

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

NATHÁLIA MAGNO GALDINO

**SÍNTESE DE NOVOS MATERIAIS DE ÓXIDO DE GRAFENO
FUNCIONALIZADO PARA APLICAÇÃO COMO BIOSSENSORES
COLORIMÉTRICOS NA DETERMINAÇÃO DE COLESTEROL
TOTAL**

Prof. Dr. Jackson Damiani Scholten
Orientador

Profa. Dra. Roberta da Silva Bussamara Rodrigues
Coorientadora

Porto Alegre, julho de 2020

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

NATHÁLIA MAGNO GALDINO

**SÍNTESE DE NOVOS MATERIAIS DE ÓXIDO DE GRAFENO
FUNCIONALIZADO PARA APLICAÇÃO COMO BIOSSENSORES
COLORIMÉTRICOS NA DETERMINAÇÃO DE COLESTEROL
TOTAL**

Tese apresentada como requisito parcial
para a obtenção do grau de Doutora em Química

Prof. Dr. Jackson Damiani Scholten
Orientador

Profa. Dra. Roberta da Silva Bussamara Rodrigues
Coorientadora

Porto Alegre, julho de 2020

Ao meu avô Luigi Magno.

Agradecimentos

Esse trabalho não seria possível sem a contribuição de diversas pessoas que fizeram parte da minha vida pessoal e profissional nos últimos quatro anos.

Agradeço primeiramente ao meu orientador professor Dr. Jackson Damiani Scholten e à minha coorientadora professora Dra. Roberta da Silva Bussamara Rodrigues que contribuíram expressivamente para minha formação e também para o desenvolvimento desse trabalho. Ao professor Jackson pelo auxílio e discussões principalmente na área de nanomateriais e por me direcionar durante essa caminhada. À professora Roberta pelos ensinamentos na área de enzimologia e também pelo suporte, principalmente na véspera do meu sanduíche.

Agradeço também a minha família, meus pais, irmãos e sobrinho, que contribuíram principalmente nos momentos de descontração com muito churrasco e chimarrão e também pelos auxílios durante esses anos, principalmente durante meu período no exterior. Gostaria de destacar a importância dos meus pais e minha avó Maria que, representando a família, puderam me visitar e incentivar enquanto estava no exterior. E um agradecimento a toda família Galdino e a família Magno, sempre reunida para qualquer comemoração.

Ao meu namorado Gabriel Zanotto que conviveu diariamente comigo durante esses quatro anos e presenciou alegrias e decepções, comemorações e também ausências; sempre me incentivando a seguir em frente. Devo reconhecer que o Gabriel foi o maior responsável pela minha ida ao exterior, pois não me deixou perder as esperanças. E pelas muitas horas de confinamento durante essa quarentena que coincidiram com a escrita desse trabalho, que se tornaram mais agradáveis na companhia dele e do Gato.

Aos meus amigos Alessandra Magno, Angélica Chini, Ariadne Köche, Brenda Rolt, Douglas Charqueiro, Evelyn Souza, Gabriela Matiello, Graciane Marin, Guilherme Belmonte, Guilherme Strapasson, Gustavo Bolzan, Iago de Sá, Jéssica Cardoso, Jéssica Petry, Juliana Dantas, Luciele Dresh, Marco Justino, Maria Cirne, Matheus Carbonari, Matheus Coldeira, Maurício Vaz, Michele Oliveira, Pablo Girardi, Paloma Campos, Rafael Brito, Suelen Cendron, Virgínia Souza e Wellington Gonçalves pelas parcerias e risadas. À minha psicóloga Alice que foi crucial durante essa jornada, principalmente no momento em que estive em San Diego.

Agradeço especialmente aos colaboradores desse trabalho que contribuíram nas discussões e também na realização de alguns experimentos. Ao Dr. Wellington D. Gonçalves e Dr. Gabriel Abarca pelas contribuições na caracterização dos materiais de óxido de grafeno funcionalizado com líquidos iônicos. À Dra. Virgínia Serra de Souza pela ajuda com a síntese e caracterização da 2,1,3-benzotiadiazolas. Ao Prof. Dr. Fabiano Severo Rodembush pelo estudo fotofísico dos materiais do capítulo II. À Profa. Dra. Naira Maria Balzaretto pelas espectroscopias Raman realizadas em ambos capítulos dessa tese. Aos técnicos e bolsistas responsáveis pelas análises que foram realizadas nesse trabalho, principalmente ao João Paulo Bruneto pela análise de XPS, à Gabriela Wentz pelo treinamento do RMN e à Larissa Rodrigues pela análise elementar.

Aos meus colegas de laboratório que fizeram dos dias no laboratório mais agradáveis, especialmente Luciele, Gabriela, Virgínia, Graciane, Iago, Zahid e dona Zenaide. Muito obrigada pela paciência quando tudo dava errado nas reações, pelos chimarrões e pela companhia nas inúmeras horas que eu ficava na salinha do espectrômetro de UV-visível. Agradeço aos outros membros dos laboratórios dos quais fiz parte, Laboratório de Catálise Molecular (LAMOCA) e Laboratório de Proteínas e Microorganismos aplicados à Química e dos colaboradores Laboratório de Fotoquímica e Superfícies (LAFOS) e Laboratório PoliBio.

Ao Prof. Dr. Joseph Wang que me acolheu em seu laboratório na Universidade da Califórnia em San Diego e propiciou que eu aprendesse muito durante minha estada lá. Ao *Brazilian Team*, Juliane Sempionatto, Paulo Raymundo Pereira, André Silva e Nathália Florência. Agradeço às pessoas que de alguma forma me fizeram sentir em casa mesmo estando tão longe: aos meus colegas de casa Kay Freeman e Ata Rajabnejad, ao colega Rupesh Mishra pela colaboração e aos meus amigos Rodolfo Mundaca, Paulo Bezerra e Juliane Sempionatto que ainda me fazem ter vontade de voltar lá. Agradeço sobretudo à Paloma Campos e ao Paulo Raymundo Pereira que foram minha família pelo tempo que estive fora, ouviram as reclamações e compartilharam das alegrias.

Aos membros da banca examinadora da qualificação de doutorado Profa. Dra. Rosane Angélica Ligabue, Profa. Dra. Maria do Carmo Martins Alves e Profa. Dra. Jacqueline Ferreira Leite Santos pelos apontamentos que contribuíram para o enriquecimento dessa tese.

Aos membros da banca examinadora da tese de doutorado Profa. Dra. Manuela Poletto Klein, Profa. Dra. Naira Maria Balzaretto, Profa. Dra. Leliz Ticona Arenas, Profa. Dra. Maria do Carmo Martins Alves, Profa. Dra. Jacqueline Ferreira Leite Santos e Prof.

Dr. Vladimir Lavayen, agradeço previamente o aceite do convite e as contribuições que possam fazer a este trabalho.

Às comissões organizadoras do Programa de Pós-graduação em Química (PPGQ) que mantém este programa funcionando nas melhores condições possíveis, mesmo frente ao corte orçamentário dos últimos anos.

Por fim, agradeço aos órgãos de fomento à pesquisa CAPES, CNPq e FAPERGS pelo auxílio financeiro que são indispensáveis para o funcionamento dos laboratórios de pesquisa e que se mostram, nesse momento em que vivemos, cada vez mais necessários. Agradeço pessoalmente a CAPES pelas duas bolsas de pesquisa concedidas na Universidade Federal do Rio Grande do Sul (Processo nº 88882.346230/2018-01) e no Programa de Doutorado Sanduíche no Exterior na Universidade da Califórnia em San Diego (Processo nº 88881.188746/2018-01).

Cite this: *J. Mater. Chem. B*, 2017, 5, 9482Received 26th September 2017,
Accepted 20th November 2017

DOI: 10.1039/c7tb02582c

rsc.li/materials-b

Sputtering deposition of gold nanoparticles onto graphene oxide functionalized with ionic liquids: biosensor materials for cholesterol detection†

Nathália M. Galdino, Gabriele S. Brehm, Roberta Bussamara,*
Wellington D. G. Gonçalves, Gabriel Abarca  and Jackson D. Scholten *

Ionic liquid (IL)-functionalized graphene oxide (GO) containing gold nanoparticles (Au NPs) (5.4–5.9 nm) deposited by sputtering combined with cholesterol oxidase appears to be a suitable and efficient biosensor for total cholesterol detection. These biosensors showed good linear range (25–340 $\mu\text{mol L}^{-1}$) for total cholesterol determination by colorimetric tests. In addition, control experiments in the presence of interferents demonstrated that the hybrid materials provided a selective detection of total cholesterol. The biosensing activities obtained for the hybrid materials indicate that these compounds are potential biosensors for clinical applications.

Nowadays, non-transmissible chronic diseases are a worldwide problem and a threat to health and human development. In particular, one of the risk factors for the development of cardiovascular disease, diabetes, atherosclerosis and hypertension is a high level of cholesterol.^{1,2} On the other hand, low level of cholesterol in blood may be associated with depression, cancer and cerebral hemorrhage.³ Cholesterol is a long-chain polycyclic alcohol, which is transported in the blood plasma of animals. Also, it is an essential component for the cell membrane and a precursor for the synthesis of other biological materials.⁴ Rapid and accurate determination of cholesterol level is fundamental to prevent diseases as mentioned above. The colorimetric method has been used for cholesterol sensing because it is easy to apply, more economical when compared to electrochemical tests, uses simple instrumentation and makes naked eye detection possible without requiring additional measurements.⁵ In this context, biosensors present many advantages compared to classical methods: low cost, rapid detection, high selectivity and sensitivity, and the possibility to produce portable devices for home or *in situ* detection.² The development of new materials that allow efficient enzyme

immobilization to maintain high activity and stability during the process is of fundamental importance in order to build a high performance biosensor for portable measurements with the same accuracy as clinical analysis. For this purpose, several kinds of hybrid biosensors have been prepared and tested, such as Au/cysteamine/Au NPs/ChOx electrode (ChOx = cholesterol oxidase),⁶ Pt/LDHs-chitosan/ChOx electrode (LDHs = layered double hydroxides),⁷ L-cysteine-rGO/GCE/Au NPs/ChOx (rGO = reduced graphene oxide, GCE = glassy carbon electrode),⁸ Au@Ag core-shell NPs,⁵ ChOx/NiFe₂O₄/CuO/FeO-chitosan/ITO (ITO = indium-tin-oxide glass substrate),⁹ ChOx-ChEt/GPTMS/ITO (ChEt = cholesterol esterase, GPTMS = (3-glycidioxypropyl)-trimethoxysilane),¹⁰ ChOx-ChEt/NiFe₂O₄ NPs-chitosan/ITO,¹¹ ChOx-ChEt/Cu₂O NPs-chitosan/ITO¹² and ChOx-ChEt/Tm₂O₃ nanorods/ITO.¹³ More examples of biosensors for cholesterol determination can be found in a previous review.² Ionic liquids (ILs) have been used as alternative materials in biosensing applications.^{14,15} Moreover, these ionic compounds have also been employed as modifiers in hybrid supports^{16–19} applied as cholesterol biosensors. However, to the best of our knowledge, there are no examples of the use of a sputtering technique to generate small and clean Au NPs on IL-modified supports and their application in the detection of cholesterol. In fact, the most common procedure to prepare Au NPs is from the reduction of gold metal precursors, which generates undesired by-products and remaining ligands. These undesired compounds can coordinate to the metal surface and decrease the particle's activity. Motivated by the advantages of ILs²⁰ and GO,²¹ in this work we combined these compounds and sputtered Au NPs to produce a simple and efficient material to be used as a biosensor for colorimetric determination of total cholesterol. In fact, the synergistic effect of the IL fragments covalently attached to the GO (rGO) together with the presence of small and clean Au NPs provides a suitable hybrid material.

The preparation of the amine-functionalized ILs (Fig. 1) and the GO modified with ILs was performed according to the methods described in ESI.† The functionalized GO supports were characterized by FTIR, Raman, X-ray diffraction (XRD) and

Instituto de Química, UFRGS, Av. Bento Gonçalves 9500, Agronomia, CEP 91501-970, Porto Alegre-RS, Brazil. E-mail: roberta.bussamara@ufrgs.br, jackson.scholten@ufrgs.br; Tel: +55-51-3308-9633

† Electronic supplementary information (ESI) available: Experimental section and additional figures. See DOI: 10.1039/c7tb02582c

Sumário

1	Introdução	1
2	Revisão bibliográfica	3
2.1	Colesterol.....	3
2.1.1	<i>Procedimento Realizado em Análises Clínicas para a Determinação do Nível de Colesterol Total no Sangue</i>	5
2.1.2	<i>Enzima Colesterol Oxidase</i>	7
2.2	Sensores e biossensores	14
2.2.1	<i>Nanomateriais aplicados a biossensores</i>	16
2.3	Grafeno e óxido de grafeno.....	19
2.3.1	<i>Materiais híbridos de óxido de grafeno funcionalizado com líquidos iônicos.....</i>	22
2.3.2	<i>Materiais híbridos de óxido de grafeno funcionalizado com moléculas orgânicas π-conjugadas</i>	28
3	Objetivos.....	32
3.1	Objetivo geral.....	32
3.2	Objetivos específicos do capítulo I	32
3.3	Objetivos específicos do capítulo II.....	32
4	Materiais e métodos.....	34
4.1	Materiais.....	34
4.2	Métodos	34
CAPÍTULO I		36
5	Procedimento experimental.....	37
5.1	Síntese do óxido de grafeno	37
5.2	Síntese do líquido iônico brometo de 1-(3-aminopropil)-1H-imidazólio (LI 1).....	38
5.3	Síntese do líquido iônico brometo de 1,3-bis(3-aminopropil)-imidazólio (LI 2).....	38
5.4	Síntese dos materiais de grafeno funcionalizados com líquidos iônicos (OG-LI).....	39
5.5	Deposição das nanopartículas de ouro por <i>sputtering</i>	40

5.6	Aplicação dos materiais de OG-LI/ Au NPs/ChOx como biossensor colorimétrico	41
5.6.1	<i>Imobilização da enzima colesterol oxidase (ChOx).....</i>	41
5.6.2	<i>Quantificação de colesterol total pelo método colorimétrico.....</i>	42
5.6.3	<i>Experimentos na presença de interferentes.....</i>	43
5.6.4	<i>Reutilização do biossensor.....</i>	43
6	Resultados e discussão.....	45
6.1	Caracterização dos líquidos iônicos	45
6.2	Caracterização dos materiais de óxido de grafeno funcionalizados com líquidos iônicos e nanopartículas de ouro	46
6.3	Aplicação dos materiais de óxido de grafeno funcionalizados com líquidos iônicos.....	56
7	Conclusões parciais do capítulo I.....	64
	CAPÍTULO II.....	66
8	Procedimento experimental.....	67
8.1	Síntese da 4,7-dibromo-2,1,3-benzotiadiazola.....	67
8.2	Síntese da 4,7-bis-(imidazol-1-il)-2,1,3-benzotiadiazola.....	68
8.3	Síntese da 4,7-bis-[1-carbóximetil-(imidazólio-3-il)]-2,1,3-benzotiadiazola... ..	69
8.4	Síntese do óxido de grafeno	69
8.5	Síntese do óxido de grafeno com lantânio	69
8.6	Síntese dos materiais de grafeno funcionalizados com derivados de BTD.....	70
8.7	Aplicação dos materiais de OG-La-BTD/ChOx como biossensor colorimétrico	71
8.7.1	<i>Preparação das soluções para o biossensor de colesterol.....</i>	71
8.7.2	<i>Otimização do tempo de reação para medição da atividade enzimática... ..</i>	72
8.7.3	<i>Otimização da quantidade de enzima colesterol oxidase utilizada no processo de imobilização nos materiais sintetizados.....</i>	72
8.7.4	<i>Otimização do tempo de imobilização</i>	73
8.7.5	<i>Determinação da concentração de colesterol total utilizando os materiais.....</i>	73

8.7.6	<i>Determinação de colesterol pelos materiais na presença de interferentes</i>	75
8.7.7	<i>Experimento de armazenamento dos materiais com a enzima imobilizada</i>	76
9	Resultados e discussões	77
9.1	Caracterização dos ligantes derivados de 2,1,3-benzotiadiazola	77
9.2	Caracterização dos materiais de óxido de grafeno funcionalizados com derivados de BTB	77
9.3	Aplicação dos materiais de óxido de grafeno funcionalizados com derivados de BTB	94
10	Conclusões parciais	110
11	Conclusões	112
12	Referências bibliográficas	114
	Anexo 1: Material suplementar	125

Lista de Figuras

Figura 1. Dez maiores causas de morte no mundo em 2016 segundo a Organização Mundial da Saúde. ¹	3
Figura 2. Visão da estrutura do sítio ativo com o cofator FAD não covalentemente ligado à enzima (A) e covalentemente ligado à enzima colesterol oxidase (B). As ligações de hidrogênio entre o cofator e a proteína estão representadas com linhas pontilhadas. Resíduos de aminoácidos presentes no sítio ativo da enzima colesterol oxidase com cofator não covalentemente ligado (C) e modelo da ligação do colesterol no sítio ativo (D). (Adaptado de Vrieling e Ghisla, 2009) ¹⁷	8
Figura 3. Canal de acesso do oxigênio molecular para a enzima colesterol oxidase de <i>Streptomyces sp.</i> Duas conformações possíveis resultam no canal aberto com a molécula de oxigênio (A) e fechado (B). (Adaptado de Vrieling e Ghisla, 2009) ¹⁷	10
Figura 4. Imagens de microscopia eletrônica de transmissão das nanopartículas <i>core-shell</i> de Au@Ag ⁴² (A) e imagens de microscopia eletrônica de varredura das nanofibras de ZnO/SiO ₂ antes e depois da deposição com alumínio ⁴⁶ (B), de nanocompósitos de <i>quantum dots</i> de carbono/CuO ₂ octaédrico ⁴⁸ (C), de dendrímeros de TiO ₂ ⁴⁷ (D) e de nanofibras poliméricas de quitosana e polivinil álcool ⁴⁵ (E).....	17
Figura 5. Estrutura dos materiais à base de grafeno: grafeno pristino com interação π - π entre carbonos sp ² (A), óxido de grafeno e óxido de grafeno reduzido (C). Interação entre o grafeno e óxido de grafeno com diferentes biomoléculas e nanopartículas (D). (Adaptado de Suvarnaphaet e Pechprasart, 2017) ³⁹	20
Figura 6. Cátions mais comumente utilizados em líquidos iônicos.	23
Figura 7. Núcleo 2,1,3-benzotiadiazola e 4,7-dibromo-2,1,3-benzotiadiazola.	30
Figura 8. Estrutura dos líquidos iônicos derivados do cátion imidazólio.....	45
Figura 9. Espectros de FTIR-ATR dos materiais óxido de grafeno (OG) (A), do LI 1 e óxido de grafeno funcionalizado com LI 1 (OG-LI 1) (B) e do LI 2 e óxido de grafeno funcionalizado com LI 2 (OG-LI 2) (C).....	47
Figura 10. Espectros de Raman dos materiais de óxido de grafeno (A), óxido de grafeno funcionalizado com LI 1 (B) e óxido de grafeno funcionalizado com LI 2 (C).....	50
Figura 11. Difratoograma de raios X dos materiais OG (A), OG-LI 1 (B), OG-LI 1/Au NPs (C), OG-LI 2 (D) e OG-LI 2/Au NPs (E).	52
Figura 12. MET dos materiais OG-LI 1/Au NPs (A) e OG-LI 2/Au NPs (B) com seus respectivos diagramas de distribuição de tamanho de partícula.....	53

Figura 13. Medida de XPS <i>survey</i> do grafite (A), óxido de grafeno (B), OG-LI 1 (C) e OG-LI 2 (D).....	54
Figura 14. Medidas de XPS de alta resolução nas regiões do C 1s, N 1s e Au 4f dos materiais de OG, OG-LI 1, OG-LI 2, OG-LI 1/Au NPs e OG-LI 2/Au NPs. Os pontos pretos representam os dados experimentais e a linha cinza, o melhor <i>fitting</i>	55
Figura 15. Determinação de colesterol livre pelo método colorimétrico por diferentes materiais (A) e imagem do típico ensaio colorimétrico utilizado os materiais OG-LI 1/Au NPs/ChOx (B) e OG-LI 2/Au NPs/ChOx (C).	59
Figura 16. Proposta da detecção de colesterol total pelos materiais OG-LI 1/Au NPs/ChOx e OG-LI 2/Au NPs/ChOx.....	62
Figura 17. Análise de interferentes e de colesterol total pelo método colorimétrico utilizando os materiais OG-LI 1/Au NPs/ChOx (a) e OG-LI 2/Au NPs/ChOx (b).....	62
Figura 18. Espectro no infravermelho com transformada de Fourier por refletância total atenuada dos materiais OG e OG-La (A), BTDI _m e OG-La-BTDI _m 2:1 (B) e BTDAc e OG-La-BTDAc 2:1 (C).	78
Figura 19. Análise termogravimétrica dos materiais óxido de grafeno (A) e óxido de grafeno com lantânio (B). Em preto está a curva de perda de massa em função da temperatura com o somatório no canto superior direito e em azul, a derivada da perda de massa.	80
Figura 20. Análise termogravimétrica do ligante BTDI _m (A) e dos materiais OG-BTDI _m (B), OG-La-BTDI _m 2:1 (D) e OG-La-BTDI _m 1:1 (D). Em preto está a curva de perda de massa em função da temperatura com o somatório no canto superior direito e em azul, a derivada da perda de massa.	81
Figura 21. Análise termogravimétrica do ligante BTDAc (A) e dos OG-BTDAc (B), OG-La-BTDAc 2:1 (D) e OG-La-BTDAc 1:1 (D). Em preto está a curva de perda de massa em função da temperatura com o somatório no canto superior direito e em azul, a derivada da perda de massa.	81
Figura 22. Espectros Raman dos materiais OG-BTDI _m (A), OG-BTDAc(B), OG-La-BTDI _m 2:1(C), OG-La-BTDAc 2:1(D), OG-La-BTDI _m 1:1(E), OG-La-BTDAc 1:1(F). Os dados obtidos estão em cinza, as deconvoluções estão representadas em linhas coloridas e o melhor <i>fitting</i> é a linha pontilhada em preto.	85
Figura 23. Espectro no UV-vis dos materiais OG e OG-La.....	87

Figura 24. Espectros de excitação (linha opaca) e de emissão de fluorescência (linha transparente) do ligante BTDI _m e dos materiais funcionalizados com BTDI _m em solução aquosa.	88
Figura 25. Espectros de excitação (linha opaca) e de emissão de fluorescência (linha transparente) do ligante BTDAc e dos materiais funcionalizados com BTDAc em solução aquosa.	89
Figura 26. Medida de XPS <i>survey</i> dos materiais OG-La (A), OG-BTDI _m (B), OG-La-BTDI _m 2:1 (C) e OG-La-BTDAc 2:1 (D).	90
Figura 27. Espectros de XPS de alta resolução das regiões do C 1s (A), O 1s (B), La 3d (C) e N 1s (D) do material OG-La-BTDI _m	91
Figura 28. Cinética da enzima livre ChOx (0,04 U) com 9,5 mg dL ⁻¹ de colesterol.....	94
Figura 29. Absorbância em 500 nm das reações com 9,5 mg dL ⁻¹ de colesterol utilizando diferentes concentrações de enzima ChOx livre. Avaliação da imobilização no material OG-La-BTDI _m 2:1/ChOx, sobrenadante e lavagens pós imobilização de 24 h.	96
Figura 30. Curva analítica da quantificação colorimétrica de colesterol total em diferentes concentrações utilizando a enzima livre (ChOx) nas condições otimizadas.	100
Figura 31. Curvas analíticas da quantificação colorimétrica de colesterol total em diferentes concentrações utilizando os materiais: OG, OG/ChOx, OG-La e OG-La/ChOx nas condições otimizadas.....	100
Figura 32. Curvas analíticas da quantificação colorimétrica de colesterol total em diferentes concentrações utilizando os materiais: OG-BTDI _m , OG-BTDI _m /ChOx, OG-La-BTDI _m 2:1, OG-La-BTDI _m 2:1/ChOx, OG-La-BTDI _m 1:1 e OG-La-BTDI _m 1:1/ChOx nas condições otimizadas.....	101
Figura 33. Curvas analíticas da quantificação colorimétrica de colesterol total em diferentes concentrações utilizando os materiais: OG-BTDAc, OG-BTDAc/ChOx, OG-La-BTDAc 2:1, OG-La-BTDAc 2:1/ChOx, OG-La-BTDAc 1:1 e OG-La-BTDAc 1:1/ChOx nas condições otimizadas.....	101
Figura 34. Estudo de interferentes na detecção simultânea com colesterol total por OG-La-BTDI _m 1:1/ChOx. A linha pontilhada corresponde a 5% de erro em relação à atividade obtida para 1,98 mg dL ⁻¹ de colesterol total.	107
Figura 35. Porcentagem de atividade dos biossensores em relação ao tempo de armazenamento.....	108

Lista de Esquemas

Esquema 1. Reação de oxidação do colesterol na presença de colesterol oxidase e reação secundária produzindo o corante quinonimina.....	6
Esquema 2. Etapas de reação catalisadas pela enzima colesterol oxidase. (Adaptado de Vrielink e Ghisla, 2009) ¹⁷	9
Esquema 3. Componentes de um biossensor enzimático.	15
Esquema 4. Métodos de funcionalização covalente do óxido de grafeno com líquidos iônicos (A) e interação π - π entre a monocamada de carbono e o anel imidazólio (B). (Adaptado de Verma, 2019 ⁷⁹).....	24
Esquema 5 Modificação do grafeno covalentemente com sal de diazônio monoarilo (A) e bisarilo (B) e interação π - π com bispireno (C). (Adaptado de Liu, 2012 ⁹³).....	28
Esquema 6. Proposta de estrutura do material sem íon metálicos GO-DPyE e com íon metálico GO-La ⁺³ -DPyE. (Adaptado de Zhang, 2018 ⁹⁴)	29
Esquema 7. Rota de síntese dos materiais de óxido de grafeno funcionalizados com líquidos iônicos e nanopartículas de ouro com a enzima colesterol oxidase imobilizada para aplicação como biossensor.	37
Esquema 8. Síntese do líquido iônico brometo de 1-(3-aminopropil)-1H-imidazólio (LI 1).....	38
Esquema 9. Síntese do líquido iônico brometo de 1,3-bis(3-aminopropil)-1H-imidazólio (LI 2).....	39
Esquema 10. Ilustração da preparação do óxido de grafeno funcionalizado com líquido iônico. (Adaptado de YANG, 2009 ¹¹⁰).....	40
Esquema 11. Modelo simplificado da deposição de nanopartículas pelo método de <i>sputtering</i>	40
Esquema 12. Etapas da reação colorimétrica de quantificação do colesterol: pesar 3 mg de material sólido em um <i>ependorf</i> (A), adicionar tampão de fosfato, reagente de cor e solução de colesterol (B), incubar a 37 °C por 1 h (C) e medir a absorção na região do UV-vis (D).....	43
Esquema 13. Rota de síntese dos materiais de óxido de grafeno funcionalizados com derivados de BTB na presença ou não de La ⁺³ e a enzima colesterol oxidase para aplicação como biossensor.	67
Esquema 14. Reação de bromação da 2,1,3-benzotiadiazola.....	68

Esquema 15. Síntese da 4,7-bis-(imidazol-1-il)-2,1,3-benzotiadiazola (BTDIIm).	68
Esquema 16. Síntese da 4,7-bis-[1-carbóximetil-(imidazol-3-il)]-2,1,3-benzotiadiazola (BTDAc).....	69
Esquema 17. Esquema dos três tipos de materiais sintetizados com BTDIIm ou BTDAc: OG funcionalizado com BTDI, OG-La com BTDI na proporção 2:1 (B) e na proporção 1:1 de La:BTDI (C).....	70

Lista de Tabelas

Tabela 1. Métodos de imobilização enzimática e suas características ^{20, 21}	11
Tabela 2. Materiais de grafeno funcionalizado com líquido iônico com aplicação na área de sensores e biossensores eletroquímicos.	26
Tabela 3. Análise elementar dos materiais funcionalizados com LIs e do suporte OG e porcentagem em massa e quantidade molar de LI estimada	49
Tabela 4. Porcentagem de colesterol oxidase imobilizada nos materiais e atividade recuperada dos biossensores em relação à enzima livre.....	57
Tabela 5. Equação da curva analítica, coeficiente de regressão linear e sensibilidade dos materiais na determinação de colesterol total.....	59
Tabela 6. Comparativo da resposta analítica de vários biossensores para colesterol.....	63
Tabela 7. Materiais testados para quantificação de colesterol total com os respectivos componentes	74
Tabela 8. Dados da análise termogravimétrica dos materiais funcionalizados com derivados de BTD desconsiderando a contribuição do solvente	82
Tabela 9. Análise elementar dos materiais funcionalizados com BTD e dos suportes OG e OG-La e porcentagens em massa de BTD, oxigênio e lantânio estimadas	83
Tabela 10. Componentes da deconvolução da análise de XPS com a porcentagem por região de alta resolução em cada material analisado	92
Tabela 11. Porcentagem de imobilização e atividade recuperada do material para diferentes quantidades de enzima em uma reação com 9,5 mg dL ⁻¹ de colesterol.....	96
Tabela 12. Absorções e atividade enzimática para ChOx livre e OG-La-BTDIm 2:1/ChOx em diferentes tempos de imobilização e a atividade recuperada.....	97
Tabela 13. Porcentagem de enzima imobilizada e atividade recuperada dos materiais para a reação na presença de 9,5 mg dL ⁻¹ de colesterol	98
Tabela 14. Figuras de mérito das curvas analíticas para quantificação de colesterol total utilizando materiais de óxido de grafeno modificados com derivados de BTD com e sem lantânio e imobilizados com a enzima colesterol oxidase.....	103
Tabela 15. Regressão linear e constantes extraídas dos gráficos de Lineweaver-Burk para os materiais de óxido de grafeno funcionalizados com derivados de BTD com enzima colesterol oxidase	106

Abreviaturas

BTD: 2,1,3-benzotiadiazola

BTDAc: 4,7-bis-[1-carbóximetil-(imidazol-3-il)]-2,1,3-benzotiadiazola

BTDIm: 4,7-bis-(imidazol-1-il)-2,1,3-benzotiadiazola

ChEt: colesterol esterase

ChOx: colesterol oxidase

CM: quilomícrons

DCNT: doenças crônicas não transmissíveis

DMSO: dimetilsulfóxido

DRX: difração de raios X

DPyE: bis(4-piridil)acetileno

FAD: flavina adenina dinucleotídeo

FTIR-ATR: infravermelho com transformada de Fourier no modo de reflexão total atenuada

GQDs: *quantum dots* baseados em grafeno

HDL: lipoproteínas de alta densidade

IDL: lipoproteínas de densidade intermediária

LDL: lipoproteínas de baixa densidade

LI: líquido iônico

LI 1: brometo de 1-(3-aminopropil)-1H-imidazólio

LI 2: brometo de 1,3-bis(3-aminopropil)-imidazólio

LOD: limite de detecção

LOQ: limite de quantificação

MET: microscopia eletrônica de transmissão

MOFs: estruturas metalorgânicas

NPs: nanopartículas

OG: óxido de grafeno

RMN: ressonância magnética nuclear

rOG: óxido de grafeno reduzido

SPR: ressonância plasmônica de superfície

VLDL: lipoproteínas de muito baixa densidade

TGA: análise termogravimétrica

THF: tetraidrofurano

UV-vis: ultravioleta-visível

XPS: espectroscopia de fotoelétrons excitados por raios X

Resumo

O colesterol apresenta diversas funções vitais ao organismo vivo, mas também está associado a muitas doenças, principalmente doenças cardiovasculares. Portanto, a quantificação do colesterol no plasma sanguíneo é importante tanto para a prevenção como para o tratamento dessas doenças. Para isso, têm-se investido no estudo de nanomateriais para aplicação na área de sensores e biossensores, principalmente a utilização de nanoestruturas de carbono. Dentre elas, o óxido de grafeno tem a vantagem de ter alta razão superfície/volume, além de ser biocompatível e apresentar grupos oxigenados passíveis de funcionalização. Nesse trabalho dois grupos de materiais de óxido de grafeno funcionalizados foram sintetizados, caracterizados e aplicados como biossensores colorimétricos para quantificação de colesterol total.

No primeiro capítulo, o óxido de grafeno foi funcionalizado com líquidos iônicos derivados do cátion imidazólio e nanopartículas de ouro foram depositadas por *sputtering* na superfície do material. Esses materiais foram caracterizados por espectroscopia no FTIR-ATR e Raman, XPS, análise elementar, MET e DRX. Enquanto o óxido de grafeno funcionalizado com brometo de 1-(3-aminopropil)-1H-imidazólio apresentou estrutura tipo grafeno, as duas aminas terminais do brometo de 1,3-bis(3-aminopropil)-imidazólio se ligaram às folhas de óxido de grafeno formando uma estrutura grafítica. Os materiais de óxido de grafeno funcionalizados com brometo de 1-(3-aminopropil)-1H-imidazólio ou brometo de 1,3-bis(3-aminopropil)-imidazólio, nanopartículas de ouro e enzima colesterol oxidase imobilizada apresentaram atividades recuperadas de 78% e 55% e sensibilidades de 0,1274 e 0,0969 u.a. dL mg⁻¹, respectivamente, na detecção de colesterol total.

No capítulo II, o óxido de grafeno foi funcionalizado com derivados de 2,1,3-benzotiadiazolas com ou sem lantânio. Os materiais foram caracterizados por espectroscopia no FTIR-ATR, de fluorescência e Raman, TGA, análise elementar e XPS através das informações obtidas, foi possível estimar os tipos de interações existentes entre o OG, La³⁺ e o ligante 2,1,3-benzotiadiazolas. Os materiais de óxidos de grafeno funcionalizados com 4,7-bis-(imidazol-1-il)-2,1,3-benzotiadiazola com e sem lantânio apresentaram o melhor desempenho na quantificação de colesterol total, com sensibilidade de 0,0649 e 0,0618 u.a. dL mg⁻¹, respectivamente. Estes materiais apresentaram porcentagem de imobilização (> 90%), atividade recuperada, resistência ao

armazenamento e faixa de detecção melhores que os materiais análogos com cloreto de 4,7-bis-[1-carbóximetil-(imidazol-3-il)]-2,1,3-benzotiadiazola.

Em ambos os capítulos evidenciou-se que a funcionalização do óxido de grafeno é essencial para a quantificação do colesterol, à medida que os materiais não funcionalizados não foram capazes de distinguir as diferentes concentrações do analito, e que a estrutura dos nanomateriais funcionalizados influencia na atividade do biossensor.

Palavras-chave: óxido de grafeno funcionalizado, líquidos iônicos, derivados de 2,1,3-benzotiadiazolas, biossensores, colesterol.

Abstract

Cholesterol has several functions of live organs, but it is also associated with many diseases, mainly cardiovascular diseases. Therefore, the quantification of cholesterol in blood plasma is important for both the prevention and treatment of these diseases. The researches have been studying nanomaterials for applications in the field of sensors and biosensors, specially the carbon nanostructures. For this purpose, graphene oxide has the advantage of having a high surface-to-volume ratio, in addition to being biocompatible and having oxygenated groups capable of functionality. In this work, two groups of functionalized graphene oxide materials were synthesized, characterized and used as colorimetric biosensors for total cholesterol quantification.

In the first chapter, the graphene oxide was functionalized with imidazolium ionic liquids and gold nanoparticles were deposited by sputtering on the surface of the material. These materials were characterized by FTIR-ATR and Raman spectroscopy, XPS, elemental analysis, TEM and XRD. Whereas the graphene oxide functionalized with 1-(3-aminopropyl)-1H-imidazole bromide had a graphene-like structure, the two terminal amine groups of 1,3-bis(3-aminopropyl)-imidazole bromide bond to the sheets of graphene oxide forming a graphitic-like structure. The graphene oxide functionalized with 1-(3-aminopropyl)-1H-imidazole bromide or 1,3-bis(3-aminopropyl)-imidazole bromide, gold nanoparticles and cholesterol oxidase enzyme immobilized materials exhibit recovered activities of 78% and 55% and sensitivities of 0.1274 and 0.0969 a.u. dL mg⁻¹, respectively, in the detection of total cholesterol.

In chapter II, graphene oxide was functionalized with 2,1,3-benzothiadiazole compounds with or without lanthanum. The materials were characterized by FTIR-ATR, Raman and fluorescence spectroscopy, TGA, elemental analysis and XPS, from the obtained information, it was possible to estimate the types of interaction among GO, La³⁺ and the BTD ligand. The graphene oxide functionalized with 4,7-bis-(imidazol-1-yl)-2,1,3-benzothiadiazole with and without lanthanum materials presented the best performance for the quantification of total cholesterol with sensitivity of 0.0649 and 0.0618 a.u. dL mg⁻¹, respectively. These materials showed a percentage of immobilization (> 90%), recovered activity, resistance to storage and detection range better than analogous materials with 4,7-[1-carboximetyl-(imidazol-3-yl)]-2,1,3-benzothiadiazole chloride.

In both chapters, it is evident that the functionality of graphene oxide is essential for the quantification of cholesterol, as the non-functional materials were not able to distinguish how different tests of the analyst and which structure of the functional nanomaterials influenced in the activity of the biosensor.

Keywords: functionalized graphene oxide, ionic liquids, 2,1,3-benzothiadiazole derivatives, biosensor, cholesterol.

1 Introdução

O colesterol é responsável por diversas funções biológicas, desde a síntese de hormônios até o funcionamento das sinapses. Por isso, a falta de colesterol pode desencadear depressão, hipertireoidismo, anemia e doenças respiratórias e neurológicas. Por outro lado, o excesso de colesterol é muito mais comum e prejudicial à saúde. Níveis elevados de colesterol estão associados a diversas doenças, sendo as doenças cardiovasculares as mais recorrentes no mundo. Por esses motivos, a determinação da concentração de colesterol no plasma sanguíneo ou outro biofluido é essencial para a prevenção e tratamento de diversas doenças.

A pesquisa na área de biossensores tem se destacado para a quantificação de analitos no meio biológico por ser um método simples e de baixo custo em relação às técnicas cromatográficas comumente utilizadas. Além disso, permitem a produção de dispositivos portáteis de fácil e rápida operação. Os biossensores são dispositivos que reconhecem o analito através de uma biomolécula, como por exemplo as enzimas, e traduzem o sinal para um sinal mensurável com o auxílio de um transdutor. Os biossensores colorimétricos para colesterol são fundamentados na reação com o subproduto da oxidação do colesterol, o peróxido de hidrogênio, produzindo um corante pela reação com o reagente de cor. A vantagem dessa técnica é que pode ser operada sem necessitar de um profissional treinado e o sinal é medido a olho nu ou utilizando um espectrofotômetro.

Comercialmente, não há muitos dispositivos disponíveis para quantificação de colesterol, pois ainda há muitos desafios nessa área. O maior desafio reside na imobilização e estabilização da enzima colesterol oxidase em suportes, responsável pela oxidação do colesterol. A imobilização da enzima colesterol oxidase, além de ser necessária do ponto de vista econômico, deve ser realizada de forma que a enzima se encontre disponível para a reação, sem impedimento difusional e facilite a transdução do biossensor. Por isso, a busca por novos materiais que favoreçam a imobilização eficiente da enzima colesterol oxidase é uma área emergente.

Os nanomateriais são excelentes candidatos para a imobilização enzimática pela alta razão superfície/volume. Dentre os nanomateriais, o óxido de grafeno se destaca por ser biocompatível, ter boas propriedades mecânicas e elétricas e permitir a funcionalização. A funcionalização do óxido de grafeno adiciona grupos funcionais superficiais que facilitam a interação com biomoléculas e pode modificar as propriedades

do material. Os líquidos iônicos e as moléculas π -conjugadas são excelentes candidatos para a funcionalização do óxido de grafeno.

Visto que as atitudes preventivas devem prevalecer as atitudes corretivas, a justificativa para o desenvolvimento dessa pesquisa encontra-se na importância de explorar outras possibilidades para a quantificação de colesterol em biofluidos, contribuindo para a prevenção de diversas doenças. A imobilização da enzima colesterol oxidase possibilita a reutilização do biossensor, diminuindo o ônus normalmente associado à enzima. Adicionalmente, a utilização de uma metodologia simples como a colorimetria permite a quantificação de colesterol total tanto em plasma sanguíneo como em biofluidos não invasivos, como a saliva.

Assim sendo, o objetivo desse estudo foi sintetizar, caracterizar e aplicar como biossensores colorimétricos para colesterol materiais de óxido de grafeno funcionalizado. No primeiro capítulo foram estudados materiais de óxido de grafeno funcionalizados com líquidos iônicos derivados do imidazólio com nanopartículas de ouro depositadas por *sputtering*. No capítulo II, foram estudados materiais funcionalizados com derivados de 2,1,3-benzotiadiazolas com e sem lantânio.

2 Revisão bibliográfica

2.1 Colesterol

Segundo a Organização Mundial da Saúde,¹ as doenças crônicas não transmissíveis (DCNT) são as maiores responsáveis pelas mortes no mundo e recaem principalmente sobre os países em desenvolvimento.² Entre as principais DCNT encontram-se doenças cardiovasculares, doenças respiratórias crônicas, diabetes, câncer, doenças renais, entre outras.² Segundo o Ministério da Saúde, em 2010, as doenças cardiovasculares - maiores responsáveis pelos custos referentes à internação hospitalar no sistema de saúde nacional² - foram responsáveis por 326 mil mortes no Brasil, ou seja, cerca de 1.000 mortes/dia;³ sendo a principal causa de morte no país. Segundo a Sociedade Brasileira de Cardiologia, as razões para esse cenário são os fatores socioculturais e a falta de infraestrutura que acabam por evoluir uma doença que poderia ser prevenida, causando ainda outras enfermidades como diabetes e hipertensão.³ Nesse sentido, ressalta-se a importância de um diagnóstico clínico prévio e do tratamento imediato a fim de melhorar a qualidade de vida da população e diminuir os custos do sistema de saúde. Um dos fatores de risco para o desenvolvimento das doenças cardiovasculares e diabetes – que representam três das dez maiores causas de morte no mundo (Figura 1)¹ - é o nível elevado do colesterol, principalmente devido ao consumo excessivo de alimentos processados e à redução na prática de atividades físicas.²

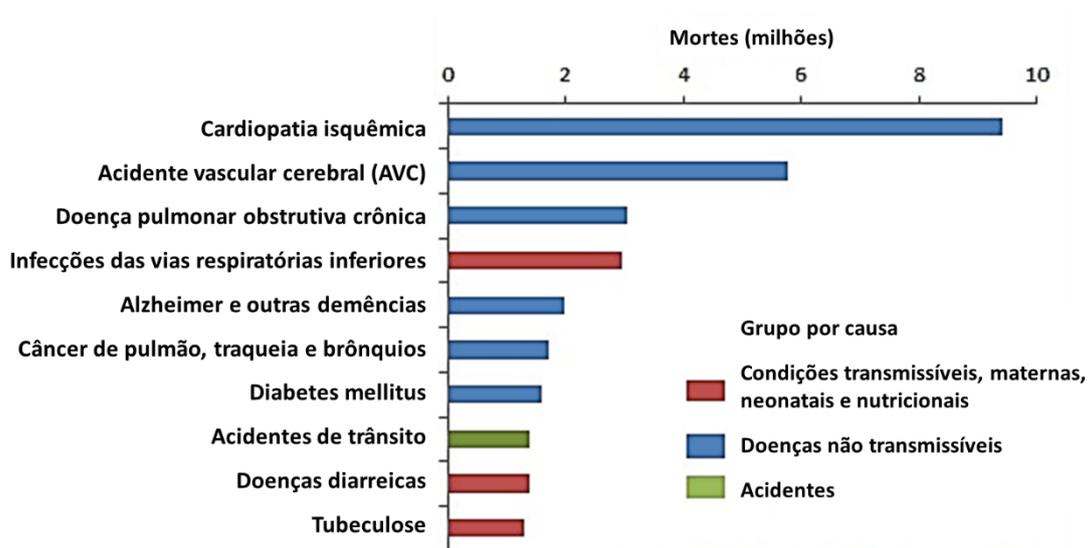


Figura 1. Dez maiores causas de morte no mundo em 2016 segundo a Organização Mundial da Saúde.¹

O colesterol, apesar de ser um composto fundamental para muitos processos bioquímicos, é mais conhecido pela associação com as doenças cardiovasculares. O colesterol é um lipídio transportado no plasma sanguíneo de todos os animais e constituído por um anel esteroide rígido com uma cadeia isoocatila e um grupo álcool.⁴ Esse esteroide pode ser absorvido a partir de alimentos ou sintetizado no fígado utilizando outros componentes dietéticos, principalmente gordura.⁵ O colesterol é um componente essencial nas membranas celulares,⁴ nas células nervosas⁶ e precursor de outros materiais biológicos (como o ácido biliar, a vitamina D e os hormônios esteroides).⁷

Como o colesterol pertence à classe dos lipídeos, este possui solubilidade relativamente baixa em água e, conseqüentemente, no sangue. Para que o mesmo seja transportado através da corrente sanguínea é necessário que se ligue a diversos tipos de proteínas, formando as lipoproteínas (moléculas globulares com superfície composta principalmente por proteínas hidrossolúveis), onde o colesterol se encontra majoritariamente na forma esterificada.^{5, 8} As lipoproteínas são classificadas de acordo com a sua densidade: quilomícrons (*Chylomicrons*, CM), lipoproteínas de muito baixa densidade (*Very Low-Density Lipoprotein*, VLDL), de baixa densidade (*Low-Density Lipoprotein*, LDL), de densidade intermediária (*Intermediate-Density Lipoprotein*, IDL), e de alta densidade (*High-Density Lipoprotein*, HDL).⁹ As duas principais lipoproteínas usadas para o diagnóstico dos níveis de colesterol, além do colesterol total, são as lipoproteínas LDL e HDL. Acredita-se que as LDL em excesso são malélicas ao ser humano devido à sua principal função ser o transporte do colesterol proveniente do fígado aos tecidos periféricos, aumentando o risco de complicações cardiovasculares.¹⁰ Por outro lado, o HDL é um indicador inverso aos eventos cardiovasculares à medida que esta lipoproteína é capaz de remover o excesso de colesterol livre levando-o ao fígado, onde é eliminado.⁸ O HDL também previne disfunções endoteliais, que ocorre pela deposição do colesterol ou placas lipoproteicas nas paredes das artérias (aterosclerose) - tornando-as mais duras, menos flexíveis e, inclusive, bloqueando o fluxo sanguíneo para o coração.⁸

Observa-se, no entanto, que os níveis de colesterol total estão diretamente relacionados com as doenças cardiovasculares; estudos comprovam que indivíduos com níveis de colesterol total elevado no plasma sanguíneo ($>200 \text{ mg dL}^{-1}$) têm o dobro de chance de apresentarem cardiopatia isquêmica que os pacientes com níveis normais ($<180 \text{ mg dL}^{-1}$).¹⁰ Portanto, níveis elevados de colesterol total estão associados à diversas doenças, como aterosclerose, nefrose, diabetes mellitus, mixedema, icterícia, hipertensão, doenças vasculares, entre outros.^{6, 11} Em contraponto, devido à importância do colesterol

para a manutenção da vida, sua carência pode estar associada com hipertireoidismo, má absorção, anemia, depressão, câncer e doenças respiratórias.^{6, 11} Além do plasma sanguíneo, colesterol total e esterificado podem ser encontrados na saliva, suor e urina, entre outros biofluidos.¹²⁻¹⁵ Nesse sentido, a quantificação de colesterol em biofluidos é de grande importância em aplicações clínicas. Cabe ressaltar, por exemplo, que no caso de diabetes, dados referentes à brasileiros com 20 anos ou mais mostram que há um aumento no diabetes autorrelatado de 3,3% em 1998 para 5,3% em 2008 correlacionado principalmente ao maior acesso a testes diagnósticos, essenciais para a identificação da doença e tratamento adequado em fase inicial.²

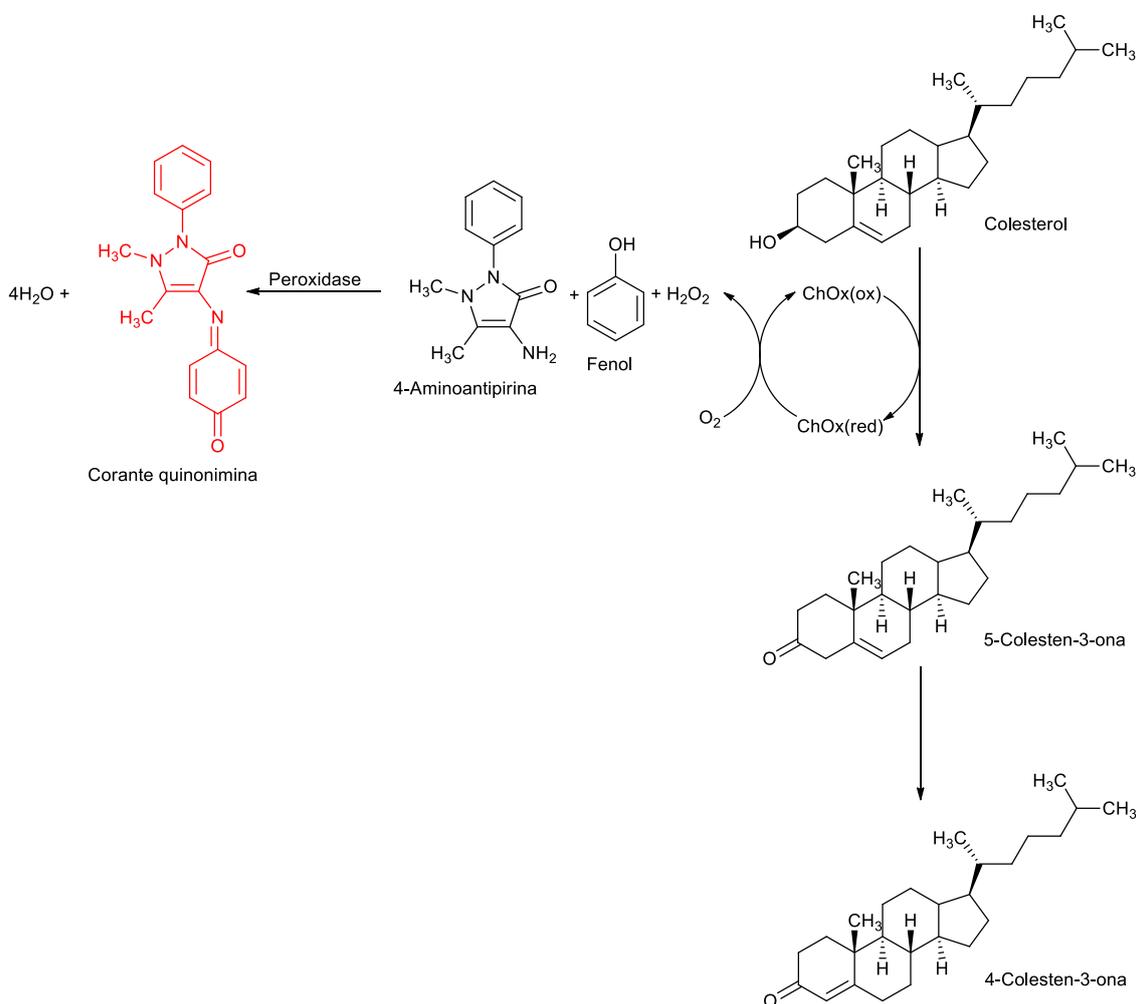
Dessa maneira e afirmando que as atitudes preventivas devem prevalecer às atitudes corretivas, facilitar a quantificação de colesterol a partir de testes rápidos contribuiria no sentido geral para precaução de diversas doenças.

2.1.1 *Procedimento Realizado em Análises Clínicas para a Determinação do Nível de Colesterol Total no Sangue*

Os métodos para quantificação de colesterol total podem ser divididos em três categorias: métodos químicos baseados no protocolo de Abell-Kendall, métodos enzimáticos (colorimétricos, eletroquímicos ou fluorimétricos) e métodos analíticos instrumentais, tais como cromatografia líquida e gasosa ou espectrometria de massas.^{9, 14} Enquanto os métodos químicos e analíticos instrumentais envolvem várias etapas, os ensaios enzimáticos são técnicas mais simples e, por isso, são comumente empregados em kits de ensaios, dispositivos portáteis e analisadores automatizados.⁹

O método colorimétrico enzimático vem sendo aplicado para ensaios clínicos desde 1974.¹⁶ Como a maior parte do colesterol do sangue se encontra na forma esterificada, é necessária a enzima colesterol esterase (EC 3.1.1.13) para liberar o colesterol na forma alcóolica (colesterol total).⁹ Para determinar a quantidade de colesterol livre no plasma em análises clínicas se utiliza a enzima colesterol oxidase (ChOx), capaz de oxidar o colesterol a colesterona, produzindo H₂O₂ como subproduto. A determinação do colesterol do sangue pode ser determinada através dos métodos colorimétricos de Allain ou Nishiya.^{11, 16} O método de Allain é o mais comumente utilizado em análises clínicas e está fundamentado na oxidação do colesterol pela enzima (livre ou imobilizada) produzindo peróxido de hidrogênio no meio reacional. O peróxido de hidrogênio pode ser quantificado a partir da reação com fenol e 4-aminoantipirina, na presença da enzima peroxidase como catalisador, produzindo o corante quinonimina, que

absorve na região do ultravioleta-visível (UV-vis) (Esquema 1). A quantificação de colesterol utilizando a enzima colesterol oxidase é realizada por espectroscopia na região UV-vis em 500 nm.



Esquema 1. Reação de oxidação do colesterol na presença de colesterol oxidase e reação secundária produzindo o corante quinonimina.

Desde a invenção dos eletrodos enzimáticos por Clark em 1962, os ensaios enzimáticos vêm sendo amplamente estudados e evoluíram para análises de resposta rápida, sensível, estável e de fácil utilização. A quantificação colorimétrica e eletroquímica são os métodos ideais utilizados em dispositivos portáteis devido aos sistemas de detecção de baixo custo e miniaturizados. Os testes rápidos visam reproduzir as análises clínicas com maior acurácia e, por isso, vêm sendo explorados nas pesquisas e na indústria.¹⁴ O método colorimétrico é particularmente atraente para utilização em dispositivos portáteis, porque os resultados medidos podem ser simplesmente lidos a olho nu ou através da absorbância do corante produzido. Essas metodologias empregam a

enzima colesterol oxidase livre ou imobilizada ou materiais que mimetizem sua ação.¹⁴ Tradicionalmente, a enzima ChOx é utilizada no controle de colesterol total e esterificado em plasma ou sangue, em membrana celular, em pedras da vesícula, bile e amostras de comida.¹¹

2.1.2 *Enzima Colesterol Oxidase*

A enzima colesterol oxidase ou 3 β -hidroxiesterol oxidase (EC 1.1.3.6) é uma oxidorreductase da ligação CH-OH que atua primariamente na oxidação do colesterol. A ChOx possui o cofator FAD (flavina adenina dinucleotídeo) como catalisador redox, cuja ligação à enzima pode ocorrer de duas formas. Na maioria dos casos, o FAD está fortemente, mas não covalentemente ligado à proteína (Figura 2A), como ocorre nos gêneros: *Streptomyces sp.*, *Rhodococcus equi*, *Vibrio harveyi HY01*, *Salinispora arenicola*, *Nostoc punctiforme*, *Frankia sp.*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium leprae*, *Corynebacterium urealyticum*, *Streptomyces coelicolor*.¹⁷ Nos gêneros *Brevibacterium sterolicum*, *Burkholderia cepacia*, *Burkholderia thailandensis*, *Chromobacterium sp.*, *Rhodococcus erythropolis*, o FAD está covalentemente ligado à proteína pelo grupo 8-metil da isoaloxazina (Figura 2B).¹⁷ Os diferentes gêneros apresentam sequência de aminoácidos características de 509 a 645 resíduos de aminoácidos que correspondem de 47 a 60 kDa¹⁷ (aproximadamente 2,5 nm), que influenciam em sua estrutura e propriedades cinéticas da enzima. Importante ressaltar que, as enzimas que possuem FAD não covalentemente ligado podem liberar o cofator em condições de desnaturação, como aquecimento acima de 90 °C ou pH abaixo de 2,0.¹⁷ Apesar das diferenças estruturais entre as formas enzimáticas, ambas possuem uma cavidade hidrofóbica para interagir com o anel esteroide do substrato (Figura 2C e D).¹¹ Além disso, o mecanismo de reação dessa flavoproteína atraiu grande interesse, pois foi a primeira enzima onde se descobriu um túnel molecular específico para acesso do oxigênio.¹⁷

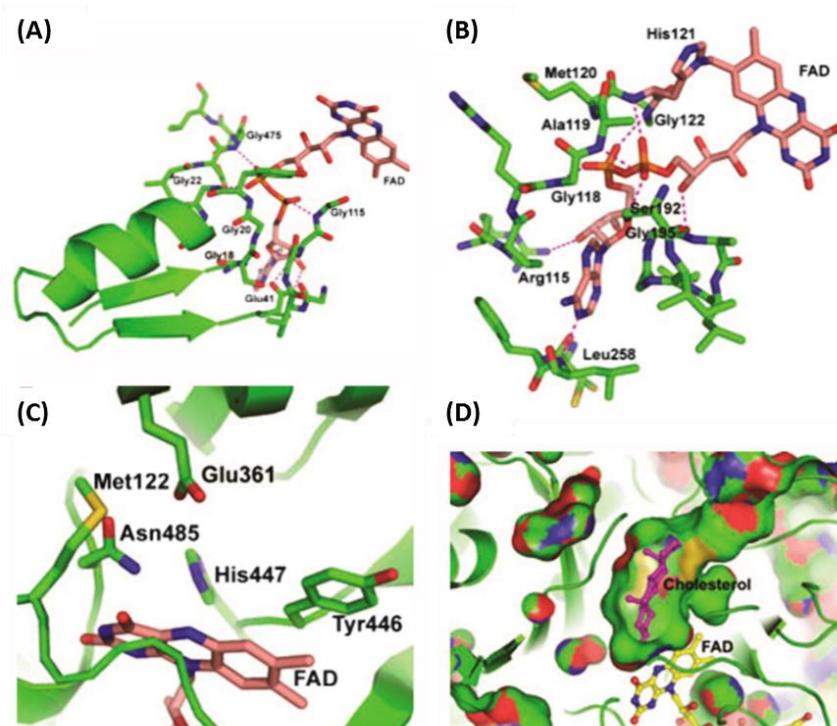
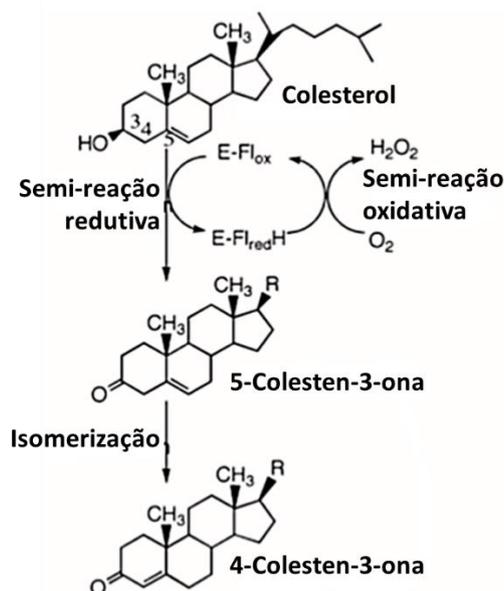


Figura 2. Visão da estrutura do sítio ativo com o cofator FAD não covalentemente ligado à enzima (A) e covalentemente ligado à enzima colesterol oxidase (B). As ligações de hidrogênio entre o cofator e a proteína estão representadas com linhas pontilhadas. Resíduos de aminoácidos presentes no sítio ativo da enzima colesterol oxidase com cofator não covalentemente ligado (C) e modelo da ligação do colesterol no sítio ativo (D). (Adaptado de Vrieling e Ghisla, 2009)¹⁷

A colesterol oxidase catalisa três reações químicas. Inicialmente, ocorre a desidrogenação no grupo funcional álcool e na posição 3 do anel esteroide, transferindo dois hidrogênios e levando a enzima da forma oxidada para reduzida (semi-reação redutiva). Na sequência, a enzima é oxidada pela reação com oxigênio molecular, gerando peróxido de hidrogênio (semi-reação oxidativa). Por fim, o esteroide oxidado é isomerizado, transferindo a dupla ligação da ligação C-C da posição 5-6 para 4-5, formando o produto de reação 4-colesten-3-ona (Esquema 2).^{11, 17}



Esquema 2. Etapas de reação catalisadas pela enzima colesterol oxidase. (Adaptado de Vrieling e Ghisla, 2009)¹⁷

Para que essa sequência de reações ocorra, são necessárias algumas condições presentes no sítio ativo da enzima, muito bem reportadas por Vrieling e Ghisla para a enzima com FAD não covalentemente ligado.¹⁷ Para que ocorra a oxidação do colesterol, a maioria dos autores concorda que deva iniciar com a transferência do hidreto do carbono ligado ao grupo álcool (CH-OH) para o cofator da enzima. Para que essa transferência ocorra, é necessário o alinhamento dos orbitais envolvidos e uma base que aceite o próton ligado ao oxigênio. Estudos sugerem que o grupo histidina (His 447, Figura 2) auxilia na orientação correta do substrato, para que haja o alinhamento dos orbitais e a transferência de hidreto para o cofator. O grupo tirosina (Tyr 446, Figura 2), que exerce pressão estérica sobre o anel isoaloxazina impedindo o cofator de reduzir, e toda a cadeia lateral é reorientada quando há ligação com o substrato, sendo um exemplo de um mecanismo de ajuste induzido para a modulação dos potenciais redox do cofator. Por outro lado, a asparagina (Asn 485, Figura 2) se movimenta em direção ao anel de isoaloxazina a fim de estabilizar o cofator reduzido, ao mesmo tempo que permite o acesso do oxigênio ao sítio ativo. Possivelmente, o glutamato (Glu 361, Figura 2) age como base tanto para abstrair o hidrogênio da ligação -OH como para a reação de isomerização, logo após a transferência do hidrogênio. Na isomerização, o hidrogênio ligado ao C4 é transferido para o C6 utilizando o glutamato como base. Normalmente, a etapa de isomerização é mais rápida que a liberação do intermediário pelo sítio ativo. Estudos sugerem que, para

enzima com FAD covalentemente ligado, a liberação do produto ocorre antes da semi-reação oxidativa; enquanto para a enzima com FAD não covalentemente ligado, a liberação do produto e H_2O_2 ocorrem concomitantemente.

No entanto, a oxidação dessa enzima acontece de forma diferente das flavoproteínas típicas; estudos indicam que não há formação de intermediário, durante a conversão da forma reduzida para a oxidada. A oxidação da enzima com oxigênio, é uma etapa de interesse da comunidade científica à medida que o controle da entrada e reatividade do oxigênio acontecem de modo particular, utilizando um canal específico (Figura 3). A cinética observada para a enzima com FAD não covalentemente ligado indica que o oxigênio molecular forma um pré-complexo antes de reagir com o cofator redox, reativando o catalisador para a reação com a próxima molécula de colesterol.¹⁷ Todos esses aspectos mostram a complexidade e especificidade do processo de oxidação do colesterol pela enzima colesterol oxidase, envolvendo um mecanismo de três etapas com mudança de conformação com a entrada do substrato e também para abertura do canal do oxigênio.

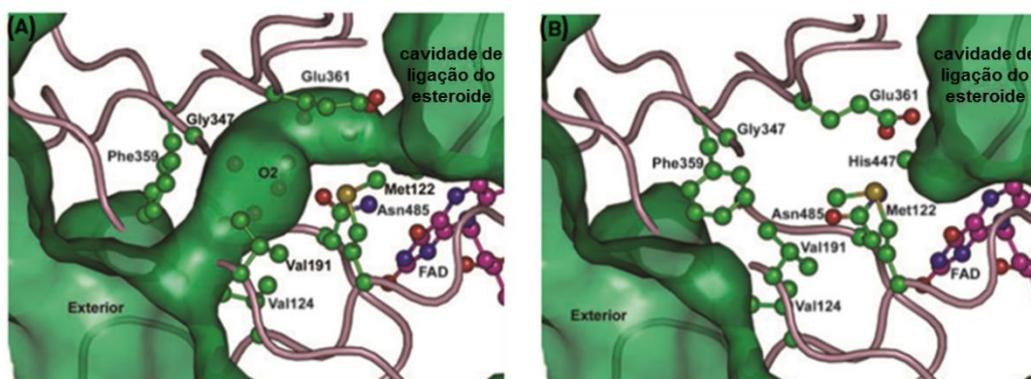


Figura 3. Canal de acesso do oxigênio molecular para a enzima colesterol oxidase de *Streptomyces sp.* Duas conformações possíveis resultam no canal aberto com a molécula de oxigênio (A) e fechado (B). (Adaptado de Vrielink e Ghisla, 2009)¹⁷

A atividade catalítica da ChOx é altamente dependente da composição do tampão, pH e do tipo e concentração de surfactante utilizado para solubilizar o substrato.¹⁸ A colesterol oxidase é produzida por microrganismos patogênicos e não patogênicos no meio intracelular, extracelular ou ligada a membrana. Mais informações sobre a produção e purificação dessa enzima podem ser encontradas na literatura.¹¹

Tanto a enzima ChOx livre quanto a imobilizada, têm sido utilizadas para diferentes aplicações. A colesterol oxidase também pode ser aplicada como inseticida em

plantas geneticamente modificadas, facilitando a lise das células epiteliais das larvas; ou em estudos estruturais das membranas de células eucarióticas pela interação com fosfolípidos e jangadas lipídicas. Adicionalmente, a ChOx tem mostrado potencial aplicação como droga antimicrobiana à medida que sua indução em condições extracelulares, juntamente com outros fatores, facilitaram a lise de bactérias Gram-positivas. Por estar presente em um grande número de microrganismos, a colesterol oxidase pode ser utilizada para a produção de precursores de hormônios esteroides ou transformadas em intermediários esteroides. Devido ao mecanismo de ação da ChOx, estudos sugerem que o decréscimo na quantidade de colesterol induz a apoptose celular irreversível, sendo indicada como terapia antitumoral.¹¹

Há um amplo interesse em imobilizar a enzima colesterol oxidase, tanto por pesquisadores como pela indústria, devido ao elevado custo associado a ela. Tradicionalmente, a quantificação de colesterol ocorre utilizando a enzima livre; no entanto, há um alto custo associado ao descarte e a impossibilidade de recuperar a enzima.¹⁹ Além da questão econômica, a imobilização é uma estratégia para aumentar a estabilidade e reutilização das enzimas.¹¹ Os métodos de imobilização enzimática abrangem adsorção, ligação covalente, encapsulamento, inclusão em matriz e ligação covalente cruzada. Na Tabela 1, são enumeradas as diferentes formas de imobilização, vantagens e desvantagens de cada uma, bem como as principais matrizes utilizadas na imobilização de enzimas.²⁰

Tabela 1. Métodos de imobilização enzimática e suas características^{20, 21}

Método de imobilização	Características
Adsorção	<p>Interações iônicas, eletrostáticas, hidrofóbicas (van der Waals) ou ligações de hidrogênio entre suporte e enzima.</p> <p>Vantagens</p> <ul style="list-style-type: none"> ● Simples, econômico e rápido; ● Não envolve etapas de reação química que podem afetar a atividade enzimática. <p>Desvantagens</p> <ul style="list-style-type: none"> ● Adsorção não seletiva ou falta de biocompatibilidade que pode diminuir a atividade enzimática;

Método de imobilização	Características
	<ul style="list-style-type: none"> • Alterações nas condições de trabalho (pH, solvente, temperatura e força iônica) podem induzir a dessorção da biomolécula. <p>Exemplos: Celulose, sílica gel, hidroxiapatita, vidro, colágeno, poliestireno, óxidos metálicos, resinas poliméricas, alumina e grafite.</p>
Encapsulamento e inclusão em matriz	<p>A enzima é imobilizada na rede polimérica (inclusão em matriz) ou no interior de esferas (encapsulamento).</p> <p>Vantagens</p> <ul style="list-style-type: none"> • Pode ser realizado com praticamente qualquer biomolécula, sendo mais favorável quando há afinidade entre enzima e suporte; • Evita autoagregação de enzimas; • Aumenta estabilidade térmica e química; • Possibilidade de modulação do tamanho de poros da matriz; • Proteção contra inibidores. <p>Desvantagens</p> <ul style="list-style-type: none"> • Chance de contaminação à medida que o processo de polimerização é realizado na presença da enzima; • Possibilidade de prejudicar a conformação devido ao confinamento (efeito estérico) ou durante o processo de polimerização; • Dificulta a transferência de massa e acesso do substrato; • Possibilidade de lixiviamento pelos poros quando a interação entre a proteína e a matriz forem fracas. <p>Exemplos: Poliacrilamida, quitosana, amido, nylon, <i>sol-gel</i>, polivinil álcool, polipirrol, polianilina, pasta de carbono e resinas epóxi.</p>
Ligação covalente	<p>Ligação covalente entre os grupos funcionais da enzima e uma superfície ativada, normalmente por reação de amidação.</p> <p>Vantagens</p>

Método de imobilização	Características
	<ul style="list-style-type: none"> ● Robustez da ligação previne lixiviamento; ● Evita adsorção inespecífica ou bloqueio do sítio ativo (na presença de substrato ou inibidores competitivos durante a imobilização); ● Aumento da estabilidade térmica e química. <p>Desvantagens</p> <ul style="list-style-type: none"> ● Complexas etapas de reação que podem resultar em desativação enzimática pela utilização de reagentes químicos; ● Utilização de espaçadores para afastar a enzima da superfície do suporte facilita a difusão e mobilidade enzimática; ● Rigidez na ligação pode prejudicar a movimentação do sítio ativo durante a catálise. <p>Exemplos: sílica, vidro, ouro, materiais metálicos e de carbono.</p>
Ligação cruzada	<p>Utiliza-se um agente reticulante bi ou multifuncional para fazer ligação química entre as enzimas, não necessita suporte inerte.</p> <p>Vantagens</p> <ul style="list-style-type: none"> ● Formação de agregados biomoleculares de alto peso molecular insolúveis; ● Concentração muito alta de enzima utilizada; ● Imobilização multipontual sob condições específicas previne dessorção. <p>Desvantagens</p> <ul style="list-style-type: none"> ● Possível necessidade de utilização de molécula inerte (grupo protetor) a fim de prevenir a ligação entre grupos essenciais ou do sítio ativo; ● Controle da reação de reticulação; ● Alguns agentes reticulantes são tóxicos ou não biocompatíveis; ● Requer grande quantidade de enzima, porém somente as expostas na superfície se encontram acessíveis ao substrato. <p>Exemplos: glutaraldeído.</p>

A enzima ChOx pode ser imobilizada utilizando qualquer uma das metodologias supracitadas. Segundo Kimberley, a estrutura cristalina da colesterol oxidase de *streptomyces* indica que esta é formada por estruturas anfífilas, onde os resíduos de aminoácidos hidrofóbicos estão voltados para a região interna e sítio ativo, enquanto há predominância de grupos hidrofílicos na região externa.²² Por isso, a imobilização por adsorção ou por ligação covalente são as mais comumente utilizadas na preparação de sensores para determinação de colesterol. A ligação covalente pode ocorrer entre a ChOx e o suporte diretamente ou através da utilização de um espaçador, normalmente entre grupos amina e ácido carboxílico. Por outro lado, a adsorção física pode ser por ligação de hidrogênio com o suporte ou interação eletrostática, dependendo do pH do meio.²¹

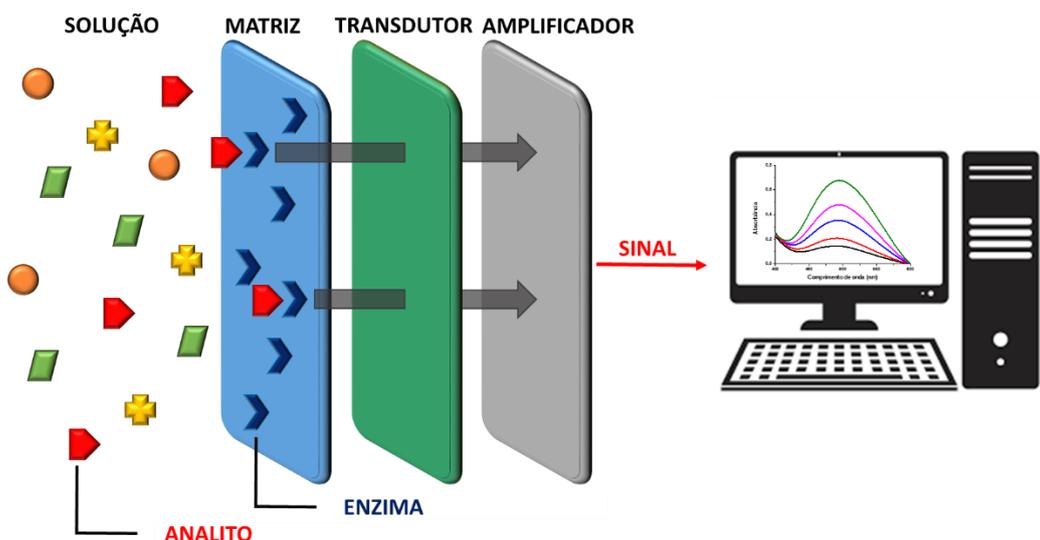
A eficiência e estabilidade da enzima após a imobilização é determinada tanto pela escolha da matriz/suporte como pela escolha do método de imobilização.¹¹ No caso dos biossensores enzimáticos, a imobilização é uma etapa determinante, pois deve permitir a fixação da enzima em uma conformação favorável que permita ao analito acessar o sítio ativo e liberar o produto, deve evitar o lixiviamento do elemento de biorreconhecimento e garantir a proximidade com o transdutor, a fim de que a transferência de sinal seja eficiente.²⁰ Por fim, devido à importância na quantificação de colesterol de amostras biológicas e alimentícias, novas técnicas de quantificação vêm sendo estudadas utilizando biossensores com a enzima colesterol oxidase.

2.2 Sensores e biossensores

Os sensores são dispositivos que detectam qualitativamente ou quantitativamente uma propriedade físico-química, gerando um sinal. Os sensores podem ser classificados em três tipos: sensores físicos, sensores químicos e biossensores.²³ Os sensores físicos medem propriedades físicas como distância, temperatura, pressão, massa, etc.²³⁻²⁵ Por outro lado, os sensores químicos e biossensores detectam moléculas-alvo a partir de suas propriedades físico-químicas.²³ Sendo que os biossensores empregam pelo menos um elemento biológico (enzimas, anticorpos, proteínas receptoras, ácidos nucleicos, células ou tecidos) como elemento de reconhecimento que identifica física, química ou biologicamente o analito produzindo um sinal que é convertido pelo transdutor em um sinal mensurável.^{7, 26}

No caso dos biossensores enzimáticos, este sinal pode resultar de uma alteração na concentração de prótons, liberação ou absorção de gases, emissão de luz, absorção ou refletância, emissão de calor, formação de subprodutos e assim por diante, provocada pela

reação catalisada pela enzima.^{19, 26} No Esquema 3 encontra-se a representação de um biossensor, onde o elemento de biorreconhecimento – que está imobilizado em uma matriz – interage com o analito de interesse, gerando um sinal que é transmitido ao transdutor, amplificado e traduzido ao usuário na forma de um sinal mensurável. Os transdutores podem ser calorimétricos, óticos, eletroquímicos, colorimétricos, piezoelétricos ou elétricos.¹⁹



Esquema 3. Componentes de um biossensor enzimático.

Os sensores químicos e biossensores são amplamente utilizados na indústria química,²⁷⁻²⁹ agricultura,³⁰ indústria automobilística,²⁷ monitoramento ambiental,^{27, 29} segurança,³¹ indústria alimentícia,³⁰ ambientes domésticos,²⁸ biomedicina,^{27, 29, 32} entre outros. Nas últimas décadas, têm-se investido massivamente em sensores aplicados a área biomédica com o intuito de detectar e quantificar determinadas moléculas-alvo (analitos) em biofluidos e, dessa forma, prever e/ou acompanhar o tratamento de diversas doenças.^{27, 32-36} Podemos citar alguns exemplos de moléculas de interesse que causam disfunção no sistema biológico: níveis altos de amônia exalada no ar pelo homem são decorrentes de doenças renais ou úlceras;²⁷ baixas concentrações de dopamina na região motora do cérebro ocasionam a doença de Parkinson;³⁴ níveis anormais de colesterol estão normalmente relacionados com doenças cardíacas e vasculares;⁷ altos níveis de lactato no sangue e no suor indicam metabolismo anaeróbico causada por isquemia ou exaustão muscular importante para medicina do esporte.^{37, 38}

O primeiro biossensor foi desenvolvido por Clark e Lyons para monitorar componentes químicos no sangue de um paciente cirúrgico e registrar o conteúdo quantitativo de biomoléculas no sangue e, até hoje, vêm sendo extensivamente aplicado na área biomédica.³⁹ Sem dúvida os biossensores mais conhecidos são os sensores eletroquímicos para glicose, utilizado no controle de diabetes. A primeira patente de biossensor para esta finalidade foi depositada em 1971 nos EUA e utilizava fitas com enzima para quantificação colorimétrica de glicose.³³ Ainda hoje, os biossensores para glicose continuam sendo estudados na busca do sensor ideal.

O desenvolvimento de sensores para colesterol ainda é uma área emergente visto que essa biomolécula está associada a diversas doenças. No entanto, existem poucos biossensores para colesterol disponíveis no mercado principalmente devido à otimização dos parâmetros críticos como estabilização enzimática, controle de qualidade e projeto de instrumentação.⁷ Segundo Oliver, o sensor ideal deve ser seletivo, biocompatível, não invasivo, rápido, de baixo custo em larga escala, produzir resposta previsível e sensível à variação de concentração com sinal reversível e reproduzível por um longo tempo operacional, não requerer calibração pelo usuário e permitir monitoramento contínuo em tempo-real.³³ Nesse sentido, o desenvolvimento de novos materiais que permitam aprimorar a imobilização da ChOx ainda é um desafio na área de biossensores para colesterol.

2.2.1 *Nanomateriais aplicados a biossensores*

Os nanomateriais são utilizados de diversas formas na área de sensores e biossensores devido a sua elevada área superficial, alta eficiência catalítica, elevada reatividade e capacidade de adsorção.⁴⁰ Os nanomateriais se apresentam como uma alternativa promissora como matriz para imobilização de enzimas à medida que a escala nanométrica confere propriedades químicas, físicas e eletrônicas distintas do *bulk* e permite a produção de dispositivos miniaturizados.⁴¹ Além disso, os nanomateriais apresentam dimensões similares às biomoléculas, permitindo a formação de sistemas híbridos com melhores respostas analíticas, como menor tempo de resposta e altas seletividade e sensibilidade.⁴⁰ No caso dos biossensores amperométricos, eletrodos modificados com nanomateriais facilitam a transferência eletrônica direta da enzima devido às propriedades eletrônicas e ao efeito eletrocatalítico. A maior vantagem dos nanomateriais está na alta razão superfície/volume; com maior superfície exposta, aumenta a área ativa, resultando em um biossensor mais sensível com maior razão

sinal/ruído. Outra característica interessante à maioria dos nanomateriais é a presença de carga superficial, facilitando a interação de biomoléculas por interação eletrostática.⁴¹ Dentre os nanomateriais comumente utilizados na área de biossensores para aplicação biomédica, destacam-se as nanopartículas (metálicas e óxidos), nanomateriais de silício, nanofibras poliméricas e os nanomateriais de carbono (Figura 4).⁴⁰⁻⁴⁸

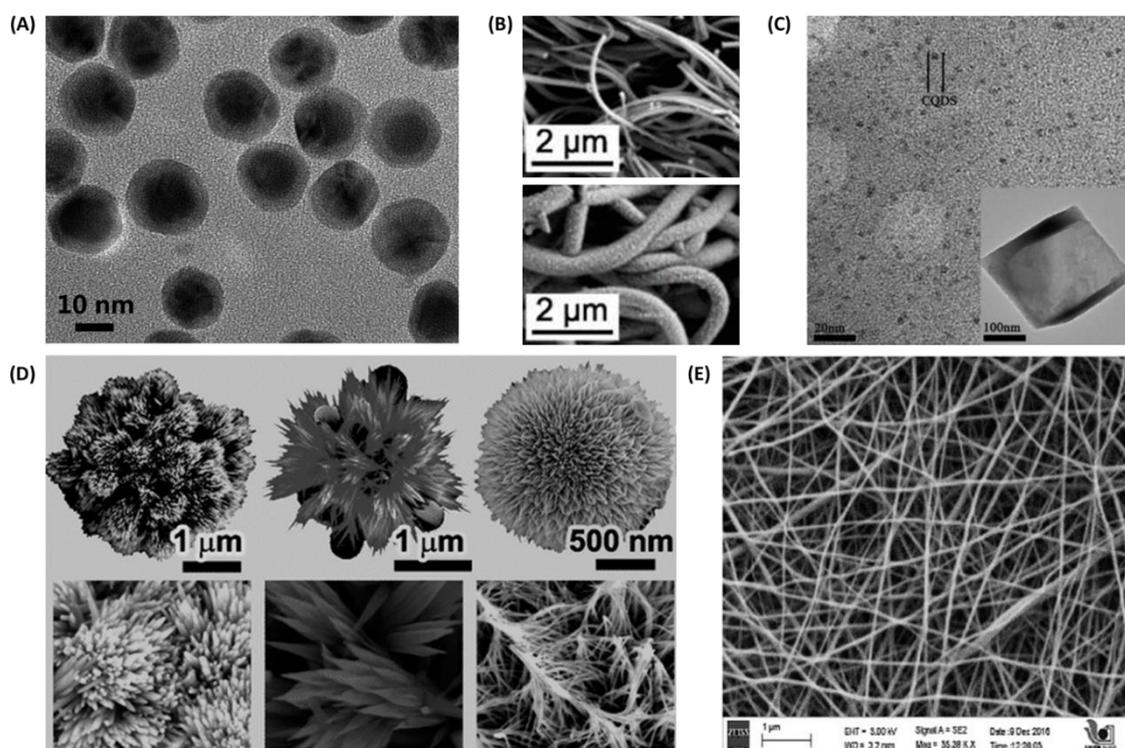


Figura 4. Imagens de microscopia eletrônica de transmissão das nanopartículas *core-shell* de Au@Ag⁴² (A) e imagens de microscopia eletrônica de varredura das nanofibras de ZnO/SiO₂ antes e depois da deposição com alumínio⁴⁶ (B), de nanocompósitos de *quantum dots* de carbono/CuO₂ octaédrico⁴⁸ (C), de dendrímeros de TiO₂⁴⁷ (D) e nanofibras poliméricas de quitosana e polivinil álcool⁴⁵ (E).

As nanopartículas (NPs) possuem propriedades óticas e catalíticas únicas decorrentes da alta razão superfície/volume e de efeitos quânticos de tamanho, podendo ser classificadas em nanopartículas metálicas, óxidos, semicondutores e compósitos nanoestruturados.^{41, 49} Dentre as nanopartículas metálicas mais utilizadas podemos citar as de ouro, platina e prata; além de diversos trabalhos que utilizam NPs bimetálicas com o intuito de melhorar o sensor devido ao efeito sinérgico. O ouro e a prata são muito utilizados nos dispositivos eletroquímicos por facilitar a transferência eletrônica, mas também podem ser aplicados como sensor ótico em razão do fenômeno de ressonância plasmônica de superfície (*surface plasmon resonance*, SPR).⁴¹ Nanopartículas de Au e

Ag exibem um alto coeficiente de extinção e elevada dependência de tamanho e distância relacionado às propriedades óticas.⁴⁰ Zhang e colaboradores utilizaram desse efeito em nanopartículas *core-shell* de Au@Ag, para detectar colorimetricamente glicose e colesterol a olho nu. Os autores combinaram a sensibilidade plasmônica das NPs de Ag e a estabilidade química das NPs de Au para modular o tamanho e forma do material, abrangendo uma faixa de quantificação de colesterol de 0,3 a 300 $\mu\text{mol L}^{-1}$.⁴²

As nanopartículas metálicas de ouro são, sem dúvida, as mais utilizadas na fabricação de biossensores, pois as propriedades desse material podem ser facilmente moduladas pelo tamanho e forma das nanopartículas. O ouro possui excelente biocompatibilidade, interagindo com as biomoléculas por interação eletrostática e também pela alta afinidade com os aminoácidos cisteína e metionina, seja por fisissorção ou pela ligação covalente através da ligação S-Au.^{20, 50, 51} Devido à essa forte interação, as NPs de ouro ajudam as enzimas a manter a atividade por um maior período de tempo, aumentando a estabilidade do biossensor. Além disso, há um aumento da seletividade e sensibilidade devido à propriedade eletrocatalítica das nanopartículas de ouro, que auxiliam na transferência dos elétrons gerados durante as reações químicas catalisadas pelas enzimas.^{41, 52, 53} Zhu e colaboradores conseguiram determinar colesterol eletroquimicamente sem a utilização de mediadores através da transferência eletrônica da enzima colesterol oxidase para o eletrodo de carbono vítreo modificado com nanotubos de carbono multicamada, nanopartículas de ouro (6-10 nm) e nafion.⁵³

Em contrapartida, estão as nanopartículas de óxidos metálicos que - apesar de também facilitarem a condutividade elétrica - possuem melhor capacidade de adsorção de biomoléculas.⁴¹ Muitos trabalhos também se apropriaram da presença de nanoporos nos óxidos metálicos para a imobilização da enzima ChOx.¹⁹ Por apresentarem um menor custo em relação aos metais nobres, as nanopartículas de óxidos metálicos – como o TiO_2 – têm sido amplamente aplicadas em sensores/biossensores para gases, solutos orgânicos em soluções aquosas e substâncias biológicas.⁴³ Dentre os nanomateriais de óxidos metálicos mais utilizados como sensores/biossensores, encontram-se CeO_2 , CuO , NiO , Fe_2O_3 , Co_3O_4 , MnO_2 , ZnO , TiO_2 , SnO_2 , CdO , entre outros.⁴⁴

Os nanomateriais de silício têm sido estudados – sozinhos ou combinados com nanopartículas – por causa das excelentes propriedades óticas, mecânicas e eletrônicas, combinada com biocompatibilidade e adaptabilidade da superfície.⁴⁰

As nanofibras permitem, além de conferir alta razão superfície/volume e estabilidade térmica, alteração na porosidade e maleabilidade por meio da técnica de

processamento. Dhawane e colaboradores desenvolveram um biossensor colorimétrico para quantificação de colesterol utilizando nanofibras de quitosana/polivinil álcool eletrofiadas capaz de distinguir a quantidade de colesterol de desejada até altíssima através de um gradiente de cor.⁴⁵

Os nanomateriais de carbono são uma opção promissora à medida que apresentam propriedades físico-químicas desejáveis, como por exemplo extraordinária relação superfície/volume, alta condutividade elétrica, estabilidade química, biocompatibilidade e resistência mecânica.^{32, 44} Encontram-se na literatura diferentes exemplos de alótropos do carbono aplicados a sensores, seguem exemplos de revisões que tratam especificamente de cada um deles: nanotubos de carbono em monocamada e multicamada,^{32, 54} fulereno,⁵⁵ *nanohorns* de carbono,⁵⁶ nanoesferas de carbono,⁵⁷ *carbon dots*,^{58, 59} e grafeno.⁶⁰⁻⁶³

2.3 Grafeno e óxido de grafeno

O grafeno tem atraído muito interesse nas últimas décadas devido à suas propriedades físico-químicas únicas, sendo aplicado em baterias, supercapacitores, catálise, nanoeletródos flexíveis, engenharia biomédica e sensores.^{32, 64} Além da altíssima razão superfície/volume, o grafeno apresenta excelente condutividade térmica e elétrica em macroescala superior aos nanotubos de carbono, devido à sua estrutura bidimensional.⁶¹ Além disso, o grafeno apresenta uma larga janela de potencial eletroquímico e baixa resistência a transferência de carga, sendo um ótimo candidato para aplicação como sensor eletroquímico.⁶³

O grafeno pristino pode ser definido como uma única camada de átomos de carbono sp^2 ligados em forma hexagonal gerando uma estrutura 2D no formato de colmeia (Figura 5A); essa forma do alótropo de carbono dá origem às estruturas de fulereno 0D, nanotubos de carbono 1D e grafite 3D.^{64, 65} O grafeno de multicamadas apresenta até 10 folhas bidimensionais, onde os carbonos do plano basal estão ligados por ligação σ e π , enquanto as folhas interagem por interação π - π .⁶⁶ O número de camadas do grafeno pode ser estimado a partir da espectroscopia Raman, avaliando a intensidade, formato e posição das bandas G e 2D.⁶⁶ Várias folhas de grafeno interagem por forças de van der Waals para formar o grafite, onde a distância entre folhas é de 3,35 Å.^{39, 67} Quanto maior o número de camadas do grafeno, maior a característica “metálica” do material, sendo o método de síntese determinante para modular as propriedades físico-químicas do material para as diferentes aplicações.⁶⁶

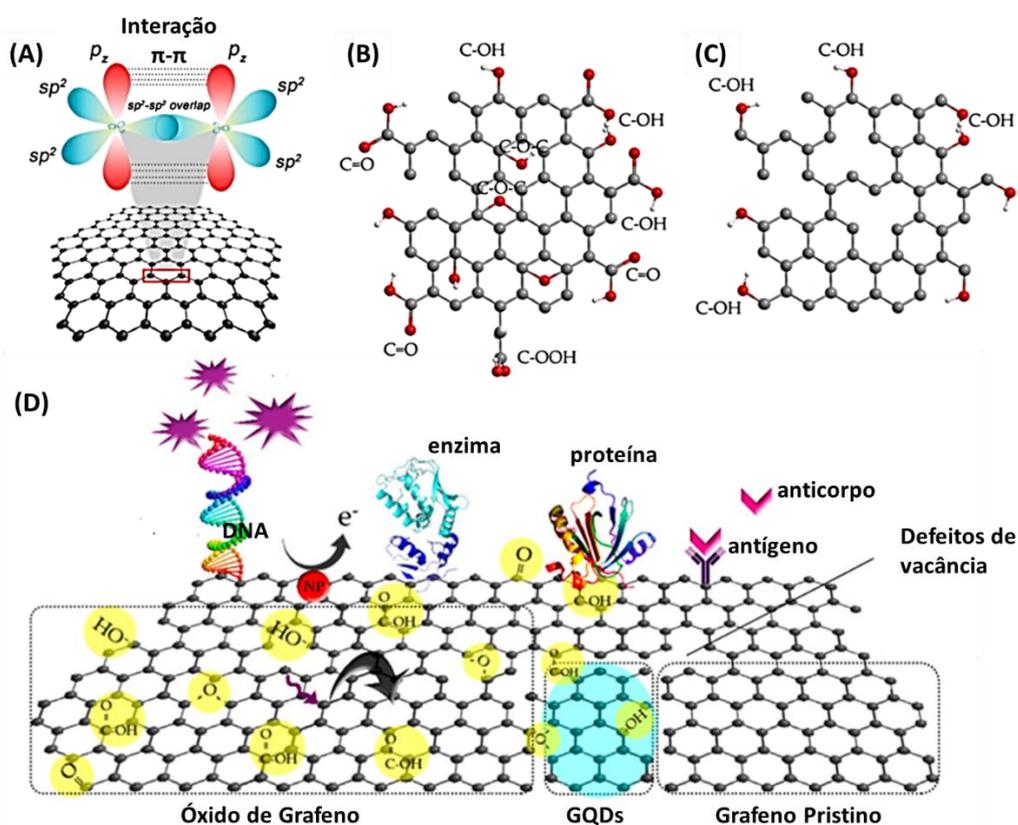


Figura 5. Estrutura dos materiais à base de grafeno: grafeno pristino com interação π - π entre carbonos sp^2 (A), óxido de grafeno e óxido de grafeno reduzido (C). Interação entre o grafeno e óxido de grafeno com diferentes biomoléculas e nanopartículas (D). (Adaptado de Suvarnaphaet e Pechprasart, 2017)³⁹

O primeiro método de síntese utilizado para obter grafeno foi a esfoliação mecânica do grafite, que produz material puro e sem defeitos; porém, hoje o grafeno pode ser sintetizado em larga escala por deposição química de vapor ou pela redução do óxido de grafeno obtido pelo método de Hummers e Offeman.^{60, 63, 64, 68, 69} O método de Hummers e Offeman é uma técnica de exfoliação química em solução que origina o óxido de grafeno (OG), com grupos carboxila, carbonila, hidroxila e epóxi randomicamente distribuídos, majoritariamente nas bordas das folhas (Figura 5B).⁶⁷ Apesar de ser a síntese mais utilizada, essa metodologia utiliza vários ácidos concentrados (agentes intercalantes) e oxidantes fortes,⁶⁹ é extremamente demorada e tem baixa escalabilidade; por isso, diversos estudos vêm sendo desenvolvidos a fim de melhorá-la.^{39, 70-72} Enquanto o grafeno é insolúvel em praticamente todos os solventes, o óxido de grafeno solubiliza em água.⁷⁰ O OG é um isolante devido ao elevado número de carbonos sp^3 , mas pode ser reduzido

ou funcionalizado originando o óxido de grafeno reduzido, com efeitos estruturais e de composição (Figura 5C).⁶⁷

O OG permite a funcionalização química e física do grafeno devido à presença de defeitos de rede e grupos funcionais,⁶¹ adequando as propriedades estruturais ao objetivo desejado.⁶⁰ Por exemplo, no caso dos biossensores enzimáticos, a transferência eletrônica direta entre o eletrodo e o sítio ativo da enzima - sem a utilização de mediadores ou outros reagentes - é difícil devido ao sítio ativo se localizar algumas vezes em cavidades hidrofóbicas do material, mas pode ser facilitada com a utilização de grafeno funcionalizado. Os grupos funcionais podem tanto melhorar a interação com a enzima através de interações mais fortes, como facilitar a transferência eletrônica direta devido às propriedades eletrônicas intrínsecas do grafeno.⁶³ Por apresentar uma estrutura de colmeia planar com um átomo de espessura, os derivados de grafeno são altamente sensíveis a adsorção de moléculas, sendo amplamente aplicado desde a detecção de moléculas gasosas⁶¹ até DNA.⁶²

A aplicação de materiais à base de grafeno como biossensor pode ser realizada por duas estratégias: interação carga-biomolécula ou através dos defeitos e de funcionalização. Nas interações carga-biomolécula, a biomolécula interage a partir dos domínios π - π , de forças eletrostáticas ou troca de carga, levando a variações elétricas no grafeno pristino. A segunda abordagem utiliza do efeito de defeitos (por exemplo vacâncias, carbonos sp^3 e dopantes) e/ou funcionalização química para imobilizar as moléculas de biorreconhecimento na superfície do óxido de grafeno, óxido de grafeno reduzido (rOG) e *quantum dots* baseados em grafeno (GQDs).³⁹

Na Figura 5D, temos a representação de diversas formas de interação entre grafeno pristino e óxido de grafeno com biomoléculas e nanopartícula. O grafeno pristino apresenta possibilidade de empilhamento π - π , interações não covalentes e alta força eletrostática; além da possibilidade de adsorver moléculas carregadas ou íons metálicos em áreas carregadas, como por exemplo, interações com defeito de vacância.³⁹ Por outro lado, o óxido de grafeno tanto interage diretamente com as biomoléculas por seus grupos oxigenados de borda e superfície como se liga a heteroátomos, NPs, *quantum dots*, entre outras moléculas.³⁹

As propriedades dos materiais de grafeno, podem ser melhoradas pelo efeito sinérgico com a criação de materiais híbridos de grafeno com outras nanoestruturas; como nanopartículas metálicas ou de óxidos metálicos, receptores orgânicos, polissacarídeos, polímeros condutores e biomoléculas.⁶⁷ Normalmente, o óxido de

grafeno é adicionado a materiais poliméricos com o intuito de melhorar as qualidades mecânicas e de adsorção do mesmo.⁷³

Como a superfície do grafeno desempenha um papel crucial nas interações intermoleculares, o planejamento da química da superfície dos materiais de grafeno - através de interações covalente, não covalentes ou dopantes - é uma forma de ajustar suas propriedades sensoriais.⁶⁷ As morfologias dos nanomateriais de carbono funcionalizados resultam em um recurso para aumentar a sensibilidade, seletividade e tempo de resposta dos sensores. Tanto os grupos reativos de superfície como impurezas e efeito de borda podem contribuir para a resposta dos sensores com materiais de carbono.⁴⁴ Por outro lado, o grafeno funcionalizado reduz as forças coesivas entre as folhas de grafeno, modificando as propriedades físico-químicas e ampliando as aplicações.⁶⁴ Estudos sugerem que a inserção de grupos retiradores de elétrons (grupos epóxido e carboxílico) geram buracos na banda de valência do rOG e, conseqüentemente, melhora a resposta em direção à oxidação de moléculas. Por outro lado, modificações de superfície com grupos funcionais contendo elétrons não ligantes (grupos amina e sulfonato) podem melhorar a resposta em direção a moléculas oxidantes.⁶⁷

Nanomateriais de carbono funcionalizados são, muitas vezes, mais efetivos que os nanomateriais não modificados. Tendo em vista a melhora das propriedades do grafeno para aplicação como sensor, diversas moléculas têm sido utilizadas para funcionalizá-lo a partir do óxido de grafeno, como polímeros, moléculas π -conjugadas, líquidos iônicos, entre outros.⁷⁴

2.3.1 *Materiais híbridos de óxido de grafeno funcionalizado com líquidos iônicos*

Dentre esses ligantes, os líquidos iônicos (LIs) se destacam por possuírem propriedades como: ampla janela eletroquímica, alta condutividade iônica e elétrica, alta estabilidade térmica e química, boa solubilidade na maioria dos solventes, elevada habilidade de solvatação, baixa volatilidade e biocompatibilidade.^{49, 65, 74-77} Os LIs são sais com temperatura de fusão menor que 100 °C e consistem em cátions orgânicos (Figura 6) e ânions orgânicos ou inorgânicos.⁴⁹ Com a finalidade de aplicar como biossensor, os líquidos iônicos na superfície do grafeno funcionalizado podem agir como mediadores de transferência eletrônica ou dispersante auxiliando na solvatação do nanomaterial de carbono.⁶⁵

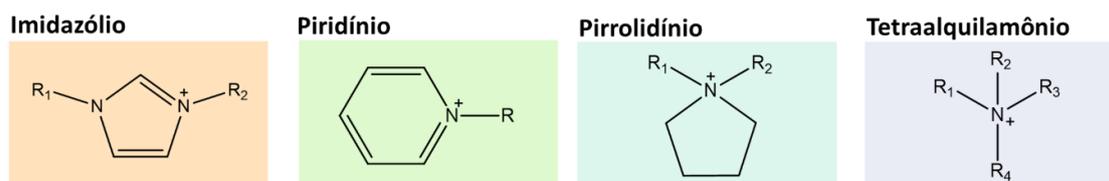
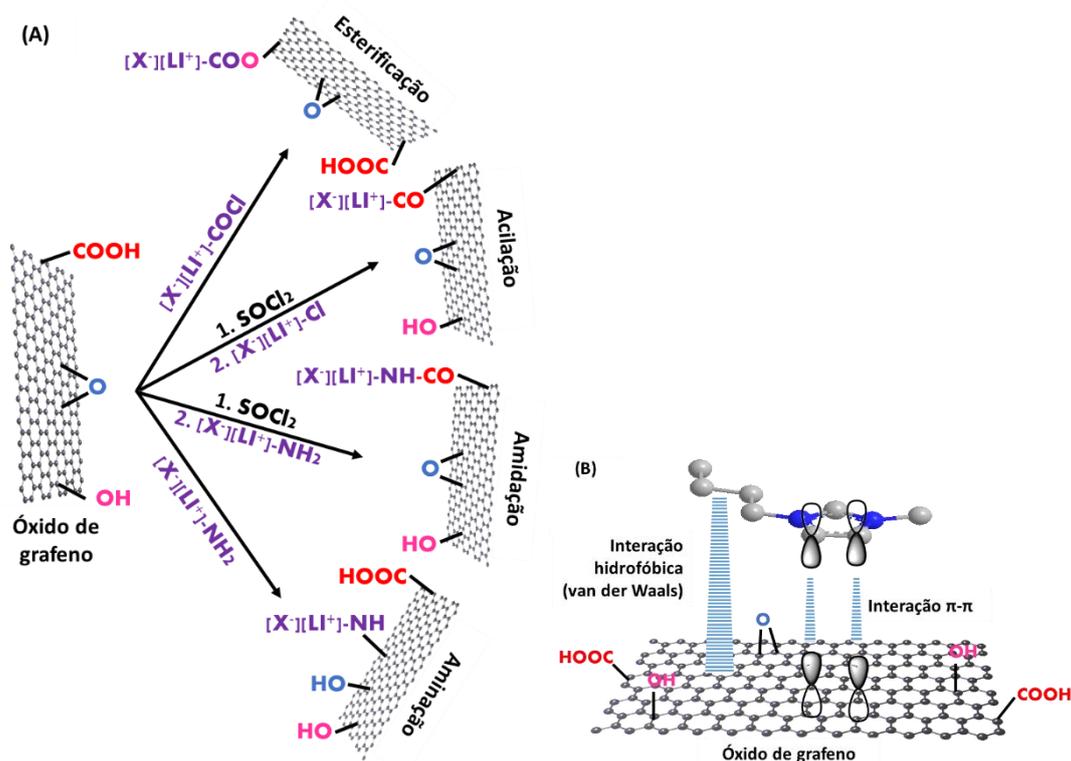


Figura 6. Cátions mais comumente utilizados em líquidos iônicos.

A biocompatibilidade do óxido de grafeno é um fator determinante para o aumento da atividade catalítica na detecção de vários analitos e também na capacidade de imobilizar biomoléculas por meio de interação química ou física.⁶⁵ As proteínas, em particular enzimas, são suscetíveis à desnaturação em solução devido às ligações de hidrogênio formadas com o solvente; nesse sentido, os líquidos iônicos também podem ser aplicados com o objetivo de estabilizá-las. Diversos fatores afetam a estabilidade de proteínas em líquidos iônicos, sendo os principais: polaridade do LI, hidrofobicidade, miscibilidade em água, viscosidade e impurezas.⁶⁵

Em suma, os líquidos iônicos podem ser utilizados juntamente com nanomateriais de carbono para três finalidades distintas. Primeiramente, pode ser utilizado em baixas quantidades para auxiliar na solubilização do grafeno reduzido em soluções ou matrizes. O segundo objetivo é produzir materiais com efeito sinérgico do LI e grafeno através de interação não covalente entre os mesmos, impedindo a aglomeração. Por fim, o LI pode servir como ligante entre folhas de grafeno ou outro componente (como as biomoléculas).⁷⁸ Sem dúvida, a maior vantagem de utilizar os LIs como ligante é a boa biocompatibilidade com biomoléculas.⁷⁵

A funcionalização pode ser não covalente, por interação π - π , ou covalente através de reação química entre o ligante e os grupos oxigenados da superfície do óxido de grafeno; ambas interações estão representadas no Esquema 4.⁷⁹



Esquema 4. Métodos de funcionalização covalente do óxido de grafeno com líquidos iônicos (A) e interação π - π entre a monocamada de carbono e o anel imidazólio (B). (Adaptado de Verma, 2019⁷⁹)

A funcionalização não covalente é um método físico de modificação, simples e não destrutivo (não afeta as conjugações π do nanomaterial de carbono); porém a interação entre os componentes é fraca e o LI pode ser facilmente lixiviado da superfície.⁸⁰ O óxido de grafeno e outras moléculas podem interagir por ligação de hidrogênio, forças Coulômbicas, interação π - π e interações de van der Waals.^{26, 75} A funcionalização não covalente ocorre preferencialmente entre a folha de grafeno ou OG e os cátions dos líquidos iônicos, sendo imidazólio, pirrolidínio e piridínio os mais comuns.⁷⁸ Os anéis aromáticos - que possuem alta densidade de elétrons π - adsorvem facilmente na superfície do grafeno através de interação π - π , como demonstrado no Esquema 4B, podendo inclusive modificar a dispersibilidade do material em determinados solventes de acordo com as características hidrofílicas ou hidrofóbicas do ligante.⁷⁹ Estudos mostram que LI hidrofóbicos, como os derivados de imidazol com longa cadeia carbônica, se orientam sobre a folha de grafeno com o anel imidazólio levemente inclinado e a cadeia lateral paralela ao plano do grafeno, favorecendo a transferência de carga. Para o caso dos LI hidrofílicos, não há evidência de que haja interação π - π .⁷⁸ Para que ocorra a interação não covalente entre o óxido de grafeno e o LI

pode-se utilizar as seguintes metodologias: mistura mecânica (sonicação ou maceramento) ou polimerização com líquidos iônicos poliméricos.⁸⁰

Por outro lado, a funcionalização covalente evita o lixiviamento do LI, além de aumentar a estabilidade térmica e química, resultando em maior durabilidade do material híbrido. A desvantagem dessa metodologia são as etapas de reação que acabam por modificar propriedades intrínsecas do grafeno pristino, como a excelente condutividade, e facilitar a contaminação com impurezas.⁸⁰ A funcionalização covalente do grafeno é precedida, obrigatoriamente, pela oxidação deste produzindo o óxido de grafeno, que possui grupos funcionais oxigenados na superfície. Então, a funcionalização é normalmente realizada por meio de reações de condensação (esterificação, acilação, amidação) ou por reação nucleofílica de abertura de anel (aminação), conforme representado no Esquema 4A.^{26, 80}

A funcionalização por condensação ocorre entre LI com grupamentos aminas ou hidroxilas terminais e o óxido de grafeno, formando amida e éster, respectivamente. Para as reações de condensação, no entanto, é importante que os grupos carboxila sejam ativados com cloreto de tionila (SOCl_2), N,N-diciclohexilcarbodiimida (DCC) ou cloreto oxálico.⁸⁰ Analisando o Esquema 4A, observa-se que a funcionalização do óxido de grafeno com líquidos iônicos que possuem terminação amina pode ocorrer por amidação com o grupo carboxila presentes nas bordas das folhas do OG ou aaminação por abertura do anel epóxido.⁷⁹ Apesar de alguns trabalhos da literatura afirmarem que a ativação previa do grupo carboxila é necessária para a reação de amidação,^{81, 82} há trabalho que consideram essa a única forma de reação entre o OG e o cátion 1-(3-aminopropilimidazólio).⁸³

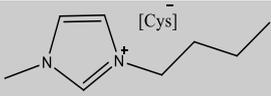
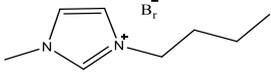
A funcionalização altera consideravelmente a hidrofiliabilidade ou hidrofobicidade do OG e, conseqüentemente, a dispersibilidade em solventes distintos.²⁶ A esfoliação das folhas de OG em solução é melhorada através da reação de abertura de anel entre os grupos epóxi do óxido de grafeno e LI com aminas terminais. As folhas de grafeno reduzido são estabilizadas pela repulsão entre as folhas de grafeno funcionalizadas carregadas positivamente e também pela alta solubilidade dos LI superficiais.⁷⁸

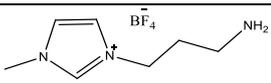
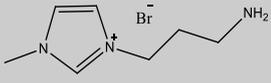
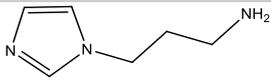
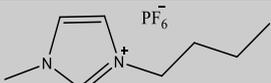
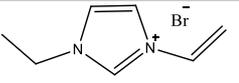
Portanto, sendo as folhas de grafeno separadas por intercalação com líquidos iônicos, o espaçamento entre elas pode ser modulado de acordo com o tamanho e grupos funcionais presentes nessa molécula. Tanto a funcionalização covalente como não covalente entre LI e OG propiciam um microambiente favorável para a imobilização de enzimas, aumentando sua estabilidade e atividade na produção de biossensores.⁷⁸

Outra vantagem de funcionalizar os nanomateriais de carbono com líquido iônico é a estabilização de nanopartículas metálicas. As nanopartículas metálicas tendem a aglomerar a fim de formar um *bulk* metálico, que é termodinamicamente mais favorável. Nesse sentido, os líquidos iônicos agem como estabilizantes das nanopartículas em solução devido a sua característica de auto-organização em escala molecular.⁴⁹ Os LIs podem tanto ligar covalentemente na superfície das nanopartículas (por exemplo, nanopartículas de ouro com LI contendo grupamento tiol terminal) como formar estruturas híbridas com as NPs incorporadas na estrutura nanométrica.⁸⁴ Há diversas evidências na literatura de que nanomateriais de carbono funcionalizados com LIs mantêm a característica de estabilização de nanopartículas. Shang e colaboradores funcionalizaram nanofitas de óxido de grafeno com brometo de 1-(3-aminopropil)-3-metilimidazólio por abertura de anel epóxido e imobilizaram nanopartículas *core-shell* ocas de Pd@Ag por interação eletrostática.⁸⁵ Yang e colaboradores funcionalizaram o óxido de grafeno com 1-(3-aminopropil)-3-propil-imidazol, seguido de redução de H₂AuCl₄ com NaBH₄, formando nanopartículas de ouro com menos de 10 nm.⁸⁶

Na Tabela 2 encontram-se alguns trabalhos relevantes na área utilizando grafeno funcionalizado com líquido iônico para a detecção de diferentes analitos.

Tabela 2. Materiais de grafeno funcionalizado com líquido iônico com aplicação na área de sensores e biossensores eletroquímicos.

	Material	Estrutura do LI	Método	Analito	Referência
1	OG- [BMI ⁺][Cys ⁻]		Voltametria cíclica e por pulso diferencial	Dopamina e ácido úrico em urina	Wang, 2014 ⁷⁴
2	OG-[BMI ⁺] [Br ⁻]-Au NP		Voltametria cíclica e por pulso diferencial	Dopamina (análise de traços)	Li, 2017 ⁸⁷
3	NFOG -hPdAg NP	-	Voltametria por pulso diferencial	Medicamento nifedipina	Shang, 2015 ⁸⁵

Material	Estrutura do LI	Método	Analito	Referência
4 Gelatina/OG- [APMI ⁺][BF ₄ ⁻] /AChE/GA		Cronoamperometria e voltametria por pulso diferencial	Pesticidas carbaryl e monocrotofos	Zheng, 2015 ⁸⁸
5 OG- [APMI ⁺][Br ⁻] /Ni ₃ S ₂		Voltametria cíclica e amperometria	Glicose (não enzimático)	Luan, 2018 ⁸⁹
6 OG-[API]		Voltametria de onda quadrada	Progesterona	Gevaerd, 2018 ⁸³
7 OG- [BMI ⁺][PF ₆ ⁻]/ catalase/ChOx		Cronoamperometria	Colesterol	Gholivand, 2014 ⁹⁰
8 OG- LIP/PSS/ChOx		Voltametria por pulso diferencial	Colesterol	Wu, 2016 ⁹¹

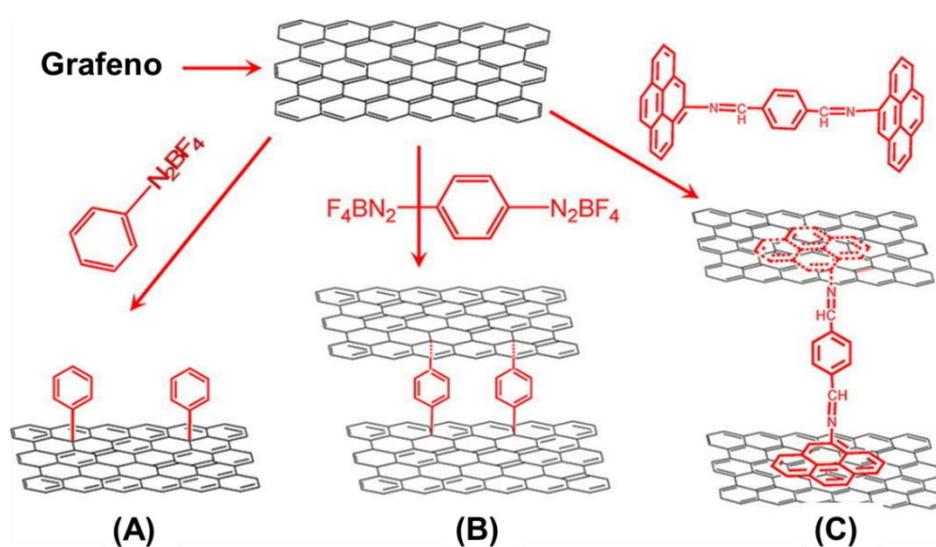
OG = óxido de grafeno; [BMI⁺] = cátion 1-butil-3-metilimidazólio; [Cys] = cisteína; NFOG = nanofitas de óxido de grafeno; AChE = Acetilcolina esterase; GA = glutaraldeído; [APMI⁺] = cátion 1-(3-aminopropil)-3-metilimidazólio; [BF₄⁻] = ânion tetrafluorborato, [API] = 1-(3-aminopropil)imidazol; QGDs = *quantum dots* de grafeno; LIP = líquido iônico polimérico; PSS = poli(*p*-estirenosulfonato de sódio).

Observando os trabalhos atuais, podemos concluir que o grafeno funcionalizado com diferentes líquidos iônicos tem potencial aplicação como sensor ou biossensor para diferentes analitos, utilizando principalmente método eletroquímico. Nesse sentido, optamos por explorar as características de materiais de grafeno funcionalizados com líquidos iônicos como suporte e estabilizante de nanopartículas e biomoléculas (enzimas). Têm-se investido principalmente na utilização de LIs com terminação amina para a funcionalização covalente do óxido de grafeno para detecção de vários analitos como pesticidas (Tabela 2, entrada 4), glicose (Tabela 2, entrada 5) e hormônios (Tabela 2, entrada 6). Por isso, decidiu-se aplicar os materiais produzidos como sensor colorimétrico de um analito muito importante, porém ainda pouco estudado, o colesterol. No capítulo I desse trabalho, exploramos as características dos materiais de óxido de grafeno

funcionalizado com dois líquidos iônicos derivados do cátion imidazólio (com uma ou duas aminas terminais) e nanopartículas de ouro depositadas por *sputtering* para serem aplicados como biossensor colorimétrico na quantificação de colesterol total.

2.3.2 Materiais híbridos de óxido de grafeno funcionalizado com moléculas orgânicas π -conjugadas

A superfície dos nanomateriais, como o grafeno ou óxido de grafeno, pode ser modificada por adsorção ou funcionalizada com diferentes moléculas orgânicas a fim de conferir propriedades adequadas para as mais diversas aplicações. A funcionalização covalente com uma molécula orgânica pode ocorrer no plano basal - pela reação com as ligações insaturadas do grafeno -, nos grupos funcionais das bordas do óxido de grafeno ou através de um heteroátomo.⁹²

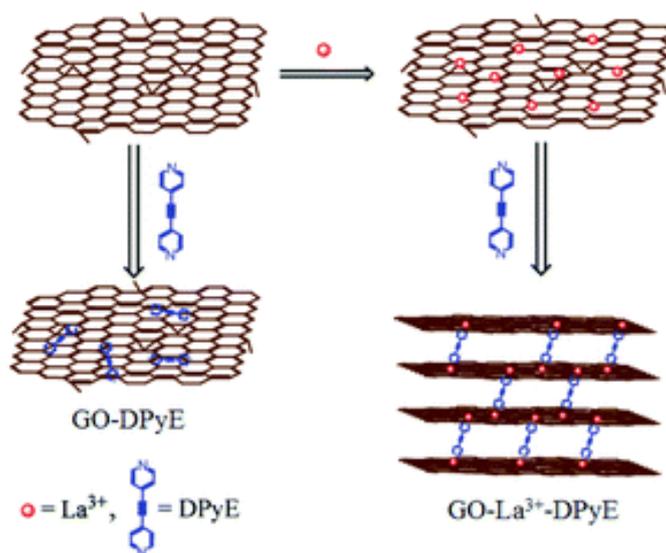


Esquema 5 Modificação do grafeno covalentemente com sal de diazônio monoarilo (A) e bisarilo (B) e interação π - π com bispireno (C). (Adaptado de Liu, 2012⁹³)

Para realizar o acoplamento com as ligações C=C do plano basal, se utilizam normalmente sais de diazônio ou grupos dienófilos, resultando em um composto orgânico perpendicularmente orientado em relação às folhas do grafeno (Esquema 5A e B).⁹² No entanto, a ligação química também pode ocorrer entre um grupo funcional oxigenado do óxido de grafeno e a molécula orgânica que contenha uma funcionalidade (amina ou carboxila), pelas mesmas metodologias já descritas para os LIs. A modificação não covalente pode ocorrer entre o óxido de grafeno e moléculas orgânicas por interações hidrofílicas, hidrofóbicas ou por interação π - π .⁹² As moléculas planares π -conjugadas são

candidatas para modificação por interação π - π na superfície das folhas de grafeno (Esquema 5C), como os derivados de pireno⁹³, de piridina⁹⁴ e de porfirina.⁹⁵

A funcionalização covalente utilizando heteroátomo pode ser realizada por dopagem do grafeno (principalmente com nitrogênio ou boro) ou por coordenação com íons metálicos. Ge e colaboradores avaliaram diferentes íons metálicos (K^+ , Ca^{2+} , Zn^{2+} , Cu^{2+} , Co^{2+} e Cr^{3+}) na funcionalização covalente de óxido de grafeno com (5,15-difenil)-10,20-di(4-piridil)porfirina. As vantagens da funcionalização por coordenação, segundo os autores, consistem na possibilidade de funcionalização do material à temperatura ambiente e a diminuição da resistência interfacial entre OG e o ligante devido ao pequeno raio dos íons metálicos.⁹⁵ Por outro lado, Zhang e colaboradores funcionalizaram o OG com bis(4-piridil)acetileno (DPyE) utilizando íons de metais terras raras como agente coordenante. Os autores afirmam que, devido à exclusiva camada 4f dos elementos terras raras, estes íons possuem uma maior capacidade coordenativa que os íons de metais de transição, fortalecendo a ligação entre o OG e o ligante.⁹⁴ Em ambos os estudos supracitados, as caracterizações dos materiais indicam que, na ausência de íons metálicos, as folhas de OG se empilham com as moléculas orgânicas por interação π - π ; enquanto na presença de íons metálicos, as moléculas orgânicas se encontram covalentemente ligadas ao OG (Esquema 6).



Esquema 6. Proposta de estrutura do material sem íon metálicos GO-DPyE e com íon metálico GO- La^{3+} -DPyE. (Adaptado de Zhang, 2018⁹⁴)

Uma recente possibilidade para funcionalização do óxido de grafeno é a utilização de derivados do núcleo 2,1,3-benzotiadiazola (BTD). O núcleo 2,1,3-benzotiadiazola (Figura 7A) é um sistema heterocíclico π -conjugado planar. Essa molécula tem atraído interesse para aplicações diversas com potencial utilização como fungicida, herbicida, antibacteriano, crescimento de plantações, proteção e regulação genética, materiais fluorescentes, condutores orgânicos e reconhecimento molecular.⁹⁶ Também se têm explorado a utilização de derivados de BTD na área biológica, inicialmente como sonda e sensor de DNA; mas posteriormente se expandiu a utilização como sonda de diversas outras organelas pela modificação das cadeias laterais.⁹⁷⁻¹⁰⁰

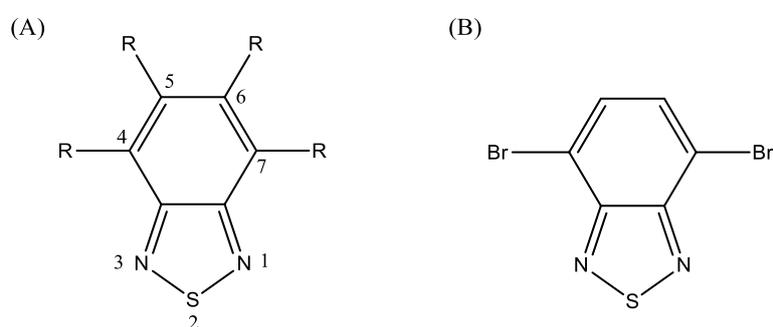


Figura 7. Núcleo 2,1,3-benzotiadiazola e 4,7-dibromo-2,1,3-benzotiadiazola.

Sem dúvida, o núcleo BTD é um dos mais importantes da química de compostos luminescentes, apresentando algumas propriedades fotofísicas desejáveis para essa aplicação. Primeiramente, o núcleo BTD por si só já é um fluoróforo eficiente, com alta intensidade de fluorescência, elevado coeficiente de extinção e largo deslocamento de Stokes.¹⁰¹ Além disso, o anel heterocíclico possui alta capacidade aceptora de elétrons, tornando o material que o compõe um portador de elétrons.⁹⁶ Conjuntamente, a BTD induz a formação de estruturas altamente ordenadas à medida que essa molécula apresenta uma elevada propriedade de polarização, favorecendo interações intermoleculares, principalmente interações π - π .⁹⁸ Por fim, a molécula BTD pode ser utilizada na construção de materiais condutores como unidade aceptora de elétrons.⁹⁶ Todas essas propriedades fotofísicas resultam em materiais eficientes empregados em OLEDs, células solares, cristais líquidos, corantes, células fotovoltaicas, dispositivos eletro-óticos, fios moleculares, entre outros.⁹⁶

Para a síntese de derivados da BTD, utiliza-se normalmente o intermediário 4,7-dibromo-2,1,3-benzotiadiazola (Figura 7B). A molécula 4,7-dibromo-2,1,3-

benzotiadiazola pode ser facilmente obtida a partir da BTB pela adição de bromo molecular em ácido bromídrico. A adição lenta do bromo molecular resulta na formação do produto dissustituído, enquanto a adição rápida, no produto tetrassustituído.⁹⁶

Na área de sensores, os derivados de BTB estão sendo aplicados principalmente na detecção de metais. Moro e colaboradores sintetizaram derivados de 2,1,3-benzotiadiazol-triazolas conjugados com glicose e aplicaram como sensor químico, observando a supressão da fluorescência seletiva para Ni^{2+} , em comparação com outros cátions bivalentes.¹⁰¹ Wu e colaboradores utilizaram quatro derivados de BTB como sensores fluorescentes e colorimétricos do íon fluoreto, com alta sensibilidade e seletividade na presença de outros ânions (Cl^- , Br^- , I^- , AcO^- , H_2PO_4^- , HSO_4^-).¹⁰² Ju e colaboradores produziram estruturas metalorgânicas (MOFs, *metal-organic frameworks*) utilizando 4,7-di(4-piridil)-2,1,3-benzotiadiazolas e dicarboxilato de 1,4-benzeno ou ácido isoftálico como componente orgânico e diferentes metais (Cd, Zn, Co e Ni). Esses materiais foram utilizados na detecção de 2,4,6-trinitrofenol, um componente comum em explosivos, a partir da supressão da fluorescência.¹⁰³ Recentemente, Spychalska e colaboradores desenvolveram um biossensor eletroquímico para a quantificação do hormônio 17β -estradiol, utilizando o polímero condutor poli(4,7-bis(5-bromotiofenil-2)benzotiadiazol e a enzima peroxidase. Os autores acreditam que a molécula π -conjugada facilita a interação π - π de moléculas hidrofóbicas, tornando a imobilização da enzima forte e apropriada na matriz de polímero condutor derivado de BTB.¹⁰⁴

Frente a todos os desafios na área de biossensores, há uma grande demanda por novos materiais que melhorem a detecção ao mesmo tempo que apresentem um microambiente adequado às biomoléculas. Nesse sentido, uma nova possibilidade é utilizar os derivados de BTB como ligantes na funcionalização do óxido de grafeno, a fim de combinar as propriedades desses componentes em um material estável, resistente mecanicamente e adequado para imobilização de biomoléculas. No entanto, não se encontraram na literatura trabalhos que avaliem o potencial do óxido de grafeno funcionalizado com BTB. Tendo como referência estudos de OG funcionalizados com moléculas π -conjugadas planares, observaram-se duas estruturas formadas, uma por modificação não covalente e outra por funcionalização covalente utilizando íons metálicos. Por isso, no capítulo II desse trabalho, novos materiais de óxido de grafeno modificado com derivados de 2,1,3-benzotiadiazolas serão estudados como possíveis sensores enzimáticos para quantificação colorimétrica de colesterol total e também será avaliada a presença de lantânio como agente complexante.

3 Objetivos

3.1 Objetivo geral

O presente estudo tem como objetivo o desenvolvimento de materiais de óxido de grafeno funcionalizado com diferentes moléculas para utilização como biossensores enzimáticos na determinação colorimétrica de colesterol total.

3.2 Objetivos específicos do capítulo I

- Síntese e caracterização do óxido de grafeno;
- Preparação de novos ligantes do tipo líquido iônico para a funcionalização dos suportes;
- Redução do óxido de grafeno pela funcionalização com os ligantes derivados de imidazólio;
- Deposição de nanopartículas de ouro nos suportes pelo método de *sputtering*;
- Caracterização dos materiais sintetizados;
- Imobilização da enzima colesterol oxidase;
- Aplicação dos materiais de óxido de grafeno funcionalizados com líquido iônico e nanopartículas de ouro como biossensor colorimétrico na quantificação de colesterol total;
- Avaliação da resposta do biossensor na presença de interferentes.

3.3 Objetivos específicos do capítulo II

- Síntese e caracterização do óxido de grafeno;
- Preparação de ligantes de 2,1,3-benzotiadiazolas substituídas;
- Funcionalização do óxido de grafeno com os ligantes derivados da 2,1,3-benzotiadiazola;
- Avaliação da importância do íon La^{3+} na funcionalização do óxido de grafeno com derivados de 2,1,3-benzotiadiazolas em diferentes proporções;
- Caracterização dos materiais sintetizados;
- Otimização do tempo de imobilização e quantidade da enzima colesterol oxidase no material sintetizado;
- Aplicação dos materiais de óxido de grafeno funcionalizados com 2,1,3-benzotiadiazolas substituídas, contendo ou não lantânio, como biossensores colorimétricos na quantificação de colesterol total;

- Avaliação da resposta dos biossensores na presença de interferentes;
- Avaliação do armazenamento dos biossensores.

4 Materiais e métodos

4.1 Materiais

Todos os reagentes utilizados nesse trabalho são da marca Sigma-Aldrich, exceto o peróxido de hidrogênio 30% que é da marca Vetec e os sais de fosfato de sódio monobásico e dibásico anidros P.A. que são da marca Neon. O hidrobrometo de 3-bromopropilamina foi purificado, lavando-se com tetraidrofurano (THF) gelado até obter um sólido branco. Os outros reagentes foram utilizados sem necessidade de purificação.

As enzimas utilizadas nesse estudo foram a enzima peroxidase e a enzima colesterol oxidase. A enzima peroxidase de *horseradish* da marca Sigma-Aldrich em pó liofilizado (≥ 250 U mg^{-1} de proteína) foi utilizada para ambos capítulos desse estudo. No capítulo I, foi utilizada a enzima ChOx de *microorganismos* expressa em *Escherichia coli* da marca Sigma-Aldrich em pó liofilizado (≥ 50 units mg^{-1} proteína). Enquanto no capítulo II, foi utilizada a enzima ChOx de *Streptomyces sp.* da marca Sigma-Aldrich em pó liofilizado (≥ 20 units mg^{-1} proteína).

4.2 Métodos

Para a caracterização dos materiais em ambos os capítulos desse estudo foram utilizadas as técnicas de espectroscopia na região do infravermelho com transformada de Fourier no modo de reflexão total atenuada (FTIR-ATR) utilizando o equipamento Bruker modelo Alpha-P de 4000 a 450 cm^{-1} , com 32 scans e resolução de 4 cm^{-1} . Também foi realizada a espectroscopia Raman utilizando um espectrômetro Horiba Jobin Yvon iHR320 excitado com laser de HeNe (632,8 nm) de 10 mW, com detector CCD Symphony refrigerado a nitrogênio líquido com lente de 50X e o diâmetro amostrado foi de aproximadamente 3 micrômetros. A análise elementar foi realizada no equipamento CHN SO PE 2400 series II da marca PerkinElmer. Os ligantes foram caracterizados por ressonância magnética nuclear (RMN) no equipamento da Varian 400 MHz com aproximadamente 10 mg de amostra em solvente deuterado e temperatura ambiente.

Adicionalmente, no capítulo I, os materiais foram caracterizados por difratometria de raios X, microscopia eletrônica de transmissão e espectroscopia de fotoelétrons excitados por raios X (XPS). As análises de difração de raios X (DRX) foram realizadas à temperatura ambiente em um equipamento D/Max 2500V/PC (Rigaku Corporation, Tokyo, Japan), com ângulo 2θ de 5° a 50° e passo de 0.05°, utilizando uma fonte de radiação de Cu ($K\alpha = 1.5418$ Å). As imagens foram obtidas por microscopia eletrônica

de transmissão (MET), após metalização com ouro, em um microscópio da JEOL modelo JEM- 1200 EXII operando a uma tensão de aceleração de 80kV. Para realização das imagens de MET, poucos miligramas dos materiais foram dispersos em 2-propanol e uma gota dessa solução foi depositada sobre uma tela de cobre. Para as medidas de XPS no Laboratório Nacional de Luz Síncrotron, os materiais de óxido de grafeno funcionalizado com líquido iônico foram dispersos em fita de carbono condutora e analisadas em modo *long scan* e nas regiões do N 1s, C 1s e Au 4f. Os espectros foram coletados usando um monocromador de cristal-duplo de InSb (111) em uma energia de fóton fixa de 1840 eV em um ângulo de incidência de 45° à temperatura ambiente.

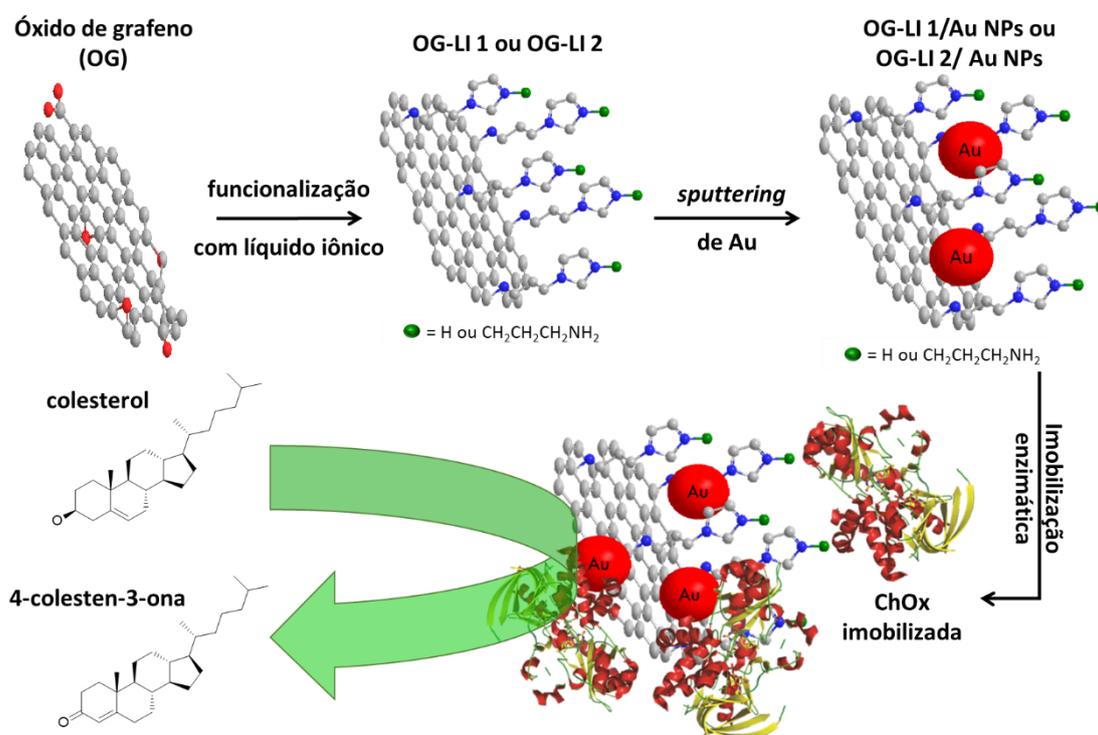
No capítulo II, foram realizadas ainda análises de espectroscopia no ultravioleta-visível (UV-vis), espectroscopia de fluorescência, XPS e análise termogravimétrica (TGA). Os espectros de UV-vis foram obtidos no espectrofotômetro da Shimadzu modelo UV-2450, enquanto os espectros de fluorescência de emissão e excitação foram obtidos no fluorímetro da Shimadzu modelo RF-5301PC. Ambos os experimentos foram realizados a temperatura ambiente utilizando cubeta de quartzo com 4 faces óticas de 1 cm para análise de soluções. As medidas de XPS foram realizadas em um equipamento OMICRON (CHA - Concentric Hemispherical Analyser), utilizando radiação Al/K α (1486,6 eV) e ânodo operado a 15 kV, 15mA e 225W. As amostras foram depositadas sobre fita de cobre em porta amostras de molibdênio e transferidas sob atmosfera para a pré-câmara. A pressão na câmara de análise foi de 1×10^{-9} mbar. Os espectros de varredura (*survey*) foram obtidos com uma energia de passagem de 50 eV e passo de 1 eV e as regiões específicas de interesse foram obtidas em uma resolução maior, energia de passagem de 10 eV e passo de 0.1 eV. Foram avaliadas as estabilidades térmicas dos materiais funcionalizados com derivados de BTDA no equipamento TGA Q50, utilizando 3 mg de material e operando com atmosfera de nitrogênio (40 mL min^{-1}) até 700 °C com taxa de aquecimento de $20 \text{ }^\circ\text{C min}^{-1}$.

Para os ensaios de atividade dos biossensores produzidos, foi utilizado o espectrofotômetro de UV-vis da marca Shimadzu modelo UV-2450 no intervalo 400-600 nm e velocidade rápida de varredura.

CAPÍTULO I

5 Procedimento experimental

Para a síntese dos materiais utilizados no capítulo I, foram preparados dois líquidos iônicos (LI 1 e LI 2) para funcionalização do óxido de grafeno (OG). Nanopartículas de ouro (Au NPs) foram depositadas sobre os materiais funcionalizados pelo método de *sputtering*. Então, a enzima colesterol oxidase foi imobilizada a fim de aplicá-los como biossensores para colesterol total. O Esquema 7 resume a rota de síntese dos materiais de óxido de grafeno funcionalizados com líquidos iônicos e nanopartículas de ouro com colesterol oxidase, que será detalhada nas próximas seções.



Esquema 7. Rota de síntese dos materiais de óxido de grafeno funcionalizados com líquidos iônicos e nanopartículas de ouro com a enzima colesterol oxidase imobilizada para aplicação como biossensor.

5.1 Síntese do óxido de grafeno

O óxido de grafeno (OG) foi sintetizado utilizando o método de Hummers e Offeman⁶⁹ modificado e reportado por Wang.¹⁰⁵ Em um balão de 2 L de três bocas, foram adicionados 3 g de grafite sobre 12 mL de ácido sulfúrico concentrado (H_2SO_4), 2,5 g de persulfato de potássio ($\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$) e 2,5 g de pentóxido de fósforo (P_2O_5); o sistema foi aquecido a 80 °C e mantido sob agitação por 4,5 h. Após, a reação foi resfriada e foram adicionados 500 mL de água deionizada, mantendo sob agitação durante a noite. A

mistura foi filtrada em papel filtro (Quanty, diâmetro de poros de 28 μm) e lavada com água destilada até que o filtrado atingisse pH neutro. O sólido foi seco ao ar durante a noite. O grafite pré-tratado foi colocado no balão de 2 L com 120 mL de H_2SO_4 concentrado em banho de gelo. Foram adicionados lentamente 15 g de permanganato de potássio (KMnO_4) mantendo a temperatura inferior a 20 $^\circ\text{C}$. A reação foi agitada a 35 $^\circ\text{C}$ por 2 h. Então, a reação foi diluída com 250 mL de água deionizada e agitada por mais 2 h. Por fim, foram acrescentados mais 700 mL de água deionizada e 30 mL de peróxido de hidrogênio 30%, a fim de consumir o excesso de KMnO_4 . O material obtido foi centrifugado a 3500 rpm por 30 min, lavado com HCl 10% (três vezes) e etanol (uma vez) e seco em estufa a vácuo (Fisher Scientific modelo 280A com controlador de temperatura) a 60 $^\circ\text{C}$ por 3 h.

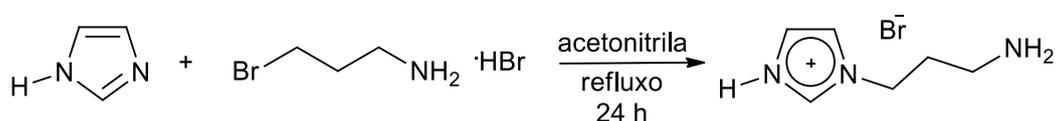
Rendimento: aproximadamente 3,5 g.

5.2 Síntese do líquido iônico brometo de 1-(3-aminopropil)-1H-imidazólio (LI 1)

O líquido iônico brometo de 1-(3-aminopropil)-1H-imidazólio (LI 1) foi sintetizado por meio de metodologia adaptada à previamente descrita na literatura (Esquema 8).¹⁰⁶ Em um experimento típico, 11 mmol de imidazol (0,7723 g) foram misturados com 11 mmol de hidrobrometo de 3-bromopropilamina (2,4507 g) em 50 mL de acetonitrila. A reação ficou sob atmosfera de nitrogênio em refluxo por 24 h. O precipitado foi lavado com acetonitrila para remover o excesso de reagentes e seco à vácuo sob aquecimento.

A geometria do líquido iônico foi otimizada com o método semi-empírico PM6¹⁰⁷ sem efeito de solvente utilizando o programa MOPAC2016.¹⁰⁸

Rendimento: 79% após purificação (1,780 g).



Esquema 8. Síntese do líquido iônico brometo de 1-(3-aminopropil)-1H-imidazólio (LI 1).

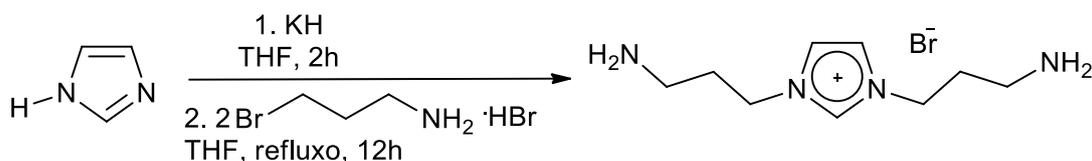
5.3 Síntese do líquido iônico brometo de 1,3-bis(3-aminopropil)-imidazólio (LI 2)

O líquido iônico dissustituído brometo de 1,3-bis(3-aminopropil)-imidazólio (LI 2) foi sintetizado de acordo com metodologia descrita na literatura (Esquema 9).¹⁰⁹ Todo

o experimento foi realizado sob atmosfera de argônio. Em um experimento típico, 5,3 mmol de hidreto de potássio (0,210 g) foi pesado em um Schlenk dentro da câmara de luvas. Na sequência, o hidreto de potássio foi diluído em 8 mL de THF e acoplou-se ao sistema um funil de adição contendo 5,3 mmol de imidazol (0,367 g) dissolvido em 8 mL de THF. Então, a solução de imidazol foi gotejada lentamente sobre o KH em banho de gelo. Ao terminar a adição, o banho de gelo foi removido e a solução ficou sob agitação por 2 h em temperatura ambiente. Em seguida, foram adicionados lentamente ao sistema 20 mmol de hidrobrometo de 3-bromopropilamina (2,317 g) dissolvidos em 25 mL de THF com auxílio do funil de adição. A solução ficou reagindo por 12 h em condição de refluxo. O precipitado foi lavado com THF e seco à vácuo sob aquecimento. O sólido obtido foi diluído em água e o pH foi ajustado a 10 com adição de hidróxido de potássio. Finalmente, o solvente foi removido sob vácuo com aquecimento.

A geometria do líquido iônico foi otimizada com o método semi-empírico PM6¹⁰⁷ sem efeito de solvente utilizando o programa MOPAC2016.¹⁰⁸

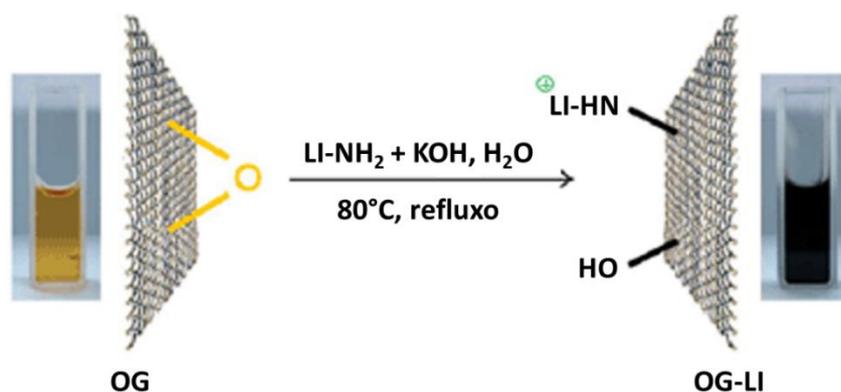
Rendimento: 41% após purificação (0,566 g).



Esquema 9. Síntese do líquido iônico brometo de 1,3-bis(3-aminopropil)-1H-imidazólio (LI 2).

5.4 Síntese dos materiais de grafeno funcionalizados com líquidos iônicos (OG-LI)

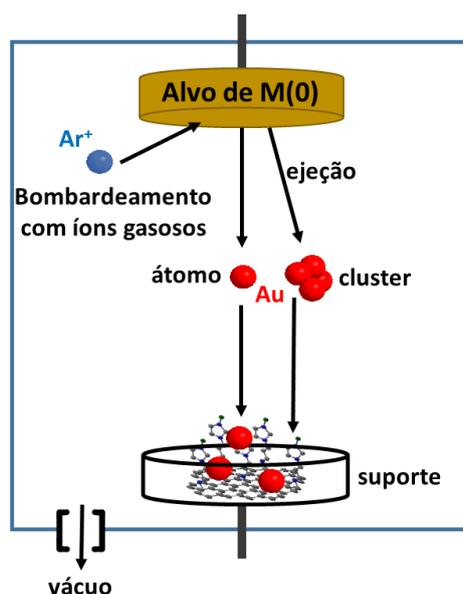
A reação de funcionalização foi realizada conforme procedimento anteriormente reportado na literatura (Esquema 10).¹¹⁰ Em um balão de 250 mL foram adicionados 100 mg de OG e 100 mL de água deionizada e colocou-se no banho de ultrassom por 1 h. Em seguida, foram adicionados 200 mg de líquido iônico, que corresponde a 0,97 mmol de LI 1 ou 0,76 mmol de LI 2. Alguns minutos depois foram acrescentados 200 mg de hidróxido de potássio e a mistura ficou sob agitação magnética a 80 °C por 24 h. O sólido obtido foi centrifugado a 3500 rpm por 30 min, lavado duas vezes com ácido clorídrico 10% e uma vez com etanol. O óxido de grafeno funcionalizado (OG-LI) foi seco em estufa à vácuo a 60 °C por 4 h. Esses materiais foram denominados OG-LI 1 e OG-LI 2 para óxido de grafeno funcionalizado com LI 1 e LI 2, respectivamente.



Esquema 10. Ilustração da preparação do óxido de grafeno funcionalizado com líquido iônico. (Adaptado de YANG, 2009¹¹⁰)

5.5 Deposição das nanopartículas de ouro por *sputtering*

Realizou-se a deposição de nanopartículas de ouro nos materiais de OG-LI a fim de facilitar a imobilização da enzima e de melhorar a transferência eletrônica. Anteriormente à deposição, o material foi seco sob vácuo à temperatura ambiente por 2 h. A deposição foi realizada utilizando o equipamento MED 020 da Bal-Tech no modo *sputter*, conforme Esquema 11. Foi utilizada uma voltagem de descarga de 40 mA (335 V) em pressão de argônio de 2 Pa à temperatura ambiente por 120 s. O material (150 mg) foi colocado em uma placa de Petri de 3 cm de diâmetro paralela ao alvo de ouro e localizada a uma distância de 50 mm.¹¹¹



Esquema 11. Modelo simplificado da deposição de nanopartículas pelo método de *sputtering*.

5.6 Aplicação dos materiais de OG-LI/ Au NPs/ChOx como biossensor colorimétrico

A quantificação de colesterol total pelo método colorimétrico foi realizada de forma similar à utilizada em laboratórios de análises clínicas, descrita previamente por Allain e colaboradores como uma metodologia enzimática para determinação de colesterol total em soro fisiológico.¹⁶ A quantificação de colesterol foi realizada a partir da reação com o subproduto da reação de oxidação do colesterol: H₂O₂. O H₂O₂ reage com o reagente de cor utilizado catalisado pela enzima peroxidase, gerando o corante quinonimina (Esquema 1) e, então, a oxidação do colesterol é quantificada por espectroscopia na região do UV-vis em 500 nm. Para a realização de experimentos de quantificação de colesterol, foi preparado um reagente de cor composto por 500 mL de tampão de fosfato (Na₂HPO₄/NaH₂PO₄ 35 mmol L⁻¹ pH 7,0), 28 mmol L⁻¹ de fenol (1,317 g), 800 U L⁻¹ de enzima peroxidase, 0,5 mmol L⁻¹ de 4-aminoantipirina (0,051 g) e 15 mmol L⁻¹ de azida de sódio (0,487 g). Também foi preparada a solução tampão de fosfato 0,1 mol L⁻¹ a partir de 93 mL da solução 1 mol L⁻¹ de Na₂HPO₄ e 7 mL da solução 1 mol L⁻¹ de NaH₂PO₄, que foram diluídas a 1 L com água deionizada. O pH foi ajustado utilizando o pHmetro (modelo K39 da KASVI) com a solução de NaH₂PO₄ a fim de atingir pH 7,0. A solução tampão de fosfato preparada foi utilizada para solubilização da enzima ChOx e nos ensaios colorimétricos. Tanto a solução tampão como o reagente de cor foram armazenados à 4 °C durante o período dos experimentos.

5.6.1 Imobilização da enzima colesterol oxidase (ChOx)

A imobilização da enzima colesterol oxidase foi realizada imergindo 3 mg do material (OG-LI 1/Au NPs ou OG-LI 2/Au NPs) em 500 µL de solução contendo a enzima colesterol oxidase de microrganismos (2,15 U mL⁻¹) em tampão de fosfato. Uma unidade de atividade de colesterol oxidase (U) foi definida como a quantidade de enzima que catalisa a conversão de 1 mmol de colesterol para 4-colesten-3-ona por minuto nas condições do experimento, utilizando a curva de calibração da enzima livre da Figura S1. O *ependorff* contendo o material e a solução enzimática foi deixado parado na posição horizontal à 4 °C por 24 h a fim de proporcionar a adsorção da enzima na superfície do material. A fim de compreender o efeito de cada componente do material na imobilização da enzima, experimentos controle foram realizados imobilizando a enzima em óxido de grafeno puro (OG), nanopartículas de ouro depositadas sobre o óxido de grafeno (OG/Au

NPs) e nos materiais de óxido grafeno funcionalizados com líquido iônico (OG-LI 1 e OG-LI 2). Após 24 h de imersão, a mistura foi centrifugada, o suporte foi lavado uma vez com 1 mL de tampão de fosfato para retirada de enzimas não adsorvidas no material e centrifugada novamente. Os materiais sobre os quais foi imobilizada a enzima colesterol oxidase foram denominados OG-LI 1/Au NPs/ChOx, OG-LI 2/Au NPs/ChOx, OG-LI 1/ChOx, OG-LI 2/ChOx, OG/Au NPs/ChOx e OG/ChOx.

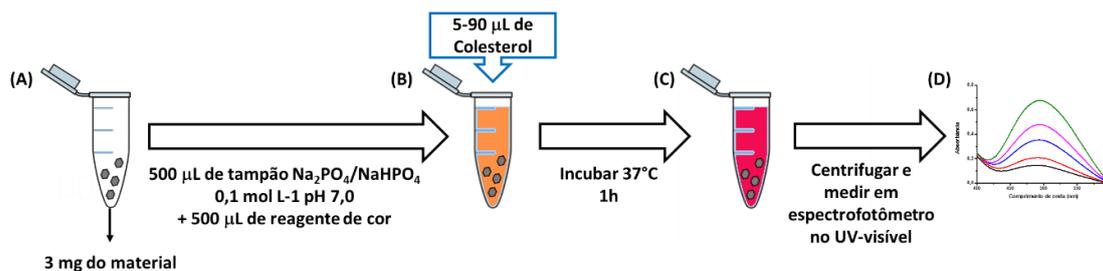
Os sobrenadantes da solução de imobilização e de lavagem foram analisados a fim de determinar indiretamente a quantidade de enzima imobilizada. Aos 0,5 mL de sobrenadante, foram adicionados 0,5 mL de reagente de cor e 10 μ L da solução de colesterol total de 200 mg dL⁻¹ comercial, resultando em 1,98 mg dL⁻¹ de colesterol total. A porcentagem de imobilização foi calculada a partir da quantidade de enzima detectada no sobrenadante da imobilização e líquidos de lavagem, segundo a equação 1.

$$\% \text{ Imobilização} = 100 - \left[\frac{(A_S + A_L)}{A_{EL}} \times 100 \right] \quad (1)$$

Onde A_S e A_L são as atividades do sobrenadante de imobilização e da lavagem, respectivamente, e A_{EL} é a atividade da enzima ChOx livre para 1,98 mg dL⁻¹ de colesterol total.

5.6.2 *Quantificação de colesterol total pelo método colorimétrico*

Em um experimento típico, foram adicionados 0,5 mL de tampão de fosfato, 0,5 mL de reagente de cor (descrito em 5.6) e solução de colesterol total comercial (5 μ L a 70 μ L da solução de colesterol total de 200 mg dL⁻¹) à 3 mg de OG-LI 1/Au NPs/ChOx ou OG-LI 2/Au NPs/ChOx (Esquema 12). Foram medidas diferentes quantidades de colesterol (0,995; 1,980; 3,921; 5,825; 9,524 e 13,084 mg dL⁻¹) a fim de avaliar a linearidade na determinação do colesterol pela enzima imobilizada nos materiais; vale ressaltar que cada uma das medidas foi feita com diferentes alíquotas de 3 mg do mesmo material. A mistura foi incubada a 37 °C por 1 h - para simular as condições de temperatura do corpo - e a atividade da enzima no material foi calculada a partir da leitura da absorbância em 500 nm após ensaio da atividade conforme descrito acima. Também foi analisada a atividade da enzima nos seguintes materiais na quantificação de colesterol total: OG/Au NPs/ChOx e OG/ChOx.



Esquema 12. Etapas da reação colorimétrica de quantificação do colesterol: pesar 3 mg de material sólido em um *eppendorf* (A), adicionar tampão de fosfato, reagente de cor e solução de colesterol (B), incubar a 37 °C por 1 h (C) e medir a absorção na região do UV-vis (D).

A atividade recuperada da enzima imobilizada em todos os materiais foi avaliada a partir da atividade recuperada utilizando uma concentração de 1,98 mg dL⁻¹ de colesterol total. A atividade recuperada foi determinada medindo-se a atividade da enzima imobilizada no material (A_M) e comparando essa atividade com a da enzima livre (A_{EL}), segundo a equação 2.

$$\textit{Atividade Recuperada} = \frac{A_M}{A_{EL}} \times 100 \quad (2)$$

5.6.3 Experimentos na presença de interferentes

Foram realizados testes com a presença dos principais interferentes na determinação de colesterol total: glicose, ácido ascórbico e ácido úrico, pois estes podem afetar a concentração de H_2O_2 no meio reacional.¹⁴ O procedimento experimental foi idêntico ao utilizado para quantificação de colesterol. Foram utilizados 3 mg de material (OG-LI 1/Au NPs/ChOx ou OG-LI 2/Au NPs/ChOx), 0,5 mL de tampão de fosfato, 0,5 mL de reagente de cor e solução contendo interferente dentro da faixa de concentração na qual essas substâncias são encontradas no sangue: 0,1 mmol L⁻¹ de glicose, 2,5 µmol L⁻¹ de ácido ascórbico ou 20 µmol L⁻¹ de ácido úrico.¹¹² A mistura foi incubada por 1 h a 37 °C e a atividade enzimática analisada pela leitura da absorbância em 500 nm por espectroscopia no UV-vis. Na sequência, o material utilizado para testar o interferente foi lavado com 1 mL de tampão de fosfato e reutilizado na detecção de colesterol (1,98 mg dL⁻¹) sob as mesmas condições.

5.6.4 Reutilização do biossensor

A reutilização do biossensor foi avaliada para os materiais OG-LI 1/ChOx e OG-LI 2/ChOx. A quantificação do colesterol foi realizada conforme descrito na seção 5.6.2

para $1,98 \text{ mg dL}^{-1}$. Ao finalizar cada ensaio, os materiais foram lavados duas vezes com 1 mL de tampão de fosfato, armazenados a $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$ e um novo ensaio foi realizado em 24 e 115h após a primeira avaliação.

6 Resultados e discussão

A fim de melhorar a eficiência do grafeno como biossensor colorimétrico, nesse capítulo foram estudados materiais de óxido de grafeno funcionalizados com líquidos iônicos com nanopartículas de ouro depositadas por *sputtering*. Os materiais foram caracterizados através das técnicas de ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN ^1H), espectroscopia na região do infravermelho por refletância total atenuada (FTIR-ATR), difração de raios X (DRX), análise elementar, espectroscopia Raman, microscopia eletrônica de transmissão (MET) e espectroscopia de fotoelétrons excitados por raios X (XPS).

6.1 Caracterização dos líquidos iônicos

Nesse trabalho, foram projetadas duas estruturas de líquidos iônicos derivados do cátion do imidazólio (Figura 8), que são moléculas capazes de estabilizar nanopartículas metálicas mesmo quando ligadas a suportes.^{49, 111} O líquido iônico **1** possui um grupamento terminal amina e o anel imidazólio enquanto o líquido iônico **2** possui as duas terminações amina, essenciais para a funcionalização do óxido de grafeno⁷⁹ e também passíveis de realizar ligação de hidrogênio com biomoléculas.¹¹³ O tamanho das moléculas foi calculado de acordo com a distância entre os átomos mais extremos da geometria mais estável (de menor energia), sendo que o LI **2** apresentou duas conformações com pouca diferença energética (Figura 8).

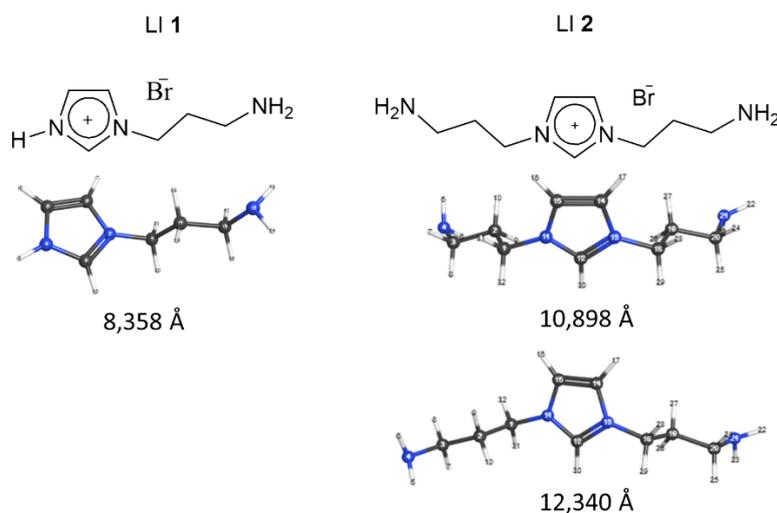


Figura 8. Estrutura dos líquidos iônicos derivados do cátion imidazólio.

Os líquidos iônicos foram caracterizados por RMN ^1H . O LI **1** apresentou os seguintes deslocamentos químicos (D_2O , 400MHz): δ ppm 8,74 (s, 1 H), 7,48 (s, 1 H), 7,42 (s, 1 H), 4,29 (t, 2 H), 3,02 (t, 2 H), 2,23 (m, 2 H), que corroboram com o LI similar descrito por Yang e colaboradores.¹¹⁰ Enquanto o LI **2** apresentou os seguintes deslocamentos químicos (D_2O , 400MHz): δ ppm 8,65 (s, 1H), 7,43 (s, 2 H), 4,28 (t, 4 H), 4,16 (m, 4 H), 2,70 (t, 4 H), 2,45 (m, 4 H), que confere com os deslocamentos do mesmo LI obtido por Li e colaboradores.¹⁰⁹

6.2 Caracterização dos materiais de óxido de grafeno funcionalizados com líquidos iônicos e nanopartículas de ouro

Os materiais de óxido de grafeno funcionalizados com LI **1** e LI **2** foram caracterizados por meio das técnicas de espectroscopias no FTIR-ATR e Raman, XPS, análise elementar e DRX e a deposição das nanopartículas de ouro pode ser confirmada através das técnicas de DRX e MET.

Na Figura 9 são apresentados os espectros de FTIR-ATR do óxido de grafeno (Figura 9A), do LI **1** e óxido de grafeno funcionalizado com LI **1** (Figura 9B) e do LI **2** e óxido de grafeno funcionalizado com LI **2** (Figura 9C).

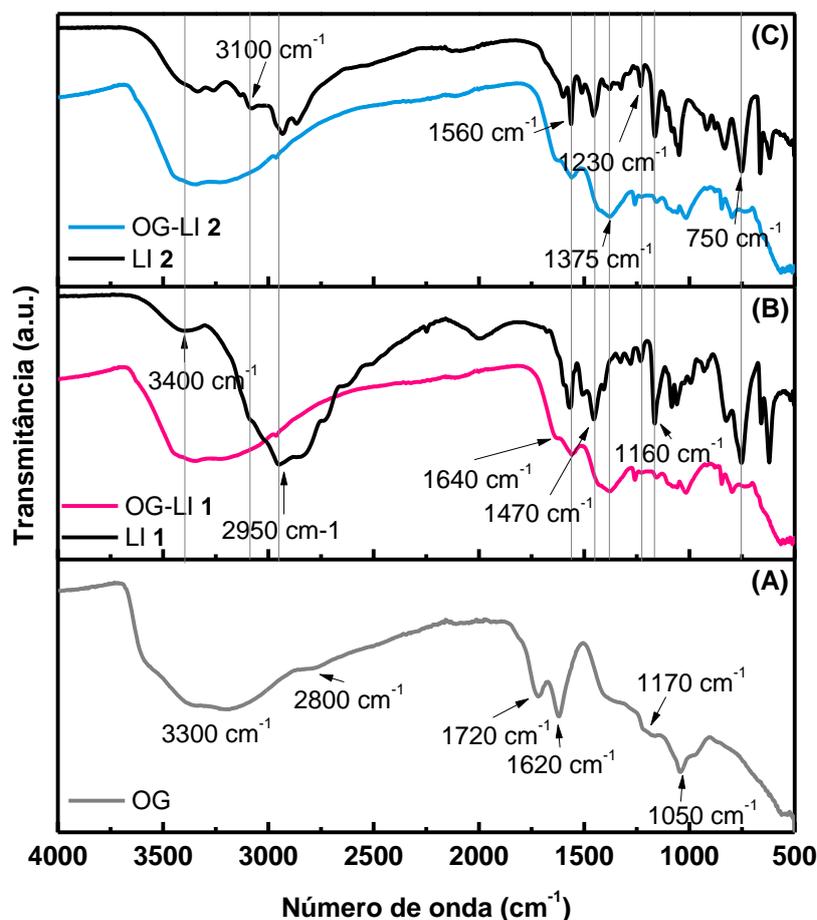


Figura 9. Espectros de FTIR-ATR dos materiais óxido de grafeno (OG) (A), do LI 1 e óxido de grafeno funcionalizado com LI 1 (OG-LI 1) (B) e do LI 2 e óxido de grafeno funcionalizado com LI 2 (OG-LI 2) (C).

Analisando o espectro de FTIR-ATR do óxido de grafeno sintetizado pelo método de Hummers, podemos destacar a larga banda em $3700\text{-}3000\text{ cm}^{-1}$ referente aos grupos carboxílicos, hidroxilas e água, confirmando a hidrofiliabilidade do óxido de grafeno.¹¹⁴ A banda em 2800 cm^{-1} deve-se à sobreposição dos estiramentos simétrico e assimétrico da ligação CH_2 que geralmente aparecem em 2930 e 2850 cm^{-1} , respectivamente, presentes nos carbonos terminais das folhas de grafeno.¹¹⁴ Os carbonos não oxidados podem ser identificados através da banda em 1620 cm^{-1} referente ao estiramento $\text{C}=\text{C}$ e ao dobramento da ligação H-O-H da água. Não se observa banda em 1570 cm^{-1} referente à vibração C-C dos domínios de grafite.^{115, 116} Por fim, podemos identificar as bandas características dos grupos oxigenados em 1720 , 1170 e 1050 cm^{-1} referentes aos estiramentos $\text{C}=\text{O}$ de carbonila e carboxila, C-OH e C-O , respectivamente.¹¹⁴⁻¹¹⁹ A

presença desses grupos oxigenados confirma a oxidação do grafite e facilita a fixação de biomoléculas através de ligações de hidrogênio, sendo um atrativo para aplicação desses materiais como biossensores.¹¹⁷

Na Figura 9B e C, observam-se os espectros dos líquidos iônicos **1** e **2**, respectivamente, e do óxido de grafeno funcionalizada com cada um deles. Nos espectros dos líquidos iônicos puros – em preto na Figura 9B e C- identificam-se em 3100 cm^{-1} o estiramento C-H aromático e dois sinais do anel imidazólio em 1230 e 1470 cm^{-1} , referentes ao estiramento C-N aromático e C=C aromáticos, respectivamente.¹²⁰ Da cadeira carbônica lateral com o grupamento amina, observam-se as bandas em 2950 cm^{-1} referentes ao estiramento CH_2 alifático, em 3400 cm^{-1} o estiramento N-H de amina (provavelmente alargado devido à presença de água), em 1160 cm^{-1} devido ao estiramento C-N alifático e em 1560 e 750 cm^{-1} referentes aos dobramentos NH_2 no plano e fora do plano, respectivamente.¹²⁰ Observa-se que os espectros dos materiais funcionalizados são formados pela sobreposição de bandas referentes ao líquido iônico e ao óxido de grafeno. Destacam-se duas bandas intensas nos materiais funcionalizados que diferem do óxido de grafeno em 1375 e 1640 cm^{-1} atribuídas ao estiramento C-N e ao estiramento C=O de amida secundária.^{86, 106} A banda em 1570 cm^{-1} , também referente a vibração C-C dos domínios de grafite, apresenta-se mais intensa nos materiais funcionalizados indicando uma tendência a essa estrutura.^{115, 116} Apesar de alguns trabalhos afirmarem que os líquidos iônicos com terminação amina se ligam ao óxido de grafeno através de amidação somente quando a carboxila é ativada previamente, não se descarta essa interação entre o líquido iônico e o óxido de grafeno.⁸³ Outro indício da formação de amida é o alargamento da banda atribuída ao estiramento O-H com ligações de hidrogênio, sugerindo a presença de estiramento da ligação N-H que ocorre entre $3400\text{-}3500\text{ cm}^{-1}$. Podemos afirmar, portanto, que o líquido iônico reagiu com a maior parte dos grupos oxigenados superficiais e está ligado ao material preferencialmente de forma covalente por abertura de anel epóxido ou pela formação de amida, devido ao aumento de intensidade da banda C-N. A mudança na coloração do material de marrom para preto e insolubilidade em água apresentada pelo material após a reação, corroboram com essa afirmação.

A quantificação dos líquidos iônicos nos materiais funcionalizados foi realizada a partir da análise elementar e comparada com o material de óxido de grafeno não funcionalizado, conforme a Tabela 3.

Tabela 3. Análise elementar dos materiais funcionalizados com LIs e do suporte OG e porcentagem em massa e quantidade molar de LI estimada

	% C	% H	% N	% LI ^a	n de LI ^b
OG	43,28	2,35	0,15	-	-
OG-LI 1	43,60	3,60	7,51	36,09	0,17
OG-LI 2	51,26	4,56	7,57	34,85	0,13

^aAs porcentagens de LI 1 e LI 2 foram calculadas a partir da porcentagem de nitrogênio no material subtraída da quantidade de nitrogênio no OG. ^bValor referente a quantidade molar, em mmol/100 mg de material.

Pela análise elementar dos materiais, vemos que a porcentagem em massa dos LIs nos materiais é aproximadamente 35%, ou seja, a quantidade de LI adicionada na síntese (200% em massa) foi muito superior ao necessário para reagir com os sítios oxigenados do OG. Possivelmente, os LIs estão ocupando a maior parte dos grupos oxigenados passíveis de funcionalização, nesse caso, embora por espectroscopia no FTIR-ATR ainda se observem grupos oxigenados remanescentes nos materiais funcionalizados. Adicionalmente, é possível observar que houve maior quantidade de LI 1 tanto molar como em massa no material modificado com este do que com LI 2.

A espectroscopia Raman é uma técnica bem estabelecida para caracterização de materiais de carbono, como grafite, grafeno, diamante, fulereno e nanotubos de carbono. Essa técnica permite distinguir as diferentes estruturas de carbono e é sensível a defeitos, tensão na cadeia, dopagem, arranjo das bordas e número de camadas.^{115, 121, 122} Na Figura 10, estão apresentados os espectros de Raman do óxido de grafeno (Figura 10A) e óxido de grafeno funcionalizado com LI 1 e LI 2 (Figura 10B e C, respectivamente).

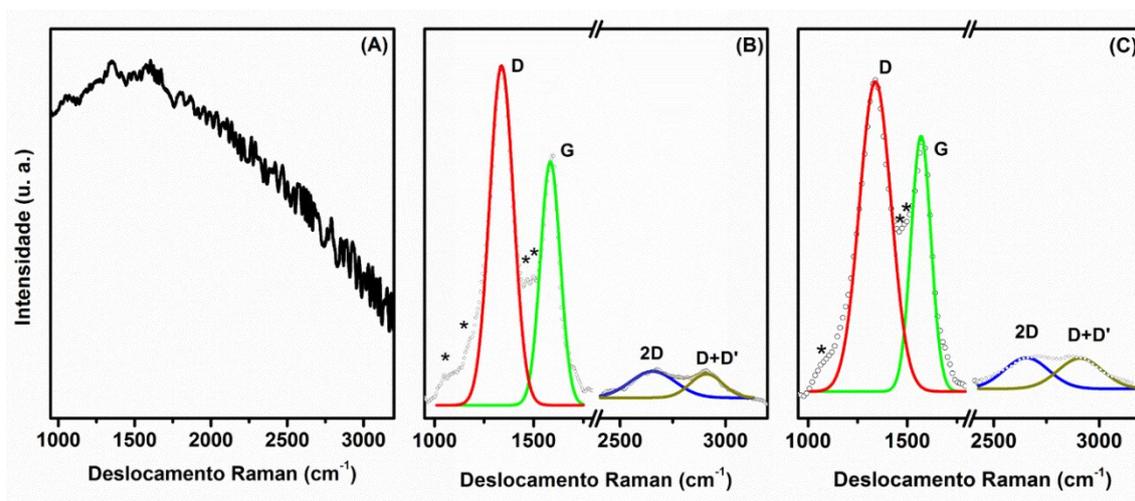


Figura 10. Espectros de Raman dos materiais de óxido de grafeno (A), óxido de grafeno funcionalizado com LI 1 (B) e óxido de grafeno funcionalizado com LI 2 (C).

A banda G é comum a materiais que possuem carbonos do tipo sp^2 em ligações C-C, ocorrendo em torno de 1580 cm^{-1} para o grafeno e podendo apresentar deslocamento de acordo com o número de camadas.^{123, 124} Por outro lado, a banda D - única banda presente no espectro Raman do diamante em 1355 cm^{-1} ¹²⁵ - surge em decorrência dos defeitos na amostra, indicando o grau de desordem do material.¹¹⁴ Outro indicativo de desordem no material é a banda de dupla ressonância 2D (também chamado de G') em 2680 cm^{-1} com formato amplo e de baixa intensidade.^{114, 115} As bandas G e G' são os modos permitidos por Raman para carbonos sp^2 ,¹²² exclusivamente no caso do grafeno monocamada a banda G' é mais forte que a banda G,^{126, 127} situação que se inverte quando se aumentam o número de camadas e defeitos no material. É evidente que nenhum dos materiais estudados nesse trabalho é formado por monocamada de grafeno, como sugerido pelos espectros da Figura 10. O material de óxido de grafeno não apresenta definição das bandas devido à efeito de espalhamento ocasionado pela alta concentração de grupos oxigenados.¹²⁸ Os deslocamentos Raman da banda G dos materiais OG-LI 1 e OG-LI 2 foram 1585 cm^{-1} e 1570 cm^{-1} , respectivamente; indicando material de grafeno com ligações do tipo sp^2 C-C e um maior número de camadas quando modificado com o líquido iônico dissubstituído (LI 2) em relação ao análogo modificado com LI 1. A presença de defeitos na estrutura, ou seja, de carbonos sp^3 devido à funcionalização com o líquido iônico é confirmada pela baixa intensidade da banda 2D e pela presença das bandas D e D+D'. A fim de avaliar o grau de desordem do grafeno, usualmente é feita a análise da razão de intensidade entre as bandas D e G (I_D/I_G).¹²⁴ As razões I_D/I_G obtidas

foram de 1,39 e 1,26 para os materiais OG-LI 1 e OG-LI 2, respectivamente, indicando que o material modificado com LI 1 apresenta maior desordem devido ao efeito de borda.¹²¹ Tuinstra e Koenig observaram que a razão I_D/I_G é inversamente proporcional ao tamanho efetivo do cristalito (L_a) em direção do plano grafítico.¹²⁵ Logo, é possível calcular o tamanho de cristalito dos sítios grafíticos a partir da equação 3:

$$L_a = \frac{560}{E_L^4} \left(\frac{I_D}{I_G} \right)^{-1} \quad (3)$$

onde E_L é a energia do laser utilizado em eV,¹²⁹ no caso desse trabalho o laser de He-Ne emite em 632.8 nm, que corresponde a 1,96 eV. Portanto, o L_a obtido para os materiais foi de 27,3 nm e 30,1 nm para OG-LI 1 e OG-LI 2, respectivamente. O valor de L_a sugere que o material modificado com LI 1 possui menos característica de grafite; enquanto o material com LI 2 apresenta maior interação entre as folhas de grafeno, sugerindo que o LI 2 possa estar agindo como ponte entre as folhas de grafeno, corroborando com o resultado observado pela análise elementar. Portanto, a espectroscopia Raman indica que o material OG-LI 2, que possui duas terminações amina passíveis de funcionalização, possui maior característica grafítica tanto devido ao tamanho efetivo de cristalito quanto devido ao maior número de camadas determinado pelo deslocamento da banda G, em relação ao material OG-LI 1.

Para compreender melhor a estrutura cristalina dos materiais, foi realizada a análise de difratometria de raios X de 5 a 50 graus (Figura 11).

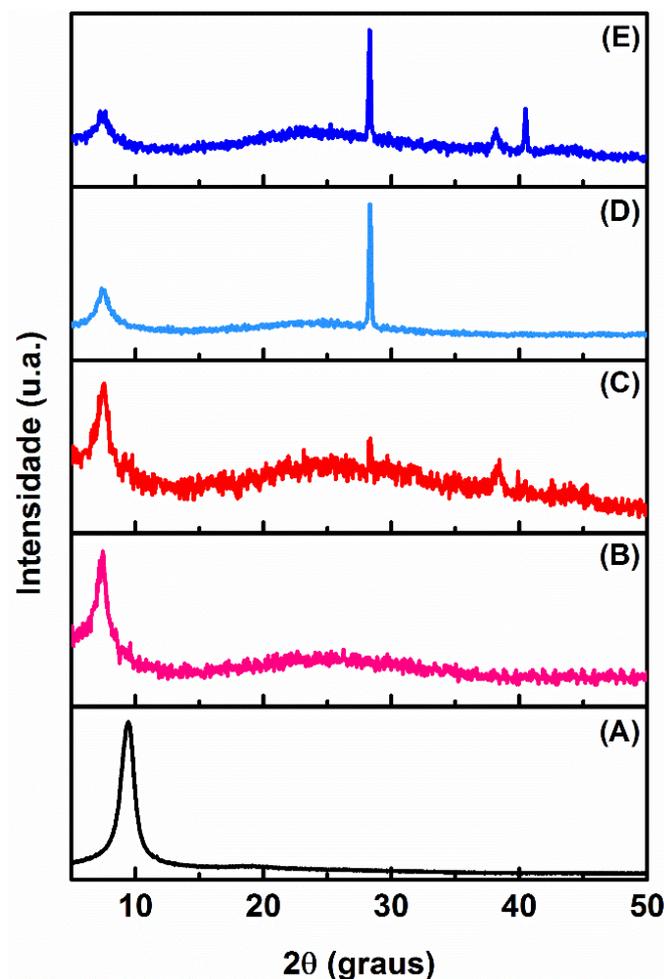


Figura 11. Difratoograma de raios X dos materiais OG (A), OG-LI 1 (B), OG-LI 1/Au NPs (C), OG-LI 2 (D) e OG-LI 2/Au NPs (E).

No difratograma do óxido de grafeno puro (Figura 11A), podemos confirmar a síntese do material pelo método de Hummers devido à presença do largo pico característico em $9,5^\circ$ ($d = 9,3 \text{ \AA}$) que corresponde ao plano (002).^{114, 130-132} O grau de oxidação de materiais de óxido de grafeno é proporcional ao espaçamento entre camadas, podendo variar de 8 a $9,5 \text{ \AA}$ de acordo com a metodologia de síntese utilizada;^{115, 119} esse resultado mostra que o método utilizado nesse estudo foi eficiente para produzir um material com alto grau de oxidação. Os materiais funcionalizados apresentaram o pico de difração referente ao plano (002) em $7,5^\circ$ e $7,3^\circ$ – correspondendo a um espaçamento entre camadas de $11,8 \text{ \AA}$ e $12,1 \text{ \AA}$ – quando utilizado LI 1 (Figura 11B) e LI 2 (Figura 11D), respectivamente. Devido ao maior espaçamento entre camadas comparado ao OG, pode-se concluir que o líquido iônico funcionalizou as folhas, atuando como espaçador entre camadas. Portanto, a distância interplanar do OG-LI 1, que é maior que o tamanho do LI 1 ($8,358 \text{ \AA}$, ver Figura 8), sugere que houve ligação somente em uma extremidade e

que o LI na superfície contribui para a repulsão eletrostática entre as folhas de OG. Enquanto, no caso do LI 2 (10,989 a 12,340 Å, ver Figura 8), a distância interplanar do OG-LI 2 indica que há moléculas de LI 2 ligadas covalentemente pelas duas extremidades nas folhas de OG, formando uma estrutura semelhante ao grafite: folhas de grafeno intercaladas por líquido iônico. Complementarmente, um pico intenso em 28,3° ($d = 3,3$ Å) característico de domínios de grafite^{115, 131, 132} está bem evidente no difratograma do material GO-LI 2 (Figura 11D). Esse resultado corrobora com o resultado encontrado por espectroscopia Raman de que o material OG-LI 2 apresenta estrutura gráfitica, com regiões com pequenas distâncias entre as folhas de carbono. Observa-se um pico pouco intenso na região de 28° para o material GO-LI 1/Au NPs que pode ser um indicativo da aproximação das folhas de grafeno funcionalizadas em torno das nanopartículas de ouro (Figura 11C). A deposição das nanopartículas de ouro sobre os materiais GO-LI1/Au NP e GO-LI 2/Au NPs é confirmada no difratograma (Figura 11C e E) pelos picos em 38,2° e 40,5° que correspondem aos planos (111) e (200) do ouro, respectivamente.^{115, 133, 134}

Por microscopia eletrônica de transmissão (MET), foi possível identificar as folhas de grafeno funcionalizado e as nanopartículas de ouro que correspondem às regiões cinza claro e escuro, respectivamente (Figura 12). A distribuição de tamanho de partícula foi realizada utilizando o programa ImageJ¹³⁵ pela contagem do diâmetro de 200 nanopartículas.

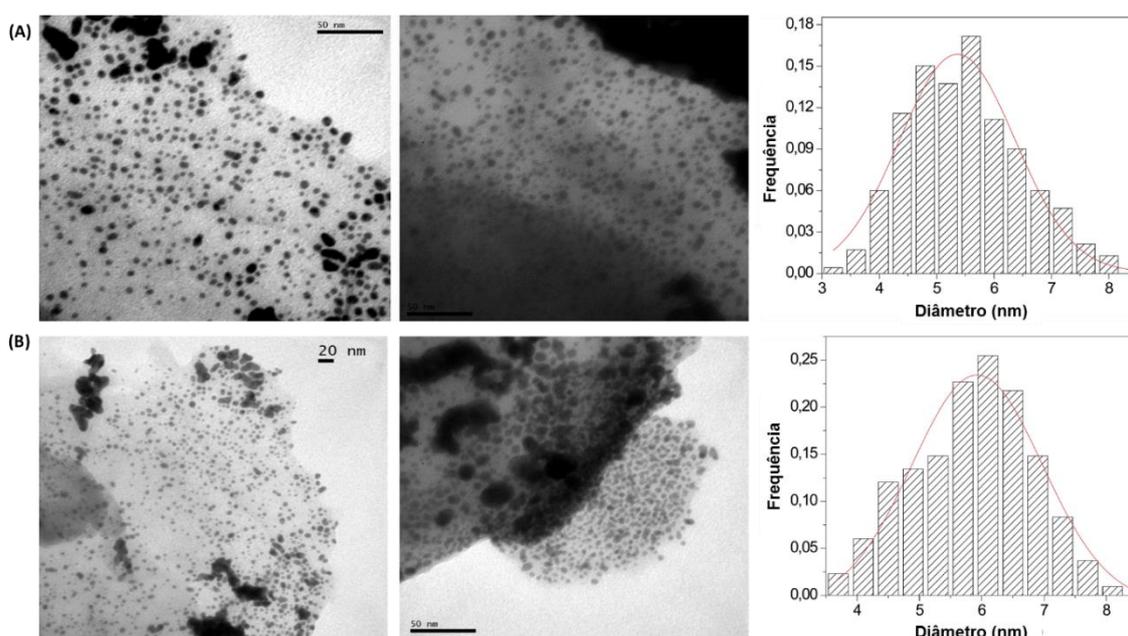


Figura 12. MET dos materiais OG-LI 1/Au NPs (A) e OG-LI 2/Au NPs (B) com seus respectivos diagramas de distribuição de tamanho de partícula.

As áreas de alta transparência indicam formação de filme muito fino (poucas camadas de grafeno funcionalizado), enquanto as áreas de média transparência indicam sobreposição de maior número de camadas.¹³⁰ As nanopartículas de ouro apresentam forma esférica e boa dispersão sobre as folhas de grafeno funcionalizado, apresentando algumas regiões de aglomerados. O diâmetro médio das NPs de ouro foi de 5.4 ± 2.0 nm (Figura 12A) e 5.9 ± 2.1 nm (Figura 12B) quando depositadas sobre os materiais OG-LI 1 e OG-LI 2, respectivamente. A estreita distribuição de tamanho das nanopartículas é uma vantagem do método de *sputtering* utilizado nesse trabalho e, por ser um método físico de deposição, evita a contaminação com outros reagentes químicos. Essa metodologia é vantajosa à medida que o tamanho de partícula pode ser controlado facilmente pela alteração dos parâmetros, como tempo, distância do alvo, corrente e voltagem aplicada.¹³⁶ Adicionalmente, acredita-se que os líquidos iônicos derivados do cátion imidazólio utilizados provêm estabilização para as nanopartículas resultando em diâmetro pequeno e estreita distribuição de tamanho.^{49, 111, 136}

Por fim, os materiais foram caracterizados por espectroscopia de fotoelétrons excitados por raios X a fim de compreender melhor a composição química na superfície do material. Na Figura 13 são apresentadas as medidas de XPS *survey* dos materiais, onde se observam picos referentes às regiões de C 1s, N 1s e Au 4f, cujos espectros de alta resolução se encontram na Figura 14.

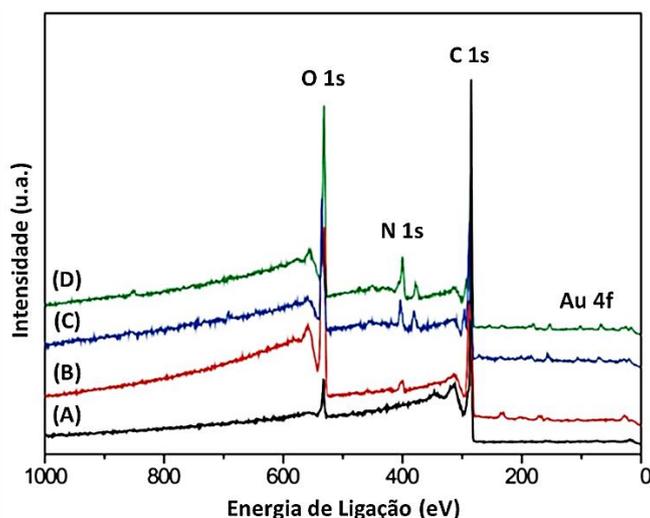


Figura 13. Medida de XPS *survey* do grafite (A), óxido de grafeno (B), OG-LI 1 (C) e OG-LI 2 (D).

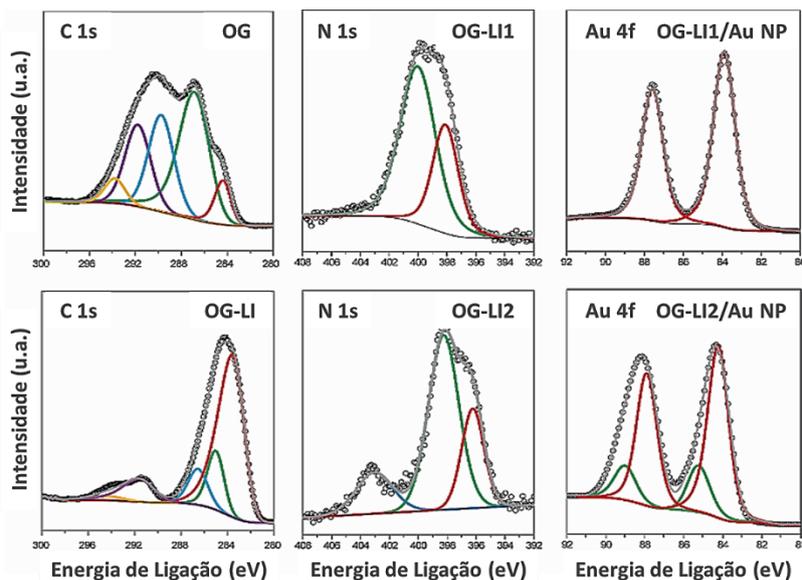


Figura 14. Medidas de XPS de alta resolução nas regiões do C 1s, N 1s e Au 4f dos materiais de OG, OG-LI 1, OG-LI 2, OG-LI 1/Au NPs e OG-LI 2/Au NPs. Os pontos pretos representam os dados experimentais e a linha cinza, o melhor *fitting*.

Quando comparados os espectros *survey* dos materiais de grafite, óxido de grafeno e óxido de grafeno funcionalizado, podemos observar como era esperado um aumento no pico referente ao oxigênio devido à oxidação do grafite e o aparecimento do pico da região do N 1s para os materiais com líquido iônico. A razão C/O calculada para o grafite (Figura 13A) foi de 20,13 enquanto que para o óxido de grafeno (Figura 13B) foi de 3,84, confirmando o alto grau de oxidação desse material.^{115, 137} A região do C 1s (Figura 14) foi decomposta em cinco picos: linhas vermelha, verde, azul, roxa e amarela referentes aos componentes químicos C=C, C-C, C-O-C, C=O e O=C-O, respectivamente.^{110, 115, 130, 138} Após a funcionalização, a intensidade dos componentes oxigenados diminui juntamente com o aumento das regiões de C sp² indicando a ligação dos líquidos iônicos nas regiões oxigenadas presentes no óxido de grafeno.¹³⁹ Na região do N 1s (Figura 14), as linhas vermelha, verde e azul representam os componentes químicos NH (ligado ao grafeno), N do anel imidazólio¹⁸ e NH₂, respectivamente.^{110, 140} A presença de amina terminal em 405,2 eV somente é observada no material OG-LI 2 e apresenta intensidade baixa, provavelmente porque há parte dos líquidos iônicos ligados ao grafeno somente por um dos lados. Por fim, os materiais que foram depositados com nanopartículas de ouro apresentam na região do Au 4f_{7/2} (Figura 14) as linhas vermelha e verde que representam os componentes químicos Au⁰ e Au^{δ+}, respectivamente.¹⁴¹ No material OG-LI 1/Au NPs é observado um dublete consistente com ouro no estado de oxidação Au⁰,

enquanto o material OG-LI 2/Au NPs também apresenta a componente Au^{δ+}.¹⁴¹ A presença de ouro com carga positiva pode influenciar na imobilização da enzima e, conseqüentemente, a atividade do material.¹⁴² A quantidade relativa de Au encontrada por XPS nas amostras foi de 4%.

6.3 Aplicação dos materiais de óxido de grafeno funcionalizados com líquidos iônicos

As reações promovidas por enzimas apresentam alta seletividade e resposta rápida e, por isso, a imobilização das enzimas em suportes é uma área de grande interesse, pois permite na maior parte das vezes, uma maior estabilidade e atividade enzimática propiciando ainda a reutilização das mesmas.¹⁴³ O maior desafio nesse contexto é explorar novos materiais com morfologia e funcionalização de superfície adequadas para interagir com a enzima proporcionando um aumento na atividade catalítica.¹¹³ Nesse trabalho, os materiais de óxido de grafeno funcionalizados com líquidos iônicos e nanopartículas de Au foram aplicados no desenvolvimento de biossensores colorimétricos para a quantificação de colesterol total utilizando a enzima colesterol oxidase imobilizada no suporte como elemento de biorreconhecimento do analito. A quantidade de enzima colesterol oxidase foi otimizada, utilizando-se diferentes quantidade de ChOx em solução tampão de fosfato para 3 mg de material OG-LI 1/Au NPs ou OG-LI 2/Au NPs. A quantidade de ChOx que apresentou melhor resposta para o material OG-LI 1/Au NPs (Figura S2) foi escolhida para os ensaios.

Na Tabela 4, encontramos as porcentagens de imobilização e atividade recuperada para os materiais OG-LI 1/Au NPs, OG-LI 2/Au NPs e os materiais controle (OG/ChOx, OG/Au NPs/ChOx, OG-LI 1/ChOx e OG-LI 2/ChOx).

Tabela 4. Porcentagem de colesterol oxidase imobilizada nos materiais e atividade recuperada dos biossensores em relação à enzima livre

Material	Atividade recuperada após imobilização	Porcentagem de enzima ChOx imobilizada no suporte
Enzima livre (ChOx)	100%	-
OG-LI 1/Au NPs/ChOx	78%	93%
OG-LI 2/Au NPs/ChOx	55%	92%
OG/ChOx	215%	73%
OG/Au NPs/ChOx	225%	73%
OG-LI 1/ChOx	42%	58%
OG-LI 2/ChOx	45%	54%

Primeiramente, observa-se que a imobilização da ChOx foi efetiva em todos os materiais, demonstrando que estes apresentavam um ambiente favorável para adsorver a enzima. Em relação à porcentagem de enzima imobilizada nos materiais de óxido de grafeno e óxido de grafeno com nanopartículas de ouro é de 73% em ambos os casos, demonstrando que a enzima interage com os sítios oxigenados do óxido de grafeno.¹¹⁷ A enzima pode, possivelmente, ter interagido com o OG de duas formas: por ligação química entre os grupos amina da ChOx e os grupos carboxila do suporte e/ou por ligação de hidrogênio entre os resíduos da enzima e os grupos oxigenados do OG.¹¹³ Ao funcionalizar o material com líquido iônico, a quantidade de enzima imobilizada é menor (54% e 58% para OG-LI 2/ChOx e OG-LI 1/ChOx, respectivamente), pois se perdem alguns sítios oxigenados; ainda assim há imobilização, provavelmente, tanto na superfície do óxido de grafeno reduzido através dos grupos oxigenados remanescentes como por ligação de hidrogênio com os grupos amina do líquido iônico. Um efeito sinérgico é observado nos materiais de óxido de grafeno funcionalizados com líquido iônico e contendo nanopartículas de ouro que apresentam a maior porcentagem de imobilização (mais de 90%). Comparando com os análogos sem nanopartículas, pode-se inferir que a enzima também interage com o ouro, pois a porcentagem de enzima imobilizada diminui para menos de 60% na ausência da nanopartícula. A interação entre a enzima colesterol oxidase e o ouro pode ocorrer por duas interações: (i) através da ligação com os grupos tióis terminais dos resíduos de cisteína e/ou (ii) por interação eletrostática com a superfície das nanopartículas de ouro.^{50-53, 143}

A atividade recuperada é a atividade da enzima imobilizada no suporte em comparação à atividade da enzima livre. Ao imobilizar a enzima sobre os materiais OG-LI/Au NPs, mesmo a porcentagem de enzima imobilizada sendo similar para materiais funcionalizados com os dois líquidos iônicos, a atividade recuperada foi de 78% e 55% para o com LI 1 e com LI 2, respectivamente. Essa diferença na atividade recuperada demonstra que a configuração do material influencia fortemente na atividade da enzima imobilizada. O biossensor OG-LI 2/Au NPs/ChOx - que apresenta uma estrutura preferencialmente do tipo grafite conforme identificado pelas técnicas de DRX, espectroscopia Raman e análise elementar – interage com a enzima provavelmente de forma que o sítio ativo fique menos exposto e/ou apresentam uma estrutura mais rígida, diminuindo a atividade da enzima após a imobilização.^{12, 17, 127, 144} Assim como, a maior proximidade entre as folhas de grafeno pode ter prejudicado a difusão do colesterol ao sítio ativo da enzima dificultando a sua ação no biossensor. Por outro lado, o biossensor OG-LI 1/Au NPs/ChOx, que apresenta maior similaridade com grafeno, possibilitou uma melhor difusão do colesterol ao sítio ativo da enzima, aumentando a atividade recuperada.^{17, 144}

Comparando esses materiais com os análogos sem nanopartículas metálica, observa-se a importância da presença de nanopartículas de Au na composição do material, pois devido ao aumento de ChOx imobilizada pela presença do ouro, há aumento na atividade. Como visto anteriormente, as biomoléculas tendem a adsorver na superfície das nanopartículas de ouro devido à sua biocompatibilidade e também aos resíduos cisteína.²⁰ A presença de Au^{δ+}, observado no OG-LI 2/Au NPs por XPS, pode ser um outro fator que influencia na ação do biossensor à medida que facilita a coordenação de grupos doadores de elétrons na superfície das nanopartículas.¹⁴² Tendo em vista que o ponto isoelétrico da enzima colesterol oxidase é 5,4;¹⁴⁵ a enzima apresenta carga negativa nas condições do experimento, propiciando uma interação mais forte com o material OG-LI 2/Au NPs o que pode ter ocasionado uma maior rigidez na sua estrutura e, conseqüentemente, diminuído a atividade do biossensor comparado ao análogo com LI 1. Espera-se que aliando as propriedades elétricas do grafeno e das NPs de Au, haja uma melhora na transferência eletrônica entre o centro redox da enzima e o suporte. Esse efeito pode acelerar a regeneração da enzima ChOx e, conseqüentemente, aumentar a ação do biossensor.¹⁴³

Na Figura 15, podemos ver as respostas dos materiais para concentrações de colesterol total de 1 a 13 mg dL⁻¹. A enzima livre e os biossensores OG-LI 1/Au NPs e

OG-LI 2/Au NPs apresentaram relação linear entre a quantidade de colesterol da solução e a quantidade detectada pelo método colorimétrico, os espectros de UV-vis e a curva de analítica podem ser consultados nas Figuras S3-S8. As equações das curvas analíticas bem como os coeficientes de regressão linear e sensibilidade são apresentados na Tabela 5.

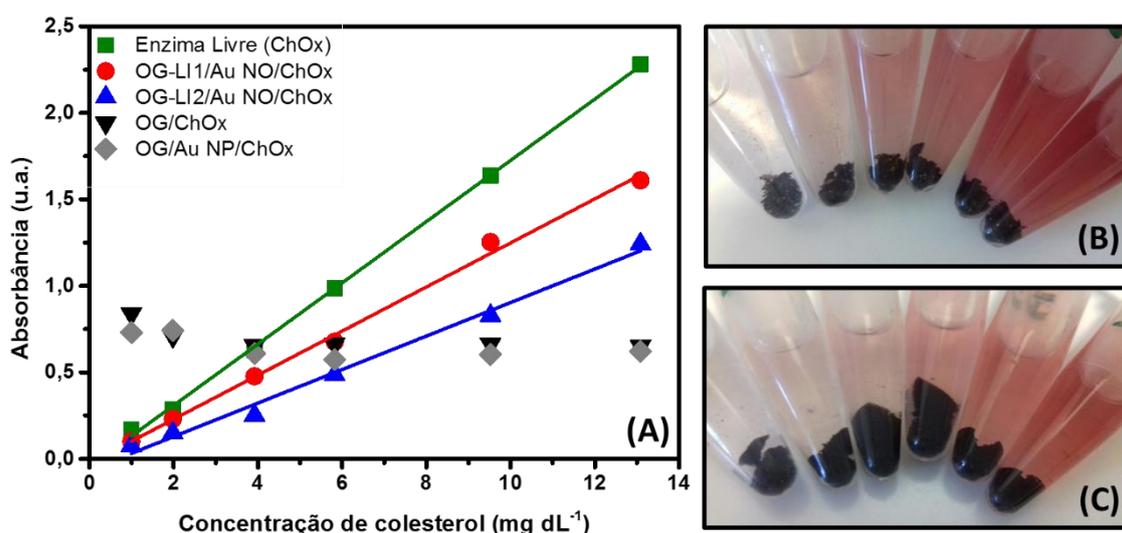


Figura 15. Determinação de colesterol livre pelo método colorimétrico por diferentes materiais (A) e imagem do típico ensaio colorimétrico utilizado os materiais OG-LI 1/Au NPs/ChOx (B) e OG-LI 2/Au NPs/ChOx (C).

Tabela 5. Equação da curva analítica, coeficiente de regressão linear e sensibilidade dos materiais na determinação de colesterol total.

Material	Equação da curva analítica	Coefficiente de regressão linear (R ²)	Sensibilidade ^a
Enzima livre (ChOx)	$y=0,1771x-0,0456$	0,9991	0,1771
OG-LI 1/Au NPs/ChOx	$y=0,1274x-0,0261$	0,9951	0,1274
OG-LI 2/Au NPs/ChOx	$y=0,0969x-0,0655$	0,9889	0,0969

^aA sensibilidade se refere ao coeficiente angular da equação da curva analítica cuja unidade é a razão entre a absorbância em unidades arbitrárias e a concentração de colesterol (mg dL⁻¹).

Ambos materiais desenvolvidos nesse capítulo apresentaram linearidade quanto à determinação de colesterol total nas concentrações avaliadas (Figura 15A). Comparado à

enzima livre, a intensidade do sinal gerado quanto utilizado os materiais OG-LI/Au NPs é menos intensa, como observado pela atividade recuperada. No entanto os materiais apresentam alto potencial para serem aplicados no desenvolvimento de biossensores colorimétricos portáteis, pois a enzima se encontra imobilizada, não sendo descartada no processo.

A sensibilidade dos biossensores foi de 0,1274 e 0,0969 u.a. dL mg⁻¹ para OG-LI 1/Au NPs/ChOx e OG-LI 2/Au NPs/ChOx, respectivamente, apresentando um valor razoável quando comparado à enzima livre (0,1771 u.a. dL mg⁻¹). Observando a Figura 15B e 15C, a coloração avermelhada da solução é mais intensa quanto maior a concentração de colesterol total, permitindo a avaliação do nível de colesterol pelo gradiente de cor mesmo a olho nu. Apesar da porcentagem de imobilização de enzima ser similar para os materiais OG-LI 1/Au NPs/ChOx e OG-LI 2/Au NPs/ChOx, o material modificado com LI 1 apresentou uma resposta mais intensa quando comparado ao análogo com LI 2 (Figura 15A). Provavelmente isso se deve à característica dos materiais que apresenta uma estrutura mais parecida com grafeno no caso do OG-LI 1/Au NPs e mais parecida com o grafite para o OG-LI 2/Au NPs, com o líquido iônico fazendo ligação com mais de uma folha de grafeno e dificultando difusão do colesterol, a exposição do sítio ativo e mobilidade da enzima, como discutido anteriormente.

A fim de entender melhor qual a contribuição do líquido iônico, a enzima foi imobilizada no óxido de grafeno (OG/ChOx) e óxido de grafeno com nanopartículas de ouro (OG/Au NPs/ChOx). Para os dois materiais, a quantidade de enzima imobilizada é similar (ver Tabela 4), porém menor que no material funcionalizado com líquido iônico e NPs de ouro. Ao observar a atividade do material na quantificação de colesterol total (Figura 15A), no entanto, pode-se concluir que tanto OG/ChOx como OG/Au NPs/ChOx não são capazes de diferenciar a concentração de colesterol pelo método colorimétrico à medida que não são sensíveis à variação da concentração. Adicionalmente, a atividade recuperada dos materiais não funcionalizados (ver Tabela 5) é superior a 100%, ou seja, a coloração produzida possivelmente apresenta outras origens além do peróxido produzido pela oxidação do colesterol presente. Os materiais OG e OG/Au NPs foram testados sem enzima para a concentração de 19,8 mg L⁻¹ de colesterol total e apresentaram coloração correspondente à 132% e 74% da atividade, respectivamente. Como não havia enzima presente, a coloração não foi causada pela oxidação do colesterol, mas devido a dois possíveis fatores: a presença de grupos carboxila na superfície do grafeno que podem ser reduzidos pela enzima peroxidase do reagente de cor e a solubilização de óxido de

grafeno no tampão de fosfato, aumentando a absorção em 500 nm.^{146, 147} Esse resultado evidencia a importância do líquido iônico na composição do biossensor para colesterol, reagindo com os grupamentos oxigenados de superfície e tornando o suporte insolúvel em água, resultando em um efeito decisivo na distinção da concentração de colesterol. Outra possibilidade é de que o óxido de grafeno atue como catalisador mimético da peroxidase e, quando combinado com a ChOx, atue aumentando a resposta na detecção do H₂O₂ em relação ao sistema somente com peroxidase, como observamos para os materiais OG/ChOx e OG/Au NPs/ChOx, gerando uma saturação do sinal.¹⁴⁶

Posteriormente, foram realizadas análises de reutilização e estabilidade ao armazenamento a 4 °C do biossensor após 24 h e 115 h. Após 115 h do primeiro teste, a determinação de colesterol total diminuiu para 52% e 81% do valor inicial quando utilizado OG-LI 1/Au NPs/ChOx e OG-LI 2/Au NPs/ChOx, respectivamente. Esse decréscimo na atividade ocorre, possivelmente devido ao lixiviamento da enzima com as lavagens realizadas após o teste de estabilidade e devido à estocagem do material imobilizado.⁷ Visto que o OG-LI 2/Au NPs/ChOx manteve 81% da atividade inicial, isso sugere que houve uma interação mais forte da enzima imobilizada com a estrutura gráfica deste material e as nanopartículas de ouro, possivelmente levando a uma maior estabilidade da estrutura da ChOx.⁷ Essa análise de estabilidade e reutilização confirma a aplicabilidade desses biossensores na determinação de colesterol, sendo possível a realização em mais de uma medida com o mesmo material em análises clínicas. A partir de todos resultados obtidos, foi proposto um modelo (Figura 16) para exemplificar a atuação dos biossensores. À esquerda está o material OG-LI 1/Au NPs/ChOx e a direita, o material OG-LI 2/Au NPs/ChOx. Por apresentar o líquido iônico em ponte entre as folhas de grafeno, o material OG-LI 2/Au NPs/ChOx apresentaram uma menor ação na quantificação do colesterol.

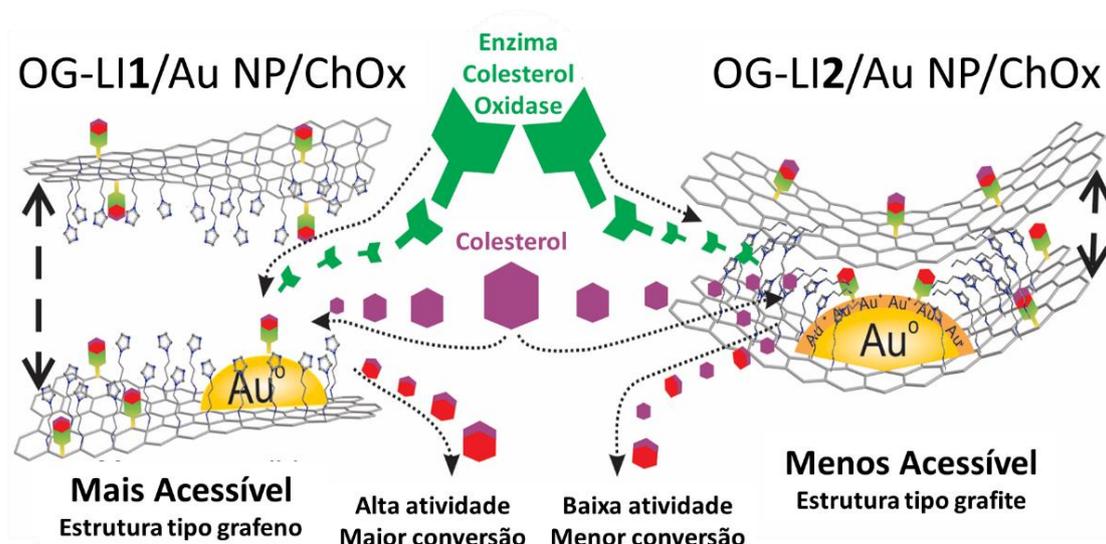


Figura 16. Proposta da detecção de colesterol total pelos materiais OG-LI 1/Au NPs/ChOx e OG-LI 2/Au NPs/ChOx.

Também foram realizados experimentos com os principais interferentes no plasma sanguíneo para colesterol total, como glicose ($0,1 \text{ mmol L}^{-1}$), ácido ascórbico ($2,5 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$) e ácido úrico ($20 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$),¹¹² a fim de verificar a aplicabilidade desses materiais como biossensores em matrizes mais complexas. As absorvâncias em 500 nm obtidas para estes interferentes (Figura 17), mesmo em concentrações altas encontradas em biofluidos, são negligenciáveis (menor que 10%) frente à absorvância obtida para colesterol. Os materiais ainda foram reutilizados e aplicados na detecção de colesterol total, demonstrando que os interferentes não inibiram a atividade enzimática.

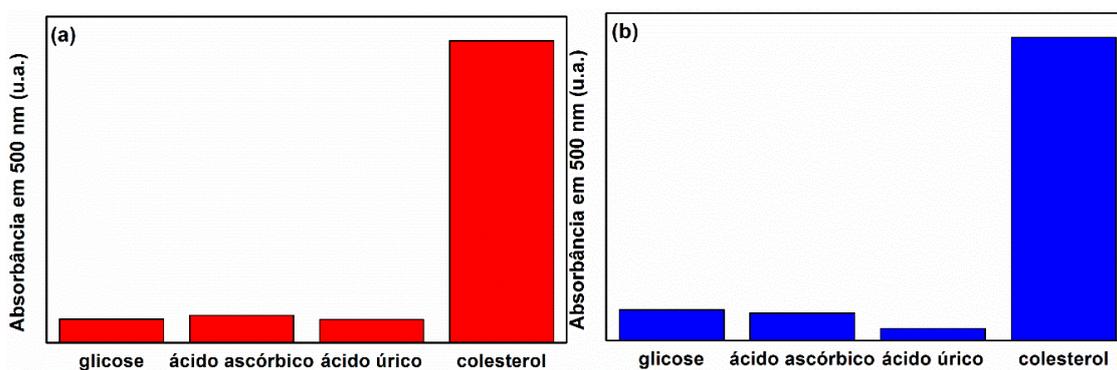


Figura 17. Análise de interferentes e de colesterol total pelo método colorimétrico utilizando os materiais OG-LI 1/Au NPs/ChOx (a) e OG-LI 2/Au NPs/ChOx (b).

Por fim, os biossensores produzidos nesse trabalho foram comparados com materiais análogos da literatura (Tabela 6).

Tabela 6. Comparativo da resposta analítica de vários biossensores para colesterol

Material	Método	Faixa linear ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	Referência
OG-LI 1/Au NPs/ChOx	Colorimétrico	25-340	Trabalho atual
OG-LI 2/Au NPs/ChOx	Colorimétrico	25-340	Trabalho atual
Au@Ag NPs <i>core-shell</i> /ChOx	Colorimétrico	0,3-300	Zhang, 2016 ⁴²
GCE/Au NPs em LI/ChOx	Voltamétrico	0,1-50	Dong, 2014 ¹⁴⁸
GCE/rOG-LI/catalase/ChOx	Cronoamperométrico	0,25-5/ 5-215 ^a	Gholivand, 2014 ⁹⁰
GCE/grafeno-Nafion/Pt NPs/ChOx-ChEt	Amperométrico	5-35	Dey, 2010 ¹⁴⁹

^aDuas faixas lineares. ChEt = Colesterol esterase, GCE = eletrodo de carbono vítreo.

Observando os resultados apresentados na Tabela 6, notavelmente os materiais produzidos nesse trabalho apresentaram uma faixa de quantificação larga de 25 a 340 $\mu\text{mol L}^{-1}$ (9,95 a 130,84 mg L^{-1}), que é uma faixa ampla comparado com os materiais similares da literatura. Essa faixa linear demonstra que os biossensores podem ser aplicados, por exemplo, para teste de plasma em análise clínica, utilizando um fator de diluição de 1:20. Nessas condições, os materiais seriam capazes de quantificar deficiência de colesterol (<150 $\mu\text{mol L}^{-1}$), níveis normais de colesterol e colesterol alto (>260 $\mu\text{mol L}^{-1}$).¹⁶

Outra possibilidade seria aplicá-los como biossensores não invasivos, utilizando amostras de saliva na proporção 1:1 com o reagente de cor. Segundo Eom e colaboradores, a concentração de colesterol na saliva pode variar de 10 a 320 $\mu\text{mol L}^{-1}$, correspondendo a uma faixa de 5 a 160 $\mu\text{mol L}^{-1}$ considerando o fator de diluição da análise, sendo possível avaliar níveis normais e altos de colesterol com os biossensores produzidos nesse capítulo.¹²

7 Conclusões parciais do capítulo I

No capítulo I desse estudo foram sintetizados dois líquidos iônicos derivados do cátion imidazólio com um ou dois grupamentos amina terminais. O óxido de grafeno foi então funcionalizado com os líquidos iônicos e nanopartículas de ouro, com diâmetro de aproximadamente 5 nm, foram depositadas por *sputtering*. Os materiais foram caracterizados por espectroscopia no FTIR-ATR e Raman, análise elementar, MET, DRX e XPS.

O líquido iônico foi decisivo na formação da estrutura do material à medida que a funcionalização ocorreu de forma covalente. Enquanto o material funcionalizado com LI 1 apresentou estrutura do tipo grafeno, o material com LI 2 formou uma estrutura gráfica com os líquidos iônicos em ponte entre as folhas de grafeno. Os materiais obtidos foram aplicados como biossensores colorimétricos na quantificação de colesterol total. Observou-se um efeito sinérgico entre o grafeno funcionalizado e as nanopartículas de ouro depositadas, resultando em mais de 90% de imobilização da enzima ChOx nesses materiais, sendo imobilizada uma quantidade muito menor de enzima nos materiais funcionalizados sem ouro. O óxido de grafeno puro e depositado com Au NPs não foram capazes de distinguir as diferentes concentrações de colesterol, demonstrando que o líquido iônico é determinante na produção do biossensor, além de auxiliar na formação de estrutura do material.

Quando comparadas as atividades dos materiais OG-LI 1/Au NPs/ChOx e OG-LI 2/Au NPs/ChOx, o material modificado com LI 1 foi mais ativo para a quantificação de colesterol total, provavelmente devido à estrutura tipo grafeno que permite ao substrato acessar mais facilmente o sítio ativo da enzima. Em contrapartida, o LI 2 favoreceu a estrutura gráfica devido a possibilidade de se ligar ao OG pelas duas extremidades, dificultando a difusão do colesterol e/ou mobilidade e exposição do sítio ativo da enzima imobilizada. As atividades recuperadas obtidas foram de 78% e 55%, enquanto as sensibilidades foram de 0,1274 e 0,0969 u.a. dL mg⁻¹ para OG-LI 1/Au NPs/ChOx e OG-LI 2/Au NPs/ChOx, respectivamente. Quando comparados com materiais análogos na literatura, os biossensores produzidos nesse trabalho apresentaram uma larga faixa de detecção, sendo capazes de distinguir desde deficiência de colesterol até altos níveis de colesterol em amostras de sangue (com fator de diluição 1:20) ou em amostras de saliva (com fator de diluição 1:1). Foram realizados testes de reutilização em 115 h, onde o

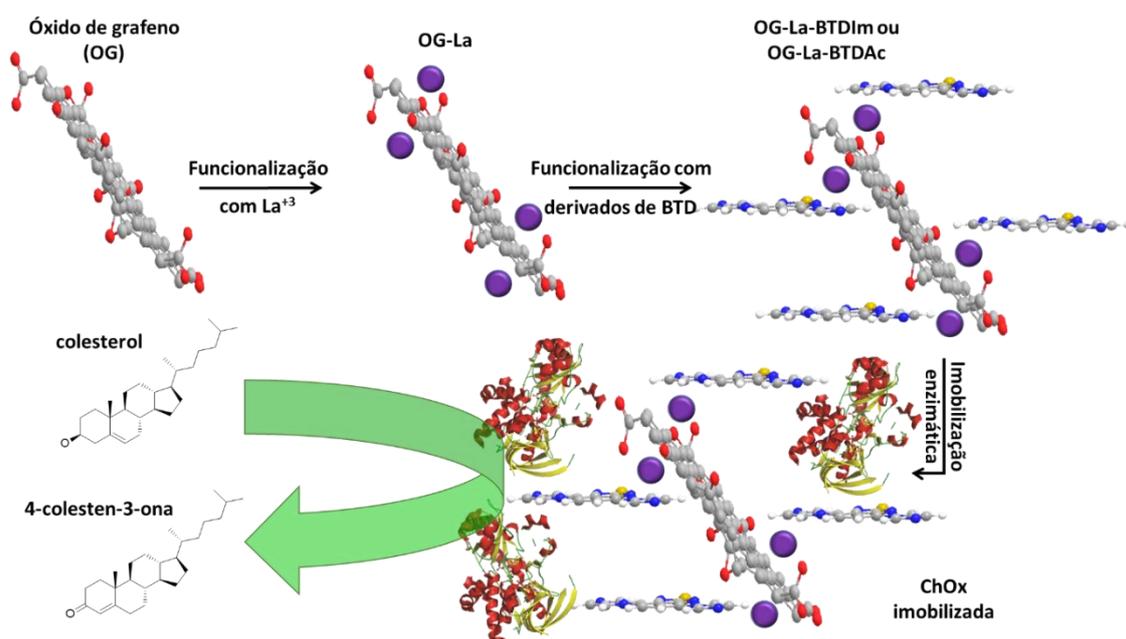
material ainda se mostrou ativo após esse período estocado à 4 °C, demonstrando a possibilidade de reutilização desse material para mais de uma análise. Por fim, os testes com interferentes (glicose, ácido ascórbico e ácido úrico) demonstraram que a resposta para tais analitos é insignificante frente à determinação de colesterol, indicando alta seletividade.

Portanto, os biossensores produzidos no capítulo I desse trabalho - óxido de grafeno funcionalizado com líquidos iônicos derivados do cátion imidazólio e com nanopartículas de Au depositadas por *sputtering*- podem ser aplicados e reutilizados na quantificação colorimétrica de colesterol com linearidade em uma larga faixa de detecção e sem interferência dos principais compostos presentes no plasma sanguíneo.

CAPÍTULO II

8 Procedimento experimental

Para a síntese dos materiais utilizados no capítulo II, foram preparados dois ligantes derivados do núcleo BTB (BTBIm e BTBAC) para funcionalização do óxido de grafeno (OG). Foram preparados materiais com lantânio e sem, a fim de compreender se o La^{3+} atuaria como agente coordenante dos derivados de BTB na superfície do óxido de grafeno. Então, a enzima colesterol oxidase foi imobilizada com o intuito de aplicá-los como biossensores para colesterol total. O Esquema 13 resume a rota de síntese dos materiais de óxido de grafeno funcionalizados com derivados de BTB e com colesterol oxidase. Cada etapa será descrita individualmente nas próximas seções.



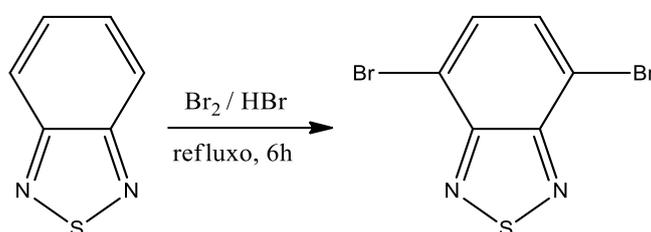
Esquema 13. Rota de síntese dos materiais de óxido de grafeno funcionalizados com derivados de BTB na presença ou não de La^{3+} e a enzima colesterol oxidase para aplicação como biossensor.

8.1 Síntese da 4,7-dibromo-2,1,3-benzotiadiazola

Inicialmente foi sintetizado o 4,7-dibromo-2,1,3-benzotiadiazola, precursor dos ligantes derivados de BTB utilizados nesse trabalho, segundo procedimento já descritos na literatura (Esquema 14).^{96, 150} Em um balão de 3 bocas de 1 L foram acoplados um condensador de refluxo e um funil de adição. Então, foram adicionados 2,1,3-benzotiadiazola (33,12 mmol, 4,5096 g) e 74 mL de HBr ao balão. A solução foi agitada vigorosamente e aquecida a 130 °C, com fluxo contínuo de argônio. Foi adicionado lentamente uma solução de bromo (97,58 mmol, 5 mL) em HBr (50 mL) por gotejamento

durante 60 min. Após o término da adição, verteu-se ao balão mais 100 mL de HBr e o refluxo foi mantido durante 6 h sob agitação vigorosa. A reação apresentou inicialmente uma coloração alaranjada escuro e, com o passar do tempo, foi precipitando sólido amarelo claro. Após 6 h de reação, o aquecimento foi desligado, a mistura foi resfriada a temperatura ambiente e foi adicionada uma solução saturada de NaHSO₃ a fim de reagir com o bromo residual. A mistura foi filtrada em funil de Büchner, o sólido foi lavado abundantemente com água até que o pH ficasse neutro e, por fim, lavou-se com éter etílico. O sólido amarelo foi seco ao ar durante a noite.

Rendimento: 3,585 g; 12,2 mmol (36%).

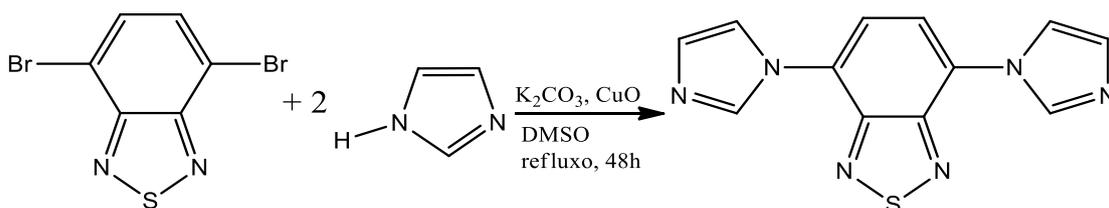


Esquema 14. Reação de bromação da 2,1,3-benzotriazola.

8.2 Síntese da 4,7-bis-(imidazol-1-il)-2,1,3-benzotriazola

A 4,7-bis-(imidazol-1-il)-2,1,3-benzotriazola será denominada BTDI_m nesse trabalho e foi sintetizada de acordo com o procedimento descrito por Souza (Esquema 15).¹⁵⁰ A BTDI_m foi sintetizada a partir da 4,7-dibromo-2,1,3-benzotriazola (3,585 g, 12,2 mmol), que foi adicionada a um Schlenk contendo K₂CO₃ (3,647g, 26,4 mmol), CuO (0,097 g, 1,22 mmol), imidazol (2,216 g, 32,55 mmol) e 4 mL de dimetilsulfóxido (DMSO). A reação foi conduzida em atmosfera de argônio a 140 °C por 48 h sob agitação magnética. O solvente foi removido sob vácuo e aquecimento e o sólido foi purificado por cromatografia em coluna de sílica, utilizando metanol/acetato de etila como eluente (iniciando com 10:90 até 50:50 v/v).

Rendimento: 1,502 g; 5,59 mmol (46% após purificação).

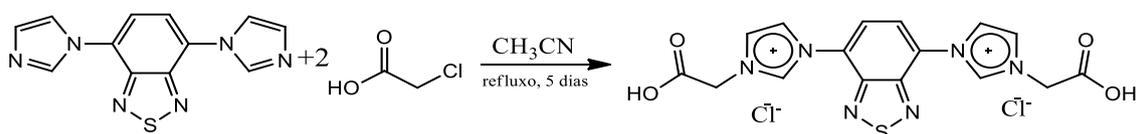


Esquema 15. Síntese da 4,7-bis-(imidazol-1-il)-2,1,3-benzotriazola (BTDI_m).

8.3 Síntese da 4,7-bis-[1-carbóximetil-(imidazólio-3-il)]-2,1,3-benzotiadiazola

A 4,7-bis-[1-carbóximetil-(imidazólio-3-il)]-2,1,3-benzotiadiazola será denominada BTDAc nesse trabalho e foi sintetizada de acordo com o procedimento descrito por Souza (Esquema 16).¹⁵⁰ Em um balão de 50 mL com condensador de refluxo, foram adicionados BTDIIm (0,685 g, 2,56 mmol) e ácido cloroacético (0,657 g, 6,32 mmol) em 10 mL de acetonitrila. A reação foi conduzida a 90 °C durante 5 dias sob agitação magnética. O solvente foi removido por decantação e o produto, de coloração amarelo pálido, foi purificado lavando-se sucessivas vezes com isopropanol a quente e seco sob vácuo.

Rendimento: 0,377 g; 0,82 mmol (32% após purificação).



Esquema 16. Síntese da 4,7-bis-[1-carbóximetil-(imidazólio-3-il)]-2,1,3-benzotiadiazola (BTDAc).

8.4 Síntese do óxido de grafeno

O óxido de grafeno foi sintetizado pelo método de Hummers, segundo a mesma metodologia descrita na seção 5.1.

8.5 Síntese do óxido de grafeno com lantânio

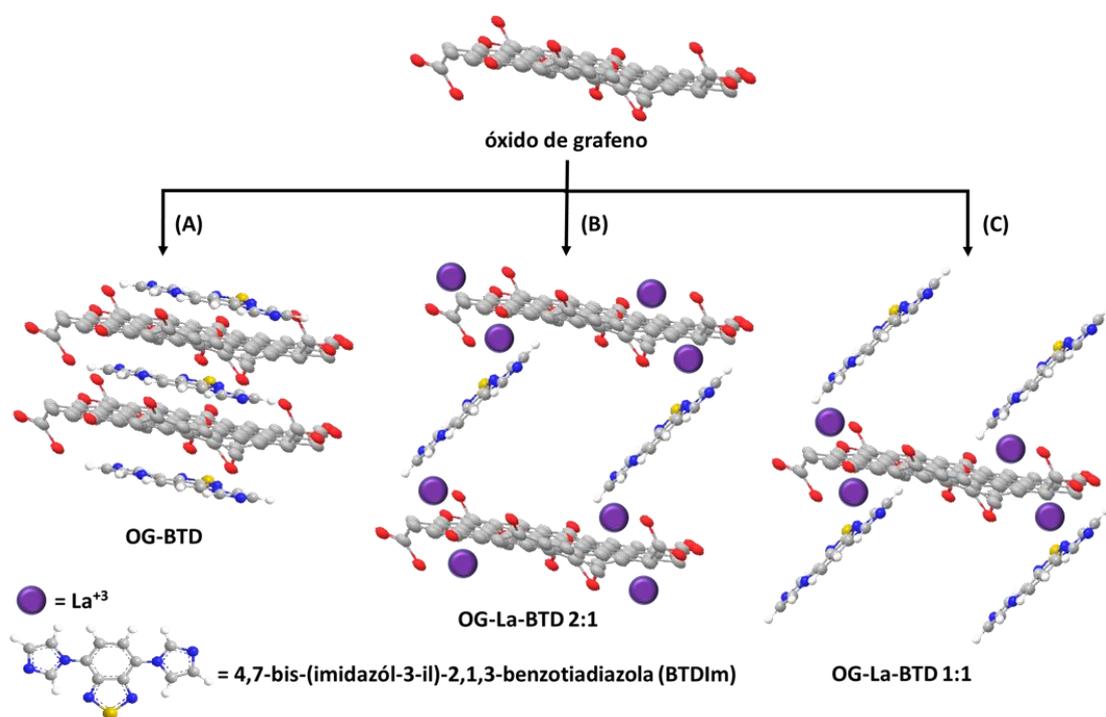
O material de óxido de grafeno com lantânio (OG-La) foi sintetizado conforme trabalhos descritos na literatura.^{94, 95} Em um experimento típico, 450 mg de óxido de grafeno foi disperso em 450 mL de água deionizada no ultrassom por 1 h (solução 1 mg mL⁻¹). Então, foi adicionado 9 mg de La(NO₃)₃ · 6H₂O (6% em massa de La³⁺, 0,21 mmol) e deixou-se a reação sob agitação por 20 h a temperatura ambiente. O material obtido foi centrifugado a 3500 rpm por 30 min, lavado duas vezes com água e duas vezes com etanol. O sólido obtido foi seco em placa de Petri na estufa a vácuo a 60 °C por 3 h.

Rendimento: aproximadamente 400 mg.

8.6 Síntese dos materiais de grafeno funcionalizados com derivados de BTD

A funcionalização do OG-La com os derivados de BTD sintetizados nesse trabalho foi inspirada no procedimento de funcionalização com bipyridina reportado por Zhang e colaboradores.⁹⁴ Em um balão de 500 mL, foram adicionados 100 mg de OG-La e 200 mL de água deionizada, que ficou no banho de ultrassom por 1 h (solução 0,5 mg mL⁻¹). Então, foi adicionado o derivado de BTD (BTDim ou BTDAc) nas proporções molares 2:1 ou 1:1 (La:BTD). Devido à baixa solubilidade da BTDim em água, a BTDim foi previamente solubilizada em 5 mL de metanol. A reação ocorreu sob agitação por 18 h a temperatura ambiente. O material obtido foi centrifugado a 3500 rpm por 30 min, lavado duas vezes com água e duas vezes com etanol. O sólido obtido foi seco em placa de Petri na estufa a vácuo a 60 °C por 3 h. Esses materiais foram denominados OG-La-BTDim e OG-La-BTDAc, seguido da proporção La:BTD. Também foram sintetizados análogos sem lantânio, seguido o mesmo protocolo na mesma quantidade da proporção 2:1. Esses materiais foram denominados OG-BTDim e OG-BTDAc. O Esquema 17 simplifica as interações esperadas para os materiais funcionalizados com BTD, segundo Zhang e colaboradores.⁹⁴

Rendimento: 70-90 mg para os materiais OG-La-BTD e 50 mg para os materiais OG-BTD.



Esquema 17. Esquema dos três tipos de materiais sintetizados com BTDim ou BTDAc: OG funcionalizado com BTD, OG-La com BTD na proporção 2:1 (B) e na proporção 1:1 de La:BTD (C).

8.7 Aplicação dos materiais de OG-La-BTD/ChOx como biossensor colorimétrico

Os materiais foram utilizados como suporte para a imobilização da enzima colesterol oxidase e aplicados como biossensores colorimétricos para determinação de colesterol total, utilizando o método de Allain (Esquema 1).¹⁶

8.7.1 Preparação das soluções para o biossensor de colesterol

Para imobilização e medição da atividade da enzima no biossensor, foram preparadas 4 soluções: solução tampão de fosfato, reagente de cor, solução estoque da enzima colesterol oxidase e solução de colesterol.

A solução tampão de fosfato foi preparada a partir dos sais sódicos de fosfato. Primeiramente foram pesados 12 g de NaH_2PO_4 e 14,2 g de Na_2HPO_4 e cada um dos sólidos foi diluído individualmente a 100 mL com água deionizada, resultando em soluções 1 mol L^{-1} de cada sal. Então misturou-se 46,5 mL da solução de Na_2HPO_4 1 mol L^{-1} e 3,5 mL da solução de NaH_2PO_4 1 mol L^{-1} , diluindo-se a 500 mL com água deionizada. O pH da solução foi regulado utilizando as soluções estoque 1 mol L^{-1} e obteve-se uma solução tampão de fosfato 0,1 mol L^{-1} com pH $7\pm 0,05$. Essa solução tampão de fosfato foi utilizada para a preparação de todas as soluções seguintes, nas lavagens e nas reações de quantificação de colesterol descritas a seguir.

No capítulo II desse trabalho, foi utilizada a enzima colesterol oxidase de *Streptomyces sp.* A enzima liofilizada com 100 U mg^{-1} de proteína foi solubilizada em 5 mL de tampão de fosfato e separada em várias alíquotas (solução estoque da enzima, 20 U mL^{-1} conforme dados fornecidos pelo fabricante), que ficaram armazenadas no freezer. A atividade da enzima nas condições do experimento foi posteriormente determinada.

O reagente de cor utilizado consiste em uma solução contendo 28 mmol L^{-1} de fenol, 0,5 mol L^{-1} de 4-aminoantipirina, 15 mmol L^{-1} de azida sódica e 800 U L^{-1} de enzima peroxidase diluídos em tampão de fosfato 35 mmol L^{-1} . Após preparado, o reagente foi armazenado à 4 °C durante o período dos experimentos. Esse reagente é responsável pela quantificação colorimétrica do peróxido de hidrogênio formado na oxidação do colesterol, conforme Esquema 1.

Para preparar a solução de colesterol 200 mg dL^{-1} (5,17 mmol L^{-1}), 40 mg de colesterol foram dissolvidos em 2 mL de isopropanol a 60 °C com agitação vigorosa (solução I). Em um outro recipiente, foi preparada uma solução contendo 2 g de Triton X-100 em 9 mL de tampão de fosfato (solução II). A solução II ficou sob agitação

vigorosa a 37 °C e, então, a solução I foi adicionada gota a gota, a fim de evitar a precipitação do colesterol. A solução de colesterol preparada foi armazenada à 4 °C durante o período dos experimentos.

8.7.2 *Otimização do tempo de reação para medição da atividade enzimática*

Em uma cubeta de quartzo de 4 mL, foram adicionados 500 µL do reagente de cor, 500 µL de tampão de fosfato, 50 µL de solução de colesterol 200 mg dL⁻¹ e 1 µL da solução estoque de enzima. A solução foi incubada a 37 °C e a absorbância medida a cada 5 min.

8.7.3 *Otimização da quantidade de enzima colesterol oxidase utilizada no processo de imobilização nos materiais sintetizados*

Para a otimização da quantidade de enzima colesterol oxidase, soluções contendo diferentes quantidades de enzima ChOx (0,02; 0,04; 0,08 e 0,20 U mL⁻¹, conforme dados fornecidos pelo fabricante) em tampão de fosfato foram adicionadas ao material OG-La-BTDIm 2:1. A mistura contendo 1 mg de material e 500 µL de solução enzimática foi mantida a 4 °C por 24 h para proceder a imobilização. Como controle, foram analisadas amostras contendo apenas tampão e o material OG-La-BTDIm 2:1 (sem enzima) e uma outra amostra com tampão e a enzima, mas sem material. Após 24 h, o material foi centrifugado a 13000 rpm por 2 min, lavado duas vezes com tampão de fosfato e testado para quantificação de colesterol utilizando 500 µL do reagente de cor, 500 µL de tampão de fosfato, 50 µL de solução de colesterol 200 mg dL⁻¹. Às alíquotas de material sem enzima, sobrenadantes (de imobilização e de lavagem) e de enzima livre, foram adicionadas as mesmas quantidades de reagente de cor e colesterol. As soluções foram incubadas a 37 °C por 30 min e a absorbância medida de 600 a 400 nm. A absorbância em 500 nm foi convertida em atividade da enzima utilizando a curva de calibração para a enzima livre (Figura S9).

A partir dos valores de absorbância (abs), possuindo a curva de calibração com a enzima livre (Figura S9), é possível calcular a atividade da enzima imobilizada para cada ponto a partir da equação 4:

$$\text{Atividade (U mL}^{-1}\text{min}^{-1}) = \frac{\text{abs} \times 1000}{3,7612} \times v_f \times f_{dil} \quad (4)$$

$t \times v_e$

Onde v_f é o volume final do ensaio, f_{dil} é o fator de diluição (nesse caso não houve diluição, então corresponde a 1), v_e é o volume de enzima otimizado (2 µL) e t é o tempo

do ensaio de 30 min. A atividade para cada ponto foi calculada e expressa em $\text{U mL}^{-1} \text{ min}^{-1}$, onde uma unidade de atividade (1 U) corresponde à quantidade de enzima que catalisa a conversão de 1 mmol de colesterol para 4-colesten-3-ona por minuto sob as condições do ensaio.

A atividade dos sobrenadantes de imobilização e lavagem foram utilizadas para calcular a porcentagem de enzima imobilizada através da equação 1 e atividade recuperada foi obtida a partir da razão entre a atividade do material e da enzima livre, conforme equação 2.

8.7.4 *Otimização do tempo de imobilização*

Para a otimização do tempo de imobilização enzimática, 1 mg do material OG-La-BTDIm 2:1 foi imobilizado com 500 μL de solução da colesterol oxidase em tampão de fosfato ($0,08 \text{ U mL}^{-1}$, conforme dados fornecidos pelo fabricante) a 4°C por 30 min, 1 h, 2 h, 6 h e 24 h. Após cada tempo de imobilização, o material foi centrifugado a 13000 rpm por 2 min, lavado duas vezes com tampão de fosfato e testado para determinação de colesterol utilizando 500 μL do reagente de cor, 500 μL de tampão de fosfato, 50 μL de solução de colesterol 200 mg dL^{-1} . Para cada tempo, também foi analisada uma amostra com enzima livre nas mesmas condições. Às alíquotas de sobrenadante e de enzima livre, foram adicionadas as mesmas quantidades de reagente de cor e colesterol. As soluções foram incubadas a 37°C por 30 min e a absorbância medida de 600 a 400 nm. A atividade dos sobrenadantes de imobilização e lavagem foram calculadas segundo a equação 4 e utilizadas para calcular a porcentagem de enzima imobilizada através da equação 1 e a atividade recuperada, de acordo com a equação 2.

8.7.5 *Determinação da concentração de colesterol total utilizando os materiais*

Os materiais produzidos nesse trabalho foram aplicados como biossensores colorimétricos na quantificação de colesterol total. Na Tabela 7 são listados todos materiais testados nesse capítulo e os componentes dos mesmos, destaca-se que a atividade de cada material foi testada individualmente sem e com enzima imobilizada.

Tabela 7. Materiais testados para quantificação de colesterol total com os respectivos componentes

Código	Lantânio	BTD	La:BTD	ChOx
Enzima livre	-	-	-	X
OG	-	-	-	-
OG/ChOx	-	-	-	X
OG-La	X	-	-	-
OG-La/ChOx	X	-	-	X
OG-La-BTDIm 2:1	X	BTDIm	2:1	-
OG-La-BTDIm 2:1/ChOx	X	BTDIm	2:1	X
OG-La-BTDIm 1:1	X	BTDIm	1:1	-
OG-La-BTDIm 1:1/ChOx	X	BTDIm	1:1	X
OG-BTDIm*	-	BTDIm	-	-
OG-BTDIm/ChOx*	-	BTDIm	-	X
OG-La-BTDAc 2:1	X	BTDAc	2:1	-
OG-La-BTDAc 2:1/ChOx	X	BTDAc	2:1	X
OG-La-BTDAc 1:1	X	BTDAc	1:1	-
OG-La-BTDAc 1:1/ChOx	X	BTDAc	1:1	X
OG-BTDAc*	-	BTDAc	-	-
OG-BTDAc/ChOx *	-	BTDAc	-	X

*Esses materiais apresentam a mesma quantidade de BTD que o material OG-La-BTD 2:1, apesar de não conter lantânio.

Para realizar a imobilização da enzima colesterol oxidase, foram utilizados a quantidade de enzima e tempo de imobilização otimizados. À 1 mg de material, foram adicionados 500 µL de solução de ChOx (0,08 U mL⁻¹, conforme dados fornecidos pelo fabricante) em tampão de fosfato que ficou imobilizando a 4 °C por 1 h dentro de um *ependorf* na posição horizontal. Para analisar os materiais sem enzima, 500 µL de solução tampão de fosfato foi adicionado a 1 mg de cada material em um *ependorf* e mantido por 1 h a 4 °C. Após esse período, os materiais com enzima imobilizada foram centrifugados a 13500 rpm por 2 min e lavados 2 vezes com tampão de fosfato. Em um experimento típico, foram adicionados 500 µL de tampão de fosfato, 500 µL de reagente de cor e diferentes concentrações de solução de colesterol total (0,99 a 16,51 mg dL⁻¹) ao material. Nos experimentos contendo somente o material com tampão ou somente a

enzima livre, foram adicionados 500 µL de reagente de cor e diferentes concentrações de solução de colesterol total (0,99 a 16,51 mg dL⁻¹). A mistura foi agitada e incubada a 37 °C por 30 min, o material foi centrifugado a 13500 rpm por 90 s e as absorbâncias da enzima livre, do material com enzima imobilizada e do material sem enzima foram analisadas por espectroscopia no UV-vis. A absorbância foi convertida em atividade dos segundo a equação 4 e utilizadas para calcular a porcentagem de enzima imobilizada através da equação 1 e a atividade recuperada, de acordo com a equação 2.

Os limites de detecção (LOD) e quantificação (LOQ) foram calculados a partir do desvio padrão dos valores de absorbância obtidos para a quantidade zero de colesterol (σ) e do valor de sensibilidade (s , coeficiente angular da curva analítica), conforme as equações 6 e 7:

$$LOD = \frac{3\sigma}{s} \quad (5)$$

$$LOQ = \frac{10\sigma}{s} \quad (6)$$

Então, a atividade calculada para cada ponto da curva analítica foi utilizada na execução do gráfico de Lineweaver-Burk (duplo recíproco), onde foi considerada equivalente a velocidade inicial de reação. A partir desse gráfico é possível avaliar a cinética da enzima livre e imobilizada nos materiais a partir da equação de Lineweaver-Burk.¹⁵¹

$$\frac{1}{v_0} = \frac{K_m}{v_{max}[S]} + \frac{1}{v_{max}} \quad (7)$$

Onde K_m é a constante de Michaelis-Menten e v_0 e v_{max} correspondem às velocidades inicial (atividade) e máxima, respectivamente.

8.7.6 *Determinação de colesterol pelos materiais na presença de interferentes*

Foram realizados testes na presença dos principais interferentes presentes no plasma sanguíneo na determinação de colesterol total: glicose, ácido ascórbico e ácido úrico. Também foi avaliada a interferência do isopropanol na mesma proporção utilizada na solubilização do colesterol, 10% de isopropanol/tampão de fosfato v/v. Em um procedimento típico, 1 mg do material OG-La-BTDIm 1:1 foi pesado em um *ependorf* e adicionou-se 500 µL da enzima ChOx em tampão de fosfato (0,08 U mL⁻¹, conforme dados fornecidos pelo fabricante) para imobilização por 1 h a 4 °C. O material foi centrifugado a 13000 rpm e lavado duas vezes com 500 µL de tampão de fosfato. Então, ao *ependorf* foram adicionados 500 µL de tampão de fosfato, 500 µL de reagente de

cor, 10 μL de colesterol total (resultando na concentração 1,98 mg dL^{-1}) e 10 μL da solução contendo um dos interferentes em tampão de fosfato a fim de atingir as concentrações: 0,1 mmol L^{-1} de glicose, 2,5 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de ácido ascórbico, 20 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de ácido úrico ou 0,01% isopropanol.¹¹² A mistura foi incubada por 30 min a 37 °C e a atividade enzimática analisada por espectroscopia no UV-vis e comparada com a atividade na quantificação do colesterol total.

8.7.7 *Experimento de armazenamento dos materiais com a enzima imobilizada*

Por fim, foi avaliada a manutenção da atividade dos biossensores em relação ao tempo de armazenamento. Para isso, os materiais OG-La-BTDIm 2:1, OG-BTDIm, OG-La-BTDAc 2:1 e OG-BTDAc foram imobilizados com 500 μL da enzima ChOx em tampão de fosfato (0,08 U mL^{-1} , conforme dados fornecidos pelo fabricante) por 1 h a 4 °C, centrifugados e lavados duas vezes com 500 μL de tampão de fosfato. Os materiais com enzima ChOx imobilizada foram armazenados à 4 °C por 1, 2, 3 e 10 semanas e a atividade foi avaliada por espectroscopia no UV-vis para uma solução 5,8 mg dL^{-1} de colesterol total, conforme procedimento descrito na seção 8.7.5.

9 Resultados e discussões

9.1 Caracterização dos ligantes derivados de 2,1,3-benzotiadiazola

Nesse trabalho foram sintetizados dois ligantes derivados de 2,1,3-benzotiadiazola contendo um grupo imidazol ou um sal de imidazólio com terminação de ácido carboxílico: 4,7-bis-(imidazol-1-il)-2,1,3-benzotiadiazola (BTDI_m) e 4,7-bis-[1-carbóximetil-(imidazol-3-il)]-2,1,3-benzotiadiazola (BTDA_c), respectivamente. A estrutura e a pureza dos ligantes foram confirmadas por RMN ¹H. O ligante BTDI_m apresentou os seguintes deslocamentos no RMN ¹H (400 MHz) realizado em CD₃CO₂D: δ (ppm) 7,26 (s, 1 H), 7,98 (s, 2 H), 8,66 (s, 1 H) (Figura S10). A BTDA_c apresentou os seguintes deslocamentos no RMN ¹H (400 MHz) realizado em D₂O: δ (ppm) 5,15 (s, 2 H), 7,74 (s, 1 H), 8,15 (d, 2 H), 9,77 (s, 1 H) (Figura S11). Ambas as estruturas coincidem com os deslocamentos reportados por Souza.¹⁵⁰ Também foram realizadas espectroscopia no FTIR-ATR e análise termogravimétrica a fim de comparação com os materiais de óxido de grafeno funcionalizados com esses ligantes, que serão descritos na próxima seção.

9.2 Caracterização dos materiais de óxido de grafeno funcionalizados com derivados de BTDA

Na sequência foram realizadas várias análises estruturais a fim de compreender como os derivados de BTDA estão ligados ao óxido de grafeno e se os grupos funcionais terminais diferenciam os materiais. Outro objetivo foi compreender se os íons metálicos La³⁺ e se a proporção La³⁺:BTDA resulta em materiais diferentes.

Os derivados de BTDA e os materiais funcionalizados foram caracterizados por espectroscopia no FTIR-ATR e todos os espectros se encontram no material suplementar (Figura S12 a S14). Na Figura 18 estão somente os espectros representativos dos materiais OG-La-BTDI_m 2:1 e OG-La-BTDA_c 2:1, dos respectivos derivados de BTDA e dos materiais suporte OG e OG-La.

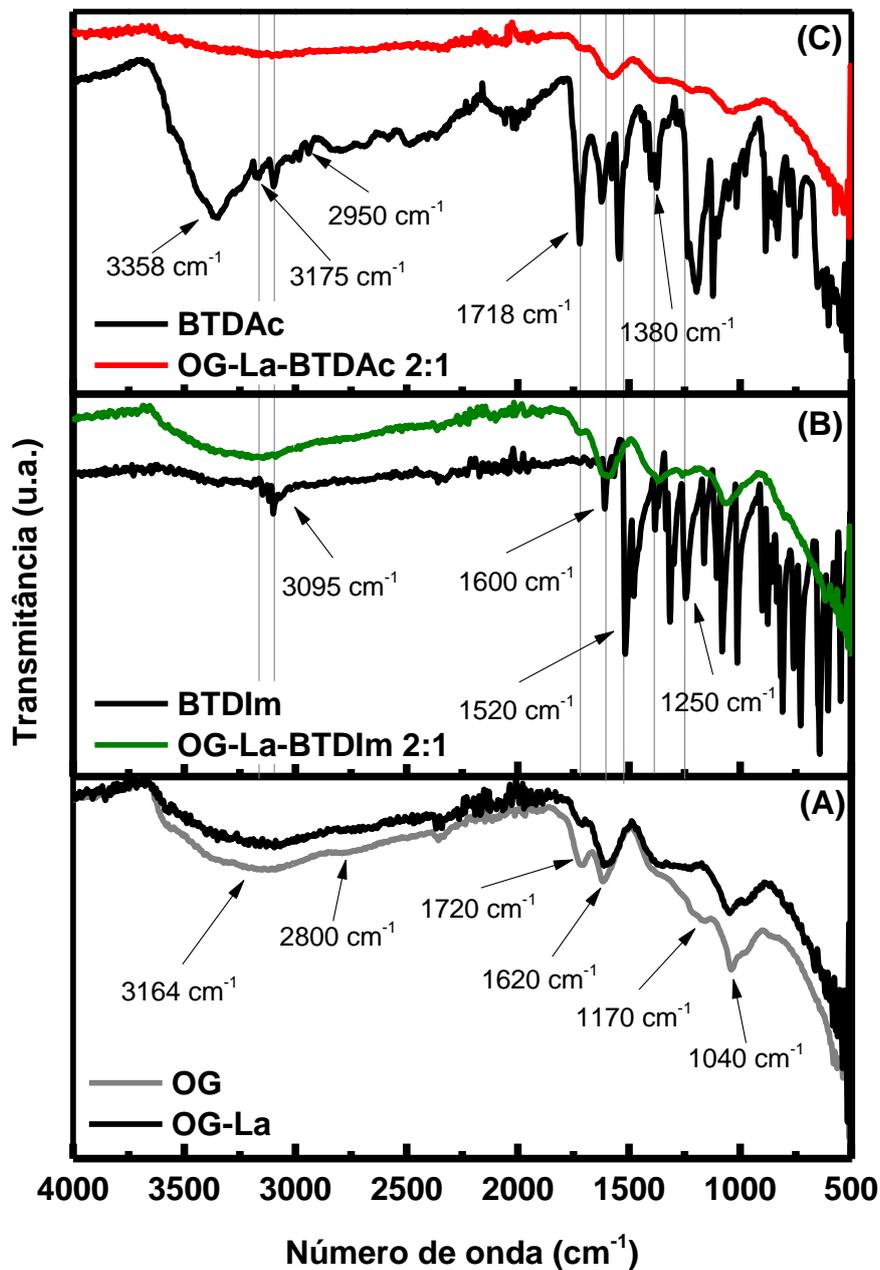


Figura 18. Espectro no infravermelho com transformada de Fourier por refletância total atenuada dos materiais OG e OG-La (A), BTDIIm e OG-La-BTDIIm 2:1 (B) e BTDAc e OG-La-BTDAc 2:1 (C).

No espectro de FTIR-ATR do óxido de grafeno (Figura 18A, em cinza), observam-se as bandas referentes aos grupos oxigenados em 1040, 1170 e 1720 cm^{-1} características dos estiramentos C-O, C-OH e C=O de grupos carbonila e carboxila,

respectivamente.¹¹⁴⁻¹¹⁹ Em 1620 cm^{-1} , a ligações C=C do grafeno estão sobrepostas com o dobramento H-O-H das moléculas de água adsorvidas, que também é confirmada pela banda larga acima de 3200 cm^{-1} .¹¹⁴ Também se observam os estiramentos assimétricos e simétricos da ligação CH₂ presentes nas bordas das folhas de óxido de grafeno como um ombro localizado em 2800 cm^{-1} e em 3164 cm^{-1} .¹¹⁴ Por fim, não se observa banda em 1570 cm^{-1} referente à vibração C-C dos domínios de grafite.^{115, 116} As mesmas bandas descritas acima também estão presentes no espectro do material OG-La (Figura 18A, em preto), demonstrando ainda a presença dos grupos oxigenados onde o lantânio pode se coordenar.¹⁵² Entretanto, não foi possível observar uma banda isolada referente à ligação La-O em 622 cm^{-1} para confirmar a ligação, pois há muito ruído nessa região.⁹⁴

Ambos os derivados de BTDA (Figura 18B e C, em preto) apresentaram bandas em 3095 , 1520 e 1250 cm^{-1} referentes aos estiramentos C-H aromático, C=C aromático e C-N aromático, respectivamente, do núcleo 2,1,3-benzotiadiazola dissustituído com o grupo imidazol. Complementarmente, a BTDAc apresenta uma banda larga em 3358 cm^{-1} que corresponde à água adsorvida na molécula hidrofílica e também bandas em 2950 , 3175 , 1718 e 1380 cm^{-1} referentes ao estiramento simétrico de C-H alifático e aos estiramentos O-H, C=O e C-O de ácido carboxílico do grupo carbóximetil terminal, respectivamente.

Nos materiais funcionalizados, permanece a banda larga de 2900 a 3600 cm^{-1} com um ombro em 2800 cm^{-1} presentes nos materiais OG e OG-La, que correspondem ao estiramento O-H com ligações de hidrogênio e estiramento assimétrico da ligação CH₂, respectivamente. Também se encontram as bandas em 1720 , 1375 , 1230 e 1050 cm^{-1} referentes aos estiramentos C=O e C-O de ácido carboxílico, C-N aromático e C-O de outros grupos oxigenados, como epóxido e álcool, respectivamente. Por fim, comparando a vibração do estiramento C=C aromático em 1620 cm^{-1} (Figura S15) para ambos os materiais sem lantânio (OG e OG-BTD), observa-se um deslocamento batocrômico nos materiais com lantânio (OG-La e OG-La-BTD), sugerindo que o lantânio deva estar se coordenando também à ligação C=C do suporte e/ou do anel imidazol(ólio).

A análise termogravimétrica (TGA) é uma técnica utilizada principalmente na caracterização de materiais poliméricos com óxido de grafeno para quantificar os componentes da amostra. Na Figura 19A e B, estão as análises termogravimétricas dos materiais de óxido de grafeno puro e funcionalizado com lantânio, respectivamente.

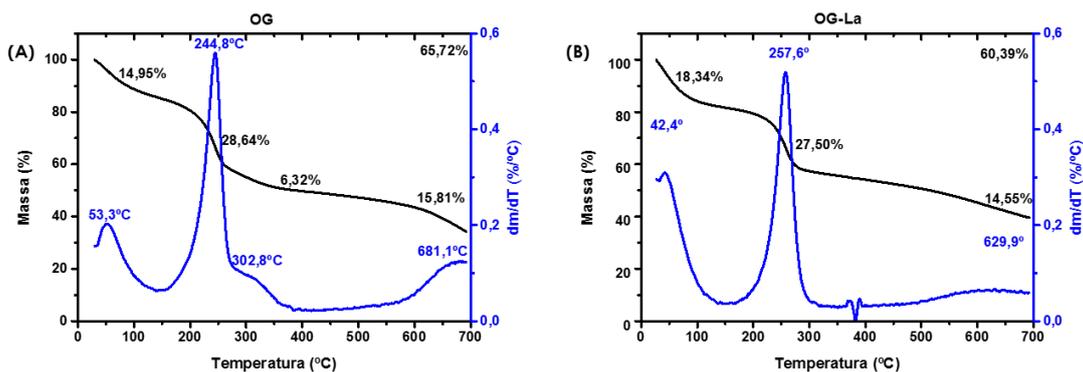


Figura 19. Análise termogravimétrica dos materiais óxido de grafeno (A) e óxido de grafeno com lantânio (B). Em preto está a curva de perda de massa em função da temperatura com o somatório no canto superior direito e em azul, a derivada da perda de massa.

A TGA do óxido de grafeno (Figura 19A) possui quatro regiões distintas, estando de acordo com os trabalhos previamente reportados na literatura.^{116, 119, 153} Na região abaixo de 100 °C, há uma perda de massa de aproximadamente 15% referente à água adsorvida. Em 245 °C há uma perda de massa significativa (aproximadamente 29%), atribuída aos grupos oxigenados lábeis presentes no material. Outros grupos oxigenados também são perdidos lentamente em torno de 300 °C (6% em massa), enquanto grupamentos oxigenados estáveis (aproximadamente 16%) são reduzidos à altas temperaturas, nesse caso 680 °C. Ossoon e Bélanger realizaram TGA acoplado à espectrometria de massas do óxido de grafeno e conseguiram identificar a liberação de OH ($m/z = 17$), água ($m/z = 18$), CO ($m/z = 28$) e CO₂ ($m/z = 44$) até 400 °C, enquanto a perda de massa à altas temperaturas foi atribuída a liberação de CO dos grupos carbonila.¹⁵³ Quando comparado com o material funcionalizado com La³⁺ (Figura 19B), observamos uma diminuição de perda de massa nas duas regiões referentes aos grupos oxigenados, indicando uma estabilização dos grupamentos oxigenados. A perda de massa total decaiu mais de 5%, indicando uma estabilização térmica considerável do OG para OG-La, Ainda que a quantidade de La³⁺ seja baixa, esse cátion ofereceu um efeito protetor aos grupamentos oxigenados das folhas do óxido de grafeno. Nas Figuras 20 e 21 são apresentadas as análises termogravimétricas para os dois derivados de BTB e os respectivos materiais funcionalizados.

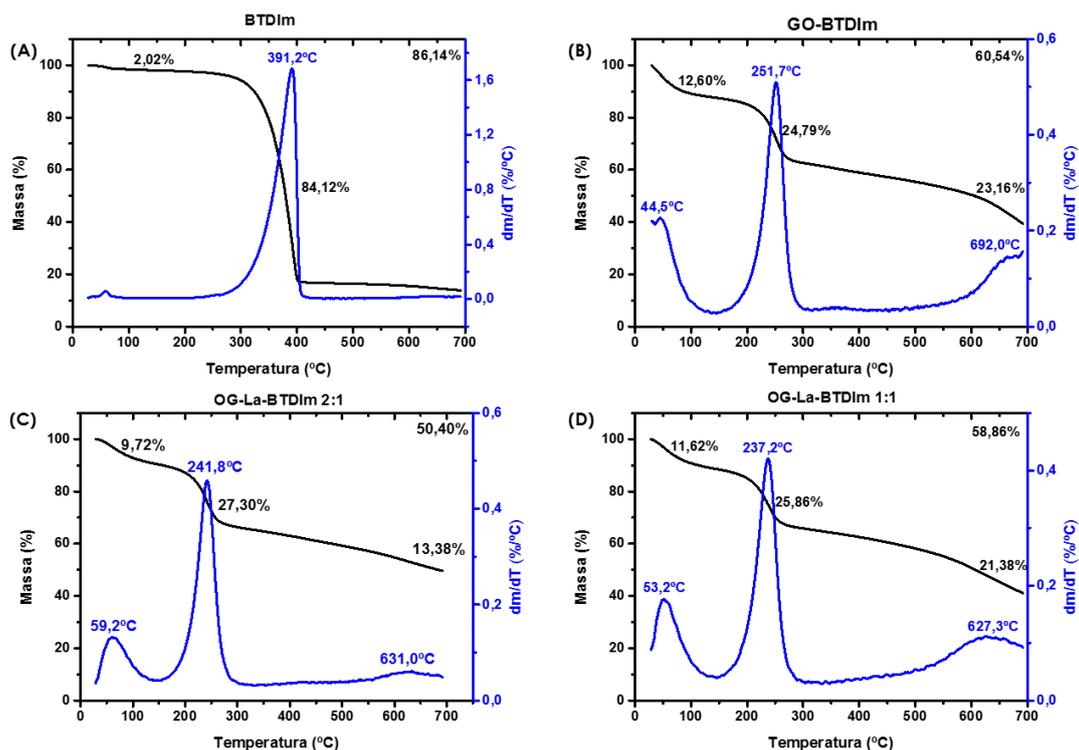


Figura 20. Análise termogravimétrica do ligante BTDIIm (A) e dos materiais OG-BTDIm (B), OG-La-BTDIm 2:1 (D) e OG-La-BTDIm 1:1 (D). Em preto está a curva de perda de massa em função da temperatura com o somatório no canto superior direito e em azul, a derivada da perda de massa.

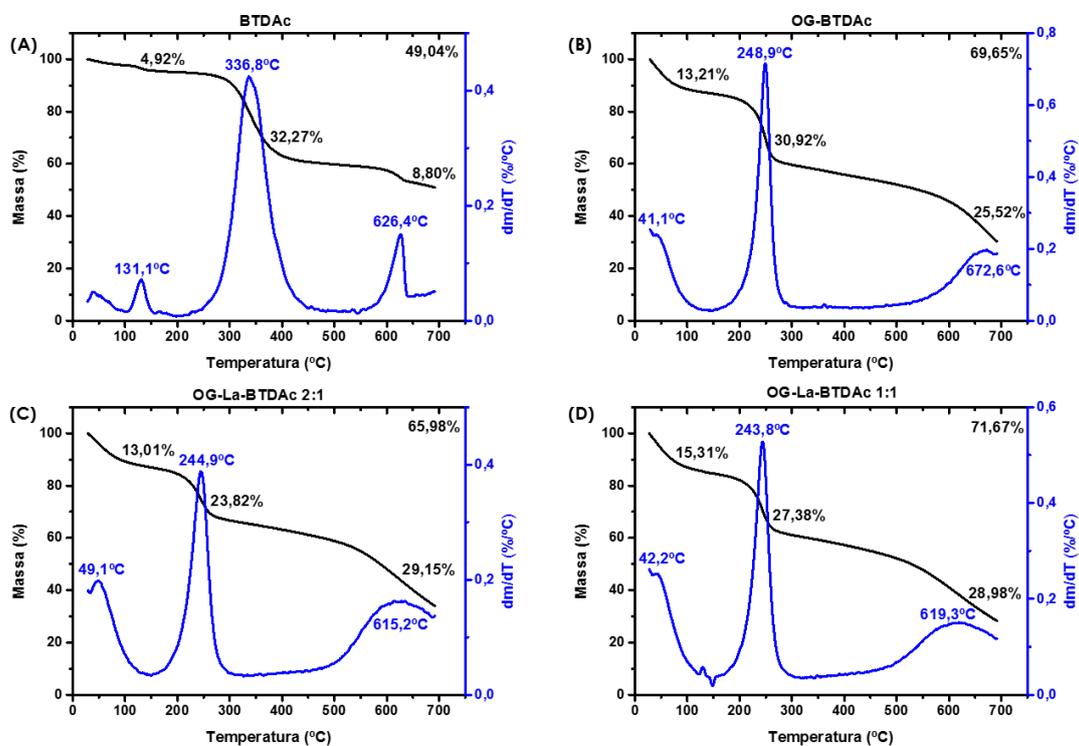


Figura 21. Análise termogravimétrica do ligante BTDAc (A) e dos OG-BTDAc (B), OG-La-BTDAc 2:1 (D) e OG-La-BTDAc 1:1 (D). Em preto está a curva de perda de massa em função da temperatura com o somatório no canto superior direito e em azul, a derivada da perda de massa.

Observa-se que os derivados de BTDAc têm a maior perda de massa acima de 300 °C, tendo o pico máximo da derivada em 391 °C para BTDAc (Figura 20A) e 337 °C e 626 °C BTDAc (Figura 21A) que correspondem a porção correspondente a BTDAc e as carboxilas terminais, respectivamente. No entanto, não são observadas perdas de massa significativas na região de 300-400 °C nos materiais funcionalizados, indicando que os derivados de BTDAc formaram um material híbrido com o OG, como era esperado. Por outro lado, a presença da BTDAc ocasionou uma alteração tanto na perda de massa como na temperatura nas regiões entre 150 e 400 °C e acima de 600 °C, que correspondem aos grupos oxigenados mais e menos lábeis presentes no óxido de grafeno, respectivamente. Os dados de perda de massa extraídos dos gráficos de TGA foram compilados na Tabela S1 e a perda de massa desconsiderando a contribuição do solvente está na Tabela 8.

Tabela 8. Dados da análise termogravimétrica dos materiais funcionalizados com derivados de BTDAc desconsiderando a contribuição do solvente

Material	Perda de massa de 150-400 °C (%)	Perda de massa de 400-700 °C (%)	Perda de massa total (%)
OG-BTDAc	32,57	22,29	54,86
OG-La-BTDAc 2:1	30,24	14,82	45,06
OG-La-BTDAc 1:1	29,26	24,19	53,45
OG-BTDAc	35,63	29,40	65,03
OG-La-BTDAc 2:1	27,38	33,51	60,89
OG-La-BTDAc 1:1	32,33	34,51	66,55

Observa-se que para todos os materiais funcionalizados, os materiais com BTDAc são mais estáveis termicamente que os materiais com BTDAc. Embora a perda de massa na região em torno de 240 °C seja parecida, há um aumento significativo na perda de massa acima de 600 °C para os materiais funcionalizados com BTDAc em relação aos análogos funcionalizados com BTDAc. Esse aumento na região dos grupos oxigenados mais estáveis pode ser devido à estabilização desses grupos presentes no óxido de grafeno, mas principalmente pela presença de carboxilas terminais na BTDAc, como observado na Figura 21A. Comparando os materiais sem lantânio e com lantânio na região abaixo de 400 °C, sugere-se que o lantânio esteja estabilizando os grupos

oxigenados e possivelmente também a BTD coordenada ao cátion metálico, reduzindo a perda de massa.

A fim de estimar as quantidades de BTD e do cátion La^{3+} nos materiais, foi realizada a análise elementar e as porcentagens de carbono, hidrogênio e nitrogênio obtidas bem como de BTD, oxigênio e lantânio calculadas estão apresentadas na Tabela 9.

Tabela 9. Análise elementar dos materiais funcionalizados com BTD e dos suportes OG e OG-La e porcentagens em massa de BTD, oxigênio e lantânio estimadas

Materiais	% C	% H	% N	% de BTD ^a	% de O ^b	% de La ^b
OG	43,28	2,35	0,15	-	54,22	-
OG-La	41,55	2,53	0,21	-	52,05	3,66
OG-La-BTDIm 2:1	44,81	1,87	1,94	5,52 (0,020) ^c	47,04	3,68
OG-La-BTDIm 1:1	46,83	2,36	3,00	8,91 (0,033) ^c	43,04	3,70
OG-BTDIm	46,81	2,30	1,97	5,81 (0,021) ^c	48,23	-
OG-La-BTDAc 2:1	47,93	2,29	1,19	5,33 (0,012) ^c	42,62	4,02
OG-La-BTDAc 1:1	44,94	2,70	1,12	4,95 (0,011) ^c	45,66	3,77
OG-BTDAc	47,85	2,73	1,33	6,42 (0,014) ^c	45,75	-

^aAs porcentagens de BTDIm e BTDAc foram calculadas a partir da porcentagem de nitrogênio no material subtraída da quantidade de nitrogênio no respectivo suporte. ^bAs porcentagens de O e La foram calculadas considerando-se que a razão entre esses elementos e carbono do suporte se mantinham constante. ^cValor referente a quantidade molar, em mmol/100 mg de material.

Observa-se que a porcentagem de lantânio na amostra OG-La foi de 3,66% em massa, a qual se manteve similar para os materiais funcionalizados com BTD. No caso dos materiais funcionalizados com BTDIm, observa-se que a porcentagem do ligante nos materiais OG-BTDIm e OG-La-BTDIm 2:1 foi igual, como era esperado, pois se adiciona a mesma quantidade do ligante BTDIm em ambas as sínteses. No material OG-La-BTDIm 1:1 (onde se adiciona o dobro de BTDIm na síntese), a quantidade molar de

BTDIm aumentou consideravelmente (aproximadamente 60%), indicando que ainda haviam sítios para coordenação da BTDIm seja no óxido de grafeno e/ou no lantânio e também que a molécula BTDIm provavelmente esteja se ligando somente por um grupo imidazol terminal. Por outro lado, não é observado aumento da quantidade de ligante no material OG-La-BTDAc 1:1 quando comparada com os análogos funcionalizados com BTDAc, sugerindo que os sítios de coordenação desse ligante foram ocupados com menor quantidade da BTDAc e possivelmente essa ligação ocorre em mais de um sítio do suporte.

Na Figura 22 temos os espectros de Raman dos materiais funcionalizados com indicação das bandas G, D, 2D e D+D' que são associadas aos carbonos com hibridização sp^2 e sítios de defeitos ou desordem. A razão entre as bandas D e G foram calculadas a partir dos valores de intensidade dessas bandas após o ajuste da linha de base e deconvolução de cada região utilizando o programa Origin.¹⁵⁴

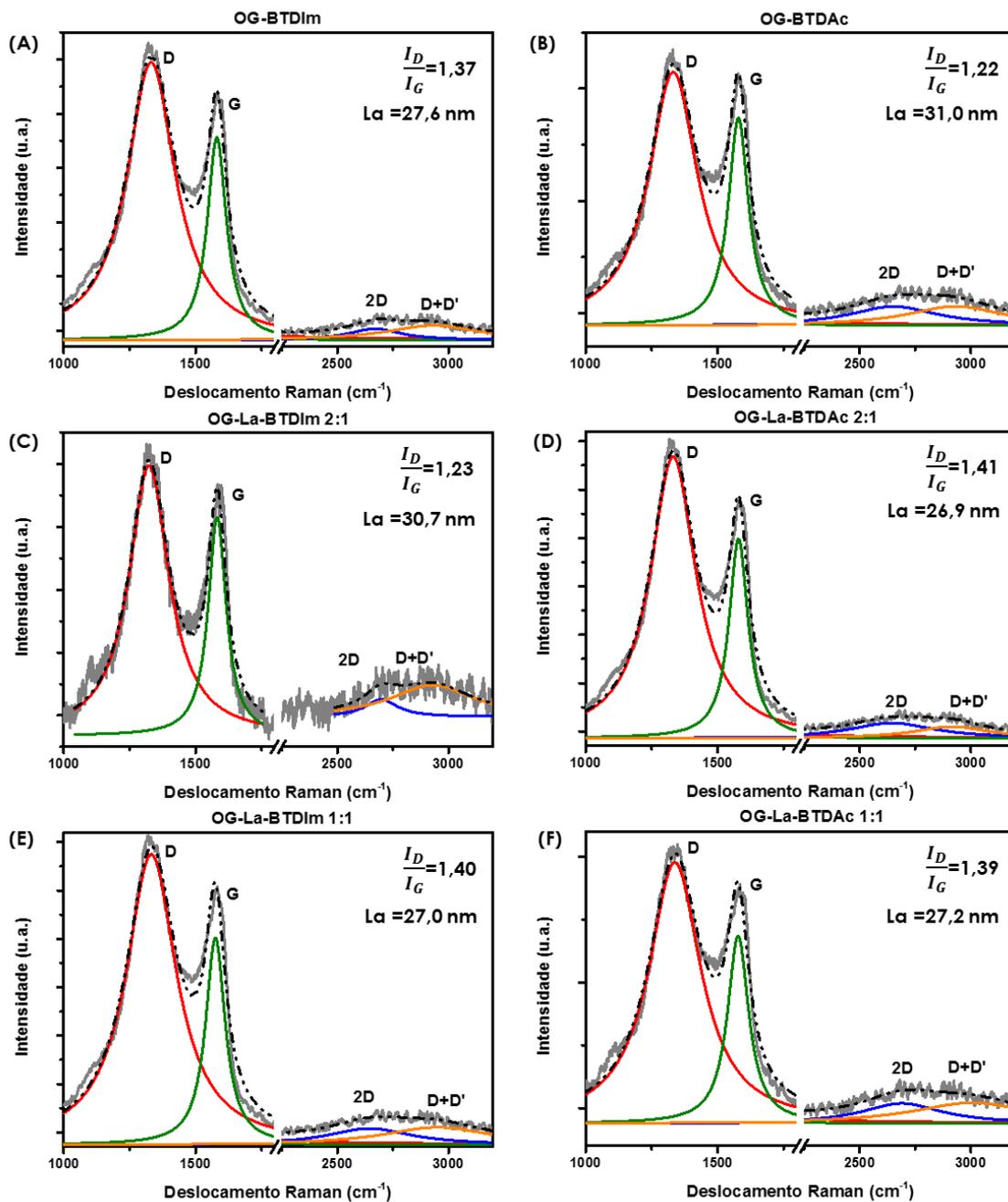


Figura 22. Espectros Raman dos materiais OG-BTDIm(A), OG-BTDAc(B), OG-La-BTDIm 2:1(C), OG-La-BTDAc 2:1(D), OG-La-BTDIm 1:1(E), OG-La-BTDAc 1:1(F). Os dados obtidos estão em cinza, as deconvoluções estão representadas em linhas coloridas e o melhor *fitting* é a linha pontilhada em preto.

Observa-se que o deslocamento Raman da banda G acontece em torno de 1580 cm^{-1} para todos os materiais, indicando que os materiais apresentam uma ou poucas camadas de carbonos sp^2 . Todos os materiais apresentam a banda D mais intensa que a banda G e também bandas pouco intensas 2D e D+D', que confirmam a presença de defeitos na estrutura do grafeno. A fim de comparar a quantidade de defeitos dos

materiais, foi calculada a razão I_D/I_G e o tamanho dos sítios grafíticos dos materiais segundo a equação 3.^{124, 125} Era esperado que o maior tamanho de cristalito, ou seja, maior similaridade com a estrutura grafítica, fossem dos materiais OG-La-BTD 2:1 caso as duas terminações da BTD (nitrogênio no caso do imidazol e carboxila no caso do sal de imidazólio) coordenassem nos íons lantânio distribuídos nas folhas de grafeno. Isso foi o que aconteceu nos materiais funcionalizados com BTDim. O material OG-La-BTDim 2:1 apresentou a menor razão I_D/I_G e maior tamanho de cristalito, seguido do material OG-BTDim e OG-La-BTDim 1:1, respectivamente. Isso indica que a molécula BTDim está interagindo com as folhas de óxido de grafeno (sem lantânio) (i) por interação π - π num empilhamento ou (ii) via ligação covalente pela abertura de anéis epóxidos e/ou pela reação com grupos carboxilas do suporte (formação de amidas), levando ao aumento de tamanho de cristalito. Por outro lado, o material OG-La-BTDim 1:1 possui uma relação equimolar de íons La^{3+} e ligante, facilitando a coordenação da BTDim somente por uma extremidade, favorecendo a característica de grafeno e apresentando maior razão entre as bandas dada pelo efeito de bordas.^{121, 125} No entanto, os materiais funcionalizados com BTDAc não seguiram a mesma sequência dos funcionalizados com BTDim, provavelmente devido à molécula BTDAc já conter um sal de imidazólio e apresentar carbonos sp^3 na estrutura do cátion que podem sofrer rotação, quebrando a planaridade da estrutura. Isso se torna evidente quando observamos que a diferença entre OG-La-BTDAc 2:1 e OG-La-BTDAc 1:1 é muito baixa, demonstrando que possivelmente a interação entre a BTDAc e o íon La^{3+} seja estequiométrica e ocorra pela coordenação de dois grupos carboxila ao lantânio. Esse resultado corrobora com o obtido por análise elementar, de que o aumento de BTDAc na síntese não resulta em material com mais quantidade desse ligante. Realmente, o lantânio tem alta afinidade por átomos doadores duros, como os grupos carboxílicos, podendo se ligar a mais de uma molécula como quelante bidentado ou em ponte bidentada ou tridentada.¹⁵⁵ Por fim, o maior tamanho de cristalito foi obtido para o material OG-BTDAc, indicando que há uma forte interação seja por (i) ligação química com os grupos oxigenados do OG e/ou (ii) atração eletrostática entre a parte catiônica da BTDAc e as folhas de grafeno carregadas negativamente, como demonstram os experimentos de potencial zeta da literatura.¹⁵⁶

As propriedades fotofísicas dos derivados de BTD e dos materiais de OG modificados foram caracterizadas utilizando espectroscopia de absorção na região do UV-vis e de emissão e excitação de fluorescência em solução e no estado sólido. Os experimentos realizados em solução aquosa não são quantitativos, pois as amostras

analisadas foram avaliadas a partir de suspensões, onde não foi possível a sua quantificação, tendo em vista que a sua concentração varia com o material. Assim, somente as amostras OG e BTDAc mostraram-se completamente solúveis em água após a sonicação.

A espectroscopia de absorção na região do UV-vis no estado sólido e em solução aquosa, bem como a respectiva refletância difusa dos materiais estão apresentadas nas Figuras S17-S18. Na Figura 23 pode ser observado o espectro de absorção normalizado dos materiais OG e OG-La em solução aquosa.

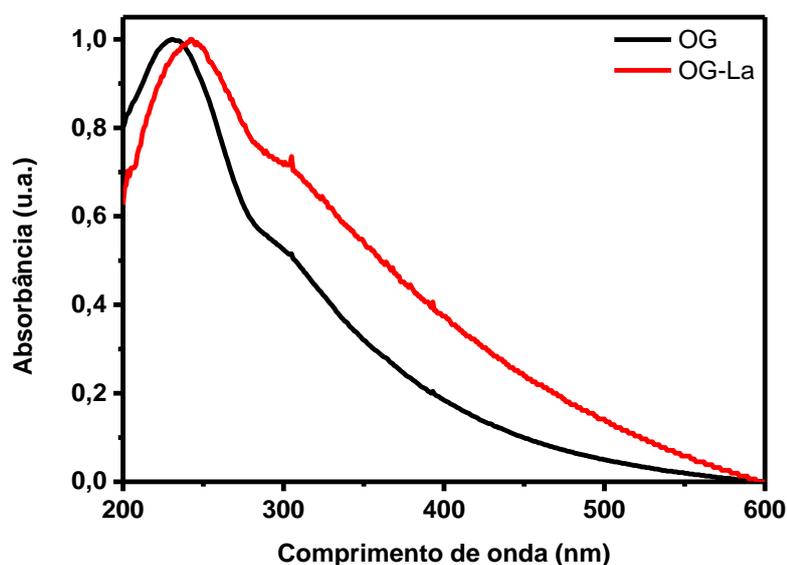


Figura 23. Espectro no UV-vis dos materiais OG e OG-La.

O espectro de absorção do óxido de grafeno exibe dois máximos de absorção em 231 e 300 nm que correspondem às transições eletrônicas do tipo $\pi \rightarrow \pi^*$ da ligação dupla C=C e $n \rightarrow \pi^*$ da ligação C=O, respectivamente.¹¹⁶ Com a funcionalização das folhas de óxido de grafeno com o íon La^{3+} , há um deslocamento do máximo de absorção para 242 nm, indicando uma modificação eletrônica na estrutura. Apesar do óxido de grafeno ser formado por domínios com carbono de hibridização sp^2 e domínios com hibridização sp^3 , as transições ópticas nesses domínios são inter-relacionadas sob excitações, sendo a resposta óptica heterogênea e não-linear devido à natureza não estequiométrica do OG.¹⁵⁷ Portanto, o óxido de grafeno pode apresentar fotoluminescência, embora nesse estudo não foi identificada essa propriedade (Figura S21).

Nas Figuras S17(A) e S18(A) encontram-se os espectros de absorção de UV-vis em solução aquosa da BTDI_m e BTDAc, respectivamente. A BTDI_m apresenta máximos de absorção localizados em 237, 305 e 364 nm, enquanto a BTDAc apresenta máximos de absorção em 227, 311 e 340 nm, que correspondem à região ultravioleta. A absorção localizada em torno de 230 nm é associada à transição $\pi \rightarrow \pi^*$ do grupo imidazol(ólio).¹⁵⁸ A banda de intensa absorção localizada acima de 300 nm foi atribuída à transição $\pi \rightarrow \pi^*$ permitida por spin e simetria do núcleo BTD.^{101, 159, 160} Observamos que a substituição do imidazol com 1-carbóximetil produziu um deslocamento hipsocrômico nas bandas externas e batocrômico na banda central. A absorção máxima dos materiais funcionalizados com BTD coincidiram com as absorções do OG e OG-La (Figura 23).

Os complexos com íons lantanídeos têm baixa luminescência devido ao fraco coeficiente de absorção das transições proibidas por paridade e, por isso, normalmente se utilizam ligantes cromóforos.¹⁵⁵ Nesse sentido, materiais híbridos de óxido de grafeno e complexos de metais lantanídeos são interessantes para a produção de novos materiais luminescentes de alta performance.¹⁶¹ Os espectros de fluorescência de emissão e excitação dos materiais funcionalizados com BTD e das moléculas BTDI_m e BTDAc estão apresentados nas Figuras 24 e 25, respectivamente.

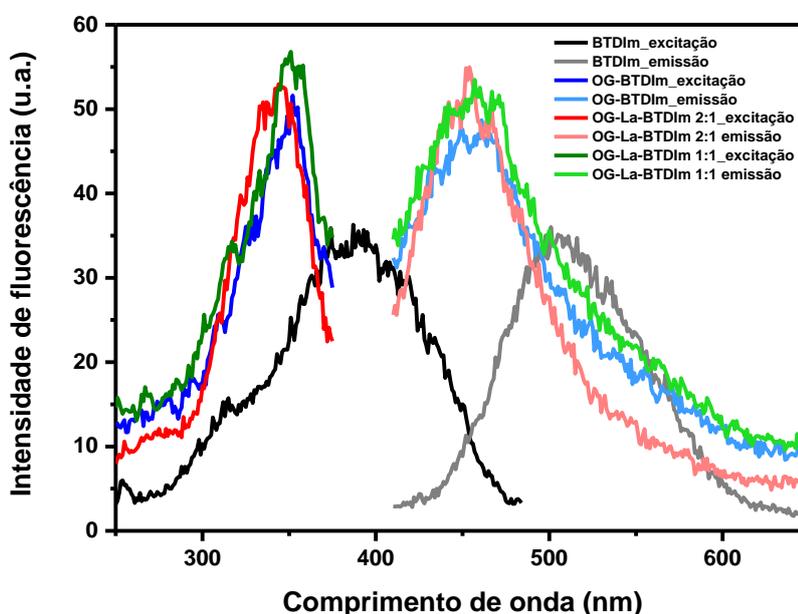


Figura 24. Espectros de excitação (linha opaca) e de emissão de fluorescência (linha transparente) do ligante BTDI_m e dos materiais funcionalizados com BTDI_m em solução aquosa.

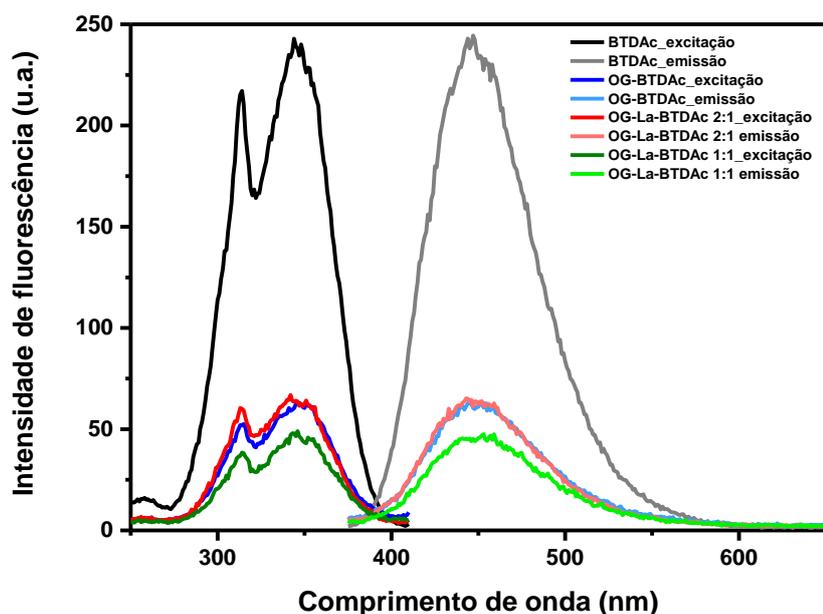


Figura 25. Espectros de excitação (linha opaca) e de emissão de fluorescência (linha transparente) do ligante BTDAc e dos materiais funcionalizados com BTDAc em solução aquosa.

Os espectros de emissão de fluorescência apresentados nas Figuras 24 e 25 foram obtidos utilizando a absorção máxima como comprimento de onda de excitação. Outros espectros de fluorescência utilizando diferentes comprimentos de onda de excitação podem ser encontrados nas Figuras S21 e S22. A introdução do grupo 1-carbóximetil para formar a BTDAc produziu deslocamento de 509 nm para 446 nm no máximo de emissão e de 390 nm para 347 nm no máximo de excitação em relação à BTDI_m. O deslocamento hipsocrômico também foi observado nas análises de sólido dos derivados de BTDAc (Figura S19). A localização do máximo de emissão da BTDI_m foi em 509 nm, que corresponde à região do verde água. Os materiais OG-BTDAc e OG-La-BTDAc apresentaram emissão máxima localizada na região do ciano, em 455 nm. Esse deslocamento tanto no máximo de emissão quanto excitação comprova que a BTDI_m está interagindo fortemente com o óxido de grafeno, provocando um deslocamento na direção do azul nesses materiais, provavelmente devido à transferência eletrônica para o nanomaterial de carbono. Em contraponto, os materiais funcionalizados com BTDAc apresentaram emissão máxima localizada em 446 nm, coincidindo com a emissão da molécula BTDAc, demonstrando que, nesse caso, a interação com o óxido de grafeno não afeta a fluorescência da molécula.

A fluorescência apresentada por esses materiais indica que eles também podem ser utilizados como sensores fluorescentes para determinação de outros analitos ou como sondas fluorescentes.

Por fim, os materiais foram caracterizados por espectroscopia de fotoelétrons excitados por raios X para melhor compreender a interação entre os elementos. Na Figura 26 são apresentadas as medidas de XPS *survey* dos materiais OG-La, OG-BTDIm, OG-La-BTDIm 2:1 e OG-La-BTDAc 2:1.

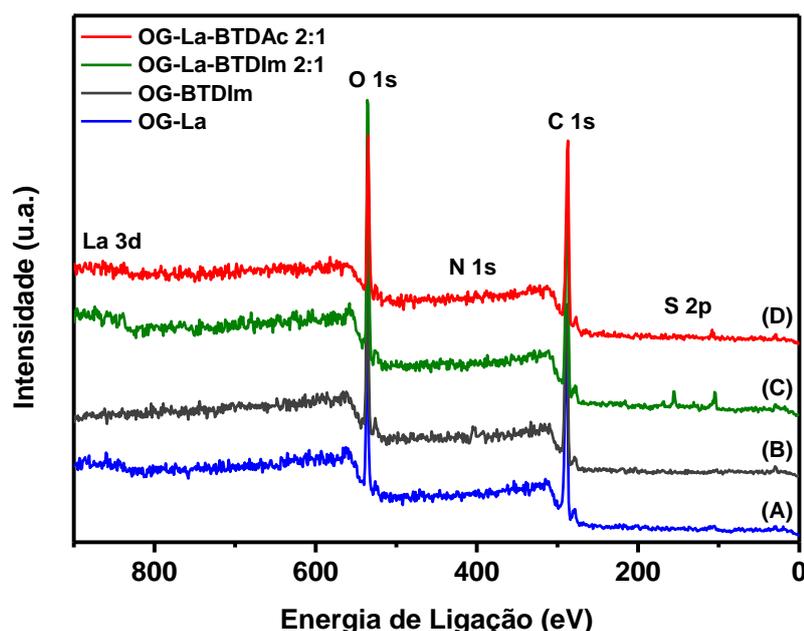


Figura 26. Medida de XPS *survey* dos materiais OG-La (A), OG-BTDIm (B), OG-La-BTDIm 2:1 (C) e OG-La-BTDAc 2:1 (D).

Nos espectros de XPS *survey* dos materiais podemos observar que os maiores picos correspondem às regiões do C 1s e O 1s, porém ainda nos interessam três regiões (S 2p, N 1s e La 3d) para identificar o lantânio e a BTDA presentes nos materiais. Para isso, foram realizadas medidas de alta resolução das cinco regiões e um exemplo de cada região se encontra na Figura 27. Os espectros de alta resolução de cada região para cada material e respectivas deconvoluções encontram-se nas Figuras S23 a S26, cujos dados foram tratados utilizando o programa CasaXPS¹⁶² e compilados na Tabela 10.

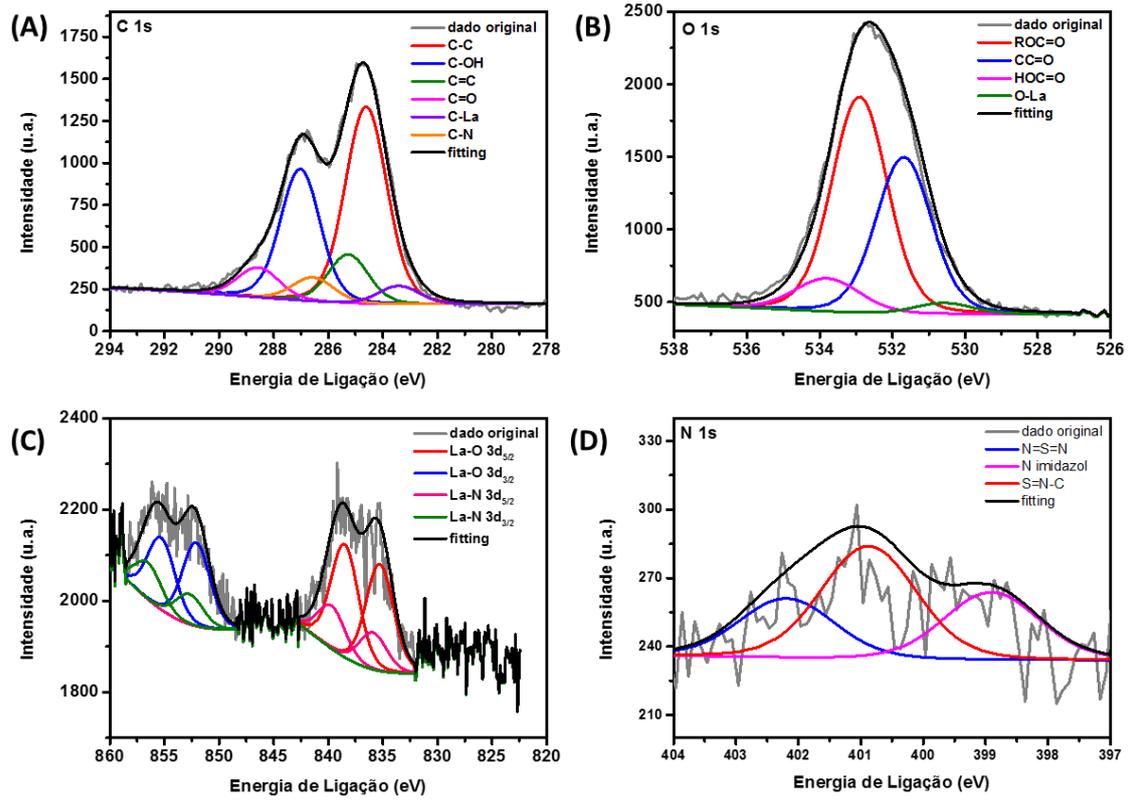


Figura 27. Espectros de XPS de alta resolução das regiões do C 1s (A), O 1s (B), La 3d (C) e N 1s (D) do material OG-La-BTDIm.

Tabela 10. Componentes da deconvolução da análise de XPS com a porcentagem por região de alta resolução em cada material analisado

Região	Sinal (eV)	Atribuição	Material			
			OG-La	OG-BTDIm	OG-La-BTDIm 2:1	OG-La-BTDAc 2:1
C 1s	284,6	C-C	49,5	44,5	44,8	52,4
	285,3	C=C	3,2	3,5	10,6	9
	286,8	C-OH/C-O	40,7	39,0	28,5	20,1
	286,5	C-N		5,6	5,4	5,5
	288,6	C=O	6,6	7,4	6,7	5,5
	283,3	C-La	-	-	4	7,5
O 1s	530,5	O-La	-	-	2,7	11,2
	531,6	CC=O	27,1	25,6	37,0	35,4
	532,9	ROC=O	63,5	64,4	51,1	45,0
	533,8	HOC=O	9,4	10,0	9,2	8,4
La	852,1	-	24,5	-	26,4	25,6
3d _{3/2}	855,3	-	24,5	-	26,3	27,1
La	835,3	-	25,5	-	23,6	23,4
3d _{5/2}	838,5	-	25,5	-	23,7	23,9
N 1s	398,8	N imidazol	-	23,8	28,2	29,9
	400,3	S=N-C	-	44,3	47,0	25,5
	401,8	N=S=N	-	31,9	24,8	44,6

A região do C 1s foi decomposta em seis regiões: linhas vermelha, azul, rosa, verde, laranja e violeta referentes aos componentes químicos C-C, C-OH, C=O, C=C, C-N e C-La, respectivamente (Figura 27A).^{94, 163} No material OG-La somente se observam as primeiras quatro regiões, demonstrando que estão presentes grupos oxigenados na superfície do óxido de grafeno e que não há componentes nitrogenados nem lantânio ligado ao carbono nesse material. Nos materiais funcionalizados com BTDA se observam também uma componente localizada em 286,5 eV referente à ligação C-N do ligante, reafirmando a presença do mesmo no material como observado pelas outras técnicas de caracterização. Os materiais OG-La-BTDA apresentam ainda uma componente em 283,3

eV associada às ligações entre carbono e metal, nesse caso, C-La. Embora não se observe essa componente para a amostra OG-La e somente para os materiais OG-La-BTD, não se possa excluir a possibilidade de interação do La^{3+} com as ligações C=C do suporte, que corrobora com o deslocamento batocrômico observado pela espectroscopia no IV. Adicionalmente, as BTDs podem estar se coordenando ao íon La^{3+} também i) através da formação de carbenos N-heterocíclicos ou ii) pelo anel imidazol(ólio) através de interação π . Para a BTDIm, as duas formas são possíveis, enquanto que para a BTDAc a primeira forma é mais provável, tendo em vista que o primeiro tipo de interação envolveria a aproximação de duas cargas positivas (anel imidazólio e La^{3+}).

Os espectros de alta resolução da região do O 1s também confirmam a presença de grupos oxigenados (epóxido, hidroxila, carboxila e carbonila) em todos os materiais (Figura 27B). A região do O 1s foi decomposta em quatro componentes representadas em vermelho, azul, rosa e verde que se referem aos componentes químicos $\text{ROC}=\text{O}$, $\text{CC}=\text{O}$, $\text{HOC}=\text{O}$ e O-La.^{163, 164} Os primeiros três componentes foram observados em todos os materiais, pois todos são provenientes do óxido de grafeno. O componente referente à ligação O-La em 530,5 eV só foi observado novamente nos materiais OG-La-BTD sugerindo que os íons La^{3+} devem estar se coordenando também nos grupos oxigenados da superfície do OG. Como o sinal referente à ligação O-La foi mais expressivo no material OG-La-BTDAc (11,2%) quando comparado com o análogo OG-La-BTDIm (2,7%), infere-se que também ocorre coordenação da carboxila terminal da BTDAc com os íons La^{3+} . A presença de lantânio nas amostras é confirmada, inclusive para o material OG-La, pelo espectro na região do La 3d que apresenta dois dubletos com aproximadamente a mesma proporção em 835 e 838 eV que corresponde ao La-O $3d_{5/2}$ e 852 e 855 eV que corresponde ao La-O $3d_{3/2}$.^{94, 165} Como esperado, somente na amostra OG-BTDIm não se identificou a presença de lantânio. Somente para o material OG-La-BTDIm 2:1, cada dubleto do La 3d apresentou mais uma componente em 840 e 857 eV que corresponde ao La-N $3d_{5/2}$ e 836 e 853 eV que corresponde ao La-O $3d_{3/2}$ (Figura 27C).⁹⁴ Isso indica que, para esse material, possivelmente há coordenação pelo par de elétrons do nitrogênio do grupo imidazol também.

As regiões do N 1s e S 2p não apresentaram boa resolução, mas ainda foi possível observar os componentes em 398,8, 400,3 e 401,8 eV correspondentes aos componentes químicos N do anel imidazol(ólio), S=N-C e N=S=N, respectivamente em rosa, vermelho e azul.^{94, 163} Tais componentes são características dos derivados de BTD utilizados nesse estudo e estão presentes em todos os materiais, com exceção do OG-La.

9.3 Aplicação dos materiais de óxido de grafeno funcionalizados com derivados de BTB

Os materiais de óxido de grafeno funcionalizados com lantânio e derivados de 2,1,3-benzotiadiazolas (BTBIm e BTBAC) foram aplicados na quantificação de colesterol total pelo método colorimétrico. Diversos são os fatores que afetam a atividade enzimática, como: pH e temperatura do meio, tempo de reação, concentração da enzima e substrato, presença de inibidores, entre outros. Tendo em vista que a determinação de colesterol é feita em amostras de plasma sanguíneo, o pH e a temperatura foram fixados para simular as condições reais da amostra: pH neutro e temperatura de 37 °C. Tais condições coincidem com as condições adequadas para o funcionamento da enzima colesterol oxidase, segundo estudos da literatura.¹⁷ Então, avaliou-se a cinética da enzima livre nas condições do experimento a fim de determinar o melhor tempo de reação. Na Figura S27 se encontram os espectros de absorção no UV-vis medidos a cada 5 min de reação e na Figura 28, o gráfico de absorção em 500 nm em relação ao tempo para 0,04 U de ChOx e 9,5 mg dL⁻¹ de colesterol. Nesse experimento, o branco (tampão de fosfato e reagente de cor 1:1) foram subtraídos das medidas.

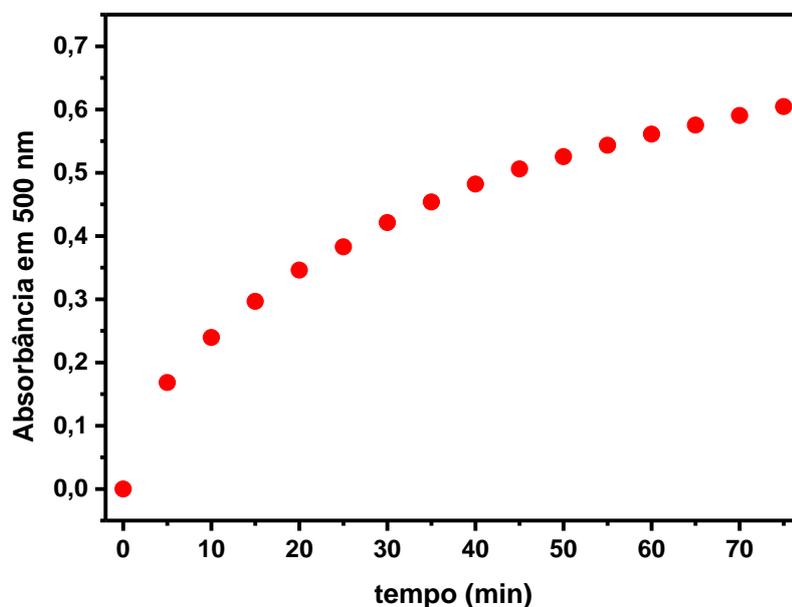


Figura 28. Cinética da enzima livre ChOx (0,04 U) com 9,5 mg dL⁻¹ de colesterol.

Observa-se que a enzima colesterol oxidase livre obedece uma cinética de primeira ordem no início da reação (< 3min) onde há a saturação da enzima que, com o passar do tempo, se transforma em uma cinética de ordem zero. Por isso, o tempo de 30 min foi definido como o tempo de reação otimizado, antes da curva inflexionar por completo, onde a absorvância se aproxima de 0,5 u.a.¹⁵¹

Na sequência, foi utilizado o material OG-La-BTDIm 2:1 como modelo para os testes de otimização das condições de tempo de imobilização e quantidade de enzima. A imobilização enzimática é um fator determinante na atividade do biossensor, afetando fatores como sensibilidade, especificidade, tempo de resposta, tempo de armazenamento, repetibilidade, entre outros.²⁰ Nesse trabalho, o método de adsorção física foi escolhido para a imobilização da enzima colesterol oxidase por ser um método simples que não envolve outros reagentes químicos, comumente utilizado com materiais a base de carbono.²⁰ No entanto, a imobilização covalente da enzima também é possível devido a presença dos grupos funcionais no material. Utilizando 24 h como tempo padrão de imobilização, foram testadas quatro quantidades de enzima 0,02; 0,04; 0,08 e 0,20 U mL⁻¹. Na Figura 29 e Tabela 11, podemos observar a absorvância em 500 nm e a atividade da enzima livre, dos materiais e respectivos sobrenadantes de imobilização e lavagem.

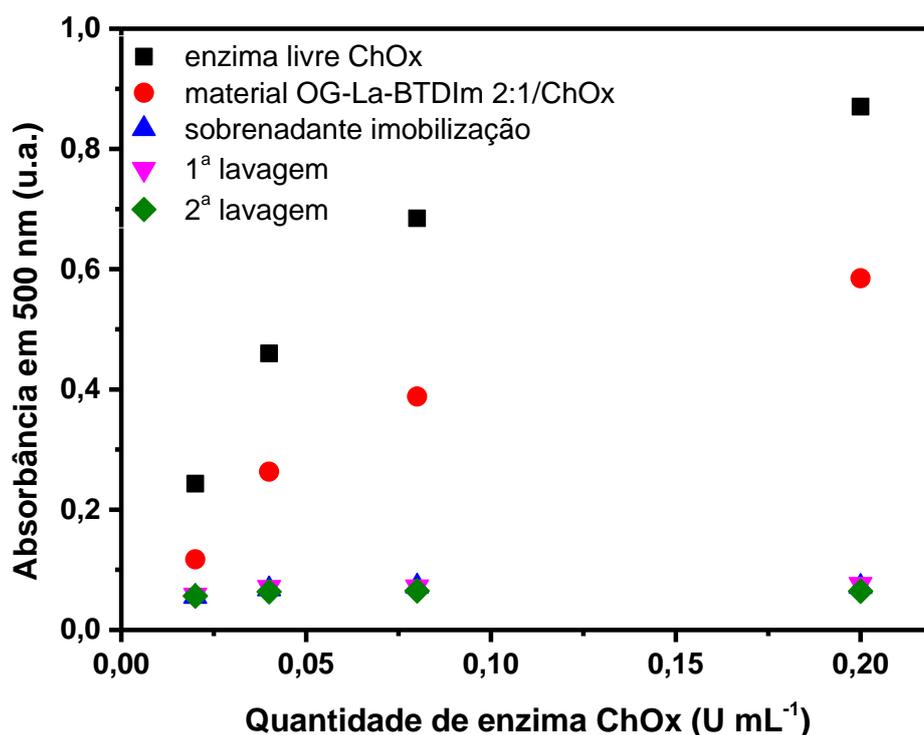


Figura 29. Absorbância em 500 nm das reações com 9,5 mg dL⁻¹ de colesterol utilizando diferentes concentrações de enzima ChOx livre. Avaliação da imobilização no material OG-La-BTDIm 2:1/ChOx, sobrenadante e lavagens pós imobilização de 24 h.

Tabela 11. Porcentagem de imobilização e atividade recuperada do material para diferentes quantidades de enzima em uma reação com 9,5 mg dL⁻¹ de colesterol

Quantidade de ChOx (U mL ⁻¹) ^a	Porcentagem de imobilização ^b	Atividade Recuperada do Material ^b
0,02	30,1%	48,2%
0,04	56,0%	57,2%
0,08	69,4%	56,7%
0,20	75,6%	67,1%

^aA atividade da enzima foi calculada conforme dados fornecidos pelo fabricante. ^b A porcentagem de imobilização e atividade recuperada do material foram calculadas a partir das equações 1 e 2 e os dados de absorbância e atividade estão disponíveis na Tabela S2. Nesse experimento, o branco (tampão de fosfato e reagente de cor 1:1) foram subtraídos das medidas.

Observa-se na Figura 29 que a atividade da enzima aumenta com o aumento da quantidade de enzima para ChOx livre e imobilizada, enquanto a absorvância do sobrenadantes de imobilização e lavagem mantem-se baixa. A quantidade de 0,08 U mL⁻¹ de ChOx foi considerada a mais adequada para esse estudo com porcentagem de imobilização e atividade recuperada de 69% e 57%, respectivamente, pois busca-se utilizar a menor quantidade de enzima com melhor eficiência a fim de diminuir o custo da produção dos biossensores.

Tendo estabelecido 0,08 U mL⁻¹ de ChOx como quantidade de enzima ótima nas condições do experimento; em seguida foi otimizado o tempo de imobilização. Na Figura S28 encontram-se os espectros de UV-vis das reações contendo enzima livre ou o material OG-La-BTDIm 2:1/ChOx na presença de 9,5 mg dL⁻¹ de colesterol. Na Tabela 12, as absorvâncias foram convertidas em atividade enzimática e a atividade recuperada foi calculada pela razão entre a atividade do material e da enzima livre, para os diferentes tempos de imobilização.

Tabela 12. Absorções e atividade enzimática para ChOx livre e OG-La-BTDIm 2:1/ChOx em diferentes tempos de imobilização e a atividade recuperada

Tempo	Absorvância Enzima Livre	Atividade Enzima livre ^a	Absorvância Enzima Imobilizada	Atividade Enzima imobilizada ^a	Atividade Recupe- rada
30 min	0,7723	3593	0,6852	3188	88,7%
1 h	0,7822	3639	0,7145	3324	91,3%
2 h	0,7549	3512	0,5942	2765	78,7%
6 h	0,7432	3458	0,5129	2386	69,0%
24 h	0,7709	3587	0,4746	2208	61,6%

^aA atividade foi calculada de acordo com a equação 4 e está expressa em U mL⁻¹ min⁻¹, onde 1U é a quantidade de enzima ChOx necessária para catalisar a reação de 1 mmol L⁻¹ de colesterol por minuto, nas condições do experimento.

Observando os dados da Tabela 12, podemos concluir que o melhor tempo de imobilização foi de 1 h, pois apresentou a maior atividade recuperada após a imobilização nas condições do experimento. Esse tempo permitiu a adsorção da maior quantidade de enzima na superfície do material com o sítio ativo exposto, evitando um possível aumento da espessura da camada proteica e conseqüentemente dificultando o processo catalítico e

a difusão do substrato, o que pode ocorrer em longos períodos de imobilização.¹⁶⁶ A atividade recuperada para 1 h de imobilização foi de 91%, demonstrando que a enzima imobilizada no material se manteve ativa, sendo esse tempo considerado o melhor tempo de imobilização nas condições do experimento. Portanto, a imobilização, possivelmente por adsorção, se mostrou adequada para utilização nesse sistema e a alta atividade recuperada sugere que a conformação da enzima não foi alterada, não houve agregação enzimática substancial e a imobilização ocorreu de forma que a enzima não ficasse enrijecida ou com o sítio ativo inacessível, garantindo acessibilidade ao colesterol e oxigênio.^{21, 167-170}

Tendo otimizado as condições de tempo de reação para a atividade enzimática e de imobilização e quantidade de enzima, calculou-se a porcentagem de enzima imobilizada e a atividade recuperada dos materiais com enzima imobilizada de acordo com as equações 1 e 2. Na tabela 13 estão apresentados os valores de porcentagem de enzima imobilizada nos materiais e a atividade recuperada em relação a atividade da enzima livre.

Tabela 13. Porcentagem de enzima imobilizada e atividade recuperada dos materiais para a reação na presença de 9,5 mg dL⁻¹ de colesterol

Material	% Enzima Imobilizada ^a	Atividade Recuperada ^b
OG/ChOx	99,9	37,9
OG-La/ChOx	97,7	40,4
OG-La-BTDIm 2:1/ChOx	94,7	62,9
OG-La-BTDIm 1:1/ChOx	90,9	69,9
OG-BTDIm/ChOx	91,6	75,17
OG-La-BTDAc 2:1/ChOx	75,1	59,7
OG-La-BTDAc 1:1/ChOx	84,7	44,7
OG-BTDAc/ChOx	66,7	54,5

^aCalculada a partir a atividade dos sobrenadantes de imobilização e lavagens, conforme a equação 1.

^bCalculada a partir do valor da atividade do material com enzima imobilizada em relação a atividade da enzima livre, conforme a equação 2.

Para os materiais OG e OG-La observam-se elevadas porcentagens de enzima imobilizada sugerindo que os grupos funcionais superficiais do óxido de grafeno possibilitam a imobilização por adsorção e/ou covalente da enzima ChOx. No entanto, a

atividade recuperada desses materiais foi muito baixa, indicando que, mesmo havendo alta quantidade de enzima imobilizada, há outros fatores que interferem na atividade catalítica, como por exemplo a adsorção multipontual.¹⁷⁰ Quando comparadas as porcentagens de imobilização dos materiais funcionalizados com BTDI_m e os análogos funcionalizados com BTDAc, evidencia-se uma preferência da enzima pelos materiais com BTDI_m, com porcentagem de imobilização superior a 90%. Como a porcentagem de imobilização foi maior nesse conjunto de materiais, conseqüentemente a atividade recuperada foi superior (de 62 a 75% quando excluída a atividade do material sem enzima). Embora a porcentagem de imobilização da enzima nos materiais funcionalizados com BTDAc tenha sido menor (66 a 84%) que nos materiais análogos com BTDI_m, a atividade recuperada inferior a 60%. Isso indica que a enzima imobilizada nos materiais com BTDAc se encontra em sua maioria em conformação desfavorável para a reação catalítica.

Na seqüência, foram realizadas as curvas analíticas de quantificação colorimétrica de colesterol total pelos diferentes materiais sintetizados nesse capítulo. Foram realizados três experimentos para cada material, dois com enzima imobilizada e um somente com o material (experimento controle). No material suplementar estão disponibilizados os espectros no UV-vis obtidos para diferentes concentrações de colesterol com cada material e a curva analítica de 0 a 16,5 mg dL⁻¹ de colesterol total com barra de erro quando o teste foi realizado em duplicata (Figuras S29 a S37). Observa-se um desvio baixo entre as duplicatas e, por isso, a média dos valores foi considerada nas curvas analíticas. Além disso, a faixa de detecção linear, para a maioria dos materiais, compreendeu de 0 a 5,83 mg dL⁻¹ de colesterol total, a qual foi considerada na regressão linear. Nas Figuras 30-33 estão as curvas analíticas (concentração de colesterol vs. absorbância em 500 nm) da enzima livre, OG e OG-La e dos materiais funcionalizados com BTDI_m e BTDAc, respectivamente.

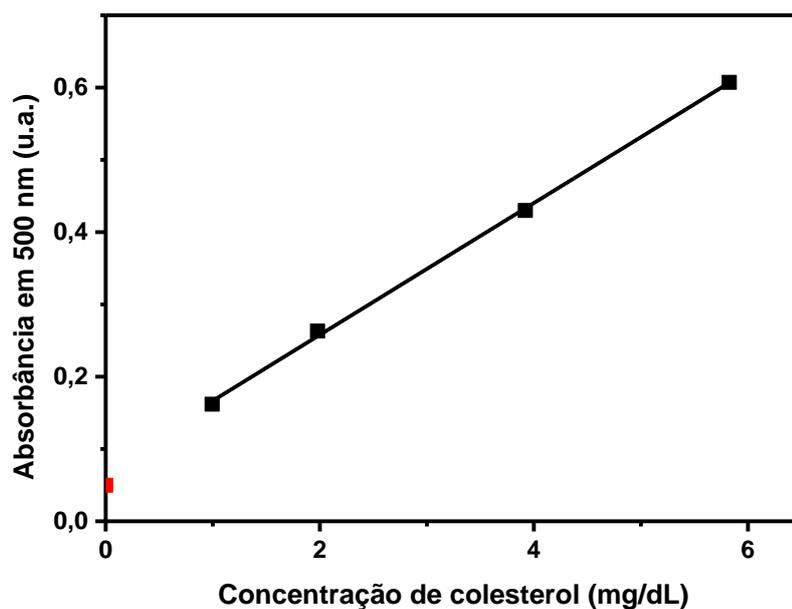


Figura 30. Curva analítica da quantificação colorimétrica de colesterol total em diferentes concentrações utilizando a enzima livre (ChOx) nas condições otimizadas.

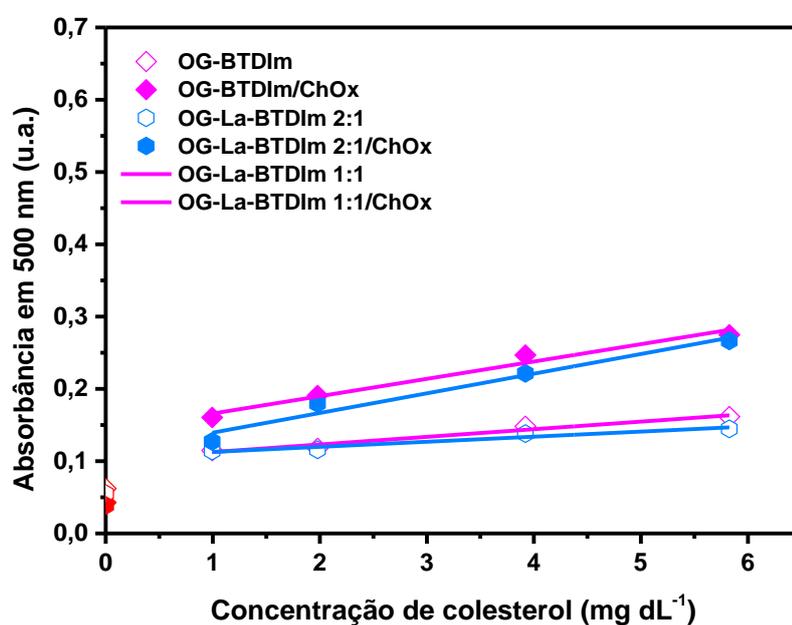


Figura 31. Curvas analíticas da quantificação colorimétrica de colesterol total em diferentes concentrações utilizando os materiais: OG, OG/ChOx, OG-La e OG-La/ChOx nas condições otimizadas.

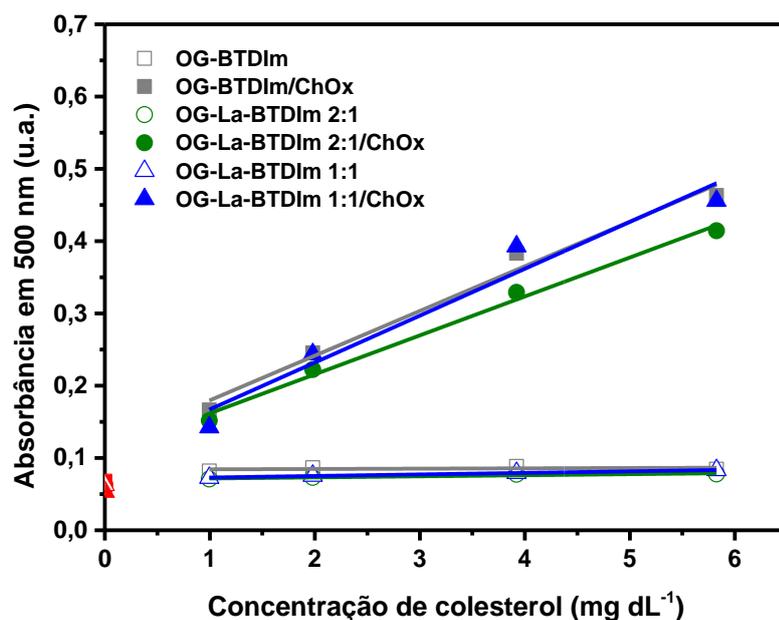


Figura 32. Curvas analíticas da quantificação colorimétrica de colesterol total em diferentes concentrações utilizando os materiais: OG-BTDIm, OG-BTDIm/ChOx, OG-La-BTDIm 2:1, OG-La-BTDIm 2:1/ChOx, OG-La-BTDIm 1:1 e OG-La-BTDIm 1:1/ChOx nas condições otimizadas.

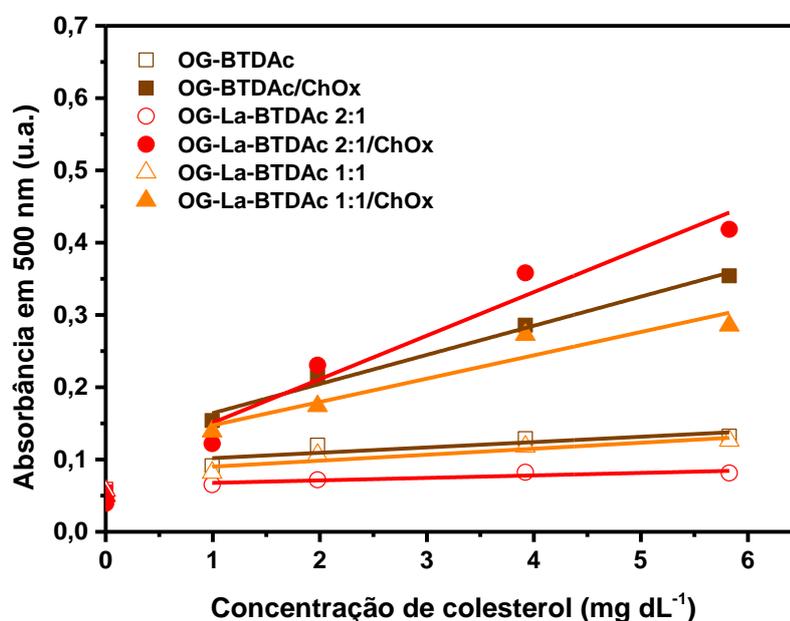


Figura 33. Curvas analíticas da quantificação colorimétrica de colesterol total em diferentes concentrações utilizando os materiais: OG-BTDAc, OG-BTDAc/ChOx, OG-La-BTDAc 2:1, OG-La-BTDAc 2:1/ChOx, OG-La-BTDAc 1:1 e OG-La-BTDAc 1:1/ChOx nas condições otimizadas.

Nas figuras acima, podemos observar que há uma correlação linear entre a concentração de colesterol e a absorbância e que a inclinação da reta é maior para os materiais com enzima imobilizada quando comparados com os análogos sem enzima. Novamente, os materiais OG e OG-La apresentaram considerável absorbância sem enzima, como era esperado a partir dos resultados previamente obtidos no capítulo I, sugerindo que os grupos oxigenados disponíveis - principalmente os grupos reativos como epóxido e carboxílico - podem estar reagindo com a enzima peroxidase do reagente de cor e gerando um falso positivo.^{170, 171} Por outro lado, os materiais funcionalizados com derivados de BTB não apresentaram alta absorbância na ausência da enzima colesterol oxidase, demonstrando a importância da BTB no bloqueio dos sítios oxigenados do OG, como observado pelas técnicas de caracterização.

A fim de comparar numericamente as características dos biossensores, na Tabela 14 estão descritas as figuras de mérito extraídas da curva analítica: equação da curva analítica, coeficiente de regressão linear, sensibilidade e limites de detecção e quantificação (LOD e LOQ, respectivamente). Nas Figuras S38 a S40 se encontram os gráficos com as curvas analíticas para cada material testado nesse capítulo. Em algumas curvas analíticas foram consideradas duas faixas de detecção para colesterol total: uma de 0 a 5,83 mg dL⁻¹ e outra de 0 a 3,9 mg dL⁻¹, quando houve uma melhora na linearidade ($R^2 > 0,95$) pela exclusão do último ponto da curva. Os materiais sem enzima também foram testados como biossensores colorimétricos como comparativo e os resultados estão apresentados na Tabela S3.

Tabela 14. Figuras de mérito das curvas analíticas para quantificação de colesterol total utilizando materiais de óxido de grafeno modificados com derivados de BTD com e sem lantânio e imobilizados com a enzima colesterol oxidase

Material	Equação da curva analítica	Linearidade (R ² ajustado)	Sensibilidade ^b	LOD ^c	LOQ ^c
Enzima Livre (ChOx)	y=0,0912x+0,0755	0,9989	0,0912	0,02	0,08
OG/ChOx	y=0,0240x+0,1419	0,9640	0,0240	0,04	0,13
OG-La/ChOx	y=0,0272x+0,1122	0,9492	0,0272	0,02	0,06
OG-La-BTDIm 2:1/ChOx	y=0,0539x+0,1079	0,9884	0,0539	0,04	0,14
OG-La-BTDIm1:1/ChOx	y=0,0649x+0,1023 y=0,0843x+0,0657 ^a	0,9340 0,9885 ^a	0,0649 0,0843 ^a	0,01	0,04
OG-BTDIm/ChOx	y=0,0618x+0,1180	0,9734	0,0618	0,01	0,04
OG-La-BTDAc 2:1/ChOx	y=0,0602x+0,0906 y=0,0786x+0,0561 ^a	0,9216 0,9609 ^a	0,0602 0,0786 ^a	0,02	0,06
OG-La-BTDAc 1:1/ChOx	y=0,0323x+0,1151 y=0,0463x+0,0887 ^a	0,8707 0,9868 ^a	0,0323 0,0463 ^a	0,05	0,18
OG-BTDAc/ChOx	y=0,0403x+0,1239	0,9828	0,0403	0,03	0,10

^aParâmetros para a faixa de 0 a 3,9 mg dL⁻¹ de colesterol total. ^bA sensibilidade se refere ao coeficiente angular da equação da curva analítica cuja unidade é a razão entre a absorbância (u.a.) e a concentração de colesterol (mg dL⁻¹). ^cLimite de detecção (LOD) e limite de quantificação (LOQ) foram calculados conforme equações 5 e 6 e estão expressos em mg dL⁻¹.

A equação da curva analítica é utilizada para calcular a concentração de um determinado analito em função da resposta obtida pelo biossensor, nesse caso a absorbância. Porém algumas características dos biossensores podem ser extraídas dessa equação, como a sensibilidade e a linearidade. A sensibilidade é definida como o coeficiente angular da curva analítica; portanto um biossensor será mais sensível quanto maior for a variação na resposta com o aumento da concentração de analito.¹⁷² Dos parâmetros obtidos da curva analítica, podemos dizer que a sensibilidade da enzima livre na quantificação do colesterol total foi a maior; o que era esperado devido à dois fatores principais que podem prejudicar a atividade da enzima imobilizada: difusão e

porcentagem de enzima imobilizada.^{21, 168} Como visto anteriormente, a porcentagem de imobilização para os materiais funcionalizados foram de 66% a 94%, portanto já são esperadas menores atividades pela quantidade de enzima imobilizada. Observando os valores de sensibilidade, podemos concluir que os materiais OG e OG-La não são adequados para utilização como biossensor colorimétrico, pois apresentam 50% da sensibilidade na ausência da enzima (Tabela S3) quando comparados com OG/ChOx e OG-La/ChOx (Tabela 14), cujos motivos já foram discutidos anteriormente. Apesar dos materiais OG-La-BTDAc e OG-BTDAc sem enzima, que também possuem carboxilas terminais, possuírem sensibilidade comparáveis aos materiais OG e OG-La (Tabela S3), a sensibilidade quando na presença de ChOx foi consideravelmente maior (Tabela 14). Em contraponto, a sensibilidade dos materiais OG-La-BTDIm e OG-BTDIm sem enzima (Tabela S3) foram muito baixas quando comparadas com os mesmos materiais com enzima (Tabela 14). Isso é um indício de que a indisponibilidade dos grupos oxigenados reativos superficiais (ocupados pela BTDIm diretamente ou coordenada ao cátion La^{3+}) pode ser determinante à medida que diminui a resposta referente ao material sem enzima, resultando em uma menor interferência do material na medida.

Considerando somente os valores de sensibilidade, podemos concluir que houve uma diferença significativa na resposta dos biossensores funcionalizados com diferentes BTDs e também pela quantidade de BTD utilizada. A sensibilidade foi maior para os materiais funcionalizados com BTDIm quando comparados com os análogos com BTDAc, provavelmente devido a maior porcentagem de imobilização e atividade recuperada (ver Tabela 13). Apesar do material OG-La-BTDIm 2:1/ChOx ter apresentado a maior porcentagem de imobilização (94%), dentre os materiais funcionalizados com BTDIm, este foi o que apresentou a menor sensibilidade, confirmando que a estrutura do material também interfere na atividade do biossensor. Esses resultados sugerem que o tamanho de cristalito obtido por espectroscopia Raman, ou seja, a maior característica de grafite do material OG-La-BTDIm 2:1 produziu biossensores menos sensíveis ao colesterol, provavelmente por deixar a enzima menos disponível. Os materiais OG-La-BTDIm 1:1/ChOx e OG-BTDIm/ChOx foram os que apresentaram a maior sensibilidade dentre todos os materiais produzidos nesse capítulo. Por outro lado, os materiais com BTDAc, apresentaram menor sensibilidade e uma faixa de detecção até $3,9 \text{ mg dL}^{-1}$ de colesterol total com linearidade aceitável ($R^2 > 0,95$). Embora o método colorimétrico seja um método de baixo custo, simples e prático, onde a mudança de coloração pode ser avaliada a olho nu, a faixa de detecção foi adequada tanto para a quantificação de

colesterol total em plasma como em saliva, cuja concentração varia de 0,5 a 12,2 mg dL⁻¹.^{12, 13} Todos os materiais desenvolvidos nesse capítulo se mostraram adequados para determinação não invasiva de colesterol total em amostras de saliva, que fica na média de 2,3 mg dL⁻¹ para um indivíduo saudável (considerando um fator de diluição de 0,5 devido ao reagente de cor).¹²

Os limites de quantificação e detecção foram calculados considerando o desvio dos valores de absorbância das amostras do branco (sem colesterol), conforme as equações 5 e 6. O LOD é a figura de mérito que descreve a habilidade do biossensor de discriminar um sinal detectável do ruído enquanto o LOQ é a menor concentração de analito capaz de gerar um sinal quantificável com grau de certeza aceitável para um determinado método analítico.¹⁷² Observa-se que ambos LOD e LOQ são menores para os materiais com enzima imobilizada quando comparados aos análogos sem enzima, reafirmando a importância da enzima na reação catalítica. O material OG-La-BTDAc 1:1/ChOx foi o que apresentou menores LOD e LOQ, com valores similares aos da enzima livre. No geral, todos materiais funcionalizados foram capazes de medir quantidades de colesterol menores que a menor concentração de colesterol analisada na curva analítica, mantendo a faixa de detecção.

Outros fatores que podem prejudicar a catálise enzimática pós imobilização são a conformação e orientação que a enzima se encontra no suporte.^{168, 170} Para compreender a catálise e inferir sobre esses fatores, é necessário compreender a cinética enzimática. Na Figura S41 se encontram os gráficos de Lineweaver-Burk da enzima livre e de todos os materiais com enzima imobilizada, obtidos a partir da equação 7. A atividade do material com enzima e sem colesterol foi subtraída de todos os pontos a fim de excluir a absorção atribuída ao material. A regressão linear da curva de Lineweaver-Burk, bem como as constantes K_m e v_{max} extraídas da equação linear estão apresentadas na Tabela 15.

Tabela 15. Regressão linear e constantes extraídas dos gráficos de Lineweaver-Burk para os materiais de óxido de grafeno funcionalizados com derivados de BTD com enzima colesterol oxidase

Material com ChOx	Regressão Linear da curva de Lineweaver-Burk	K_m	v_{max}	K_m/v_{max}
Enzima livre	$y = 5 \cdot 10^{-5}x + 0,0001$	0,50	$10 \cdot 10^3$	$5 \cdot 10^{-5}$
OG/ChOx	$y = 3 \cdot 10^{-5}x + 0,0007$	0,04	$1,4 \cdot 10^3$	$3 \cdot 10^{-5}$
OG-La/ChOx	$y = 5 \cdot 10^{-5}x + 0,0007$	0,07	$1,4 \cdot 10^3$	$5 \cdot 10^{-5}$
OG-La-BTDIm 2:1/ChOx	$y = 6 \cdot 10^{-5}x + 0,0003$	0,20	$3,3 \cdot 10^3$	$6 \cdot 10^{-5}$
OG-La-BTDIm 1:1/ChOx	$y = 6 \cdot 10^{-5}x + 0,0002$	0,30	$5,0 \cdot 10^3$	$6 \cdot 10^{-5}$
OG-BTDIm 2:1/ChOx	$y = 5 \cdot 10^{-5}x + 0,0002$	0,25	$5,0 \cdot 10^3$	$5 \cdot 10^{-5}$
OG-La-BTDAc 2:1/ChOx	$y = 5 \cdot 10^{-5}x + 0,0004$	0,15	$2,5 \cdot 10^3$	$6 \cdot 10^{-5}$
OG-La-BTDAc 1:1/ChOx	$y = 5 \cdot 10^{-5}x + 0,0005$	0,10	$2,0 \cdot 10^3$	$5 \cdot 10^{-5}$
OG-BTDAc 2:1/ChOx	$y = 5 \cdot 10^{-5}x + 0,0004$	0,13	$2,5 \cdot 10^3$	$5 \cdot 10^{-5}$

A velocidade máxima é a velocidade limitante da reação e se relaciona diretamente com a etapa de formação e liberação do produto e restauração da enzima. Em relação à velocidade máxima, a enzima livre apresentou o maior valor; o que era esperado à medida que a enzima se apresenta na solução (sistema homogêneo) e facilita a liberação do produto, aumentando a eficiência catalítica. Quando a enzima está imobilizada (sistema heterogêneo), no entanto, tanto a alteração conformacional quanto a difusão de substrato e produto é dificultada pela presença do suporte no entorno, diminuindo a velocidade máxima.¹⁶⁸

A constante de Michaelis-Menten expressa a habilidade de uma enzima de se ligar ao substrato para catalisar a reação (afinidade ao substrato) e é dada pela razão entre as constantes de dissipação e de formação do complexo enzima-substrato. Portanto, um valor elevado de K_m significa menor afinidade entre enzima e substrato, enquanto um menor valor de K_m significa o favorecimento da formação do complexo enzima-substrato (maior afinidade). Observando os dados da Tabela 15, temos valores de K_m menores nos sistemas com enzima imobilizada, confirmando que as enzimas foram imobilizadas em configurações favoráveis, exigindo menos substrato para atingir a $v_{máx}$ e, portanto, a enzima é mais eficiente nesses sistemas em relação à enzima livre. Em alguns casos, as

enzimas perdem sua atividade ou sofrem distorção na estrutura após a imobilização devido às propriedades físico-químicas da enzima, natureza do suporte e/ou suas interações mútuas.²¹ O resultado obtido nesse estudo é muito satisfatório, sugerindo que a enzima deve estar interagindo diretamente com o suporte e/ou através do ligante, evitando a ligação multipontual que pode levar ao enrijecimento da enzima ou bloqueio do sítio ativo.¹⁷⁰ Novamente confirma-se a importância dos derivados de BTD na funcionalização do óxido de grafeno, adequando a superfície do nanomaterial e melhorando a interação com a biomolécula estudada.

Em seguida, foram realizados testes com os principais interferentes encontrados no plasma sanguíneo e isopropanol, utilizado na solubilização do colesterol. Os resultados são mostrados na Figura 34.

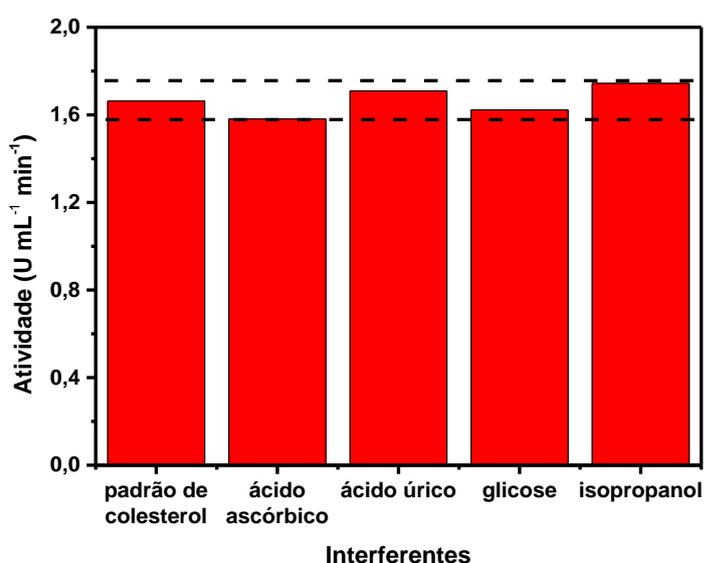


Figura 34. Estudo de interferentes na detecção simultânea com colesterol total por OG-La-BTDIm 1:1/ChOx. A linha pontilhada corresponde a 5% de erro em relação à atividade obtida para 1,98 mg dL⁻¹ de colesterol total.

Visto que as enzimas são altamente específicas em condições ambientes e que a inibição é reduzida com a imobilização por efeitos estéricos e difusionais, não se espera diferença significativa entre a atividade para o colesterol e para os interferentes testados.^{14, 21, 170} A menor atividade foi obtida na presença de ácido ascórbico com o biossensor OG-La-BTDIm 1:1/ChOx, que consome o H₂O₂ gerado; porém essa diferença foi menor de 5% em relação à atividade na presença do padrão de colesterol total. Como não se observou atividade muito diferente em relação ao padrão para os principais

interferentes quando aplicado o material OG-La-BTDIm 1:1/ChOx (< 5%), confirma-se a especificidade dessa enzima para oxidação do colesterol.

Por fim, as atividades dos biossensores foram medidas considerando 0 a 10 semanas de armazenamento dos materiais à 4 °C (Figura 35).

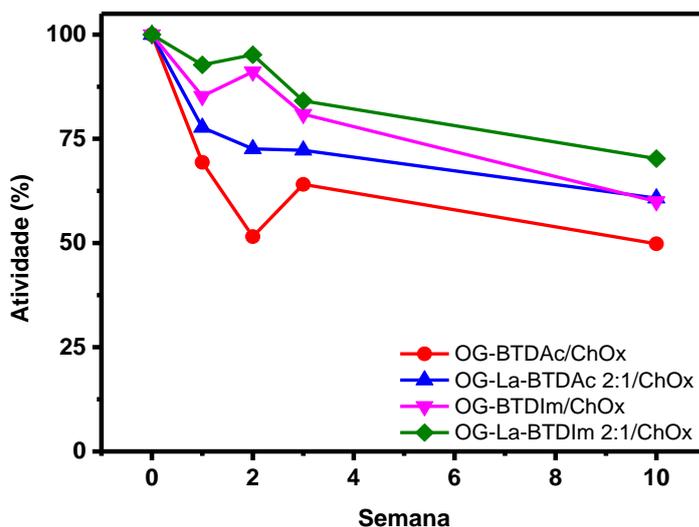


Figura 35. Porcentagem de atividade dos biossensores em relação ao tempo de armazenamento.

Como apresentado na Figura 35, mesmo após 10 semanas acondicionados à 4 °C, os biossensores mantiveram mais de 50% da atividade na determinação colorimétrica de colesterol, demonstrando a viabilidade de comercialização desses materiais já com a enzima imobilizada. Os materiais funcionalizados com BTDIm perderam menos atividade em relação aos análogos funcionalizados com BTDAc, corroborando com os valores obtidos de sensibilidade. Nesse sentido, os materiais produzidos nesse capítulo são capazes de serem produzidos, armazenados e utilizados na quantificação específica de colesterol total.

A partir dos resultados de caracterização e aplicação dos materiais de OG funcionalizados com derivados de BTD, nesse capítulo foram sintetizados novos materiais com potencial aplicação como biossensor colorimétrico para colesterol. Nesse estudo, a enzima colesterol oxidase foi utilizada como elemento de biorreconhecimento, resultando em alta atividade, seletividade e especificidade, característicos dos sistemas enzimáticos.¹⁷⁰ O diferencial da BTD em relação à outras moléculas comumente

utilizadas para funcionalização do grafeno, é a estrutura quase planar, que pode facilitar a imobilização de enzimas afastada da folha de óxido de grafeno, diminuindo os efeitos difusionais. Além disso, nesse trabalho não foram utilizados metais nobres ou nanopartículas metálicas, o que é utilizado em muitos trabalhos da literatura e acabam por aumentar o custo da análise além de gerarem complicações relacionadas a agregação e/ou biocompatibilidade das NPs.⁴² Embora a presença de lantânio no material não seja fundamental para gerar uma boa atividade do biossensor, a coordenação dos derivados de BTM através desse íon metálico pode evitar o lixiviamento. Os parâmetros avaliados nesse estudo (sensibilidade, LOD, LOQ, atividade recuperada, porcentagem de imobilização, linearidade) para os materiais OG-La-BTIm 1:1 e OG-BTIm foram equiparáveis. Dentre as vantagens dos biossensores produzidos nesse capítulo, pode-se destacar o método colorimétrico de quantificação que pode ser conduzido por qualquer operador e a determinação pode ser realizada, inclusive, a olho nu. Adicionalmente, as propriedades dos derivados de BTM também permitem a utilização desses materiais como sensores eletroquímicos ou fluorescente. A estrutura π -conjugada da BTM facilita a transferência eletrônica para o grafeno enquanto os grupos terminais amina ou ácido carboxílico permitem uma interação por ligação de hidrogênio ou covalente com as enzimas.²⁰ Como visto pelos estudos fotofísicos, a BTM associada ao grafeno apresenta intensa fluorescência e essa característica pode ser explorada para a detecção de diversas outras moléculas, como descrito na literatura.^{101, 102, 160}

10 Conclusões parciais

No capítulo II desse estudo, foram produzidos materiais inéditos de óxido de grafeno funcionalizados com derivados de BTM, com ou sem o cátion lantânio, para aplicação como biossensor colorimétrico de colesterol total. Os materiais e os ligantes foram caracterizados por TGA, XPS, análise elementar, espectroscopia no FTIR-ATR e Raman e estudos fotofísicos.

Observou-se por espectroscopia no FTIR-ATR e XPS que o óxido de grafeno apresenta grupos oxigenados de superfície, como carbonila, carboxila, hidroxila e epóxido. Por TGA, a redução dos grupos oxigenados ocorre em duas regiões, abaixo de 400 °C para os grupos mais lábeis e acima de 600 °C para os grupos mais estáveis.

A funcionalização com BTMIm e BTMAd foi confirmada por espectroscopia no FTIR-ATR, espectroscopia Raman, XPS, análise térmica e análise elementar. A espectroscopia de absorção na região do UV-vis e espectroscopia de emissão e excitação de fluorescência também confirmaram a presença de BTM e indicaram que os materiais produzidos nesse estudo podem ser utilizados como sensores fluorescentes.

A inserção do lantânio provocou um deslocamento batocrômico em 1620 cm^{-1} relativo ao estiramento C=C, sugerindo que o lantânio esteja se coordenando a esses grupos presentes no suporte. Outra possibilidade é a coordenação do La^{3+} às carboxilas, tanto do óxido de grafeno como da BTMAd, indicada pela estabilização de grupos oxigenados, diminuindo a perda de massa acima de 600 °C, de acordo com a análise termogravimétrica. Por fim, a análise de XPS indica que o lantânio pode se coordenar às carboxilas do óxido de grafeno, à carboxila terminal da BTMAd, ao nitrogênio da BTMIm e/ou ao anel imidazol(ólio) de ambos derivados de BTM. Pela análise elementar e espectroscopia Raman, observa-se que o aumento na quantidade de BTMIm produziu materiais com maior característica de grafeno, demonstrando que o aumento do ligante favoreceu a coordenação somente por um grupo imidazol, enquanto para a BTMAd não houve diferença.

A enzima colesterol oxidase foi imobilizada sobre os materiais e estes foram utilizados como biossensores colorimétricos para colesterol total. Foram otimizados os tempos de reação e imobilização e a quantidade de enzima imobilizada no material OG-La-BTMIm 2:1. Considerando os valores de sensibilidade, podemos concluir que a ordem crescente de atividade dos materiais funcionalizados é: OG-La-BTMAd 1:1/ChOx < OG-BTMAd/ChOx < OG-La-BTMIm 2:1/ChOx < OG-La-BTMAd 2:1/ChOx < OG-

BTDIm/ChOx < OG-La-BTDIm1:1/ChOx. Os melhores materiais foram OG-La-BTDIm 1:1 e OG-BTDIm com sensibilidade de 0,0649 e 0,0618 u.a. dL mg⁻¹, respectivamente. Estes materiais apresentaram porcentagem de imobilização superior a 90%, atividade recuperada de aproximadamente 70% e LOQ de 0,04 mg dL⁻¹ de colesterol.

Foram extraídas as constantes K_m e v_{max} do gráfico de Lineweaver-Burke e se observou que, apesar da velocidade máxima ser maior para a enzima livre, a constante de Michaelis-Menten foi menor para os materiais funcionalizados com BTD. Isso demonstra que a enzima colesterol oxidase foi imobilizada de forma eficiente, sem bloqueio do sítio ativo ou enrijecimento da estrutura.

Os materiais foram testados na presença dos interferentes glicose, ácido ascórbico, ácido úrico e isopropanol, mas não houve desvio na absorbância considerável para esses interferentes, demonstrando a especificidade da enzima.

Por fim, foi realizado estudo de armazenamento do biossensor e houve perda de 25-50% da atividade dependendo do material após 10 semanas estocado à 4 °C, demonstrando a viabilidade de produção e comercialização dos biossensores produzidos nesse estudo.

11 Conclusões

Considerando que a maior limitação dos testes laboratoriais de determinação de colesterol é o alto custo da enzima colesterol oxidase, os biossensores são alternativas superiores às outras técnicas de quantificação (cromatografias líquida e gasosa) pelos protocolos simples, possibilidade de reutilização, alta especificidade e baixo custo.

No primeiro capítulo, o óxido de grafeno foi funcionalizado com os líquidos iônicos derivados do cátion imidazólio seguido da deposição de nanopartículas de ouro pela técnica de sputtering. Enquanto o LI 1, com uma terminação amina ligada covalentemente ao óxido de grafeno, apresentou estrutura tipo grafeno, as duas aminas terminais do LI 2 se ligaram às folhas de óxido de grafeno formando uma estrutura grafítica. Quando aplicados como biossensores colorimétricos para colesterol total, os materiais OG-LI 1/Au NPs/ChOx e OG-LI 2/Au NPs/ChOx apresentaram atividades recuperadas de 78% e 55% e sensibilidades de 0,1274 e 0,0969 u.a. dL mg⁻¹, respectivamente. Observou-se um efeito sinérgico entre o óxido de grafeno funcionalizado com os líquidos iônicos e as nanopartículas de ouro resultando em mais de 90% de imobilização da enzima colesterol oxidase.

No capítulo II, o óxido de grafeno foi funcionalizado com derivados de 2,1,3-benzotiadiazolas com ou sem lantânio. Os materiais foram caracterizados por espectroscopia no FTIR-ATR e Raman, TGA, XPS e estudos fotofísicos, onde se evidenciou interações entre OG, La³⁺ (quando utilizado) e o ligante BTD. O aumento na quantidade de BTD somente causou efeito no material para a BTDIm, sugerindo que em baixas quantidades possa estar se coordenando pelos dois anéis imidazol e, aumentando a quantidade, somente por um deles. Os materiais OG-La-BTDIm 1:1 e OG-BTDIm apresentaram maior eficiência quando aplicados na quantificação de colesterol total dentre os materiais produzidos no capítulo II, com sensibilidade de 0,0649 e 0,0618 u.a. dL mg⁻¹, respectivamente. Estes materiais apresentaram porcentagem de imobilização, atividade recuperada, resistência ao armazenamento e faixa de quantificação melhores que os materiais análogos com BTDAc.

Em ambos os capítulos os materiais de óxido de grafeno funcionalizados foram aplicados como biossensores colorimétricos para colesterol total e observou-se que os materiais não-funcionalizados não foram capazes de distinguir as diferentes concentrações do analito. Portanto, a funcionalização do óxido de grafeno é essencial para a quantificação do colesterol à medida que a ocupação dos grupos oxigenados de

superfície evita falso positivo. Além disso, os diferentes ligantes afetam de forma singular a estrutura dos nanomateriais funcionalizados, influenciando na imobilização de enzimas e, conseqüentemente, na atividade do biossensor.

Além disso, os materiais desenvolvidos nesse estudo podem ser utilizados para a determinação de colesterol não invasiva por meio de uma metodologia simples e prática, utilizando a saliva como biofluido.

12 Referências bibliográficas

1. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/the-top-10-causes-of-death>. (08/03/2020),
2. Schmidt, M. I.; Duncan, B. B.; Silva, G. A.; Menezes, A. M.; Monteiro, C. A.; Barreto, S. M., Doenças crônicas não transmissíveis no Brasil: Carga e desafios atuais. *Lancet* **2011**, 61-74.
3. Simão, A. F.; Précoma, D. B.; Andrade, J. P. d.; Correa Filho, H.; Saraiva, J. F. K.; Oliveira, G. M. M., I Diretriz de Prevenção Cardiovascular da Sociedade Brasileira de Cardiologia - Resumo Executivo. *Arquivos Brasileiros de Cardiologia* **2014**, *102*, 420-431.
4. Subczynski, W. K.; Pasenkiewicz-Gierula, M.; Widomska, J.; Mainali, L.; Raguz, M., High Cholesterol/Low Cholesterol: Effects in Biological Membranes: A Review. *Cell Biochem Biophys* **2017**, *75*, 369-385.
5. Gordon, M., Cholesterol. *Nutrition & Food Science* **1985**, *85*, 10-11.
6. Ding, S.-N.; Shan, D.; Zhang, T.; Dou, Y.-Z., Performance-enhanced cholesterol biosensor based on biocomposite system: Layered double hydroxides-chitosan. *Journal of Electroanalytical Chemistry* **2011**, *659*, 1-5.
7. Arya, S. K.; Datta, M.; Malhotra, B. D., Recent advances in cholesterol biosensor. *Biosensors & Bioelectronics* **2008**, *23*, 1083-1100.
8. Savel, J.; Lafitte, M.; Pucheu, Y.; Pradeau, V.; Tabarin, A.; Couffignal, T., Very low levels of HDL cholesterol and atherosclerosis, a variable relationship--a review of LCAT deficiency. *Vasc Health Risk Manag* **2012**, *8*, 357-361.
9. Li, L. H.; Dutkiewicz, E. P.; Huang, Y. C.; Zhou, H. B.; Hsu, C. C., Analytical methods for cholesterol quantification. *Journal of Food and Drug Analysis* **2019**, *27*, 375-386.
10. Mann, S.; Beedie, C.; Jimenez, A., Differential Effects of Aerobic Exercise, Resistance Training and Combined Exercise Modalities on Cholesterol and the Lipid Profile: Review, Synthesis and Recommendations. *Sports Medicine* **2014**, *44*, 211-221.
11. Devi, S.; Kanwar, S. S., Cholesterol Oxidase: Source, Properties and Applications. *Insights in Enzyme Research* **2017**, *01*, 1-5.
12. Eom, K. S.; Lee, Y. J.; Seo, H. W.; Kang, J. Y.; Shim, J. S.; Lee, S. H., Sensitive and non-invasive cholesterol determination in saliva via optimization of enzyme loading and platinum nano-cluster composition. *Analyst* **2020**, *145*, 908-916.
13. Lee, Y. J.; Eom, K. S.; Shin, K.-S.; Kang, J. Y.; Lee, S. H., Enzyme-loaded paper combined impedimetric sensor for the determination of the low-level of cholesterol in saliva. *Sensors and Actuators B: Chemical* **2018**, *271*, 73-81.
14. Wang, X.; Hu, L., Review—Enzymatic Strips for Detection of Serum Total Cholesterol with Point-of-Care Testing (POCT) Devices: Current Status and Future Prospect. *Journal of The Electrochemical Society* **2020**, *167*, 037535.
15. Schwertner, H. A.; Johnson, E. R.; Lane, T. E., Electron-capture gas chromatography as a sensitive method for measuring subnanogram amounts of cholesterol in saliva and urine. *Clinical Chemistry* **1990**, *36*, 519-521.
16. Allain, C. C.; Poon, L. S.; Chan, C. S. G.; Richmond, W.; Fu, P. C., Enzymatic Determination of Total Serum Cholesterol. *Clinical Chemistry* **1974**, *20*, 470-475.
17. Vrieling, A.; Ghisla, S., Cholesterol oxidase: biochemistry and structural features. *FEBS Journal* **2009**, *276*, 6826-6843.

18. Lovelock, K. R. J.; Villar-Garcia, I. J.; Maier, F.; Steinrück, H.-P.; Licence, P., Photoelectron Spectroscopy of Ionic Liquid-Based Interfaces. *Chemical Reviews* **2010**, *110*, 5158-5190.
19. Gahlaut, A.; Hooda, V.; Dhull, V.; Hooda, V., Recent approaches to ameliorate selectivity and sensitivity of enzyme based cholesterol biosensors: a review. *Artificial cells, nanomedicine, and biotechnology* **2018**, *46*, 472-481.
20. Prieto-Simon, B.; Campas, M.; Marty, J. L., Biomolecule Immobilization in Biosensor Development: Tailored Strategies Based on Affinity Interactions. *Protein and Peptide Letters* **2008**, *15*, 757-763.
21. Ghosh, S.; Ahmad, R.; Khare, S. K., Immobilization of Cholesterol Oxidase: An Overview. *The Open Biotechnology Journal* **2018**, *12*, 176-188.
22. Yue, Q. K.; Kass, I. J.; Sampson, N. S.; Vrielink, A., Crystal Structure Determination of Cholesterol Oxidase from *Streptomyces* and Structural Characterization of Key Active Site Mutants. *Biochemistry* **1999**, *38*, 4277-4286.
23. Eggins, B., Chemical Sensors and Biosensors. **2007**, 1-273.
24. Liu, Z.; Kim, A. K., Review of Recent Developments in Fire Detection Technologies. *Journal of Fire Protection Engineering* **2003**, *13*, 129-151.
25. Ukil, A.; Braendle, H.; Krippner, P., Distributed Temperature Sensing: Review of Technology and Applications. *IEEE Sensors Journal* **2012**, *12*, 885-892.
26. Verma, N.; Bhardwaj, A., Biosensor technology for pesticides--a review. *Applied biochemistry and Biotechnology* **2015**, *175*, 3093-119.
27. Timmer, B.; Olthuis, W.; Berg, A. v. d., Ammonia sensors and their applications—a review. *Sensors and Actuators B: Chemical* **2005**, *107*, 666-677.
28. Dey, A., Semiconductor metal oxide gas sensors: A review. *Materials Science and Engineering: B* **2018**, *229*, 206-217.
29. Korostynska, O.; Arshak, K.; Gill, E.; Arshak, A., Review on State-of-the-art in Polymer Based pH Sensors. *Sensors* **2007**, *7*, 3027-3042.
30. Ruiz-Garcia, L.; Lunadei, L.; Barreiro, P.; Robla, J. I., A Review of Wireless Sensor Technologies and Applications in Agriculture and Food Industry: State of the Art and Current Trends. *Sensors* **2009**, *9*, 4728-4750.
31. Forzani, E. S.; Lu, D.; Leright, M. J.; Aguilar, A. D.; Tsow, F.; Iglesias, R. A.; Zhang, Q.; Lu, J.; Li, J.; Tao, N., A Hybrid Electrochemical–Colorimetric Sensing Platform for Detection of Explosives. *Journal of the American Chemical Society* **2009**, *131*, 1390-1391.
32. Chen, A.; Chatterjee, S., Nanomaterials based electrochemical sensors for biomedical applications. *Chemical Society Reviews* **2013**, *42*, 5425-5438.
33. Oliver, N. S.; Toumazou, C.; Cass, A. E. G.; Johnston, D. G., Glucose sensors: a review of current and emerging technology. *Diabetic Medicine : a Journal of the British Diabetic Association* **2009**, *26*, 197-210.
34. Yusoff, N.; Pandikumar, A.; Ramaraj, R.; Lim, H. N.; Huang, N. M., Gold nanoparticle based optical and electrochemical sensing of dopamine. *Microchimica Acta* **2015**, *182*, 2091-2114.
35. Liao, H.; Nehl, C. L.; Hafner, J. H., Biomedical applications of plasmon resonant metal nanoparticles. *Nanomedicine* **2006**, *1*, 201-208.
36. Leiner, M. J. P., Luminescence chemical sensors for biomedical applications: scope and limitations. *Analytica chimica acta* **1991**, *255*, 209-222.
37. Nikolaus, N.; Strehlitz, B., Amperometric lactate biosensors and their application in (sports) medicine, for life quality and wellbeing. *Microchimica Acta* **2008**, *160*, 15-55.

38. Rathee, K.; Dhull, V.; Dhull, R.; Singh, S., Biosensors based on electrochemical lactate detection: A comprehensive review. *Biochemistry and Biophysics Reports* **2016**, *5*, 35-54.
39. Suvarnaphaet, P.; Pechprasarn, S., Graphene-Based Materials for Biosensors: A Review. *Sensors* **2017**, *17*, 2161.
40. Su, S.; Wu, W.; Gao, J.; Lu, J.; Fan, C., Nanomaterials-based sensors for applications in environmental monitoring. *Journal of Materials Chemistry* **2012**, *22*, 18101-18110.
41. Saxena, U.; Das, A. B., Nanomaterials towards fabrication of cholesterol biosensors: Key roles and design approaches. *Biosensors & Bioelectronics* **2016**, *75*, 196-205.
42. Zhang, X.; Wei, M.; Lv, B.; Liu, Y.; Liu, X.; Wei, W., Sensitive colorimetric detection of glucose and cholesterol by using Au@Ag core-shell nanoparticles. *RSC Advances* **2016**, *6*, 35001-35007.
43. Bai, J.; Zhou, B., Titanium dioxide nanomaterials for sensor applications. *Chemical Reviews* **2014**, *114*, 10131-10176.
44. Maduraiveeran, G.; Sasidharan, M.; Ganesan, V., Electrochemical sensor and biosensor platforms based on advanced nanomaterials for biological and biomedical applications. *Biosensors & bioelectronics* **2018**, *103*, 113-129.
45. Dhawane, M.; Deshpande, A.; Jain, R.; Dandekar, P., Colorimetric point-of-care detection of cholesterol using chitosan nanofibers. *Sensors and Actuators B: Chemical* **2019**, *281*, 72-79.
46. Xi, M.; Wang, X.; Zhao, Y.; Zhu, Z.; Fong, H., Electrospun ZnO/SiO₂ hybrid nanofibrous mat for flexible ultraviolet sensor. *Applied Physics Letters* **2014**, *104*, 133102-133104.
47. Sun, Z.; Kim, J. H.; Zhao, Y.; Bijarbooneh, F.; Malgras, V.; Lee, Y.; Kang, Y.-M.; Dou, S. X., Rational Design of 3D Dendritic TiO₂ Nanostructures with Favorable Architectures. *Journal of the American Chemical Society* **2011**, *133*, 19314-19317.
48. Li, Y.; Zhong, Y.; Zhang, Y.; Weng, W.; Li, S., Carbon quantum dots/octahedral Cu₂O nanocomposites for non-enzymatic glucose and hydrogen peroxide amperometric sensor. *Sensors and Actuators B: Chemical* **2015**, *206*, 735-743.
49. Dupont, J.; Scholten, J. D., On the structural and surface properties of transition-metal nanoparticles in ionic liquids. *Chemical Society Reviews* **2010**, *39*, 1780-1804.
50. Monti, S.; Carravetta, V.; Ågren, H., Decoration of gold nanoparticles with cysteine in solution: reactive molecular dynamics simulations. *Nanoscale* **2016**, *8*, 12929-12938.
51. Saxena, U.; Chakraborty, M.; Goswami, P., Covalent immobilization of cholesterol oxidase on self-assembled gold nanoparticles for highly sensitive amperometric detection of cholesterol in real samples. *Biosensors & Bioelectronics* **2011**, *26*, 3037-3043.
52. Wojnarowska-Nowak, R.; Polit, J.; Sheregii, E. M., Interaction of gold nanoparticles with cholesterol oxidase enzyme in bionanocomplex—determination of the protein structure by Fourier transform infrared spectroscopy. *Journal of Nanoparticle Research* **2020**, *22*, 107.
53. Zhu, L.; Xu, L.; Tan, L.; Tan, H.; Yang, S.; Yao, S., Direct electrochemistry of cholesterol oxidase immobilized on gold nanoparticles-decorated multiwalled carbon nanotubes and cholesterol sensing. *Talanta* **2013**, *106*, 192-199.
54. Camilli, L.; Passacantando, M., Advances on Sensors Based on Carbon Nanotubes. *Chemosensors* **2018**, *6*, 62.

55. Pilehvar, S.; De Wael, K., Recent Advances in Electrochemical Biosensors Based on Fullerene-C60 Nano-Structured Platforms. *Biosensors* **2015**, *5*, 712-735.
56. Karousis, N.; Suarez-Martinez, I.; Ewels, C. P.; Tagmatarchis, N., Structure, Properties, Functionalization, and Applications of Carbon Nanohorns. *Chemical Reviews* **2016**, *116*, 4850-4883.
57. Plonska-Brzezinska, M. E., Carbon Nano-Onions: A Review of Recent Progress in Synthesis and Applications. *ChemNanoMat* **2019**, *5*, 568-580.
58. Sun, X.; Lei, Y., Fluorescent carbon dots and their sensing applications. *Trends in Analytical Chemistry* **2017**, *89*, 163-180.
59. Molaei, M. J., A review on nanostructured carbon quantum dots and their applications in biotechnology, sensors, and chemiluminescence. *Talanta* **2019**, *196*, 456-478.
60. Toda, K.; Furue, R.; Hayami, S., Recent progress in applications of graphene oxide for gas sensing: A review. *Analytica Chimica Acta* **2015**, *878*, 43-53.
61. Chatterjee, S. G.; Chatterjee, S.; Ray, A. K.; Chakraborty, A. K., Graphene-metal oxide nanohybrids for toxic gas sensor: A review. *Sensors and Actuators B: Chemical* **2015**, *221*, 1170-1181.
62. Lu, C. H.; Yang, H. H.; Zhu, C. L.; Chen, X.; Chen, G. N., A graphene platform for sensing biomolecules. *Angewandte Chemie* **2009**, *48*, 4785-4787.
63. Shao, Y.; Wang, J.; Wu, H.; Liu, J.; Aksay, I. A.; Lin, Y., Graphene Based Electrochemical Sensors and Biosensors: A Review. *Electroanalysis* **2010**, *22*, 1027-1036.
64. Nag, A.; Mitra, A.; Mukhopadhyay, S. C., Graphene and its sensor-based applications: A review. *Sensors and Actuators A: Physical* **2018**, *270*, 177-194.
65. Abo-Hamad, A.; AlSaadi, M. A.; Hayyan, M.; Juneidi, I.; Hashim, M. A., Ionic Liquid-Carbon Nanomaterial Hybrids for Electrochemical Sensor Applications: a Review. *Electrochimica Acta* **2016**, *193*, 321-343.
66. Choi, W.; Lahiri, I.; Seelaboyina, R.; Kang, Y. S., Synthesis of Graphene and Its Applications: A Review. *Critical Reviews in Solid State and Materials Sciences* **2010**, *35*, 52-71.
67. Meng, Z.; Stolz, R. M.; Mendecki, L.; Mirica, K. A., Electrically-Transduced Chemical Sensors Based on Two-Dimensional Nanomaterials. *Chemical Reviews* **2019**, *119*, 478-598.
68. Brownson, D. A. C.; Kampouris, D. K.; Banks, C. E., Graphene electrochemistry: fundamental concepts through to prominent applications. *Chemical Society Reviews* **2012**, *41*, 6944-6976.
69. Hummers, W. S.; Offeman, R. E., Preparation of Graphitic Oxide. *Journal of the American Chemical Society* **1958**, *80*, 1339-1339.
70. Yu, H.; Zhang, B.; Bulin, C.; Li, R.; Xing, R., High-efficient Synthesis of Graphene Oxide Based on Improved Hummers Method. *Scientific Reports* **2016**, *6*, 36143.
71. Zaaba, N. I.; Foo, K. L.; Hashim, U.; Tan, S. J.; Liu, W.-W.; Voon, C. H., Synthesis of Graphene Oxide using Modified Hummers Method: Solvent Influence. *Procedia Engineering* **2017**, *184*, 469-477.
72. Romero, A.; Lavin-Lopez, M. P.; Sanchez-Silva, L.; Valverde, J. L.; Paton-Carrero, A., Comparative study of different scalable routes to synthesize graphene oxide and reduced graphene oxide. *Materials Chemistry and Physics* **2018**, *203*, 284-292.
73. Ashori, A., Effects of graphene on the behavior of chitosan and starch nanocomposite films. *Polymer Engineering & Science* **2014**, *54*, 2258-2263.

74. Wang, C.; Xu, P.; Zhuo, K., Ionic Liquid Functionalized Graphene-Based Electrochemical Biosensor for Simultaneous Determination of Dopamine and Uric Acid in the Presence of Ascorbic Acid. *Electroanalysis* **2014**, *26*, 191-198.
75. Yavir, K.; Marcinkowski, L.; Marcinkowska, R.; Namiesnik, J.; Kloskowski, A., Analytical applications and physicochemical properties of ionic liquid-based hybrid materials: A review. *Analytica Chimica Acta* **2019**, *1054*, 1-16.
76. Morais, E. M.; Grillo, I. B.; Stassen, H. K.; Seferin, M.; Scholten, J. D., The effect of an electron-withdrawing group in the imidazolium cation: the case of nitro-functionalized imidazolium salts as acidic catalysts for the acetylation of glycerol. *New Journal of Chemistry* **2018**, *42*, 10774-10783.
77. Scholten, J. D.; Leal, B. C.; Dupont, J., Transition Metal Nanoparticle Catalysis in Ionic Liquids. *ACS Catalysis* **2012**, *2*, 184-200.
78. Tunckol, M.; Durand, J.; Serp, P., Carbon nanomaterial–ionic liquid hybrids. *Carbon* **2012**, *50*, 4303-4334.
79. Verma, C.; Ebenso, E. E., Ionic liquid-mediated functionalization of graphene-based materials for versatile applications: a review. *Graphene Technology* **2019**, *4*, 1-15.
80. Jon, C.-S.; Meng, L.-Y.; Li, D., Recent review on carbon nanomaterials functionalized with ionic liquids in sample pretreatment application. *Trends in Analytical Chemistry* **2019**, *120*, 115641.
81. Karousis, N.; Economopoulos, S. P.; Sarantopoulou, E.; Tagmatarchis, N., Porphyrin counter anion in imidazolium-modified graphene-oxide. *Carbon* **2010**, *48*, 854-860.
82. Bhunia, P.; Hwang, E.; Min, M.; Lee, J.; Seo, S.; Some, S.; Lee, H., A non-volatile memory device consisting of graphene oxide covalently functionalized with ionic liquid. *Chemical Communications* **2012**, *48*, 913-915.
83. Gevaerd, A.; Blaskiewicz, S. F.; Zarbin, A. J. G.; Orth, E. S.; Bergamini, M. F.; Marcolino-Junior, L. H., Nonenzymatic electrochemical sensor based on imidazole-functionalized graphene oxide for progesterone detection. *Biosensors & Bioelectronics* **2018**, *112*, 108-113.
84. He, Z.; Alexandridis, P., Ionic liquid and nanoparticle hybrid systems: Emerging applications. *Advances in Colloid and Interface Science* **2017**, *244*, 54-70.
85. Shang, L.; Zhao, F.; Zeng, B., Highly dispersive hollow PdAg alloy nanoparticles modified ionic liquid functionalized graphene nanoribbons for electrochemical sensing of nifedipine. *Electrochimica Acta* **2015**, *168*, 330-336.
86. Yang, H.; Zhou, W.; Yu, B.; Wang, Y.; Cong, C.; Yu, T., Uniform Decoration of Reduced Graphene Oxide Sheets with Gold Nanoparticles. *Journal of Nanotechnology* **2012**, *2012*, 328565.
87. Li, J.; Wang, Y.; Sun, Y.; Ding, C.; Lin, Y.; Sun, W.; Luo, C., A novel ionic liquid functionalized graphene oxide supported gold nanoparticle composite film for sensitive electrochemical detection of dopamine. *RSC Advances* **2017**, *7*, 2315-2322.
88. Zheng, Y.; Liu, Z.; Jing, Y.; Li, J.; Zhan, H., An acetylcholinesterase biosensor based on ionic liquid functionalized graphene–gelatin-modified electrode for sensitive detection of pesticides. *Sensors and Actuators B: Chemical* **2015**, *210*, 389-397.
89. Luan, F.; Zhang, S.; Chen, D.; Wei, F.; Zhuang, X., Ni₃S₂/ionic liquid-functionalized graphene as an enhanced material for the nonenzymatic detection of glucose. *Microchemical Journal* **2018**, *143*, 450-456.
90. Gholivand, M. B.; Khodadadian, M., Amperometric cholesterol biosensor based on the direct electrochemistry of cholesterol oxidase and catalase on a graphene/ionic liquid-modified glassy carbon electrode. *Biosensors & Bioelectronics* **2014**, *53*, 472-478.

91. Wu, S.; Wang, Y.; Mao, H.; Wang, C.; Xia, L.; Zhang, Y.; Ge, H.; Song, X.-M., Direct electrochemistry of cholesterol oxidase and biosensing of cholesterol based on PSS/polymeric ionic liquid–graphene nanocomposite. *RSC Advances* **2016**, *6*, 59487-59496.
92. Liu, J.; Liu, Z.; Barrow, C. J.; Yang, W., Molecularly engineered graphene surfaces for sensing applications: A review. *Analytica Chimica Acta* **2015**, *859*, 1-19.
93. Liu, J.; Wang, R.; Cui, L.; Tang, J.; Liu, Z.; Kong, Q.; Yang, W.; Gooding, J., Using Molecular Level Modification To Tune the Conductivity of Graphene Papers. *The Journal of Physical Chemistry C* **2012**, *116*, 17939-17946.
94. Zhang, L.; Qin, L.; Kang, S.-Z.; Li, G.; Li, X., A novel three-dimensional pyridine-pillared graphene assembly for enhanced electron transfer and photocatalytic hydrogen evolution. *Catalysis Science & Technology* **2018**, *8*, 2818-2824.
95. Ge, R.; Li, X.; Kang, S.-Z.; Qin, L.; Li, G., Highly efficient graphene oxide/porphyrin photocatalysts for hydrogen evolution and the interfacial electron transfer. *Applied Catalysis B: Environmental* **2016**, *187*, 67-74.
96. Neto, B. A. D.; Lapis, A. A. M.; da Silva Júnior, E. N.; Dupont, J., 2,1,3-Benzothiadiazole and Derivatives: Synthesis, Properties, Reactions, and Applications in Light Technology of Small Molecules. *European Journal of Organic Chemistry* **2013**, *2013*, 228-255.
97. Neto, B. A. D.; Carvalho, P. H. P. R.; Correa, J. R., Benzothiadiazole Derivatives as Fluorescence Imaging Probes: Beyond Classical Scaffolds. *Accounts of Chemical Research* **2015**, *48*, 1560-1569.
98. Mota, A. A. R.; Correa, J. R.; Carvalho, P. H. P. R.; de Sousa, N. M. P.; de Oliveira, H. C. B.; Gatto, C. C.; da Silva Filho, D. A.; de Oliveira, A. L.; Neto, B. A. D., Synthesis, Structure, Properties, and Bioimaging of a Fluorescent Nitrogen-Linked Bisbenzothiadiazole. *The Journal of Organic Chemistry* **2016**, *81*, 2958-2965.
99. Carvalho, P. H. P. R.; Correa, J. R.; Paiva, K. L. R.; Baril, M.; Machado, D. F. S.; Scholten, J. D.; de Souza, P. E. N.; Veiga-Souza, F. H.; Spencer, J.; Neto, B. A. D., When the strategies for cellular selectivity fail. Challenges and surprises in the design and application of fluorescent benzothiadiazole derivatives for mitochondrial staining. *Organic Chemistry Frontiers* **2019**, *6*, 2371-2384.
100. Carvalho, P. H. P. R.; Correa, J. R.; Paiva, K. L. R.; Machado, D. F. S.; Scholten, J. D.; Neto, B. A. D., Plasma membrane imaging with a fluorescent benzothiadiazole derivative. *Beilstein journal of Organic Chemistry* **2019**, *15*, 2644-2654.
101. Moro, A. V.; Ferreira, P. C.; Migowski, P.; Rodembusch, F. S.; Dupont, J.; Lüdtke, D. S., Synthesis and photophysical properties of fluorescent 2,1,3-benzothiadiazole-triazole-linked glycoconjugates: selective chemosensors for Ni(II). *Tetrahedron* **2013**, *69*, 201-206.
102. Wu, J.; Lai, G.; Li, Z.; Lu, Y.; Leng, T.; Shen, Y.; Wang, C., Novel 2,1,3-benzothiadiazole derivatives used as selective fluorescent and colorimetric sensors for fluoride ion. *Dyes and Pigments* **2016**, *124*, 268-276.
103. Ju, Z.; Yan, W.; Gao, X.; Shi, Z.; Wang, T.; Zheng, H., Syntheses, Characterization, and Luminescence Properties of Four Metal–Organic Frameworks Based on a Linear-Shaped Rigid Pyridine Ligand. *Crystal Growth & Design* **2016**, *16*, 2496-2503.
104. Szychalska, K.; Zając, D.; Cabaj, J., Electrochemical biosensor for detection of 17 β -estradiol using semi-conducting polymer and horseradish peroxidase. *RSC Advances* **2020**, *10*, 9079-9087.
105. Wang, J.; Zhang, X.-B.; Wang, Z.-L.; Wang, L.-M.; Zhang, Y., Rhodium–nickel nanoparticles grown on graphene as highly efficient catalyst for complete decomposition

of hydrous hydrazine at room temperature for chemical hydrogen storage. *Energy & Environmental Science* **2012**, *5*, 6885-6888.

106. Zhang, Y.; Shen, Y.; Yuan, J.; Han, D.; Wang, Z.; Zhang, Q.; Niu, L., Design and synthesis of multifunctional materials based on an ionic-liquid backbone. *Angewandte Chemie* **2006**, *45*, 5867-5870.

107. Stewart, J. J. P., Optimization of parameters for semiempirical methods V: Modification of NDDO approximations and application to 70 elements. *Journal of Molecular Modeling* **2007**, *13*, 1173-1213.

108. Stewart, J. J. P. *MOPAC2016*, Colorado Springs: USA, 2016.

109. Li, C.; Zhao, J.; Tan, R.; Peng, Z.; Luo, R.; Peng, M.; Yin, D., Recyclable ionic liquid-bridged chiral dimeric salen Mn(III) complexes for oxidative kinetic resolution of racemic secondary alcohols. *Catalysis Communications* **2011**, *15*, 27-31.

110. Yang, H.; Shan, C.; Li, F.; Han, D.; Zhang, Q.; Niu, L., Covalent functionalization of polydisperse chemically-converted graphene sheets with amine-terminated ionic liquid. *Chemical Communications* **2009**, 3880-3882.

111. Wender, H.; de Oliveira, L. F.; Migowski, P.; Feil, A. F.; Lissner, E.; Prechtel, M. H. G.; Teixeira, S. R.; Dupont, J., Ionic Liquid Surface Composition Controls the Size of Gold Nanoparticles Prepared by Sputtering Deposition. *The Journal of Physical Chemistry C* **2010**, *114*, 11764-11768.

112. Singh, S.; Solanki, P. R.; Pandey, M. K.; Malhotra, B. D., Covalent immobilization of cholesterol esterase and cholesterol oxidase on polyaniline films for application to cholesterol biosensor. *Analytica Chimica Acta* **2006**, *568*, 126-132.

113. Zhang, J.; Zhang, F.; Yang, H.; Huang, X.; Liu, H.; Zhang, J.; Guo, S., Graphene oxide as a matrix for enzyme immobilization. *Langmuir* **2010**, *26*, 6083-6085.

114. Shahriary, L.; Athawale, A., Graphene oxide synthesized by using modified Hummers approach. *International Journal of Renewable Energy and Environmental Engineering* **2014**, *2*, 58-63.

115. Krishnamoorthy, K.; Veerapandian, M.; Yun, K.; Kim, S. J., The chemical and structural analysis of graphene oxide with different degrees of oxidation. *Carbon* **2013**, *53*, 38-49.

116. Paredes, J. I.; Villar-Rodil, S.; Martínez-Alonso, A.; Tascón, J. M. D., Graphene Oxide Dispersions in Organic Solvents. *Langmuir* **2008**, *24*, 10560-10564.

117. Rattana, T.; Chaiyakun, S.; Witit-anun, N.; Nuntawong, N.; Chindaudom, P.; Oaew, S.; Kedkeaw, C.; Limsuwan, P., Preparation and characterization of graphene oxide nanosheets. *Procedia Engineering* **2012**, *32*, 759-764.

118. Lin, Y.; Jin, J.; Song, M., Preparation and characterisation of covalent polymer functionalized graphene oxide. *J. Mater. Chem.* **2011**, *21*, 3455-3461.

119. Marcano, D. C.; Kosynkin, D. V.; Berlin, J. M.; Sinitskii, A.; Sun, Z.; Slesarev, A.; Alemany, L. B.; Lu, W.; Tour, J. M., Improved Synthesis of Graphene Oxide. *ACS Nano* **2010**, *4*, 4806-4814.

120. Vieira, M. O.; Monteiro, W. F.; Ligabue, R.; Seferin, M.; Chaban, V. V.; Andreeva, N. A.; do Nascimento, J. F.; Einloft, S., Ionic liquids composed of linear amphiphilic anions: Synthesis, physicochemical characterization, hydrophilicity and interaction with carbon dioxide. *Journal of Molecular Liquids* **2017**, *241*, 64-73.

121. Cancado, L. G.; Jorio, A.; Ferreira, E. H.; Stavale, F.; Achete, C. A.; Capaz, R. B.; Moutinho, M. V. O.; Lombardo, A.; Kulmala, T. S.; Ferrari, A. C., Quantifying defects in graphene via Raman spectroscopy at different excitation energies. *Nano Letters* **2011**, *11*, 3190-3196.

122. Eckmann, A.; Felten, A.; Mishchenko, A.; Britnell, L.; Krupke, R.; Novoselov, K. S.; Casiraghi, C., Probing the nature of defects in graphene by Raman spectroscopy. *Nano Letters* **2012**, *12*, 3925-3930.
123. Gupta, A.; Chen, G.; Joshi, P.; Tadigadapa, S.; Eklund, P. C., Raman scattering from high-frequency phonons in supported n-graphene layer films. *Nano Letters* **2006**, *6*, 2667-2673.
124. Dresselhaus, M. S.; Jorio, A.; Hofmann, M.; Dresselhaus, G.; Saito, R., Perspectives on carbon nanotubes and graphene Raman spectroscopy. *Nano Letters* **2010**, *10*, 751-758.
125. Tuinstra, F.; Koenig, J. L., Raman Spectrum of Graphite. *The Journal of Chemical Physics* **1970**, *53*, 1126-1130.
126. Dresselhaus, M. S.; Jorio, A.; Saito, R., Characterizing Graphene, Graphite, and Carbon Nanotubes by Raman Spectroscopy. *Annual Review of Condensed Matter Physics* **2010**, *1*, 89-108.
127. Niyogi, S.; Bekyarova, E.; Itkis, M. E.; Zhang, H.; Shepperd, K.; Hicks, J.; Sprinkle, M.; Berger, C.; Lau, C. N.; deHeer, W. A.; Conrad, E. H.; Haddon, R. C., Spectroscopy of covalently functionalized graphene. *Nano Letters* **2010**, *10*, 4061-4066.
128. Hermanova, S.; Zarevucka, M.; Bousa, D.; Pumera, M.; Sofer, Z., Graphene oxide immobilized enzymes show high thermal and solvent stability. *Nanoscale* **2015**, *7*, 5852-5858.
129. Cançado, L. G.; Takai, K.; Enoki, T.; Endo, M.; Kim, Y. A.; Mizusaki, H.; Jorio, A.; Coelho, L. N.; Magalhães-Paniago, R.; Pimenta, M. A., General equation for the determination of the crystallite size L_a of nanographite by Raman spectroscopy. *Applied Physics Letters* **2006**, *88*, 163106.
130. Stobinski, 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* **2014**, *195*, 145-154.
131. Woo, S.; Kim, Y.-R.; Chung, T. D.; Piao, Y.; Kim, H., Synthesis of a graphene-carbon nanotube composite and its electrochemical sensing of hydrogen peroxide. *Electrochimica Acta* **2012**, *59*, 509-514.
132. Siburian, R.; Sihotang, H.; Lumban Raja, S.; Supeno, M.; Simanjuntak, C., New Route to Synthesize of Graphene Nano Sheets. *Oriental Journal of Chemistry* **2018**, *34*, 182-187.
133. Aromal, S. A.; Babu, K. V. D.; Philip, D., Characterization and catalytic activity of gold nanoparticles synthesized using ayurvedic arishtams. *Spectrochimica acta. Part A, Molecular and Biomolecular Spectroscopy* **2012**, *96*, 1025-1030.
134. Yan, W.; Petkov, V.; Mahurin, S. M.; Overbury, S. H.; Dai, S., Powder XRD analysis and catalysis characterization of ultra-small gold nanoparticles deposited on titania-modified SBA-15. *Catalysis Communications* **2005**, *6*, 404-408.
135. Schneider, C. A.; Rasband, W. S.; Eliceiri, K. W., NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nature Methods* **2012**, *9*, 671-675.
136. Wender, H.; Migowski, P.; Feil, A. F.; Teixeira, S. R.; Dupont, J., Sputtering deposition of nanoparticles onto liquid substrates: Recent advances and future trends. *Coordination Chemistry Reviews* **2013**, *257*, 2468-2483.
137. Shamaila, S.; Sajjad, A. K. L.; Iqbal, A., Modifications in development of graphene oxide synthetic routes. *Chemical Engineering Journal* **2016**, *294*, 458-477.
138. Chua, C. K.; Sofer, Z.; Pumera, M., Functionalization of Hydrogenated Graphene: Transition-Metal-Catalyzed Cross-Coupling Reactions of Allylic C-H Bonds. *Angewandte Chemie* **2016**, *55*, 10751-10754.

139. Dreyer, D. R.; Park, S.; Bielawski, C. W.; Ruoff, R. S., The chemistry of graphene oxide. *Chemical Society Reviews* **2010**, *39*, 228-240.
140. Wang, Z.; Zhang, Q.; Kuehner, D.; Xu, X.; Ivaska, A.; Niu, L., The synthesis of ionic-liquid-functionalized multiwalled carbon nanotubes decorated with highly dispersed Au nanoparticles and their use in oxygen reduction by electrocatalysis. *Carbon* **2008**, *46*, 1687-1692.
141. Klyushin, A. Y.; Greiner, M. T.; Huang, X.; Lunkenbein, T.; Li, X.; Timpe, O.; Friedrich, M.; Hävecker, M.; Knop-Gericke, A.; Schlögl, R., Is Nanostructuring Sufficient To Get Catalytically Active Au? *ACS Catalysis* **2016**, *6*, 3372-3380.
142. Cai, X.; Gao, X.; Wang, L.; Wu, Q.; Lin, X., A layer-by-layer assembled and carbon nanotubes/gold nanoparticles-based bienzyme biosensor for cholesterol detection. *Sensors and Actuators B: Chemical* **2013**, *181*, 575-583.
143. Baby, T. T.; Aravind, S. S. J.; Arockiadoss, T.; Rakhi, R. B.; Ramaprabhu, S., Metal decorated graphene nanosheets as immobilization matrix for amperometric glucose biosensor. *Sensors and Actuators B: Chemical* **2010**, *145*, 71-77.
144. Lario, P. I.; Sampson, N.; Vrieling, A., Sub-atomic Resolution Crystal Structure of Cholesterol Oxidase: What Atomic Resolution Crystallography Reveals about Enzyme Mechanism and the Role of the FAD Cofactor in Redox Activity. *Journal of Molecular Biology* **2003**, *326*, 1635-1650.
145. Cheillan, F.; Lafont, H.; Termine, E.; Fernandez, F.; Sauve, P.; Lesgards, G., Molecular characteristics of the cholesterol oxidase and factors influencing its activity. *Biochimica et Biophysica Acta* **1989**, *999*, 233-238.
146. Garg, B.; Bisht, T.; Ling, Y. C., Graphene-Based Nanomaterials as Efficient Peroxidase Mimetic Catalysts for Biosensing Applications: An Overview. *Molecules* **2015**, *20*, 14155-14190.
147. Konios, D.; Stylianakis, M. M.; Stratakis, E.; Kymakis, E., Dispersion behaviour of graphene oxide and reduced graphene oxide. *Journal of Colloid and Interface Science* **2014**, *430*, 108-112.
148. Dong, M.; Nan, Z.; Liu, P.; Zhang, Y.; Xue, Z.; Lu, X.; Liu, X., Two-phase synthesis of hydrophobic ionic liquid-capped gold nanoparticles and their application for sensing cholesterol. *Electrochimica Acta* **2014**, *132*, 465-471.
149. Dey, R. S.; Raj, C. R., Development of an Amperometric Cholesterol Biosensor Based on Graphene-Pt Nanoparticle Hybrid Material. *The Journal of Physical Chemistry C* **2010**, *114*, 21427-21433.
150. Souza, V. S.; Corrêa, J. R.; Carvalho, P. H. P. R.; Zanutto, G. M.; Matiello, G. I.; Guido, B. C.; Gatto, C. C.; Ebeling, G.; Gonçalves, P. F. B.; Dupont, J.; Neto, B. A. D., Appending Ionic Liquids to Fluorescent Benzothiadiazole Derivatives: Light Up and Selective Lysosome Staining. *Sensors and Actuators B: Chemical* **2020**, *321*, 128530.
151. Nelson, D.; Cox, M., *Lehninger Principios de Bioquímica*. **2001**.
152. Bünzli, J.-C. G., Review: Lanthanide coordination chemistry: from old concepts to coordination polymers. *Journal of Coordination Chemistry* **2014**, *67*, 3706-3733.
153. Ossoonon, B. D.; Bélanger, D., Synthesis and characterization of sulfophenyl-functionalized reduced graphene oxide sheets. *RSC Advances* **2017**, *7*, 27224-27234.
154. OriginLab Corporation *OriginPro* 9.0.0 (64-bit): Northampton, MA, USA.
155. Feng, R.; Jiang, F.-L.; Wu, M.-Y.; Chen, L.; Yan, C.-F.; Hong, M.-C., Structures and Photoluminescent Properties of the Lanthanide Coordination Complexes with Hydroxyquinoline Carboxylate Ligands. *Crystal Growth & Design* **2010**, *10*, 2306-2313.
156. Baskoro, F.; Wong, C.-B.; Kumar, S. R.; Chang, C.-W.; Chen, C.-H.; Chen, D. W.; Lue, S. J., Graphene oxide-cation interaction: Inter-layer spacing and zeta potential

- changes in response to various salt solutions. *Journal of Membrane Science* **2018**, *554*, 253-263.
157. Liu, Z.-B.; Zhao, X.; Zhang, X.-L.; Yan, X.-Q.; Wu, Y.-P.; Chen, Y.-S.; Tian, J.-G., Ultrafast Dynamics and Nonlinear Optical Responses from sp²- and sp³-Hybridized Domains in Graphene Oxide. *The Journal of Physical Chemistry Letters* **2011**, *2*, 1972-1977.
158. Wang, X.; Wang, D.; Guo, Y.; Yang, C.; Iqbal, A.; Liu, W.; Qin, W.; Yan, D.; Guo, H., Imidazole derivative-functionalized carbon dots: using as a fluorescent probe for detecting water and imaging of live cells. *Dalton Transactions* **2015**, *44*, 5547-5554.
159. Pazini, A.; Maqueira, L.; Santos, F. S.; Barreto, A. R. J.; Carvalho, R. S.; Valente, F. M.; Back, D.; Aucélio, R. Q.; Cremona, M.; Rodembusch, F. S.; Limberger, J., Designing highly luminescent aryloxy-benzothiadiazole derivatives with aggregation-induced enhanced emission. *Dyes and Pigments* **2020**, *178*, 108377.
160. Isoppo, V. G.; Gil, E. S.; Gonçalves, P. F. B.; Rodembusch, F. S.; Moro, A. V., Highly fluorescent lipophilic 2,1,3-benzothiadiazole fluorophores as optical sensors for tagging material and gasoline adulteration with ethanol. *Sensors and Actuators B: Chemical* **2020**, *309*, 127701.
161. Zhang, X.; Zhang, W.; Li, Y.; Li, C., Hybrid luminescent materials of graphene oxide and rare-earth complexes with stronger luminescence intensity and better thermal stability. *Dyes and Pigments* **2017**, *140*, 150-156.
162. Fairley, N. *CasaXPS*, 2.2.87.
163. Liu, Y.; Wang, R.; Lang, J.; Yan, X., Insight into the formation mechanism of graphene quantum dots and the size effect on their electrochemical behaviors. *Physical Chemistry Chemical Physics : PCCP* **2015**, *17*, 14028-14035.
164. Oliveira, R. C.; Hammer, P.; Guibal, E.; Taulemesse, J.-M.; Garcia, O., Characterization of metal–biomass interactions in the lanthanum(III) biosorption on Sargassum sp. using SEM/EDX, FTIR, and XPS: Preliminary studies. *Chemical Engineering Journal* **2014**, *239*, 381-391
165. Sunding, M. F.; Hadidi, K.; Diplas, S.; Løvvik, O. M.; Norby, T. E.; Gunnæs, A. E., XPS characterisation of in situ treated lanthanum oxide and hydroxide using tailored charge referencing and peak fitting procedures. *Journal of Electron Spectroscopy and Related Phenomena* **2011**, *184*, 399-409.
166. Jiang, D.-S.; Long, S.-Y.; Huang, J.; Xiao, H.-Y.; Zhou, J.-Y., Immobilization of Pycnopus sanguineus laccase on magnetic chitosan microspheres. *Biochemical Engineering Journal* **2005**, *25*, 15-23.
167. Liu, Y.; Yu, J., Oriented immobilization of proteins on solid supports for use in biosensors and biochips: a review. *Microchimica Acta* **2016**, *183*, 1-19.
168. Zdarta, J.; Meyer, A. S.; Jesionowski, T.; Pinelo, M., Developments in support materials for immobilization of oxidoreductases: A comprehensive review. *Advances in Colloid and Interface Science* **2018**, *258*, 1-20.
169. Bilal, M.; Zhao, Y.; Noreen, S.; Shah, S. Z. H.; Bharagava, R. N.; Iqbal, H. M. N., Modifying bio-catalytic properties of enzymes for efficient biocatalysis: a review from immobilization strategies viewpoint. *Biocatalysis and Biotransformation* **2019**, *37*, 159-182.
170. Mateo, C.; Palomo, J. M.; Fernandez-Lorente, G.; Guisan, J. M.; Fernandez-Lafuente, R., Improvement of enzyme activity, stability and selectivity via immobilization techniques. *Enzyme and Microbial Technology* **2007**, *40*, 1451-1463.
171. Bilal, M.; Adeel, M.; Rasheed, T.; Zhao, Y.; Iqbal, H. M. N., Emerging contaminants of high concern and their enzyme-assisted biodegradation - A review. *Environment International* **2019**, *124*, 336-353.

172. Justino, C. I. L.; Rocha-Santos, T. A.; Duarte, A. C.; Rocha-Santos, T. A., Review of analytical figures of merit of sensors and biosensors in clinical applications. *Trends in Analytical Chemistry* **2010**, *29*, 1172-1183.

Anexo 1: Material suplementar

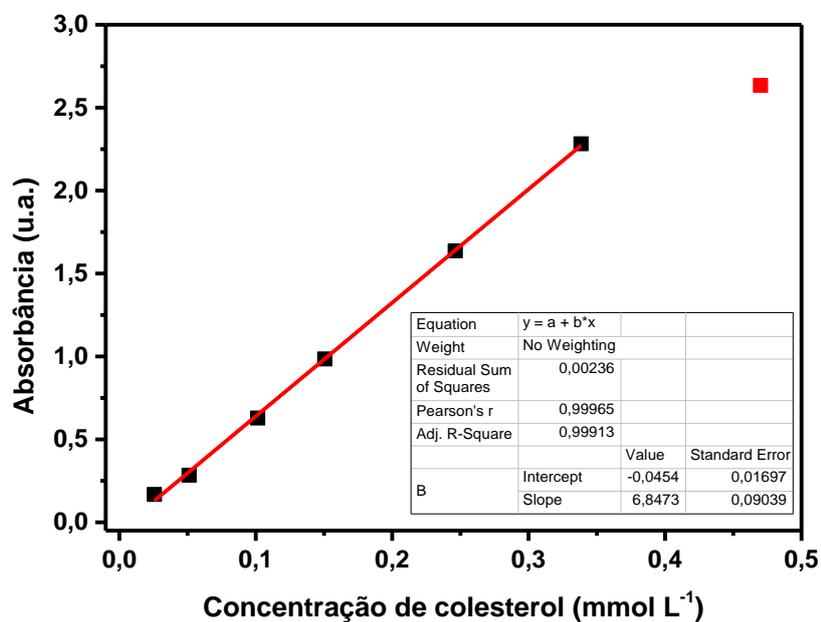


Figura S 1. Curva de calibração da enzima livre colesterol oxidase de microrganismos utilizada em todos os cálculos de atividade do capítulo I.

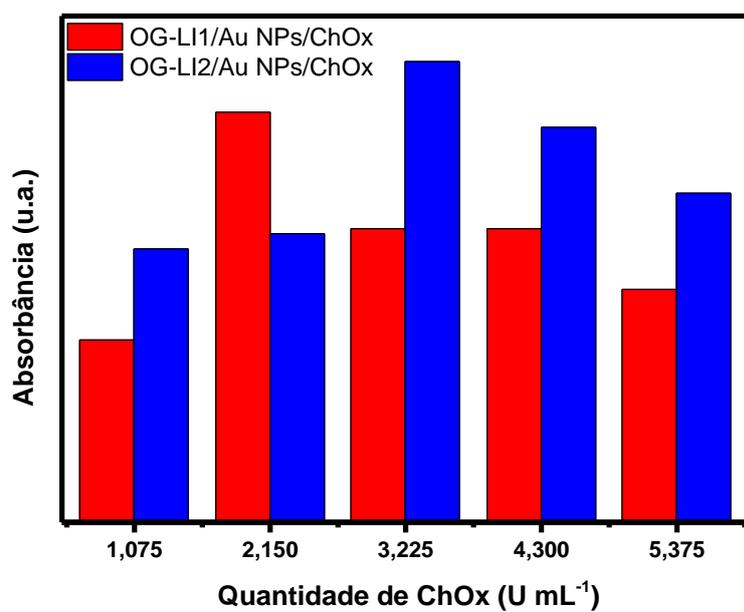


Figura S 2. Otimização do volume de enzima ChOx de microrganismos utilizada na imobilização de 3 mg de material.

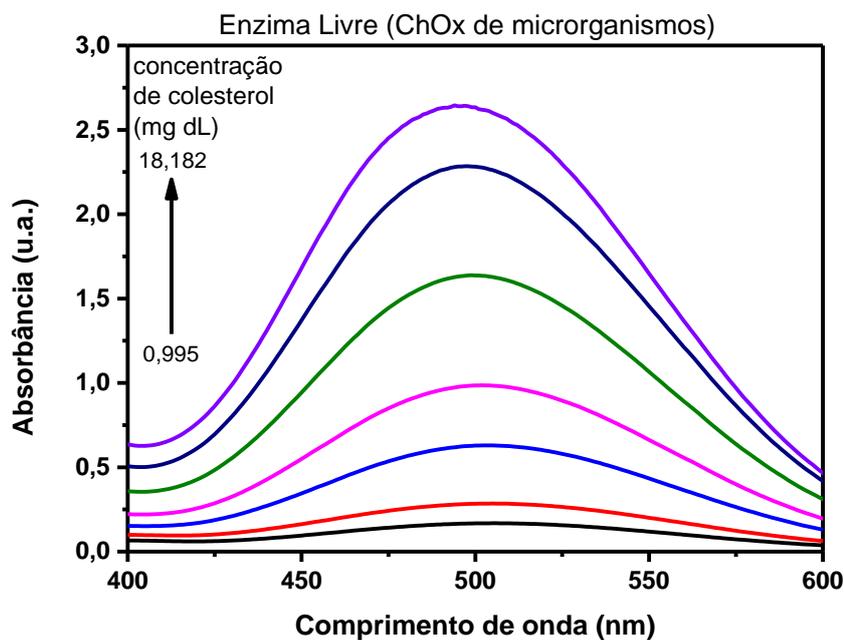


Figura S 3. Espectros no UV-visível da absorção da reação colorimétrica utilizando enzima livre (ChOx de microrganismos) após 60 min incubado com concentração de colesterol de 0,995; 1,980; 3,921; 5,825; 9,524; 13,084 e 18,182 mg dL⁻¹.

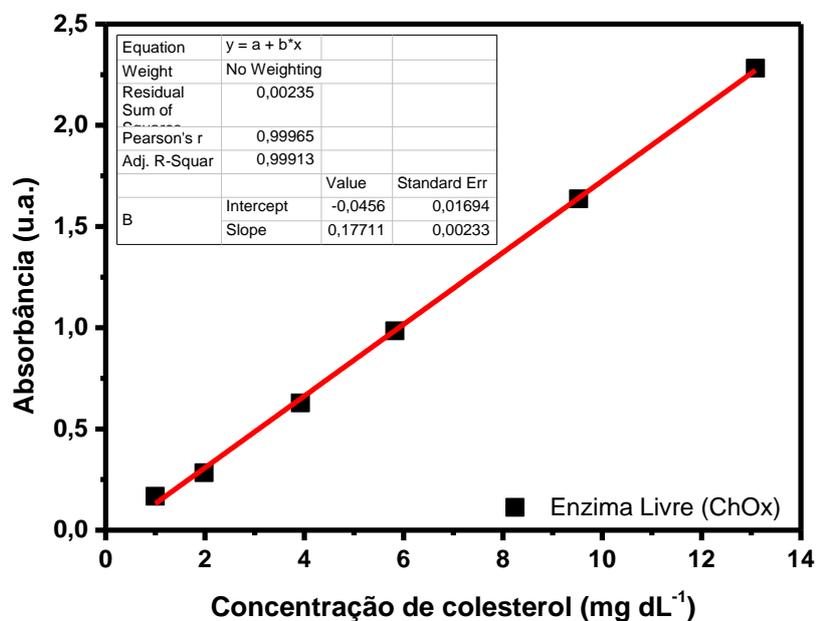


Figura S 4. Curva analítica da quantificação de colesterol total pela enzima livre colesterol oxidase de microrganismos e correlação linear entre concentração e absorbância.

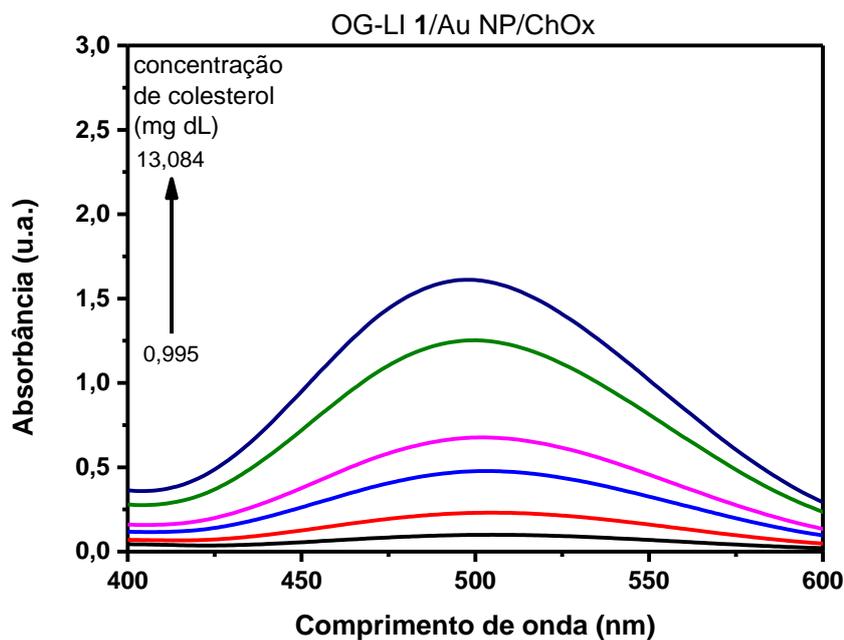


Figura S 5. Espectros no UV-visível da absorção da reação colorimétrica utilizando o biossensor OG-LI 1/Au NP/ChOx após 60 min incubando com concentração de colesterol de 0,995; 1,980; 3,921; 5,825; 9,524 e 13,084 mg dL⁻¹.

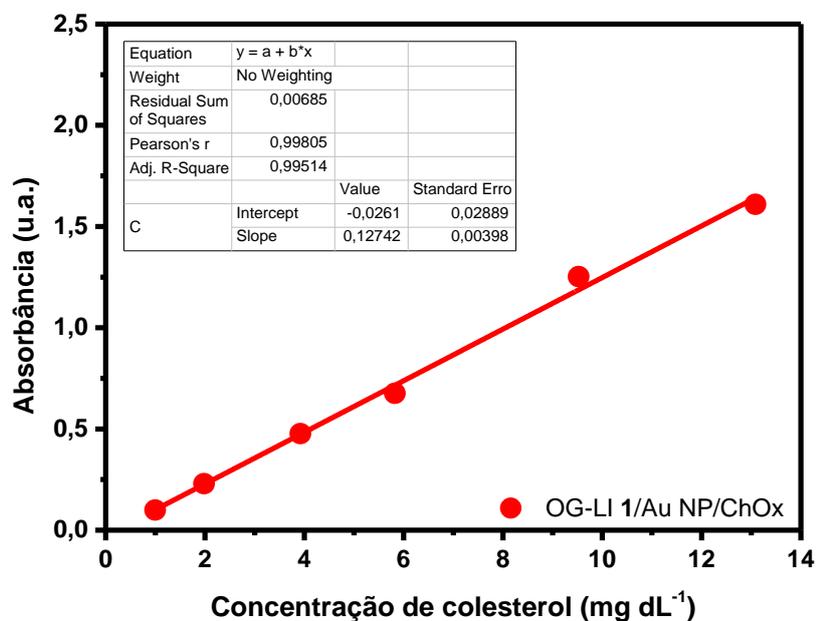


Figura S 6. Curva analítica da quantificação de colesterol total pelo material OG-LI 1/Au NP/ChOx e correlação linear entre concentração e absorbância.

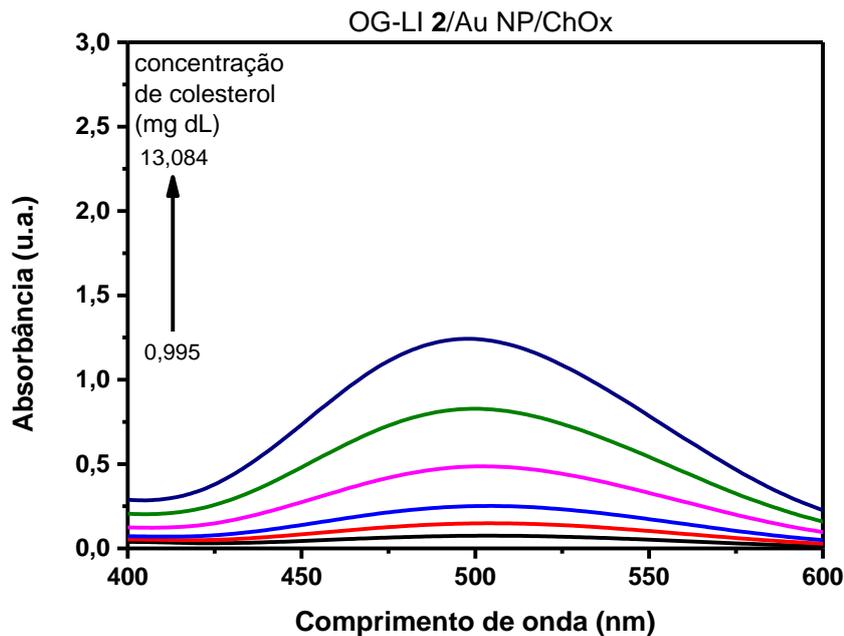


Figura S 7. Espectros no UV-visível da absorção da reação colorimétrica utilizando o biossensor OG-LI 2/Au NP/ChOx após 60 min incubando com concentração de colesterol de 0,995; 1,980; 3,921; 5,825; 9,524 e 13,084 mg dL⁻¹.

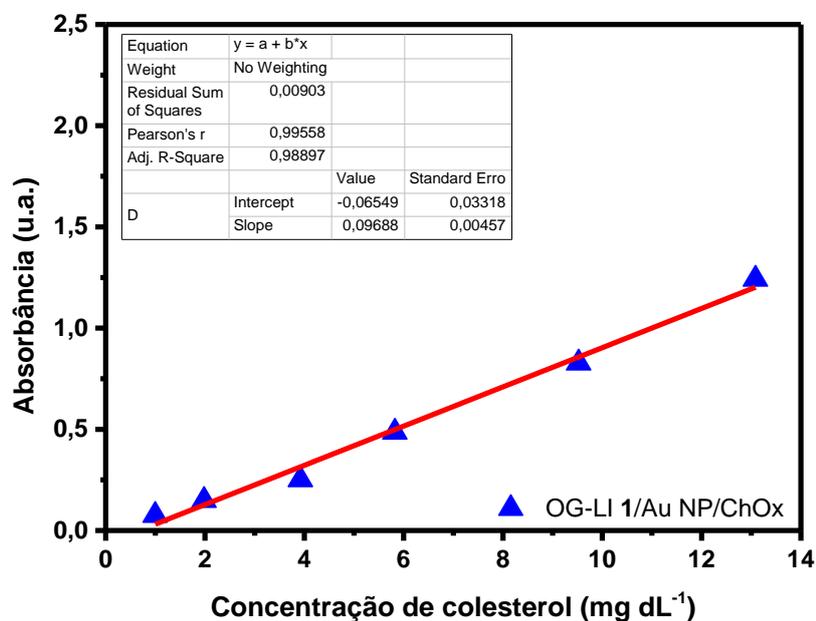


Figura S 8. Curva analítica da quantificação de colesterol total pelo material OG-LI 2/Au NP/ChOx e correlação linear entre concentração e absorbância.

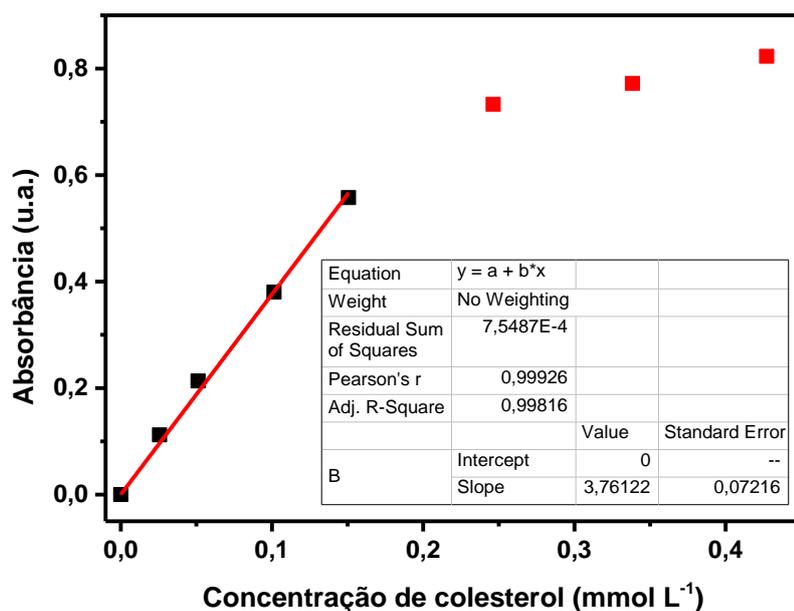


Figura S 9. Curva de calibração da enzima livre de *streptomices sp* normalizada no zero e utilizada em todos os cálculos de atividade do capítulo II.

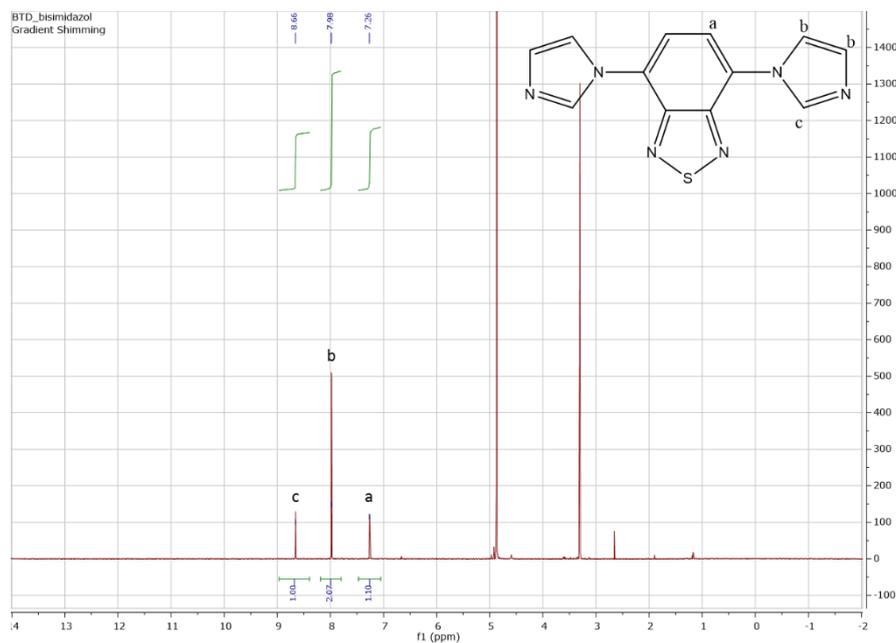


Figura S 10. RMN ^1H (400 MHz) da BTDIIm realizado em CD_3COD .

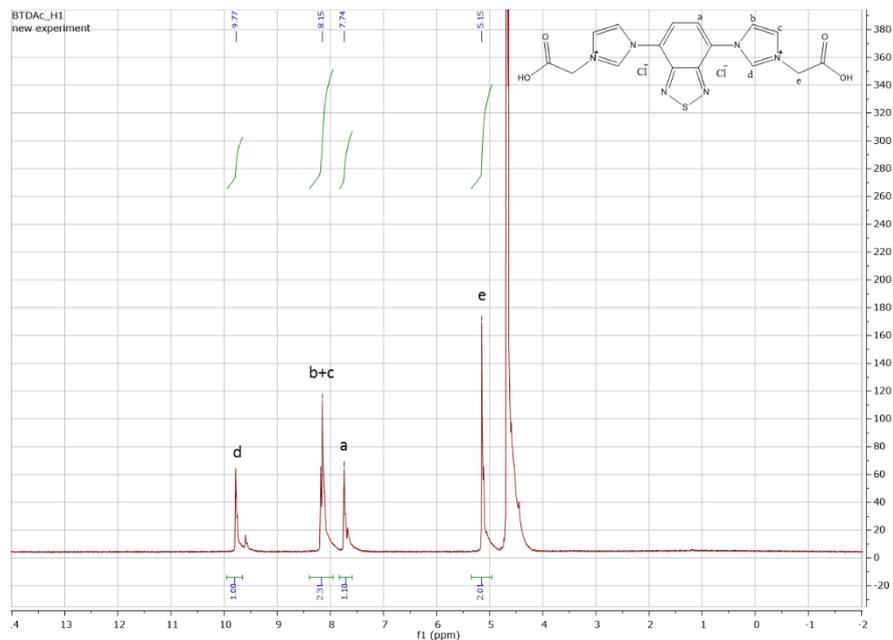


Figura S 11. RMN ^1H (400 MHz) da BTDAc realizado em D_2O .

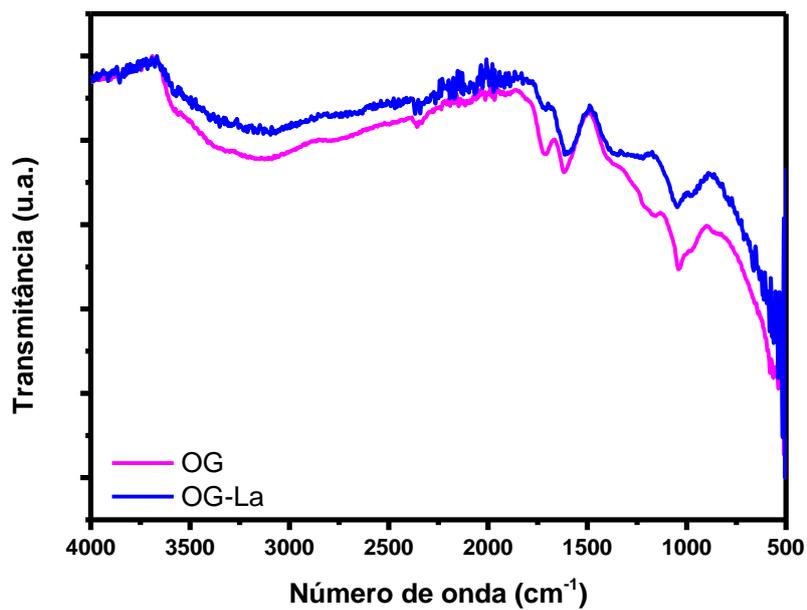


Figura S 12. Espectro na região do infravermelho com transformada de Fourier dos materiais sólidos OG e OG-La.

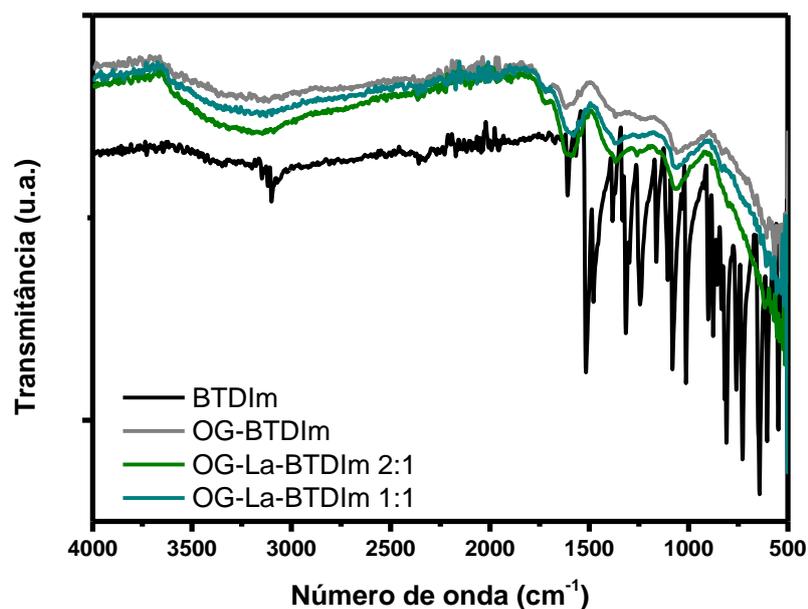


Figura S 13. Espectro na região do infravermelho com transformada de Fourier dos materiais sólidos BTDIIm, OG-BTDIm, OG-La-BTDIm 2:1 e OG-La-BTDIm 1:1.

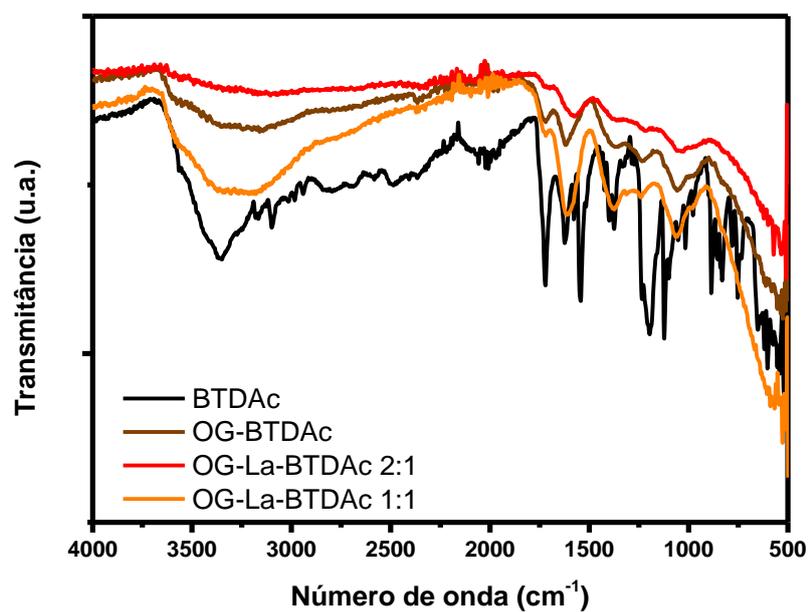


Figura S 14. Espectro na região do infravermelho com transformada de Fourier dos materiais sólidos BTDAc, OG-BTDAc, OG-La-BTDAc 2:1 e OG-La-BTDAc 1:1.

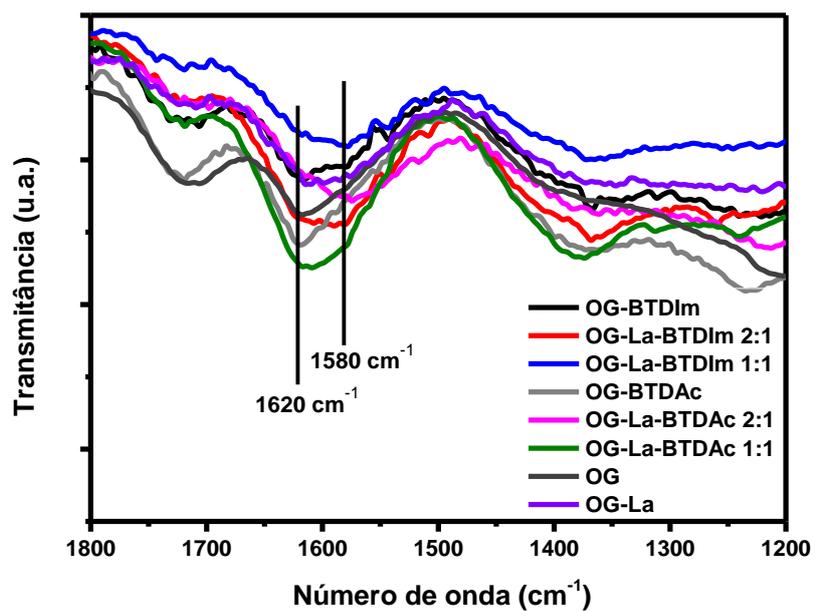


Figura S 15. Deslocamento da banda estiramento C=O de ácido carboxílico dos materiais de óxido de grafeno funcionalizados com derivados de BTD com e sem o cátion lantânio.

Tabela S1. Dados da análise termogravimétrica dos materiais e derivados de BTB.

Material	Perda de massa até 150 °C		Perda de massa 150-400 °C		Perda de massa 400-700 °C		Perda de massa total
	T (°C)	%	T (°C)	%	T (°C)	%	%
GO	53,3	14,95	244,8	28,64	681,1	15,81	65,72
			302,8	6,32			
GO-La	42,4	18,34	257,6	27,50	629,9	14,55	60,39
BTBIm	-	-	391,2	84,12	-	-	84,12
GO-BTBIm	44,5	12,59	251,7	28,47	692,0	19,49	60,54
GO-La-	59,2	9,72	241,8	27,30	631,0	13,38	50,40
BTBIm 2:1							
GO-La-	53,2	11,62	237,2	25,86	627,3	21,38	58,86
BTBIm 1:1							
BTDAc	131,1	4,92	336,8	32,27	626,4	8,8	49,04
GO-BTDAc	41,1	13,21	248,9	30,92	672,6	25,52	69,65
GO-La-	49,1	13,01	244,9	23,82	615,2	29,15	65,98
BTDAc 2:1							
GO-La-	42,2	15,31	243,8	27,38	619,3	28,98	71,67
BTDAc 1:1							

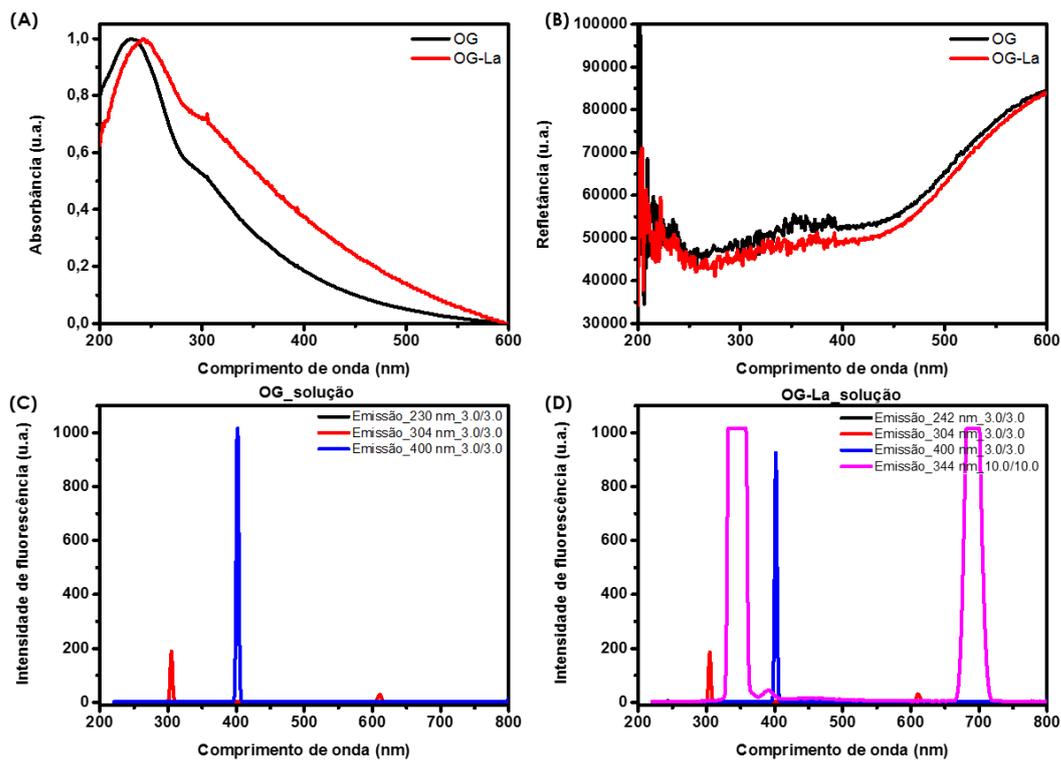


Figura S 16. Espectros de absorvância no UV-visível da solução aquosa (A) e refletância difusa dos materiais OG e OG-La e emissão de fluorescência em diferentes comprimentos de onda da solução aquosa de OG (C) e OG-La (D).

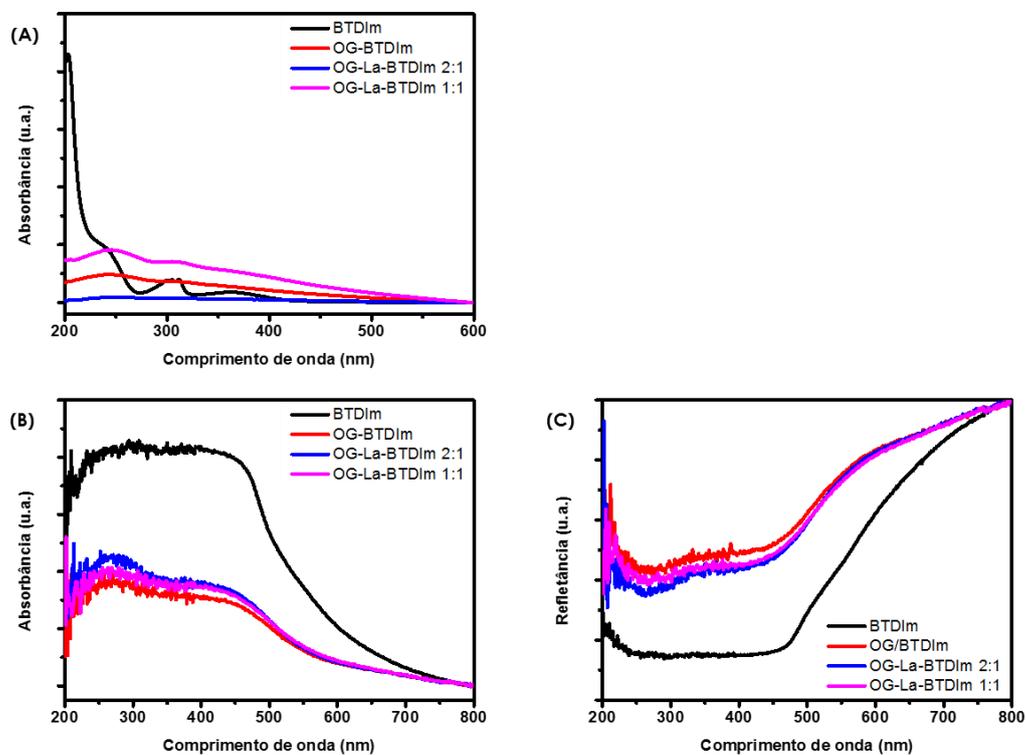


Figura S 17. Espectros de absorvância no UV-visível da BTDIIm e materiais funcionalizados com BTDIIm em solução aquosa (A) e sólido (B) e refletância difusa (C).

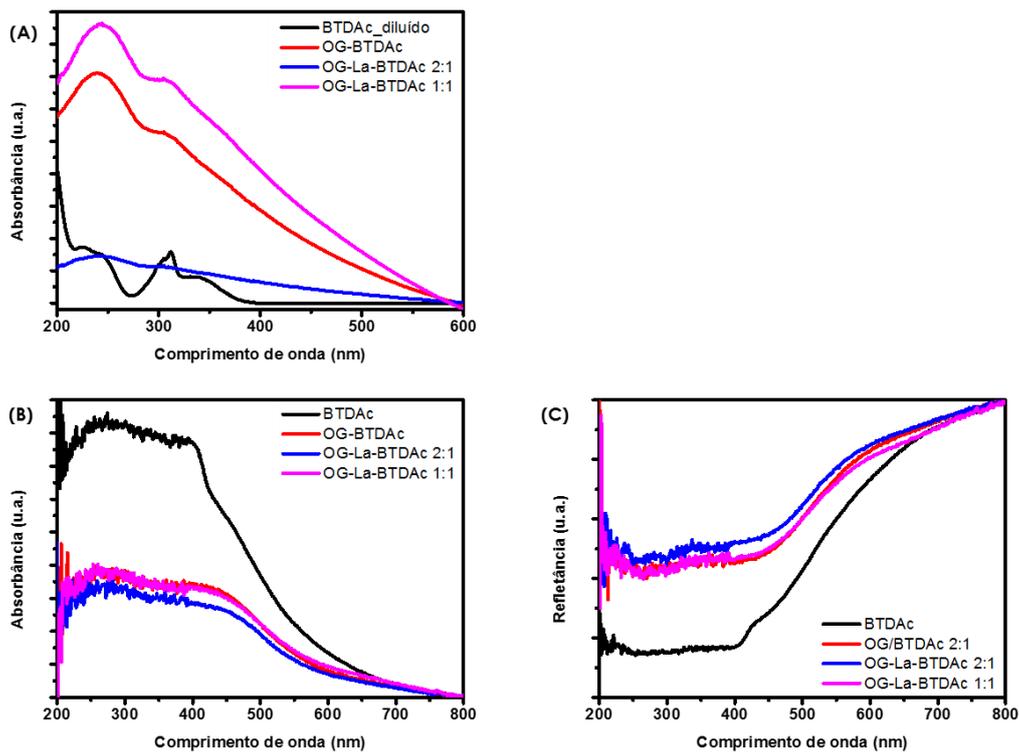


Figura S 18. Espectros de absorvância no UV-visível da BTDAc e materiais funcionalizados com BTDAc em solução aquosa (A) e sólido (B) e refletância difusa (C).

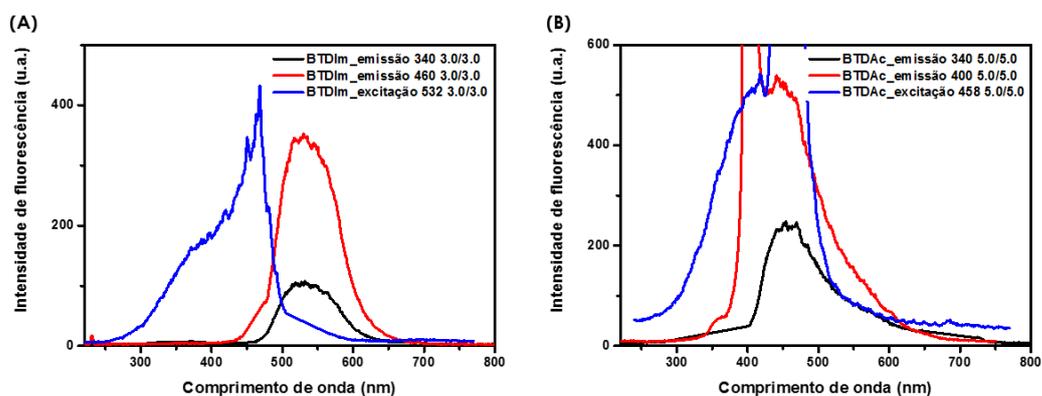


Figura S 19. Espectros de emissão e excitação de fluorescência de sólido das moléculas BTDIIm (A) e BTDAc (B).

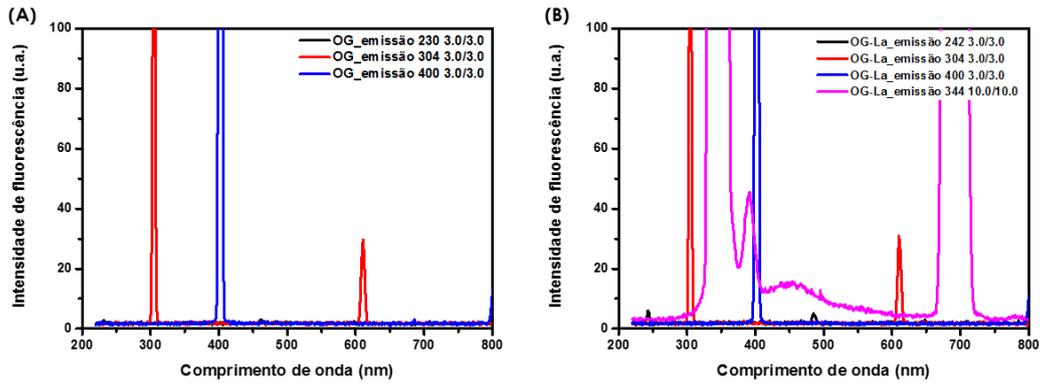


Figura S 20. Espectro de emissão de fluorescência utilizando diferentes comprimentos de onda de excitação para os materiais OG (A) e OG-La (B) em solução aquosa.

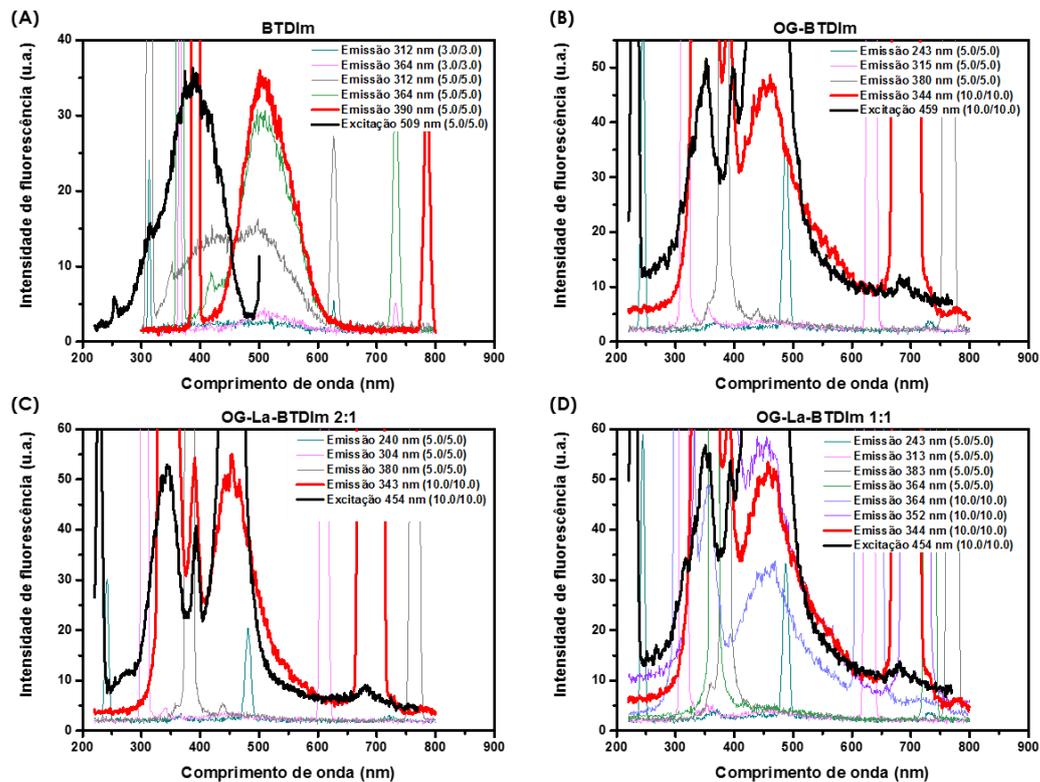


Figura S 21. Espectro de emissão de fluorescência utilizando diferentes comprimentos de onda de excitação (em colorido) e espectro de excitação de fluorescência no comprimento de onda máximo de emissão (em preto) da BTDIIm (A) e dos materiais OG-BTDIm (B), OG-La-BTDIm 2:1 (C) e OG-La-BTDIm 1:1 (D) em solução aquosa.

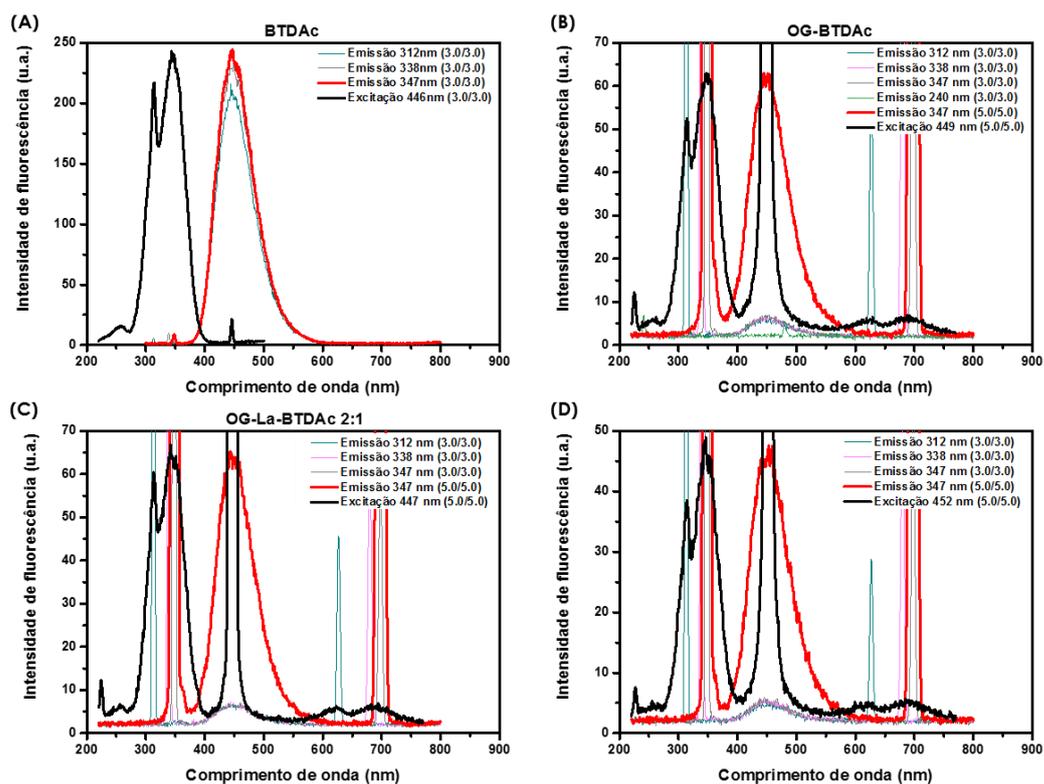


Figura S 22. Espectro de emissão de fluorescência utilizando diferentes comprimentos de onda de excitação (em colorido) e espectro de excitação de fluorescência no comprimento de onda máximo de emissão (em preto) da BTDAc (A) e dos materiais OG-BTDAc (B), OG-La-BTDAc 2:1 (C) e OG-La-BTDAc 1:1 (D) em solução aquosa.

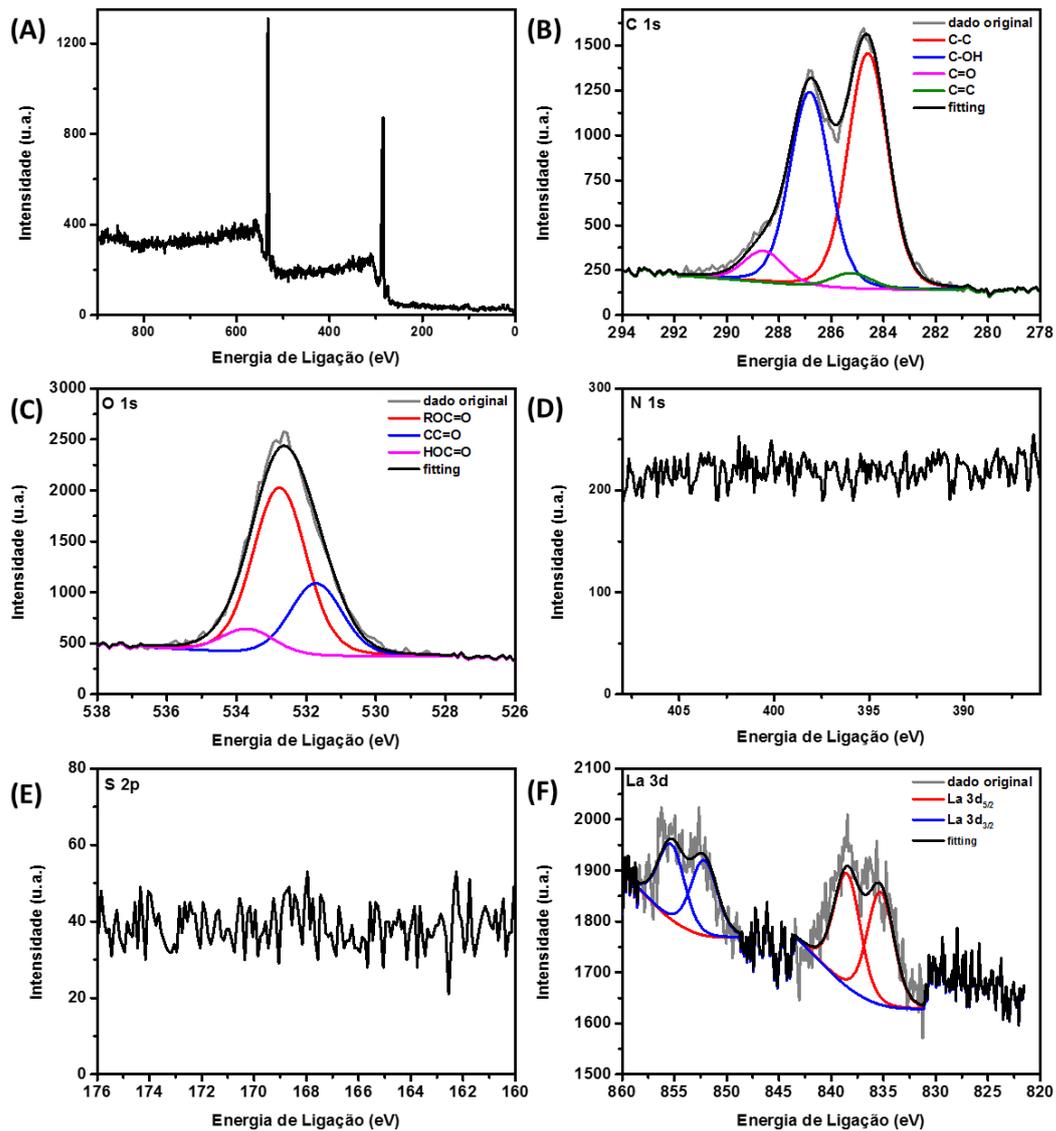


Figura S 23. Espectros de XPS *survey* do material OG-La (A) e de alta resolução das regiões do C 1s (B), O 1s (C), N 1s (D), S 2p (E) e La 3d (F).

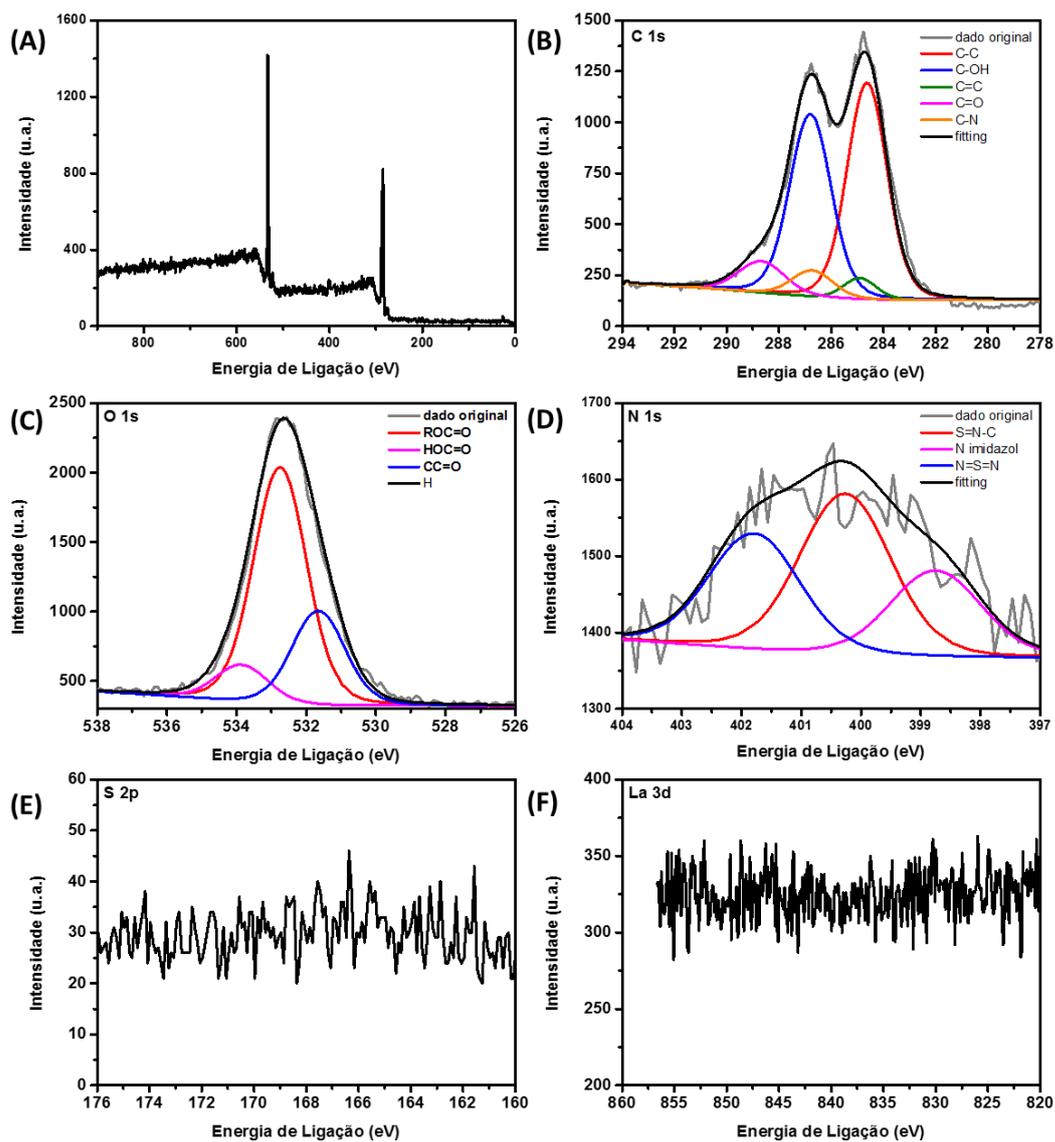


Figura S 24. Espectros de XPS *survey* do material OG-BTDIm (A) e de alta resolução das regiões do C 1s (B), O 1s (C), N 1s (D), S 2p (E) e La 3d (F).

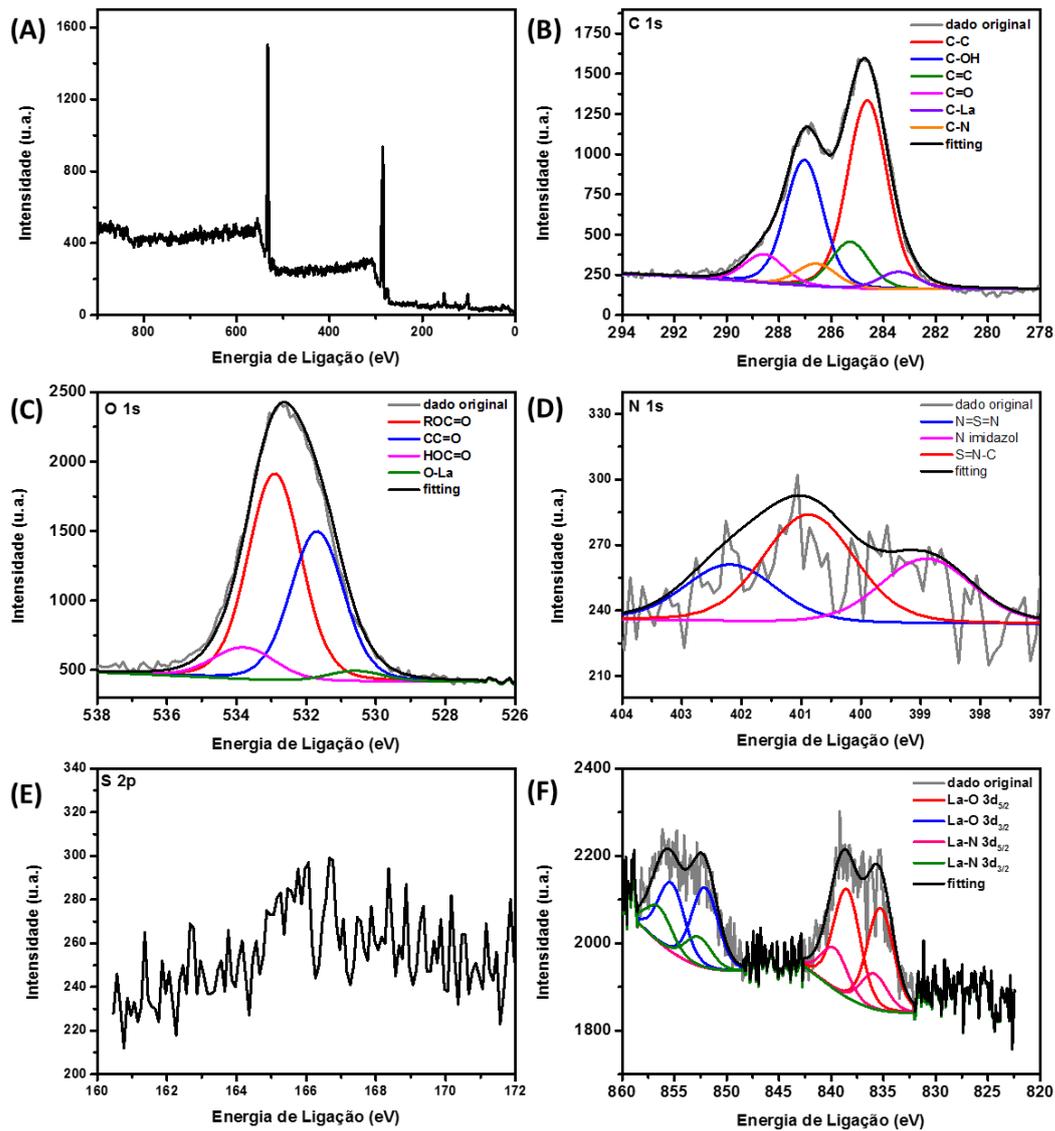


Figura S 25. Espectros de XPS *survey* do material OG-La-BTDIm 2:1 (A) e de alta resolução das regiões do C 1s (B), O 1s (C), N 1s (D), S 2p (E) e La 3d (F).

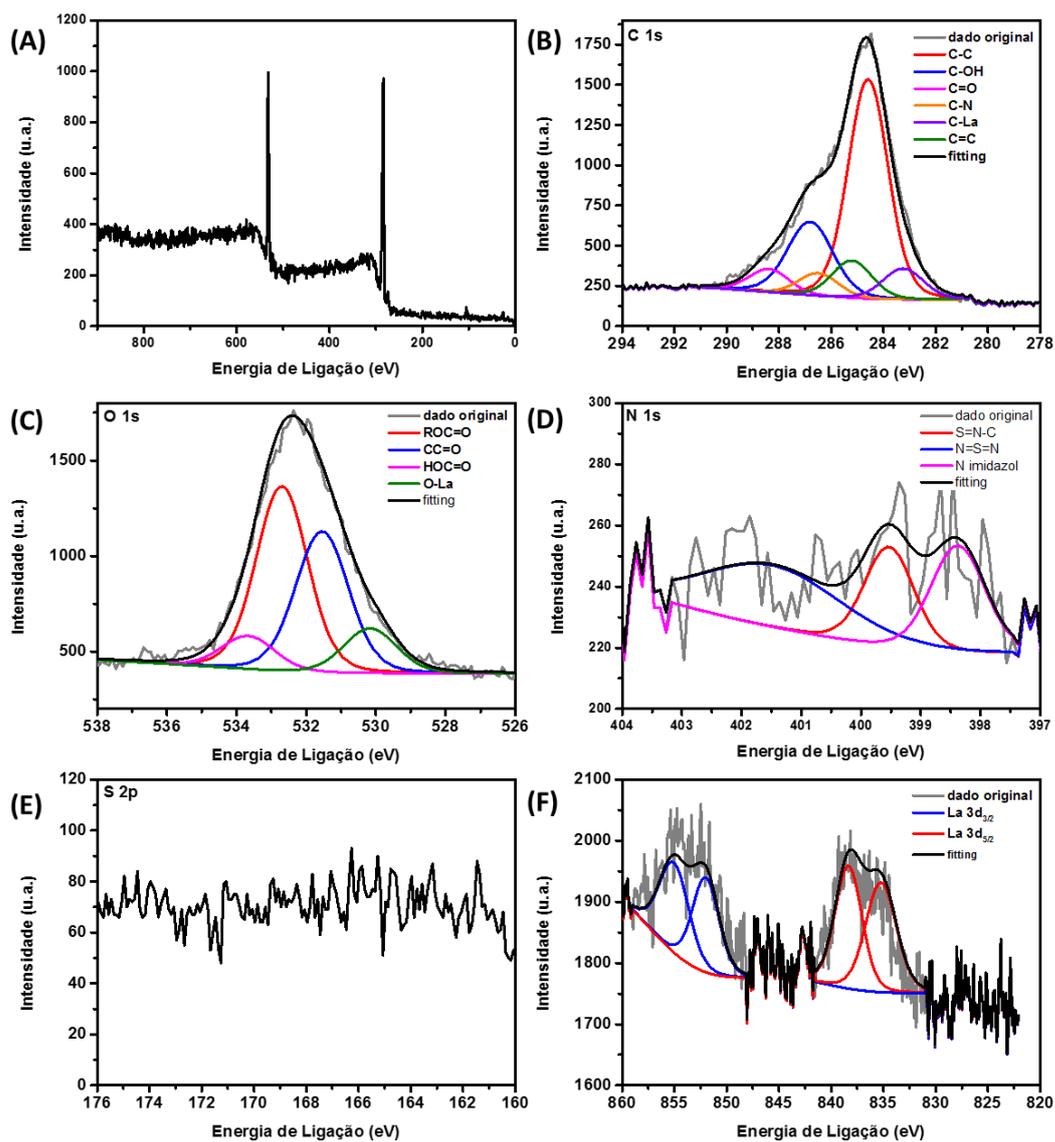


Figura S 26. Espectros de XPS *survey* do material OG-La-BTDAc 2:1 (A) e de alta resolução das regiões do C 1s (B), O 1s (C), N 1s (D), S 2p (E) e La 3d (F).

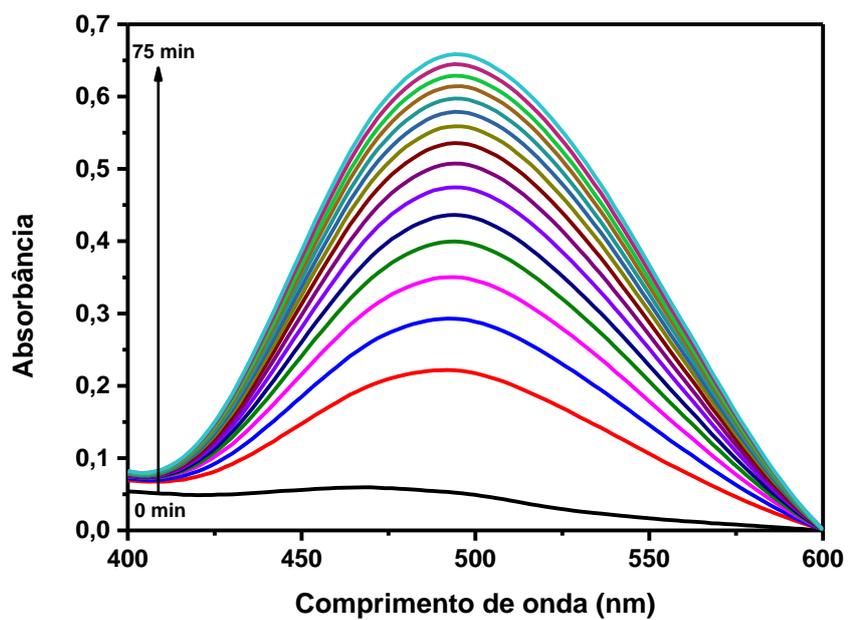


Figura S 27. Espectros no UV-visível da absorção da reação utilizando enzima livre (1 μL da solução estoque) com $9,5 \text{ mg dL}^{-1}$ de colesterol normalizada no branco, medida a cada 5 min.

Tabela S2. Absorbância e atividade das reações com 9,5 mg dL⁻¹ de colesterol normalizado no branco com diferentes volumes de enzima adicionado. Dados utilizados no cálculo de porcentagem de imobilização e atividade recuperada.

Volume de enzima	Enzima Livre	Material OG-La-BTDIm 2:1	Sobrenadante	Lavagem 1	Lavagem 2
0 (branco)	0,0864				
0,5	0,2434	0,1174	0,0552	0,0584	0,0565
	4529,9	2184,9	1027,3	1086,9	1051,5
1	0,4600	0,2633	0,0678	0,0710	0,0635
	4280,5	2450,1	630,9	660,7	590,9
2	0,6845	0,3882	0,0726	0,0720	0,0651
	3184,8	1806,2	337,8	335,0	302,9
5	0,8704	0,5848	0,0720	0,0761	0,0644
	1619,9	1088,4	134,0	141,6	119,9

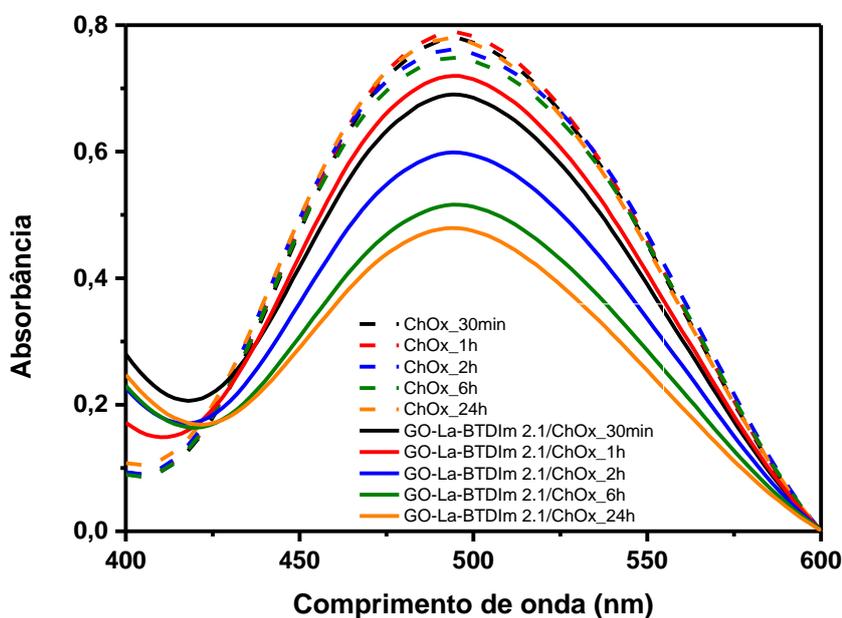


Figura S 28. Espectros no UV-visível das reações com 9,5 mg dL⁻¹ de colesterol utilizando enzima livre (ChOx) e o material OG-La-BTDIm 2:1/ChOx com diferentes tempos de imobilização. A reação ocorreu por 30 min a 37 °C.

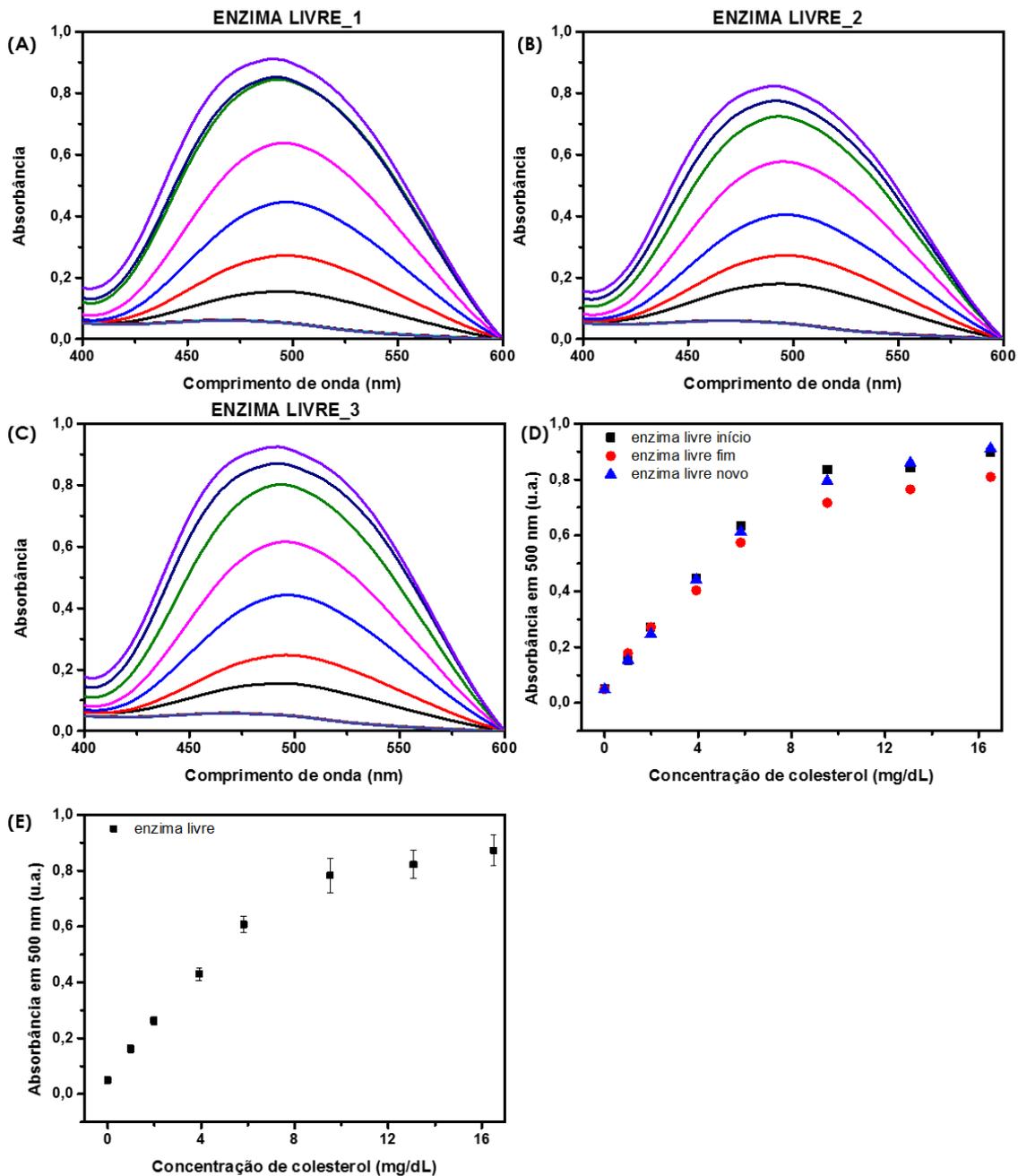


Figura S 29. Espectro no UV-visível das medidas com diferentes concentrações de colesterol total utilizando enzima livre e duplicatas (A-C), curvas analíticas da absorbância em 500 nm em função da concentração de colesterol (D) e a média das duplicatas com barra de erro (E).

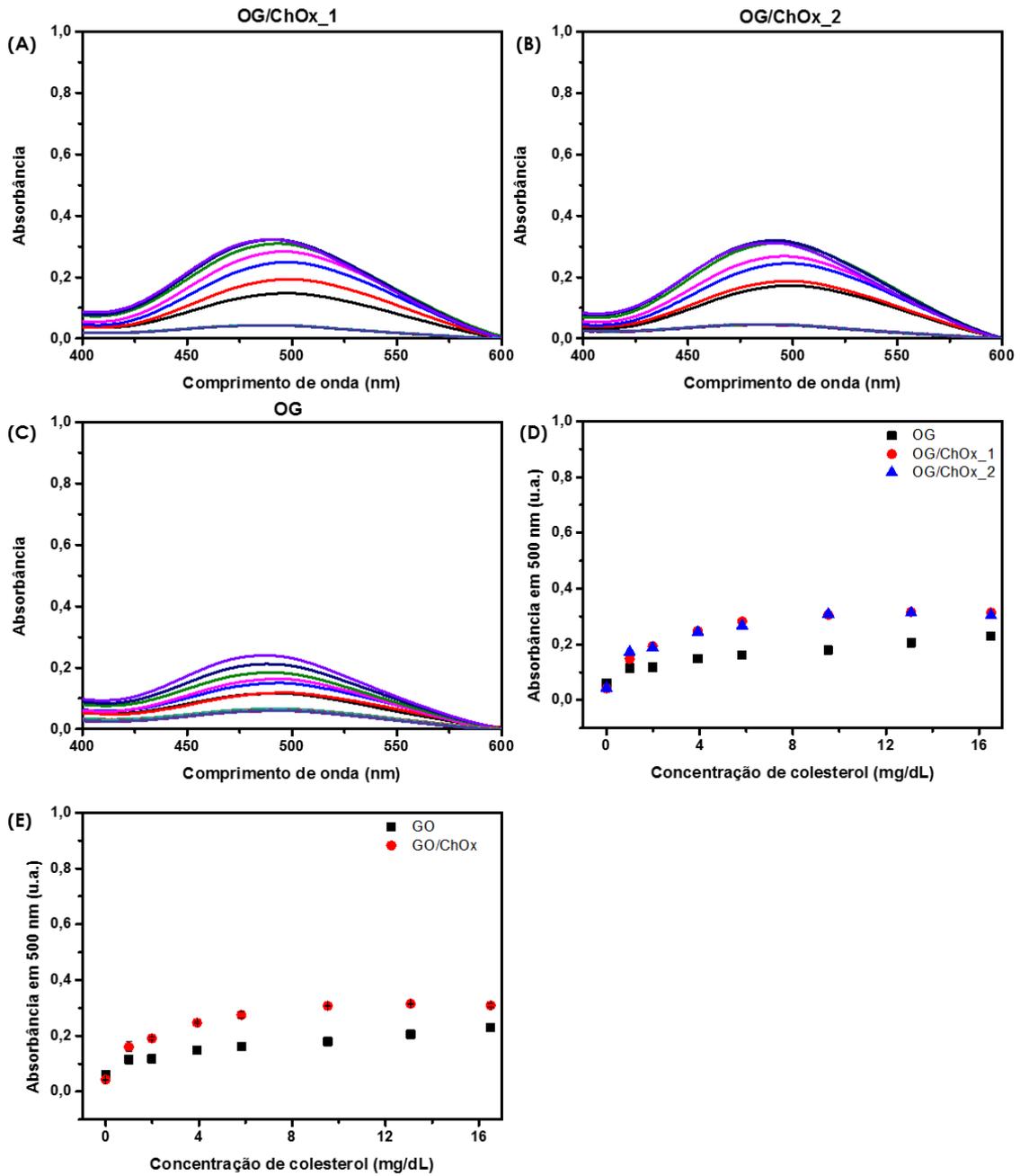


Figura S 30. Espectro no UV-visível das medidas com diferentes concentrações de colesterol total utilizando OG/ChOx (A-B) e OG (C), curvas analíticas da absorbância em 500 nm em função da concentração de colesterol (D) e a média das duplicatas com barra de erro (E).

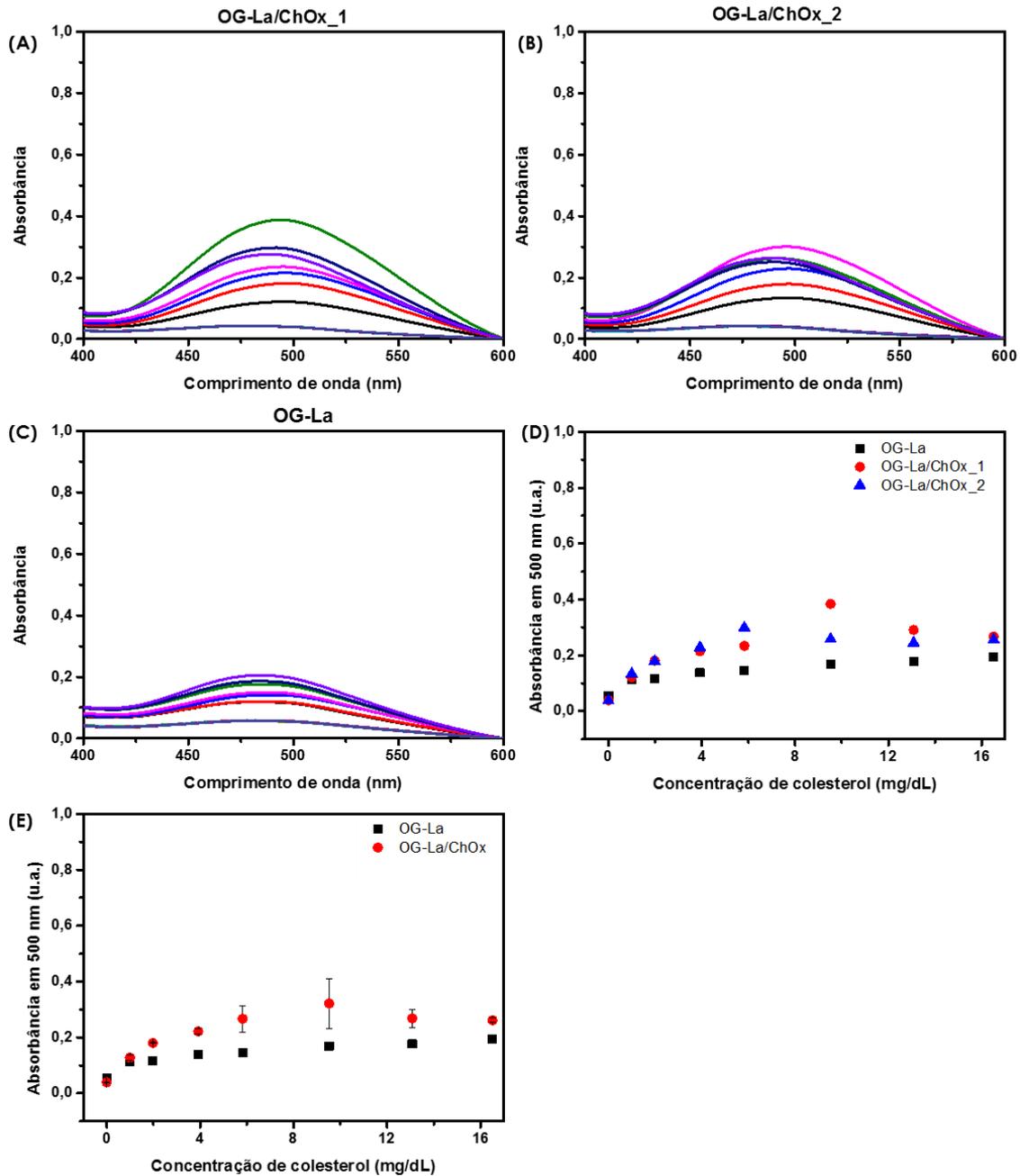


Figura S 31. Espectro no UV-visível das medidas com diferentes concentrações de colesterol total utilizando OG-La/ChOx (A-B) e OG-La (C), curvas analíticas da absorbância em 500 nm em função da concentração de colesterol (D) e a média das duplicatas com barra de erro (E).

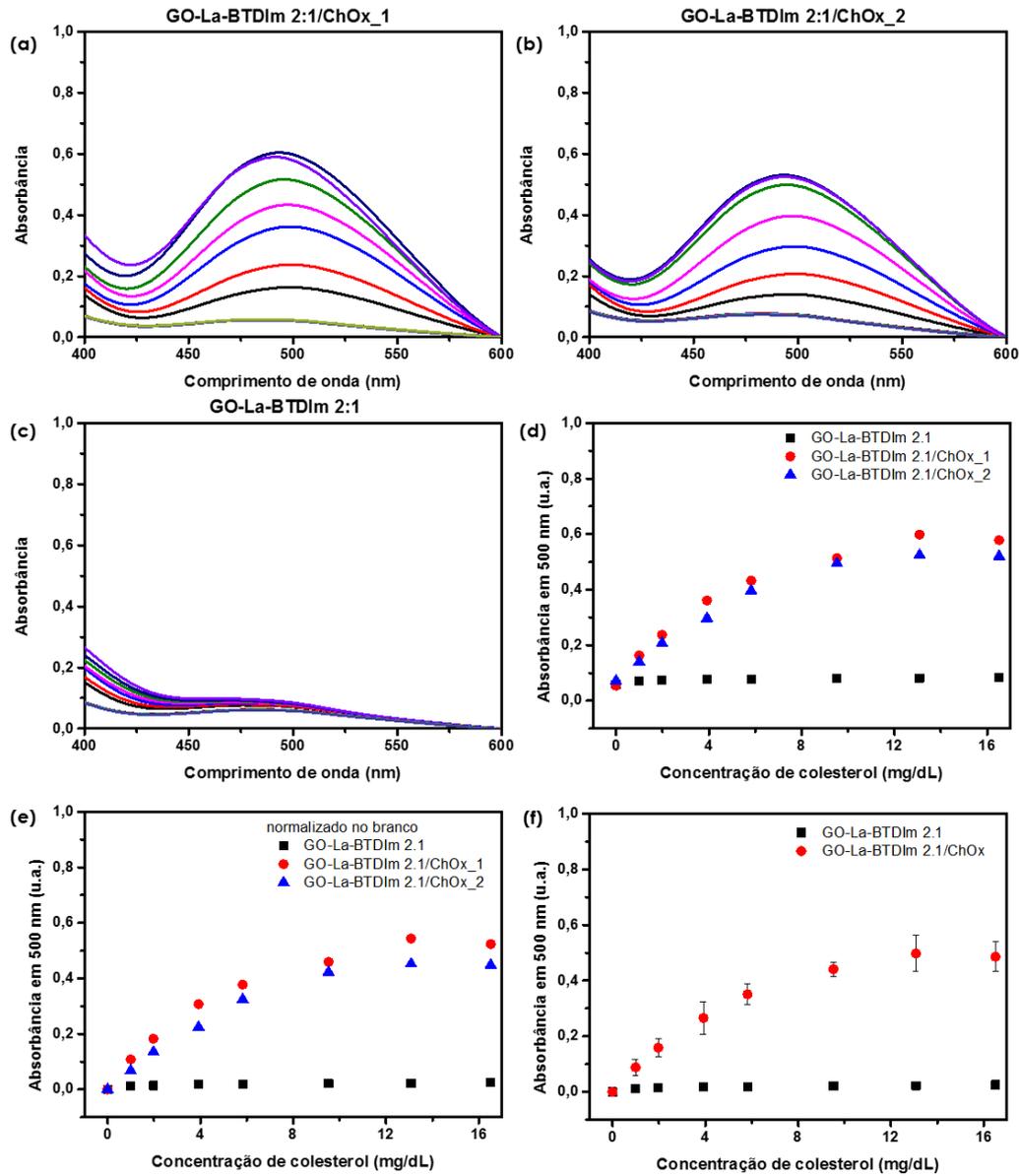


Figura S 32. Espectro no UV-visível das medidas com diferentes concentrações de colesterol total utilizando OG-La-BTDIm 2:1/ChOx (A-B) e OG-La-BTDIm 2:1 (C), curvas analíticas da absorbância em 500 nm em função da concentração de colesterol (D) e a média das duplicatas com barra de erro (E).

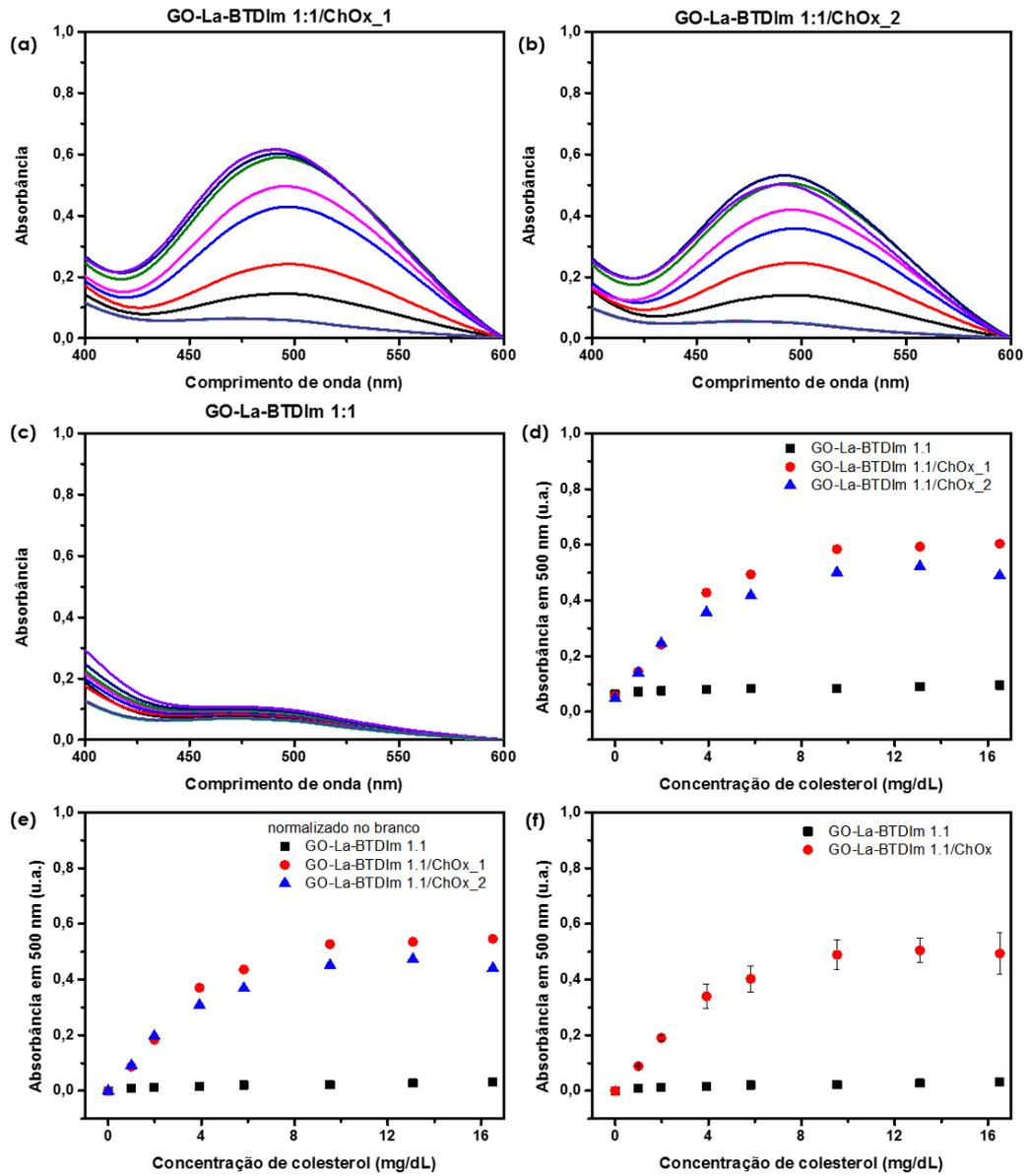


Figura S 33. Espectro no UV-visível das medidas com diferentes concentrações de colesterol total utilizando OG-La-BTDIm 1:1/ChOx (A-B) e OG-La-BTDIm 1:1 (C), curvas analíticas da absorbância em 500 nm em função da concentração de colesterol (D) e a média das duplicatas com barra de erro (E).

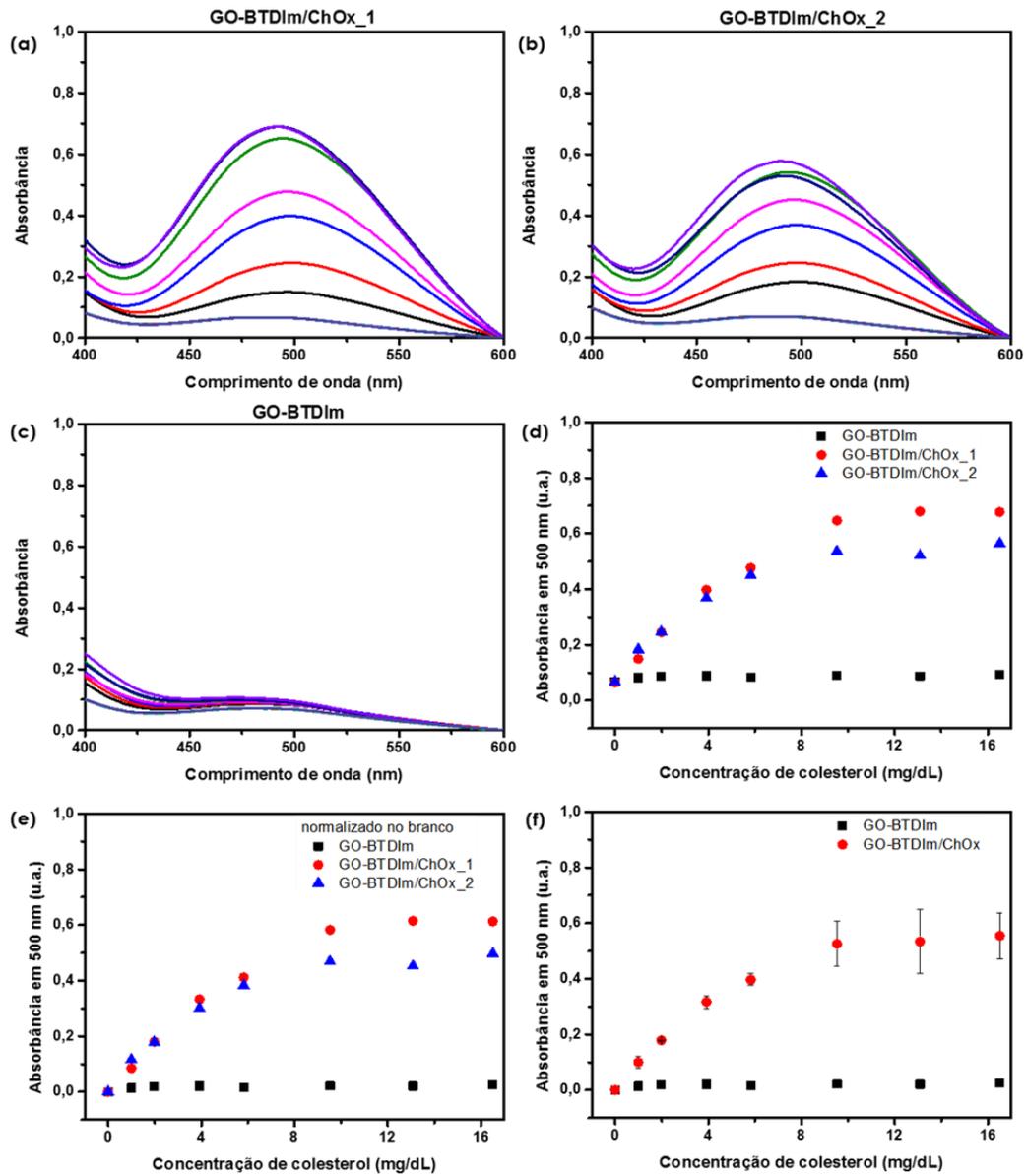


Figura S 34. Espectro no UV-visível das medidas com diferentes concentrações de colesterol total utilizando OG-BTDIm/ChOx (A-B) e OG-BTDIm (C), curvas analíticas da absorbância em 500 nm em função da concentração de colesterol (D) e a média das duplicatas com barra de erro (E).

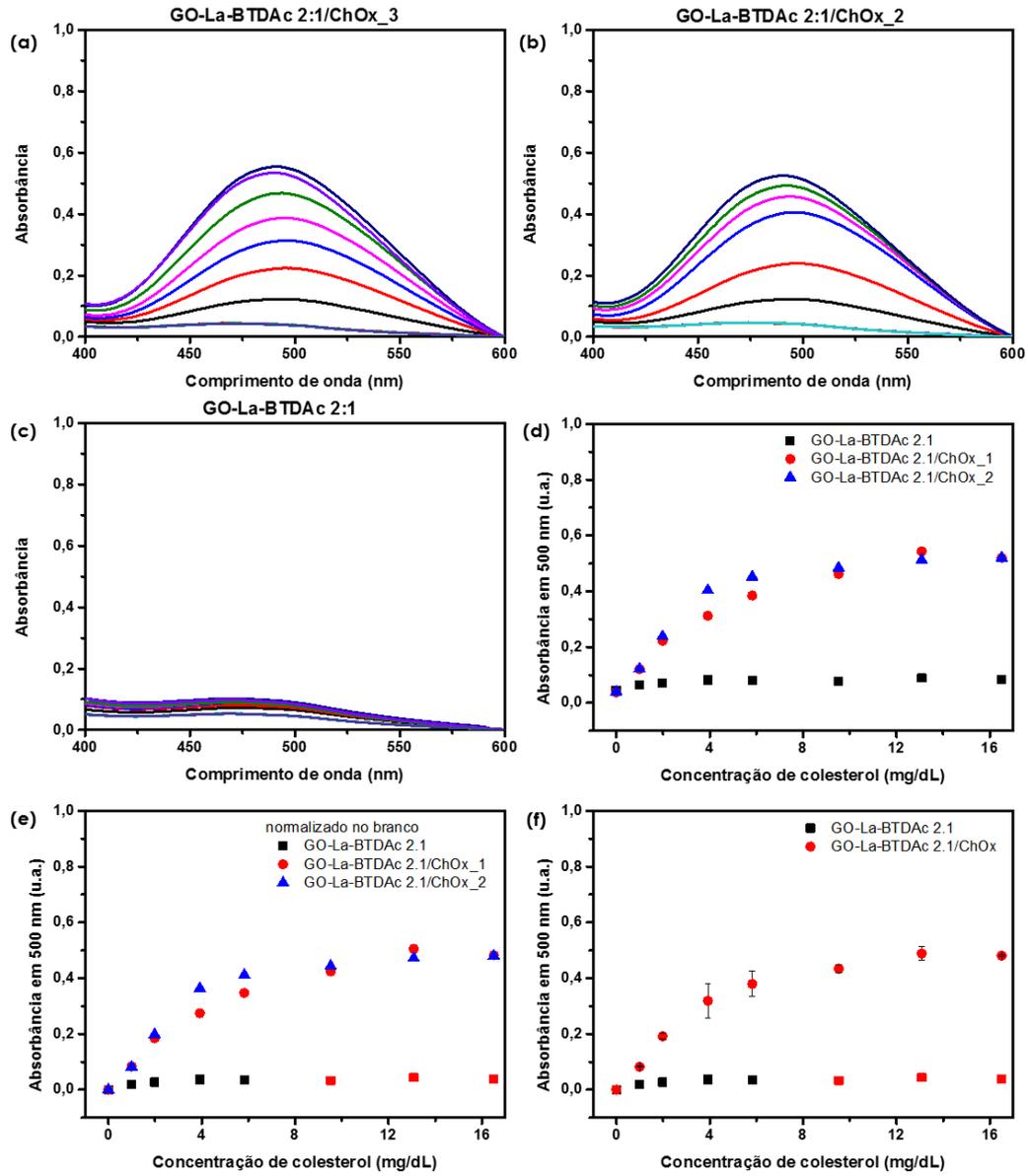


Figura S 35. Espectro no UV-visível das medidas com diferentes concentrações de colesterol total utilizando OG-La-BTDAc 2:1/ChOx (A-B) e OG-La-BTDAc 2:1 (C), curvas analíticas da absorbância em 500 nm em função da concentração de colesterol (D) e a média das duplicatas com barra de erro (E).

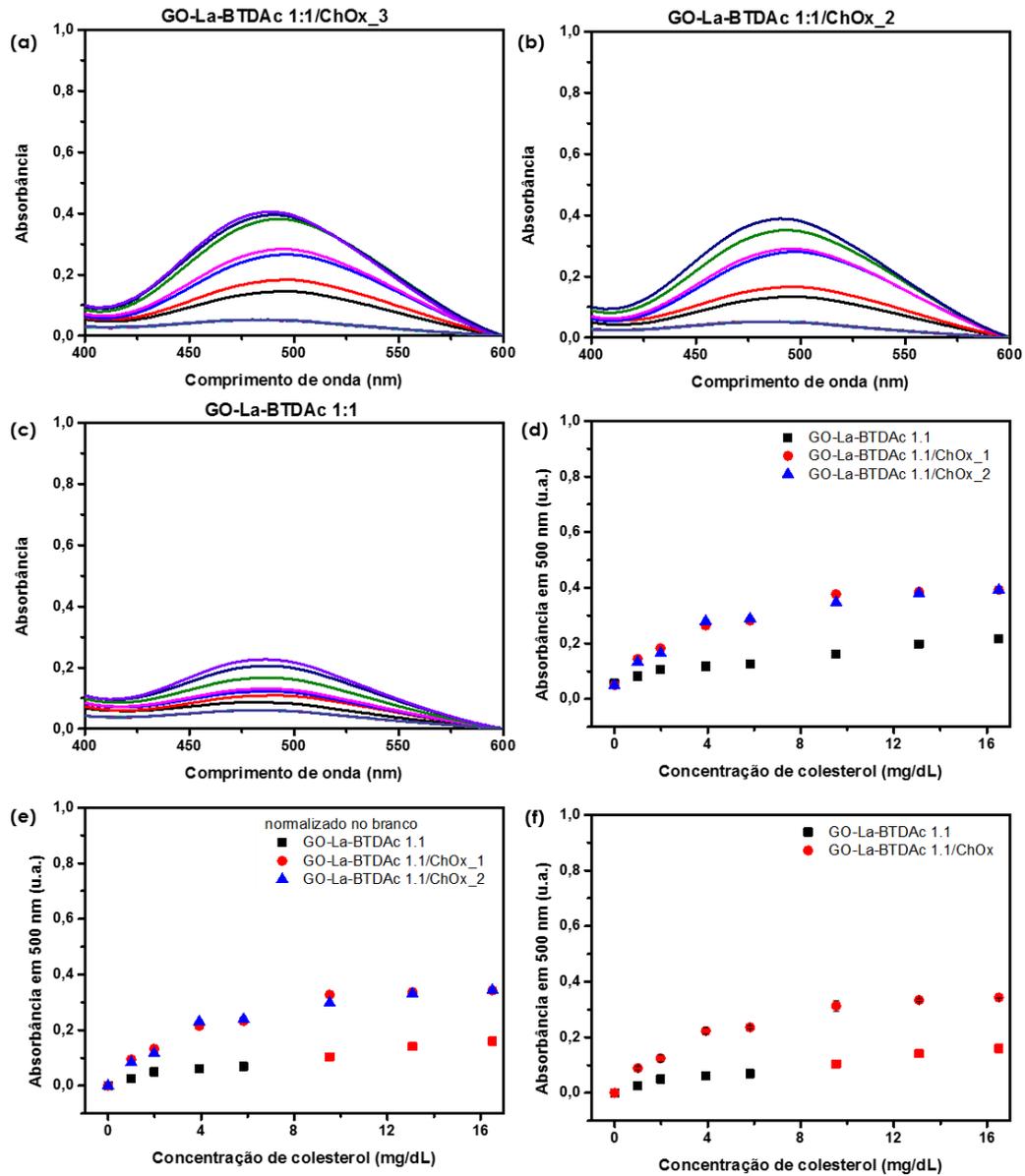


Figura S 36. Espectro no UV-visível das medidas com diferentes concentrações de colesterol total utilizando OG-La-BTDAc 1:1/ChOx (A-B) e OG-La-BTDAc 1:1 (C), curvas analíticas da absorbância em 500 nm em função da concentração de colesterol (D) e a média das duplicatas com barra de erro (E).

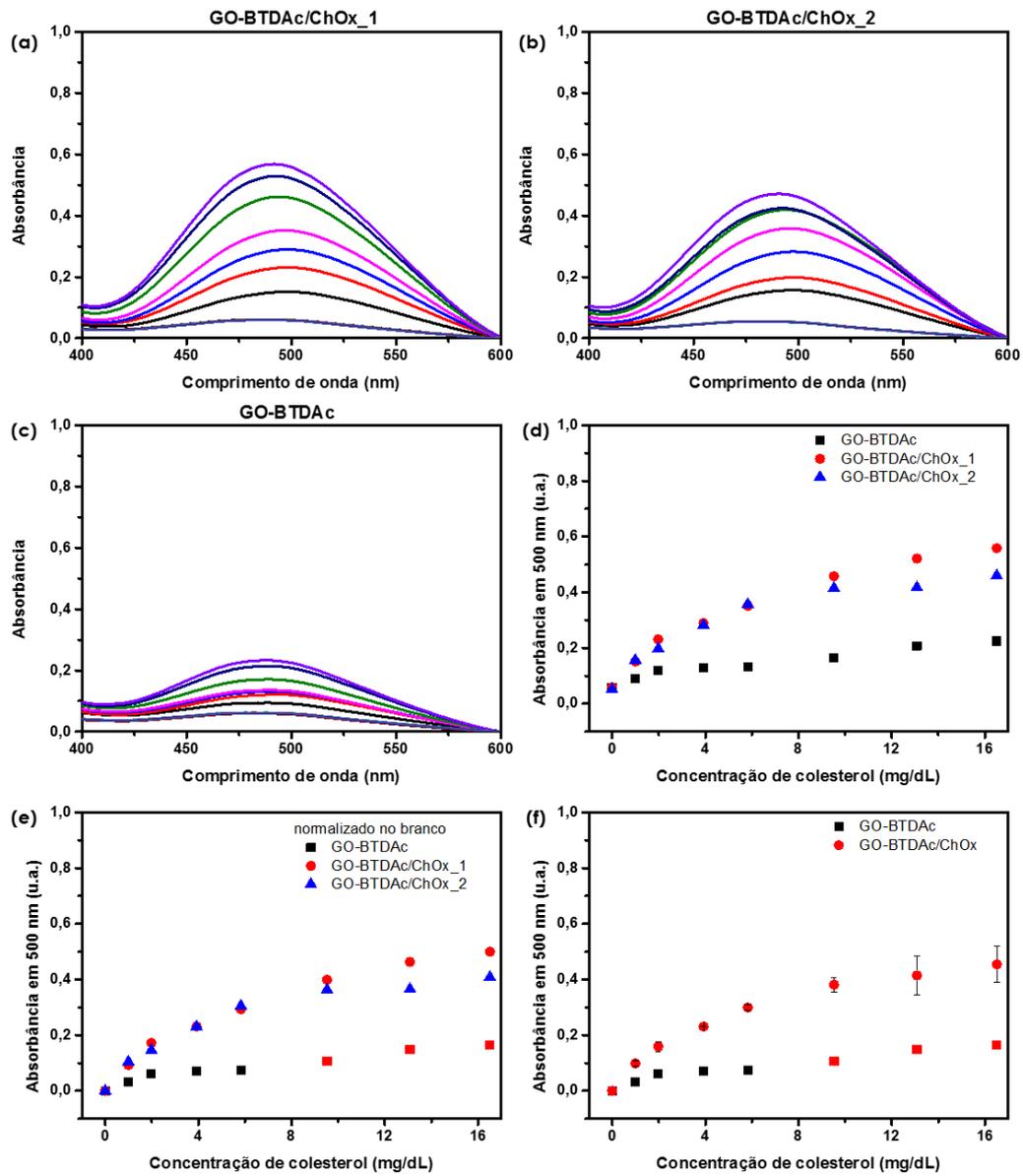


Figura S 37. Espectro no UV-visível das medidas com diferentes concentrações de colesterol total utilizando OG-BTDAc/ChOx (A-B) e OG-BTDAc (C), curvas analíticas da absorbância em 500 nm em função da concentração de colesterol (D) e a média das duplicatas com barra de erro (E).

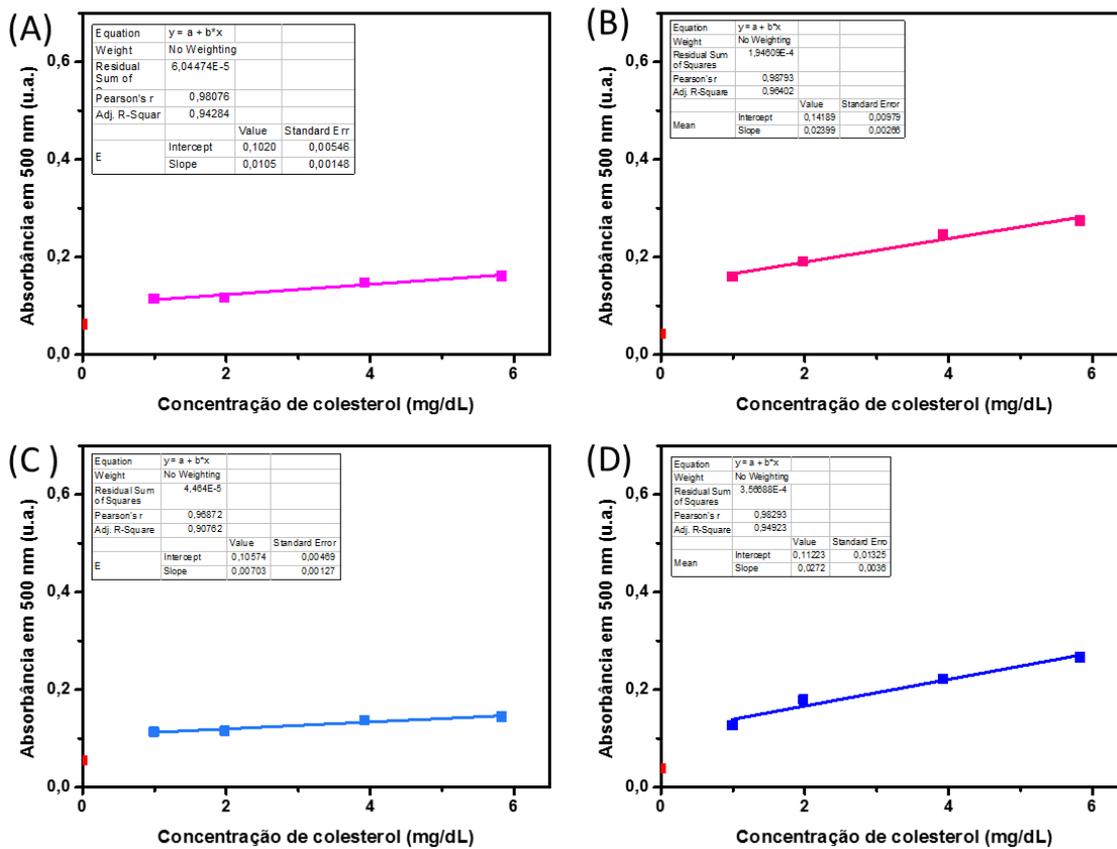


Figura S 38. Curvas analítica e regressão linear da quantificação de diferentes concentrações de colesterol utilizando os materiais OG (A). OG/ChOx (B), OG-La (C) e OG-La/ChOx (D).

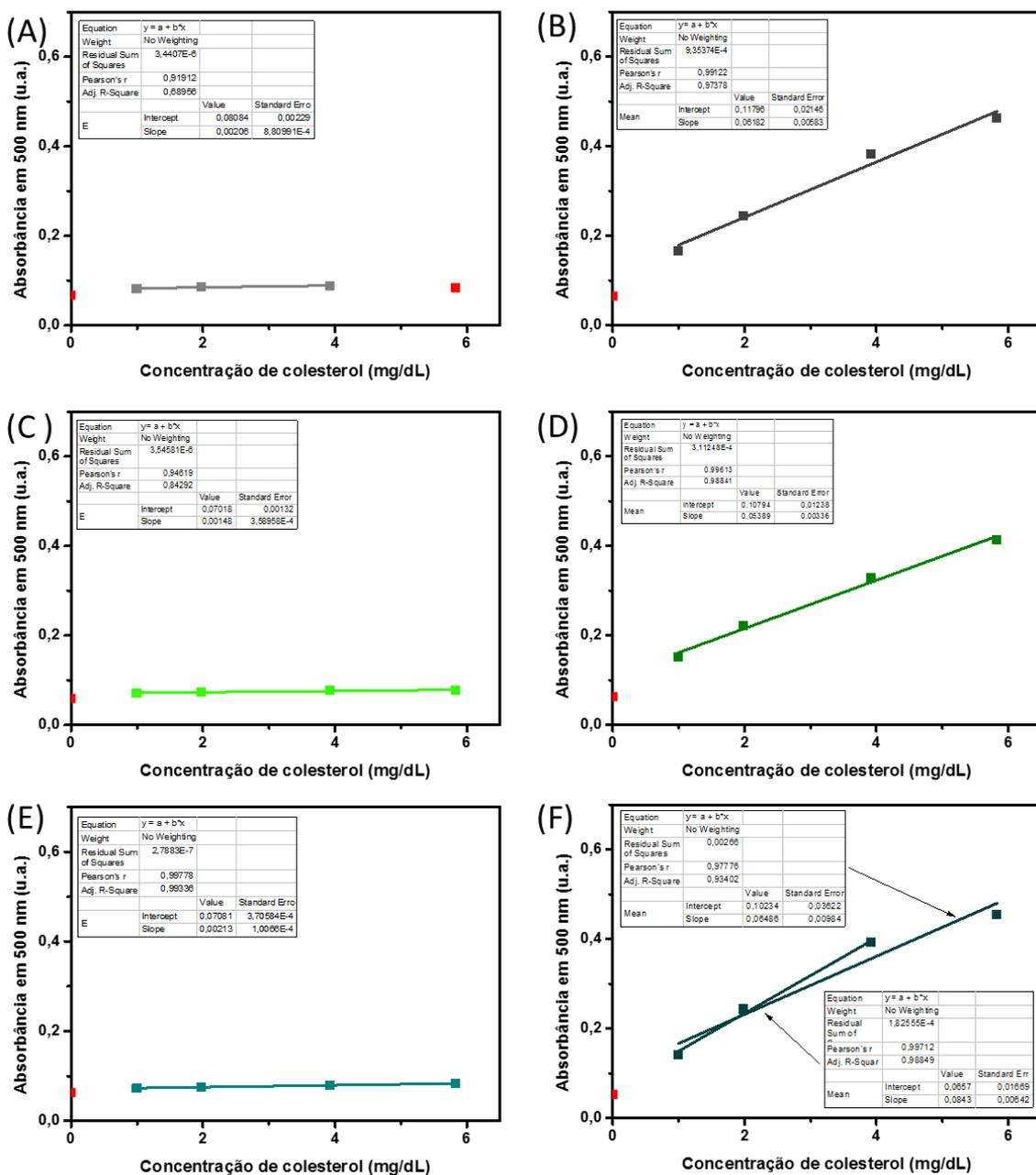


Figura S 39. Curvas analítica e regressão linear da quantificação de diferentes concentrações de colesterol utilizando os materiais OG-BTDIm (A). OG-BTDIm/ChOx (B), OG-La-BTDIm 2:1 (C), OG-La-BTDIm 2:1/ChOx (D), OG-La-BTDIm 1:1 (E) e OG-La-BTDIm 1:1/ChOx (F).

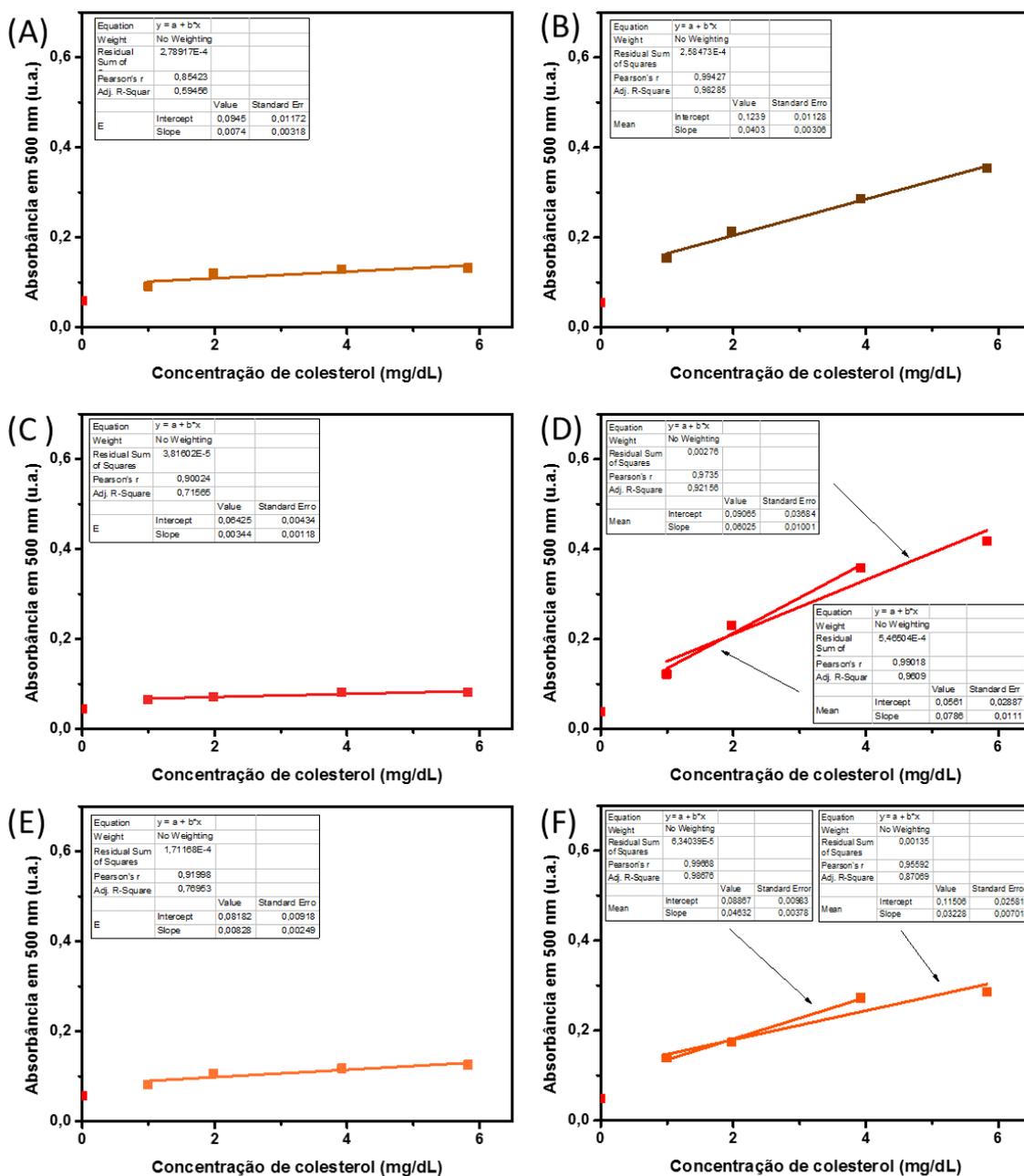


Figura S 40. Curvas analítica e regressão linear da quantificação de diferentes concentrações de colesterol utilizando os materiais OG-BTDAc (A), OG-BTDAc/ChOx (B), OG-La-BTDAc 2:1 (C), OG-La-BTDAc 2:1/ChOx (D), OG-La-BTDAc 1:1 (E) e OG-La-BTDAc 1:1/ChOx (F).

Tabela S3. Figuras de mérito das curvas analíticas para quantificação de colesterol total utilizando materiais de óxido de grafeno modificados com derivados de BTD sem a enzima colesterol oxidase

Material	Equação da curva analítica	Coefficiente de regressão (R ²)	Sensibilidade ^b	LOD ^c	LOQ ^c
OG	y=0,0105x+0,1020	0,9428	0,0105	0,53	1,77
OG-La	y=0,0070x+0,1057	0,9076	0,0070	0,29	0,98
OG-La-BTDIm 2:1	y=0,0015x+0,0702	0,8429	0,0015	1,13	3,76
OG-La-BTDIm 1:1	y=0,0021x+0,0708	0,9934	0,0021	1,37	4,56
OG-BTDIm	y=0,0021x+0,0808	0,6895	0,0021	0,56	1,85
OG-La-BTDAc 2:1	y=0,0034x+0,0642	0,7156	0,0034	0,12	0,43
OG-La-BTDAc 1:1	y=0,0083x+0,0818	0,7695	0,0083	0,08	0,26
OG-BTDAc	y=0,0074x+0,0945	0,5945	0,0074	0,38	1,26

^aParâmetros para a faixa de 0 a 3,9 mg dL⁻¹ de colesterol total. ^bA sensibilidade se refere ao coeficiente angular da equação da curva analítica cuja unidade é a razão entre a absorbância em unidades arbitrárias e a concentração de colesterol (mg dL⁻¹). ^cLimite de detecção (LOD) e limite de quantificação (LOQ) foram calculados a partir do desvio do branco de acordo com as equações 5 e 6 e estão expressos em mg dL⁻¹.

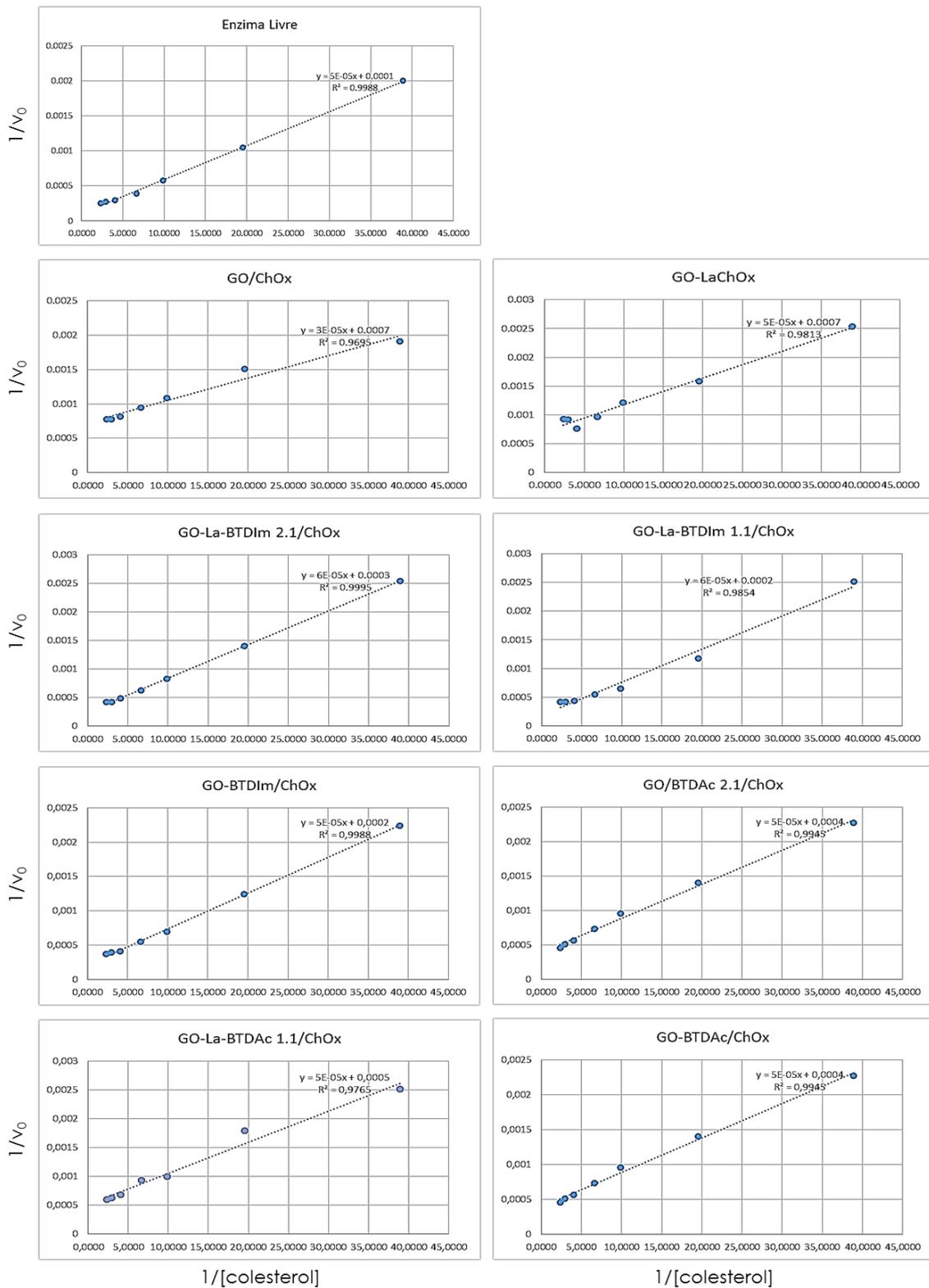


Figura S 41. Gráficos de Lineweaver-Burk da enzima livre e de todos os materiais com ChOx imobilizada com respectivas regressões lineares.