



FCTUC FACULDADE DE CIÊNCIAS
E TECNOLOGIA
UNIVERSIDADE DE COIMBRA

DEPARTAMENTO DE
ENGENHARIA MECÂNICA

A interação de filmes finos de “grafeno” com bactérias

Dissertação apresentada para a obtenção do grau de Mestre em Engenharia de
Materiais na Especialidade de Biomateriais

Autor

Diana Margarida Pereira Dias

Orientadores

Ana Paula da Fonseca Piedade

Paula Maria de Melim e Vasconcelos de Vitorino Morais

Júri

Presidente Professora Doutora Maria Teresa Freire Vieira
Professora Catedrática da Universidade de Coimbra

Vogais Doutora Ana Sofia Figueira Ramos
Investigadora Auxiliar da Universidade de Coimbra

Professora Doutora Ana Paula da Fonseca Piedade
Professora Auxiliar da Universidade de Coimbra

Coimbra, julho, 2015

“Se puderes olhar vê.
Se puderes ver, repara.”

José Saramago

Agradecimentos

O trabalho que aqui se apresenta só é possível pela colaboração de algumas pessoas a quem agradeço desde já.

À Professora Doutora Ana Paula Piedade pela atenção que me dedicou e pela paciência que teve para me ajudar neste trabalho.

À Professora Doutora Teresa Vieira pela disponibilidade e simpatia demonstrada ao longo do mestrado.

À Professora Doutora Paula Morais pela colaboração prestada sempre que necessário.

À Doutora Rita Branco pelo tempo que dispensou para me ajudar e pela constante disponibilidade para responder às minhas perguntas.

A todas as pessoas que estiveram presentes durante esta fase da minha vida e me ajudaram sempre que necessário.

Aos meus colegas que tornaram os anos vividos em Coimbra especiais e aos meus amigos que há tantos anos me apoiam.

Dedico o meu trabalho à minha família sem a qual nada disto seria possível.

A todos vós, Obrigada.

Resumo

A produção de grafeno é, usualmente, um processo dispendioso, moroso e de baixo rendimento. Por este motivo, materiais semelhantes ao grafeno ou GBM, do inglês *Graphene Based Materials*, têm vindo a ser utilizados em detrimento do grafeno. Neste contexto, o objetivo principal desta dissertação foi produzir GBM por pulverização catódica, uma tecnologia limpa e com capacidade de produção em escala superior à maioria das tecnologias usualmente utilizadas.

A deposição foi efetuada, por pulverização catódica r.f. magnetrão, em modo não reativo a partir de um alvo de grafite fazendo variar parâmetros de deposição como a densidade de potência, pressão, tempo e polarização do substrato. A caracterização por espectroscopia de Raman permitiu concluir que a estrutura dos filmes não varia com o tipo de substratos utilizados, Si, Cu, Al, aço 316L e lâminas de vidro. Os filmes finos depositados apresentavam defeitos estruturais, avaliados pela razão I_D/I_G , e o estudo efetuado permitiu concluir que os defeitos não são, maioritariamente, devidos à presença de ligações do tipo C-C sp^3 , mas sim à incorporação de oxigénio. Com efeito, a maior percentagem de ligações são do tipo C=C aromático, sp^2 , e, portanto, com estrutura semelhante à do grafeno.

A capacidade de reduzir os GBM produzidos foi avaliada com recurso a várias espécies bacterianas e os resultados comparados com os obtidos quando os filmes finos foram sujeitos a tratamento térmico, em atmosfera inerte de argon, às temperaturas de 600 e 800 °C. No caso dos tratamentos térmicos a 600 °C foi observada, num dos revestimentos testados, uma redução do número de defeitos em cerca de 1/3 do valor após deposição. O tratamento a 800 °C potenciou o aumento do número de defeitos, para o mesmo revestimento, o que aumentou a razão I_D/I_G para valores superiores a 1. A utilização de micro-organismos, especificamente da espécie *Escherichia coli*, também permitiu a diminuição da razão I_D/I_G , para valores semelhantes aos obtidos após o tratamento térmico a 600 °C. A análise, por espectroscopia do fotoeletrão X, de um dos revestimentos, após incubação com *E.coli* revelou uma reestruturação das ligações químicas em que o teor de ligações C=C do tipo aromático aumentou.

A utilização de diferentes espécies bacterianas possibilitou avaliar também o carácter antimicrobiano dos diferentes filmes finos estudados. Os resultados preliminares indicam que há variação da viabilidade celular dos micro-organismos testados, consoante o tipo de revestimento utilizado e a espécie bacteriana. No entanto, a maioria das células bacterianas apresentam uma morfologia atípica, caracterizada por um crescimento anormal, aparentemente devido à incapacidade de formação de um septo durante o processo de divisão.

Palavras-chave: Grafeno, Pulverização catódica, Redução Bacteriana, Espectroscopia de Raman, Antimicrobiano.

Abstract

Graphene production is usually an expensive process, time consuming and low-income. For this reason, graphene based materials (GBM) have been used instead of graphene. In this context the main objective of this work was to produce GBM, using sputtering, a clean technology with the ability to produce coatings in larger scale than most commonly used technologies.

The deposition was performed by r.f. magnetron sputtering, in nonreactive mode, from a graphite target and studying the influence of several deposition parameters such as power density, pressure, time and substrate bias. The characterization by Raman spectroscopy showed that the structure of the films does not vary with the type of substrate. The deposited thin films presented structural defects, measured by the ratio I_D/I_G , and the study demonstrated that the defects are not due to the presence of the C-C sp³ type bonds, but mostly as a consequence of oxygen incorporation. Indeed, the highest percentage of sp² C=C aromatic bonds and, therefore, similar to the graphene.

The ability to reduce the produced oxidised GBM was evaluated by using several bacterial species and the results compared with those obtained when the thin films were subjected to thermal treatment, under inert argon atmosphere, at temperatures of 600 and 800 °C. In the case of thermal treatment at 600 °C in one of the tested coatings, a reduction in the number of defects of about 1/3 of the value after deposition was observed. The treatment at 800 °C potentiated the number of defects for the same coating, with the ratio I_D/I_G attaining values greater than 1. The use of micro-organisms, in particular *Escherichia coli*, also enabled the reduction of the ratio I_D/I_G for values to similar those obtained after thermal treatment at 600 °C.

The use of different bacterial species made it possible to evaluate the antimicrobial character of different deposited thin films. Preliminary results indicate a change in cell viability of the micro-organisms, depending on the type of coating used and the bacterial specie. However, most of the bacterial cells exhibit a distinctive morphology, characterized by abnormal growth, probably due to inhibition of cell formation during the division process.

Keywords Graphene, Sputtering, Bacterial Reduction, Raman Spectroscopy, Antimicrobial.

Índice

Índice de Figuras	viii
Índice de Tabelas	ix
Simbologia e Siglas	x
Simbologia.....	x
Siglas	xi
Introdução.....	1
1. Grafeno e Materiais Baseados em grafeno	3
1.1. Algumas Propriedades.....	4
1.2. Aplicações	5
1.3. Síntese de Grafeno e Materiais Baseados em Grafeno.....	6
1.3.1. Grafeno e Pulverização Catódica	8
1.3.2. Redução Bacteriana de Óxidos.....	11
2. Métodos Experimentais	14
2.1. Técnica de Deposição.....	14
2.2. Tratamento Térmico	15
2.3. Técnicas de Caracterização	16
2.3.1. Microsonda Eletrónica	16
2.3.2. Espectroscopia do Fotoeletrão X.....	16
2.3.3. Espectroscopia de Infra Vermelhos por Transformada de Fourier.....	17
2.3.4. Espectroscopia do Visível	17
2.3.5. Microscópio Eletrónico de Varrimento	18
2.3.6. Microscopia de Força Atómica.....	19
2.3.7. Espectroscopia de Raman.....	19
2.3.8. Medição do Ângulo de Contacto Estático	20
2.3.9. Potencial Eletrocínético	20
2.4. Testes Microbianos.....	21
2.4.1. Incubação das Superfícies com Revestimento na Presença das Estirpes Bacterianas e Fixação	21
2.4.2. Testes de Viabilidade.....	23
3. Apresentação dos Resultados e Discussão	25
3.1. Composição Química e Grupos Químicos	25
3.2. Morfologia/ Topografia	29
3.3. Espectroscopia de Raman.....	33
3.4. Molhabilidade.....	37
3.5. Espectroscopia do Visível	38
3.6. Potencial Eletrocínético	39
3.7. Testes Microbianos.....	41
3.8. Tratamentos Térmicos	47
Conclusões.....	49

Referências Bibliográficas.....	51
Anexo A.....	A1
Apêndice A – Após Deposição.....	A2
Apêndice B – Testes Microbianos.....	A9
Apêndice C – Tratamentos Térmicos.....	A12

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.1 Representação esquemática de algumas formas alotrópicas do carbono (imagem adaptada de [8]).	4
Figura 1.2 Representação esquemática dos diferentes métodos de produção de grafeno e GBM.	11
Figura 3.1 Desconvolução dos espectros XPS de alta resolução do filme fino G2: a) espectro de alta resolução do C; b) espectro de alta resolução do O.	26
Figura 3.2 Espectro de FTIR das superfícies a) G2 (laranja), b) G7 (azul) e c) G10 (verde).	28
Figura 3.3 Micrografias das superfícies a) G1, b) G2, c) G3, d) G4, e) G5, f) G6, g) G7, h) G8, i) G9, j) G10.	29
Figura 3.4 Imagens de topografia das superfícies a) G1, b) G2, c) G3, d) G4, e) G5, f) G6, g) G7 e h) G10 (1x1 μm).	31
Figura 3.5 Imagens de topografia da deposição G2, a) 1x1 (μm) e b) 0,2x0,2 (μm).	33
Figura 3.6 Espectro de Raman das superfícies a) G2, b) G7 e c) G10.	35
Figura 3.7 Espectro do Visível das superfícies G2 (laranja), G4 (rosa), G7 (azul) e G10 (verde).	38
Figura 3.8 Relação entre os valores do ângulo de contacto com água e o potencial zeta das superfícies.	40
Figura 3.9 Micrografias da bactéria <i>E. coli</i> após contacto com as superfícies a) G2; b) G7; c) G10 e d) morfologia nativa.	41
Figura 3.10 Micrografias da bactéria <i>S. aureus</i> após contacto com as superfícies a) G2; b) G7; c) G10 e d) morfologia nativa.	42
Figura 3.11 Micrografias da bactéria <i>P. aeruginosa</i> após contacto com as superfícies a) G2; b) G7; c) G10 e d) morfologia nativa.	42
Figura 3.12 Micrografias da bactéria <i>S. putrefaciens</i> após contacto com as superfícies a) G2; b) G7; c) G10 e d) morfologia nativa.	43
Figura 3.13 Percentagem de colónias viáveis após incubação das células nas superfícies G2, G7 e G10.	44
Figura 3.14- Espectro de Raman da superfície G2 a) após deposição e b) após incubação na presença da <i>E. coli</i> .	45
Figura 3.15 Espectro de Raman da superfície G2 após tratamento térmico a) 600 °C e b) 800 °C.	47
Figura 3.16 Espectro de Raman das superfícies a) G) e b) G10, após tratamento térmico a 600 °C.	48

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 2.1 Parâmetros utilizados na deposição das superfícies G1-G10.	15
Tabela 3.1 Composição química dos filmes finos por EPMA e XPS.	25
Tabela 3.2 Ligações e % relativas das composições químicas determinadas a partir dos espectros de alta resolução, de carbono e oxigénio, determinado por XPS	27
Tabela 3.3 Grupos funcionais identificados a partir dos espectros de FTIR.....	28
Tabela 3.4 Espessuras dos filmes finos G1 a G10 avaliadas pelas micrografias de SEM de secção transversal.	31
Tabela 3.5 Razão das intensidades do pico D e G, representada por I_D/I_G , para os filmes finos estudados.	36
Tabela 3.6 Avaliação da hidrofiliicidade das superfícies por medição do ângulo de contacto com água.....	37
Tabela 3.7 Valores do potencial zeta dos revestimentos avaliado em KCl 1mM, pH 7,0. .	39
Tabela 3.8 Razão das intensidades do pico D e G, representada por I_D/I_G , para os filmes finos G2, G7 e G10 antes e após incubação na bactéria <i>E. coli</i>	46
Tabela 3.9 Comparação, por análise XPS, das ligações químicas existentes na superfície G2 após deposição e após incubação com uma suspensão de <i>E. coli</i>	47
Tabela 3.10 Razão I_D/I_G das superfícies G2, G7 e G10 após deposição, após incubação na bactéria <i>E.coli</i> e após tratamento térmico (TT) a 600 °C e 800 °C.....	48

SIMBOLOGIA E SIGLAS

Simbologia

A – Quantidade de luz absorvida

A_L – Secção transversal do canal de medição

c – Concentração

$\frac{dl}{dp}$ – Declive da curva dos valores da corrente em função da pressão

E – Módulo de Elasticidade

f_0 – Frequência de Ressonância

L – Comprimento do canal de medição

l – Percurso ótico da radiação

ε – Constante dielétrica do eletrólito

ε_0 – Permittividade em vácuo

ε_1 – Coeficiente de absorção molar

η – Viscosidade do eletrólito

γ_{lv} – Tensão de Interface líquido-vapor

γ_{sl} – Tensão de Interface sólido-líquido

γ_{sv} – Tensão de Interface sólido-vapor

λ – Comprimento de onda da radiação incidente

θ_γ – Ângulo de contacto

ξ – Potencial Zeta

Siglas

AFM – Atomic Force Microscopy

ATR – Attenuated Total Reflectance

CFU – Colony Forming Units

CVD – Chemical Vapour Deposition

EPMA – Electron Probe Microanalysis

FTIR – Fourier Transform InfraRed

GBM – Graphene Based Materials

GO – Graphene Oxide

GQD's – Graphene Quantum Dots

HOPG – Highly Oriented Pyrolytic Graphite

IUPAC – International Union of Pure and Applied Chemistry

PVD – Physical Vapour Deposition

rGO – reduced Graphene Oxide

SEM – Scanning Electron Microscopy

STM – Scanning Tunnelling Microscopy

XRD - X-ray Diffraction

XPS – X-ray Photoelectron Spectroscopy

INTRODUÇÃO

O grafeno, a monocamada de átomos de carbono constituinte da grafite, isolado e caracterizado pela primeira vez em 2003 por Andre Geim e Konstantin Novoselov na universidade de Manchester é, para muitos, o material do século XXI devido às suas propriedades, consideradas excepcionais. A elevada resistência à tração, 130 GPa, a boa condutividade térmica, superior a $3000 \text{ W.m}^{-1}\text{.K}^{-1}$, e um módulo de elasticidade de 1 TPa são apenas alguns dos exemplos que sustentam as premissas do grafeno ser o material revolucionário do corrente século.

Para que este material bidimensional possa cumprir com muitas das esperanças que nele são depositadas é necessário que a sua produção seja efetuada segundo uma tecnologia acessível, económica e ambientalmente sustentável. No entanto, desde cedo que este aspeto se revelou um desafio, não pela falta de métodos para a sua produção mas sim porque produzir grafeno, a baixo custo, com um grau de defeitos reduzido, em quantidade suficiente para a produção em grande escala, continua a ser um problema com que os investigadores de todo o mundo se debatem desde 2003.

Os materiais da família do grafeno ou GBM, do inglês *Graphene Based Materials*, nos quais se incluem os seus óxidos e materiais com espessura superior à da monocamada, surgem como uma alternativa de produção mais acessível e de elevada aplicabilidade, nomeadamente como reforço na produção de materiais compósitos e transportadores de fármacos. Alguns dos métodos de produção de grafeno requerem um passo subsequente de redução o que conduz a materiais com toxicidade associada, pois o agente redutor vulgarmente utilizado, a hidrazina, é cancerígeno. Nesse sentido ao longo dos últimos anos a investigação tem procurado novos métodos de modificação dos GBM, através do uso de tecnologias limpas e sem toxicidade associada.

É neste âmbito que se insere o objetivo desta dissertação que incide sobre o desenvolvimento de um método para a produção de GBM, através da utilização de pulverização catódica, como tecnologia limpa e económica. A posterior redução dos materiais depositados será testada usando bactérias. Esta abordagem permite não só testar a

capacidade de vários micro-organismos em, efetivamente, modificar os GBM depositados, como aferir da atividade antibacteriana destas mesmas superfícies.

A dissertação está dividida em três capítulos, em que o primeiro inclui uma breve revisão bibliográfica sobre a produção de grafeno e GBM, bem como algumas das abordagens para a redução destes últimos. O segundo capítulo inclui os diferentes métodos e condições experimentais e, por fim, no terceiro capítulo são apresentados e discutidos os resultados do estudo.

1. GRAFENO E MATERIAIS BASEADOS EM GRAFENO

O grafeno, uma monocamada de grafite composta por átomos de carbono com ligações sp^2 e espessura de um átomo, foi isolado e caracterizado pela primeira vez em 2003 na Universidade de Manchester, no Reino Unido, por Andre Geim e Konstantin Novoselov. O feito foi publicado em 2004, na revista *Science* [1], o que despoletou o interesse de vários grupos de investigação nos anos que se seguiram. A designação oficial surge em 1994 na IUPAC (do inglês, *International Union of Pure and Applied Chemistry*), na qual o grafeno é definido como uma monocamada de carbono da estrutura da grafite, com natureza química descrita por analogia aos hidrocarbonetos aromáticos policíclicos de tamanho quase infinito [2].

Nos anos que se seguiram o estudo sobre grafeno intensificou exponencialmente e em 2010 é atribuído o Nobel da Física a A. Geim e K. Novoselov “*pelos seus trabalhos revolucionários sobre o material bidimensional, grafeno*” [3,4].

O grafeno possui estrutura hexagonal bidimensional (2D) com distância entre átomos de carbono de 0,142 nm, e pode ainda ser considerado como a unidade básica de outras formas alotrópicas do carbono. A Figura 1.1 apresenta uma representação esquemática das estruturas formadas a partir do carbono como o fulereno, que pode ser definido como um material de dimensão zero (0D), os nanotubos de carbono monodimensionais (1D) e a grafite com estrutura tridimensional (3D) [1,5,6].

No entanto, devido à dificuldade de produção de grafeno e devido à procura incessante de algo ainda dificilmente alcançado, o termo grafeno tem sido utilizado de forma errada. Por esta razão, ao longo deste trabalho a designação “grafeno” diz respeito a uma monocamada de átomos de carbono, estrutura química hexagonal e com ligações sp^2 . Todos os restantes materiais de carbono com ligações sp^2 são aqui referidos como materiais da família do grafeno (GBM - do inglês *graphene based materials*), que incluem o óxido de grafeno, o óxido de grafeno reduzido, multicamadas de grafeno e compósitos onde o grafeno é usado como reforço, e que são definidos seguindo os princípios utilizados num artigo dos editores da revista *Carbon* [7].

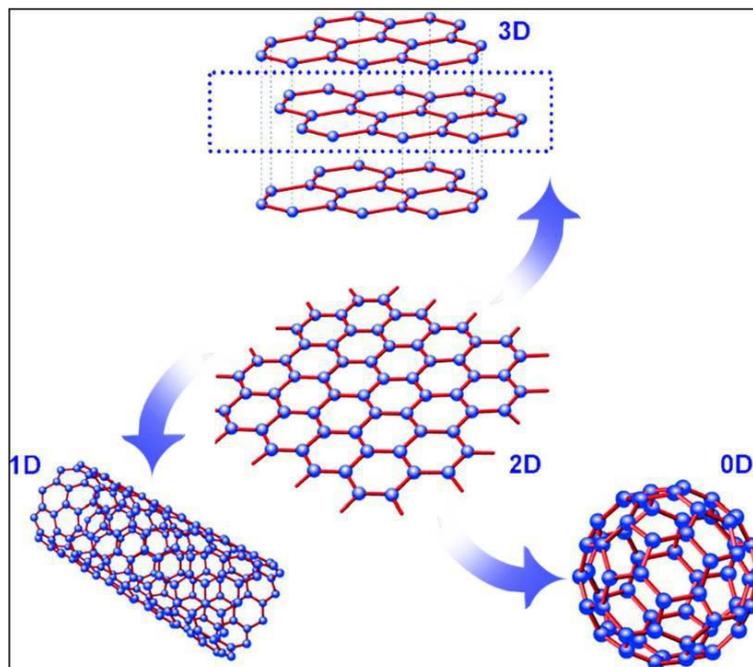


Figura 1.1 Representação esquemática de algumas formas alotrópicas do carbono (imagem adaptada de [8]).

1.1. Algumas Propriedades

“Os cientistas já utilizaram quase todos os superlativos de que se lembraram para descrever o grafeno. Esta “teia de aranha” com a espessura de um átomo de carbono é flexível, transparente, mais resistente que o aço, mais condutor que o cobre e tão fino que é efetivamente bidimensional (2D). Assim que foi isolado tornou-se numa obsessão para os investigadores de todo o mundo” [9]. Com efeito, o grafeno apresenta mobilidade de elétrons à temperatura ambiente de $2,5 \times 10^5 \text{ cm}^2 \cdot \text{V}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$, absorção da luz visível de 2,3 % e condutividade térmica superior a $3000 \text{ W} \cdot \text{m}^{-1} \cdot \text{K}^{-1}$ [6,10-12].

C. Lee e colaboradores [13], com o objetivo de testar as propriedades mecânicas do grafeno, colocaram uma camada de grafeno, obtida por esfoliação mecânica, sobre um substrato de Si/SiO₂ poroso com diâmetro entre 1,0 e 1,5 μm . A camada de grafeno foi colocada sobre os poros abertos e deformada com uma ponta de um equipamento de microscopia de força atômica, para determinar o módulo de Young (E) e a resistência à tração. O módulo de Young foi determinado pela aplicação gradual de uma carga, até a um valor máximo de 1200 nN. A resistência à tração foi calculada pela

aplicação de uma carga capaz de induzir a rotura da folha de grafeno. Neste caso, as cargas utilizadas foram de 1,8 e 2,9 μN , para grafeno sobre poros com diâmetros de 1,0 e 1,5 μm , respetivamente. Com este trabalho os investigadores determinaram os valores do módulo de Young de 1,0 TPa e de resistência à tração de 130 GPa. Outros estudos, como os de C. Gómez-Navarro [14] e J. Suk [15], complementaram este tipo de avaliação ao demonstrar que estas excelentes propriedades, de que é exemplo o valor de E, são exclusivos do grafeno e que os GBM apresentam valores inferiores.

No entanto, os GBM podem apresentar vantagens visto que é possível obter estes materiais por uma metodologia mais simples, com redução de custos associada e, por vezes, são escolhidos em detrimento do grafeno. Com efeito, os investigadores que fazem parte do projeto europeu *Graphene Flagship* já admitiram que em muitas aplicações camadas de GBM, com propriedades inferiores às ideais, terão que ser utilizadas [16]. Um dos exemplos pode ser a questão da molhabilidade superficial do grafeno e dos seus derivados. O grafeno apresenta carácter hidrofílico e, conseqüentemente, só podem ser obtidas dispersões estáveis em solventes orgânicos ou pela adição de surfactantes próprios; o óxido de grafeno (GO) apresenta grupos funcionais contendo oxigénio que podem reduzir a estabilidade térmica do material, mas que são importantes para promover a interação com compostos químicos, como o poli(etileno glicol), que estabiliza a compatibilidade do material com solventes polares [17]. Esta é uma das vantagens do GO em relação ao grafeno para aplicações biomédicas, de que é exemplo o estudo efetuado por Z. Liu e colaboradores onde o GO é utilizado como suporte para transportar fármacos insolúveis no meio biológico [18].

1.2. Aplicações

Toda a atenção reunida em volta do grafeno deu origem a um elevado número de projetos para aplicações nas mais diversas áreas, por esta razão, em 2013, a União Europeia financiou o já referido *Graphene Flagship* com o objetivo de unir a comunidade científica e tentar que num espaço de 10 anos seja possível transpor a investigação de nível académico e industrial, para a sociedade [19].

A. Ferrari e colaboradores [20] elaboraram, recentemente, um artigo de revisão onde afirmam que, devido à combinação de propriedades do grafeno e dos GBM, não é

uma questão de se os GBM vão ter utilidade, mas sim de quantas aplicações poderemos vir a beneficiar no futuro com estes materiais. Este grupo de investigadores considera o grafeno uma mais-valia para a sociedade e prevê que as aplicações atinjam o seu auge a partir de 2024 mencionando múltiplas aplicações que incluem ecrãs táteis, baterias, supercondensadores para armazenamento de energia entre outras [20].

Como já referido, os GBM também podem ser úteis no âmbito da biomedicina e para K. Kostarelos e K. Novoselov [21] esta é uma área bastante promissora apesar de se encontrar ainda no início do desenvolvimento. Com efeito, a capacidade de ajustar algumas características dos GBM, como a capacidade de funcionalização da superfície e a variação das dimensões laterais, da escala nanométrica para a escala milimétrica, implica a alteração da espessura do material, e, conseqüentemente, a sua flexibilidade. No entanto, quando se fala de um biomaterial é a citotoxicidade o fator a ter em conta e esta é uma vertente ainda pouco explorada. O grupo de A. Seabra [22] fez uma extensa revisão bibliográfica a partir da qual foi possível concluir que muitos dos trabalhos existentes até à data são contraditórios, razão pela qual a aplicação de grafeno e dos GBM como biomateriais está ainda nos seus primórdios.

1.3. Síntese de Grafeno e Materiais Baseados em Grafeno

A fase de síntese de um material pode ser considerada a mais importante para o seu desenvolvimento e, no caso do grafeno e dos GBM, este é um aspeto que desde cedo se revelou um desafio. Até hoje continua a pesquisa para encontrar uma metodologia simples, economicamente e ambientalmente sustentável. O método utilizado por A. Geim e K. Novoselov quando isolaram e caracterizaram grafeno pela primeira foi a **Esfoliação Mecânica** que consistiu em utilizar fita-cola para remover as camadas superficiais de grafite pirolítica super orientada, ou HOPG, do inglês *highly oriented pyrolytic graphite*. A fita-cola foi posteriormente pressionada sobre um substrato de sílica onde o material obtido ficou depositado. Durante este processo os resíduos de carbono na fita-cola são superiores a uma camada, mas as forças de van der Waals registadas na interface substrato/carbono são suficientes para que, ao retirar a fita-cola do substrato, ocorra delaminação de uma única camada de grafeno que fica sobre o substrato. O método requer, além de tempo, muita perícia por parte do investigador e o processo, apesar da elevada pureza do material,

tem um baixo rendimento [3,6,11]. Esta é, na sua essência, uma ideia simples mas que levou a um dos maiores contributos para o progresso neste campo.

A **Deposição Química em Fase Vapor**, ou CVD - do inglês *Chemical Vapour Deposition*, é um dos métodos mais utilizados e estudados na produção de grafeno e GBM. O processo de deposição é, geralmente, iniciado pela introdução de hidrocarbonetos, sob a forma de gás, no interior de uma câmara aquecida (800 – 1100 °C) com o objetivo de decompor o gás na superfície de um metal de transição, como o níquel, utilizado simultaneamente como catalisador e substrato, permitindo que os átomos de C formem radicais e se reorganizem na superfície para formar os anéis com as ligações sp^2 características do grafeno [23,24]. O processo de obtenção de grafeno por CVD depende de vários fatores, desde o material do substrato às condições de deposição utilizadas, sendo um dos seus maiores inconvenientes a necessidade de temperatura elevadas. Este facto limita o material a ser utilizado como substrato que por sua vez influencia as propriedades do grafeno produzido pois, distintos coeficientes de dilatação, entre o filme e o substrato, podem induzir tensões que promovem a ondulação da superfície do grafeno após arrefecimento. Uma das outras desvantagens da utilização desta técnica é o facto de os compostos químicos utilizados na obtenção do grafeno serem tóxicos e nocivos para o meio ambiente [25, 26].

Um método também bastante comum na síntese de grafeno e GBM é a **Esfoliação em Fase Líquida**, onde é possível obter grafeno reduzido ou rGO, do inglês *reduced Graphene Oxide*, e grafeno oxidado ou GO, do inglês *Graphene Oxide*, a partir de grafite oxidada e posteriormente reduzida. O método consiste na oxidação da grafite pelo método de Hummers¹ ou variações deste. A grafite oxidada é extremamente hidrofílica, de tal modo que quando em contacto com água as camadas de grafite são intercaladas por moléculas de água aumentando o espaço interplanar, de 0,34 nm para valores entre 0,6 e 1,2 nm [28]. Com objetivo de aumentar ainda mais este espaçamento e, conseqüentemente, facilitar a separação das camadas, a grafite oxidada pode ser submetida a um tratamento térmico dando origem a grafite expandida que, depois de sujeita a ultrassons para separar as camadas e, caso seja necessário, após centrifugação, origina grafeno oxidado [29-30]. Dependendo da aplicação pode ser necessária posterior redução química tal como efetuada por V. Tung e colaboradores [31] que apresentam um bom exemplo de redução química

¹ Descrição do método na referência [27].

onde rGO foi obtido por imersão do GO em hidrazina anidra (NH_2NH_2)². No entanto uma das grandes desvantagens do processo é a elevada toxicidade da hidrazina que pode gerar graves problemas não só no seu manuseamento, e conseqüente impacto ambiental, mas também para a aplicação deste GBM como biomaterial. Por este motivo, tecnologias mais ecológicas têm vindo a ser desenvolvidas, entre as quais a redução de GO por ação bacteriana, uma alternativa que vai ser abordada na secção 1.3.2. desta dissertação. O método de esfoliação em fase líquida além do inconveniente da utilização de reagentes tóxicos não permite a obtenção de grafeno puro, pois a redução nunca apresenta 100% de rendimento, apesar de ter um baixo custo económico [32].

Uma tecnologia ainda pouco explorada na deposição de grafeno é a Pulverização Catódica que, por ser utilizado no presente trabalho, é referida separadamente.

1.3.1. Grafeno e Pulverização Catódica

A técnica de pulverização catódica (*sputtering*) magnetrão por rádio frequência (r.f.) é uma das tecnologias englobadas na designação global de PVD, do inglês *Physical Vapour Deposition*, e que se baseia na formação, a pressões reduzidas, de iões a partir de um gás, como o argon (Ar). A colisão destes iões com o material que constitui o alvo, colocado no cátodo, induz a ejeção dos átomos que vão condensar sob a forma de filme fino nos substratos colocados no ânodo. Na pulverização catódica o modo magnetrão recorre à utilização de um conjunto de magnetrões, usualmente colocados na parte de trás do alvo, que gera um campo magnético forte, aumentando a densidade do plasma perto do alvo. A utilização de rádio frequência, de 13,56 MHz, oferece vantagens adicionais, como a capacidade de depositar a partir de materiais não condutores [33]. Este é um método no qual as temperaturas não são demasiado elevadas, permitindo a utilização de uma alargada gama de materiais como substrato, e pode ser considerada uma tecnologia verde. No que concerne à sua aplicação para a obtenção de grafeno e GBM é uma técnica ainda pouco utilizada pelo que são escassos os estudos encontrados na literatura. No entanto, os artigos existentes são pouco coerentes e contraditórios, por essa razão apenas alguns estudos são referidos nesta revisão.

² Ficha de segurança da hidrazina em anexo.

O estudo de M. Ionescu e do seu grupo [34] incide sobre a deposição de carbono por pulverização catódica r.f. a partir de um alvo de grafite sobre substratos de Si, Al, Ni, e Cu, a uma temperatura de 620 °C, numa atmosfera inerte de Ar com um fluxo de 14 sccm (*standard cubic centimeters per minute*). Os restantes parâmetros de deposição utilizados foram: pressão de deposição de 2 Pa, tempo de 10 min, com potência do alvo de 100 W e distância alvo-substrato de 150 mm. Este conjunto de parâmetros de deposição deu origem a filmes finos com cerca de 3 nm que, após caracterização por espectroscopia de micro Raman, permitiu ao grupo de investigação concluir que a tecnologia permite a síntese de grafeno. No entanto, uma observação atenta dos resultados apresentados de espectroscopia de Raman não permite concluir que de facto ocorreu síntese de grafeno dado que: i) a banda 2D, característica do grafeno, não possui a intensidade suficiente e ii) a banda D apresenta uma intensidade elevada o que é característico de um material com elevado grau de desordem estrutural e que no espectro de monocamadas de grafeno a banda D praticamente não ocorre. Assim, é possível concluir que o grupo de M. Ionescu foi precipitado ao referir que conseguiram produzir grafeno através de pulverização catódica, pois aparentemente produziram GBM.

M. Sato e colaboradores [35] produziram um GBM, com várias camadas de grafeno, por recozimento de carbono amorfo, anteriormente depositado por pulverização catódica, para determinar a influência de um catalisador. No seu trabalho, o grupo de M. Sato depositou carbono amorfo a partir de um alvo de grafite em substratos de Co, Ni, Cu, Pt, Au, Ti e SiO₂/Si. As deposições foram realizadas à temperatura ambiente com uma pressão de 1 Pa, potência de 250 W e foi utilizado Ar como gás de descarga. De seguida foram efetuados vários recozimentos, entre 200 e 800 °C, durante 30 minutos com atmosfera controlada de azoto. Após caracterização, realizada por espectroscopia de Raman, espectroscopia de fotoeletrão X ou XPS, do inglês *X-ray Photoelectron Spectroscopy* e difração de raios X ou XRD, do inglês *X-ray Diffraction*. O grupo de M. Sato concluiu que o uso de Co após recozimento a temperaturas superiores a 800 °C é a melhor opção para produzir grafeno multicamadas. Isto é, o uso de Co como catalisador permite uma reestruturação do carbono na superfície, o que ficou evidenciado pelos espectros de Raman onde ocorreu a separação dos picos D e G. Quando o filme de carbono foi depositado sobre SiO₂/Si, mesmo com recozimentos a 800 °C, o espectro de Raman não era definido, nomeadamente na separação dos picos G e D. A caracterização por XPS

revelou que 60% das ligações eram do tipo sp^2 , C=C, e 40 % de outro tipo de ligações, C=O, C-O, C-H e C-C. Estes resultados provam que o material produzido pelo grupo de M. Sato, além de possuir uma elevada percentagem de ligações diferentes da C=C aromática característica do grafeno, nas quais se incluem C-O, é GBM e, para conseguir grafeno este grupo de investigadores teria que recorrer a um tratamento para a redução do material oxidado.

H. Zu e colaboradores [36] tentaram produzir *dots* quânticos de grafeno ou GQD's, do inglês *Graphene Quantum Dots*, por pulverização catódica a partir de um alvo composto de ZnO (99,26 % pd.) e grafite (0,74 %pd.), para evitar a agregação dos GQD's durante o processo de deposição. Para tal utilizaram as seguintes condições: P = 0,067 Pa, Potência = 40 W, t= 30 minutos, substrato de Si e gás de descarga Ar. O ZnO foi removido dos filmes finos por imersão em ácido clorídrico (H_2SO_4). A caracterização por XPS permitiu confirmar a eliminação do ZnO, apesar de ter sido identificada a ligação C-O. A espectroscopia de Raman permitiu avaliar a presença de defeitos, a partir da razão das intensidades das bandas intensidade da banda D e G que tinha o valor 0,7. No entanto, deve ser realçado que como não foi apresentada, nos espetros Raman, a banda 2D não é possível concluir se os GQD's tinham uma estrutura semelhante à do grafeno ou não.

Os métodos de síntese apresentados estão resumidos de forma esquemática na figura 1.2 onde se pode observar o ponto de partida de cada método e o processo associado.

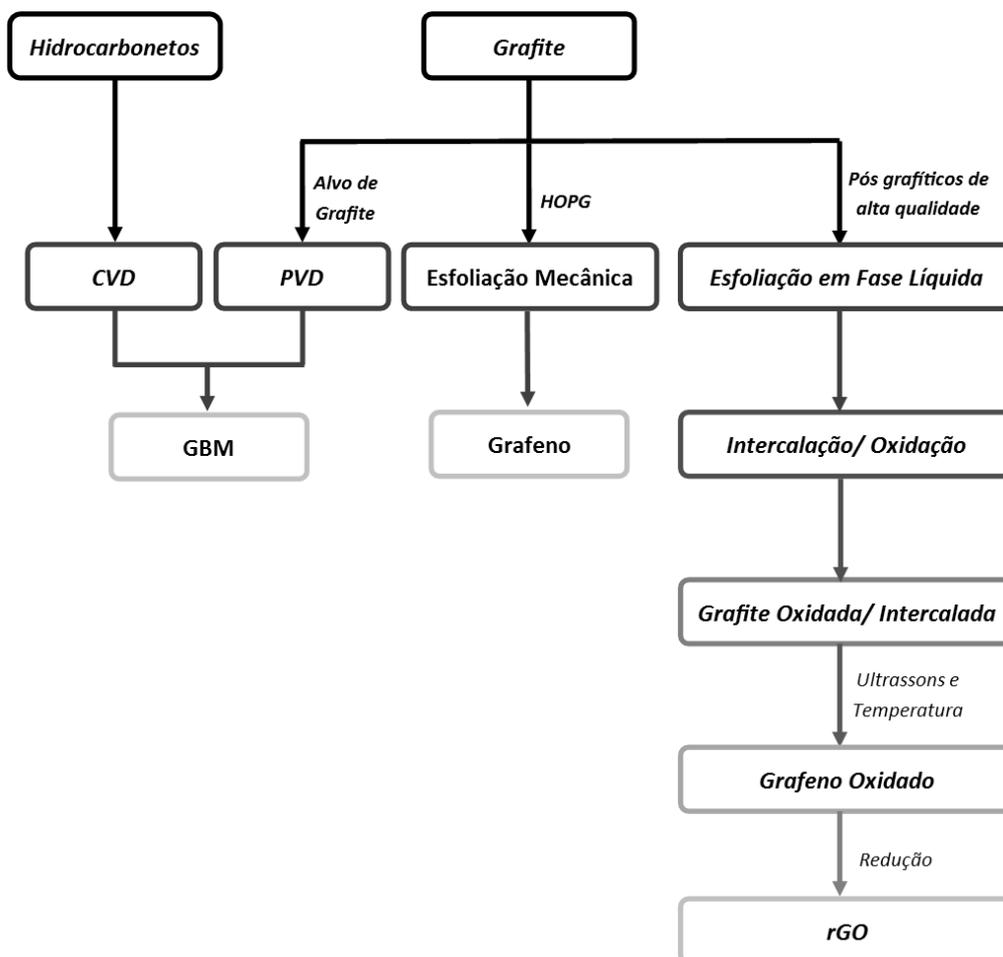


Figura 1.2 Representação esquemática dos diferentes métodos de produção de grafeno e GBM.

1.3.2. Redução Bacteriana de Óxidos

A síntese do grafeno e dos GMB continua a ser um desafio, devido à dificuldade de redução total dos óxidos e à toxicidade inerente aos reagentes químicos muitas vezes utilizados para o efeito. Nesse sentido, a investigação sobre novas abordagens que permitam obter rGO com níveis de redução semelhantes ou melhores do que os métodos já apresentados e que constituam uma alternativa simples, de baixo custo, escalável e ecológica é uma área em franco desenvolvimento. De entre as várias abordagens a utilização de bactérias para este fim foi a alternativa selecionada no presente estudo.

O primeiro trabalho relatado na redução bacteriana do GO foi apresentado em 2010 por E. Sallas e colaboradores [37], onde várias espécies do género *Shewanella* foram

incubadas com suspensão de GO preparada quimicamente a partir de pó de grafite. Estes investigadores testaram a condutividade elétrica do GO após 72 h de incubação, em meio anaeróbico, e verificaram um aumento significativo, de 10^{-5} para 10^{-2} μA . Após análise por XPS foi observado que a percentagem de ligações C-C, era superior a 95 % o que significa que as condições utilizadas foram favoráveis à redução. No entanto, é importante referir que o valor da ligação sp^2 reportado no artigo é de 285 eV o que, quando comparado com algumas bases de dados [38], implica, para esta energia, ligações C=C não aromático ou C-C sp^3 logo, em ambos os casos não é possível afirmar que o material final é grafeno ou um GBM.

Seguindo o trabalho de E. Sallas [36], G. Wang e o seu grupo [39] testaram a capacidade de redução bacteriana de GO a partir de bactérias do género *Shewanella* mas em meio aeróbico. Com efeito, o grupo de G. Wang propõe que este é um género de bactéria versátil em termos respiratórios pelo que pode crescer em meios aeróbios ou anaeróbios. O facto de o meio ser aeróbico promove um maior crescimento bacteriano, o que leva a uma maior necessidade de consumo de oxigénio. Como as células bacterianas não conseguem sobreviver apenas com o oxigénio do meio são obrigadas a utilizar uma fonte alternativa, ou seja, reduzem o GO.

O grupo de investigação liderado por O. Akhavan [40] e E. Ghandni e S. Gurunathan [41] estudaram a capacidade redutora da *Escherichia coli* (*E. coli*) por incubação de filmes de GO, produzidos por esfoliação em fase líquida. No caso estudado por O. Akhavan, o GO foi depositado em substratos de SiO_2/Si e incubado em suspensão bacteriana por 48 h. Ao fim de 12, 24, 36 e 48 h foi avaliada a resistividade dos filmes para verificar se teria havido redução. O grupo concluiu não só que a resistência diminuiu de valores de 10^4 para 10^2 $\text{M}\Omega/\text{sq}$, entre 0 e 48 h, como a razão indicativa de defeitos, razão I_D/I_G , calculada a partir dos espectros de Raman diminuiu, facto que pode ser justificado pela reorganização dos átomos de carbono com formação de ligações sp^2 . Durante este trabalho, O. Akhavan refere também o carácter antibacteriano do GO na cultura já que ao fim de 48 h não existiam células viáveis na superfície.

Outro exemplo de redução bacteriana é apresentado por S. Gurunathan e colaboradores [42] que estudaram a redução GO por incubação com uma suspensão bacteriana da bactéria *E.coli* a 37 °C, durante 72 h. A redução foi avaliada por espectroscopia UV/Visível e por espectroscopia de Raman, entre outras técnicas. Ao fim

de 72 h foi possível observar a mudança de cor de amarelo escuro para preto o que indicou a redução do GO. No entanto, ao analisar os espectros de Raman foi concluído que existe o aumento da razão I_D/I_G o que, segundo o grupo de S. Gurunathan, indicou o aumento de defeitos na estrutura, por formação de ligações sp^3 , algo que também foi evidenciado por um estudo apresentado pelo mesmo grupo mas com a bactéria *Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*), evidenciando a recuperação incompleta da estrutura do grafeno. Estes resultados indicaram também que o GO pode ser potencialmente tóxico para algumas espécies bacterianas. Por este motivo, O. Akhavan e E. Ghaderi analisaram também o efeito antibacteriano de superfícies de aço revestidas por GO e rGO (obtido por redução via hidrazina) para com *E. coli* e *Staphylococcus aureus* (*S.aureus*), bactérias Gram-negativas e Gram-positivas, respetivamente. A partir do estudo foi possível concluir que tanto o GO como o rGO possuem um efeito bactericida sobre as espécies testadas, em especial o rGO [43].

Estes trabalhos indicam que a redução bacteriana apresenta potencial para ser considerada uma via para a redução de GBM, apesar de, nos estudos apresentados, o resultado final não ter permitido uma reorganização completa da estrutura do grafeno. Apesar disso, o método tem inúmeras vantagens pois apresenta baixo custos e sem a toxicidade inerente a outros processos utilizados. Assim, devido ao facto de não existirem muitos trabalhos na vertente da redução bacteriana de GBM, pois normalmente incidem na pesquisa de um material antibacteriano, o presente trabalho terá como objetivo a avaliação das interações bactéria/GBM sob dois pontos de vista: a capacidade dos microrganismos reduzirem o material e a capacidade das superfícies apresentarem efeito antimicrobiano.

2. MÉTODOS EXPERIMENTAIS

2.1. Técnica de Deposição

Os filmes finos foram depositados no equipamento da Edwards Coating System, modelo E306A, no modo de rádio frequência de 13,56 MHz.

As deposições foram realizadas a partir de um alvo de grafite (Testbourne Ltd., UK) com pureza de 99,9 % e diâmetro de 100 mm e o gás de descarga utilizado para a deposição foi argônio (Ar), com pureza de 99,9999%. A deposição foi realizada sobre substratos de silício (Si), cobre (Cu), alumínio (Al), aço inox 316L e lâmina de vidro, cujas rugosidades médias superficiais (S_a) são de 2, 7, 5, 5 e 2 nm, respetivamente. A preparação dos substratos antes da inserção na câmara de deposição foi iniciada pela imersão dos substratos em soluções diferenciadas de acetona e álcool, durante 10 minutos, com recurso a ultrassons. No final os substratos foram secos com corrente de ar quente e colados ao porta substratos com cola de prata.

Antes do procedimento de deposição dos filmes finos foi efetuada a limpeza dos substratos e dos alvos, por plasma, no interior da câmara de deposição. O processo decorreu a uma pressão de 0,7 Pa durante 600 s, sendo que para os substratos foi utilizada uma densidade de potência (D_{pot}) de $5,09 \times 10^{-3} \text{ W.mm}^{-2}$ e no alvo uma de $D_{pot} = 2,55 \times 10^{-2} \text{ W.mm}^{-2}$ por 300 s. As condições das deposições estão sumariadas na Tabela 2.1

Tabela 2.1 Parâmetros utilizados na deposição das superfícies G1-G10.

Parâmetros de Deposição					
Designação	Pressão (Pa)	Tempo (s)	Dpot (W.mm ⁻²)	Polarização do substrato	Substratos
G1	0,7	900	1,27x10 ⁻²	×	
G2	0,7	900	2,55x10 ⁻²	×	
G3	0,7	900	3,82x10 ⁻²	×	
G4	0,7	1800	1,27x10 ⁻²	×	
G5	0,7	900	1,27x10 ⁻²	900 s, Dpot=1,02x10 ⁻³ W.mm ⁻²	Si, Cu, Al, aço 316L e vidro
G6	0,7	900	2,55x10 ⁻²	900 s, Dpot=1,02x10 ⁻³ W.mm ⁻²	
G7	4,0	900	2,55x10 ⁻²	×	
G8 (Sem limpeza dos substratos)	4,0	900	2,55x10 ⁻²	×	
G9	6,0	900	2,55x10 ⁻²	×	
G10	0,4	900	2,55x10 ⁻²	×	

2.2. Tratamento Térmico

O tratamento térmico foi efetuado num forno horizontal da marca Adamel-Lhomargo, modelo CT5HT. O aquecimento foi efetuado a uma velocidade de 1 °C/min até às temperaturas de 600 e 800 °C em atmosfera controlada de Ar, durante 30 minutos a uma pressão de 80 Pa, seguida de arrefecimento também em atmosfera de Ar a 20 Pa.

2.3. Técnicas de Caracterização

2.3.1. Microsonda Eletrónica

Na microsonda eletrónica ou EPMA, do inglês *Electron Probe Micro-Analysis*, quando um feixe finamente focado interage com uma superfície pode gerar elétrons retrodifundidos, elétrons secundários e raios X característicos. Os sinais obtidos podem ser utilizados para adquirir imagens de elevada resolução no SEM ou mapas de raios X que mostram a distribuição espacial dos elementos [44].

A microsonda eletrónica foi utilizada para determinar a % atómica dos elementos C (carbono) e O (oxigénio) em cada um dos filmes finos depositados, o equipamento utilizado era da marca Cameca, modelo Camebax SX-50 com um feixe com uma tensão de 2 keV.

2.3.2. Espectroscopia do Fotoeletrão X

A espectroscopia do fotoeletrão X ou XPS, do inglês *X-ray Photoelectron Spectroscopy*, é uma técnica utilizada para quantificar e identificar o tipo de ligações existentes num determinado material.

O seu princípio de funcionamento é baseado na irradiação de uma superfície por raios X provocando a emissão de elétrons devido ao efeito fotoelétrico, isto é, quando a energia da radiação incidente é próxima da energia de excitação do átomo, um fotoeletrão é ejetado. A partir da energia cinética do fotoeletrão é possível calcular a energia de ligação do eletrão.

Os fotoeletrões são originários de uma profundidade <10 nm e por isso a informação obtida é superficial e relativa ao intervalo de 0 a 10 nm [45].

O XPS foi utilizado para determinar o tipo de ligações e as % atómicas dos elementos presentes nas superfícies, o equipamento utilizado era o Kratos Axis Ultra HSA equipado com fonte de raios X com radiação monocromática Al-K α ($\lambda= 0,83401$ nm). Os fotoeletrões foram detetados com o ângulo de 90° em relação a superfície do material. As medições foram efetuadas com energia de passo de 80 eV e passo de 1,0 eV para ao espectro geral foi utilizada uma energia de passo de 40 eV e passo de 0,1 eV para o espectro de alta resolução.

Os dados foram tratados com recurso ao programa *CasaXPS* e as ligações foram analisadas segundo a base de dados *LaSurface* e *NIST X-ray Photoelectron Spectroscopy Database*.

2.3.3. Espectroscopia de Infra Vermelhos por Transformada de Fourier

A Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier, FTIR – do inglês *Fourier Transform Infrared Spectroscopy*, é uma técnica analítica, não destrutiva, utilizada para identificar os grupos funcionais de materiais orgânicos e inorgânicos.

Ao fazer incidir um feixe de radiação infravermelha sobre a superfície a analisar existe uma fração da radiação incidente que é absorvida, para um determinado número de onda, o que provoca vibrações nas ligações covalentes dos átomos que compõem uma molécula ou material analisado [46].

O equipamento Jasco Analytical, modelo FT/IR-4200, foi utilizado em modo ATR (do inglês *Attenuated Total Reflectance*), com resolução espectral de 4 cm^{-1} , na região entre 600 e 4000 cm^{-1} e com acumulação de 64 interferogramas.

2.3.4. Espectroscopia do Visível

A absorção da radiação eletromagnética do Visível (400-800 nm) por parte de moléculas está normalmente associada a transições eletrónicas onde um eletrão é promovido de um estado eletrónico de baixa energia para outro de energia mais elevada. Ao fazer incidir radiação Visível sobre uma superfície é possível determinar a intensidade de energia absorvida e um determinado comprimento de onda. Esta relação é expressa pela lei de Beer-Lamert (eq. 1) onde,

$$A = \varepsilon_1 cl \text{ (eq. 1)}$$

a quantidade de luz absorvida (A) quando um feixe de radiação monocromática atravessa o meio absorvente depende da concentração (c), do coeficiente de absorção (ε_l) molar da espécie absorvente e do percurso ótico da radiação (l) [47].

O equipamento utilizado foi o Jasco V-530 e a análise foi iniciada por um varrimento de uma lâmina de vidro sem revestimento para servir como referência. A

análise foi efetuada nas lâminas revestidas, utilizando a lâmina sem revestimento como referência. A análise foi realizada à temperatura ambiente.

2.3.5. Microscópio Eletrônico de Varrimento

A microscopia eletrônica de varrimento, ou SEM - do inglês *Scanning Electron Microscope*, é uma técnica utilizada para observar a morfologia de um material, pode trabalhar a ampliações de 10 a 300 000× permitindo a visualização de material orgânico e inorgânico sendo apenas necessário que o material observado seja condutor.

No SEM um feixe de elétrons finamente focado varre a superfície e ao interagir com o material são emitidos elétrons secundários ou elétrons retrodifundidos. Os elétrons secundários e os elétrons retrodifundidos estão constantemente a ser produzidos enquanto o feixe incidente irradia a amostra, no entanto, são resultantes de dois tipos de interações. Os elétrons secundários são o resultado de colisões inelásticas e são geralmente utilizados para observar a morfologia do material com uma resolução de ~10 nm ou melhor. Os elétrons retrodifundidos são o resultado de colisões elásticas e dispersão entre os elétrons incidentes e os elétrons da amostra. Neste caso, para números atômicos superiores a imagem aparece mais brilhante e definida devido ao maior número de elétrons que são ejetados da superfície [48, 49].

Neste trabalho foram utilizados dois equipamentos: um com filamento de tungstênio da marca JOEL, modelo XL30 com tensão de aceleração de 15kV, e outro com canhão de emissão de campo (FEG – do inglês *Field Emission Gun*) da marca FEI Quanta, modelo 400FEG ESEM, ambos equipados com sistema EDS (*Energy Dispersive Spectrometry*) da EDAX. Neste caso foram utilizadas tensões de aceleração entre 10 e 15 kV. Esta caracterização permitiu a observação da morfologia superficial e da seção transversal após fratura do conjunto substrato/revestimento, bem como a morfologia das células procarióticas após os testes microbiológicos, após revestimento com 30 nm de ouro. A partir da secção transversal ainda foi possível determinar a espessura dos filmes com recurso ao *software ImageJ*.

2.3.6. Microscopia de Força Atômica

A Microscopia de Força Atômica, AFM – do inglês *Atomic Force Microscopy*, é uma técnica que permite observar de forma eficaz a topografia à escala nanométrica.

O AFM é composto por uma sonda, de pequenas dimensões ($d < 10$ nm), colocada na ponta de um braço em balanço (*cantilever*) sobre o qual é feito incidir um laser e a partir da deflexão do *cantilever* no varrimento da superfície é determinada a informação topográfica. O microscópio pode operar em modo contacto, onde uma força constante é aplicada sobre *cantilever*; em modo contacto intermitente, onde o *cantilever* oscila a uma frequência perto da sua frequência de ressonância e modo não contacto que opera devido a forças interatómicas existentes entre a ponta e a superfície. A imagem de topografia permite, após tratamento adequado, obter uma visão global acerca da rugosidade de um filme e do seu substrato [46].

O equipamento utilizado na caracterização era da marca Veeco e modelo di Innova, as pontas eram de Si_3N_4 da Bruker e com frequência de ressonância, f_0 , de 291-326 kHz e força constante entre 20-80 $\text{N}\cdot\text{m}^{-1}$. A análise foi realizada com modo de contacto intermitente e permitiu avaliar a topografia dos filmes das superfícies G1-G7 e G10 sobre silício numa área de 1×1 μm . No caso da superfície foi também avaliada uma área de e $0,2 \times 0,2$ μm . As imagens foram tratadas com recurso ao programa *Gwyddion*.

2.3.7. Espectroscopia de Raman

A espectroscopia de Raman é uma técnica útil na caracterização de materiais baseados em carbono, permitindo a diferenciação entre materiais tipo grafite, grafeno, carbono amorfo e diamante com a variação das bandas presentes nos espectros. A partir da espectroscopia de Raman é possível ainda distinguir entre grafeno e GBM, e confirmar existência de defeitos na estrutura de carbono do material analisado [50].

As superfícies G1-G10 sobre silício e a superfície G4 sobre Cu, Al e aço 316L foram analisadas, no Raman LabRAM HR Evolution da Horiba, com o laser de $\lambda = 532$ nm, energia de excitação = 2,33 eV, com uma intensidade de 10 % e 20 acumulações. Os dados foram tratados no programa *Origin*.

2.3.8. Medição do Ângulo de Contacto Estático

A medição do ângulo de contacto estático é relativamente simples e pode ser aplicada para determinar a molhabilidade do sólido quando em contacto com um líquido, isto é se o material possui boa molhabilidade ($\ll 90^\circ$) ou má molhabilidade ($\gg 90^\circ$). Ao colocar uma gota líquida sobre uma superfície horizontal lisa, é possível determinar o ângulo de contacto que é definido como o ângulo formado pela interseção da interface sólido-líquido e líquido-vapor. Os dados são adquiridos por aplicação de uma tangente do ponto de contacto ao longo da interface líquido-vapor no perfil da gota. O ângulo de contacto é estimado a partir da relação descrita por *Young* (eq. 2),

$$\gamma_{lv} \cos \theta_Y = \gamma_{sv} - \gamma_{sl} \quad (\text{eq. 2})$$

Onde γ_{sv} é a tensão da interface sólido-vapor, γ_{sl} a tensão da interface sólido-líquido, γ_{lv} a tensão da interface líquido-vapor e θ_Y o ângulo de contacto[51].

O equipamento utilizado era da marca DataPhysics, modelo QCA-20, e a medição foi realizada através da colocação de uma gota de água 10 μl na superfície dos revestimentos, G1-G10, sobre lâminas de vidro. O resultado final é apresentado como a média de 7 medições em cada superfície.

2.3.9. Potencial Eletrocinético

Quando em contacto com um eletrólito uma superfície sólida desenvolve uma carga superficial que atrai iões de carga oposta formando uma camada designada de camada imóvel da dupla camada eléctrica. Quanto mais os iões da solução se encontrarem afastados da superfície menor a força de interação entre ambos e a carga do plano para o qual, por ação do fluido sob pressão, há deslocação da camada de iões que interagem com a superfície é designada como potencial zeta ou potencial ζ [52].

O potencial zeta foi avaliado através do equipamento SurPASS, do Anton Paar GmbH, utilizando como eletrólito uma solução de KCl 1 mM a pH 7 e a célula fechada (*clamping cell*). O valor do potencial zeta foi determinado, para as superfícies G1-G10 sobre lâminas de vidro, a partir da equação de Helmholtz–Smoluchowski (eq. 3) representada por,

$$\zeta = \frac{dl}{dp} \frac{\eta}{\epsilon \times \epsilon_0} \frac{L}{A} \quad (\text{eq. 3})$$

em que $\frac{dl}{dp}$, representa o declive da curva dos valores da corrente em função da pressão, o η é a viscosidade do eletrólito, ε é a constante dielétrica do eletrólito, ε_0 é a permitividade em vácuo, L é o comprimento do canal de medição e A a secção transversal do canal de medição.

2.4. Testes Microbianos

Nestes testes foram avaliadas 11 espécies bacterianas: *Escherichia coli* (*E. coli*), *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*), *Enterococcus faecium* (*E. faecium*), *Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*), *Pseudomonas acidovorans* (*P. acidovorans*), *Pseudomonas mendocina* (*P. mendocina*), *Bacillus subtilis* (*B. subtilis*), *Sulfitobacter dubius* (*S. dubius*), *Shewanella putrefaciens* (*S. putrefaciens*), *Ochrobactrum tritici* (*O. tritici*) e *Rhodanobacter sp. A2-61*.

2.4.1. Incubação das Superfícies com Revestimento na Presença das Estirpes Bacterianas e Fixação

Nestes ensaios foram utilizadas as superfícies G2, G7 e G10 sobre silício, devido à % de carbono e oxigénio presente na superfície. A fim de evitar contaminações, as superfícies foram esterilizadas em caixas multipoços estéreis por imersão em cerca de 2 mL de solução de etanol 70 % (v/v), com agitação de 130 rpm (rotações por minuto), durante 15 minutos à temperatura ambiente.

Antes do processo de incubação as espécies bacterianas foram descongeladas e repicadas para placas de Petri, com meio sólido Luria Bertani, LB, e colocadas na estufa a 37 °C, durante 24 h.

a) Incubação das superfícies com revestimento

Para a incubação foram preparadas suspensões com as espécies bacterianas referidas anteriormente, em 40 mL de meio LB e densidade ótica, DO=0,1 na escala de McFarland. A cada superfície, nas caixas multipoços, foram adicionados 2 mL da respetiva suspensão. As caixas multipoços foram colocadas em agitação contínua, a 130 rpm a uma temperatura constante de 37 °C durante 72 h. A cada 24 h, e até perfazer as 72 h, foi retirado cerca de 1 mL de suspensão bacteriana a todos os poços incubados e foi

adicionado 2 mL de meio líquido LB (a diferença de volume adicionada é devida à existência de alguma evaporação).

b) Fixação

Com o objetivo de observar a adesão bacteriana às superfícies foi realizada a fixação química e consequente desidratação das superfícies pós-incubação.

Após incubação as superfícies foram transferidas para novas caixas multipoços não estéreis a fim de realizar as lavagens. A cada poço foi adicionado cerca de 2 mL de uma solução tampão fosfato, ou PBS – do inglês *Phosphate Buffer Solution*, estéril seguido de agitação a 110 rpm, por 15 minutos. As superfícies foram trocadas de poço e a fixação química foi realizada pela adição de 2 mL de uma solução de glutaraldeído 2,5 % (v/v) com agitação a 110 rpm durante 15 min. Foram realizadas duas passagens por PBS e por glutaraldeído. Entre cada passagem as superfícies foram trocadas para novos poços.

O processo de desidratação foi realizado pela passagem das superfícies em soluções crescentes de etanol: 70, 80, 90, 95 e 100 % (v/v). A cada poço foi adicionado cerca de 2 mL da respectiva solução seguida de agitação a 110 rpm, por 10 minutos. Entre cada passagem as superfícies foram trocadas de poço. O processo foi repetido duas vezes para a concentração de 100 % (v/v). Por último, foi retirado todo o etanol dos poços e as superfícies foram colocadas a secar, no interior das caixas, na câmara de fluxo.

Determinação da morfologia das estirpes bacterianas antes do contacto com as superfícies revestidas

A fim de determinar a morfologia das bactérias *E. coli*, *S. aureus*, *P. aeruginosa* e *S. putrefaciens* no seu estado natural, foi realizado novo crescimento nas mesmas condições da incubação dos filmes, por apenas 24 h.

A fixação foi realizada sobre superfícies de Si, previamente esterilizadas em caixas multipoços estéreis, num volume de 2 mL de álcool 70 % (v/v). Sobre cada superfície foi colocado um volume de 0,2 µL a partir de uma diluição de 10x preparada do seguinte modo: em vários *ependorf* de 0,5 mL foram colocados 0,09 mL de PBS estéril para 0,01 mL de suspensão bacteriana. Cada suspensão foi agitada no vortéx antes

de ser colocada sobre as superfícies. As caixas multipoços foram deixadas a secar na câmara de fluxo por 2 h antes que o processo de fixação fosse iniciado.

A fixação foi iniciada por passagem numa solução de glutaraldeído a 2,5 % (v/v), seguida de agitação a 110 rpm por 10 minutos. A desidratação foi realizada por passagens das superfícies em soluções de etanol a 70, 90 e 100 % (v/v). Para as soluções de 70 e 90 % as caixas multipoços com as superfícies foram colocadas a agitar a 110 rpm por 10 minutos, no caso da solução de 100 % (v/v) o processo foi realizado a 110 rpm por 20 minutos. Entre cada passagem as superfícies foram trocadas de poço e no final foram colocadas a secar pelo método já descrito anteriormente.

Antes da observação por SEM, e devido à natureza não condutora das células bacterianas, todas as superfícies foram revestidas, por pulverização catódica, com 30 nm de ouro.

2.4.2. Testes de Viabilidade

Após 72 h de incubação, foram realizados testes para determinar a viabilidade bacteriana quando em contacto com os revestimentos.

O processo foi iniciado por remoção das superfícies revestidas para novas caixas multipoços estéreis onde foram realizadas lavagens por adição de 2 mL de PBS estéril e agitação a 110 rpm por 10 minutos; este passo foi repetido duas vezes. De seguida, as superfícies foram transferidas para novas caixas estéreis e a partir de cada superfície foi realizado um esfregaço com um cotonete previamente esterilizado para retirar as células bacterianas das superfícies.

Cada cotonete foi inserido num tubo de Falcon, de 15 mL, com 2 mL de PBS estéril, e agitado no vórtex. Cada uma das suspensões resultantes foi considerada a suspensão não diluída.

De seguida foram preparadas novas suspensões diluídas 10x. As diluições foram preparadas a partir das suspensões não diluídas, em tubos de ensaio estéreis, de 20 ml, com 4,5 mL de PBS estéril e 0,5 mL da suspensão não diluída. Cada suspensão foi plaqueada por adição de 0,1 mL, das suspensões diluídas e não diluídas, em placas de Petri com meio LB sólido. O processo de plaqueamento foi efetuado em duplicado para cada diluição e superfície.

As placas de Petri foram depois colocadas numa estufa a 37 °C por 24 h e posteriormente guardadas numa câmara frigorífica a 4 °C.

A viabilidade foi determinada por contagem visual do número de colónias nas placas de Petri. A determinação do valor de unidades formadoras de colónias ou CFU, do inglês *Colony Forming Units*, por mL foi calculado a partir do número médio de CFU nas caixas com diluição contável (com um número de colónias entre 20-200) e multiplicando pelo do valor da diluição aplicado.

Como em certos casos não foi possível contar as colónias, devido à sua elevada densidade, foram realizadas novas diluições até um máximo de 1000x, seguindo o mesmo princípio das diluições de 10x.

3. APRESENTAÇÃO DOS RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Composição Química e Grupos Químicos

A composição química dos filmes finos, G1-G10 sobre substratos de silício, foi, numa primeira abordagem, avaliada por microsonda eletrônica. Apesar das condições de análise terem sido otimizadas para que o volume de interação do feixe com o material fosse minimizado, alguns dos filmes finos não puderam ser avaliados devido à sua espessura reduzida (Tabela 3.1). Por este motivo, algumas das superfícies foram também analisadas por XPS (Tabela 3.1). As superfícies que foram selecionadas para análise por XPS foram a G2, G7 e G10 pois representavam, a nível de composição química, filmes finos com relações C/O distintas.

Tabela 3.1 Composição química dos filmes finos por EPMA e XPS.

	Composição Química (%at.)			
	EPMA		XPS	
	C	O	C	O
<i>G1</i>	-	-	-	-
<i>G2</i>	68,3	31,7	80,7	17,6
<i>G3</i>	77,1	22,9	-	-
<i>G4</i>	70,3	29,7	-	-
<i>G5</i>	-	-	-	-
<i>G6</i>	-	-	-	-
<i>G7</i>	76,9	23,1	77,1	19,25
<i>G8</i>	66,7	33,3	-	-
<i>G9</i>	61,8	38,2	-	-
<i>G10</i>	50,2	49,8	77,5	22,5

Como seria de esperar os valores avaliados pelas duas técnicas diferem entre si, pois enquanto a microsonda avalia a composição da totalidade da espessura, os resultados de XPS dizem respeito, no máximo, à avaliação de uma espessura de 10 nm. Ainda assim ambas as técnicas apontam o filme fino designado por G10 como aquele que maior teor de oxigénio tem incorporado.

Os picos registados, nos espetros de alta resolução de C e O, pela técnica de XPS permitiram, após desconvolução dos espetros, a listagem dos valores das energias de ligação para cada um dos elementos, após comparação com a base de dados *LaSurface* [3] tal como exemplificado na figura 3.1, para a superfície G2. Este filme fino apresenta ligações $>C=C<$ aromático (ligação sp^2), C-H (ligação sp^3), $-O-C=O-$, $>C=O$ e $-O-C$. A presença das ligações carbono-oxigénio era esperada, não só devido às avaliações efetuadas anteriormente, mas também de acordo com o reportado na literatura [35]. A presença da ligação C=C aromática confirma que o carbono depositado é da família do grafeno e que todas as outras ligações aparecem como “defeitos” nas ligações C=C.

No caso da deposição G7, as ligações são C=C aromático e não aromático e por isso, no caso desta superfície, parece não existir maioritariamente a estrutura aromática, típica dos GBM (Tabela 3.2). Os espetros relativos às superfícies G7 e G10 são apresentados no Apêndice A.

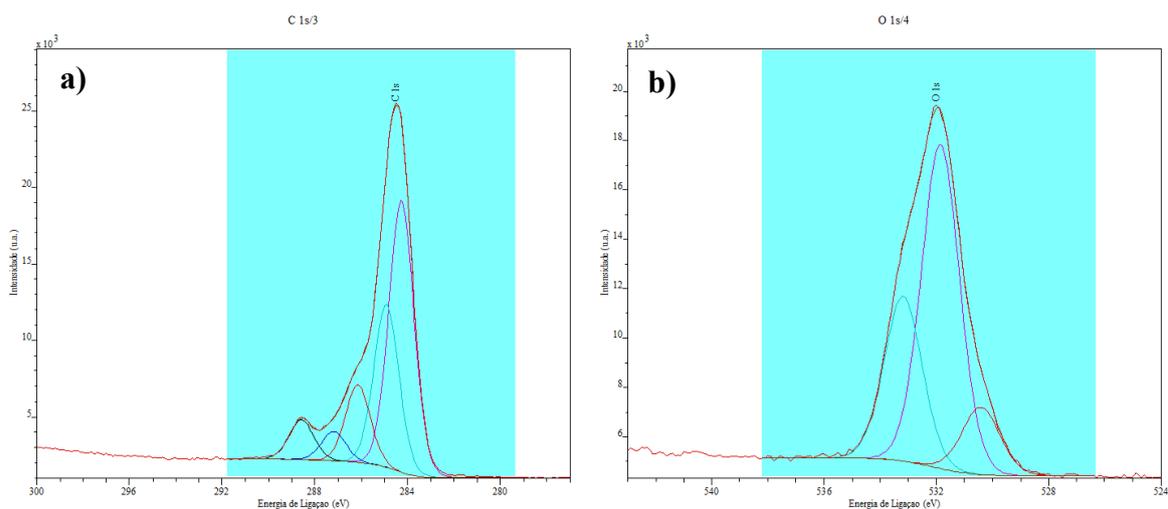


Figura 3.1 Desconvolução dos espetros XPS de alta resolução do filme fino G2: a) espetro de alta resolução do C; b) espetro de alta resolução do O.

Tabela 3.2 Ligações e % relativas das composições químicas determinadas a partir dos espectros de alta resolução, de carbono e oxigênio, determinado por XPS

Ligações identificadas por XPS (% relativa)				
G2	70,8 %	12,6 %	8,9 %	7,8 %
	C=C aromático	C-H	>C=O	-O-C=O
G7	57,7 %	14,4 %	14,8%	13,1%
	C=C não aromático	C=C aromático	C-O	>C=O
G10	71,9 %	15,7 %	7,6 %	4,8 %
	C=C aromático + C-C sp ³	C=O C-H	C-OH	O=C-OH

A superfície G10 é mais semelhante à designada por G2 dado que apresenta ligações C=C do tipo aromático, características do GBM, sendo a superfície em que estas ligações representam a maior percentagem relativa do carbono existente, no entanto, também apresentam ligações C-C do tipo sp³ típico de carbono amorfo.

A presença dos grupos químicos funcionais detetados por XPS foi também observada por FTIR. Na Figura 3.2 estão representados os espectros FTIR das superfícies G2, G7 e G10, sendo que os espectros das restantes superfícies se encontram no Apêndice A.

Após desconvolução dos espectros, com o programa *Origin 6.1*, foi possível identificar os grupos químicos funcionais, que se encontram listados na Tabela 3.3, e avaliar da semelhança entre os espectros das 3 superfícies. Após análise dos resultados foi possível comprovar que as bandas apresentadas são pertencentes aos grupos C-H, presentes como CH₂ e CH₃, C-O, C=C aromático e C=O pertencentes aos grupos carbonilo >C=O e carboxílico -COOH. No caso da região de 1665-1680 cm⁻¹ também é possível que se trate da ligação C=C não aromática [53]. Estes dados vêm reforçar o anteriormente observado pela caracterização por XPS.

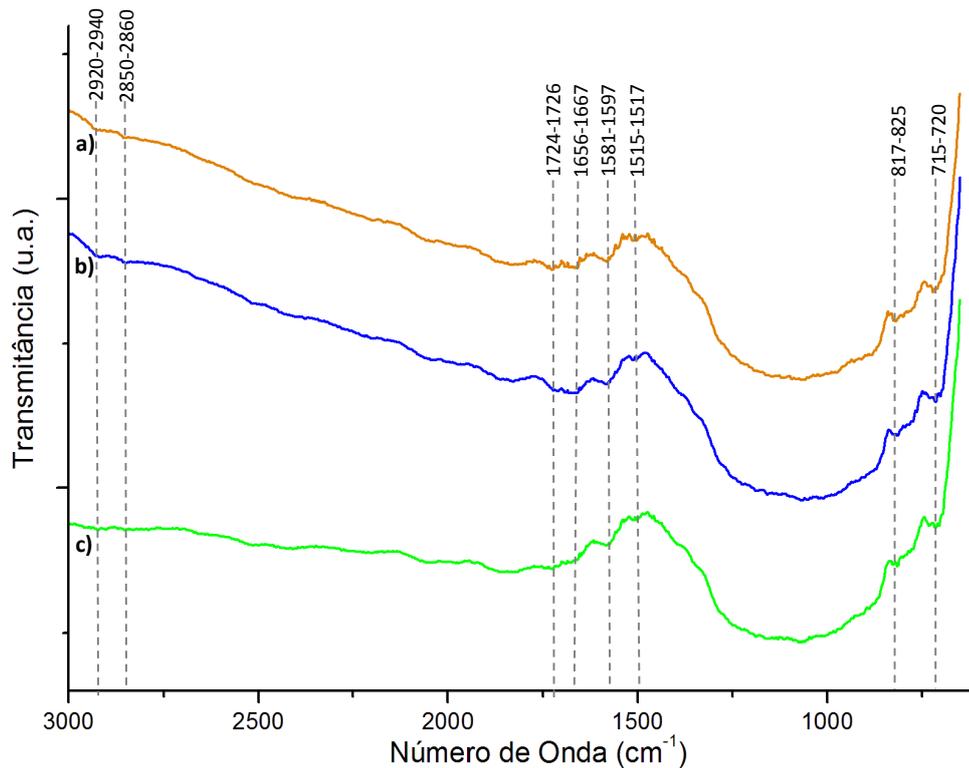


Figura 3.2 Espectro de FTIR das superfícies a) G2 (laranja), b) G7 (azul) e c) G10 (verde).

Tabela 3.3 Grupos funcionais identificados a partir dos espectros de FTIR.

Ligações Identificadas por FTIR			
<i>Região</i>	<i>Ligação</i>	<i>Superfície</i>	<i>Referência</i>
715-720	C-H do CH ₂	G2, G7 e G10	[53] [54]
817-825	C-H do CH ₂	G2, G7 e G10	[53], [54]
1510-1587	C=C do aromático	G2, G7 e G10	[53], [55], [56]
1665-1680	C=O do carboxilo	G2 e G7	[53]
1725-1731	C=O do carbonilo	G2, G7 e G10	[53]
2850-2858	C-H do CH ₂ e CH ₃	G2 e G7	[53], [54], [56]
2920-2925			

Assim, estas caracterizações permitem revelar que, por pulverização catódica, é possível depositar GBM que podem ser considerados do tipo oxidado, dado o tipo de ligações químicas identificadas.

3.2. Morfologia/ Topografia

A técnica de SEM foi utilizada para avaliar a morfologia da seção transversal e a espessura dos filmes finos (Figura 3.3). As imagens dizem respeito a aquisição com o detector de elétrons retrodifundidos de modo a que a observação do filme fino seja facilitada por contraste com o substrato de silício.

As imagens demonstram que, independentemente das condições de deposição utilizadas, os filmes finos são densos, sem porosidade aparente, isto é, apresentam uma morfologia *featureless*.

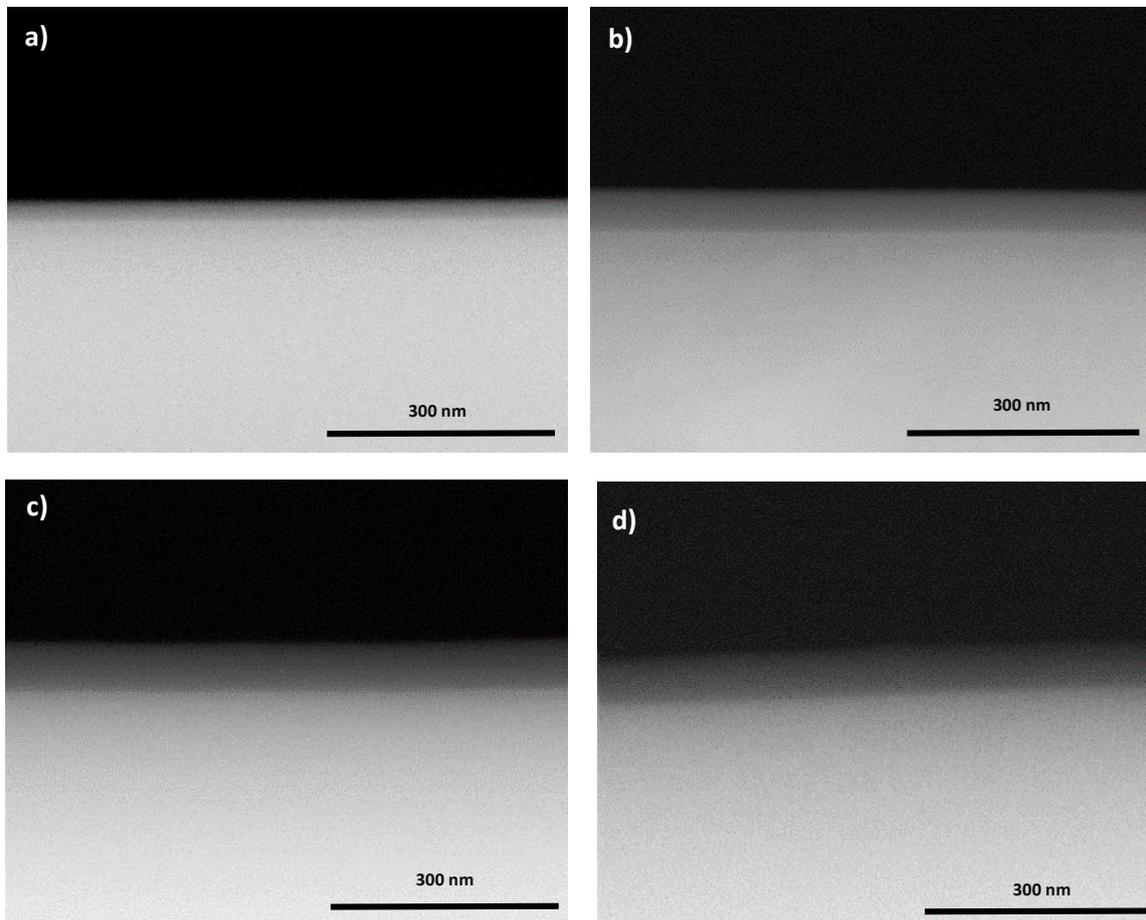


Figura 3.3 Micrografias das superfícies a) G1, b) G2, c) G3, d) G4, e) G5, f) G6, g) G7, h) G8, i) G9, j) G10.

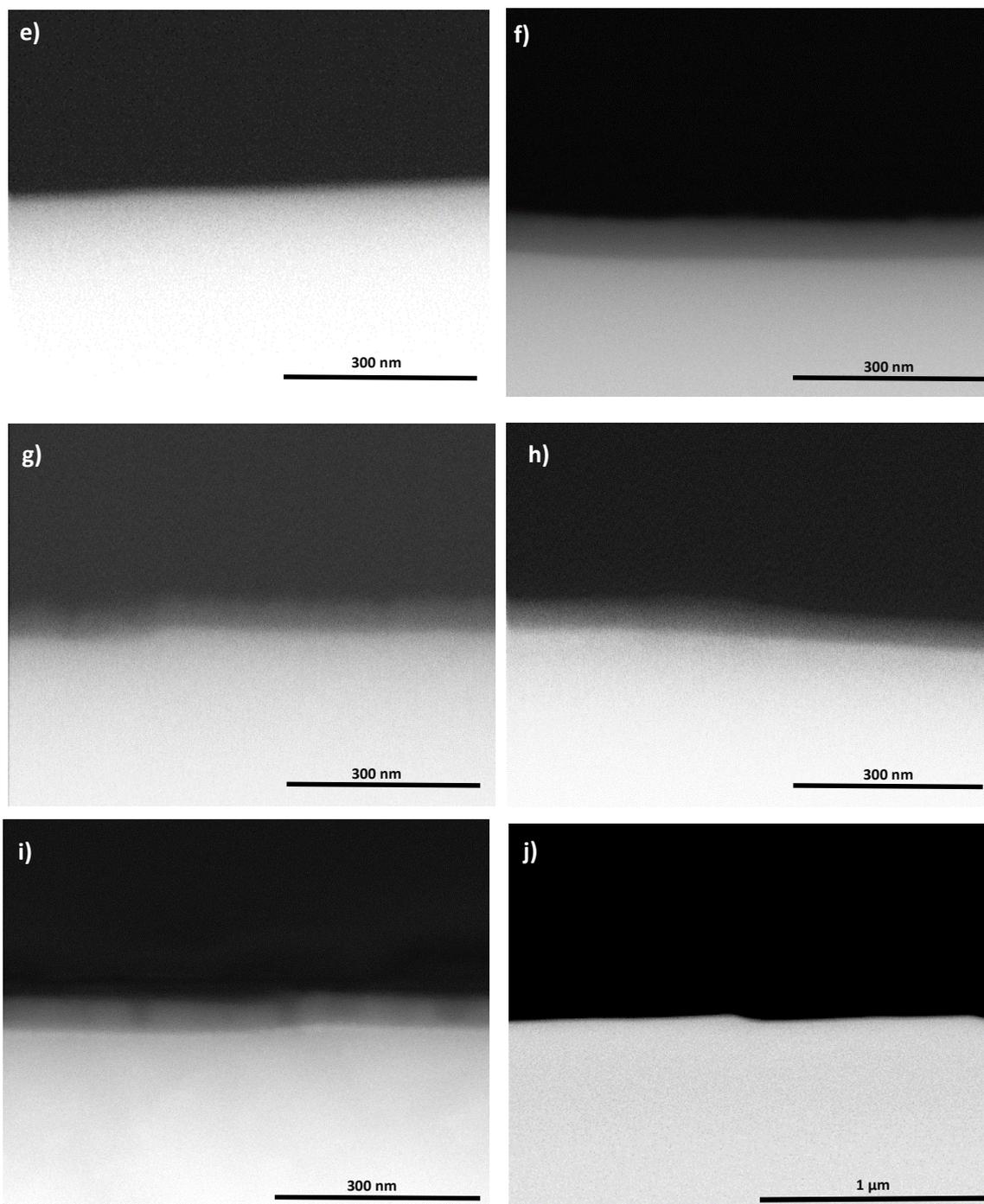


Figura 3.3 Micrografias das superfícies a) G1, b) G2, c) G3, d) G4, e) G5, f) G6, g) G7, h) G8, i) G9, j) G10. (Continuação)

Na Tabela 3.4 são apresentadas as espessuras de cada filme depositado, avaliadas por medição na imagem da secção transversal. As maiores espessuras foram registadas para os revestimentos G4 e G7, que correspondem às deposições com maior tempo de deposição e pressão de deposição de 4 Pa, respetivamente. Os filmes finos com menor espessura são os designados por G1, G5 e G10, que correspondem às deposições com menor densidade de deposição (sem e com polarização do substrato) e menor pressão de deposição, respetivamente.

Tabela 3.4 Espessuras dos filmes finos G1 a G10 avaliadas pelas micrografias de SEM de secção transversal.

Espessura dos revestimentos (nm)									
<i>G1</i>	<i>G2</i>	<i>G3</i>	<i>G4</i>	<i>G5</i>	<i>G6</i>	<i>G7</i>	<i>G8</i>	<i>G9</i>	<i>G10</i>
25	56	65	68	22	60	67	53	51	13

Na Figura 3.4 estão representadas as imagens de topografia superficial dos revestimentos. Os filmes finos G2, G3, G4, G7 apresentam topografias semelhantes. Nas superfícies G1, G5, G6 e G10 são observadas topografias diferentes devido à baixa densidade de potência, polarização do substrato e baixa pressão de deposição, respetivamente. De realçar que para o filme fino G1, depositado com uma densidade de potência de $1,27 \times 10^{-2} \text{ W.m}^{-1}.\text{K}^{-1}$, aparentemente há a formação de aglomerados que apenas são visíveis para este revestimento.

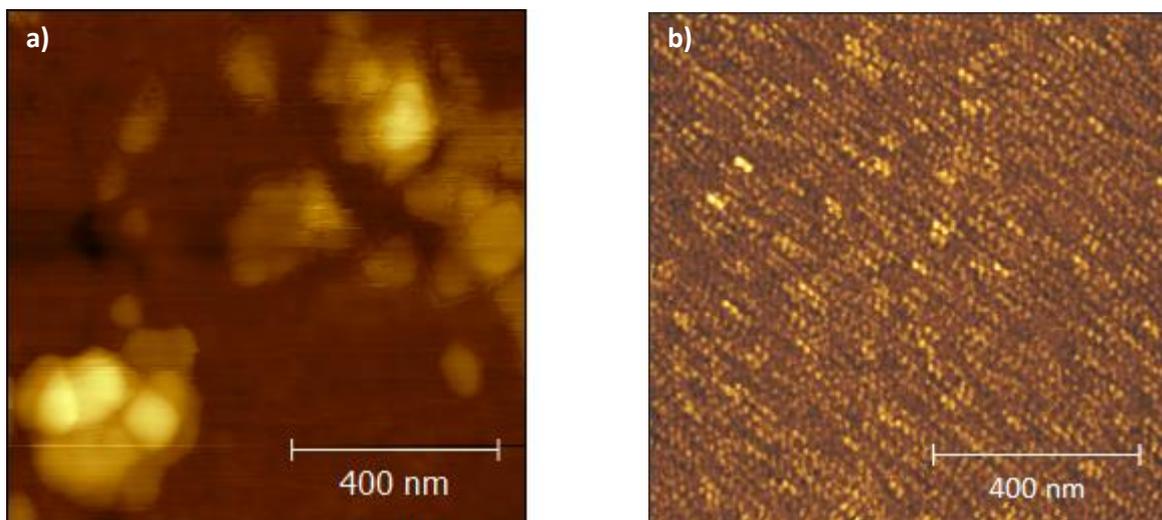


Figura 3.4 Imagens de topografia das superfícies a) G1, b) G2, c) G3, d) G4, e) G5, f) G6, g) G7 e h) G10 (1x1 μm).

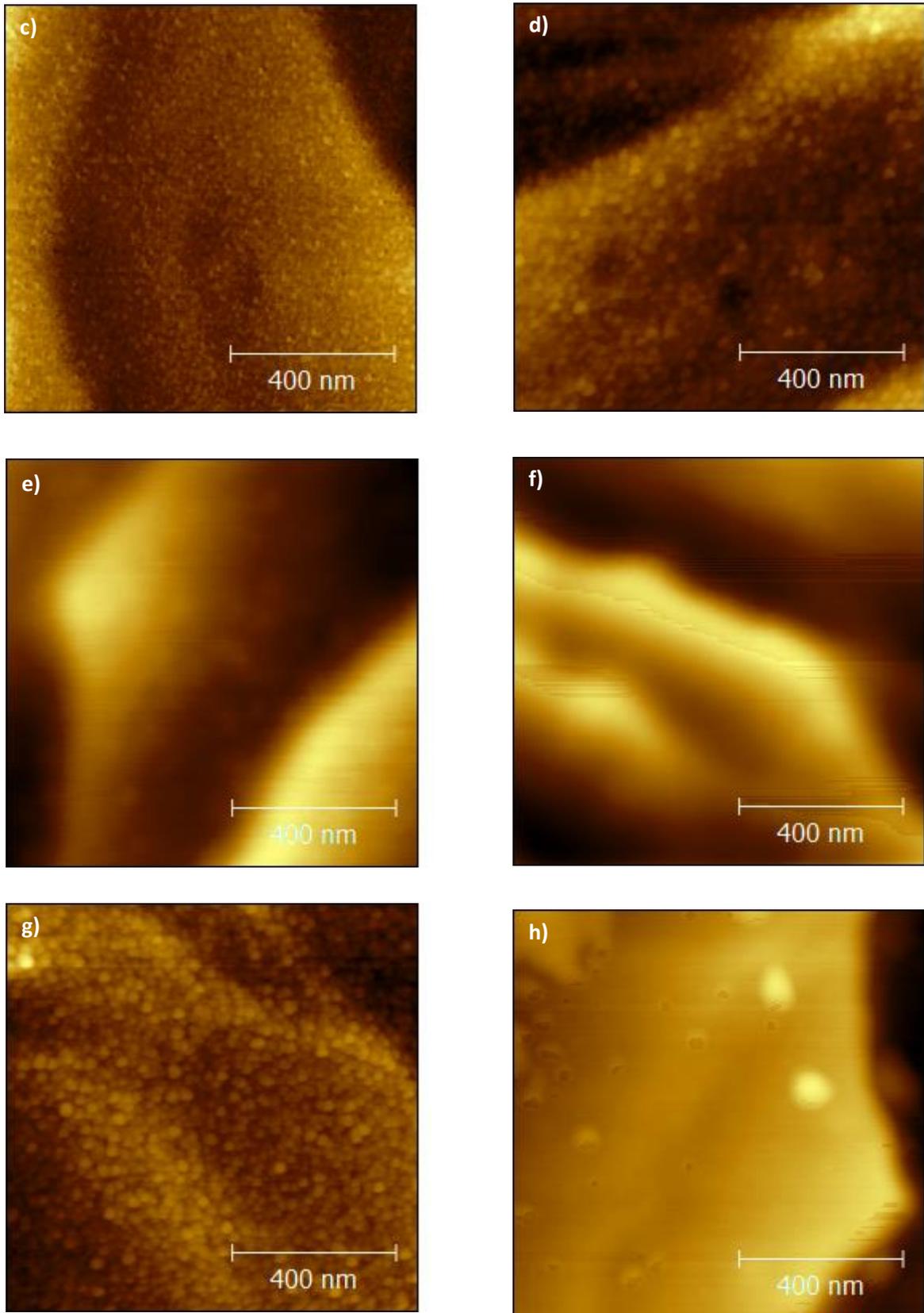


Figura 3.4 Imagens de topografia das superfícies a) G1, b) G2, c) G3, d) G4, e) G5, f) G6, g) G7 e h) G10 (1x1 μm). (Continuação).

Na imagem relativa ao revestimento G2 a topografia parece ocorrer com a repetição de um padrão, motivo pelo qual foi avaliada a topografia numa área de 200nm x 200 nm (Figura 3.5).

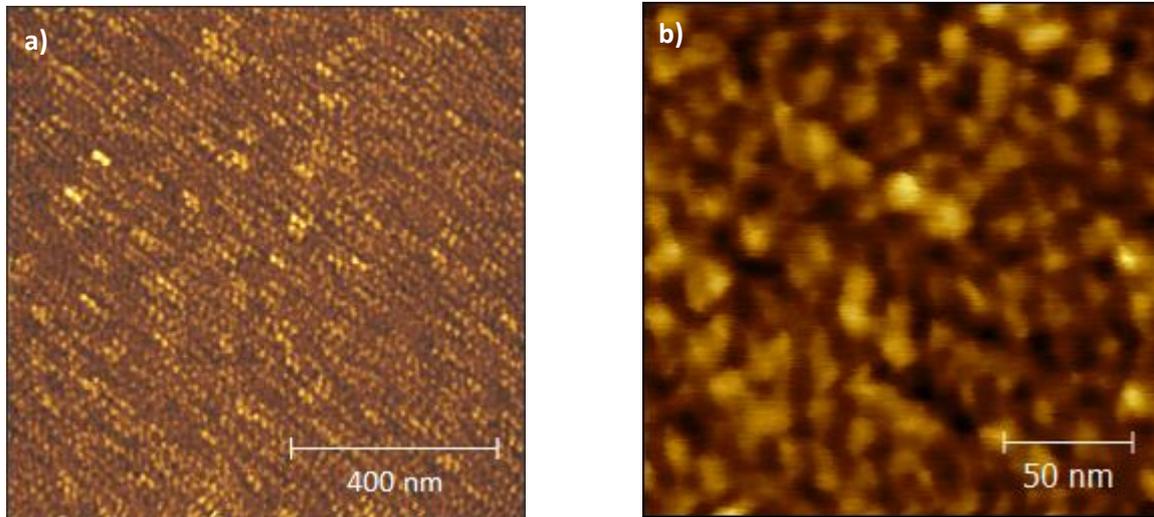


Figura 3.5 Imagens de topografia da deposição G2, a) 1x1 (μm) e b) 0,2x0,2 (μm).

A imagem revela uma regularidade que se assemelha à observada por STM, com resolução atômica, do grafeno. Apesar de a imagem topográfica apresentada não ter resolução à escala atômica poderá, eventualmente, ser consequência de um arranjo semelhante à estrutura do grafeno, mas com defeitos óbvios.

3.3. Espectroscopia de Raman

A espectroscopia de Raman é uma das técnicas mais utilizadas na identificação de grafeno ou GBM. Os espectros representativos de grafeno apresentam duas bandas típicas, a banda G a 1580 cm^{-1} , característica de ligação sp^2 e representativa da presença de anéis aromáticos na estrutura, e a banda 2D, a cerca de 2700 cm^{-1} , que usualmente é utilizada para estimar o número de camadas de “grafeno”. Por vezes os espectros podem ainda apresentar uma banda D, a 1350 cm^{-1} , que, quando presente, é indicativa da presença de defeitos na estrutura aromática, como é o caso da presença de ligações sp^3 , e cuja intensidade é proporcional ao número de defeitos. Num espectro de grafeno a banda G apresenta baixa intensidade, a banda 2D tem elevada intensidade e a banda D é

praticamente inexistente sendo observada devido às terminações da camada de grafeno [57].

Segundo a literatura quando mais do que duas camadas de grafeno estão presentes no material analisado, as intensidades da banda G e 2D variam inversamente resultando no aumento da banda G e diminuição da banda 2D. Se o número de camadas for superior a 10 o espectro tem características muito semelhantes ao da grafite [2]. Por esta razão, é muitas vezes reportada a utilização das razões de intensidade dos picos 2D, G e D representadas por I_{2D}/I_G e I_D/I_G , respetivamente. A razão I_D/I_G é utilizada para caracterizar o grau de desordem do grafeno sendo tanto quanto menor for o grau de desordem. A razão I_{2D}/I_G serve para inequivocamente identificar a existência de grafeno. No presente trabalho apenas vai ser analisada a razão I_D/I_G pois o pico 2D dos espectros é de baixa intensidade. Este facto indicia que a deposição dá origem a GBM o que já era esperado dada a espessura dos filmes finos e que correspondem à presença de mais do que uma monocamada de átomos de C.

Na figura 3.6 estão os espectros de Raman dos revestimentos G2, G7 e G10 após deposição, sendo que os restantes se encontram no Apêndice A. Para determinar a localização exata dos picos, bem como a razão I_D/I_G , foram realizadas desconvoluções no programa *Origin 6.1*. O ajuste foi realizado com o auxílio da função Gaussiana do programa *Origin 6.1* e para alguns dos espectros são utilizados 4 ou mais picos para na desconvolução de acordo com o trabalho de X. Díez-Betriua, onde são mencionados mais picos além do pico G e D esperados no espectro, devido à dupla ressonância do pico D presentes em estruturas do tipo GBM [58].

À semelhança do observado no filme fino G7, também na superfície G8 e G9 (depositadas com parâmetros semelhantes) o espectro é atípico, podendo mesmo afirmar-se que não é possível a obtenção de espectro no caso da G7 e G8 e no caso da G9 a intensidade do ruído da linha de base não permite distinguir com clareza as diferentes bandas. Eventualmente por serem os filmes finos obtidos com pressões de deposição mais elevadas, o número de colisões que os átomos ejetados sofrem no seu percurso através do plasma pode levar a que a energia de chegada ao substrato não permita a sua difusão. Tal poderá contribuir para o aumento do número de defeitos na ligação química. Estes tipos de defeitos não têm expressão no aparecimento ou intensidade da banda D, pois esta

normalmente encontra-se associada a alterações da estrutura aromática, C=C, como é o caso do aparecimento de ligações do tipo sp^3 .

Também são apresentados os espectros relativos à deposição G4 sobre Al, Si, Cu e alo 316 L, no Apêndice A. Os espectros são representativos da semelhança entre os filmes depositados nos diferentes substratos.

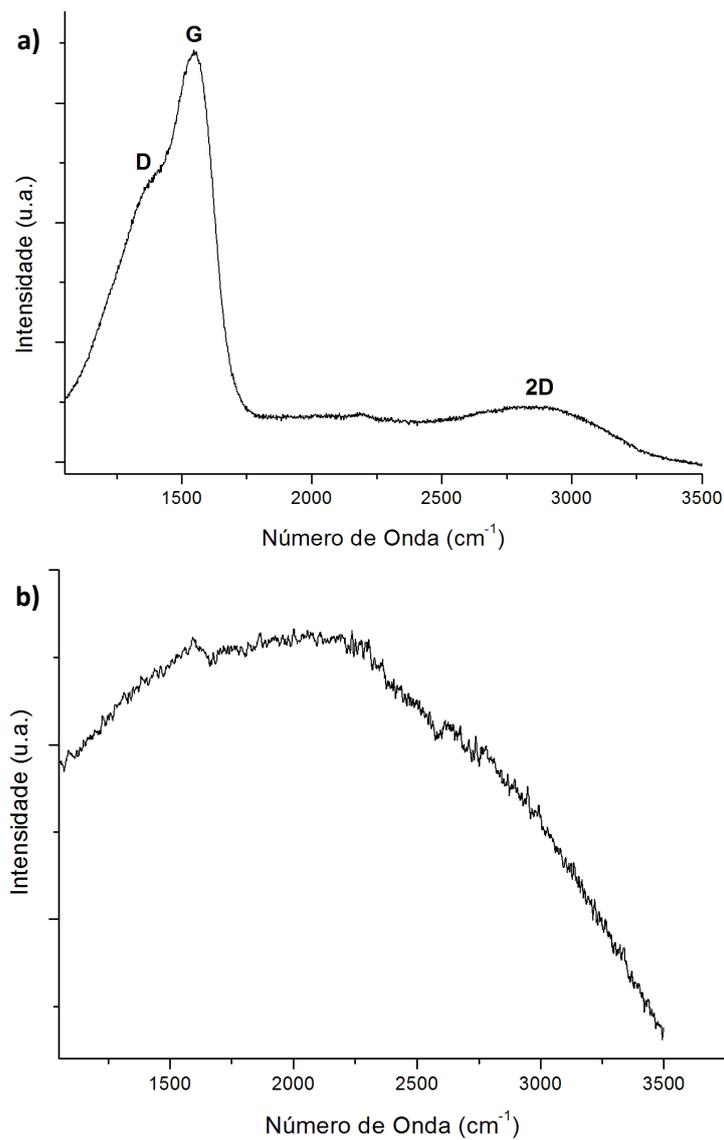


Figura 3.6 Espectro de Raman das superfícies a) G2, b) G7 e c) G10.

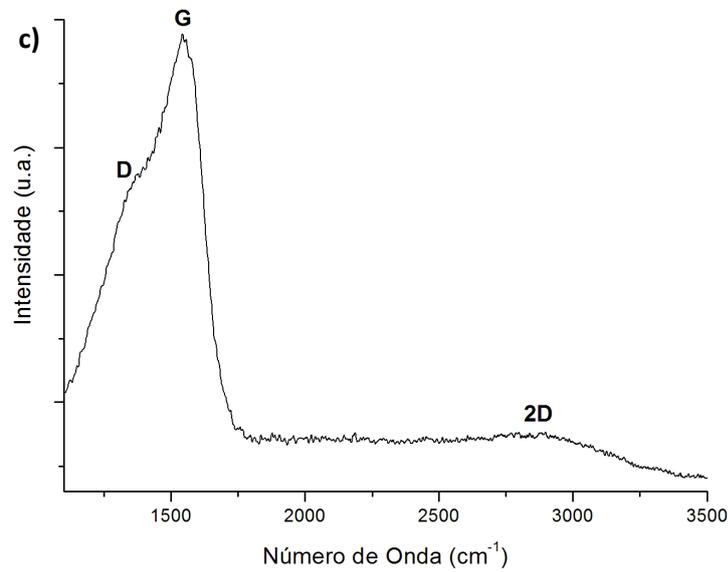


Figura 3.6 Espectro de Raman das superfícies a) G2, b) G7 e c) G10. (Continuação).

Os valores representativos da razão I_D/I_G de todas as deposições estão apresentados na Tabela 3.5 e, após análise dos dados, é possível concluir que existe um elevado grau de desordem associado às duplas ligações C=C aromáticas.

Tabela 3.5 Razão das intensidades do pico D e G, representada por I_D/I_G , para os filmes finos estudados.

	Razão I_D/I_G									
	G1	G2	G3	G4	G5	G6	G7	G8	G9	G10
Após deposição	0,97	0,75	0,67	0,66	1,02	0,79	-	-	0,93	0,73

3.4. Molhabilidade

O grafeno oxidado, o grafeno e a grafite estão reportados na literatura como apresentando diferentes afinidades para com a água sendo, por este motivo, importante avaliar a molhabilidade dos GBM. Segundo a literatura, o valor do ângulo de contacto da água com a grafite é de 92° , enquanto o grafeno, colocado sobre um substrato de vidro, apresenta um valor de ângulo de 48° , valor que aumenta com o número de camadas até atingir o valor da grafite [59].

Os valores médios, e respetivo desvio padrão, apresentados na Tabela 3.6 mostram que o grau de hidrofobicidade ou hidrofiliidade difere de deposição para deposição sem apresentar uma tendência definida com a alteração dos parâmetros de deposição. Com efeito a maior hidrofiliidade é observada para as superfícies G7 e G9 e menor hidrofiliidade na deposição G5 e G6.

Os valores aqui reportados na Tabela 3.6 para as deposições G7 e G8 são semelhantes aos existentes na literatura para o grafeno. No entanto, as caracterizações efetuadas indicaram que estes revestimentos são muito distintos do grafeno, não só porque este é constituído por uma monocamada de átomos de carbono com a espessura 0,34 nm, e a espessura dos filmes é de 67 e 51 nm, respetivamente, mas também pela ausência de espectro de Raman e distinção no tipo de ligação apresentado em XPS. A superfície G8 não foi analisada por XPS, mas devido à semelhança dos parâmetros de deposição e ao espectro de Raman da deposição G7 é possível assumir que o tipo de ligação química será semelhante.

Tabela 3.6 Avaliação da hidrofiliidade das superfícies por medição do ângulo de contacto com água.

Ângulo de contacto ($^\circ$)									
<i>G1</i>	<i>G2</i>	<i>G3</i>	<i>G4</i>	<i>G5</i>	<i>G6</i>	<i>G7</i>	<i>G8</i>	<i>G9</i>	<i>G10</i>
$58 \pm 0,6$	$61 \pm 0,5$	60 ± 1	64 ± 3	69 ± 3	69 ± 1	45 ± 2	57 ± 3	42 ± 3	50 ± 2

3.5. Espectroscopia do Visível

Como é conhecido, o grafeno possui 2,3 % de absorvância da luz visível, sendo esta uma das propriedades identificativas deste tipo de material [12]. Por esta razão foi utilizada a espectroscopia do visível para complementar a caracterização dos filmes finos.

Na figura 3.7 estão os espectros dos filmes G2, G4, G7 e G10. A análise foi efetuada nas deposições sobre lâminas de vidro; como estas absorvem radiação para comprimentos de onda de ultravioleta os espectros apenas dizem respeito à região do visível.

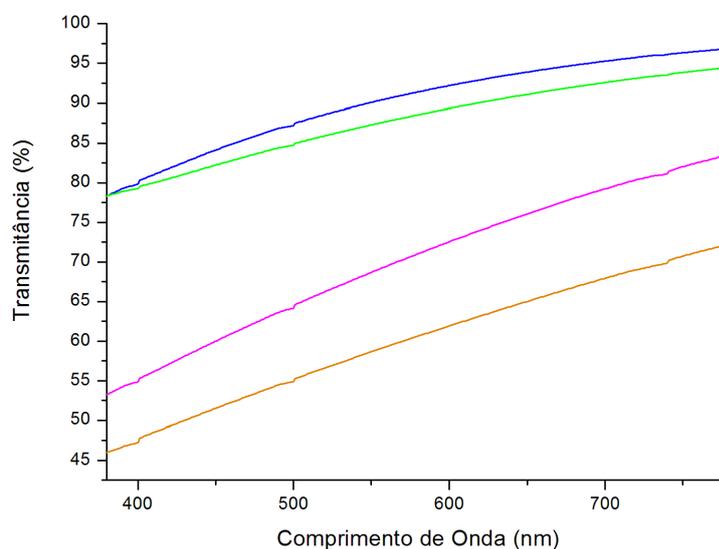


Figura 3.7 Espectro do Visível das superfícies G2 (laranja), G4 (rosa), G7 (azul) e G10 (verde).

Os espectros revelam que qualquer um dos filmes finos apresenta baixa capacidade de absorver a luz, ou seja, apresentam elevada transmitância, ainda assim superior aos 2,3% do grafeno. Por outro lado esta caracterização revela que esta capacidade não é dependente da espessura dos filmes finos, pois o designado por G7 é o que apresenta maior espessura e absorve menos radiação na zona do visível do que, por exemplo, a superfície G2 que é menos espessa.

3.6. Potencial Eletrocínético

A carga superficial dos filmes finos, quando imersos num eletrólito, foi indiretamente avaliada através do potencial zeta. Os valores deste potencial estão sumariados na Tabela 3.7 e apresentam valores entre os -30 e -134 mV.

Tabela 3.7 Valores do potencial zeta dos revestimentos avaliados em KCl 1mM, pH 7,0.

Potencial zeta (ζ) (mV)									
<i>G1</i>	<i>G2</i>	<i>G3</i>	<i>G4</i>	<i>G5</i>	<i>G6</i>	<i>G7</i>	<i>G8</i>	<i>G9</i>	<i>G10</i>
-32±2	-52±2	-67±5	-40±4	-32±1	-38±4	-134±5	-108±5	-30±2	-50±2

A relação da variação do potencial zeta com os parâmetros de deposição não é evidente. No entanto o perfil de variação, entre as distintas superfícies, e os valores dos ângulos de contacto e potencial zeta é semelhante (Figura 3.8). Com efeito, quanto mais hidrofílica a superfície, mais negativo o valor do potencial zeta. Tal facto pode estar relacionado com a presença de grupos químicos funcionais que, para além de apresentarem maior afinidade com a água, desenvolvem carga negativa por dissociação quando imersos num eletrólito.

A determinação do potencial zeta permitiu ainda observar que as superfícies G7 e G8, que não apresentaram espectro de Raman semelhante aos revestimentos de carbono, apresentam valores anormalmente negativos. Este resultado vem reforçar o anteriormente observado e sugere que o tipo de ligações e estrutura química destas duas superfícies são completamente distintas das presentes nos restantes revestimentos.

Após as caracterizações efetuadas é possível afirmar que os revestimentos depositados por pulverização catódica deram origem a filmes finos de GBM. Estes estão oxidados e apresentam defeitos na estrutura química. A tentativa de reduzir alguns destes GBM para se conseguir filmes com menor teor de oxigénio foi efetuada por recurso à ação de várias espécies de bactérias conforme a seguir se reporta.

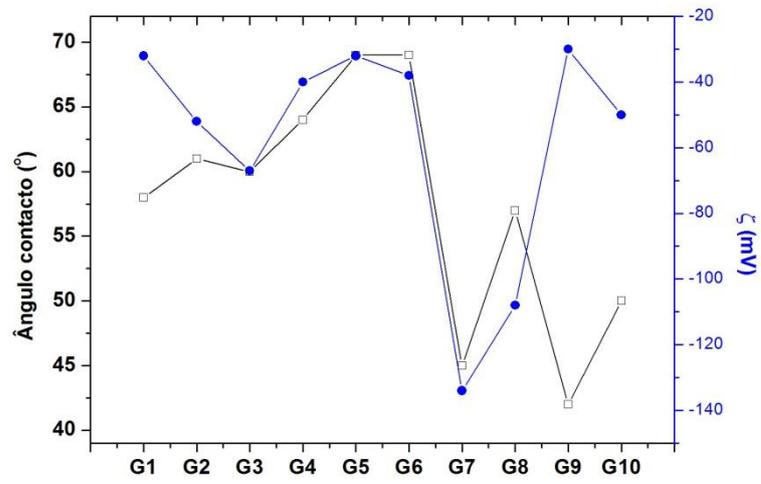


Figura 3.8 Relação entre os valores do ângulo de contacto com água e o potencial zeta das superfícies.

3.1. Testes Microbianos

Morfologia

Para os testes microbianos foram selecionadas 11 espécies diferentes, com as quais foram realizados ensaios preliminares para avaliação da toxicidade das superfícies bem como da capacidade das bactérias reduzirem os GBM. Os testes preliminares levaram à seleção de 4 espécies, a saber *E. coli*, *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *S. putrefaciens*.

Nas Figuras 3.9, 3.10, 3.11 e 3.12 são apresentadas as diferentes morfologias das bactérias depois de incubadas com as superfícies G2, G7 e G10, bem como a morfologia nativa de cada espécie.

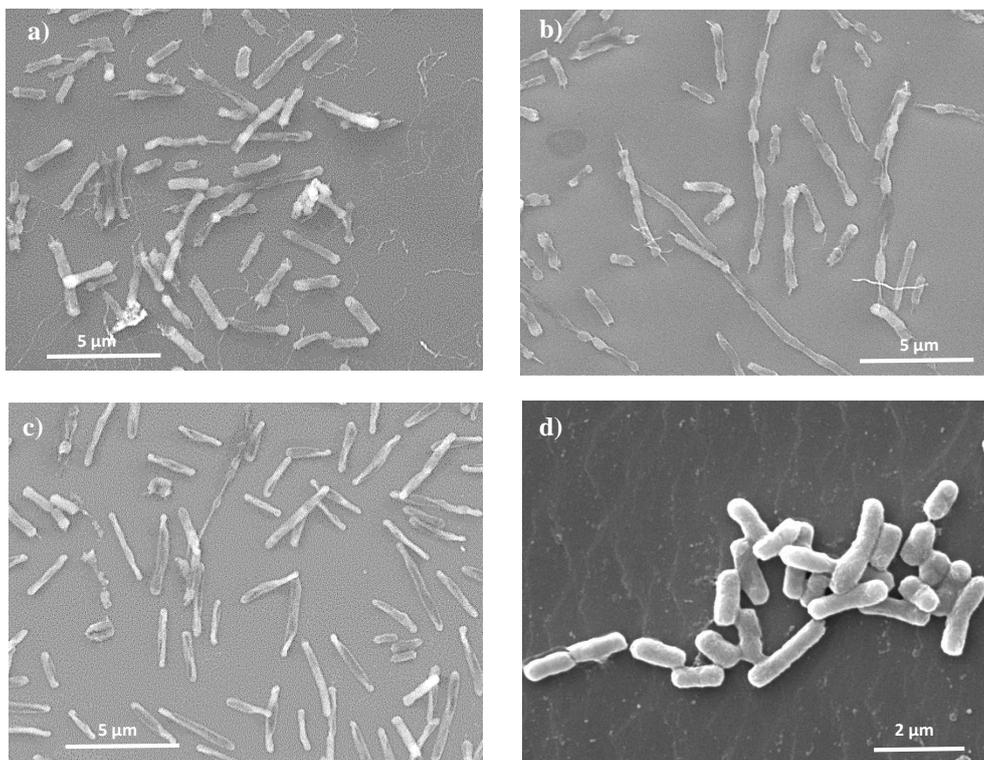


Figura 3.9 Micrografias da bactéria *E. coli* após contacto com as superfícies a) G2; b) G7; c) G10 e d) morfologia nativa.

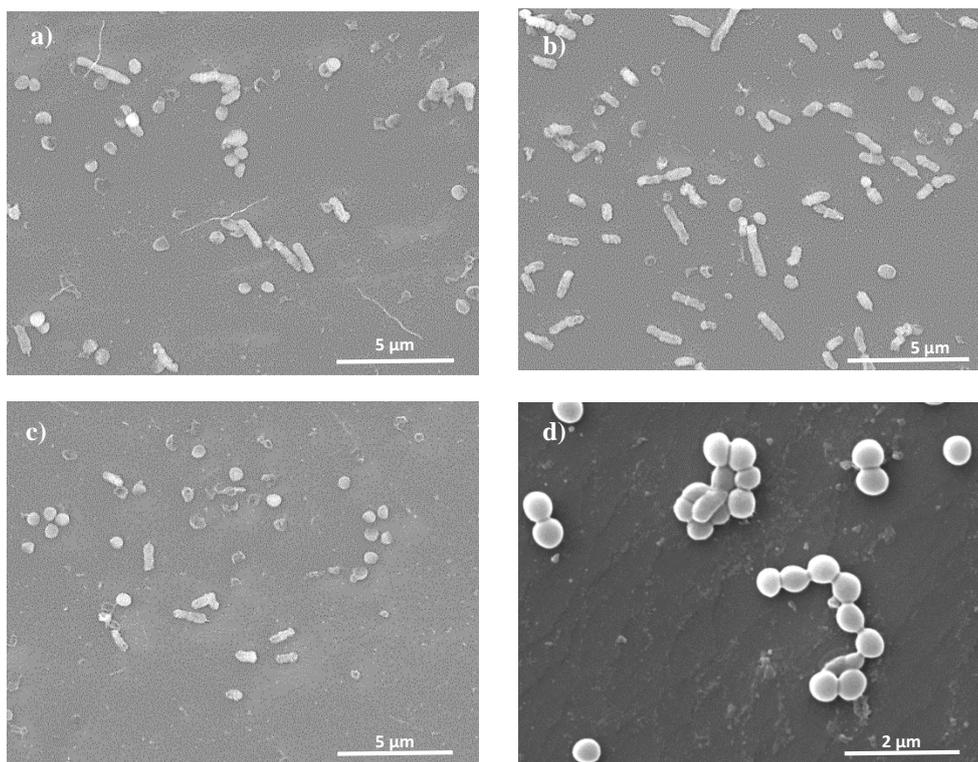


Figura 3.10 Micrografias da bactéria *S. aureus* após contacto com as superfícies a) G2; b) G7; c) G10 e d) morfologia nativa.

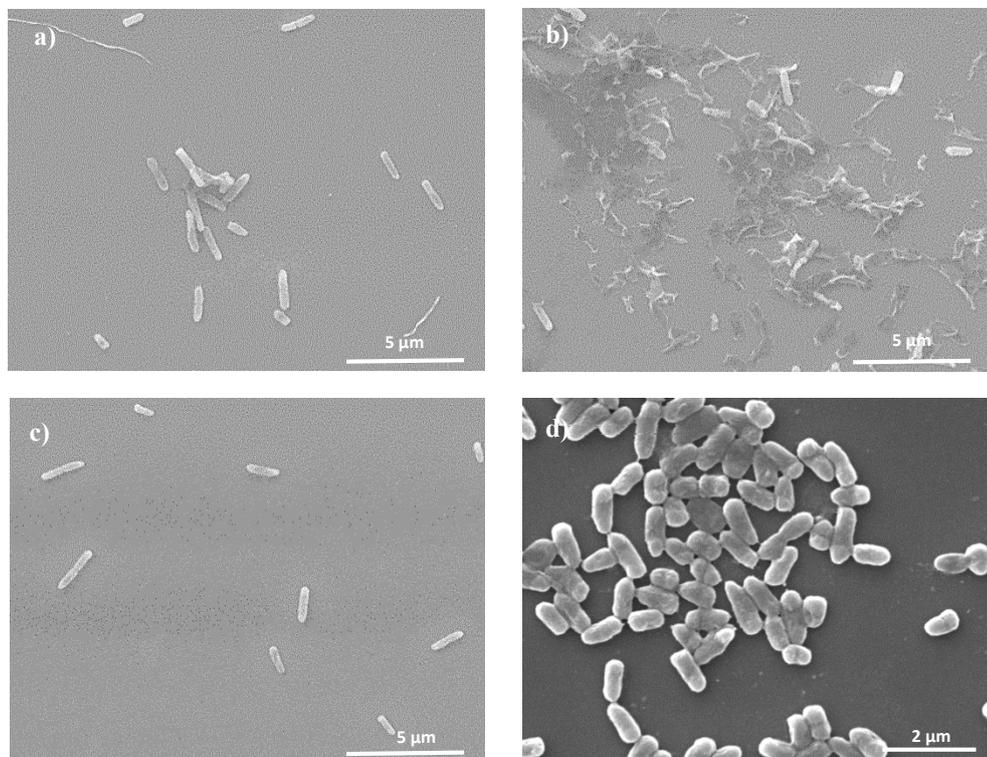


Figura 3.11 Micrografias da bactéria *P. aeruginosa* após contacto com as superfícies a) G2; b) G7; c) G10 e d) morfologia nativa.

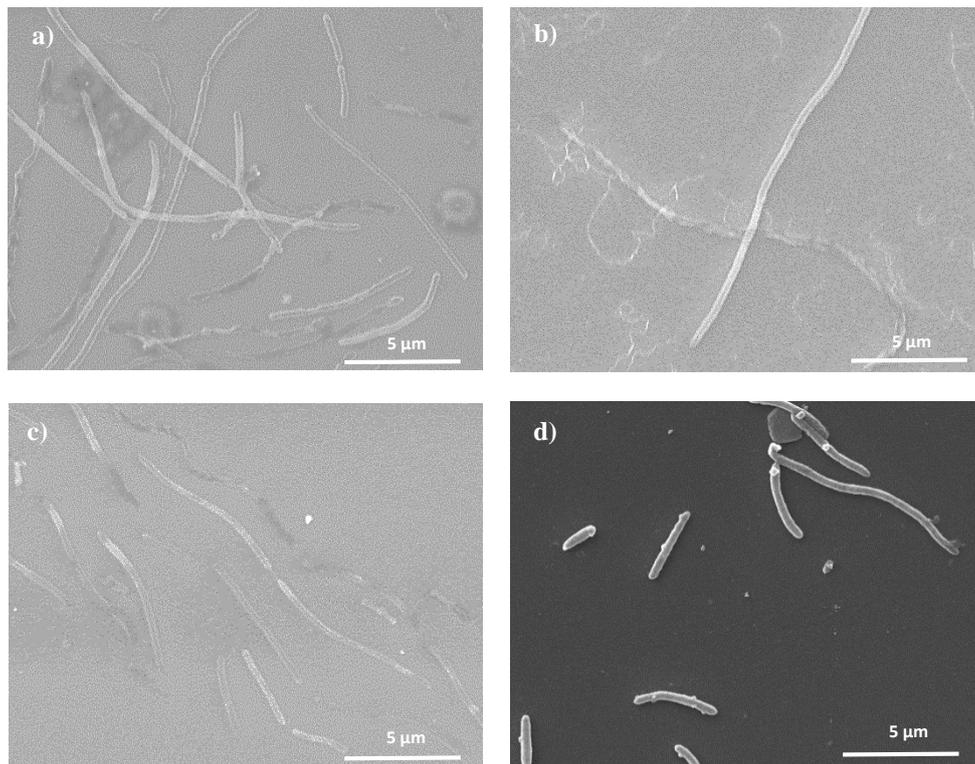


Figura 3.12 Micrografias da bactéria *S. putrefaciens* após contacto com as superfícies a) G2; b) G7; c) G10 e d) morfologia nativa.

A morfologia das células bacterianas testadas foi evidentemente alterada após contacto com as superfícies. Na maioria dos casos, o que se observou em todos os microorganismos foi a incapacidade da divisão, resultando no aumento exagerado do comprimento da célula microbiana. No caso da *P. aeruginosa*, figura 3.11 b), é visível a formação de um biofilme na superfície, geralmente aplicável ao mecanismo de defesa das bactérias para impedir o contacto com uma superfície tóxica. Na *S. putrefaciens* é possível observar que a morfologia da bactéria foi muito alterada em relação ao seu estado natural demonstrando ser a bactéria mais afetada pela toxicidade das superfícies.

Testes de Viabilidade

Os testes de viabilidade celular foram necessários para avaliar a capacidade de recuperação das células após incubação nas superfícies e aferir do seu efetivo potencial antimicrobiano. A Figura 3.13 representa, percentualmente, as células viáveis através da contabilização de unidades formadoras de colónias (CFU). No gráfico é apresentada a

diferença de viabilidade observada para as diferentes espécies bacterianas *E. coli*, *S. aureus* e *P. aeruginosa* sobre as superfícies G2, G7 e G10. No caso da bactéria *S. putrefaciens* não foi observado qualquer tipo de crescimento nas placas de meio sólido após contacto com a superfície, portanto, é possível concluir que as superfícies são muito tóxicas para a bactéria.

A partir dos dados é possível afirmar que a superfície G2 é a menos tóxica para as bactérias das espécies *E. coli* e *P. aeruginosa* que são mais afetadas pela toxicidade dos revestimentos G7 e G10. No caso da *S. aureus* é o revestimento G10 o menos tóxico e G2 e G7 os mais tóxicos, o que pode estar relacionado com o facto de *S. aureus* ser uma bactéria Gram positiva.

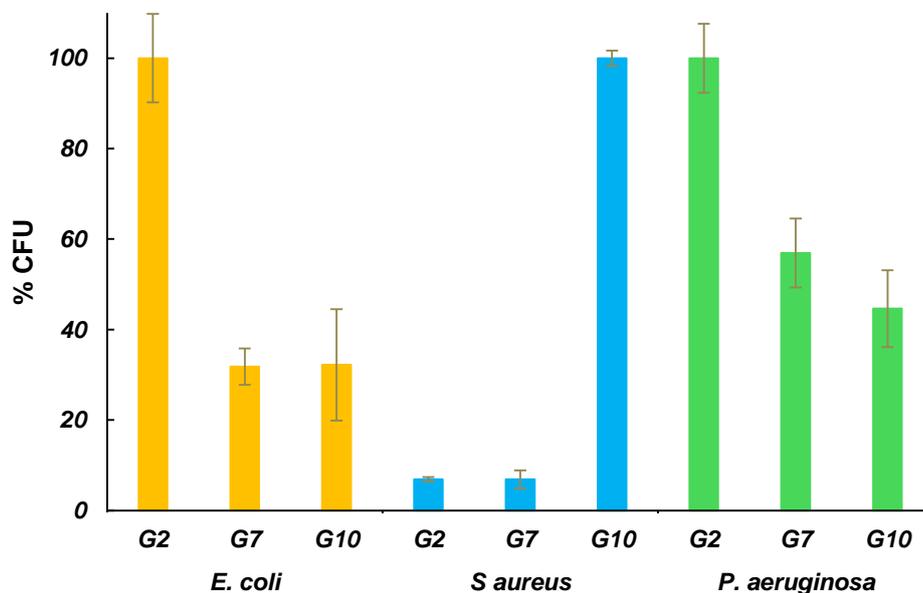


Figura 3.13 Percentagem de colónias viáveis após incubação das células nas superfícies G2, G7 e G10.

Espectroscopia de Raman

Após incubação em suspensões bacterianas as superfícies foram de novo analisadas por espectroscopia de Raman, após remoção das células procarióticas. A Figura 3.14 apresenta o espectro de Raman da superfície G2 após incubação com a bactéria *E.coli*.

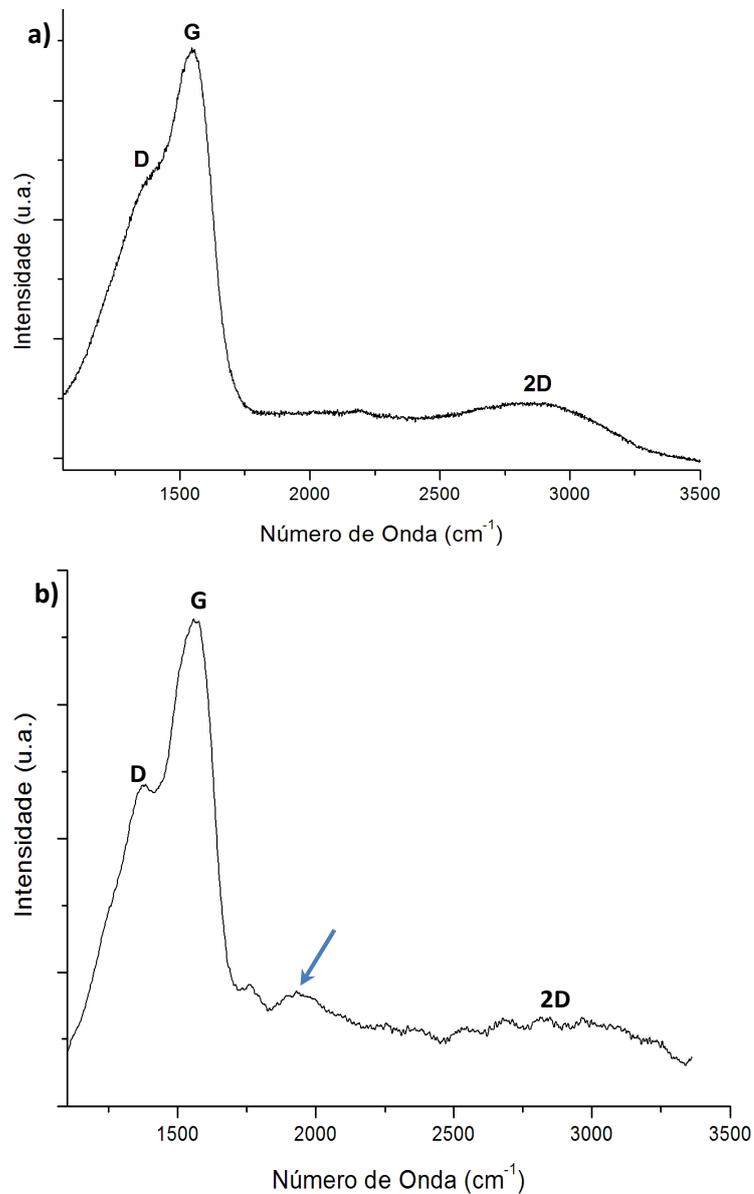


Figura 3.14- Espectro de Raman da superfície G2 a) após deposição e b) após incubação na presença da *E. coli*.

A partir do espectro apresentado é possível observar alterações em relação ao filme após deposição, nomeadamente pelo início de separação dos picos G e D, o que indica reestruturação da estrutura química mais próxima da do grafeno. Acresce o facto de a intensidade do pico D diminuir conforme se encontra quantificado na Tabela 3.8. Também o perfil do pico 2D é muito distinto do anteriormente observado apresentando-se mais estreito o que também é uma evidência de uma reorganização da estrutura. No entanto, a

sua intensidade é ainda muito baixa. Nesta região do espectro é ainda possível observar o aparecimento de picos na região próxima dos 2000 cm^{-1} (assinalado por uma seta) e que neste caso são identificados como policumulenos, que são constituídos por cadeia longas de ligações C=C lineares. Estes podem ser um dos compostos constituintes da matriz extracelular ou pode ser consequência da redução efetuada pelas bactérias que, apesar de implicar um decréscimo de oxigénio, não promove a estrutura química em anel aromático.

Tabela 3.8 Razão das intensidades do pico D e G, representada por I_D/I_G , para os filmes finos G2, G7 e G10 antes e após incubação na bactéria *E. coli*.

	Razão I_D/I_G		
	G2	G7	G10
Após deposição	0,75	-	0,73
<i>E. coli</i>	0,56	-	0,61

Após incubação das superfícies na presença de uma suspensão da espécie bacteriana *E. coli*, e análise dos espectros de Raman, concluiu-se que na presença de *E. coli* a reestruturação da superfície tinha sido melhor quando comparada com a ocorrida na presença das outras espécies bacterianas. Por esta razão, foi efetuada uma análise por XPS, neste revestimento específico, para avaliar as alterações ocorridas (Tabela 3.9).

No que respeita à composição química ocorreu uma ligeira variação dos teores de C e O, com o aumento de 80,9 % para 82,3 %at. em C, e a complementar diminuição de 19,1 %at. para 17,7%at. de O. No entanto, pelos dados apresentados na Tabela 3.9 é possível concluir que a quantidade de ligações do tipo C=C aromático aumentaram de 70,8 % para 87,8 o que é um resultado muito favorável pois indica que a ação bacteriana não se limitou a reduzir o teor de oxigénio mas, sobretudo, contribuiu significativamente para o rearranjo das ligações de modo a conferir uma estrutura química mais próxima do grafeno.

Tabela 3.9 Comparação, por análise XPS, das ligações químicas existentes na superfície G2 após deposição e após incubação com uma suspensão de *E.coli*.

Ligações identificadas por XPS (% relativa)				
G2	70,8 %	12,6 %	8,9 %	7,8 %
	C=C aromático	C-H	>C=O	-O-C=O
G2 <i>E. coli</i>	87,8 %		10,6 %	
	C=C aromático		>C=O	

3.2. Tratamentos Térmicos

Na literatura está reportado que através de tratamentos térmicos é possível obter a redução dos óxidos de GBM bem como do rearranjo de ligações com o objetivo de ter uma estrutura química semelhante à do grafeno.

As Figuras 3.15 e 3.16 representam os espectros de Raman das superfícies G2, G7 e G10 após tratamento térmico a 600 °C. No caso da superfície G2 também é apresentado, na Figura 3.15 b), o espectro após tratamento térmico a 800 °C que evidencia o aumento da intensidade da banda D.

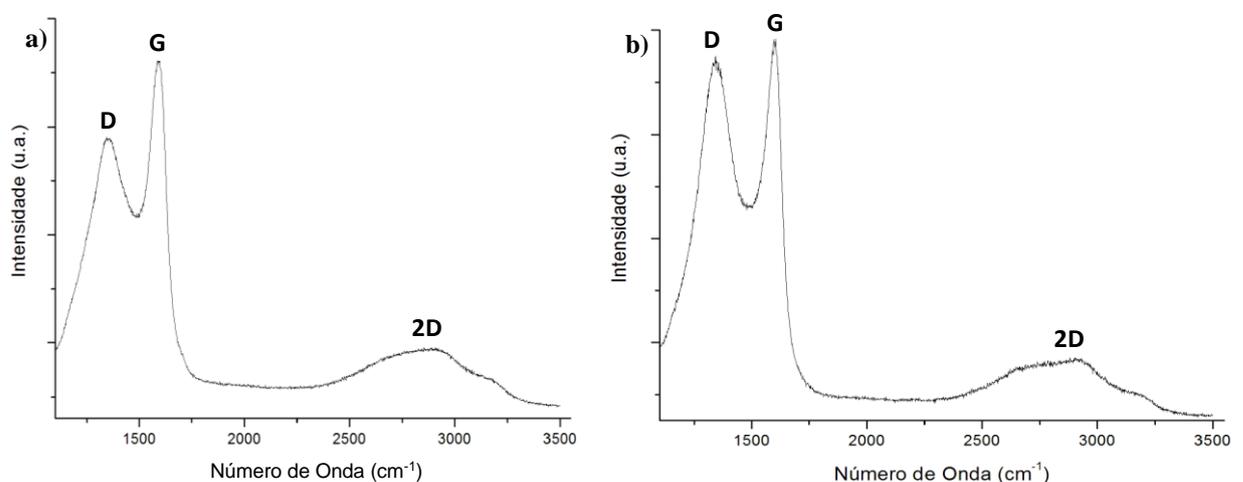


Figura 3.15 Espectro de Raman da superfície G2 após tratamento térmico a) 600 °C e b) 800 °C.

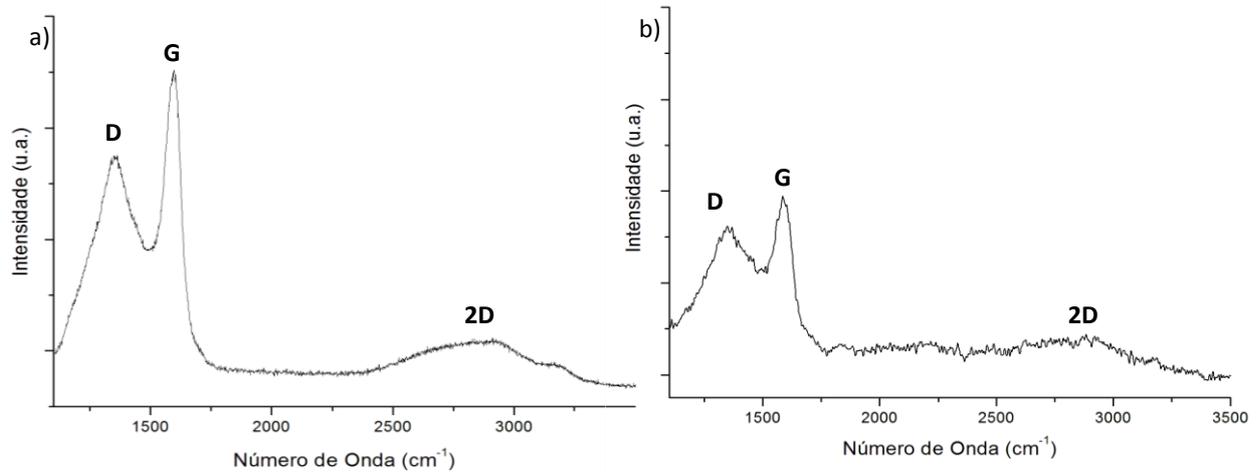


Figura 3.16 Espectro de Raman das superfícies a) G) e b) G10, após tratamento térmico a 600 °C.

Após análise dos espectros é possível concluir que o número de defeitos na estrutura química de todos os revestimentos diminuiu com o tratamento a 600 °C e aumentou quando a temperatura é de 800 °C atingindo, neste caso, valores superiores a 1 na razão I_D/I_G (Tabela 3.10). Também é possível observar que o número de defeitos diminuídos pela acção da bactéria *E.coli* é ligeiramente inferior à obtida pelo tratamento térmico a 600 °C, mas sem os custos associados a este.

Tabela 3.10 Razão I_D/I_G das superfícies G2, G7 e G10 após deposição, após incubação na bactéria *E.coli* e após tratamento térmico (TT) a 600 °C e 800 °C.

	Razão I_D/I_G		
	G2	G7	G10
Após deposição	0,75	-	0,73
<i>E. coli</i>	0,56	-	0,61
TT 600	0,44	0,59	0,82
TT 800	1,07	1,45	0,98

CONCLUSÕES

O objetivo do trabalho apresentado nesta dissertação foi produzir “grafeno” utilizando uma tecnologia limpa, capaz de revestir diretamente as superfícies de interesse e em áreas maiores do que as que atualmente são possíveis pela maioria das técnicas. Nesse sentido foi utilizada a técnica de deposição por pulverização catódica, modo r.f. magnetrão, para depositar carbono, com estrutura semelhante à do “grafeno”, sobre várias superfícies e avaliar a potencialidade de utilizar bactérias para posterior redução do material depositado. Simultaneamente este teste permitiu avaliar o potencial caráter antimicrobiano das superfícies.

Do trabalho desenvolvido podem ser inferidas as seguintes conclusões:

- a técnica de deposição pulverização catódica r.f. magnetrão é promissora na produção de materiais com estrutura semelhante à do grafeno;
- os revestimentos apresentam, na sua maioria, ligações químicas sp^2 características das ligações C=C aromáticas mas com defeitos, de acordo com a razão I_D/I_G ;
- os defeitos existentes são devidos a uma alteração da estrutura C=C aromática mas não do tipo C-C sp^3 o que significa que a partir da pulverização catódica é possível obter estruturas do tipo sp^2 contendo O na sua constituição, isto é, GBM;
- a diminuição de defeitos na estrutura sp^2 aromática pode ser conseguida por tratamento térmico a 600 °C e também por ação da bactéria *E.coli*; se o tratamento térmico ocorrer a 800 °C o número de defeitos aumenta consideravelmente e, neste caso, a ação da referida bactéria é um método mais eficaz na reestruturação das ligações sp^2 aromáticas.
- as superfícies testadas G2, G7 e G10 apresentam diferentes graus de toxicidade para com diferentes espécies de bactérias testadas, podendo ser considerados como revestimentos antibacterianos alternativos a materiais considerados citotóxicos para com as células eucarióticas, tal como a prata.

Como trabalho futuro é necessário complementar estes resultados com análise por XPS dos filmes após tratamento térmico a 600 °C para aferir se a reestruturação das ligações contribui para uma estrutura química mais semelhante ao grafeno, como aconteceu quando as superfícies foram inoculadas com bactérias. Também é sugerida uma

otimização da capacidade de redução dos revestimentos produzidos com outras espécies bacterianas. Simultaneamente, seria interessante explorar o potencial efeito antibacteriano destas superfícies nomeadamente complementar o estudo com células eucarióticas e avaliar da sua aplicabilidade como revestimentos de dispositivos médicos invasivos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] Mathew J. Allen, Vincent C. Tung, Richard B. Kaner. (2010). “Honeycomb Carbon: A Review of Graphene”. *Chemical Reviews*, **vol. 110**, pp. 132-145.
- [2] The Royal Swedish Academy of Sciences, (2010). *Graphene - the perfect atomic lattice*. Página consultada em 10 de março de 2015, <http://www.nobelprize.org/nobel_prizes/physics/laureates/2010/popular-physicsprize2010.pdf>.
- [3] K. S. Novoselov *et al.* (2004). “Electric Field Effect in Atomically Thin Carbon Films”. *Science*, **vol. 306**, pp. 666-669.
- [4]. A. D. McNaught, A. Wilkinson. (1997). *Compendium of Chemical Terminology*. 2º ed. Oxford: Blackwell Scientific Publications.
- [5] Skenar Chandra Ray. (2015). *Applications of Graphene and Graphene Oxide Based-Nanomaterials*. Wiliam Andrew, Elsevier.
- [6] Subbiah Alwarappan, Ashok Kumar. (2014). *Graphene-Based Materials: Science and Technology*. CRC Press, Taylor & Francis Group.
- [7] Albert Bianco *et al.* (2013). All in the graphene family – A recommended nomenclature for two-dimensional carbon materials. *Carbon*, **vol. 65**, pp. 1-6.
- [8] Xiangjian Wan, Yi Huang, Yongsheng Chen. (2012). Focusing on Energy and Optoelectronic Applications: A Journey for Graphene and Graphene Oxide at Large Scale. *Accounts of Chemical Research*, **vol. 45**, pp. 598-607.
- [9] Elizabeth Gibney. (2015). The super materials that could trump graphene. *Nature*, **vol. 55**, pp. 274-276.
- [10] Virendra Singh, Daeha Joung, Lei Zhai, Soumen Das, Saiful I. Khondaker, Sudipta Seal. (2011). Graphene based materials: Past, present, and Future. *Progress in Materials Science*, **vol. 56**, pp. 1178-1271.

- [11] Edward P. Randviir, Dale A. C. Brownson, Craig E. Banks. (2014). A decade of graphene research: production, applications and outlook. *Materials Today*, **vol. 17**, pp. 426-432.
- [12] K. S. Novoselov, V. I. Fal'ko, L. Colombo, P. R. Gellert, M. G. Schwab & K. Kim. (2012). A roadmap for graphene. *Nature*, **vol. 490**, pp. 192-200.
- [13] Chunggu Lee, Xiaoding Wei, W. Jeffrey, James Hone. (2008). Measurement of the Elastic Properties and Intrinsic Strength of Monolayer Graphene. *Science*, **vol. 321**, pp. 385-388.
- [14] Cristina Gómez-Navarro, Marko Burghard, Klaus Kern. (2008). Elastic Properties of Chemically Derived Single Graphene Sheets. *Nano Letters*, **vol. 8**, pp. 2045-2049.
- [15] Ji Won Suk, Richard D. Piner, Jinho An, Rodney S. Ruoff. (2010). Mechanical Properties Monolayer of Graphene Oxide. *ACS Nano*, **vol. 4**, pp. 6557-6564.
- [16] Graphene Flagship. Work Package: Nanocomposites. Página consultada em 20 junho de 2015 <http://graphene-flagship.eu/?page_id=2475#.VXf_Y_IVjp4>.
- [17] Artur M. Pinto *et al.* (2013). Biocompatibility of poly(lactic acid) with incorporated graphene-based materials. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, **vol. 104**, pp. 229-238.
- [18] Zhuang Liu, Joshua T. Robinson, Xiaoming Sun, Hongjie Dai. (2008). PEGylated Nanographene Oxide for Delivery of Water-Insoluble Cancer Drugs. *Journal of American Chemical Society*, **vol. 130**, pp. 10876-10877.
- [19] Graphene Flagship. (2013) *About the Graphene Flagship*. Página consultada em 12 de junho de 2015, <http://graphene-flagship.eu/?page_id=5#.VXxHfflViko>.
- [20] Andrea C. Ferrari *et al.* (2015) Science and technology roadmap for graphene, related two-dimensional crystals, and hybrid systems. *Nanoscale*, **vol. 7**, pp. 4587-5062.
- [21] Kostas Kostarelos, Kostya S. Novoselov. (2014) Graphene devices for life. *Nature Nanotechnology*, **vol. 9**, pp. 744-745.

- [22] Amedea B. Seabra, Amauri J. Paula, Renata de Lima, Oswaldo L. Alves, Nelson Durán. (2014). Nanotoxicity of Graphene and Graphene Oxide. *Chemical Research in Toxicology*, **vol. 27**, pp. 159-168.
- [23] Yi Zhang, Luyao Zhang, Chongwu Zhou. (2013). Review of Chemical Vapor Depositions of Graphene and Related Applications. *Accounts of Chemical Research*, **vol. 46**, pp. 2329-2339.
- [24] M. P. Lavin-Lopez *et al.* (2014). Synthesis and characterization of graphene: influence of synthesis variables. *Physical Chemistry Chemical Physics*, **vol. 16**, pp. 2962-2970.
- [25] Francesco Bonaccorso, Antonio Lombardo, Twafique Hasan, Zhipel Sun, Luigi Colombo, Andrea C. Ferrari. (2010). Production and processing of graphene and 2D crystals. *Materials Today*, **vol. 15**, pp. 564-589.
- [26] J. R. Creighton, P. Ho. (2001). "Chemical Vapor Deposition" in *Surface Engineering Series*. ASM International. Jong-Hee Park, T.S. Sudarshan, p. 1-6.
- [27] William S. Hummers Jr., Richard E. Offeman. (1950). Preparation of Graphitic Oxide. *Journal of American Chemical Society*, **vol. 80**, pp. 1339-1339.
- [28] Sungjin Park, Rodney S. Ruoff. (2011). Chemical methods for the production of graphenes. *Nature Nanotechnology*, **vol. 4**, pp. 217-224.
- [29] Ling Sun, Bunshi Fugetsu. (2013). Mass production of graphene oxide from expanded graphite. *Materials Letters*, **vol. 109**, pp. 207-220.
- [30] Yanwu Zhu *et al.* (2010) Graphene and Graphene Oxide: Synthesis, Properties, and Applications. *Advanced Materials*, **vol. 22**, pp. 3906-3924.
- [31] Vincent C. Tung, Mathew J. Allen, Yang Yang, Richard B. Kaner. (2008). High-throughput solution processing of large-scale graphene. *Nature Nanotechnology*, **vol. 4**, pp. 25-29.
- [32] Songfeng Pei, Hui-Ming Cheng. (2012). The reduction of graphene oxide. *Carbon*, **vol. 50**, pp. 3210-3228.

- [33] D. K. Maurya, A. Sardarinejad, K. Alameh. (2014). Recent Developments in R.F. Magnetron Sputtered Thin Films for pH Sensing Applications – An Overview. *Coatings*, **vol. 4**, pp. 756-771.
- [34] Mihnea Ian Ionescu, Xueliang Sun, Ben Luan. (2015). Multilayer graphene synthesized using magnetron sputtering for planar supercapacitor application. *Canadian Journal of Chemistry*, **vol. 93**, pp. 1-5.
- [35] Motonobu Sato *et al.* (2012) Fabrication of Graphene Directly on SiO₂ without Transfer Processes by Annealing Sputtered Amorphous Carbon. *Japanese Journal of Applied Physics*, **vol. 51**, nº 04DB01, 6 pag.
- [36] Huihui Zhu *et al.* (2015). Graphene quantum dots directly generated from graphite via magnetron sputtering and the application in thin-film transistors. *Carbon*, **vol. 88**, pp. 225-232.
- [37] Everett C. Salas, Zhengzong Sun, Andreas Lüttge, James M. Tour. (2010). Reduction of Graphene Oxide *via* Bacterial Respiration. *ACS Nano*, **vol. 4**, pp. 4852-4856.
- [38] LaSurface. XPS Element of Energy. Página Consultada em 3 de julho de 2015 <<http://www.lasurface.com/database/elementxps.php>>.
- [39] Gongming Wang, Fang Qian, Chad W. Saltikov, Yongqin Jiao, Yat Li. (2011). Microbial Reduction of Graphene Oxide by *Shewanella*. *Nano Research*, **vol. 4**, pp. 563-570.
- [40] O. Akhavan, E. Ghadni. (2012). *Escherichia coli* bacteria reduce graphene oxide to bactericidal graphene in a self-limiting manner. *Carbon*, **vol. 50**, pp. 1853-1860.
- [41] Sangiliyandi Gurunthan, Jae Woong Han, Vasuki Eppakalyala, Jin-Hoi Kim. (2013). Microbial reduction of graphene oxide by *Escherichia coli*: A green chemistry approach. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, **vol. 103**, pp. 772-777.
- [42] Sangiliyandi Gurunthan, Jae Woong Han, Vasuki Eppakalyala, Jin-Hoi Kim. (2013). Biocompatibility of microbially reduced graphene oxide in primary mouse embryonic fibroblast cells. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, **vol. 105**, pp. 55-68.

- [43] Omid Akhavan, Elham Ghaderi. (2010). Toxicity of Graphene and Graphene Oxide Nanowalls Against Bacteria. *ACS Nano*, **vol. 4**, pp. 5731-5736.
- [44] Nilanjan Chatterjee. (2012). *Electron Microprobe Analysis*. Notas, Massachusetts Institute of Technology.
- [45] MiPlaza Materials Analysis, Philips. (2008). X-Ray Photoelectron Spectroscopy (XPS/ESCA).
- [46] Materials Evaluation and Engineering. (2001). *Handbook of Analytical Methods for Materials*.
- [47] J. M. G. Martinho (1994). Espectroscopia de Absorção no Ultravioleta e Visível. *Química*, **vol. 52**, pp. 44-48.
- [48] Joseph I. Goldstein *et al.* (2003). *Scanning Electron Microscopy and X-Ray Microanalysis*. New York, Kluwer Academic/Plenum Publishers.
- [49] C. Richard Brundle, Charles A. Evans, Shaun Wilson. (1992). *Encyclopedia of Materials Characterization*. Butterworth-Heinemann.
- [50] C. Casiraghi. (2012). Raman Spectroscopy of graphene. *Spectroscopic Properties of Inorganic and Organometallic Compounds: Techniques, Materials and Applications*, **vol. 43**, pp. 29-56.
- [51] Gianangelo Bracco, Bodil Holst. (2013). "Contact Angle and Wetting Properties" in *Surface Science Techniques*. Springer. Yuehua Yan, T. Randall Lee, p. 3-34.
- [52] Yongan Gu, Dongqing Li. (2000). The ξ -Potencial of Glass Surface in Contact with Aqueous Solutions. *Journal of Colloid and Interface Science*, **vol. 226**, pp. 328-339.
- [53] Neil Glagovich. *Infrared Spectroscopy*. (2001). Página consultada em 1 de julho 2015
<<http://www.instruction.greenriver.edu/kmarr/chem%20162/Chem162%20Labs/Interpreting%20IR%20Spectra/IR%20Absorptions%20for%20Functional%20Groups.htm>.>
- [54] Robert M. Silverstein, Francis X. Webster, David Kiemle. (2005) *Spectrometric Identification of Organic Compounds*, 7th Edition. Wiley.

- [55] Infrared Spectra, Página Consultada em: 1 de julho de 2015 <http://www.udel.edu/chem/fox/Chem333/Fall2013/Chem333Fall2013/Welcome_files/IR%20handout.pdf>
- [56] Alyn William Johnson. (1998). Invitation to Organic. Jones & Bartlett Learning.
- [57] A. C. Ferrari et al. (2006). Raman Spectrum of Graphene and Graphene Layers. Physical Review Letters, vol. 97, nº 187401, 4 pag.
- [58] Xavier Díez-Betriu et al. (2013). Raman spectroscopy for the study of reduction mechanisms and optimization of conductivity in graphene oxide thin films. Journal of Materials Chemistry C, **vol. 1**, pp. 6905-6912.
- [59] Javad Rafiee (2012). Wetting transparency of graphene. Nature Materials, **vol. 11**, pp. 217-222.