

**MINISTÉRIO DA DEFESA
EXÉRCITO BRASILEIRO
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA
INSTITUTO MILITAR DE ENGENHARIA
CURSO DE DOUTORADO EM CIÊNCIA DOS MATERIAIS**

CAMILA CRISTINE LOPES

**PRODUÇÃO DE NANOCOMPÓSITOS
HIDROXIAPATITA – ÓXIDO DE GRAFENO**

**Rio de Janeiro
2019**

INSTITUTO MILITAR DE ENGENHARIA

CAMILA CRISTINE LOPES

**PRODUÇÃO DE NANOCOMPÓSITOS
HIDROXIAPATITA – ÓXIDO DE GRAFENO**

Tese de Doutorado apresentada ao Curso de Doutorado em Ciência dos Materiais do Instituto Militar de Engenharia, como requisito parcial para a obtenção do título de Doutora em Ciências em Ciência dos Materiais.

Orientadores: Marcelo Henrique Prado da Silva – D.Sc.
TC. Wagner Anacleto Pinheiro – D.Sc.

Rio de Janeiro

2019

2

c2019

INSTITUTO MILITAR DE ENGENHARIA

Praça General Tibúrcio, 80 – Praia Vermelha

Rio de Janeiro – RJ CEP: 22290-270

Este exemplar é de propriedade do Instituto Militar de Engenharia, que poderá incluí-lo em base de dados, armazenar em computador, microfilmар ou adotar qualquer forma de arquivamento.

É permitida a menção, reprodução parcial ou integral e a transmissão entre bibliotecas deste trabalho, sem modificação de seu texto, em qualquer meio que esteja ou venha a ser fixado, para pesquisa acadêmica, comentários e citações, desde que sem finalidade comercial e que seja feita a referência bibliográfica completa.

Os conceitos expressos neste trabalho são de responsabilidade do(s) autor(es) e do(s) orientador(es).

Lopes, Camila Cristine

Produção de Nanocompósitos Hidroxiapatita-Óxido de Grafeno / Camila Cristine Lopes. Rio de Janeiro, 2019.

119p.: il.

Tese (Doutorado) – Instituto Militar de Engenharia, Ciência dos Materiais, 2019.

1. Curso de Ciência dos Materiais – teses, dissertações. 2. Hidroxiapatita. 3. Óxido de grafeno. I. Silva, Marcelo Henrique Prado da, orient. II. Pinheiro, Wagner Anacleto, orient. III. Instituto Militar de Engenharia. IV. Título.

INSTITUTO MILITAR DE ENGENHARIA

CAMILA CRISTINE LOPES

**PRODUÇÃO DE NANOCOMPÓSITOS HIDROXIAPATITA –
ÓXIDO DE GRAFENO**

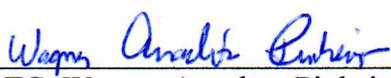
Tese de Doutorado apresentada ao Curso de Doutorado em Ciencia dos Materiais do Instituto Militar de Engenharia, como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor em Ciências em Ciência dos Materiais.

Orientadores: Marcelo Henrique Prado da Silva – D. Sc.
TC. Wagner Anacleto Pinheiro – D. Sc.

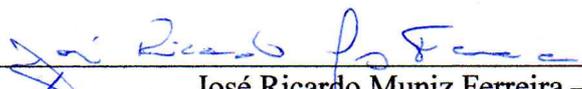
Aprovada em 5 de dezembro de 2019 pela seguinte Banca Examinadora:



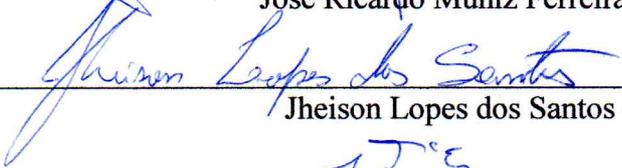
Marcelo Henrique Prado da Silva – D. Sc. do IME – Presidente



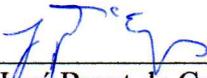
TC. Wagner Anacleto Pinheiro – D. Sc. do IME



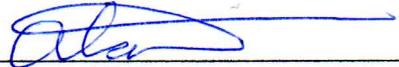
José Ricardo Muniz Ferreira – D. Sc. da R-CRIO



Jheison Lopes dos Santos – D. Sc. da UFRRJ



José Brant de Campos – D. Sc. do UERJ



Alaelson Vieira Gomes – D. Sc. do IME



André Ben-Hur da Silva Figueiredo – D.Sc. do IME

Rio de Janeiro
2019

À minha família,
em especial aos meus pais José Carlos e Rosinea.

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Deus por todas as bênçãos alcançadas, amparando-me junto à Maria nos momentos desafiadores, dando-me forças e mostrando o caminho nas horas incertas, sendo meu Pai e amigo. Eu te agradeço, meu Deus, pois até nas tribulações eu sinto o teu poder e a tua luz.

Agradeço à minha família abençoada, meus pais José Carlos e Rosinéa que são minha inspiração, motivação e exemplo de amor incondicional. Aos meus irmãos, Otávio e Bruna, por apoiar minhas decisões, aconselhando e permanecendo ao meu lado. Sem vocês eu não seria nada! Eu amo vocês. Juntos somos mais fortes! Juntos à Deus, no poder da oração, somos invencíveis e imbatíveis! YES! YES! YES!

Ao meu namorado, Daniel Navarro, faltam-me palavras para descrever toda a minha gratidão. Que sempre me ofereceu todo amor sem esperar nada em troca. Você é a peça fundamental para que a etapa do doutorado fosse um sonho possível. Obrigada por todos os dias em que estive ao meu lado, por dedicar cada segundo do seu tempo. Este trabalho jamais teria sido possível sem o seu apoio, a quem sou grata de todo coração. Obrigada por me fazer sonhar, sentir melhor, crescer, rir, acreditar, querer mudar e ir em frente. Por todo o seu carinho, sua bondade e companheirismo. Eu te amo. Agradeço a Deus por ter colocado você em meu caminho.

À toda a minha família, Carmo e Lopes, desculpe-me pela ausência. Eu amo vocês.

Aos meus orientadores Marcelo Henrique Prado da Silva e Wagner Anacleto Pinheiro, pela confiança no meu trabalho, paciência, valiosas lições transmitidas para realização da pesquisa, e, principalmente, para meu desenvolvimento científico e pessoal no Instituto Militar de Engenharia.

Aos companheiros que passaram pelo laboratório de Cerâmicos, Jheison, Suzana, Ricardo e Danúbia. Obrigada por toda a contribuição durante estes anos e pela convivência. Ao Professor Alaelson, por viabilizar e zelar pelo Laboratório, contribuindo também no auxílio de tratamento térmico neste trabalho.

Às minhas amigas Emília, Talita, Géssica, Camila Souza e Mariana, por serem minha segunda família! Obrigada pelo carinho, companheirismo, paciência e por todos os momentos que passamos juntas, ficará guardado para sempre em meu coração. Sentirei falta das nossas conversas pela manhã, nossas risadas e nossos bolos deliciosos. Yummy!

Aos meus amigos de Campinas, Juliana, Jefferson e ao bebê mais lindo e abençoado que está vindo, Maria Joana. Obrigada pela amizade, companheirismo e paciência.

À R-Crio, especialmente ao Dr. José Ricardo, deixando o Laboratório de Bioengenharia à minha disposição, o que contribuiu imensamente para o desenvolvimento deste trabalho. Agradeço imensamente ao Rafael, Jefferson, Juliana e Tamara que auxiliaram nos ensaios *in vitro* deste trabalho. E a todos os funcionários que sempre foram atenciosos e carinhosos comigo, agradeço a boa convivência e colaboração.

Aos colegas de laboratório de Filmes Finos, professora Leila, Andreza, Wesley e Rodrigo, pela contribuição durante a execução do trabalho. Em especial Andreza, Wesley e Danúbia, que auxiliaram diretamente nas etapas de produção do grafeno.

Aos colegas do laboratório de DRX, Talita, Mônica, Renato, Bruna, Nhárima, Rodolfo, e também aos amigos do IME. Obrigada por toda a contribuição e pela convivência.

À UNICAMP, especialmente à aluna de doutorado, Cecília, por ser tão prestativa e atenciosa com as análises de citotoxicidade *in vitro* e ajudar sempre quando necessário. Um muito obrigado à Profa. Ângela Maria Moraes, por disponibilizar o laboratório do Departamento de Engenharia de Materiais e de Bioprocessos da Faculdade de Engenharia Química.

À FOP – UNICAMP pela oportunidade de realizar as análises por MET. Toda a minha gratidão ao pós-doutorando Guilherme, que contribuiu e acompanhou esta e outras etapas deste trabalho, sempre disposto a ajudar.

Ao LRAC pela disponibilidade dos ensaios TGA/DTG, em especial ao Celso por toda ajuda e solitude.

À PUC por colaborar com as análises de espectroscopia Raman por intermédio do Dr. César.

Ao CPRM, em especial, ao Vinícius por toda contribuição com as análises por DRX, e por quebrar galhos inesperados no final desta etapa.

Ao CBPF por colaborarem com as análises de DRX e FTIR, em especial ao Francisco por acompanhar nos ensaios por FTIR.

A todos os colegas de curso e funcionários do IME pelo companheirismo e boa convivência ao longo destes anos. Aos professores do IME, pela disponibilidade e contribuição inestimável em minha formação.

Agradeço à CAPES pelo auxílio financeiro para a execução deste trabalho.
Gratidão!

“When one dares to try, rewards are not guaranteed, but at least it is an adventure.”

André K. Geim

RESUMO

Novas abordagens e estratégias na produção de biomateriais vem sendo investigadas com o intuito de superar as limitações existentes nos atuais produtos aloplásticos/sintéticos. Uma alternativa promissora para obter propriedades biológicas mais atrativas pode ser a fabricação de nanocompósitos à base de grafeno, e seus derivados, com o objetivo de aumentar a capacidade de interação entre os biomateriais e os tecidos biológicos, através do direcionamento do comportamento celular em tecidos danificados. No presente trabalho, nanocompósitos de hidroxiapatita (HA) e óxido de grafeno (GO) foram produzidos a fim de avaliar a influência da adição de GO em diferentes concentrações: 0,5%, 1,0% e 1,5%, em peso. Para isso, dispersões de GO foram processadas via esfoliação do grafite em fase líquida pela rota química, através do método de Hummers modificado e, na sequência, os nanocompósitos foram produzidos. Enquanto a primeira rota de produção do nanocompósito nHA - GO consistiu na adição das dispersões de GO no pó de HA; a segunda rota compreendeu a incorporação do GO durante a síntese do nanocompósito sHA - GO pelo método de precipitação em meio aquoso. Foi possível verificar a forte afinidade entre a HA e o GO para o nanocompósito nHA - GO, através das avaliações por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV-FEG) e Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET), com as nanopartículas de HA aderidas às superfícies das folhas de GO. Por outro lado, a síntese do nanocompósito sHA - GO proporcionou maior aglomeração da HA quando na presença do GO, provavelmente, devido ao aumento local na concentração de íons de Ca^{2+} e PO_4^{3-} próximos às folhas de grafeno. As caracterizações físico-químicas dos nanocompósitos foram fundamentais para comprovar a presença do GO e a estabilidade química da HA nos nanocompósitos nHA - GO e sHA - GO produzidos. Em comparação ao GO, a análise Raman demonstrou variação na intensidade das bandas e nos valores de deslocamento com o aumento da adição de GO (0,5% para 1,5%, em peso de GO) e, além disso, a menor relação I_D/I_G revelou uma possível transformação estrutural nas folhas de GO após interação com as nanopartículas de HA. Os resultados da análise Termogravimétrica (TGA) e sua Derivada (DTG) demonstraram redução na perda de massa, de acordo com o aumento da composição de 0,5% até 1,5%, em peso de GO para os nanocompósitos nHA - GO, o que sugere uma estabilidade térmica entre a nHA e o GO. Além disso, testes *in vitro* foram realizados para avaliar a bioatividade e a citotoxicidade dos nanocompósitos. O ensaio de bioatividade em meio McCoy demonstrou que a adição de baixas concentrações de GO é um potencial candidato para aplicações biomédicas, devido a maior ocorrência de depósitos de apatita após 3, 7 e 14 dias de ensaio. Através do ensaio *in vitro* de viabilidade celular, os nanocompósitos não demonstraram citotoxicidade em células-tronco mesenquimais da polpa dentária nos períodos de 24 e 48 horas. Estes resultados sugerem que a adição do GO pode influenciar na propriedade de bioatividade e proliferação celular na HA.

Palavras chave: Hidroxiapatita; Óxido de grafeno; Bioatividade, Citotoxicidade, Células-tronco mesenquimais da polpa do dente

ABSTRACT

New approaches and strategies for biomaterials production have been investigated in order to overcome existing limitations in current alloplastic/synthetic products. For more attractive biological properties, the manufacture of graphene-based nanocomposites and their derivatives aims to enhance the interaction ability between biomaterials and biological tissues for directing cellular behavior in tissues damaged. In the present work, hydroxyapatite (HA) and graphene oxide (GO) nanocomposites were produced in order to evaluate the influence of the addition of GO at different concentrations: 0.5 wt%, 1.0 wt% and 1.5 wt%. GO dispersions were processed via liquid-phase exfoliation of graphite using the modified Hummers' method and, subsequently, the nanocomposites were produced. While the first one production route of nHA - GO nanocomposite consisted of the addition of GO dispersions in HA powder; the second one route adopted the incorporation of GO in the synthesis of sHA - GO nanocomposite by chemical precipitation method. It was possible to observe a strong affinity between HA and GO in the nHA - GO nanocomposite, by Scanning Electron Microscopy (SEM) and Transmission Electron Microscopy (MET), due to the HA nanoparticles are adhered to the GO flakes. On the other hand, the synthesis of sHA - GO nanocomposite provided a strong agglomeration of HA particles in the presence of GO, probably due to the local increase of Ca^{2+} and PO_4^{3-} ions concentration close to the GO flakes. The physicochemical characterizations were fundamental to prove the presence of GO and the chemical stability of HA phase in the nHA - GO and sHA - GO nanocomposites. When compared to GO, Raman analysis showed a variation in the band intensity and displacement values with increasing GO addition (from 0.5 wt% to 1.5 wt% GO) in the HA and the lower I_D/I_G ratio revealed a possible structural transformation in GO flakes after interaction with HA nanoparticles. Thermogravimetric (TGA) and derivative thermogravimetric (DTG) analyzes showed a reduction in mass loss, according to the composition increase of 0.5 wt% to 1.5 wt% of GO in the nHA - GO nanocomposites, which suggests a thermal stability between HA and GO. In addition, *in vitro* tests were performed to evaluate the bioactivity and cytotoxicity of nanocomposites. Bioactivity assay in McCoy medium demonstrated that the addition of low concentrations of GO is a potential candidate for biomedical applications due to the higher apatite precipitation after 3, 7 and 14 days. Cell viability assay showed no cytotoxicity of HA - GO nanocomposites on dental pulp mesenchymal stem cells after 24 and 48 hours. These results suggest that the addition of GO may influence the bioactivity property and cell proliferation on hydroxyapatite.

Keywords: Hydroxyapatite; Graphene oxide; Bioactivity, Cytotoxicity, Dental pulp mesenchymal stem cells.

SUMÁRIO

| | |
|--|-----------|
| 1 INTRODUÇÃO | 21 |
| 1.1 Considerações gerais | 21 |
| 1.2 Objetivos..... | 23 |
| 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA..... | 24 |
| 2.1 Introdução aos Biomateriais..... | 24 |
| 2.2 A Evolução dos Biomateriais | 26 |
| 2.3 Biocerâmicas | 27 |
| 2.4 Hidroxiapatita..... | 31 |
| 2.4.1 Produção de Hidroxiapatita | 32 |
| 2.5 Grafeno | 37 |
| 2.5.1 Produção de Grafeno | 39 |
| 2.5.2 Grafeno como biomaterial | 42 |
| 3 MATERIAIS E METODOLOGIA..... | 48 |
| 3.1 Materiais..... | 49 |
| 3.1.1 Solução Precursora | 49 |
| 3.1.2 Óxido de Grafeno | 49 |
| 3.2 Procedimento Experimental..... | 50 |
| 3.2.1 Produção do GO | 50 |
| 3.2.2 Síntese da Hidroxiapatita..... | 52 |
| 3.2.3 Produção de nanocompósitos de Hidroxiapatita-Grafeno (nHA - GO)..... | 53 |
| 3.2.4 Síntese da Hidroxiapatita-Grafeno (sHA - GO) pelo método de precipitação em meio aquoso | 54 |
| 3.2.5 Caracterizações estruturais, morfológicas e físico-químicas..... | 55 |
| 3.2.5.1 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) e Espectroscopia de Dispersão de Energia (EDS) | 56 |
| 3.2.5.2 Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET) | 57 |
| 3.2.5.3 Difração de raios X (DRX)..... | 57 |
| 3.2.5.4 Espectroscopia Raman..... | 58 |
| 3.2.5.5 Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR)..... | 59 |

| | | |
|------------|---|------------|
| 3.2.5.6 | Análise Termogravimétrica (TGA) e sua Derivada (DTG) | 59 |
| 3.2.6 | Caracterizações biológicas <i>in vitro</i> | 60 |
| 3.2.6.1 | Ensaio <i>in vitro</i> de Bioatividade | 60 |
| 3.2.6.2 | Ensaio <i>in vitro</i> de Citotoxicidade Indireta..... | 61 |
| 3.2.6.3 | Análise Estatística..... | 62 |
| 4 | RESULTADOS E DISCUSSÃO | 63 |
| 4.1 | Caracterização do grafite e do óxido de grafeno | 63 |
| 4.1.1 | Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) | 63 |
| 4.1.2 | Difração de Raios X (DRX) | 65 |
| 4.1.3 | Espectroscopia Raman..... | 66 |
| 4.1.4 | Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR)..... | 68 |
| 4.1.5 | Análise Termogravimétrica (TGA) e a sua Derivada (DTG)..... | 69 |
| 4.2 | Caracterização dos Nanocompósitos nHA-GO..... | 71 |
| 4.2.1 | Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) | 71 |
| 4.2.2 | Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)..... | 72 |
| 4.2.3 | Difração de Raios X (DRX) | 73 |
| 4.2.4 | Espectroscopia Raman..... | 75 |
| 4.2.5 | Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR)..... | 78 |
| 4.2.6 | Análise Termogravimétrica (TGA) e a sua Derivada (DTG)..... | 80 |
| 4.2.7 | Ensaio de Bioatividade <i>in vitro</i> | 82 |
| 4.2.8 | Ensaio de Citotoxicidade Indireta <i>in vitro</i> | 86 |
| 4.3 | Caracterização dos nanocompósitos sHA-GO | 88 |
| 4.3.1 | Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) | 88 |
| 4.3.2 | Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)..... | 90 |
| 4.3.3 | Difração de Raios X (DRX) | 92 |
| 4.3.4 | Espectroscopia Raman..... | 94 |
| 4.3.5 | Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR)..... | 97 |
| 4.3.6 | Análise termogravimétrica (TGA) e a sua Derivada (DTG) | 99 |
| 4.3.7 | Ensaio de Bioatividade <i>in vitro</i> | 102 |
| 4.3.8 | Ensaio de Citotoxicidade Indireta <i>in vitro</i> | 104 |
| 5 | CONCLUSÕES | 106 |

| | |
|--|------------|
| 6 SUGESTÕES PARA FUTUROS TRABALHOS..... | 108 |
| 7 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 109 |

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

| | |
|--|----|
| Figura. 2.1 (a) Estrutura cristalina da HA de acordo com o plano (001) e (b) projeção mostrando as disposições dos octaedros e (c) e (d) posições tetraédricas . | 32 |
| Figura. 2.2 Estrutura básica do (a) grafeno que descreve outros alótropos do carbono: (b) grafite, (c) nanotubo de carbono e (d) fulereno..... | 38 |
| Figura. 2.3 (a) Estrutura hexagonal do grafeno; (b) espaço real com os vetores primitivos da rede; (c) rede recíproca do grafeno com os vetores da rede recíproca..... | 39 |
| Figura. 2.4 Métodos de produção de grafeno | 41 |
| Figura. 2.5 Estrutura do (a) grafeno, (b) óxido de grafeno (GO) e (c) óxido de grafeno reduzido (rGO)..... | 42 |
| Figura. 2.6 (a) Imagem óptica do substrato de silício com grafeno; (b) marcador celular, mostrando a formação de células ósseas no mesmo substrato; (c, d) quantificação de alizarina derivada das células cultivadas por 15 dias em substratos com/sem grafeno; (e-h) substrato de PET com e sem grafeno e alizarina mostrando depósitos de cálcio em razão da osteogênese. | 45 |
| Figura. 2.7 Imagens por MEV das amostras de HA - GO 1,5%, em peso, (a) da superfície e (b) corte transversal dos filmes de grafeno após o tratamento em SBF por 7 dias | 46 |
| Figura. 3.1 Fluxograma esquemático para a produção de nanocompósitos HA - GO. | 48 |
| Figura. 3.2 Esfoliação em fase líquida por rota química, pelo método de Hummers modificado | 51 |
| Figura. 3.3 Fluxograma para a síntese de hidroxiapatita pelo método de precipitação em meio aquoso. | 53 |
| Figura. 3.4 Fluxograma contendo a rota para a síntese da HA-grafeno pelo método de precipitação em meio aquoso. | 55 |
| Figura. 3.5 Caracterizações realizadas no grafite como recebido e nas dispersões de GO... .. | 56 |
| Figura. 3.6 Caracterizações estruturais, morfológicas e físico-químicas realizadas nos pós de HA e HA - GO. | 56 |
| Figura. 4.1 (a) Micrografia (MEV) da amostra de grafite Graflake 99550; e (b) medida do tamanho dos flocos. Ampliação de (a) e (b) 80x..... | 63 |
| Figura. 4.2 Espectro de EDS do grafite Graflake 99550..... | 64 |
| Figura. 4.3 Eletromicrografia (MEV) da amostra de GO. Ampliação de (a) 1000x e (b) 2500x..... | 64 |

| | |
|---|----|
| Figura. 4.4 Difratoograma do (a) grafite Graflake 99550 e (b) GO produzido pela esfoliação em fase líquida por rota química..... | 65 |
| Figura. 4.5 (a) Espectro Raman evidenciando as bandas características do GO; (b) espectro Raman do GO após a deconvolução das bandas características. | 67 |
| Figura. 4.6 Espectro FTIR das amostras de (a) grafite e (b) GO | 68 |
| Figura. 4.7 Análise termogravimétrica (TGA) e a sua derivada (DTG) do GO produzido .. | 70 |
| Figura. 4.8 Micrografia (MEV) dos pós de nanocompósitos (a) nHA, (b) nHA - GO 0,5%, (c) nHA - GO 1,0% e (d) nHA - GO 1,5%. Ampliação de 100.000x. | 71 |
| Figura. 4.9 Micrografia (MET) dos pós de nanocompósitos (a) nHA, (b) nHA - GO 0,5%, (c) nHA - GO 1,0% e (d) nHA - GO 1,5%..... | 73 |
| Figura. 4.10 Difratoograma dos pós de (a) nHA, (b) nHA - GO 0,5%, (c) nHA - GO 1,0% e (d) nHA - GO 1,5%..... | 74 |
| Figura. 4.11 Espectro Raman das bandas características da (a) nHA, (b) nHA - GO 0,5%, (c) nHA - GO 1,0% e (d) nHA - GO 1,5%..... | 76 |
| Figura. 4.12 Espectro Raman após a deconvolução das bandas características da (a) nHA, (b) nHA - GO 0,5%, (c) nHA - GO 1,0% e (d) nHA - GO 1,5% através do programa Fityk. | 77 |
| Figura. 4.13 Espectros FTIR característicos da (a) nHA, (b) nHA-GO 0,5%,(c) nHA-GO 1,0% e (d) nHA-GO 1,5%. | 79 |
| Figura. 4.14 Análise termogravimétrica (TGA) e a sua derivada (DTG) da (a) nHA, (b) nHA - GO 0,5%, (c) nHA - GO 1,0% e (d) nHA - GO 1,5%..... | 81 |
| Figura. 4.15 Análise termogravimétrica (TGA) comparativa da (a)nHA, (b) nHA - GO 0,5%, (c) nHA - GO 1,0% e (d) nHA - GO 1,5%..... | 81 |
| Figura. 4.16 Micrografia (MEV) mostrando os resultados do ensaio de bioatividade das amostras nHA, nHA - GO 0,5%, nHA - GO 1,0% e nHA - GO 1,5% após 3, 7 e 14 dias de imersão em meio McCoy. Ampliação de 2.500x. | 83 |
| Figura. 4.17 Micrografia (MEV) da amostra nHA - GO 1,0% após 3 dias de imersão em meio McCoy, demonstrando a maior concentração de precipitados próximo às folhas de GO. Ampliação de 10.000x. | 84 |
| Figura. 4.18 Ilustração esquemática do processo de dissolução-precipitação do nanocompósito bioativo nHA - GO após imersão em meio McCoy..... | 85 |
| Figura. 4.19 Ensaio de citotoxicidade indireta em células-tronco mesenquimais da polpa dentária expostas aos extratos das amostras nHA, nHA - GO 0,5%, nHA - GO 1,0% e nHA - GO 1,5% após 24 e 48 horas..... | 86 |

| | |
|--|-----|
| Figura. 4.20 Micrografia (MEV) dos pós (a) sHA, (b) sHA - GO 0,5%, (c) sHA - GO 1,0% e (d) sHA - GO 1,5% obtidos pelo método de precipitação em meio aquoso. Ampliação de 100.000x..... | 89 |
| Figura. 4.21 Micrografia (MEV) dos pós de sHA - GO 1,0% obtida pela síntese da hidroxiapatita pelo método de precipitação em meio aquoso, demonstrando maior aglomeração de partículas, possivelmente, pela presença das folhas de GO. Ampliação de (a)100.000x, (b)50.000x, (c)25.000x e (d)10.000x. | 90 |
| Figura. 4.22 Micrografia (MET) dos pós de nanocompósitos (a) sHA, (b) sHA - GO 0,5%, (c) sHA - GO 1,0% e (d) sHA - GO 1,5%. | 91 |
| Figura. 4.23 Difratoograma dos pós (a) sHA, (b) sHA - GO 0,5%, (c) sHA - GO 1,0% e (d) sHA - GO 1,5%. | 93 |
| Figura. 4.24 Espectro Raman evidenciando as bandas características da (a) sHA, (b) sHA - GO 0,5%, (c) sHA - GO 1,0% e (d) sHA - GO 1,5%. | 95 |
| Figura. 4.25 Espectro Raman após a deconvolução das bandas características da (a) sHA, (b) sHA - GO 0,5%, (c) sHA - GO 1,0% e (d) sHA - GO 1,5% através do programa Fityk... .. | 96 |
| Figura. 4.26 Espectros FTIR característicos da sHA, sHA - GO 0,5%, sHA - GO 1,0% e sHA - GO 1,5%. | 98 |
| Figura. 4.27 Análise termogravimétrica (TGA) e a sua derivada (DTG) da (a) sHA, (b) sHA - GO 0,5%, (c) sHA - GO 1,0% e (d) sHA - GO 1,5%. | 100 |
| Figura. 4.28 Análise termogravimétrica (TGA) comparativa da (a) sHA, (b) sHA - GO 0,5%, (c) sHA - GO 1,0% e (d) sHA - GO 1,5%. | 100 |
| Figura. 4.29 Difratoograma dos pós (a) sHA, (b) sHA - GO 0,5%, (c) sHA - GO 1,0% e (d) sHA - GO 1,5%, após o tratamento térmico à 1000oC. | 101 |
| Figura. 4.30 Ensaio de bioatividade das amostras sHA, sHA - GO 0,5%, sHA - GO 1,0% e sHA - GO 1,5% após 3, 7 e 14 dias de imersão em meio McCoy. Ampliação de 2.500x. | 103 |
| Figura. 4.31 Ensaio de citotoxicidade indireta em células-tronco mesenquimais da polpa dentária expostas aos extratos das amostras sHA, sHA - GO 0,5%, sHA - GO 1,0% e sHA - GO 1,5% após 24 e 48 horas. (* valores de $p < 0,05$) | 104 |

LISTA DE TABELAS

| | |
|--|----|
| Tabela. 2.1 Classificação das biocerâmicas de acordo com a resposta tecidual | 29 |
| Tabela. 2.2 Exemplos dos principais fosfatos de cálcio..... | 30 |
| Tabela. 2.3 Comparação dos diferentes métodos para a preparação de nanopartículas de HA.. | 33 |
| Tabela. 2.4 Diversas nanoestruturas da HA com formas moduladas..... | 34 |
| Tabela. 2.5 Propriedades relevantes do grafeno para aplicações biológicas..... | 43 |
| Tabela. 3.1 Reagentes utilizados para a produção da Solução..... | 49 |
| Tabela. 3.2 Reagentes utilizados para a produção de GO..... | 50 |
| Tabela. 4.1 Distância interplanar calculada pela equação de Bragg do grafite Graflake 99550 e do GO produzido pela esfoliação em fase líquida por rota química. | 66 |
| Tabela. 4.2 Banda do espectro FTIR observados para o GO. | 69 |
| Tabela. 4.3 Tamanho médio de cristalito para as amostras nHA - GO..... | 75 |
| Tabela. 4.4 Bandas relacionadas à hidroxiapatita observadas no espectro Raman das amostras nHA, nHA - GO 0,5%, nHA - GO 1,0% e nHA - GO 1,5%..... | 76 |
| Tabela. 4.5 Posicionamento das bandas D e G no espectro Raman e a relação ID/IG observados para o GO e para os nanocompósitos nHA - GO. | 78 |
| Tabela. 4.6 Banda do espectro FTIR observados para a nHA e os nanocompósitos nHA-GO | 79 |
| Tabela. 4.7 Análise da eficiência da Rota 1, através da comparação da composição teórica e experimental, obtidas por TGA..... | 82 |
| Tabela. 4.8 Tamanho médio de cristalito para as amostras sHA - GO | 94 |
| Tabela. 4.9 Banda do espectro Raman observados para a sHA | 95 |
| Tabela. 4.10 Picos do espectro Raman das bandas D e G e a relação ID/IG observados para o GO e para os nanocompósitos sHA - GO. | 96 |
| Tabela. 4.11 Banda do espectro FTIR observados para a sHA..... | 98 |

LISTA DE ABREVIATURAS

| | |
|------|---|
| BMPs | Proteínas Morfogenéticas ósseas |
| CIF | Códigos das fichas cristalográficas |
| COD | Crystallography Open Database |
| CVD | <i>Chemical vapor deposition</i> |
| GHA | Gelatina-Hidroxiapatita |
| GO | Óxido de grafeno (<i>graphene oxide</i>) |
| GOF | <i>goodness of fit</i> |
| MAUD | <i>Material Analysis Using Diffraction</i> |
| PDMS | Dimetil polissiloxano |
| PET | Politereftalato de etileno |
| rGO | Óxido de grafeno reduzido (<i>reduced graphene oxide</i>) |
| rpm | Rotações por minuto |
| SBF | <i>Simulated Body Fluid</i> |

LISTA DE SÍMBOLOS

| | |
|-----------|------------------------|
| 0D | Zero dimensional |
| 1D | Unidimensional |
| 2D | Bidimensional |
| 3D | Tridimensional |
| s | Segundos |
| min | Minuto(s) |
| h | Hora(s) |
| d | Dia(s) |
| λ | Comprimento de onda |
| ID | Intensidade da banda D |
| IG | Intensidade da banda G |

LISTAS DE SIGLAS

| | |
|---------|--|
| ABNT | Associação Brasileira de Normas Técnicas |
| CBPF | Centro Brasileiro de Pesquisas Físicas |
| CPRM | Companhia de Pesquisa de Recursos Minerais |
| FOP | Faculdade de Odontologia de Piracicaba |
| JCPDS | <i>Joint Committee on Powder Diffraction Standards</i> |
| LRAC | Laboratório de Recursos Analíticos e de Calibração |
| PUC-Rio | Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro |
| IME | Instituto Militar de Engenharia |
| SME/RJ | Secretaria Municipal de Educação do Rio de Janeiro |
| UFRJ | Universidade Federal do Rio de Janeiro |
| UNICAMP | Universidade Estadual de Campinas |

1 INTRODUÇÃO

1.1 CONSIDERAÇÕES GERAIS

Com o aumento da expectativa de vida da população mundial, as doenças crônicas se tornaram a principal causa da redução da qualidade de vida nos dias atuais. Dentre as doenças crônicas, a osteoporose é caracterizada por ser uma doença esquelética sistêmica que ocasiona diminuição da massa óssea e alteração na estrutura óssea, aumentando drasticamente o risco de fraturas (HERNLUND *et al.*, 2013). A regeneração das fraturas resultantes da osteoporose permanece como um dos maiores desafios clínicos na área médica.

Para o desenvolvimento de novas tecnologias que beneficiem a produção de biomateriais e o tratamento de doença esquelética sistêmica e/ou malformação óssea, primeiramente é necessária a compreensão dos processos de formação tecidual (ZORZI, 2012). Dentre os processos, a osteogênese se refere à capacidade de promover a neoformação óssea, proveniente da presença de células vivas associadas ao biomaterial. Enquanto a osteocondução demonstra a capacidade do material em servir como um suporte ou arcabouço, que facilite a vascularização e proliferação celular sobre a superfície do biomaterial, a osteoindução caracteriza-se pela formação óssea por meio do recrutamento de células-tronco mesenquimais do tecido, diferenciando-as em células ósseas. Além disso, o processo de osteoindução pode ser facilitado pela presença de fatores de crescimento, como as proteínas morfogenéticas ósseas (*Bone morphogenetic proteins – BMP*).

As estratégias atuais para a fabricação de enxertos ósseos incluem a utilização de enxertos autógenos, alógenos, xenógenos e aloplásticos (ou sintéticos). Os enxertos autógenos apresentam o material genético do próprio indivíduo, sendo considerado o padrão ouro para a reabilitação óssea. No entanto, as suas principais limitações estão associadas ao trauma adicional para o paciente, possibilitando a morbidade, dor ou perda de função temporária do local doador, bem como disponibilidade limitada (RATNER *et al.*, 2013). Os enxertos alógenos são provenientes de indivíduos da mesma espécie, mas geneticamente diferentes, assim como os xenógenos, que são oriundos de indivíduos de outras espécies (por exemplo: de origem bovina, suína ou caprina). As limitações associadas a estes materiais estão relacionadas às propriedades mecânicas, ao risco de rejeição do hospedeiro e ao elevado potencial de transmissão patogênica (MELEK, 2015). Para suprir estas desvantagens, o desenvolvimento de

biomateriais sintéticos, para os possíveis substitutos dos enxertos autógenos, alógenos e xenógenos, vem ganhando cada vez mais aceitação no mercado. Atualmente, os enxertos aloplásticos ou sintéticos são encontrados em diversas formas e tamanhos, apresentam alta disponibilidade, são facilmente manuseados, ausentes de contaminação, e a sua utilização diminui o tempo cirúrgico do paciente (POTTER, MALMQUIST e ELLIS, 2012). O projeto de um enxerto ósseo sintético ideal contempla a combinação adequada das propriedades de bioatividade, biocompatibilidade, osteocondução e osteoindução. Além disso, o biomaterial deve ser capaz de promover uma taxa de biodegradabilidade controlada durante a etapa do crescimento do tecido ósseo. Dos produtos sintéticos para reparo e/ou substituição óssea disponíveis no mercado, destacam-se os fosfatos de cálcio e os vidros bioativos.

A evolução científica e tecnológica dos biomateriais pode ser representada por quatro gerações, interpretadas de forma conceitual e não cronológica, fundamentada nas propriedades dos materiais envolvidos e na resposta tecidual (NAVARRO *et al.*, 2008; ATTAF, 2011). A primeira geração de materiais não foi desenvolvida especificamente para o uso médico, provocando uma resposta mínima ao tecido hospedeiro, e é conhecida pelos materiais bioinertes (HENCH, 1980; RATNER *et al.*, 2013). A segunda geração de materiais é caracterizada pelos materiais bioativos, cuja função é estabelecer uma forte ligação química na interface tecido/superfície do biomaterial (NAVARRO *et al.*, 2008; RATNER *et al.*, 2013). Já a terceira geração de biomateriais foi projetada para estimular as respostas celulares a nível molecular, e os conceitos de bioatividade e biodegradabilidade passaram a ser combinados (HENCH e POLAK, 2002; NAVARRO *et al.*, 2008). Uma forte mudança na interação dos biomateriais marcou o início da quarta geração de biomateriais e, conseqüentemente, o início das pesquisas na área da engenharia de tecidos e da medicina regenerativa. Esta geração é caracterizada pelo desenvolvimento de materiais com a capacidade de interagir com os sistemas biológicos, controlar o microambiente e conduzir o comportamento celular na direção desejada. As propriedades são otimizadas pela presença de células, fatores de crescimento e proteínas morfogenéticas ósseas (BMPs) (RATNER *et al.*, 2013).

Diante disso, a descoberta de um material revolucionário vem atraindo cientistas de diversas áreas por suas propriedades excepcionais e inúmeras possibilidades de uso. O grafeno é uma folha plana de átomos de carbono dispostos em uma estrutura cristalina hexagonal e bidimensional. Dentre as propriedades mecânicas, elétricas e condutoras que o grafeno possui, estudos vêm demonstrando a capacidade deste material em promover respostas celulares, induzindo a osteogênese com resultados similares às BMPs (NAYAK *et al.*, 2011;

NAIR *et al.*, 2015). A combinação adequada das propriedades bioativas e osteocondutoras da hidroxiapatita com as propriedades osteoindutoras do grafeno, supera as limitações existentes nos atuais produtos aloplásticos/sintéticos.

O estudo de nanocompósitos de hidroxiapatita (HA) e óxido de grafeno (*graphene oxide* – GO) possibilita o desenvolvimento de novos biomateriais com propriedades biológicas mais atrativas do que aquelas da HA pura. No presente trabalho, nanocompósitos de hidroxiapatita-grafeno foram produzidos por duas metodologias inovadoras e a influência físico-química e morfológica da adição de 0,5%, 1,0% e 1,5% em peso, de GO à HA foram avaliadas. As caracterizações dos nanocompósitos nHA - GO e sHA - GO foram realizadas pelas técnicas: microscopia eletrônica de varredura (MEV), microscopia eletrônica de transmissão (MET), difração de raios X (DRX), espectroscopia Raman, espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier (FTIR) e análise termogravimétrica (TGA) e sua derivada (DTG).

A caracterização biológica da HA e HA - GO foi realizada por meio dos ensaios de bioatividade *in vitro*, que avaliam a precipitação espontânea, ou não, de carbonato apatita sobre a superfície do material, além da análise de citotoxicidade com células-tronco mesenquimais.

1.2 OBJETIVOS

Os objetivos desta pesquisa foram:

- 1) Produzir as dispersões de GO pelo método de Hummers modificado;
- 2) Caracterizar as dispersões obtidas de GO pelas técnicas de MEV, DRX, FTIR, Raman e TGA/DTG, com o intuito de comprovar a eficiência do método;
- 3) Produzir o nanocompósito de HA-grafeno, através da adição das dispersões de GO no pó de HA;
- 4) Sintetizar o nanocompósito de HA-grafeno pelo método de precipitação em meio aquoso por meio da incorporação do GO durante a síntese da HA;
- 5) Caracterizar físico-química e morfológicamente os nanocompósitos de HA-grafeno produzidos, avaliando a influência do GO em diferentes concentrações: 0,5%, 1,0% e 1,5%, em peso;
- 6) Avaliar a bioatividade e a citotoxicidade por ensaios *in vitro* da HA e do nanocompósito de HA-grafeno.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 INTRODUÇÃO AOS BIOMATERIAIS

Com o rápido progresso da ciência e tecnologia, o termo biomaterial vem sendo discutido por autores de diferentes áreas ao longo dos anos. A definição mais recente publicada por WILLIAMS (2009) afirma que:

“O biomaterial é uma substância que foi projetada para assumir uma forma que, isoladamente ou como parte de um sistema complexo, é usado para controlar as interações entre os componentes dos sistemas vivos, o curso de qualquer procedimento terapêutico ou diagnóstico, em medicina humana ou veterinária WILLIAMS (2009).”

A pesquisa e o desenvolvimento dos biomateriais vêm sendo estimulados pelo avanço tecnológico multidisciplinar que envolve a biologia molecular e celular, química, engenharia e ciência dos materiais, entre outras. Dentre elas, a ciência dos materiais busca estudar a estrutura, propriedade, processamento e desempenho, dando ênfase na interação dos biomateriais com o meio biológico. Além disso, a escolha de um biomaterial depende de características que permitem uma melhor eficácia e qualidade diante das diversas aplicações, ou seja: biocompatibilidade e biofuncionalidade. A primeira diz respeito à habilidade do material de desempenhar uma resposta biológica satisfatória quando em contato com o hospedeiro, e a segunda refere-se às características mecânicas e físicas em função de uma aplicação específica (WILLIAMS, 2009; PATEL e GOHIL, 2012; RATNER *et al.*, 2013).

Para a utilização dos biomateriais no tratamento de malformação e/ou perda óssea, é necessária a compreensão dos processos de formação tecidual, como osteogênese, osteoindução e osteocondução (ZORZI, 2012). Na utilização do enxerto ósseo, o processo de osteogênese é proveniente da presença de células osteoprogenitoras vivas associadas ao biomaterial e fatores de crescimento. O processo de osteocondução está relacionado à capacidade do material de servir como um suporte, ou arcabouço, permitindo a vascularização e proliferação celular sobre a superfície do biomaterial, como os poros, canais ou tubos. A osteoindução é caracterizada pela formação óssea por meio do recrutamento de células-tronco mesenquimais do tecido circundante, que irão se diferenciar em células ósseas, e cujo processo é desencadeado pela presença de fatores de crescimento, como as proteínas morfogenéticas ósseas (BMPs).

Atualmente, os enxertos ósseos podem ser classificados como enxertos autógenos, alógenos, xenógenos e aloplásticos (ou sintéticos):

- a) Autógenos: descritos como o padrão ouro para a reabilitação óssea, pois apresentam o conteúdo de células ósseas do próprio indivíduo e proteínas osteoindutoras. Apesar das características únicas, as desvantagens para este tipo de material estão associadas ao trauma adicional para o paciente, possibilidade de morbidade, dor ou perda de função temporária do local doador e disponibilidade limitada (RATNER *et al.*, 2013).
- b) Alógenos: obtidos de indivíduos da mesma espécie, mas geneticamente diferentes. Contudo, estes materiais apresentam limitações relacionadas ao potencial risco de transmissão de doenças infectocontagiosas e reações imunológicas adversas (MELEK, 2015).
- c) Xenógenos: recolhidos de espécies diferentes como, por exemplo, de origem bovina, suína ou caprina. Assim como os enxertos alógenos, as desvantagens deste tipo de enxerto estão relacionadas a possibilidade de transmissão de doenças e aos riscos de reações imunológicas adversas.
- d) Aloplásticos ou sintéticos: são produzidos por meio da utilização de materiais sintéticos ou inorgânicos. Este tipo de material vem ganhando cada vez mais aceitação no mercado, em razão da sua alta disponibilidade, ausência de risco de contaminação, facilidade ao manuseio, eliminação de morbidade da área doadora e diminuição do tempo cirúrgico do paciente. Além disso, são subdivididos em materiais reabsorvíveis e não reabsorvíveis, e estão disponíveis em diversas formas e tamanhos (POTTER e ELLIS, 2004).

Atualmente, muitos produtos sintéticos para a substituição e reparo ósseo estão disponíveis no mercado, como exemplo, tem-se os fosfatos de cálcio e vidros bioativos. Entretanto, para o desenvolvimento de um enxerto ósseo sintético ideal, o biomaterial deve apresentar as seguintes características: alta biocompatibilidade, bioreabsorção controlada, combinação das propriedades osteocondutoras e osteoindutoras, ser estruturalmente semelhante ao tecido ósseo e economicamente viável.

2.2 A EVOLUÇÃO DOS BIOMATERIAIS

Durante as últimas décadas, a evolução dos biomateriais pode ser representada por quatro gerações, que são interpretadas de forma conceitual e não cronológica, fundamentada nas propriedades dos materiais envolvidos e, na consequente, resposta tecidual (NAVARRO *et al.*, 2008; ATTAF, 2011). A primeira geração é composta, em sua grande maioria, por materiais que não foram desenvolvidos especialmente para o uso médico. Estes materiais eram selecionados em função de suas propriedades mecânicas e físicas específicas para o uso clínico pretendido. Trata-se dos materiais bioinertes, cuja função é provocar a resposta mínima ao tecido hospedeiro (HENCH, 1980; RATNER *et al.*, 2013). Na presença de um material bioinerte, é formada uma camada fibrosa interfacial entre o material e o tecido. Entre os materiais metálicos conhecidos desta geração são: ferro, cobalto, aço e suas ligas (aços 316L contendo cromo, níquel e molibdênio) e titânio e suas ligas (principalmente o titânio comercialmente puro, Ti c.p. e Ti₆Al₄V); entre os biomateriais cerâmicos, destacam-se a alumina e zircônia. Já os materiais poliméricos, são representados pela borracha de silicone, polietileno (PE), resinas acrílicas, poliuretanos, polipropileno (PP) e polimetilmetacrilato (PMMA) (NAVARRO *et al.*, 2008).

Os biomateriais da segunda geração são caracterizados pelos materiais bioativos. Estes biomateriais são capazes de interagir com o ambiente biológico, promovendo a resposta celular desejada, e estabelecerem uma forte ligação química na interface tecido/superfície do biomaterial. Esta geração inclui também o desenvolvimento de materiais reabsorvíveis, podendo a taxa de degradação ser adaptada aos requisitos de uma aplicação específica (NAVARRO *et al.*, 2008; RATNER *et al.*, 2013). Alguns exemplos de biomateriais cerâmicos bioativos: vidros bioativos, vitrocerâmicas e os fosfatos de cálcio (por exemplo, hidroxiapatita [Ca₁₀(PO₄)₆(OH)₂] e fosfato tricálcico (β-TCP, Ca₃(PO₄)₂). Diversos métodos vêm sendo desenvolvidos para obter apatitas e outros recobrimentos bioativos sobre a superfície metálica bioinerte (principalmente para o Ti comercialmente puro e suas ligas), criando, assim, uma superfície capaz de interagir ativamente com o hospedeiro. Dos biomateriais poliméricos biodegradáveis, podemos destacar: ácido poliglicólico (PGA), ácido polilático (PLA), poliéster, quitosana e outros hidrogéis (NAVARRO *et al.*, 2008).

A terceira geração de biomateriais foi projetada para estimular as respostas celulares a nível molecular, e os conceitos de bioatividade e biodegradabilidade passaram a ser combinados

(HENCH e POLAK, 2002; NAVARRO *et al.*, 2008). Dos componentes desta geração, destacam-se os materiais compósitos: hidroxiapatita/colágeno, hidroxiapatita/quitosana e hidroxiapatita/ácido polilático (ATTAF, 2011). Atualmente, o avanço tecnológico permitiu uma forte mudança na interação dos biomateriais com o tecido e fluidos corpóreos, quando em comparação com as gerações anteriores. A quarta geração é caracterizada pelo desenvolvimento de materiais com a capacidade de interagir com os sistemas biológicos, podendo controlar o microambiente e conduzir o comportamento celular na direção desejada. Além disso, esta geração é marcada pelo início das pesquisas na área da engenharia de tecidos e da medicina regenerativa (RATNER *et al.*, 2013). Os princípios se assemelham aos da terceira, contudo, as propriedades dos biomateriais são melhoradas pela presença de células, fatores de crescimento e/ou proteínas ósseas morfogenéticas (BMPs).

Neste sentido, a descoberta de um material revolucionário vem impulsionando as pesquisas científicas. O grafeno é uma folha plana de átomos de carbono dispostos em uma estrutura cristalina hexagonal e bidimensional. Desde a sua descoberta, este material vem atraindo cientistas de diversas áreas por suas inúmeras possibilidades de uso. Estudos com grafeno vem demonstrando a capacidade desse material em promover respostas celulares, induzindo a osteodiferenciação (com resultados similares às BMPs), além de reforçar significativamente as propriedades mecânicas dos biomateriais (NAYAK *et al.*, 2011; NAIR *et al.*, 2015). A combinação adequada das propriedades bioativas e osteocondutoras da hidroxiapatita com as osteoindutoras do grafeno, supera as limitações existentes nos atuais produtos aloplásticos/sintéticos.

2.3 BIOCERÂMICAS

De modo geral, os materiais cerâmicos são definidos como materiais inorgânicos, compostos por elementos metálicos e não-metálicos que formam ligações químicas iônicas ou covalentes (CALLISTER e RETHWISCH, 2013). Dentre as suas propriedades, destacam-se: alta dureza, resistência à abrasão, estabilidade química, alta rigidez e fragilidade (BOSH e NIÉPCE, 2001).

As biocerâmicas são definidas como todo material cerâmico de origem natural ou sintético, utilizadas por um período de tempo, capaz de substituir parcial ou totalmente um órgão ou uma função do corpo (KUTZ, 2009). O princípio básico para o uso de materiais

cerâmicos como um substituto ósseo, baseia-se pela sua bioatividade, ou seja, a capacidade de formar uma ligação química com o osso, servindo como um arcabouço apropriado para a neoformação óssea. Adicionalmente, as biocerâmicas podem ainda aliar bioatividade à capacidade de bioreabsorção (LEGEROS, 2008; DOROZHKIN, 2016).

A utilização de cerâmicas como biomateriais foi relatada pela primeira vez em 1894 por Dreesman, com o uso de gesso para preenchimento de defeitos ósseos. Contudo, este material apresentou propriedades inadequadas para aplicações biomédicas, como baixa resistência mecânica e alta taxa de bioreabsorção pelo organismo (HULBERT *et al.*, 1982). A utilização das biocerâmicas bioinertes (como, por exemplo, a alumina - Al_2O_3) teve início através de Smith, em 1963, devido a sua boa biocompatibilidade, elevada dureza, resistência à corrosão, alta resistência ao desgaste e alta resistência à compressão. Atualmente, este material ainda é amplamente empregado para substituição em próteses ortopédicas e como componentes protéticos em implantes dentários (RATNER *et al.*, 2013). Entretanto, o início de uma nova era de biomateriais cerâmicos foi marcada somente após a descoberta de um material capaz de interagir quimicamente com o tecido ósseo. O Bioglass[®], desenvolvido por Larry Hench, em 1969, foi sintetizado usando como base quatro componentes principais: Na_2O , CaO , P_2O_5 e SiO_2 . As características notáveis deste material estão relacionadas à sua capacidade de formar uma camada de apatita em sua superfície quando em meio sorológico (*in vitro* ou *in vivo*), promovendo a ligação química na interface osso-biomaterial e, como consequência, a neoformação óssea (HENCH, 1980). A partir daí, inúmeros questionamentos aconteceram em relação às interações dos materiais com o hospedeiro, e o conceito de bioatividade foi introduzido (HENCH, 1998). Hench (1998) quantificou o índice de bioatividade de um material, I_B :

$$I_B = \frac{100}{t \ 0,5 \ bb} \quad \text{Equação 2.1}$$

onde $t \ 0,5 \ bb$ é o tempo necessário para que mais de 50% da ligação entre tecido ósseo e hospedeiro seja formada. Atualmente, o potencial de bioatividade pode ser avaliado através da utilização de uma solução inorgânica, com concentração iônica semelhante à do plasma sanguíneo humano (SBF – *Simulated Body Fluid*), desenvolvida por KOKUBO e TAKADAMA (2006). Esta solução é mantida sob as mesmas condições fisiológicas, de pH e

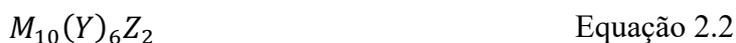
temperatura do corpo humano, e tem por objetivo avaliar as alterações e reações superficiais de um biomaterial na presença deste fluido, simulando o comportamento do biomaterial *in vivo*.

Com os avanços da pesquisa e o conhecimento dos mecanismos biológicos, o desenvolvimento das biocerâmicas se estendeu, levando a uma melhor compreensão das interações biológicas com as superfícies dos biomateriais. Atualmente, as biocerâmicas podem ser classificadas em três categorias distintas: bioinertes, bioativas e bioabsorvíveis (Tabela 2.1 **Error! Reference source not found.**), adaptada de RATNER *et al.* (2013).

Tabela 2.1 Classificação das biocerâmicas de acordo com a resposta tecidual

| Classificação | Tipo de interação | Exemplos |
|----------------|--|---|
| Bioinertes | Apresentam estabilidade química e não são rejeitadas pelo organismo, mas são circundadas por uma mínima cápsula de tecido fibroso. | Zircônia e alumina |
| Bioativas | Interagem com o organismo através de ligações de natureza química devido à similaridade entre o material e o tecido ósseo. | Vidros bioativos, vitrocerâmicas bioativas e hidroxiapatita |
| Bioabsorvíveis | Após um tempo em contato com os tecidos biológicos, são degradadas, solubilizadas ou fagocitadas pelo organismo. | Fosfato tricálcio (TCP) |

Dentre as biocerâmicas utilizadas para a substituição e regeneração da estrutura óssea, o potencial uso dos fosfatos de cálcio se destaca pela sua similaridade química com a fase mineral óssea. Normalmente, o osso é constituído por 25% em peso de água, 15% de materiais orgânicos e 60% de fases minerais, sendo que a fase mineral é constituída, principalmente, de íons cálcio e fósforo (RATNER *et al.*, 2013). Segundo LEGEROS (2008), além do mineral ósseo apresentar semelhança na composição química com a apatita biológica, foi identificado padrão de difração de raios X compatível com as apatitas minerais. O termo apatita vem sendo utilizado para descrever a família de compostos com estruturas similares, que pode ser definida pela seguinte composição:



onde, M representa um cátion metálico (Ca^{2+} , Sr^{2+} , Pb^{2+} ou Cd^{2+} , entre outros); Y configura um ânion trivalente (PO_4^{3-} , AsO_4^{3-} , VO_4^{3-} , CrO_4^{3-} ou MnO_4^{3-} , entre outros); e Z corresponde aos ânions monovalentes (F^- , OH^- , Br^- ou Cl^- , entre outros). As diferentes fases de fosfato de cálcio

podem ser classificadas, de acordo com: a razão molar entre os átomos de cálcio e fósforo (Ca/P), pH, temperatura e composição (LEGEROS, 2008; BEN-NISSAN, 2014; DOROZHKIN, 2016). A Tabela 2.2 apresenta alguns dos principais fosfatos de cálcio conhecidos, com sua razão molar (Ca/P), nomenclatura, fórmula química e estabilidade em pH em solução a 25 °C.

Tabela 2.2 Exemplos dos principais fosfatos de cálcio (adaptada de DOROZHKIN, 2016)

| Razão Molar Ca/P | Nomenclatura e Abreviação | Fórmula química | Estabilidade em pH - solução a 25°C |
|------------------|--|---|-------------------------------------|
| 0,5 | Fosfato Monocálcico monohidratado (MCPM) | $\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2\text{H}_2\text{O}$ | 0,0 – 2,0 |
| 0,5 | Fosfato Monocálcico anidro (MCPA ou MCP) | $\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2$ | a |
| 1,0 | Bruxita (DCPD) | $\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ | 2,0 – 6,0 |
| 1,0 | Monetita (DCPA ou DCP) | CaHPO_4 | a |
| 1,33 | Fosfato Octacálcico (OCP) | $\text{Ca}_8(\text{HPO}_4)_2(\text{PO}_4)_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ | 5,5 – 7,0 |
| 1,5 | Fosfato Tricálcico (α -TCP) | $\alpha\text{-Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ | b |
| 1,5 | Fosfato Tricálcico (β -TCP) | $\beta\text{-Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ | b |
| 1,2 – 2,2 | Fosfato de cálcio Amorfo (ACP) | $\text{Ca}_x\text{H}_y(\text{PO}_4)_z \cdot n\text{H}_2\text{O}$, $n = 3\text{--}4.5, 15\text{--}20\% \text{H}_2\text{O}$ | 5,0 – 12 |
| 1,67 | Hidroxiapatita (HA) | $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ | 9,5 – 12 |
| 1,67 | Fluorapatita (FHA) | $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6\text{F}_2$ | 7 – 12 |
| 1,67 | Oxiapatita (AO) | $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6\text{O}$ | b |
| 2,0 | Fosfato tetracálcico (TTCP) | $\text{Ca}_4(\text{PO}_4)_2\text{O}$ | b |

a - Estável após tratamento térmico acima de 100 °C

b - Estes compostos não podem ser obtidos por métodos em soluções aquosas.

As apatitas podem ainda ser classificadas como: biológicas ou sintéticas. As apatitas biológicas são consideradas impuras e não estequiométricas, devido à facilidade de incorporações aniônicas e catiônicas em sua estrutura (LEGEROS, 2008; APARICIO e GINEBRA, 2016). Normalmente, a apatita óssea biológica é cálcio-deficiente e apresenta baixa cristalinidade, devido a impurezas como: o sódio (Na^+), potássio (K^+), magnésio (Mg^{2+}), estrôncio (Sr^{2+}), fluoreto (F^-), cloreto (Cl^-), carbonato (CO_3^{2-}), entre outros (LIU *et al.*, 2013).

As apatitas sintéticas são ideais para estudar as modificações químicas, estruturais e morfológicas induzidas por substituições iônicas ou controle dos parâmetros da síntese (APARICIO e GINEBRA, 2016). Dentre as biocerâmicas à base de fosfatos de cálcio, a hidroxiapatita é a cerâmica mais estudada e utilizada para as finalidades clínicas, principalmente por ser o principal componente presente na fase de tecidos duros do organismo humano como, por exemplo: dentina, esmalte dentário e osso. A possibilidade de incorporações e substituições dos íons Ca^{2+} , PO_4^{3-} e OH^- permitem a existência de hidroxiapatitas sintéticas impuras e não-estequiométricas, e estas substituições resultam em mudanças nas propriedades química, morfológica, cristalinidade e área superficial específica (LEGEROS, 2008; BENNISSAN, 2014; FIIHRI *et al.*, 2017).

2.4 HIDROXIAPATITA

A hidroxiapatita (HA) é um fosfato de cálcio que apresenta fórmula molecular estequiométrica $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ e razão molar Ca/P igual à 1,67. Os cristais de HA são constituídos por grupos de Ca^{2+} , PO_4^{3-} e OH^- empacotados em uma rede tridimensional, composta por um arranjo de tetraedros de PO_4^{3-} , unidos por íons Ca^{2+} intercalados entre eles. A estrutura cristalina monoclinica da HA apresenta-se como a forma mais estável à temperatura ambiente (25°C), enquanto a fase hexagonal é estável em altas temperaturas (200°C) (LEGEROS, 2008; LIU *et al.*, 2013; APARICIO e GINEBRA, 2016).

A HA apresenta simetria hexagonal, constituída por 44 átomos, e está classificada no grupo espacial $\text{cP6}_3/\text{m}$ (Figura 2.1). A célula unitária é formada por 10 átomos de Ca situados em dois sítios cristalográficos da estrutura cristalina, quatro deles localizados num sítio I, denominado Ca1, estando alinhados em colunas (Figura 2.1 a). Os outros 6 íons Ca encontram-se arranjados em triângulos equiláteros nos planos perpendiculares ao eixo c, no sítio II (Ca2). Existem ainda outros 4 sítios cristalinos distintos de oxigênio e sítios de fósforo equivalentes, formando o fosfato PO_4 , em uma estrutura compacta (Figura 2.1 b). A existência de dois sítios diferentes de cálcio é importante para as propriedades da HA, uma vez que elas podem ser ajustadas por modificações específicas no sítio. Os grupos tetraedros PO_4 estão arranjados de tal forma que permitem a formação de dois tipos de canais perpendiculares ao plano basal. O primeiro, é ocupado por átomos Ca1, sendo paralelo aos eixos ternários, enquanto o segundo é constituído por átomos Ca2. A estrutura monoclinica da HA deriva-se de duas células unitária

hexagonais, sendo o parâmetro do eixo b equivalente ao dobro do valor do encontrado na estrutura hexagonal, e a disposição dos ânions acontece de forma ordenada. A constituição na célula unitária é composta por 88 átomos com grupo espacial $P2_1/b$ (BEN-NISSAN, 2014; FIHRI *et al.*, 2017).

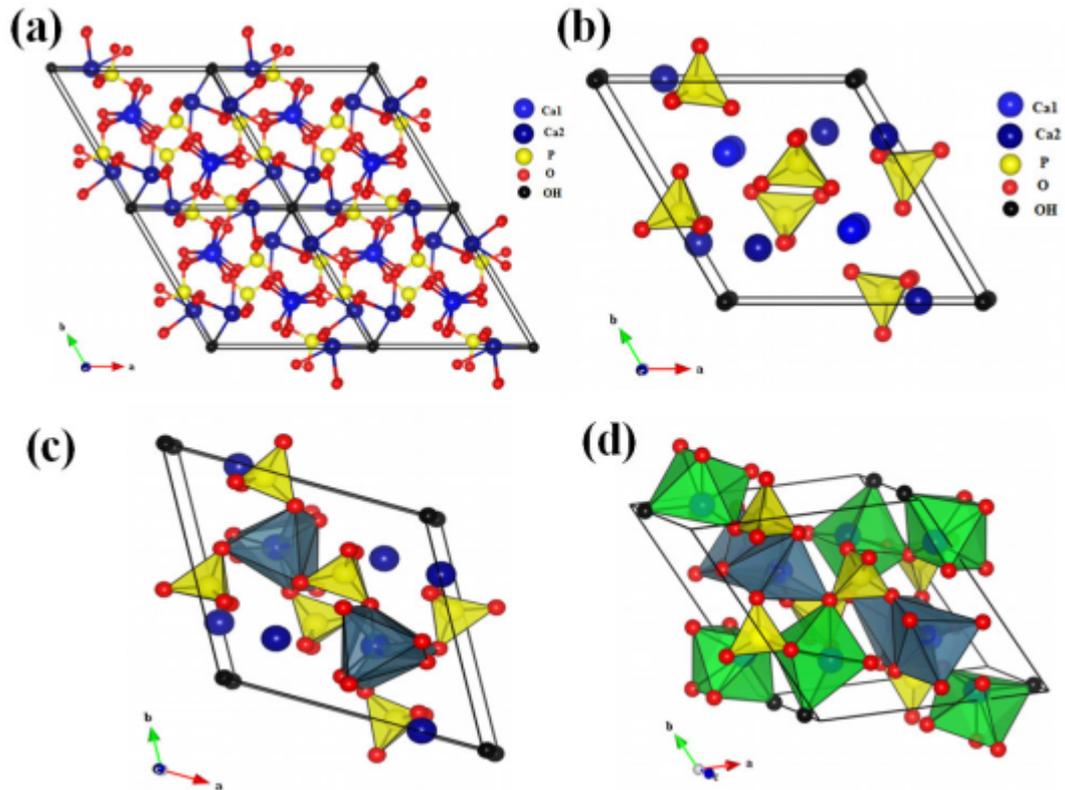


Figura 2.1 (a) Estrutura cristalina da HA de acordo com o plano (001) e (b) projeção mostrando as disposições dos octaedros e (c) e (d) posições tetraédricas.

A hidroxiapatita é um material de grande importância devido à sua elevada biocompatibilidade, boa capacidade de adsorção e alta estabilidade em meio fisiológico. A superfície da hidroxiapatita permite ligações do tipo dipolo-dipolo, fazendo-a uma forte candidata para a adsorção e, posterior, entrega de fármacos e/ou agentes indutores na região do defeito ósseo (FIHRI *et al.*, 2017). Atualmente, as pesquisas concentram-se, principalmente, na síntese das nanopartículas de HA, cujas propriedades podem ser otimizadas através do controle da morfologia, tamanho e cristalinidade deste material.

2.4.1 Produção de Hidroxiapatita

Durante as últimas décadas, foram desenvolvidas diversas rotas para a produção de pós de fosfato de cálcio. Um grande interesse na pesquisa científica para as diversas fases de fosfato

de cálcio vem ganhando um maior destaque, em especial a HA nanométrica, pela sua: biocompatibilidade e bioatividade, além da apropriada morfologia para as diversas aplicações biomédicas. As nanopartículas de HA, com tamanho inferior a 100 nm, apresentam elevada área superficial e uma estrutura ultrafina que se assemelham aos minerais encontrados no tecido ósseo (VALLET-REGÍ e GONZÁLEZ-CALBET, 2004). O grande desafio para a síntese de pós cristalinos é o controle preciso do crescimento dos cristais em relação ao seu tamanho, distribuição de tamanho e forma das partículas. Estes parâmetros podem afetar significativamente suas propriedades mecânicas, condições de processamento, química da superfície, biocompatibilidade e bioatividade. Assim, ao controlar estes parâmetros as potenciais aplicações das nanopartículas de HA podem ser otimizadas (SADAT-SHOJAI *et al.*, 2013).

Na revisão de SADAT-SHOJAI *et al.* (2013), os métodos de síntese foram classificados em cinco grupos: métodos a seco (estado sólido e método mecanoquímico); métodos aquosos (precipitação, hidrólise, sol-gel, hidrotérmico, método por emulsão e método sonoquímico); processos em alta temperatura (método por combustão e pirólise); métodos de síntese baseados em fontes biogênicas; e sínteses combinadas. A Tabela 2.3 apresenta a classificação dos métodos comumente utilizados e com suas características mais relevantes.

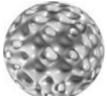
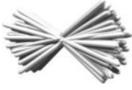
Tabela 2.3 Comparação dos diferentes métodos para a preparação de nanopartículas de HA.

| Método | | Morfologia do pó | Cristalinidade | Tamanho |
|--------------------------------------|---------------|---|----------------|--|
| Seco | Estado sólido | Diversas | Muito alta | Usualmente microm |
| | Mecanoquímico | Diversas | Muito alta | Nano |
| Aquoso | Precipitação | Diversas | baixa | Usualmente Nano |
| | Sol-gel | Diversas | Variável | Nano |
| | Hidrotérmico | frequentemente em forma de agulhas | Muito alta | Nano ou microm |
| Processo em altas temperaturas | Combustão | Diversas (normalmente irregulares) | Variável | Variável |
| | Pirólise | Diversas | Alta | Partículas nano incorporadas em agregados microm |
| Síntese baseada em fontes biogênicas | | Diversas | Variável | Variável |
| Sínteses combinadas | | Diversas (frequentemente em forma de agulhas) | Alta | Usualmente nano |

As características das partículas de HA, tais como: toxicidade celular, bioatividade e bioreabsorção, dependem fortemente de sua microestrutura, morfologia, estequiometria, estrutura cristalográfica e pureza da fase. Entretanto, quando consideramos pós na escala nano ou micrométrica, a morfologia e as dimensões das partículas podem ter um destaque maior do que as outras características. Em particular, para os cristais de HA, tem sido demonstrado que a sua forma microscópica, tamanho e distribuição de tamanho podem afetar significativamente as propriedades mecânicas, condições de processamento, superfície química, biocompatibilidade e bioatividade (SADAT-SHOJAI *et al.*, 2013). De acordo com SADAT-SHOJAI *et al.* (2013) diferentes formas e dimensões para as partículas de HA podem ser encontradas, como mostrados na Tabela 2.4.

Tabela 2.4 Diversas nanoestruturas da HA com formas moduladas.

| Forma | Descrição | Faixa de tamanho (aprox..) | Métodos de síntese* |
|---|--|---|---|
|  | Irregular, sem forma, esfera | 5 nm-200µm | ss, mch, cc, hl, sg, hth, em, sch, ht, bs, cp |
|  | Esfera, microesfera, nanoesfera, bola | 10nm-1000µm | mch, cc, sg, hth, em, sch, ht, bs, cp |
|  | Haste, agulha, tubo, filamento, fibra, fio, prisma, prisma hexagonal, ripa, faixa. | Comprimento: 10 nm-150µm; Diâmetro: 3nm-50µm; Proporção da Tela: 2-1200 | ss, mch, cc, hl, sg, hth, em, sch, ht, bs, cp |
|  | Prato, floco, folha | Comprimento: 40 nm-50nm, Diâmetro: 20nm-35µm; Espessura: 5nm-3µm. | cc, hth, bs, cp |
|  | Nanobastões automontados, pacotes de nanobastões, estrutura do tipo prisma, aglomerado de nanobastões, matriz orientada de agulhas empacotadas, nanobastões empacotados. | Comprimento: 200nm-80µm, largura: 100nm-50µm (nanobastões organizados com 10nm-13µm diâmetro e 200nm-75µm de comprimento) | cc, hl, hth, bs, cp |
|  | Dente de leão, crisântemo, flor, estrutura de penas, ofensores, nanobastões automontados, roseta | 1-8µm (nanobastões organizados com 80-500nm diâmetro e 600 nm-5µm comprimento) | hth, em, bs, cp |
|  | Folha, floco, folha, prato | 800 nm-10µm (nanobastões organizados com 20-100nm de espessura) | cc, hl, cp |

| | | | |
|---|---|--|------------|
|  | Flor | 700 nm–60µm (pétalas organizadas com 20nm–10µm de largura e 180 nm–50µm comprimento) | cc, hth,bs |
|  | Microesfera porosa, esfera mesoporosa | 0.5–7µm (poros de 20–150nm) | hth,cp |
|  | <i>Bowknot</i> , nanobastões automontados | 1.5–2.5µm (nanobastões organizados de 100–150nm diâmetro e 1–2µm comprimento) | cp |
|  | <i>Dumbbell</i> | 2–3µm (nanopartículas organizadas com tamanho de ~50 nm) | cc |

*ss: síntese em estado sólido, mch: método mecanoquímico, cc: precipitação química convencional, hl: método de hidrólise, sg: método sol-gel, hth: método hidrotérmico, em: método de emulsão, sch: método sonoquímico, ht: processos de alta temperatura, bs: síntese a partir de fontes biogênicas, cp: procedimentos de combinação.

Nos últimos anos, o progresso para a preparação de HA utilizando a síntese em meio seco tem ocorrido de forma muito lenta e este método vem recebendo menor atenção na literatura devido às suas limitações (SADAT-SHOJAI *et al.*, 2013). Apesar da síntese em meio seco produzir HA altamente cristalina, a partir de matérias primas relativamente baratas, os processos deste grupo apresentam algumas desvantagens que são relevantes para as características do pó. Para a síntese em estado sólido, por exemplo, a produção das partículas acontece no tamanho micrométrico, não sendo apropriadas para aplicações biomédicas; assim como o processo mecanoquímico, que produz a fase da HA com pureza muito baixa (PRAMANIK *et al.*, 2007; REZAIE *et al.*, 2015).

Os processos de síntese em alta temperatura envolvem, normalmente, boa homogeneidade dos compostos precursores, evitando fases indesejáveis e produzindo HA com alta cristalinidade (AIZAWA *et al.*, 1999). Contudo, as altas taxas de tratamento térmico inviabilizam este processo, uma vez que os níveis de consumo de energias são muito elevados. Além disso, um controle inadequado sobre as variáveis de processamento e a geração de agregados secundários são as principais desvantagens do método pirólise (SADAT-SHOJAI *et al.*, 2013).

As sínteses de fontes biogênicas e sínteses combinadas são processos relativamente novos e em desenvolvimento. A produção de HA, através da síntese de fontes biogênicas, se caracteriza pela utilização de diversas fontes de origem natural, tais como: resíduos ósseos, cascas de ovos, exoesqueleto de organismos marinhos, biomoléculas derivadas naturalmente e

biomembranas (LAONAPAKUL, 2015). No estudo de FERREIRA (2014), por exemplo, foram utilizadas as cascas do ovo de avestruz como fonte primária de cálcio para sintetizar a HA, demonstrando que os pós fabricados eram não tóxicos e bioativos. As principais características deste processo referem-se aos benefícios econômicos e ambientais em função da recuperação destes resíduos. Entretanto, estes materiais são utilizados, em sua grande maioria, exclusivamente para produção de blocos de HA ou para aplicações com partículas maiores (micrométricas). No método de sínteses combinadas, são empregados dois ou mais procedimentos distintos, a fim de criar uma estratégia sinérgica para a produção de HA. Entre as várias possibilidades, as técnicas combinadas mais conhecidas são: hidrotérmico-mecanoquímico, hidrotérmico-hidrólise e hidrotérmico-emulsão. As principais limitações deste procedimento estão relacionadas ao aumento do custo operacional em razão do maior grau de complexidade envolvido (SADAT-SHOJAI *et al.*, 2013).

A rota mais simples e amplamente utilizada para a produção de nanopartículas de HA é a rota de precipitação em via úmida. As reações são empregadas em meio aquoso através de diversas fontes de íons cálcio e fósforo, apresentando como vantagens o controle da morfologia e o tamanho médio das partículas. Normalmente, as características obtidas para a produção dos pós cerâmicos são controladas pelo tempo de reação, temperatura e tempo de envelhecimento. Além disso, o menor custo de produção, associado à possibilidade de obtenção de um maior volume de HA, quando comparado às demais técnicas, torna este processo promissor. Devido a estas vantagens, este processo foi o adotado para a fabricação das nanopartículas de HA neste trabalho.

A técnica por precipitação consiste na obtenção da fase de fosfato de cálcio pelo controle do pH, temperatura e das concentrações em solução contendo íons Ca^{2+} e PO_4^{3-} . Normalmente, o ácido ortofosfórico, fonte de PO_4^{3-} , é adicionado em suspensão contendo hidróxido de cálcio, como fonte de Ca^{2+} , conforme a Equação 2.3.



A adição dos reagentes é realizada de maneira controlada, sob agitação, enquanto a razão molar dos elementos (Ca/P) é mantida em 1,67 (HA estequiométrica). Ao final da síntese, a suspensão resultante poderá ser envelhecida ou imediatamente lavada, filtrada, seca e macerada em pó. De acordo com FERRAZ *et al.* (2004) o tamanho, a forma e área superficial das partículas de HA, além da estabilização do pH obtido ao final da síntese, são sensíveis à

taxa de adição do ácido ortofosfórico. A temperatura da reação também influenciará na formação dos cristais de HA, de modo que as partículas sintetizadas em baixas temperaturas (<60°C) serão monocristalinas e com tamanhos de grão <100 nm (FERRAZ *et al.*, 2004).

2.5 GRAFENO

Historicamente, o grafeno foi estudado pela primeira vez pelo físico canadense Philip Russel Wallace, em 1946, e o principal objetivo era explicar, por meio de cálculos termodinâmicos, as propriedades físicas do grafite (WALLACE, 1947). Em 1962, o termo “grafeno” foi adotado pelo químico Hanns-Peter Boehm, pela combinação da palavra grafite e o sufixo -eno, em função da dupla ligação de carbono existente (JAIN *et al.*, 2016). Ao longo desse tempo, muitos cientistas pesquisaram o grafeno, mas somente em 2004, Andre Geim e Konstantin Novoselov (ambos da Universidade de Manchester, na Inglaterra) conseguiram isolar e caracterizar o primeiro cristal de grafeno (NOVOSELOV *et al.*, 2004). Essa descoberta culminou na premiação do Nobel de Física em 2010 e, desde então, esse material tem despertado um grande interesse na comunidade científica.

Grafeno é o nome dado a monocamada plana de átomos de carbono de hibridização sp^2 que estão organizados em estrutura hexagonal e bidimensional (2D), densamente compactados, em configuração similar à de uma colmeia (NOVOSELOV *et al.*, 2004; GEIM e NOVOSELOV, 2007; BIANCO *et al.*, 2013). Sua configuração descreve a estrutura básica para outros alótropos do carbono, tais como: fulereno (0D), nanotubo de carbono (1D) e grafite (3D), conforme a Figura 2.2.

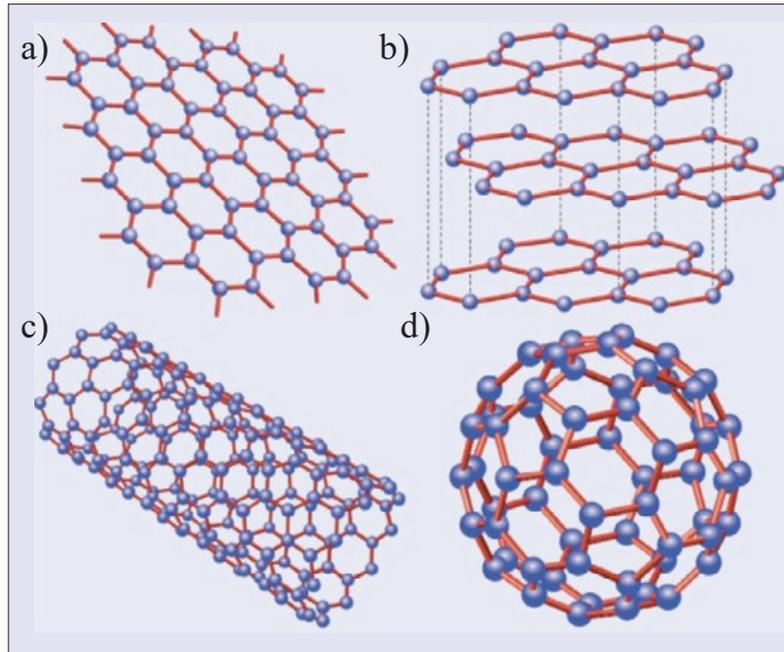


Figura 2.2 Estrutura básica do (a) grafeno que descreve outros alótropos do carbono: (b) grafite, (c) nanotubo de carbono e (d) fulereno (a).

Um dos aspectos importantes na química do carbono, em termos de hibridização, refere-se a sua configuração eletrônica. As ligações químicas entre os átomos de carbono possibilitam que os orbitais dos subníveis atômicos s e p se misturem, permitindo, assim, a formação de outros orbitais híbridos. Para o grafeno, essa flexibilidade estrutural é refletida em suas propriedades eletrônicas, uma vez que a hibridização sp^2 entre um orbital s e dois orbitais p conduz a formação de estrutura planar, como uma rede triangular de base composta por dois átomos de carbono por célula (Figura 2.3 (a)). Os vetores da rede podem ser descritos na EQ. 2.4 e Figura 2.3 (b), onde $a \cong 1,42 \text{ \AA}$, e representa a distância entre carbono-carbono, e os vetores da rede recíproca são dados pela EQ. 2.5 e Figura 2.3 (c) (CASTRO NETO *et al.*, 2009; CASTRO NETO, 2010).

$$a_1 = \frac{a}{2} (3, \sqrt{3}), \quad a_2 = \frac{a}{2} (3, -\sqrt{3}) \quad \text{Equação 2.4}$$

$$b_1 = \frac{2\pi}{3a} (1, \sqrt{3}), \quad b_2 = \frac{2\pi}{3a} (1, -\sqrt{3}) \quad \text{Equação 2.5}$$

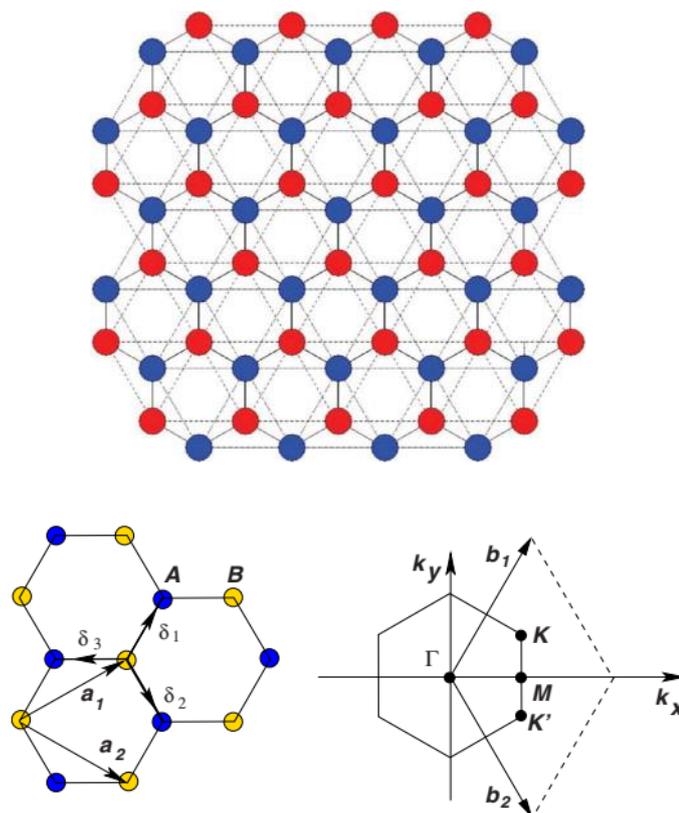


Figura 2.3 (a) Estrutura hexagonal do grafeno; (b) espaço real com os vetores primitivos da rede; (c) rede recíproca do grafeno com os vetores da rede recíproca.

O grafeno revelou um conjunto único de propriedades e, desde a sua descoberta, despertou enorme interesse da comunidade científica. Além disso, algumas características medidas experimentalmente excedem às obtidas em qualquer outro material já observado. Dentre as muitas propriedades intrigantes do grafeno, podemos ressaltar: a elevada área superficial específica ($2630 \text{ m}^2\text{g}^{-1}$), alta mobilidade intrínseca ($200.000 \text{ cm}^2\text{V}^{-1}\text{s}^{-1}$), elevado módulo de elasticidade ($\sim 1\text{TPa}$), condutividade térmica ($\sim 5000 \text{ Wm}^{-1} \text{ K}^{-1}$) e transparência ótica ($\sim 97,7\%$). Essas propriedades tornam o grafeno um material promissor para a fabricação de compósitos, alta performance de eletrodos de armazenamento de energia, catalisadores, biomateriais e outras aplicações potenciais (YANG *et al.*, 2014).

2.5.1 Produção de Grafeno

O rápido progresso científico ocorreu em virtude da obtenção do grafeno de alta qualidade ao utilizar um procedimento relativamente simples e barato. O método adotado por NOVOSELOV *et al.* (2004) consiste na esfoliação mecânica, ou clivagem micromecânica, do

grafite em poucas e/ou apenas uma camada, utilizando um outro elemento para separar essas camadas. Os autores prepararam filmes de carbono a partir de pequenas placas de grafite pirolítico altamente orientado e, utilizando fita adesiva, a esfoliação dos flocos de grafite foi realizada. Apesar da sua simplicidade, a técnica adotada possui alguns recursos esclarecedores e permitiu entender o porquê deste material não ser descoberto anteriormente. NOVOSOLOV *et al.* (2007) explicam que as monocamadas de grafeno são completamente transparentes a luz visível e não podem ser vistas por microscopia ótica utilizando um substrato qualquer. Durante o experimento, NOVOSELOV *et al.* (2004) utilizaram um disco de silício/óxido de silício (300 nm de espessura) como substrato e esta configuração permitiu a observação da monocamada de grafeno. A partir daí outros métodos para a produção do grafeno foram desenvolvidos e/ou aperfeiçoados.

Atualmente, a produção de grafeno pode ser realizada por dois métodos: *top-down* (caminho de cima para baixo) e *bottom-up* (caminho de baixo para cima). Enquanto o método *bottom-up* é definido como a síntese do material (construindo a sua estrutura átomo a átomo / molécula por molécula); o método *top-down* é relacionado à fragmentação do material macro até a escala nanométrica (por exemplo, o grafite para grafeno) (TOUR, 2014; KUMAR e PATTAMMATTEL, 2017).

No processo *bottom-up*, o grafeno pode ser produzido por deposição química à vapor (CVD), crescimento epitaxial em substrato e síntese química. Para o processo *top-down*, o grafeno pode ser obtido por clivagem micromecânica, ligação anódica, fotoesfoliação, esfoliação em fase líquida, crescimento em SiC e precipitação em metais. A Figura 2.4 apresenta de forma esquemática os métodos de produção de grafeno mencionados.

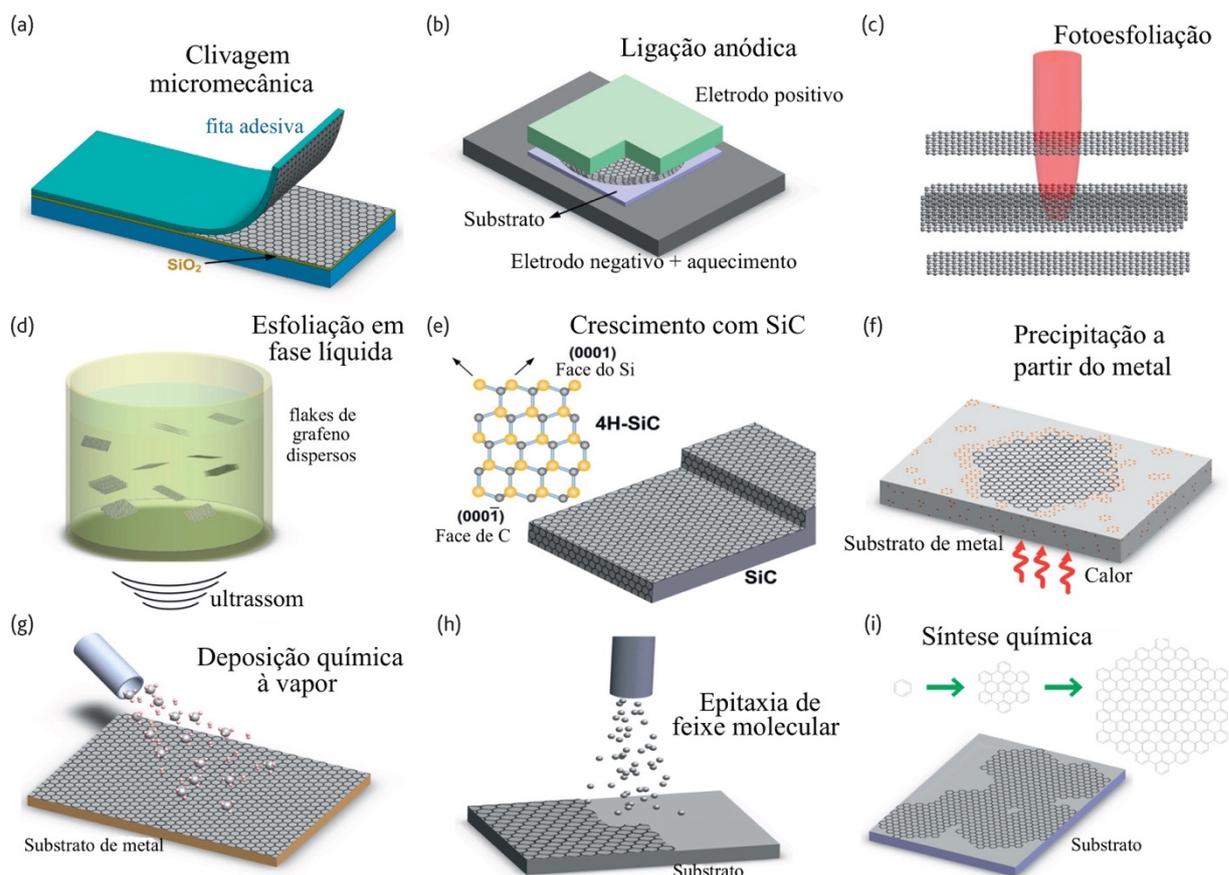


Figura 2.4 Métodos de produção de grafeno.

Atualmente, o mercado é impulsionado pela produção de grafeno com alta qualidade, em diversas dimensões e formas, buscando propriedades adequadas a uma determinada aplicação (FERRARI *et al.*, 2015). Nesse contexto, a esfoliação química do grafite (*top-down*) é uma técnica bem estabelecida e altamente promissora, capaz de produzir o grafeno em grandes quantidades e baixo custo (KUMAR e PATTAMMATTEL, 2017; NOVOSELOV *et al.*, 2012). Nessa técnica, inicialmente, é promovida a oxidação do grafite pela introdução de moléculas ou solventes, chamados agentes esfoliantes. Os grupos funcionais (tais como hidroxilas e epóxidos) são inseridos na superfície e nas camadas de carbono do material e diminuem as interações entre as camadas, resultando em um aumento do espaçamento entre elas. Esse método gera dispersões de óxido de grafeno (*graphene oxide – GO*), o qual, posteriormente, pode sofrer redução química. Nesse caso, o óxido de grafeno reduzido (*reduced graphene oxide – rGO*) é caracterizado como um grafeno convertido quimicamente.

Tipicamente, existem três formas importantes do grafeno: grafeno, óxido de grafeno (GO) e óxido de grafeno reduzido (rGO). As estruturas são mostradas na Figura 2.5 e podem

ser modificadas quimicamente para a realização de reações superficiais, devido à presença de diferentes grupos funcionais.

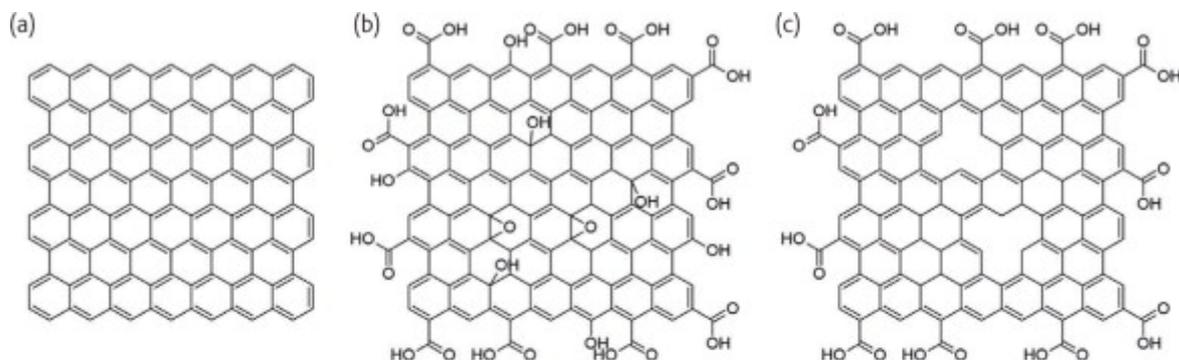


Figura 2.5 Estrutura do (a) grafeno, (b) óxido de grafeno (GO) e (c) óxido de grafeno reduzido (rGO).

É comum muitos autores descreverem o grafeno como *monolayer* ou *single-layer*, para enfatizar que este é o verdadeiro material de camada única. Existem ainda outras denominações que descrevem esse material, como, por exemplo, grafeno *multilayer* ou *few-layer*. Contudo, para fins práticos, vale ressaltar que até dez camadas de carbono empilhadas de forma organizada, o material pode ser classificado como grafeno. Porém, acima desse valor, a estrutura passa a ser grafite (BIANCO *et al.*, 2013).

2.5.2 Grafeno como biomaterial

A utilização de materiais em escala nanométrica trouxe um salto tecnológico para a área da ciência médica, oferecendo inúmeras oportunidades e soluções inovadoras para a prevenção e o tratamento de doenças. O rápido avanço está intimamente ligado a suas propriedades e algumas características devem ser bem definidas para que os resultados desejados sejam alcançados.

O grafeno se demonstra com um grande potencial em muitas aplicações na área de ciência dos materiais e vem ganhando grande destaque também na área biomédica como, por exemplo, em componentes para biosensores, engenharia de tecidos e *drug delivery* (FENG e LIU, 2011). Esse material apresenta compatibilidade celular muito complexa e sensível aos sinais físicos, químicos e elétricos. Além disso, os diferentes métodos de produção e o grande número de formas físicas e químicas disponíveis do grafeno possibilitam uma ampla

gama de propriedades que devem ser levadas em consideração ao avaliar sua biocompatibilidade (THOMPSON *et al.*, 2015). O aspecto tridimensional do grafeno, por exemplo, é formado em sua grande maioria, por folhas constituídas de monocamadas, ou poucas camadas, a partir de uma geometria variada, como: triangular e hexagonal. Embora sua espessura seja identificada em escala nanométrica (entre 0,34 nm a alguns nanômetros), a dimensão lateral varia entre 0,3 a 10 μm (BUSSY *et al.*, 2012). As propriedades relevantes para as aplicações biológicas do grafeno são apresentadas na Tabela 2.5.

Tabela 2.5 Propriedades relevantes do grafeno para aplicações biológicas.

| Características Físico-químicas | Descrição |
|----------------------------------|---|
| Forma | Planar – <i>monolayer</i> ou <i>multilayer</i> ; Estrutura/forma variada: constituído por folhas (ou <i>flakes</i>), nas formas triangular e hexagonal. |
| Dimensões típicas | Espessura 0,34 a alguns nanômetros Dimensão lateral entre 0,3 a 10 μm |
| Área superficial | Até 2675 m^2/g , podendo ser descrita pelo número de camadas. |
| Mudança superficial | Varia de acordo com a funcionalização e o revestimento |
| Revestimento superficial | Varia de acordo com a natureza química, tipo, densidade e conformação. |
| Módulo de elasticidade e Rigidez | Módulo de Young: 1,1 TPa; capaz de dobrar/curvar e flambar; a rigidez aumenta com o aumento do número de camadas. |
| Estabilidade coloidal | Dispersão aquosa (grafeno diluído em água) ou agregados. |
| Durabilidade | Degradação enzimática ocorre por defeitos no plano. |
| Impureza | Varia de acordo o processo de fabricação: principalmente grafite e resíduos químicos do processamento |

A superfície do biomaterial desempenha um papel importante nas interações biológicas. Em escala micrométrica, as características dos biomateriais são de tamanho comparável aos da própria célula; enquanto, para a escala nanométrica, as características da superfície são de várias ordens de grandeza, resultando em uma resposta mais complexa e, sendo possível ainda, modular as respostas celulares (GITTENS *et al.*, 2011). Segundo SANCHEZ *et al.* (2011), para o grafeno monocamada, cada átomo fica na superfície e, de fato, é exposto ao meio circundante nos dois lados. Esta interação dá origem a uma área superficial teórica máxima de uma folha

de carbono com hibridização sp^2 de, aproximadamente, 2600 m^2/g . Logo, o número de camadas de grafeno determina a área superficial específica e a rigidez à flexão desse material, uma vez que a área superficial específica é inversamente proporcional ao número de camadas.

As notáveis propriedades mecânicas do grafeno o destacam tanto como um material isolado quanto como um agente de reforço em biomateriais compósitos. A razão para a sua excepcional propriedade consiste na estabilidade das ligações sp^2 que formam a rede hexagonal e se opõem a uma variedade de deformações no plano (PAPAGEORGIOU *et al.*, 2017). As propriedades elásticas do grafeno monocamada foram medidas pela primeira vez por LEE *et al.* (2008), por meio da utilização de um nanoindentador equipado a um microscópio de força atômica (AFM - *Atomic Force Microscope*). Essa configuração proporcionou a maior medida de módulo de elasticidade (1,1 TPa) já encontrada.

A alta condutividade elétrica (até 2×10^4 S/cm) e a mobilidade eletrônica (2×10^5 $cm^2/V.s$) do grafeno são propriedades importantes que estimulam a diferenciação e direcionalidade das células-tronco mesenquimais (THOMPSON *et al.*, 2015). Estudos com o grafeno vem demonstrando a capacidade desse material em diferenciar as células-tronco mesenquimais em linhagens osteogênicas, com resultados similares àquelas obtidas com as proteínas morfogenéticas ósseas (BMPs). No estudo de NAYAK *et al.* (2011), os autores comprovaram a influência do grafeno sobre o crescimento das células-tronco mesenquimais em quatro substratos diferentes, com rigidez e rugosidade superficial amplamente variáveis. O grafeno foi sintetizado pelo método de deposição química a vapor em folhas de cobre e, após o crescimento, transferido para quatro diferentes substratos (PDMS, PET, lâmina de vidro e Si/SiO₂). Observações qualitativas foram confirmadas por coloração com alizarina (corante e pigmento vermelho), conforme Figura 2.6 (c) e (d), indicando a presença ou ausência de depósitos de cálcio. Os resultados demonstram um forte aumento no depósito de cálcio com o revestimento de grafeno, mesmo na ausência do fator de crescimento BMP-2, para todos os substratos investigados, mostrando que o grafeno possui excelente propriedade osteoindutora. Além disso, na presença das BMPs, os substratos contendo grafeno também demonstraram maior coloração com alizarina, o que revela um efeito sinérgico quando utilizados BMPs-grafeno.

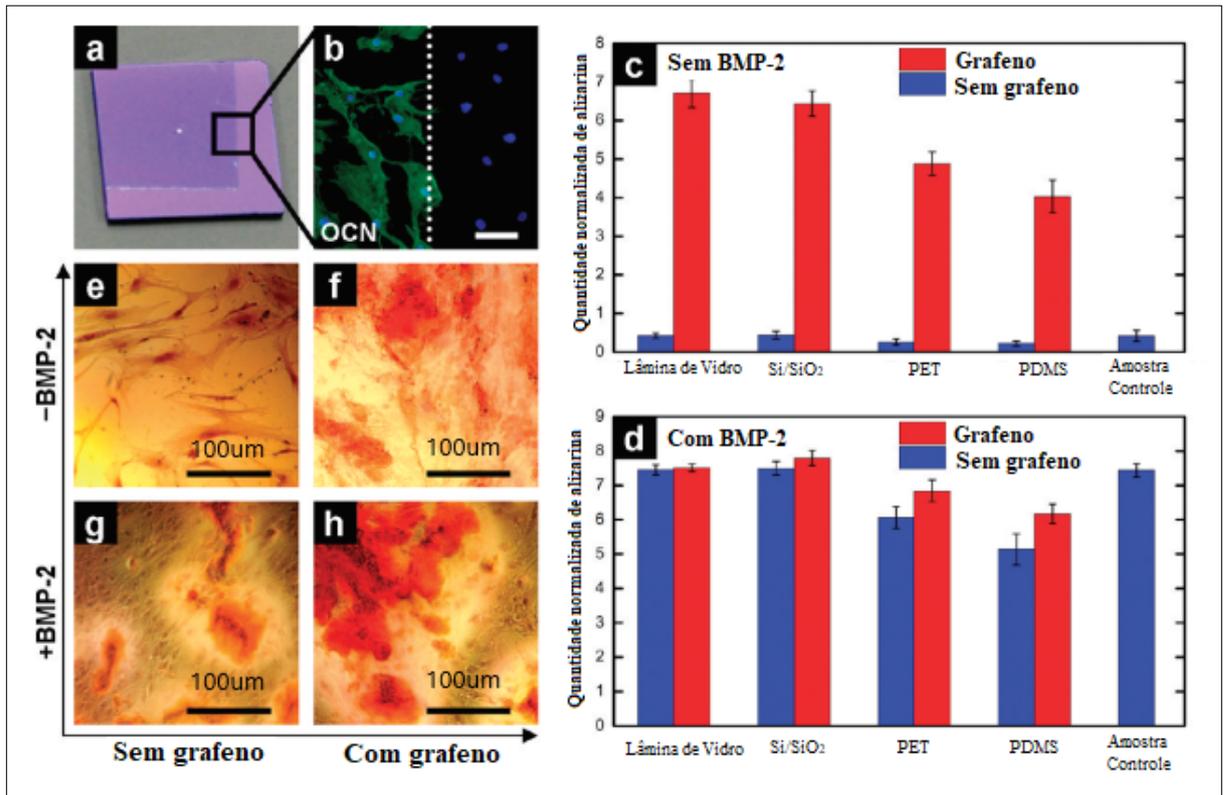


Figura 2.6 (a) Imagem óptica do substrato de silício com grafeno; (b) marcador celular, mostrando a formação de células ósseas no mesmo substrato; (c, d) quantificação de alizarina derivada das células cultivadas por 15 dias em substratos com/sem grafeno; (e-h) substrato de PET com e sem grafeno e alizarina mostrando depósitos de cálcio em razão da osteogênese.

No estudo de LEE *et al.* (2015), nanocompósitos de HA/rGO foram produzidos com o objetivo de aumentar a osteogênese dos pré-osteoblastos e promover a formação óssea. Quando combinado com a HA, o rGO promoveu a diferenciação espontânea das células sem impedir a sua proliferação. Os autores sugerem que os compósitos HA/rGO podem ser explorados para o desenvolvimento de novos enxertos ósseos dentários e ortopédicos, acelerando a regeneração óssea e estimulando a osteogênese devido à característica osteoindutora do grafeno.

Melhorias nas propriedades físicas, mecânicas e elétricas de compósitos hidroxiapatita e grafeno vêm sendo relatadas na literatura por outros autores. Estudos recentes vêm demonstrando a aplicação de biomateriais à base de grafeno para fabricação de *scaffolds* na engenharia tecidual, devido à capacidade deste material, além de ser osteoindutor, em otimizar as propriedades mecânicas do biomaterial (SHADJOU *et al.*, 2018). No estudo de NAIR *et al.* (2015), *nanoflakes* de óxido de grafeno (GO) foram incorporados (0,5 e 1,0%, em peso de GO) ao *scaffold* de gelatina-hidroxiapatita (GHA). Essa incorporação aumentou significativamente a rigidez, resistência à flexão e a resistência à compressão dos arcações,

quando comparados aos *scaffold* sem grafeno. Os autores também realizaram experiências de cultura para diferenciação osteogênica de células-tronco mesenquimais. Os resultados desse trabalho demonstram que o nível de diferenciação osteogênica do *scaffold* GHA-grafeno foi compatível aquelas estruturas de GHA com suplementos osteogênicos.

Em 2017, RAUCCI *et al.* obtiveram compósitos de HA/GO por duas técnicas simples e distintas. Na primeira abordagem, *flakes* de GO foram incorporados na síntese da HA pelo método de sol-gel, e essa interação apresentou melhoras significativas na bioatividade, demonstrado pela formação de uma camada apatita na superfície do material após tratamento biomimético. Além disso, os HA/GO formados demonstraram alta viabilidade de células-tronco mesenquimais e induziram a diferenciação osteogênica. Este estudo comprovou, pelas técnicas FTIR (Espectroscopia de Infravermelhos por Transformada de Fourier) e MET (Microscopia Eletrônica de Transmissão), que os grupos funcionais contendo oxigênio, hidroxilas e carbonila, presentes no plano basal das folhas de GO, desempenharam um papel importante na ancoragem dos íons cálcio. Ainda, de acordo com RAUCCI *et al.* (2017), a segunda abordagem compreendeu a obtenção de um material com superfície mineralizada. A mineralização incipiente foi induzida por incubação do GO em solução supersaturada em SBF e os resultados foram comprovados por MEV (Microscopia Eletrônica de Varredura) e FTIR (Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier). A presença aniônica de grupos funcionais presentes no GO promoveu a nucleação heterogênea (Figura 2.7 (b)) dos biominais, atraindo cátions Ca^{2+} depositados na superfície da folha de GO e, subsequentemente, de PO_4^{3-} .

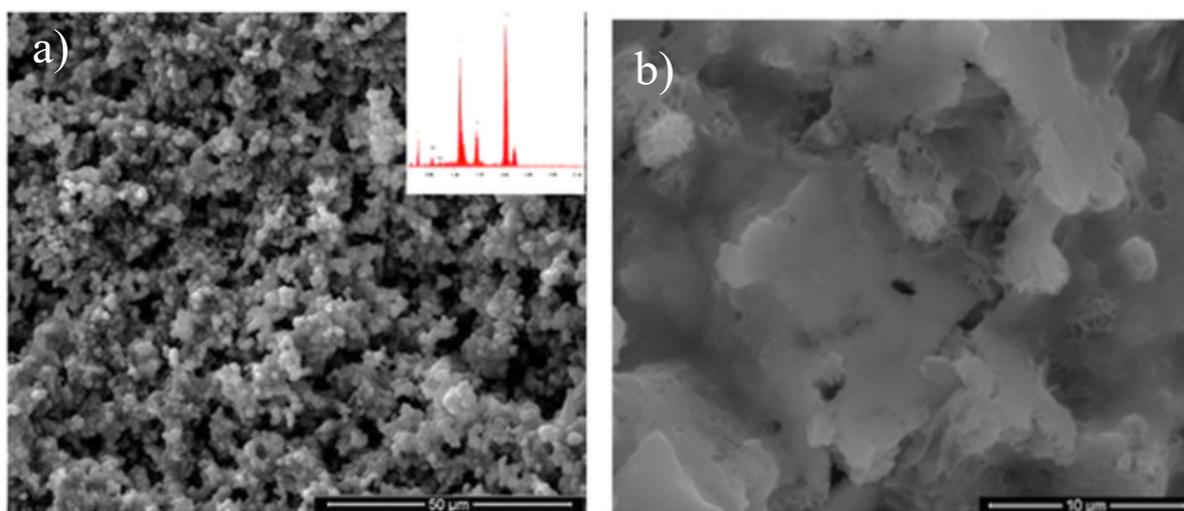


Figura 2.7 Imagens por MEV das amostras de HA - GO 1,5%, em peso, (a) da superfície e (b) corte transversal dos filmes de grafeno após o tratamento em SBF por 7 dias.

Para garantir o uso seguro do grafeno em aplicações biomédicas, eventuais avaliações dos riscos potenciais deste material são obrigatórias. Contudo, as informações sobre a toxicidade *in vitro* e *in vivo* do grafeno ainda são muito limitadas e mais estudos são necessários. Além disso, investigações sistemáticas devem ser cuidadosamente realizadas para correlacionar cada um desses parâmetros ao evento biológico induzido pelo grafeno. SEABRA *et al.* (2014) revelam que a toxicidade do grafeno dependerá de diversos parâmetros, dentre eles, a superfície (estrutura química ou a natureza dos revestimentos funcionalizados), tamanho dos *flakes*, número de camadas, tipo de células investigadas, tempo de exposição e métodos de síntese. Portanto, as propriedades relevantes do grafeno para aplicações biológicas abordadas atualmente na literatura são importantes para a compreensão detalhada do desempenho desse material.

3 MATERIAIS E METODOLOGIA

Neste capítulo, descrevem-se os materiais empregados, métodos de obtenção das amostras e equipamentos utilizados para a caracterização dos mesmos. Inicialmente, foi realizada a caracterização do grafite como recebido, material precursor para a produção do óxido de grafeno (GO) e, posteriormente, a caracterização deste material após a sua produção. Para a produção dos nanocompósitos HA - GO, foram selecionadas duas rotas para incorporação do GO na HA. Abaixo estão descritas as rotas investigadas neste trabalho, como também o fluxograma de cada produção de nanocompósitos HA - GO. O procedimento experimental para cada rota abordada está descrito na sessão 3.2.

- Rota 1: Mistura entre os pós de HA e as dispersões de GO, nomeadas como nHA - GO;
- Rota 2: Síntese da HA pelo método de precipitação em meio aquoso, adicionando dispersões de GO após o preparo da solução precursora, nomeadas sHA - GO;

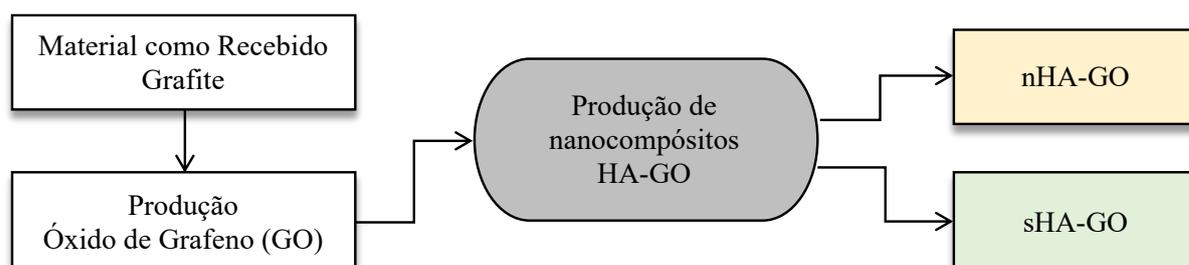


Figura 3.1 Fluxograma esquemático para a produção de nanocompósitos HA - GO.

A água ultrapura foi obtida por meio de um equipamento de osmose reversa da marca Quimis, modelo Q842-210 disponível no Laboratório de Cerâmicas do IME, sendo utilizada tanto para a obtenção das dispersões de GO quanto para a fabricação das amostras nHA - GO. Verificou-se que a água ultrapura apresentou um caráter levemente ácido (pH entre 5 e 6). Já o preparo das amostras sHA - GO foi realizado em colaboração com a empresa R-CRIO. A obtenção da água ultrapura ocorreu por meio de um equipamento de ultrapurificação de água da marca Mili-Q, modelo Direct 8, disponível no laboratório de Criopreservação da empresa. As especificações são: resistividade: 18.2 microhm/cm; carbono orgânico total=2 ppb e

contagem de microrganismo: < 1UFC/mL. Verificou-se que a água ultrapura apresentou um pH entre 8 e 9.

3.1 MATERIAIS

3.1.1 Solução Precursora

Neste trabalho, o método adotado para a obtenção da hidroxiapatita foi fundamentado em preparar soluções aquosas ricas em precursores dos íons cálcio e fósforo. Os reagentes utilizados estão listados na Tabela 3.1.

Tabela 3.1 Reagentes utilizados para a produção da Solução.

| Material | Fórmula Molecular | Concentração | Marca |
|----------------------------|--|--------------|-------|
| Hidróxido de Cálcio P.A. | Ca(OH) ₂ | 96,00% | Merck |
| Ácido láctico P.A. | C ₃ H ₆ O ₃ | 85-90% | Synth |
| Ácido orto-fosfórico P.A. | H ₃ PO ₄ | 85,00% | Merck |
| Hidróxido de potássio P.A. | KOH | 99,90% | Merck |
| Água ultrapura | H ₂ O | - | - |

3.1.2 Óxido de Grafeno

Para as dispersões de GO, foi utilizado o grafite Graflake 99550, fornecido pela empresa Nacional de Grafite, com granulometria média superior a 300 microns (+50 mesh – abertura 0,297 mm), conforme especificações do fornecedor. Os demais reagentes utilizados na rota de produção do GO estão descritos na Tabela 3.2.

Tabela 3.2 Reagentes utilizados para a produção de GO.

| Material | Fórmula Molecular | Concentração | Marca |
|-----------------------------|--|--------------|----------|
| Ácido sulfúrico P.A. | H ₂ SO ₄ | 98,80% | B'Herzog |
| Nitrato de sódio P.A. | NaNO ₃ | - | Vetec |
| Permanganato de potássio | KMnO ₄ | 93,30% | Vetec |
| Peróxido de hidrogênio P.A. | H ₂ O ₂ | 32% | Vetec |
| Hidróxido de amônio P.A. | NH ₄ OH | 29% | Vetec |
| Ácido ascórbico P.A. | C ₆ H ₈ O ₆ | 99% | Synth |
| Plurônic (F-127) | $\text{H}(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_x(\text{OCH}_2\overset{\text{CH}_3}{\text{C}}\text{H})_y(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_z\text{OH}$ | - | Sigma |
| Água ultrapura | H ₂ O | - | - |

3.2 PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

3.2.1 Produção do GO

A rota de produção de GO adotada consiste na esfoliação em fase líquida por rota química, utilizando o método de HUMMERS e OFFEMAN (1958) modificado por ROURKE *et al.* (2011). Em relação às outras técnicas de produção de grafeno, o presente método foi adotado devido ao menor custo associado à possibilidade de um maior volume de produção. Neste trabalho, o GO foi produzido com base no estudo de FARIA *et al.* (2017), que avaliaram a influência do tempo de oxidação em relação às características finais dos *flakes*. O processo por esfoliação química pode ser subdividido em três etapas principais: intercalação, oxidação e esfoliação/lavagem (Figura 3.2).

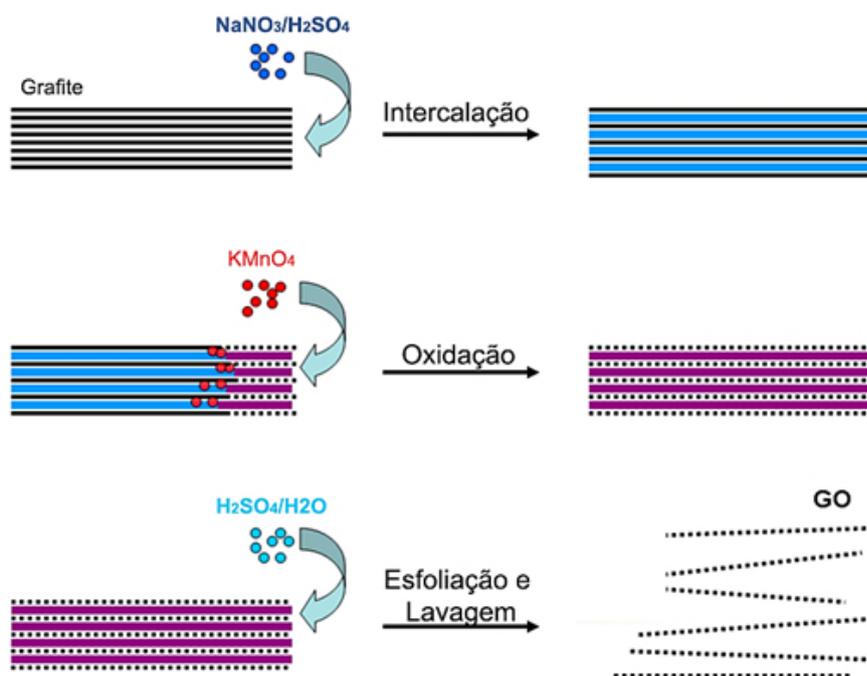


Figura 3.2 Esfoliação em fase líquida por rota química, pelo método de Hummers modificado.

Para a etapa de intercalação, inicialmente, foram adicionados 10,00 g de grafite, 7,60 g de nitrato de sódio (NaNO_3) e 348,70 ml de ácido sulfúrico (H_2SO_4) em um balão volumétrico de fundo redondo. Após 2 horas de agitação, foram adicionados 49,50 g de permanganato de potássio (KMnO_4) para início da etapa de oxidação. Devido ao caráter exotérmico da reação, a adição é realizada de forma fracionada, divididas em 12 partes a cada 10 min, e utilizando um banho de gelo para evitar o superaquecimento. Após a última adição de KMnO_4 , o tempo de oxidação é de 7 dias com base no estudo de FARIA *et al.* (2017).

A etapa de esfoliação é iniciada com o preparo e gotejamento de 1210 ml de uma solução contendo H_2SO_4 diluída a 5% vol. por 1 hora. A mistura foi mantida sob agitação durante o período de 3 horas e, em seguida, adicionou-se uma solução contendo 33 g de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) a 30 volumes (corresponde a 9% vol.). Para remover o excesso de reagentes durante o processo, foram adicionados 1000 ml de solução diluída contendo H_2O_2 a 3% vol. e H_2SO_4 a 0,5% vol., mantendo em agitação por 12 horas. A mistura resultante foi centrifugada para descarte do sobrenadante e sedimentação do material viscoso. A centrifugação foi realizada em uma velocidade de 9300 rpm por meio da centrífuga (Hettich Centrifugen rotina 420R), com capacidade para 4 tubos de 250 ml, por 30 min. Em seguida, foram adicionados à mistura 1000 ml da solução H_2O_2 a 3%vol. para completa lavagem e eliminação dos reagentes.

Após a adição da solução H_2O_2 a 3%vol. e H_2SO_4 a 0,5%vol., foram realizadas um total de 13 centrifugações, como também outras 5 lavagens com água ultrapura. Para melhor sedimentação e eficiência da centrifugação, o tempo de centrifugação pode ser aumentado de acordo com o progresso das lavagens. Ao final desta etapa, foi realizada a filtragem a vácuo das dispersões obtidas para eliminação de particulados de grafite não oxidado, com o auxílio de um funil de Büchner, kitassato, bomba de vácuo e tela polimérica de *silk screen* (GG PET plus 100T, Global) com abertura de 100 mesh (149 μm).

3.2.2 Síntese da Hidroxiapatita

O método de síntese adotado para a obtenção da hidroxiapatita foi a precipitação em meio aquoso (NAVARRO DA ROCHA *et al.*, 2013), em temperatura ambiente e controle do pH igual a 12, como ilustrado no fluxograma da Figura 3.3. A solução precursora foi produzida pela mistura, sempre em agitação, das soluções: 0,5 mol/L de hidróxido de cálcio ($\text{Ca}(\text{OH})_2$), 0,3 mol/L de ácido orto-fosfórico e 1 mol/L de ácido láctico ($\text{C}_3\text{H}_6\text{O}_3$).

Primeiramente, a solução de 1 mol/L ácido láctico ($\text{C}_3\text{H}_6\text{O}_3$) foi adicionada à suspensão de 0,5 mol/L hidróxido de cálcio ($\text{Ca}(\text{OH})_2$). Após 30 minutos, adicionou-se lentamente à mistura uma solução de 0,3 mol/L ácido orto-fosfórico (H_3PO_4), a uma taxa de 8 ml/min. Ao final desta etapa, a solução obtida apresentou um aspecto translúcido e estável. Após 24 horas do preparo da solução precursora, sempre em agitação, a solução de 1 mol/L hidróxido de potássio (KOH) foi adicionada para induzir a precipitação da hidroxiapatita através do ajuste do pH, a fim de alcançar o valor de 12. O precipitado resultante foi envelhecido por 24 horas e filtrado em sistema de vácuo (DVP, modelo ZA 60S da marca EDWARDS), adicionando abundantemente água ultrapura para a retirada do KOH em excesso. Nesta etapa, foi alcançado o pH=7 no líquido filtrado e, na sequência, o material foi encaminhado para secagem na estufa, com temperatura controlada, em torno de 50°C por 48 horas. Após a obtenção dos pós secos, os mesmos foram desaglomerados com o auxílio de um almofariz e um pistilo e peneirados para obtenção da granulometria padrão (75 e 150 μm).

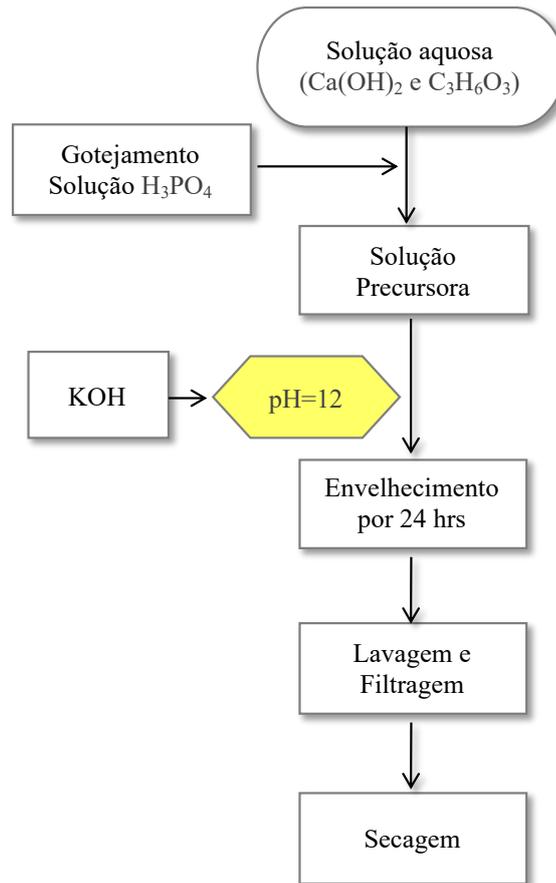


Figura 3.3 Fluxograma para a síntese de hidroxiapatita pelo método de precipitação em meio aquoso.

3.2.3 Produção de nanocompósitos de Hidroxiapatita-Grafeno (nHA - GO)

A primeira rota de produção dos nanocompósitos consiste na mistura entre o pó de HA e as dispersões de GO. A mistura foi submetida à agitação mecânica, durante 1 hora, em agitador mecânico (Fisatom, modelo 713). Quando necessário, as dispersões de GO foram diluídas em água ultrapura para auxiliar na agitação. A velocidade de agitação foi regulada em função do volume de solução sob agitação. Na sequência, as misturas foram filtradas à vácuo com o auxílio de funil de Buchner, kitassato, bomba de vácuo e papel de filtro qualitativo (Qualy, J.Prolab – 80 gramas, 18,5 cm) para eliminação do excesso de água. O material foi encaminhado para secagem na estufa, com temperatura controlada, em 50 °C por 48 horas. Após a obtenção dos pós secos, estes foram desaglomerados com o auxílio de um almofariz e um pistilo. Os nanocompósitos nHA - GO foram fabricados contendo 0,5%, 1,0% e 1,5%, em peso de GO.

3.2.4 Síntese da Hidroxiapatita-Grafeno (sHA - GO) pelo método de precipitação em meio aquoso

Para a síntese da sHA - GO pelo método de precipitação em meio aquoso, as dispersões de GO foram adicionadas durante o preparo da solução precursora. A suspensão contendo o GO foi adicionada, lentamente, à solução rica em íons Ca^{2+} e PO_4^{3-} já pronta. Após 24 horas do preparo da solução precursora sHA - GO, sempre em agitação, a solução de 1 mol/L hidróxido de potássio (KOH) foi adicionada, atingindo $\text{pH}=12$, como na síntese convencional de HA. Para um melhor controle dos parâmetros, a síntese foi realizada em parceria com a empresa R-CRIO, utilizando o reator Tec-Bio-Flex, da Tecnal. O equipamento possui entradas para sensor de temperatura, eletrodo de pH digital e bombas peristálticas, capazes de controlar a temperatura, o pH da solução e a velocidade de gotejamento das soluções, respectivamente. Para esta rota, os parâmetros temperatura e pH foram ajustados para $25\text{ }^\circ\text{C}$ e $\text{pH}=12$.

O composto resultante foi envelhecido por 24 horas e filtrado em papel de filtro (Qualy, J.Prolab – 80 gramas, 18,5 cm) em sistema de vácuo (DVP, modelo ZA 60S da marca EDWARDS). Os precipitados foram suspensos, diversas vezes, em água ultrapura para a retirada do excesso de KOH. Nesta etapa do trabalho, foi alcançado o $\text{pH}=7$ no líquido filtrado e, logo após, foram realizados os processos de secagem, desaglomeração e peneiramento (75 e $150\mu\text{m}$), conforme descrito no tópico de produção da HA. O processo de secagem foi realizado utilizando o equipamento de liofilização (Christ, modelo Alpha 1-2) por um período de 48 horas. A rota sHA - GO está ilustrada na Figura 3.4. Os nanocompósitos foram fabricados contendo 0,5%, 1,0% e 1,5%, em peso de GO.

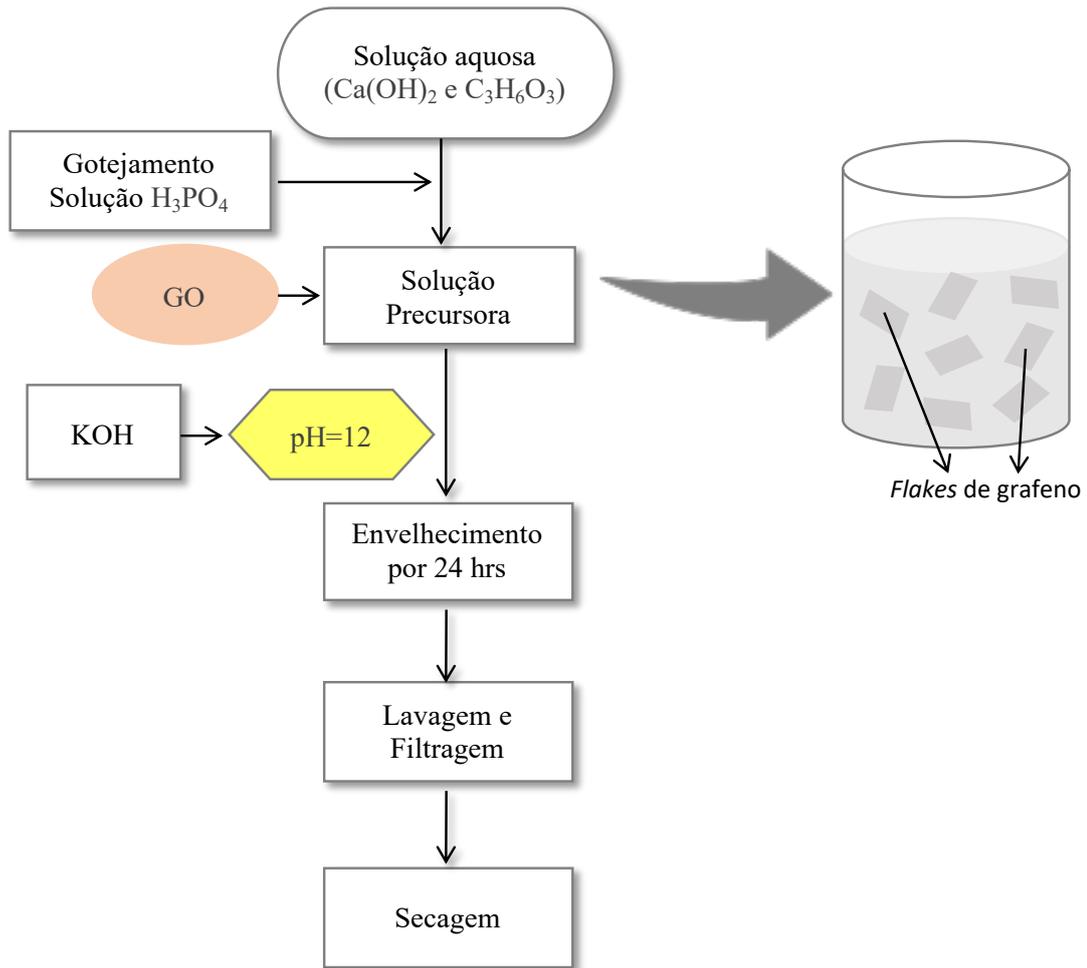


Figura 3.4 Fluxograma contendo a rota para a síntese da HA-grafeno pelo método de precipitação em meio aquoso.

3.2.5 Caracterizações estruturais, morfológicas e físico-químicas

As caracterizações foram realizadas contemplando o grafite como recebido, a produção do GO, a síntese da hidroxiapatita e a produção dos nanocompósitos de HA - GO por meio das 2 rotas. Estão representadas no fluxograma abaixo (Figura 3.5 e Figura 3.6) as caracterizações referentes a cada etapa proposta neste trabalho.

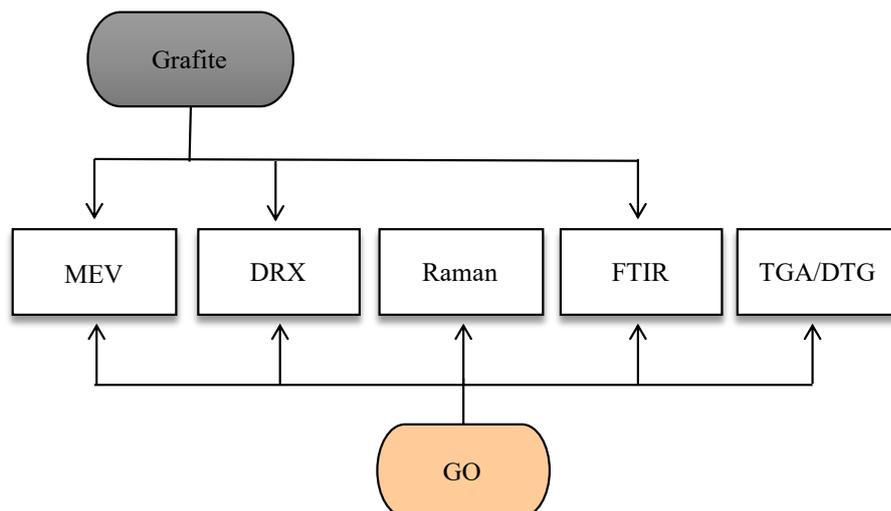


Figura 3.5 Caracterizações realizadas no grafite como recebido e nas dispersões de GO.

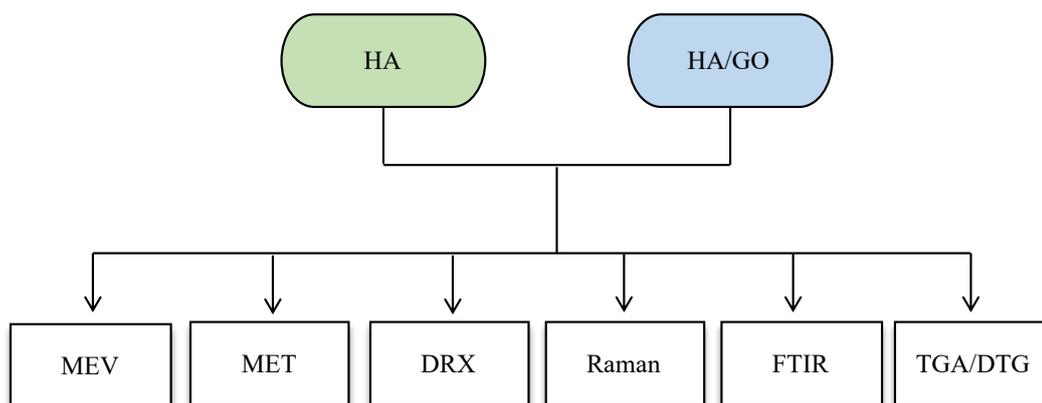


Figura 3.6 Caracterizações estruturais, morfológicas e físico-químicas realizadas nos pós de HA e HA - GO.

3.2.5.1 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) e Espectroscopia de Dispersão de Energia (EDS)

As análises morfológicas dos materiais investigados foram realizadas por meio de um microscópio eletrônico de varredura com fonte de emissão de campo (*Field Emission Gun*, MEV-FEG, da marca FEI e modelo: QUANTA FEG 250) no Instituto Militar de Engenharia (IME). Esse equipamento proporciona elevada resolução espacial quando comparado aos outros emissores termiônicos. Foram ainda realizadas análises de espectroscopia de raios X por dispersão de energia (EDS), identificando qualitativa e semi-quantitativamente a composição química do grafite como recebido. Os parâmetros utilizados para análise das amostras dos pós de HA e HA - GO foram: tensão de aceleração de 10 kV, abertura da lente 5, *spot size* de 3 e distância de trabalho de 3 mm, com o uso de elétrons secundários. As amostras foram recobertas

com platina por *sputtering* com o auxílio do equipamento de deposição de filme de alto vácuo (LEICA, EM ACE600) sob corrente de 35 mA.

Para as dispersões de GO, foi necessário preparar as amostras sobre o substrato de silício monocristalino. Devido à superfície hidrofóbica do substrato de silício foi necessário um ataque de hidrofilição. A preparação das amostras consiste na imersão dos substratos em solução contendo peróxido de hidrogênio (H_2O_2), hidróxido de amônio (NH_4OH) e água ultrapura (H_2O) na proporção 5:1:1 com a temperatura de 80 °C por um período de 10 min (KERN, 2018). As dispersões de GO foram diluídas em concentrações abaixo de 0,6 mg/ml e depositadas sobre o substrato de silício por *spin coating* (3000 rpm por 60 s). Os parâmetros utilizados foram: tensão de aceleração de 5 kV, abertura da lente 5, *spot size* de 4 e distância de trabalho de 5 mm, com o uso de elétrons secundários.

3.2.5.2 Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)

As análises por microscopia eletrônica de transmissão (MET) foram realizadas no Laboratório de Microscopia, o qual se encontra inserido na Faculdade de Odontologia de Piracicaba (FOP). As observações foram feitas no microscópio eletrônico de transmissão da marca JEOL, modelo JEM1400, operando com voltagem de aceleração de 120kV. A técnica possibilita a aquisição de imagens de alta resolução, permitindo a observação direta da microestrutura dos materiais.

A morfologia e o tamanho de partícula dos nanocompósitos nHA - GO e sHA - GO, na escala manométrica, foram avaliados. Para isso, as amostras nHA, nHA - GO, sHA e sHA - GO foram dispersas em álcool isopropílico a 1%, deixadas em repouso por 24 horas, e gotejadas 50 μ L em tela de cobre de 200 mesh, cobertos por película de filme de carbono.

3.2.5.3 Difração de raios X (DRX)

A obtenção dos difratogramas para identificação das fases foi realizada em um difratômetro da marca PANalytical, modelo X'Pert PRO no Departamento de Cristalografia da Companhia de Pesquisa de Recursos Minerais (CPRM) e no Centro Brasileiro de Pesquisas Físicas (CBPF). A varredura da HA e dos nanocompósitos HA - GO foram realizadas no intervalo angular de $10^\circ < 2\theta < 80^\circ$ e, para o grafite e as dispersões de GO, o intervalo angular de

varredura foi $5^\circ < 2\theta < 80^\circ$ e $5^\circ < 2\theta < 40^\circ$, respectivamente. Os parâmetros utilizados para análise foram: tempo por passo de 100 s, passo de coleta $0,02^\circ$, fenda incidente 1° e divergente $1/2$, com fonte de cobre ($\text{Cu K}\alpha \lambda = 1,54 \text{ \AA}$) e tensão e corrente de 40 kV e 40 mA. A identificação das fases dos materiais investigados neste trabalho foi realizada através do software X'Pert HighScore Plus da Panalytical.

Além disso, estimativas do valor da dimensão do cristalito foram obtidas ao utilizar o programa MAUD (*Material Analysis Using Diffraction*, versão 2.92), que compara os dados experimentais com os arquivos da base de dados cristalográficas (CIF). Os arquivos foram obtidos no site COD (*Crystallography Open Database*), e os indicadores estatísticos: GOF (*godness of fit*) e R_{wp} apresentaram a qualidade do refinamento, com os valores entre 1,3 e 1,7, e entre 10 e 20%, respectivamente.

Vale ressaltar que os cálculos de tamanho médio de cristalito utilizando padrões de difração de raios X podem não fornecer resultados precisos. Contudo, estes dados podem oferecer informações dos cristais, a respeito da ordem de grandeza, e a sua escala nanométrica.

3.2.5.4 Espectroscopia Raman

A espectroscopia Raman tornou-se uma das técnicas mais importantes para caracterização do grafeno e seus derivados. Trata-se de uma técnica não destrutiva capaz de identificar a impressão digital do material pela análise das bandas D e G, situadas em torno de 1360 e 1560 cm^{-1} , respectivamente (FERRARI, 2007). Além disso, a técnica possibilita avaliar a quantidade de camadas de grafeno, identificar subprodutos indesejados, defeitos estruturais, grupos funcionais e modificações químicas durante a produção do grafeno (FERRARI e BASKO, 2013).

As análises foram realizadas no Laboratório de Revestimentos Protetores e Materiais Nanoestruturados da Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro (PUC-Rio), utilizando espectrômetro NT-MDT NTEGRA com comprimento de onda de laser de 518 nm, faixa de varredura entre 500 e 3250 cm^{-1} e tempo de radiação de 100 s. Para identificação precisa da intensidade do picos presentes no espectro, foram realizadas a deconvolução dos modos vibracionais na região das bandas D e G, como também para a região 2D. Para o processamento dos dados das curvas deconvoluídas, foi utilizado o software FITYK (versão 1.3.1) com a função lorentziana (WOJDYR, 2010; KANIYOOR e RAMAPRABHU, 2012).

3.2.5.5 Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR)

A espectroscopia FTIR é uma técnica que se fundamenta nas mudanças de estados energéticos vibracionais e fornece evidências da presença de grupos funcionais na estrutura da amostra. Nesta técnica, a amostra é exposta à radiação infravermelha e é comparada com a radiação transmitida na sua ausência, registrada na forma de bandas de absorção. A absorção dessa radiação corresponde à frequência de vibrações das moléculas que compõem o material (THOMAS *et al.*, 2017).

As análises foram realizadas no Centro Brasileiro de Pesquisas Físicas (CBPF) pelo espectrofotômetro FT-IR Prestige-21 da Shimadzu, obtidos na faixa de número de ondas entre 4000 e 400 cm^{-1} e na resolução de 4 cm^{-1} . As amostras foram preparadas sob a forma de pastilhas transparentes com a razão 1:100, sendo este último a quantidade de KBr.

3.2.5.6 Análise Termogravimétrica (TGA) e sua Derivada (DTG)

A análise termogravimétrica envolve a variação da massa de amostras submetidas a uma programação controlada de temperatura, definida como um processo contínuo que é determinado em função da temperatura e/ou tempo. É uma técnica que proporciona o entendimento das alterações de massa de uma substância aquecida/resfriada, possibilitando conhecer a temperatura em que a amostra começa a decompor, oxidar, sofrer degradação, entre outros processos (LUCAS *et al.*, 2001).

As análises foram realizadas no laboratório de Recursos Analíticos e de Calibração (LRAC) na UNICAMP, através do analisador Termogravimétrico (modelo TGA/DSC1, METTLER TOLEDO) com balança microanalítica (modelo MX5, METTLER TOLEDO). As amostras foram adicionadas em um cadinho de alumina, utilizando atmosfera de nitrogênio com fluxo de 100 ml/min. A taxa de aquecimento foi de 10°C/min, com temperatura variando entre 25 a 1000 °C.

Para o GO, foi realizado um prévio processo de secagem por liofilização para eliminação da umidade na amostra. A análise térmica foi realizada para testar a estabilidade térmica das folhas de GO, separadamente, e nos nanocompósitos produzidos.

3.2.6 Caracterizações biológicas *in vitro*

Para os ensaios *in vitro*, as amostras produzidas pelas Rotas 1 e 2 foram prensadas uniaxialmente em prensa hidráulica (SSP - 10A Shimadzu) e conformadas em pastilhas de 10 mm de diâmetro, com massa de 150 mg, à 500 MPa, por 3 minutos.

Para este estudo, as amostras passaram pelo processo de esterilização em uma mistura de gás composta de 30% de óxido de etileno e 70% de dióxido de carbono, com exposição por 8 horas, 40°C e umidade relativa de 30 a 80%. Este processo ocorreu aplicando vácuo por 15 minutos, com posterior entrada da mistura do gás até a pressão de 0,5 kgf/cm². Ao término deste processo, as amostras foram aeradas por 10 min com ar filtrado.

3.2.6.1 Ensaios *in vitro* de Bioatividade

O teste de bioatividade *in vitro*, introduzido por KOKUBO *et al.* (1990), consiste na imersão do material em solução inorgânica, com concentração iônica semelhante à do plasma sanguíneo humano, conhecida como fluido corporal simulado (*Simulated Body Fluid* -SBF). A observação de modificação na morfologia e, mais especificamente, a presença de depósitos de apatita (*bone-like apatite*) na superfície do biomaterial é considerada um resultado positivo para a bioatividade da amostra testada. Atualmente, com o intuito de aproximar os resultados dos experimentos *in vitro* aos *in vivo*, estudos vem utilizando meios de cultivo celular, porém sem as células, para a avaliação do comportamento e bioatividade superficial dos biomateriais (LEE *et al.*, 2011).

O ensaio de bioatividade foi realizado em uma incubadora de CO₂ (PANASONIC, modelo COM-19AIC-PA) em temperatura de 37 °C e pressão de 5% CO₂, e as amostras foram imersas, separadamente, em 20ml de solução McCoy, em 3 diferentes tempos (3, 7 e 14 dias), avaliando a precipitação espontânea, ou não, de carbonato apatita sobre a superfície do biomaterial através da análise por MEV.

3.2.6.2 Ensaios *in vitro* de Citotoxicidade Indireta

Para o estudo biológico *in vitro*, foram realizados testes de citotoxicidade com células - tronco mesenquimais da polpa do dente em colaboração com a empresa de Centro de Processamento Celular – R-Crio Criogenia SA (Campinas, SP).

A análise de citotoxicidade indireta dos nanocompósitos nHA - GO foi realizada através do ensaio de conversão do sal brometo de 2- (4,5-dimetil-2-tiazolil)-3,5-difenil-2H-tetrazólio (MTT) (Sigma-Aldrich) em cristais de formazan. Para este estudo, extratos das amostras foram obtidos após a imersão das amostras em 2 mL de meio basal DMEM suplementado em períodos de 24 e 48 horas a 37 °C e 5% de CO₂. A análise foi realizada nesses extratos das amostras após imersão em meio de cultura basal DMEM (Sigma–Aldrich, Cat. D5523) suplementado com 10% v/v de soro fetal bovino (Sigma–Aldrich, Cat. F2561), 1% v/v de L-glutamina (Sigma–Aldrich, Cat. 59202C) e 1,1% v/v penicilina/estreptomicina (SIGMA–ALDRICH, Cat. P4333) durante 24 horas. Para isso, alíquotas de 200 µL de uma suspensão contendo 4x10⁴ células em meio DMEM suplementado foram inoculadas em placas de fundo chato de 96 poços e mantidas por 24 horas em incubadora (Panasonic, MCO-19AIC UV) a 37 °C e 5% de CO₂. Nesta etapa, foram adicionados 150 µL de dimetilsulfóxido (DMSO, Sigma–Aldrich) para a dissolução dos cristais. As placas foram incubadas em estufa (Tecnal) na temperatura de 37° C por 40 minutos. Após este período, os extratos foram transferidos para nova placa e as absorbâncias analisadas em espectrofotômetro (Promega, modelo Glomax E8032) a 560 nm.

Para o ensaio de citotoxicidade indireta dos nanocompósitos sHA - GO, seguiu-se a norma ISO 10993-5/2009, realizando-se o procedimento em duas etapas paralelas, inicialmente. Pesou-se o material esterilizado, adicionando-se em seguida meio de cultivo na proporção de 0,1 g de material por mililitro de meio (α -MEM suplementado com 10% v/v de soro fetal bovino e 1% v/v dos antibióticos penicilina/estreptomicina), incubando-se as amostras a 37 °C por 24 h. Simultaneamente, semeou-se as células-tronco mesenquimais em placas de 96 poços, na proporção de 4x10⁴ células/poço, adicionando-se 100 µL de meio de cultivo e incubando-as também por 24 h (37 °C, 5 % CO₂), até a obtenção de uma monocamada de células. Após este período, o meio de cultivo das células foi trocado por 100 µL do extrato do material, e mantido nas mesmas condições por 24 horas. Em seguida, para avaliar a atividade metabólica celular, trocou-se o extrato por 200 µL de solução de resazurina (Sigma-Aldrich) (0,5 mg/mL em PBS, diluída em meio de cultura padrão a 50 % v/v), que foi incubada com as células por 4 horas. A resazurina, de cor azul, é metabolizada pelas células e reduzida a resorufina, de cor rosa. Por

fim, retiraram-se alíquotas de 100 µL de cada poço, transferindo-os para outra placa de 96 poços, onde se realizou a análise de fluorescência (BiotekSynergy HT) com comprimentos de onda de 530 nm de excitação e 590 nm de emissão.

Para o controle positivo, a inoculação das células-tronco mesenquimais foi realizada diretamente nos poços. Para o controle negativo, as células não foram inoculadas, apenas os reagentes adicionados. A viabilidade celular (%) das amostras foram calculadas para normalização, conforme PARK e XIAN *et al.* (2015) avaliaram em seu estudo através da equação abaixo:

$$\% \text{ viabilidade celular} = \frac{\text{Absorbância das células da amostra} - \text{Controle Negativo}}{\text{Controle Positivo} - \text{Controle negativo}} \times 100 \quad \text{Equação 3.1}$$

3.2.6.3 Análise Estatística

Os valores relativos à intensidade da absorbância foram submetidos ao teste de normalidade de Shapiro-Wilk, os quais apresentaram-se com distribuição normal. Foi utilizado a Análise de variância de um fator (ANOVA *one-way*), para indicar possíveis diferenças entre os grupos, seguido do pós-teste de Tukey. Para esta análise, foi adotado o nível de significância $p < 0,05$.

A análise estatística foi realizada com o auxílio dos programas Microsoft Excel 2019 (Office 365, versão 16.30) e SPSS (IBM SPSS Statistic, versão 21).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste capítulo, serão apresentados os resultados e discussão das seguintes etapas de trabalho:

- Caracterização do grafite, como recebido, e do GO produzido;
- Produção e caracterização das amostras de nHA e nHA - GO;
- Produção e caracterização das amostras sHA e sHA - GO

4.1 CARACTERIZAÇÃO DO GRAFITE E DO ÓXIDO DE GRAFENO

4.1.1 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

A Figura 4.1 (a) e (b) apresenta, respectivamente, a análise morfológica superficial e a medição do tamanho dos flocos do grafite Graflake 99550 obtidas por MEV. O tamanho médio dos flocos medido foi de 734,9 μm , com desvio padrão igual à 214,45 μm . Este resultado valida o laudo descrito pelo fornecedor, que garante um tamanho médio dos flocos superior a 300 μm . O resultado por EDS (Figura 4.2) identificou apenas a presença de carbono e oxigênio, verificando a não existência de contaminações no material.

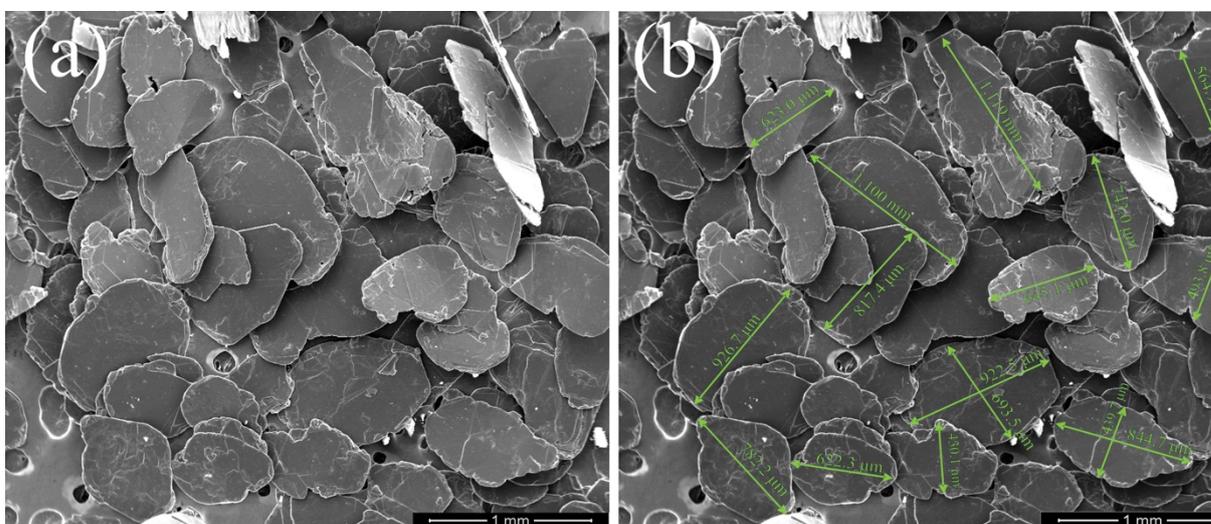


Figura 4.1 (a) Micrografia (MEV) da amostra de grafite Graflake 99550; e (b) medida do tamanho dos flocos. Ampliação de (a) e (b) 80x.

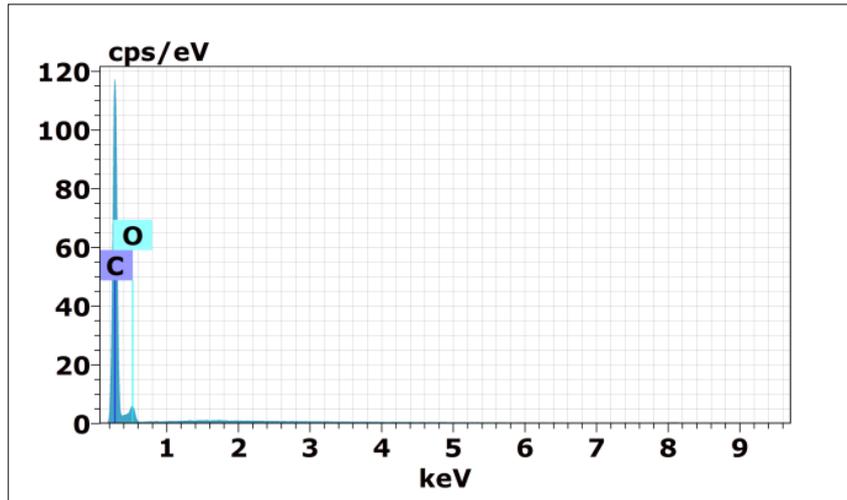


Figura 4.2 Espectro de EDS do grafite Graflake 99550.

A Figura 4.3 apresenta as imagens obtidas por MEV para avaliação morfológica das folhas de GO. A partir das imagens, pode-se observar a presença de folhas de óxido de grafeno sobrepostas e dobradas, com tamanhos variados, confirmando o sucesso no processo de esfoliação do grafite. Esta característica está de acordo com os resultados encontrados na literatura, que confirmam a flexibilidade das folhas de GO, através da evidência de dobras ao longo de toda a imagem (MARCANO *et al.*, 2010; FARIA *et al.*, 2017).

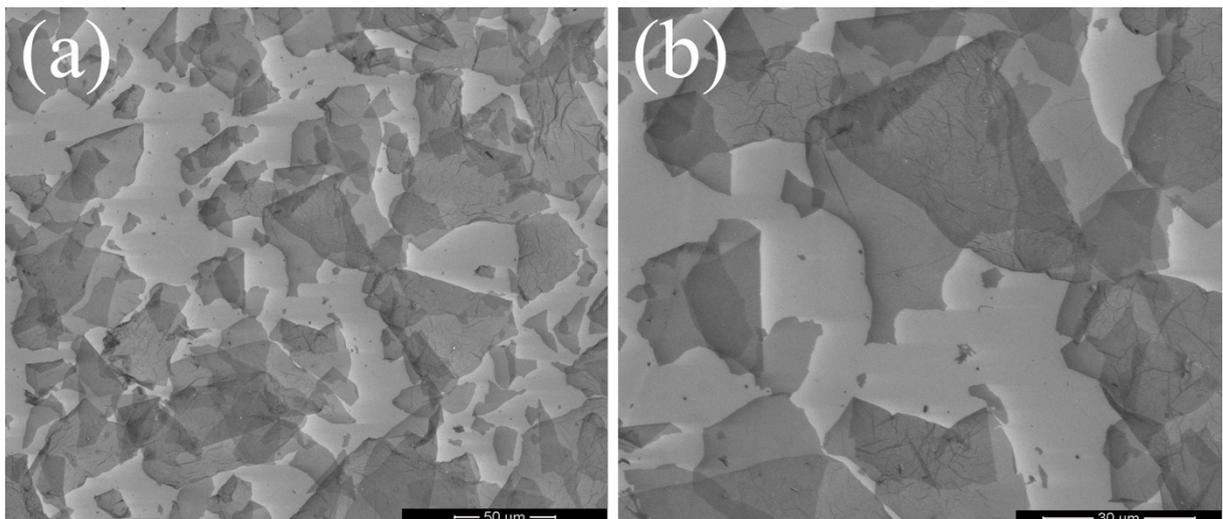


Figura 4.3 Eletromicrografia (MEV) da amostra de GO. Ampliação de (a) 1000x e (b) 2500x.

4.1.2 Difração de Raios X (DRX)

Os difratogramas do grafite e do GO obtidos por DRX estão representados na Figura 4.4. A posição e intensidade dos picos 26,6° e 54,8° observados no padrão difratométrico do grafite (Figura 4.4 (a)) podem ser atribuídos aos planos (002) e (004), indexados pela ficha JCPDS 00 - 023 - 0064, referentes a estrutura hexagonal do carbono. Além disso, nenhuma outra fase cristalina foi identificada, o que indica a alta pureza, concordando com o resultado por EDS (Figura 4.2). A Figura 4.4 (b) exhibe o difratograma do GO produzido, identificando um único pico de difração relacionado ao plano (002), para 2θ igual a 6,30°. A ausência do pico 26,6°, característico do grafite, confirma a completa oxidação obtida pela esfoliação em fase líquida por rota química.

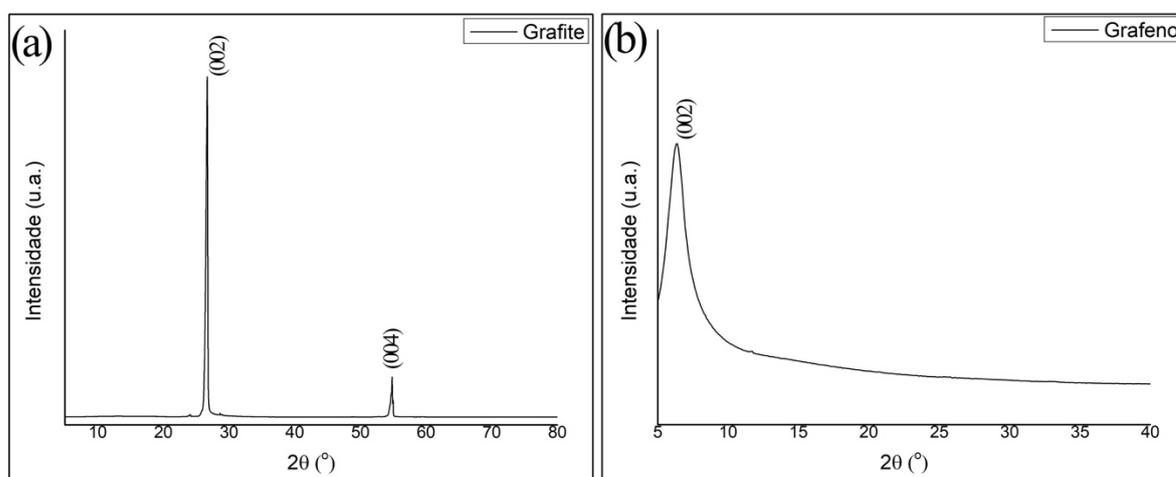


Figura 4.4 Difratograma do (a) grafite Graflake 99550 e (b) GO produzido pela esfoliação em fase líquida por rota química.

Através da análise por DRX, foi possível detectar a distância interplanar (Tabela 4.1) e o grau de esfoliação do GO por meio da equação de Bragg (Equação 4.1). O deslocamento do pico 26,6°, referente ao plano (002) do grafite, para 6,30° no GO, indica um aumento na distância interplanar (de até 4 vezes a distância original), devido à intercalação por grupos funcionais de oxigênio (PRUNA *et al.*, 2013).

$$d = \frac{n\lambda}{2 \sin \phi} \quad \text{Equação 4.1}$$

Tabela 4.1 Distância interplanar calculada pela equação de Bragg do grafite Graflake 99550 e do GO produzido pela esfoliação em fase líquida por rota química.

| Amostra | 2 θ (°) | Distância Interplanar (nm) |
|---------|----------------|----------------------------|
| Grafite | 26,6 | 0,335 |
| GO | 6,30 | 1,401 |

É importante ressaltar que o espaçamento interplanar pode variar pelo preparo da amostra para análise por DRX e/ou em função do grau de oxidação obtido durante o processo de esfoliação. Além disso, o padrão difratométrico do GO produzido neste estudo pode ser relacionado ao grafeno *multi* ou *few-layer*, em virtude do grafeno *monolayer* não apresentar picos de difração.

4.1.3 Espectroscopia Raman

As análises por Raman podem evidenciar a qualidade do GO produzido (Figura 4.5) pela presença das bandas D e G e, especialmente, pela relação de intensidade entre elas (I_D/I_G). Através do espectro Raman, observou-se os valores de deslocamento correspondentes da banda D, em $1355,37\text{ cm}^{-1}$, e banda G, em $1577,65\text{ cm}^{-1}$, que estão de acordo com os encontrados na literatura (FERRARI *et al.*, 2006; MARTINS FERREIRA *et al.*, 2010; MARCANO *et al.*, 2010; FERRARI e BASKO, 2013; DIMIEV e TOUR, 2014). Essas duas bandas representam a impressão digital do grafeno. Enquanto a banda D do espectro está associada a natureza defeituosa e desordenada das folhas de grafeno (presença de domínios sp^3), a banda G está associada ao carbono grafítico, sendo uma das bandas da estrutura do grafeno (FERRARI e BASKO, 2013; RAJAGOPALAN e CHUNG, 2014). Estudos indicam que a banda G se torna mais intensa com o aumento do número de camadas de grafeno (SHEN e LUA, 2013). Como observado neste trabalho, a maior intensidade da banda D confirma os defeitos da rede no plano basal do grafeno, originados pela produção via esfoliação em fase líquida pela rota química ($I_D/I_G = 1,40$). Este resultado está de acordo com os encontrados na literatura (MUZYKA *et al.*, 2018).

A partir de uma análise criteriosa dos espectros Raman, foi possível obter informações relevantes das bandas D e G. Por exemplo, após a deconvolução, utilizando o ajuste Lorentziano destas bandas, um total de quatro picos constituintes foram obtidos, sendo eles: D, G, D** e D' (Figura 4.5(b)) posicionados em: $1355,37$, $1577,65$, $1522,11$ e $1607,05\text{ cm}^{-1}$, respectivamente.

Com isso, foi possível observar que a aparente maior intensidade da banda G (FIG. 4.5(a)) está relacionada a presença da banda D', que ocorre em função do GO produzido ser composto por uma estrutura altamente defeituosa (KANIYOOR e RAMAPRABHU, 2012). Já, o pico D**, possui a sua origem nas vibrações de C-H em carbonos hidrogenados (MERLEN *et al.*, 2017). Neste trabalho, os valores para o coeficiente de determinação (R^2) foi de 0,9946 para o GO, demonstrando a alta qualidade do ajuste.

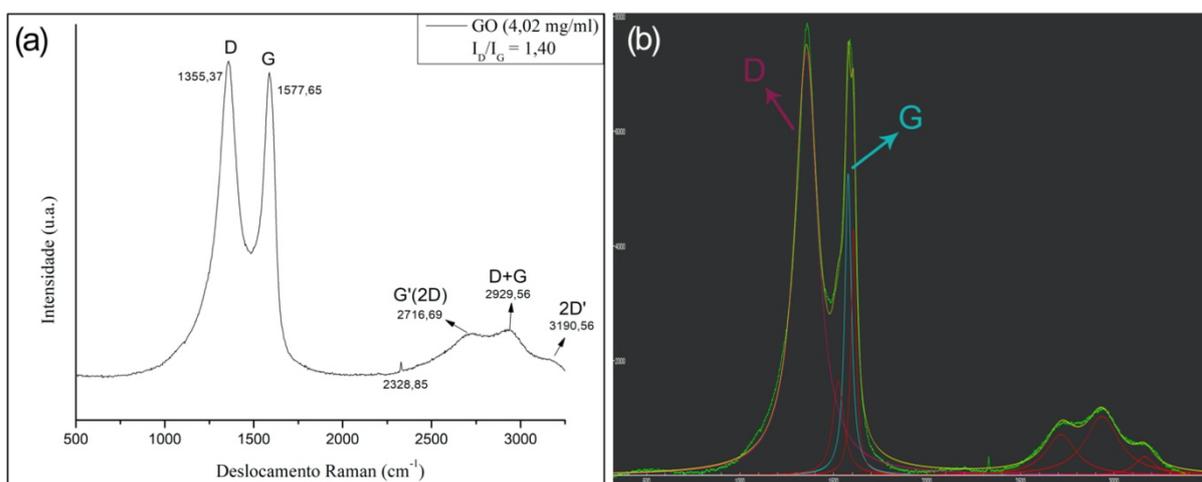


Figura 4.5 (a) Espectro Raman evidenciando as bandas características do GO; (b) espectro Raman do GO após a deconvolução das bandas características.

A literatura indica que bandas adicionais podem ser visíveis também na região da banda G' (2D) do espectro Raman (KANIYOOR e RAMAPRABHU; 2012; MUZYKA *et al.*, 2018). Após a deconvolução pelo ajuste Lorentziano, três bandas nesta região foram identificadas: G', D+G e 2D'. O surgimento da banda G' ($2716,69 \text{ cm}^{-1}$) está relacionado com a organização estrutural (impressão digital) de materiais cristalinos à base de carbono, sendo considerada uma banda de segunda ordem. Em contrapartida, o aparecimento desta banda não tem relação com a presença de defeitos, diferentemente do que foi reportado para a banda D (MATOS, 2015). Além disso, a razão de intensidade relativa $I_{G'}/I_G$ pode ser usada para distinguir o número de camadas de folhas de grafeno, onde: $I_{G'}/I_G > 2$ corresponde ao grafeno *single layer*; entre 1-2, como *double layer*; e < 1 , *multi layer* (SHEN e LUA, 2013). No presente trabalho, a razão $I_{G'}/I_G$ foi igual a 0,07, que confere características do grafeno *multi layer*. Estes valores corroboram com os resultados por DRX apresentados na análise do GO deste trabalho.

Outra região localizada em $3190,56 \text{ cm}^{-1}$ pode ser atribuída à banda 2D'. No trabalho de KANIYOOR e RAMAPRABHU (2012), os autores relatam o surgimento desta banda em amostras de grafite, porém, de baixa intensidade. Além disso, CANÇADO *et al.* (2011) afirmam

que não são necessários defeitos para a sua ativação. Portanto, esta banda 2D' pode estar associada ao carbono grafítico; ao contrário da banda D+G ($2929,56\text{ cm}^{-1}$), relacionada aos defeitos estruturais presentes na amostra (sobretudo da banda D) (KANIYOOR e RAMAPRABHU; 2012). Segundo DIMIEV e TOUR (2014), a evidência das bandas G' e D+G, apresentando alta amplitude e baixa intensidade, é típica para o GO.

Além disso, o pico em $2328,85\text{ cm}^{-1}$ está relacionado ao silício, material utilizado como substrato para a análise.

4.1.4 Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR)

Na Figura 4.6, são apresentados os espectros de FTIR das amostras de grafite e GO. Na Figura 4.6 (a), o espectro de FTIR do grafite não exibe bandas significativas ou relevantes para quaisquer grupos funcionais. No entanto, bandas atribuídas a moléculas de água adsorvidas podem ser observadas em $3000\text{-}4000\text{ cm}^{-1}$ e 1631 cm^{-1} . Estudos indicam que, durante o processo de esfoliação do grafite por rota química, algumas bandas podem aparecer devido à intercalação de alguns reagentes utilizados no processo como, por exemplo: ácido sulfúrico, ácido nítrico e ácido fórmico (LEE *et al.*, 2010).

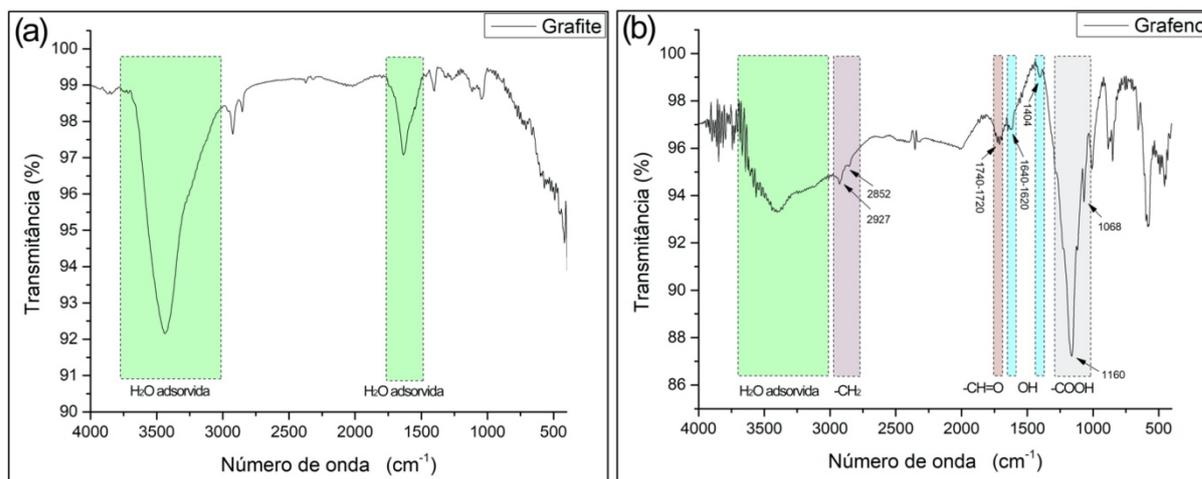


Figura 4.6 Espectro FTIR das amostras de (a) grafite e (b) GO.

O GO produzido é um material quimicamente funcionalizado pela introdução de grupos funcionais (contendo oxigênio), podendo ser composto por carbonos sp^3 -hibridizados (com grupos funcionais hidroxila e éter/epoxi dispostos em ambos os lados das superfícies) e carbonos sp^2 -hibridizados (com grupos funcionais carbonila e carboxila tanto nas superfícies

quanto nas bordas). O espectro do GO, observado na Figura 4.6 (b), apresenta bandas características para ligações de CO em 1160 cm^{-1} e 1068 cm^{-1} (dos grupos carboxila). A presença de grupos carboxila na superfície das folhas de grafeno é confirmada pelo alongamento do modo de vibração do grupo carbonila a 1740–1720 cm^{-1} .

A banda larga entre 3500-3000 cm^{-1} está relacionada aos modos de estiramento da ligação - OH, devido à presença de água adsorvida em sua superfície. Além disso, os grupos hidroxila são definidos pelo modo de flexão entre 1640-1620 cm^{-1} e 1404 cm^{-1} . As bandas em 2927 e 2852 cm^{-1} correspondem, respectivamente, aos estiramentos antissimétrico e simétrico dos grupamentos - CH₂. O processo de oxidação foi confirmado pela presença das bandas de C = O e pelo decréscimo na intensidade das bandas O - O, a partir das ligações de OH - OH ou O - O - C, como observado em outros estudos (ȚUCUREANU *et al.*, 2016).

As bandas do espectro FTIR observados para o GO estão listados na Tabela 4.2. Geralmente, nos espectros FTIR de grafeno, a interpretação das bandas que aparecem em intervalos abaixo de 900 cm^{-1} não são atribuídas devido à complexidade estrutural (LEE *et al.*, 2010).

Tabela 4.2 Banda do espectro FTIR observados para o GO.

| Banda (cm^{-1}) | Descrição |
|----------------------------|---|
| 3500-3000 | Modo de estiramento da ligação –OH devido à presença de água adsorvida em sua superfície (ligação OH) |
| 2927 | Modo de alongamento antissimétrico do grupo – CH ₂ (ligação C –H) |
| 2852 | Modo de alongamento simétrico do grupo –CH ₂ (ligação C – H) |
| 1740–1720 | Modo de vibração do grupo carbonila – CH = O (ligação C = O) |
| 1640-1620; 1404 | Modo de flexão do grupo hidroxila OH (ligação O – H) |
| 1160; 1068 | Modo de alongamento simétrico do grupo – COOH (ligação C – O) |

4.1.5 Análise Termogravimétrica (TGA) e a sua Derivada (DTG)

As curvas termogravimétricas do GO são apresentadas na Figura 4.7, mostrando que a decomposição do GO ocorre em diferentes estágios. A primeira perda de 27% ocorre até 132°C,

que se refere às moléculas de água adsorvidas e à liberação dos grupos OH superficiais no GO (EQTESADIA *et al.*, 2017; RODRÍGUEZ-GONZÁLEZ *et al.*, 2014). A decomposição térmica dos grupos funcionais contendo oxigênio instável mostrou uma perda de massa de, aproximadamente, 28%, e ocorreu até a temperatura de 145°C (RAUCCI *et al.*, 2017; LI *et al.*, 2013). Entre 145 e 335 °C, grupos hidroxilas ligados às folhas de GO e os grupos funcionais mais estáveis do carbono são removidos, apresentando uma perda de 17% (MARCANO *et al.*, 2010; MOHANDES e SALAVATI-NIASARI, 2014). Ao final, a massa residual encontrada para o GO fabricado foi de 16,44% à 1000°C.

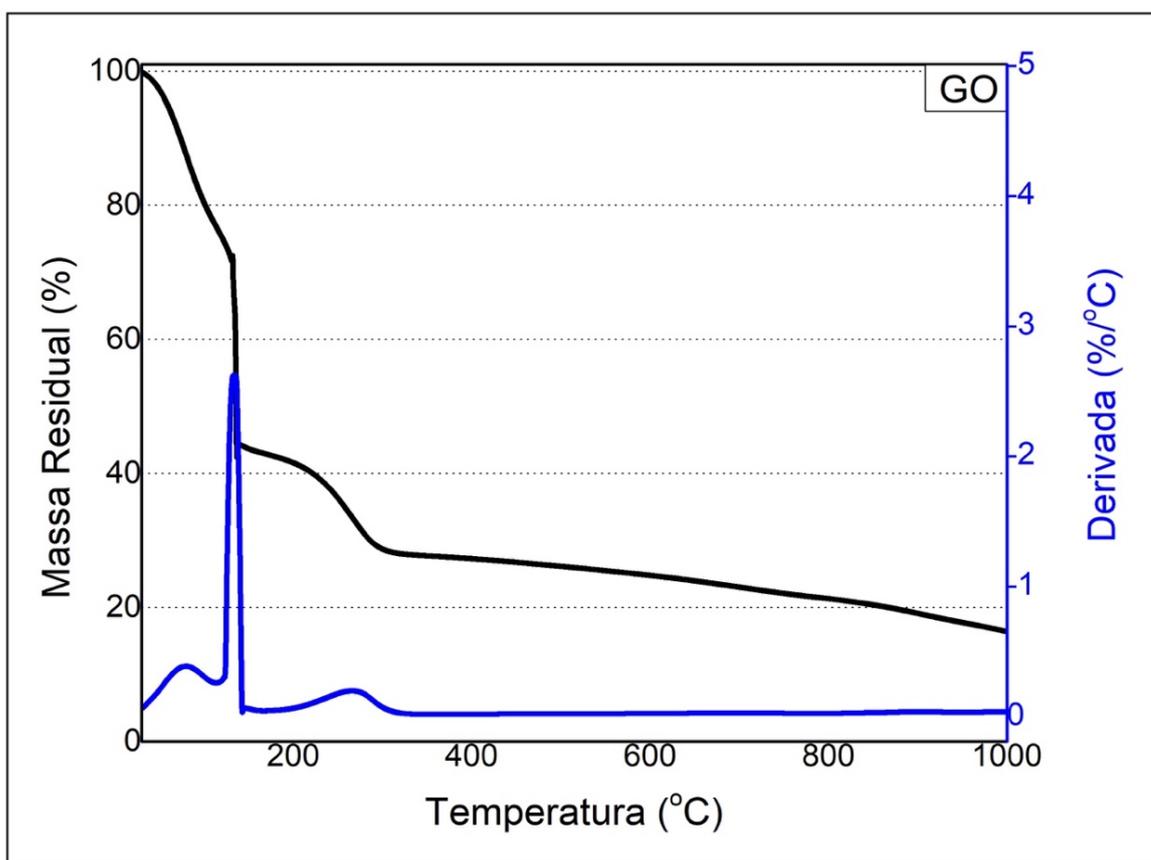


Figura 4.7 Análise termogravimétrica (TGA) e a sua derivada (DTG) do GO produzido.

4.2 CARACTERIZAÇÃO DOS NANOCOMPÓSITOS nHA-GO

4.2.1 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

A Figura 4.8 apresenta as micrografias das amostras de nHA e nHA - GO produzidas, contendo 0,5%, 1,0% e 1,5%, em peso de GO. A análise dos pós da nHA revelou uma microestrutura homogênea formada por finas partículas, de morfologia agulhada, com tamanho inferior a 500 nm. Para os pós dos nanocompósitos nHA - GO produzidos, é possível identificar as nanopartículas de HA aderidas à superfície das folhas de GO. Além disso, na superfície das folhas de GO, pode-se observar a forte afinidade entre a HA e o GO. Assim, como no trabalho de LEE *et al.* (2015), essa forte interação pode ser atribuída à ligação de hidrogênio entre os grupos hidroxila da HA e os grupos funcionais do GO, como grupos carboxila, hidroxila, carbonila e epóxi.

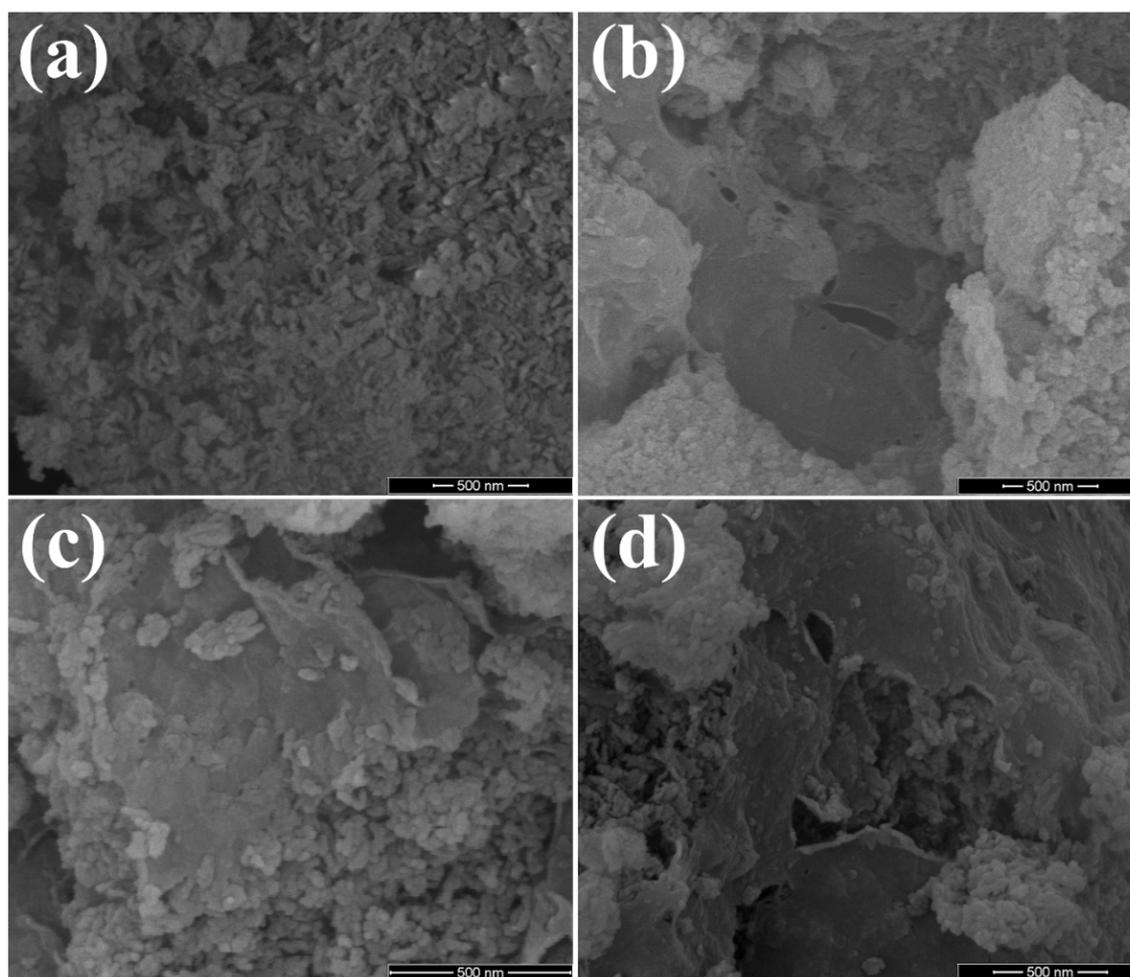


Figura 4.8 Micrografia (MEV) dos pós de nanocompósitos (a) nHA, (b) nHA - GO 0,5%, (c) nHA - GO 1,0% e (d) nHA - GO 1,5%. Ampliação de 100.000x.

O aumento da adição de 0,5% para 1,5%, em peso de GO resultou na maior presença da HA na superfície do GO. Contudo, mesmo com o aumento gradativo, aglomeração das folhas de GO não foi observada. Neste estudo, as folhas de GO estão homogeneamente dispostas, em relação as nanopartículas de HA, em toda a extensão da superfície analisada por MEV.

4.2.2 Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)

A morfologia das amostras nHA, nHA - GO 0,5%, nHA - GO 1,0% e nHA - GO 1,5% são apresentadas na Figura 4.9. Para a nHA (Figura 4.9(a)), observou-se partículas aglomeradas com aspecto semelhante a agulha. As partículas finas, particularmente em escala nanométrica, apresentam elevada área superficial e, conseqüentemente, podem aglomerar, formando partículas secundárias. PAZ *et al.* (2012) demonstraram que a morfologia e a cristalinidade são fortemente dependentes do método de síntese adotado e do tempo de crescimento das nanopartículas. No estudo de PAZ *et al.* (2012), as partículas obtidas pelo método de precipitação em meio aquoso resultaram em nanopartículas na forma de agulha e com um tamanho de partícula de, aproximadamente, 62nm. Estes resultados são similares aos obtidos na produção da nHA do presente trabalho.

A microestrutura dos nanocompósitos nHA - GO revelou uma deposição e distribuição das nanopartículas de HA sobre a folha transparente de GO. Além disso, pode-se observar na região transparente da folha de GO, o aspecto enrugado ou amassado na forma de onda, o que demonstra ser característica da existência de folhas de GO de camada única. Assim como relatado no trabalho de NEELGUND *et al.* (2013), as folhas de GO foram recobertas com eficiência pelas nanopartículas de HA, comprovando a forte interação entre a HA e o GO. De modo similar, MOHANDÉS e SALAVATI-NIASARI (2014) afirmaram que a deposição e distribuição das nanopartículas de HA ocorreu por toda a extensão das folhas de GO. Estes resultados estão de acordo com os obtidos por MEV, que mostrou uma distribuição homogênea das nanopartículas de HA na superfície do GO, indicando que a abordagem adotada neste trabalho se trata de um método eficaz para formar materiais compósitos nanoestruturados à base de grafeno.

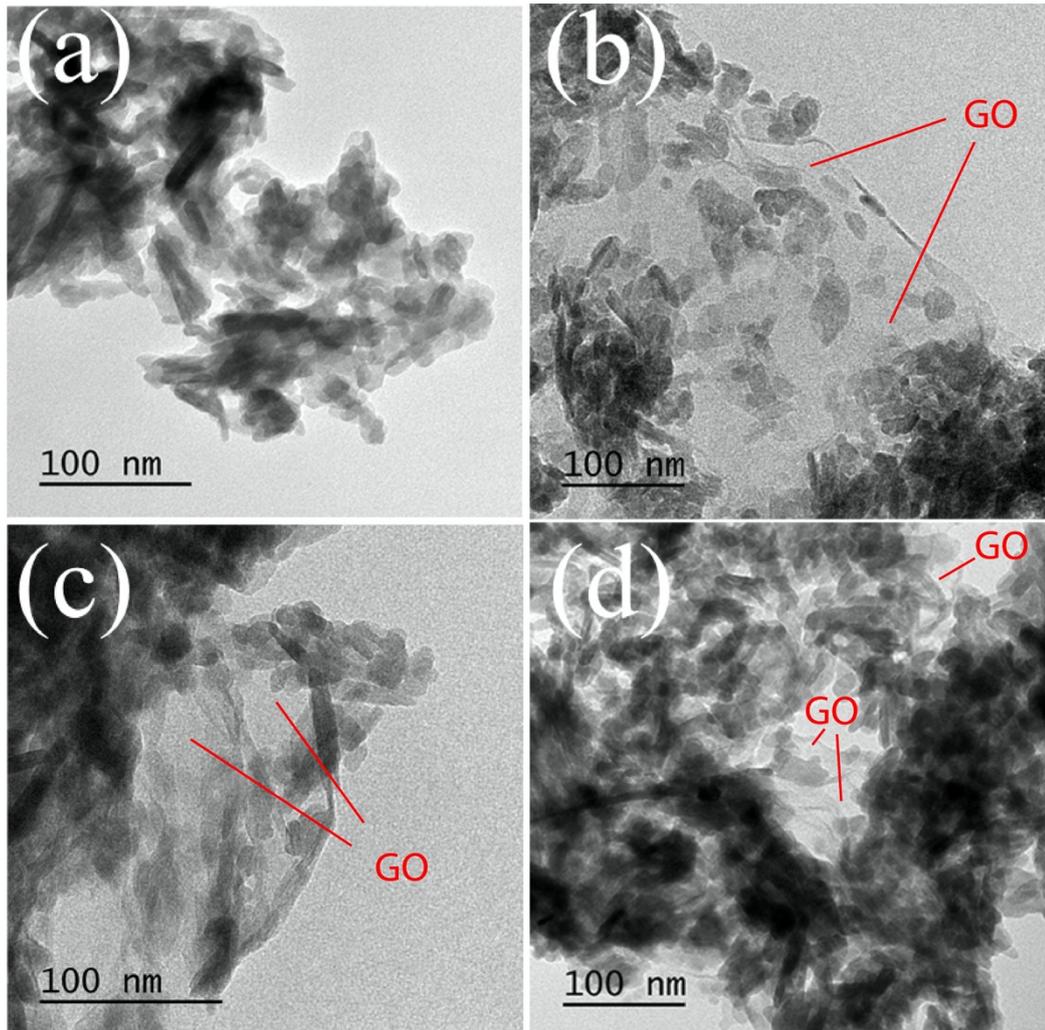


Figura 4.9 Micrografia (MET) dos pós de nanocompósitos (a) nHA, (b) nHA - GO 0,5%, (c) nHA - GO 1,0% e (d) nHA - GO 1,5%.

4.2.3 Difração de Raios X (DRX)

A Figura 4.10 apresenta o difratograma das amostras de nHA, nHA - GO 0,5%, nHA - GO 1,0% e nHA - GO 1,5% obtidas por DRX. Para a amostra nHA, o perfil difratométrico demonstrou um padrão característico da fase hidroxiapatita pouco cristalina e/ou nanométrica, com picos pouco definidos e bandas alargadas. Segundo LEGEROS (2008), esta característica é compatível com o padrão da fase mineral do osso humano, identificando o padrão de difração de raios X correspondente às apatitas minerais. Os picos de difração dos planos cristalinos correspondem a estrutura da HA, e foram indexados pela ficha JCPDS 01 - 089 - 4405.

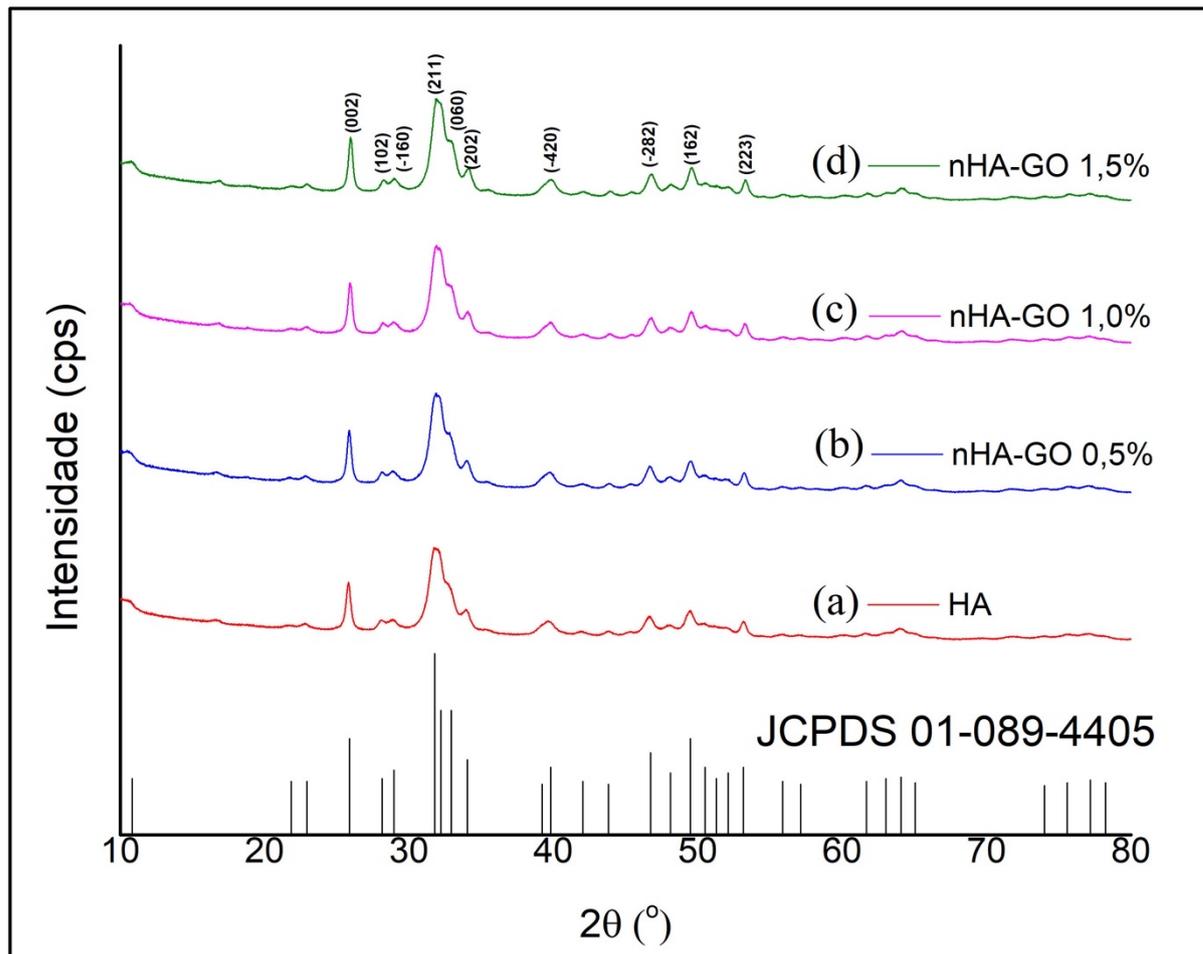


Figura 4.10 Difratoograma dos pós de (a) nHA, (b) nHA - GO 0,5%, (c) nHA - GO 1,0% e (d) nHA - GO 1,5%.

Para as amostras dos pós de nanocompósitos nHA - GO, não foram identificados picos de difração característicos do GO em nenhuma das composições investigadas neste trabalho dentro do intervalo angular de $10^\circ < 2\theta < 80^\circ$. Este resultado indica alta homogeneidade do GO na nHA, como observado por MEV. Além disso, a identificação dos planos cristalinos somente da fase nHA indica alta estabilidade química da matriz de HA e o GO. Uma possível limitação da técnica pode estar relacionada com as poucas camadas do GO produzido, o que foi comprovado pela análise por DRX (Figura 4.4(b)), uma vez que o grafeno *multi* ou *few-layer* apresenta o seu pico, pouco definido, em $6,3^\circ$. Além do mais, este pico de $6,3^\circ$, encontra-se fora da faixa de varredura utilizada para os nanocompósitos neste trabalho.

Utilizando o software MAUD, realizou-se a estimativa do tamanho médio de cristalito para a amostra nHA, que correspondeu ao valor de 11,23 nm (Tabela 4.3). Para as amostras nHA - GO, o tamanho médio de cristalito encontrado variou entre 12,86 - 13,27 nm. Os resultados apresentaram um aumento do tamanho médio de cristalito, de acordo com o aumento

na concentração, em peso do GO na HA. Portanto, a partir do perfil difratométrico, a nanocrystalinidade de todos os materiais produzidos por esta rota foi comprovada.

Tabela 4.3 Tamanho médio de cristalito para as amostras nHA - GO

| Descrição | MAUD (nm) |
|---------------|-----------|
| nHA | 11,23 |
| nHA - GO 0,5% | 12,86 |
| nHA - GO 1,0% | 12,62 |
| nHA - GO 1,5% | 13,27 |

4.2.4 Espectroscopia Raman

As análises por Espectroscopia Raman das amostras de nHA, nHA - GO 0,5%, nHA - GO 1,0% e nHA - GO 1,5% são mostradas na Figura 4.11. A partir do espectro Raman, foi verificada uma banda muito característica em $962,61\text{ cm}^{-1}$, para a amostra de nHA, que corresponde ao modo simétrico do grupo PO_4 tetraédrico (ligação P - O). Foram observadas outras duas bandas, em $1048,93\text{ cm}^{-1}$, atribuídas ao alongamento antissimétrico do grupo PO_4 (ligação P - O). Além disso, outras duas bandas observadas, em $590,08\text{ cm}^{-1}$ e $440,43\text{ cm}^{-1}$, são relacionadas ao modo de flexão triplamente e duplamente degenerada do grupo PO_4 (ligação O - P - O), respectivamente. Todas estas bandas identificadas foram também atribuídas aos modos vibracionais do grupo fosfato em outros trabalhos e podem ser observadas na Tabela 4.4 (KOUTSOPOULOS, 2002; YILMAZ e EVIS, 2014; NOSENKO *et al.*, 2016).

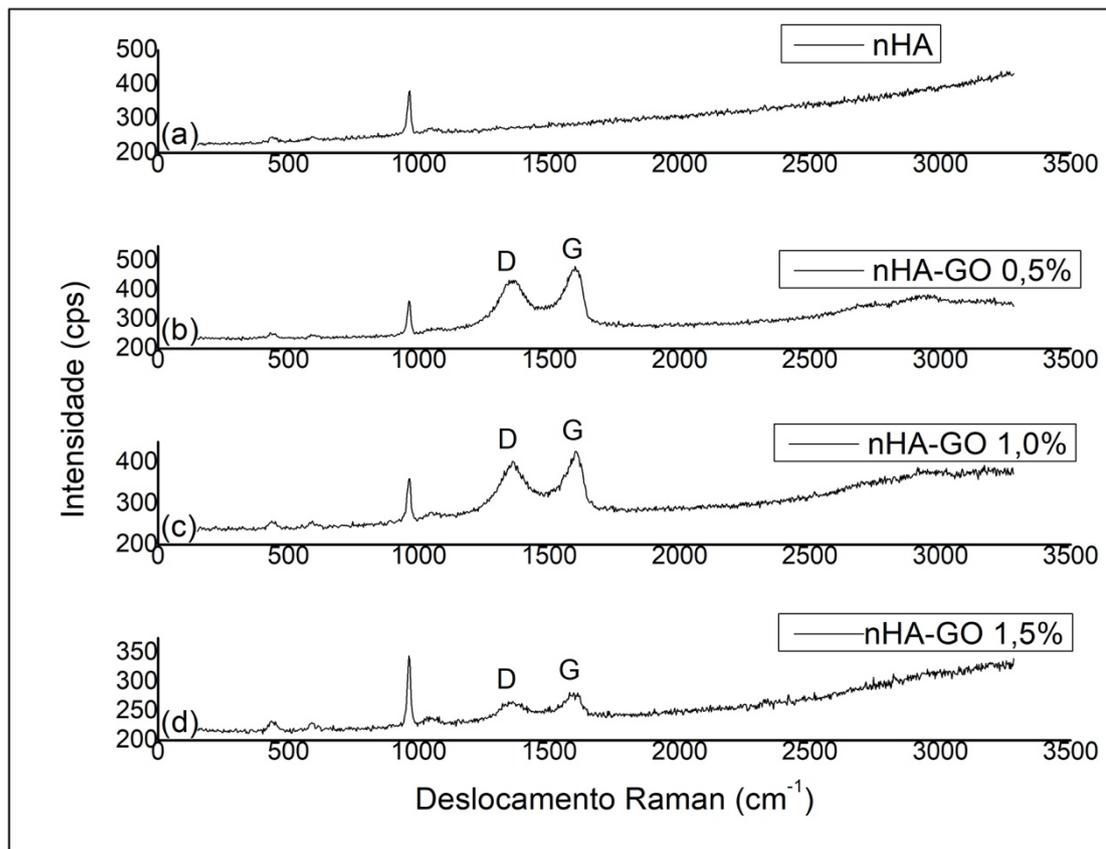


Figura 4.11 Espectro Raman das bandas características da (a) nHA, (b) nHA - GO 0,5%, (c) nHA - GO 1,0% e (d) nHA - GO 1,5%.

Tabela 4.4 Bandas relacionadas à hidroxiapatita observadas no espectro Raman das amostras nHA, nHA - GO 0,5%, nHA - GO 1,0% e nHA - GO 1,5%

| Banda (cm ⁻¹) | Descrição |
|---------------------------|---|
| 962,61 | Modo de alongamento simétrico do grupo PO ₄ tetraédrico (ligação P - O). |
| 1048,93 | Modo triplo de alongamento assimétrico degenerado do grupo PO ₄ grupo (ligação P - O). |
| 590,08 | Modo de flexão triplamente degenerada do grupo PO ₄ (ligação O - P - O) |
| 440,43 | Modo de flexão duplamente degenerada do grupo PO ₄ (ligação O - P - O) |

Para as amostras de nHA - GO, a banda característica da HA não sofreu alteração, mantendo a sua localização em, aproximadamente, 962 cm⁻¹. Após a deconvolução, utilizando ajuste Lorentziano, os quatro picos típicos do GO foram observados: D, G, D** e D'. Como mostrado na Figura 4.11 (b-d), as bandas D e G, respectivamente, sofreram alteração no deslocamento Raman nos nanocompósitos de nHA - GO para: 1358,51 e 1586,50 cm⁻¹

(nHA - GO 0,5%); 1359,80 e 1601,45 cm^{-1} (nHA - GO 1,0%); e, 1354,46 e 1581,90 cm^{-1} (nHA -GO 1,5%).

A relação I_D/I_G foi determinada para avaliar a densidade de defeitos presentes no nanocompósito, sendo elas: 1,17, 1,14 e 1,02, para o nHA - GO contendo 0,5%, 1,0% e 1,5%, respectivamente. Nota-se que, o aumento da adição de 0,5% para 1,5%, em peso de GO, levou à variação nas intensidades das bandas D e G e nos valores de deslocamento no espectro Raman (Tabela 4.5). Além disso, a razão de intensidade relativa I_D/I_G do nanocompósito nHA - GO foi menor ao comparar com o GO ($I_D/I_G=1,40$). Da mesma forma, RODRÍGUEZ-GONZÁLEZ *et al.* (2014) e BARADARAN *et al.* (2014) observaram, em seus respectivos estudos, a redução da razão de intensidade relativa I_D/I_G . Acredita-se que a variação nos valores das bandas D e G nos nanocompósitos, bem como a menor razão I_D/I_G , implicam em uma possível transformação estrutural (remoção de defeitos estruturais) no GO após a sua interação com as partículas nanométricas de HA, como foi relatado por GONG *et al.* (2018) e NEELGUND *et al.* (2013).

Vale ressaltar que, os valores para o coeficiente de determinação (R^2) dos nanocompósitos ficaram na faixa entre 0,961-0,986, o que demonstra a alta qualidade do ajuste. O posicionamento das bandas D e G no espectro Raman e a relação I_D/I_G , para o GO e para os nanocompósitos nHA - GO, estão listados na Tabela 4.5.

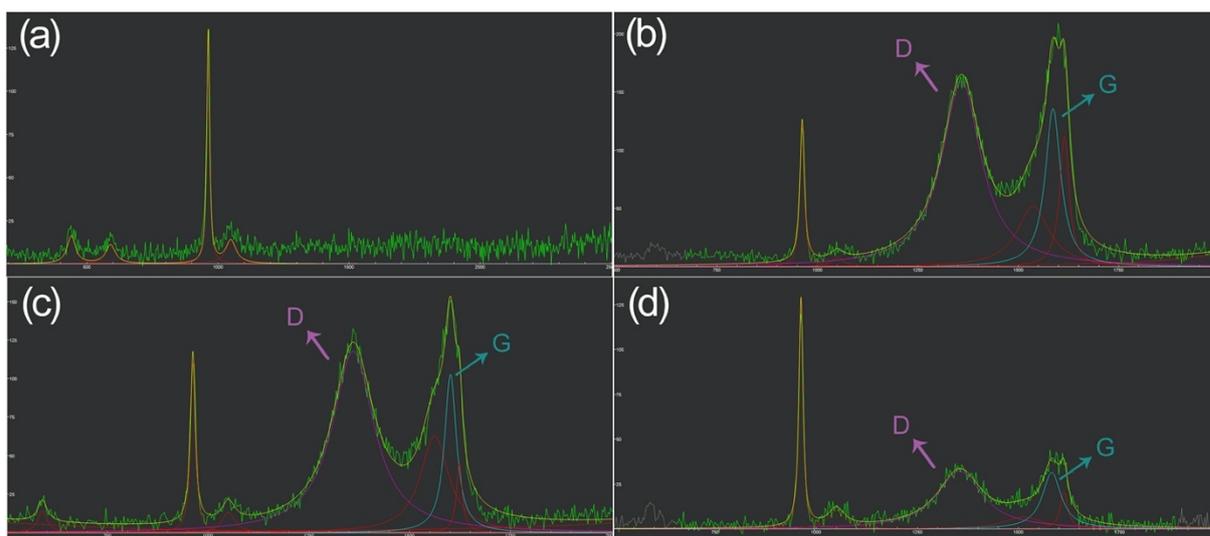


Figura 4.12 Espectro Raman após a deconvolução das bandas características da (a) nHA, (b) nHA - GO 0,5%, (c) nHA - GO 1,0% e (d) nHA - GO 1,5% através do programa Fityk.

Tabela 4.5 Posicionamento das bandas D e G no espectro Raman e a relação I_D/I_G observados para o GO e para os nanocompósitos nHA - GO.

| Amostra | Banda D | Banda G | I_D/I_G |
|----------------|----------------|----------------|-----------------------------|
| GO | 1355,37 | 1577,65 | 1,40 |
| nHA - GO 0,5% | 1358,51 | 1586,50 | 1,17 |
| nHA - GO 1,0%, | 1359,80 | 1601,45 | 1,14 |
| nHA - GO 1,5%, | 1354,46 | 1581,90 | 1,02 |

4.2.5 Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR)

A Figura 4.13(a) representa os espectros FTIR das amostras de nHA, nHA - GO 0,5%, nHA - GO 1,0% e nHA - GO 1,5%. O espectro da amostra nHA demonstrou as bandas de absorção características da HA, fosfatos e hidroxila, além dos grupos carbonatos. A banda larga entre $3750-2500\text{ cm}^{-1}$ pode ser atribuída à água adsorvida na nHA, enquanto que a banda em 1645 cm^{-1} é característica do modo vibracional em torno do O - H - O (Tabela 4.6). A banda característica da HA, devido ao modo de vibração de estiramento simétrico da hidroxila, foi encontrada em 3568 cm^{-1} . Normalmente, durante o processo de síntese em meio aquoso, bandas de carbonato (CO_3^{2-}) podem substituir os sítios aniônicos presentes na estrutura da HA, como foi observado em 876 , 1456 e 1417 cm^{-1} . É de conhecimento na literatura que o íon carbonato pode substituir tanto o grupo hidroxila (substituição do tipo A) quanto o grupo fosfato (substituição do tipo B), resultando nas bandas características encontradas neste trabalho. Ainda no espectro de infravermelho da amostra nHA, foi possível observar as bandas bem definidas em 1091 cm^{-1} , 1034 cm^{-1} e 962 cm^{-1} atribuídas ao alongamento e flexão do grupo PO_4^{3-} , bem como as bandas 603 e 567 cm^{-1} correspondentes à deformação assimétrica deste mesmo grupo (BERZINA-CIMDINA e BORODAJENKO, 2012).

Em relação aos espectros por FTIR dos nanocompósitos nHA - GO (Figura 4.13(b-d)) foi observado que, devido ao aumento da adição de 0,5% para 1,5%, em peso de GO no nanocompósito nHA - GO ocorreu um aumento na banda atribuída à água adsorvida, já que o GO é um material higroscópico. Além disso, a ausência da banda de absorção em $1720 - 1740\text{ cm}^{-1}$, relacionada aos grupos carbonila do GO, indica a influência das nanopartículas de HA na superfície das folhas de GO (GONG *et al.*, 2018). Este resultado

confirma a forte interação entre a HA e o GO, observada por MEV e MET, possivelmente, pela ligação da hidroxila da HA com o grupo funcional superficial do GO.

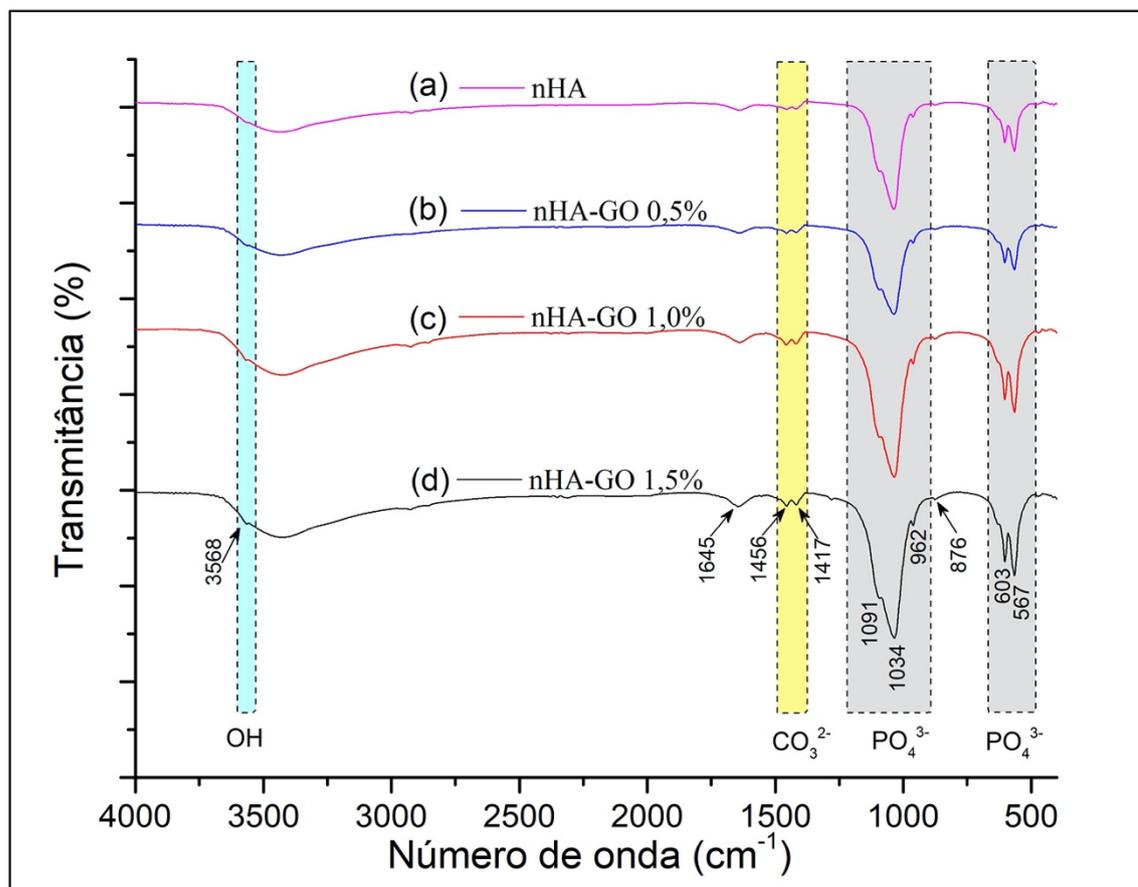


Figura 4.13 Espectros FTIR característicos da (a) nHA, (b) nHA - GO 0,5%, (c) nHA - GO 1,0% e (d) nHA - GO 1,5%.

Tabela 4.6 Banda do espectro FTIR observados para a nHA e os nanocompósitos nHA - GO.

| Banda (cm ⁻¹) | Descrição |
|---------------------------|---|
| 3750-2500 | H ₂ O adsorvida na superfície |
| 3568 | Modo de estiramento da ligação -OH |
| 1645 | Modo vibracional em torno do O-H-O |
| 876, 1456 e 1417 | Bandas CO ₃ ²⁻ substitutas do íon fosfato |
| 1091; 1034; 962 | Modo de flexão do grupo PO ₄ ³⁻ |
| 603, 567 | Modo de deformação assimétrica do grupo PO ₄ ³⁻ |

4.2.6 Análise Termogravimétrica (TGA) e a sua Derivada (DTG)

A análise termogravimétrica das amostras nHA, nHA - GO 0,5%, nHA - GO 1,0% e nHA - GO 1,5% são apresentadas na Figura 4.14. Para a amostra nHA (Figura 4.14 (a)), a HA apresentou um comportamento gradual de perda de massa durante o processo de aquecimento da temperatura ambiente até 1000°C, demonstrando alta estabilidade térmica dos pós. Como observado na literatura, a perda de massa de 6% ocorreu abaixo de 150 °C, que corresponde à evaporação das moléculas de água adsorvidas na superfície da HA. Com o aumento da temperatura de 150 °C até, aproximadamente, 700 °C, a literatura indica uma perda irreversível de água estrutural (entre 200 e 400 °C) e um processo de cristalização da HA durante a sua calcinação (LIAO *et al.*, 1999; TONSUAADU *et al.*, 2011). Neste trabalho, não foi verificado nenhum estágio de perda de massa até 1000 °C, relacionado à decomposição da HA, o que confirma a alta estabilidade dos pós produzidos (MOBASHERPOUR *et al.*, 2007; HUANG *et al.*, 2010). Para as amostras nHA - GO, a Figura 4.14 (b-d) apresenta as curvas TGA contendo a adição de 0,5%, 1,0% e 1,5% em peso de GO, respectivamente. Similar à amostra nHA, os nanocompósitos nHA - GO produzidos apresentaram uma lenta e gradual perda de massa, demonstrando também alta estabilidade térmica entre a HA e o GO. Vale ainda ressaltar que este comportamento foi diferente para o GO isolado, uma vez que a perda de massa foi de, aproximadamente, 84% (Figura 4.7). Para uma possível análise quantitativa de GO nas amostras nHA - GO, a Figura 4.15 exhibe a comparação da perda de massa entre a nHA e os nanocompósitos nHA - GO produzidos. Enquanto na amostra nHA foi verificada a massa residual de 91,63% ao final do tratamento térmico até 1000 °C, as amostras nHA - GO 0,5%, nHA - GO 1,0% e nHA - GO 1,5% apresentaram massa residual de 91,84%, 92,37% e 92,84%, respectivamente. Esses resultados demonstraram a redução na perda de massa de acordo com o aumento da composição de 0,5% até 1,5%, em peso de GO.

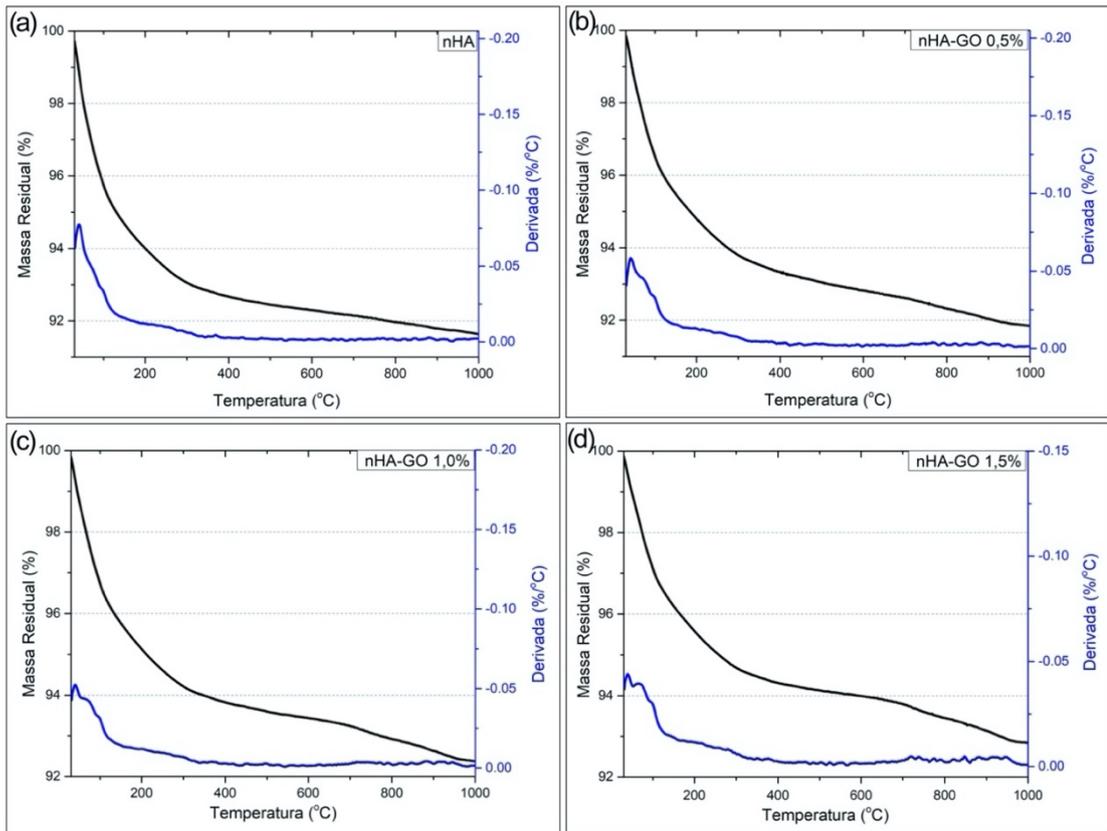


Figura 4.14 Análise termogravimétrica (TGA) e a sua derivada (DTG) da (a) nHA, (b) nHA - GO 0,5%, (c) nHA - GO 1,0% e (d) nHA - GO 1,5%.

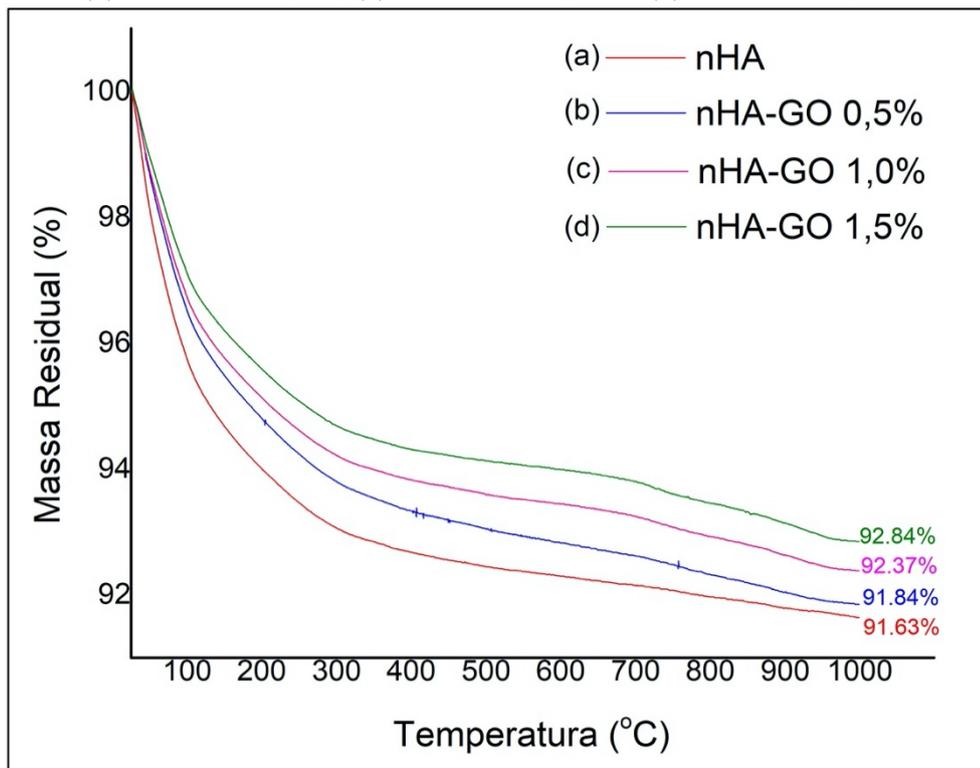


Figura 4.15 Análise termogravimétrica (TGA) comparativa da (a)nHA, (b) nHA - GO 0,5%, (c) nHA - GO 1,0% e (d) nHA - GO 1,5%.

Através da Tabela 4.7, foi possível calcular a incorporação experimental do GO, em comparação com a teórica, avaliando a eficiência da produção pela Rota 1 deste trabalho. Os resultados indicaram quantidades experimentais inferiores das teóricas, devido a incompleta reação do GO com a HA e a consequente degradação das folhas de GO isoladas após a calcinação do material. Foram obtidos, experimentalmente, 0,21%, 0,74% e 1,21% de GO para as amostras nHA - GO 0,5%, nHA - GO 1,0% e nHA - GO 1,5%, respectivamente. Neste trabalho, observou-se um aumento de 42% para 80% na eficiência da interação entre as partículas nanométricas de HA e as folhas de GO, formando o nanocompósito nHA - GO, de acordo com o aumento na adição de 0,5% para 1,5%, em peso de GO. De modo semelhante ao estudo de RAUCCI *et al*, (2017), que realizaram cálculos sobre a eficiência da incorporação do GO, parte do material introduzido não reagiu completamente com a HA. Além disso, LI *et al*, (2013) relataram que, em seus estudos sobre a produção da HA - GO usando o método de síntese *in situ*, o resíduo calcinado consistia principalmente de HA, devido a alta estabilidade térmica dessa fase.

Tabela 4.7 Análise da eficiência da Rota 1, através da comparação da composição teórica e experimental, obtidas por TGA

| Amostras | Composição teórica de GO (%) | Composição Experimental de GO por TGA (%) | Eficiência (%) |
|-----------------|-------------------------------------|--|-----------------------|
| nHA - GO 0,5% | 0,50 | 0,21 | 42 |
| nHA - GO 1,0% | 1,00 | 0,74 | 74 |
| nHA - GO 1,5% | 1,50 | 1,21 | 80 |

4.2.7 Ensaio de Bioatividade *in vitro*

Os testes de bioatividade *in vitro* foram realizados em meio McCoy afim de avaliar a capacidade de biomineralização dos nanocompósitos pela formação de apatita na superfície das amostras. A Figura 4.16 apresenta a morfologia das amostras nHA, nHA - GO 0,5%, nHA - GO 1,0% e nHA - GO 1,5% após 3, 7 e 14 dias de ensaio. Para o controle do ensaio, foram realizadas imagens das superfícies das amostras antes do ensaio, denominadas como 0 dias. Após 3 dias de imersão foi observada uma distribuição heterogênea, com pequenos precipitados da fase apatita na superfície da nHA e dos nanocompósitos nHA - GO. Além disso,

a maior concentração destes precipitados foi observada para as amostras contendo 0,5 e 1,0%, em peso de GO. As micrografias avaliadas por MEV confirmaram que o crescimento da apatita foi dependente do tempo de imersão/incubação das amostras. As amostras nHA e nHA - GO apresentaram um resultado positivo para a propriedade de bioatividade, confirmada pela precipitação dos depósitos de apatita (*bone-like apatite*) na superfície do biomaterial (Figura 4.16).

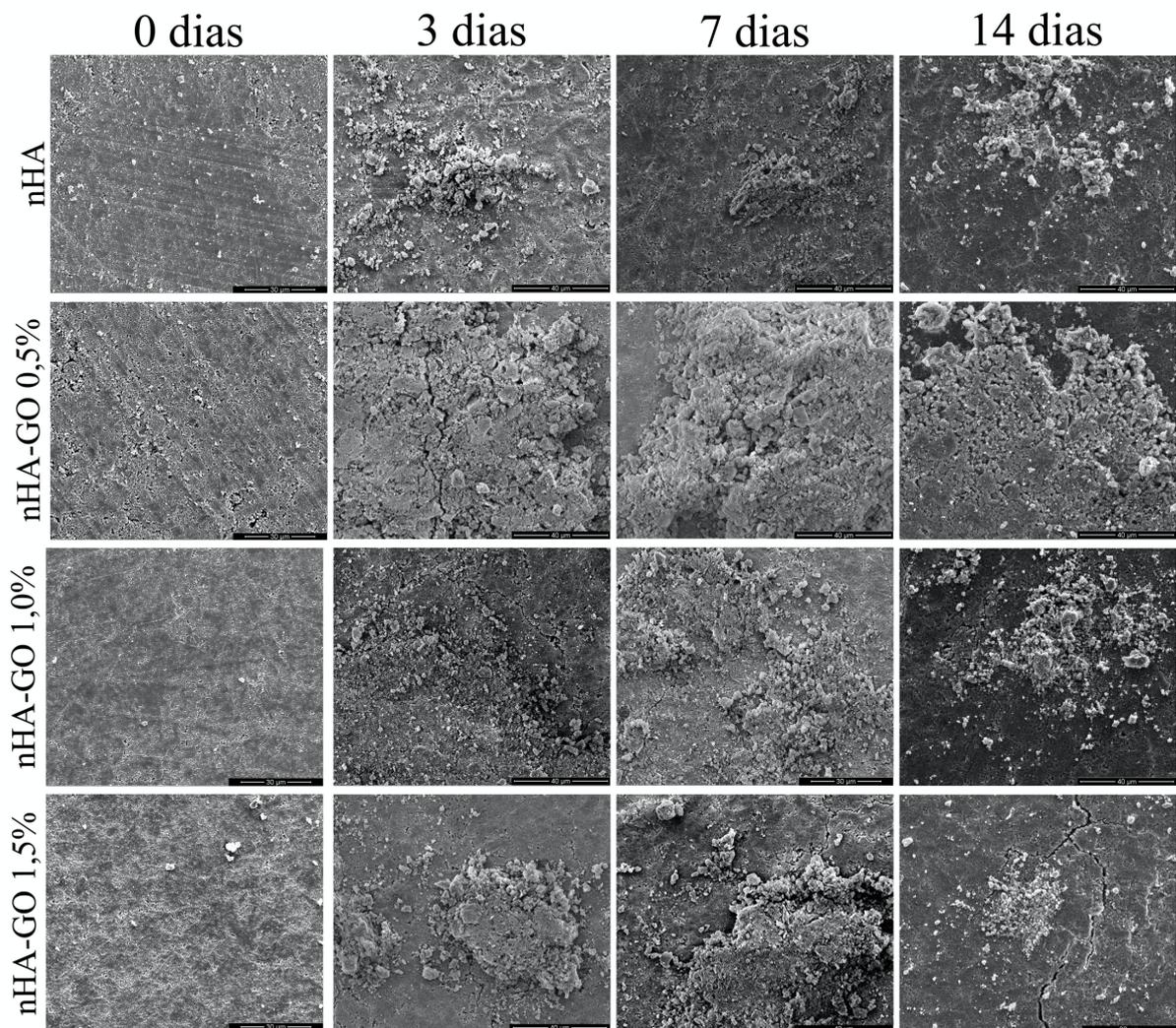


Figura 4.16 Micrografia (MEV) mostrando os resultados do ensaio de bioatividade das amostras nHA, nHA - GO 0,5%, nHA - GO 1,0% e nHA - GO 1,5% após 3, 7 e 14 dias de imersão em meio McCoy. Ampliação de 2.500x.

Além disso, a presença do óxido de grafeno contribuiu para o aumento da concentração dos precipitados para as amostras contendo 0,5 e 1,0%, em peso de GO. Em especial para as amostras nHA - GO 0,5%, que demonstrou um aumento dos precipitados com 7 dias de

imersão, quando em comparação aos dias iniciais. Após 14 dias de imersão, a região observada estava totalmente coberta por depósitos da apatita biológica. Assim como neste trabalho, LOGESH *et al.* (2019) avaliaram que nanocompósitos contendo GO são capazes de auxiliar no crescimento da camada de apatita na superfície das amostras pela presença abundante de grupos hidroxila das folhas de GO. Este mecanismo pode acelerar a taxa de nucleação *in vitro* da apatita pela presença de cargas negativas na superfície do material. Acredita-se que os defeitos do GO, quando em contato com o meio, atuam como sítios de nucleação, o que é evidenciado na Figura 4.17 pela capacidade de formação de apatita na superfície do GO (ZHANG, *et al.*, 2013).

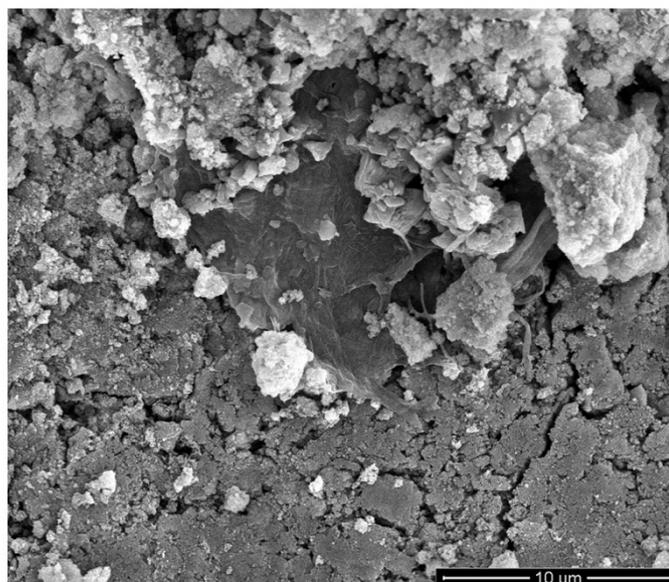


Figura 4.17 Micrografia (MEV) da amostra nHA - GO 1,0% após 3 dias de imersão em meio McCoy, demonstrando a maior concentração de precipitados próximo às folhas de GO. Ampliação de 10.000x.

Os resultados encontrados no presente trabalho são compatíveis com os estudos *in vitro* em solução SBF divulgados por MOHANDÉS e SALAVATI-NIASARI (2014). Os autores avaliaram por MEV que os nanocompósitos de HA reforçados com GO apresentaram mudanças morfológicas após 14 dias de imersão, além de um considerável crescimento de apatita na superfície do biocompósito. Os autores atribuem este crescimento ao processo de dissolução e precipitação da camada de apatita. Quando as pastilhas nHA e nHA - GO são imersas em solução fisiológica simulada, dois fenômenos ocorrem concomitantemente: dissolução dos pós e precipitação da nova camada de apatita (LI *et al.*, 2018; LOGESH *et al.*, 2019).

A Figura 4.18 apresenta a ilustração esquemática do processo de bioatividade dos nanocompósitos nHA - GO produzidos no presente trabalho e imersos em meio McCoy. No estágio controlado por dissolução (Figura 4.18 (a)), há a liberação de íons cálcio e, por

consequência, a superfície encontra-se carregada negativamente. Já o estágio por precipitação ((Figura 4.18 (b)) é constituído pela formação de uma camada rica em cálcio, em decorrência do processo de re-precipitação dos mesmos íons, que se encontram saturados no meio. Como a superfície, neste momento, estará carregada positivamente, haverá mais locais para a nucleação da nova apatita (Figura 4.18 (c)), onde a camada de cálcio formada atrairá os íons fosfato do fluido circundante. Segundo KOKUBO e YAMAGUCHI (2019), uma vez que o meio já esteja supersaturado em relação a apatita, os núcleos que são formados na superfície do material crescem consumindo os íons cálcio e fósforo disponíveis.

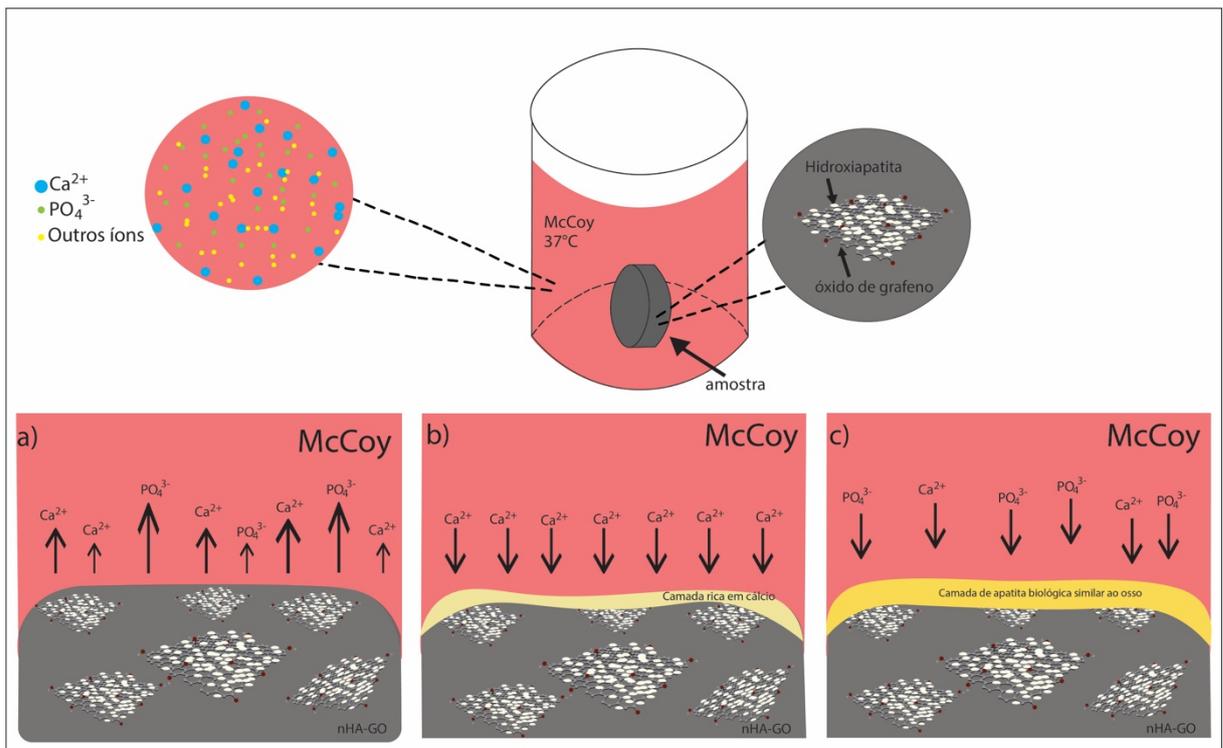


Figura 4.18 Ilustração esquemática do processo de dissolução-precipitação do nanocompósito bioativo nHA - GO após imersão em meio McCoy.

Através das análises morfológicas, os resultados indicaram a bioatividade promissora para as amostras. A adição de 0,5%, em peso de GO apresentou os melhores resultados em relação a bioatividade para os dias de ensaio analisados, demonstrando-se um potencial candidato para aplicações biomédicas. Como já relatado, a maior ocorrência de depósitos de apatita está associada a um maior número de íons cálcio sendo atraído na superfície da amostra e pelo fenômeno de dissolução/precipitação. No entanto, uma diminuição na formação destes depósitos foi observada com o aumento da quantidade de GO (1,0 e 1,5%, em peso de GO) e do tempo de ensaio (7 e 14 dias) nestas amostras. As respostas biológicas de um nanocompósito contendo GO dependerá de diversos parâmetros, dentre eles, a quantidade ideal de grafeno

utilizado na matriz de HA e a disponibilidade de grupos funcionais para a nucleação da apatita. Por exemplo, como foi observado nos resultados de Raman e TGA, um aumento na eficiência da interação entre as partículas nanométricas de HA e as folhas de GO, formando o nanocompósito nHA - GO, provavelmente influenciou no número de sítios disponíveis para a nucleação *in vitro* da apatita durante o ensaio de bioatividade.

Vale ressaltar que, neste trabalho, as pastilhas de nHA - GO foram encaminhadas à verde para o ensaio *in vitro*, ou seja, não foram submetidas ao processo de sinterização. Estudos indicam que, o controle do grau de cristalinidade e da taxa de dissolução do material produzido podem influenciar na propriedade de bioatividade *in vitro* e *in vivo* (MATSUMOTO *et al.*, 2002; DOROZHKIN, 2009; BERTAZZO *et al.*, 2010). Sendo assim, os resultados morfológicos encontrados neste trabalho divergem dos observados na literatura, como, por exemplo, nos trabalhos de FONSECA (2016) e FERREIRA (2015), onde as amostras foram sinterizadas a 1100°C e não demonstraram bioatividade após 14 dias.

4.2.8 Ensaio de Citotoxicidade Indireta *in vitro*

A Figura 4.19 apresenta a viabilidade celular por MTT das células-tronco mesenquimais da polpa do dente analisadas por via indireta dos extratos obtidos a partir dos nanocompósitos de nHA - GO. Os valores relativos à intensidade da absorbância fornecem um indicador do número relativo de células viáveis durante o ensaio. Foi possível observar que os nanocompósitos nHA - GO não apresentaram toxicidade para as células-tronco mesenquimais, mesmo em altas concentrações (1,5%, em peso de GO).

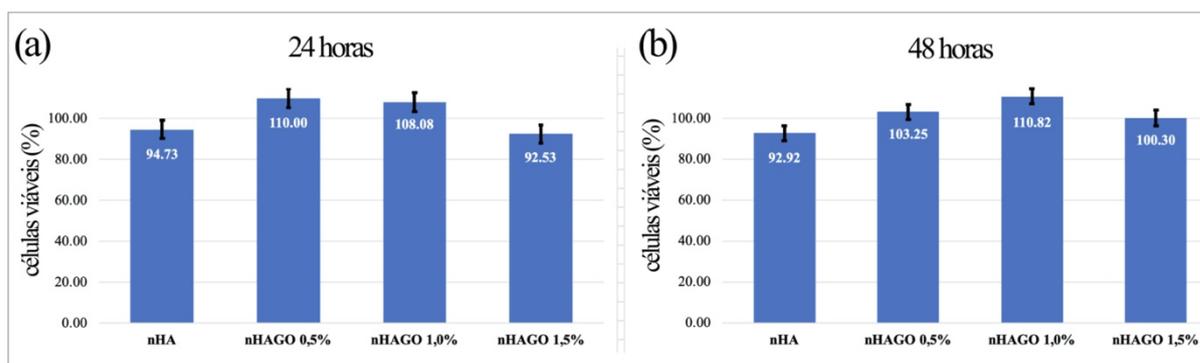


Figura 4.19 Ensaio de citotoxicidade indireta em células-tronco mesenquimais da polpa dentária expostas aos extratos das amostras nHA, nHA - GO 0,5%, nHA - GO 1,0% e nHA - GO 1,5% após 24 e 48 horas.

Os resultados do ensaio de citotoxicidade indireta *in vitro*, nos tempos de 24h e 48h, exibiram uma biocompatibilidade comparável entre as amostras de nHA e os nanocompósitos nHA - GO (Figura 4.19). As amostras nHA - GO 0,5% e 1,0% demonstraram os melhores resultados médios para a viabilidade celular, sugerindo-as como um material promissor para a regeneração de tecidos ósseos. Entretanto, não foi observada diferença estatística significativa entre os grupos, pois o valor de *p* observado (de 0,22 e 0,35 para os tempos de 24h e 48h, respectivamente) foi maior que o nível de significância definido para o presente trabalho (0,05 – probabilidade de erro de 5%). A atividade metabólica celular sobre os compósitos de HA e grafeno também foi avaliada por outros autores (LIU *et al.*, 2012; DUAN *et al.*, 2018; KUMAR *et al.*, 2019). LIU *et al.* (2012) avaliaram a citotoxicidade de compósitos HA - rGO, e os resultados indicaram que a viabilidade celular das células foi de 95%, em comparação com o controle/positivo (somente células). No estudo de DUAN *et al.* (2018), os resultados do ensaio MTT demonstraram um adequado crescimento das células pré-osteoblásticas (MC3T3 - E1) nos compósitos de HA - GO, devido a uma favorável superfície para a adesão e proliferação celular. Recentemente, através da síntese em estado sólido, KUMAR *et al.* (2019) demonstraram que o compósito HA - Grafeno não apresentou efeitos citotóxicos.

No presente trabalho, o aumento para 1,5%, em peso de GO, nos nanocompósitos exibiu redução na viabilidade e multiplicação das células-tronco mesenquimais da polpa do dente, porém, mantiveram um alto nível de viabilidade celular (acima de 92%). De acordo com alguns estudos, o grafeno pode exibir citotoxicidade em altas concentrações, entretanto não demonstrando citotoxicidade aparente em baixas concentrações (KIM *et al.*, 2017, LIAO *et al.*, 2018). Por exemplo, no estudo de KIM *et al.* (2017), a viabilidade celular diminuiu significativamente em concentrações > 100 µg/mL de rGO, mas foi mantida acima de 80% de viabilidade quando em concentrações < 62,5 µg / mL.

É importante ressaltar que a alta concentração, bem como outras características do grafeno, que incluem: dimensão lateral, estrutura superficial, grupos funcionais, pureza, entre outros; podem influenciar fortemente a sua toxicidade em sistemas biológicos (SANCHEZ *et al.*, 2011; SEABRA *et al.*, 2014; OU *et al.*, 2016). Além disso, a literatura aponta que a resposta celular do grafeno é diferente dependendo da linhagem celular utilizada, conforme GIES e ZOU (2018) observaram. No estudo de GIES e ZOU (2018), foram realizados seis ensaios de viabilidade celular utilizando distintas linhagens: NIH 3T3, RAW 264.7, A549, U87, NB4 e HL60, demonstrando uma variação considerável na citotoxicidade do GO. Portanto, os resultados encontrados no presente trabalho são importantes para compreender a

resposta de viabilidade das células-tronco mesenquimais da polpa dentária frente aos nanocompósitos nHA - GO, bem como entender os relatos conflitantes sobre a citotoxicidade do GO discutidos na literatura.

4.3 CARACTERIZAÇÃO DOS NANOCOMPÓSITOS sHA-GO

4.3.1 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

A Figura 4.20 apresenta a micrografia das amostras sHA e sHA - GO, contendo 0,5%, 1,0% e 1,5%, em peso de GO, obtidas pelo método de precipitação em meio aquoso. A amostra sHA apresentou uma microestrutura na forma arredondada (ou esférica) contendo partículas com tamanho inferior a 500 nm, como mostrado na Figura 4.20 (a). Segundo SADAT - SHOJAI *et al.*, (2013), nanopartículas de HA produzidas por precipitação em meio aquoso podem apresentar alterações morfológicas em função do processo de secagem na qual são submetidas. Neste trabalho, a morfologia encontrada foi a típica para nanopartículas de HA que foram submetidas à secagem por liofilização. Morfologia semelhante a esta foi observada por WANG *et al.* (2010) ao investigarem a influência do método de secagem (secagem atmosférica, secagem à vácuo e liofilização) sobre as características dos pós produzidos. Segundo os autores, o método de secagem demonstrou ser um importante fator para determinar tanto a morfologia quanto a dispersão das nanopartículas do pó produzido.

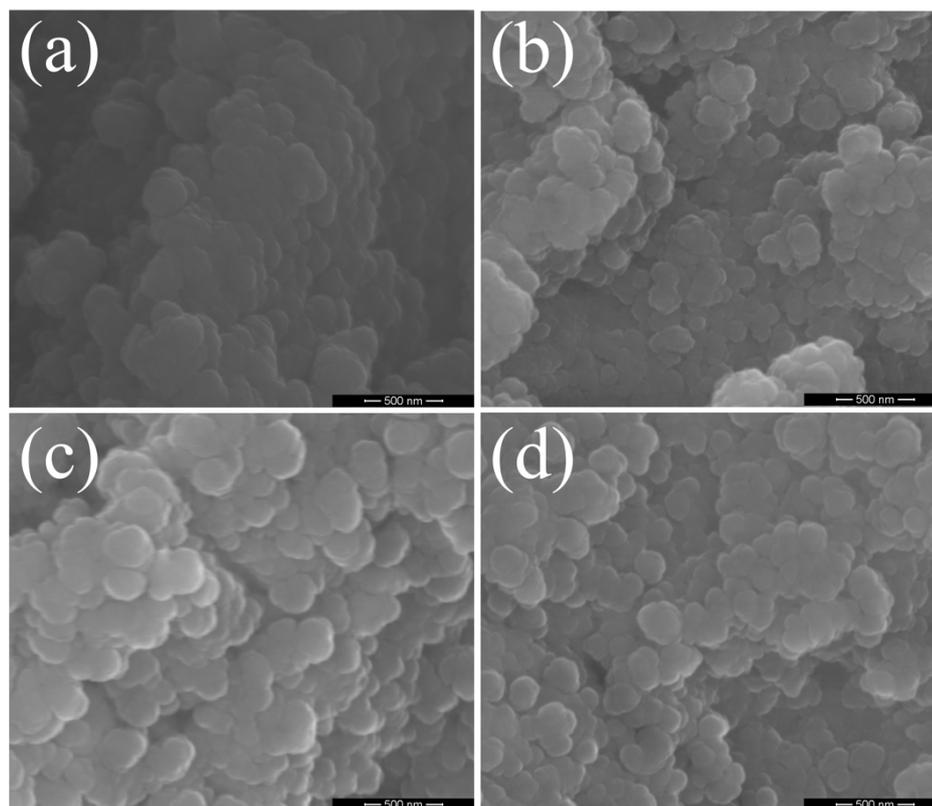


Figura 4.20 Micrografia (MEV) dos pós (a) sHA, (b) sHA - GO 0,5%, (c) sHA - GO 1,0% e (d) sHA - GO 1,5% obtidos pelo método de precipitação em meio aquoso. Ampliação de 100.000x.

As diferentes morfologias encontradas entre as amostras nHA e sHA podem ser explicadas pelo fenômeno de formação de cristais, que dependem do método de produção realizado. A formação dos cristais compreende duas etapas principais: a nucleação, onde são formados os pequenos núcleos cristalinos em meio supersaturado da solução rica em cálcio e fósforo; e crescimento, no qual os núcleos crescem continuamente até o seu tamanho e forma final (BASIRUN *et al.*, 2018). Esta última etapa pode ser influenciada diretamente pela temperatura. Como observada nas imagens obtidas por MEV (Figura 4.20 (a)), acredita-se que não houve participação significativa da etapa de crescimento dos cristais que, possivelmente, contribuiu para manter as partículas com a morfologia esférica. Ao contrário do observado nos cristais produzidos pela Rota 1 do presente trabalho, que apresentaram morfologia de agulhas alongadas, devido ao crescimento preferencial (Figura 4.8 (a)).

As amostras sHA - GO apresentaram característica análoga à observada para a sHA, exibindo morfologia arredondada (ou esférica), com partículas menores que 500 nm (Figura 4.20 (b - d)). Contudo, não foi possível observar as folhas de GO aderidas ou próximas às nanopartículas de HA, mesmo com o aumento das adições de GO. Maiores detalhes das

amostras podem ser observados na Figura 4.21, onde as amostras sHA - GO apresentaram maior aglomeração de partículas, quando comparado com a nHA e nHA - GO (Figura 4.8 (b-d)). Apesar de não ser possível observar através da análise por MEV, acredita-se que as folhas de GO estão totalmente recobertas pelas nanopartículas de HA.

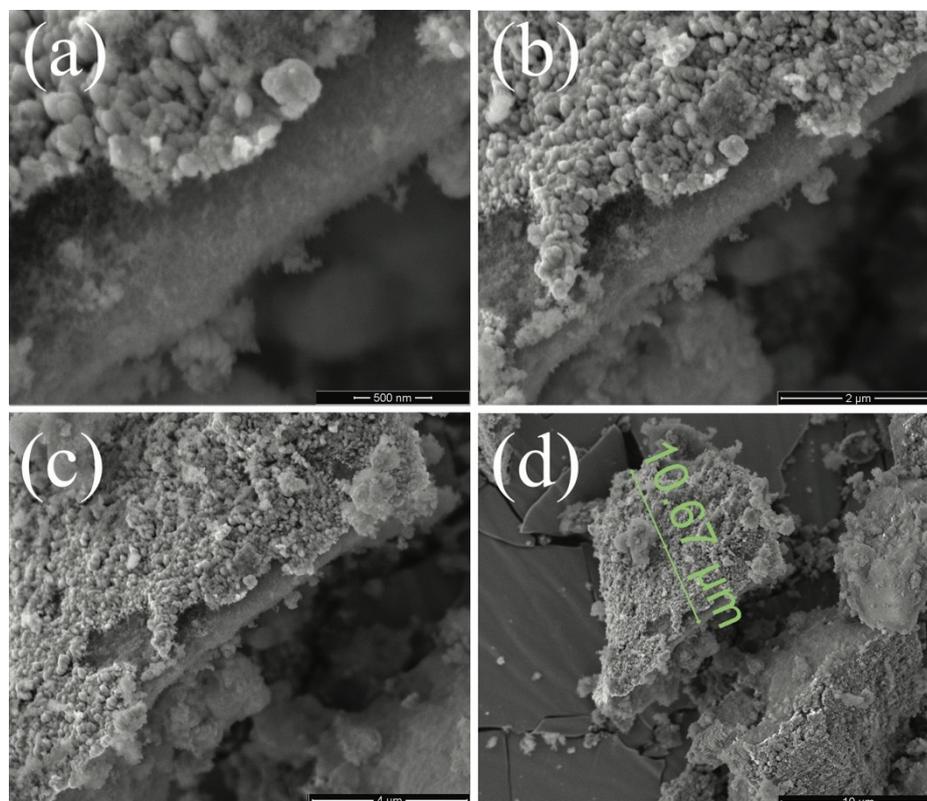


Figura 4.21 Micrografia (MEV) dos pós de sHA - GO 1,0% obtida pela síntese da hidroxiapatita pelo método de precipitação em meio aquoso, demonstrando maior aglomeração de partículas, possivelmente, pela presença das folhas de GO. Ampliação de (a)100.000x, (b)50.000x, (c)25.000x e (d)10.000x.

4.3.2 Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)

Na Figura 4.22 são apresentados os aspectos morfológicos das amostras sHA, sHA - GO 0,5%, sHA - GO 1,0% e sHA - GO 1,5% após análise por MET. As características da amostra sHA, observadas por MET, corroboram com os resultados discutidos por MEV na sessão 4.3.1, referentes à Figura 4.20 (a). Entretanto, além das partículas arredondadas (ou esféricas), também foram verificadas a morfologia de agulhas (Figura 4.22(a)) com distribuição de tamanho abaixo de 100 nm.

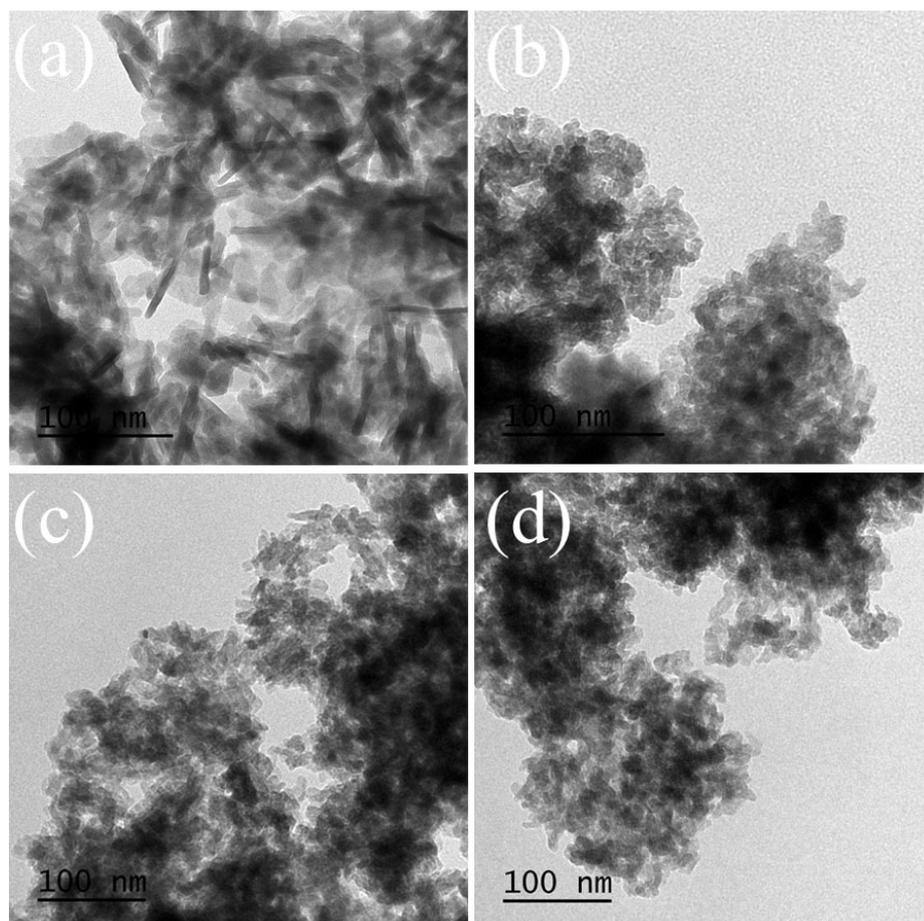


Figura 4.22 Micrografia (MET) dos pós de nanocompósitos (a) sHA, (b) sHA - GO 0,5%, (c) sHA - GO 1,0% e (d) sHA - GO 1,5%.

Já os nanocompósitos sHA - GO, em comparação com a sHA, apresentaram partículas arredondadas (ou esféricas), com distribuição de tamanho na faixa nanométrica (Figura 4.22 (b-d)). Além disso, os pós dos nanocompósitos sHA - GO apresentaram alta aglomeração, impossibilitando verificar a presença das folhas de grafeno, mesmo em altas concentrações (1,5%, em peso de GO). Esse fato pode estar relacionado à alta deposição de HA sobre as folhas de GO, recobrando totalmente a sua superfície.

Assim como observado nos resultados produzidos pela Rota 1 do presente trabalho, que demonstrou a interação entre as partículas de HA sobre as folhas de GO, acredita-se que a maior aglomeração das nanopartículas de HA deve-se à forte interação entre a HA e o GO durante a precipitação química pelo método aquoso. Através da Rota 2, os íons Ca^{2+} e PO_4^{3-} , da solução precursora, podem interagir com os grupos funcionais e os defeitos presentes nas folhas de GO (que apresentam cargas elétricas e energia superficial), contribuindo para a nucleação heterogênea das nanopartículas da hidroxiapatita (RAUCCI *et al.*, 2017).

A nucleação é o primeiro passo na formação de uma nova fase termodinâmica, ou estrutura. Em uma nucleação heterogênea, a menor barreira energética de nucleação é verificada, quando comparada com a nucleação homogênea, levando a rápida precipitação. A nucleação homogênea é menos favorável do ponto de vista energético, pois ocorre quando os núcleos se formam uniformemente ao longo da fase-mãe, enquanto a nucleação heterogênea se forma em pontos específicos (superfícies, impurezas, limites de grãos, deslocamentos, entre outros), que servem como catalisadores para o processo de nucleação (WANG e NANCOLLAS, 2008). O processo de precipitação ocorre quando a concentração de íons precursores na solução aumenta acima de um nível crítico e isso pode ser alcançado localmente em uma superfície, de preferência, se houver algumas funcionalidades que possam interagir fortemente com os íons. Para as amostras sHA - GO, os resultados demonstram que a presença do GO é capaz de aumentar localmente a concentração de íons de Ca^{2+} e PO_4^{3-} próximos às folhas de grafeno, ocasionando maior aglomeração da HA, em comparação ao observado para a nHA - GO. Além disso, interações eletrostáticas entre os grupos funcionais da superfície do GO e os íons Ca^{2+} e PO_4^{3-} podem contribuir para o aumento da supersaturação local mais facilmente. TAVAFOGHI *et al.* (2016) comprovaram por análises químicas (XPS, EDS, Potencial Zeta, entre outras análises superficiais), que a presença de grupos com carga positiva e negativa, observados em materiais a base de grafeno, possui forte influência na precipitação da HA.

4.3.3 Difração de Raios X (DRX)

A informação estrutural das amostras sHA, sHA - GO 0,5%, sHA - GO 1,0% e sHA - GO 1,5% foi fornecida pela análise por DRX, como mostrado na Figura 4.23. Os valores de 2θ da amostra sHA foram indexados pela ficha JCPDS 01 - 089 - 4405, referente a estrutura cristalina monoclinica da HA. Além disso, o perfil difratométrico apresentou bandas alargadas e picos de difração pouco intensos, indicando a sua baixa cristalinidade, já esperado pelo método de precipitação em meio aquoso e o processo de secagem por liofilização utilizado. A estimativa do tamanho de cristalito para os pós da sHA, de acordo com dados obtidos pelo software MAUD, revelou um valor médio de 8,42 nm, conforme Tabela 4.8.

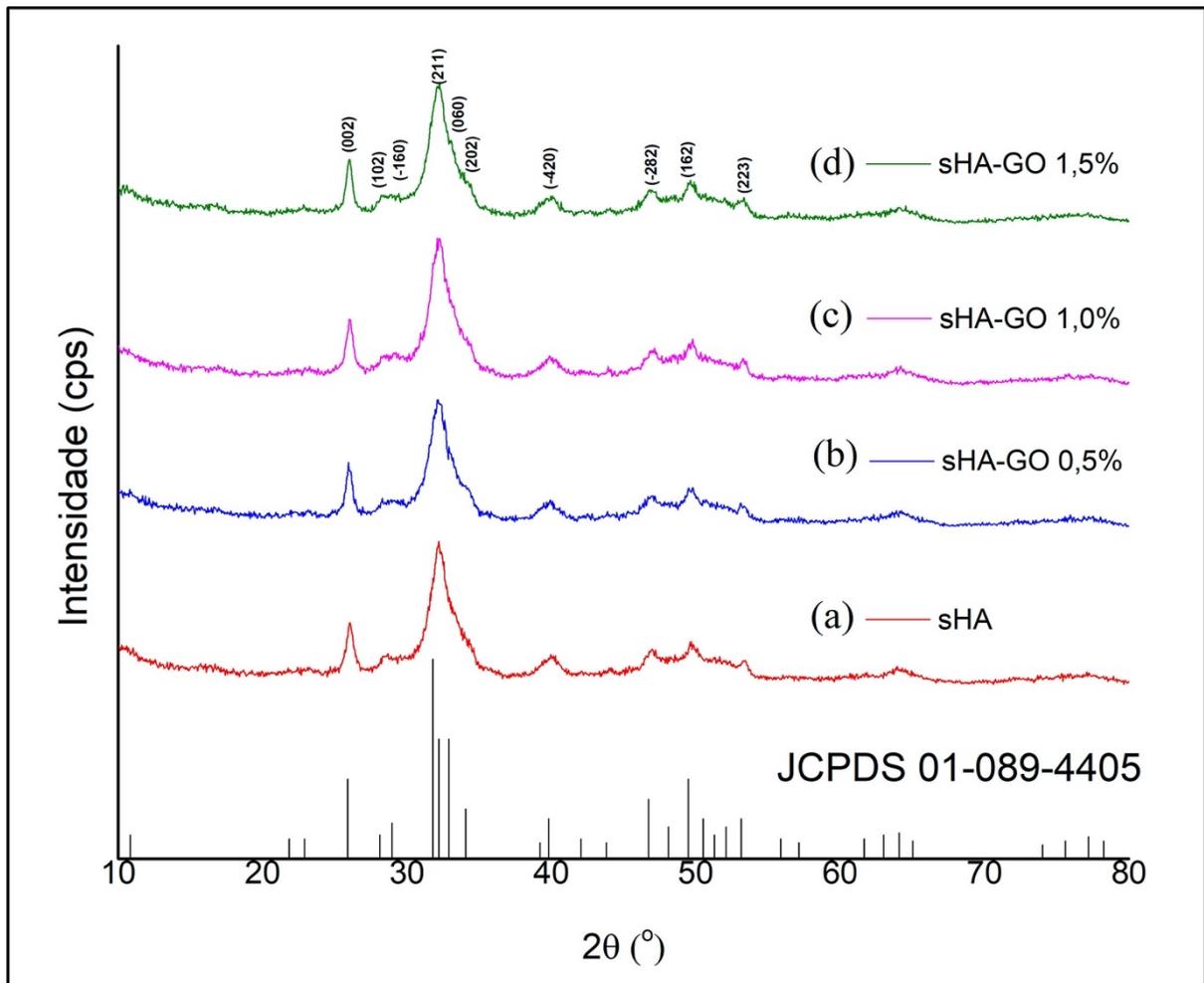


Figura 4.23 Difratoograma dos pós (a) sHA, (b) sHA - GO 0,5%, (c) sHA - GO 1,0% e (d) sHA - GO 1,5%.

Para as amostras sHA - GO, os resultados por DRX demonstraram um padrão difratométrico semelhante ao da sHA, indicando que as nanopartículas de HA preservaram a sua rede monoclinica (JCPDS 01 - 089 - 4405). Este padrão também foi observado em outros trabalhos, demonstrando que a HA preservou a sua estrutura mesmo após a síntese dos nanocompósitos (RAJESH *et al.*, 2017; RAMADAS *et al.*, 2017). O padrão de difração do GO não foi encontrado para o nanocompósito, possivelmente, devido à maior cristalinidade da fase HA presente no nanocompósito sHA - GO, além da varredura da análise ter sido realizada no intervalo angular entre $10^{\circ} < 2\theta < 80^{\circ}$.

Os resultados do tamanho médio de cristalito para os nanocompósitos sHA - GO variaram entre 8,86 - 9,00 nm, conforme observado na Tabela 4.8. É importante ressaltar que a variação do tamanho médio de cristalito entre os nanocompósitos nHA - GO e sHA - GO se deve aos diferentes processos de secagem utilizado no presente trabalho. Enquanto o

nanocompósito sHA - GO passou pelo processo de secagem por liofilização, na qual a remoção da água é realizada através da sublimação; o nHA - GO foi encaminhado para secagem na estufa à 50° por 48 horas. Logo, o método de secagem da Rota 2, que utiliza baixíssima temperatura e tem grande influência na etapa de crescimento das partículas, resultou em tamanho médio de cristalito menor para o nanocompósito sHA - GO, assim como relatado por BASIRUN *et al.* (2018).

Tabela 4.8 Tamanho médio de cristalito para as amostras sHA - GO

| Descrição | MAUD (nm) |
|------------------|------------------|
| sHA | 8,42 |
| sHA - GO 0,5% | 8,86 |
| sHA - GO 1,0% | 9,00 |
| sHA - GO 1,5% | 8,46 |

4.3.4 Espectroscopia Raman

Para comprovar a presença do GO, a análise por Raman foi empregada nas amostras sHA, sHA - GO 0,5%, sHA - GO 1,0% e sHA - GO 1,5% (Figura 4.24). Todas as bandas observadas para a sHA foram identificadas e atribuídas aos modos vibracionais do grupo fosfato. As bandas características da sHA estão listadas na Tabela 4.9, que correspondem ao: (i) modo simétrico do grupo PO₄ tetraédrico em 961,70 cm⁻¹; (ii) alongamento antissimétrico do grupo PO₄ (ligação P - O) em 1074,45 cm⁻¹; (iii) modo de flexão triplamente e duplamente degenerada do grupo PO₄ (ligação O - P - O), em 601,09 e 473,09 cm⁻¹, respectivamente. Todas as bandas encontradas neste trabalho foram também relatadas por NOSENKO *et al.* (2016) e STAMMEIER *et al.* (2018) em seu estudo.

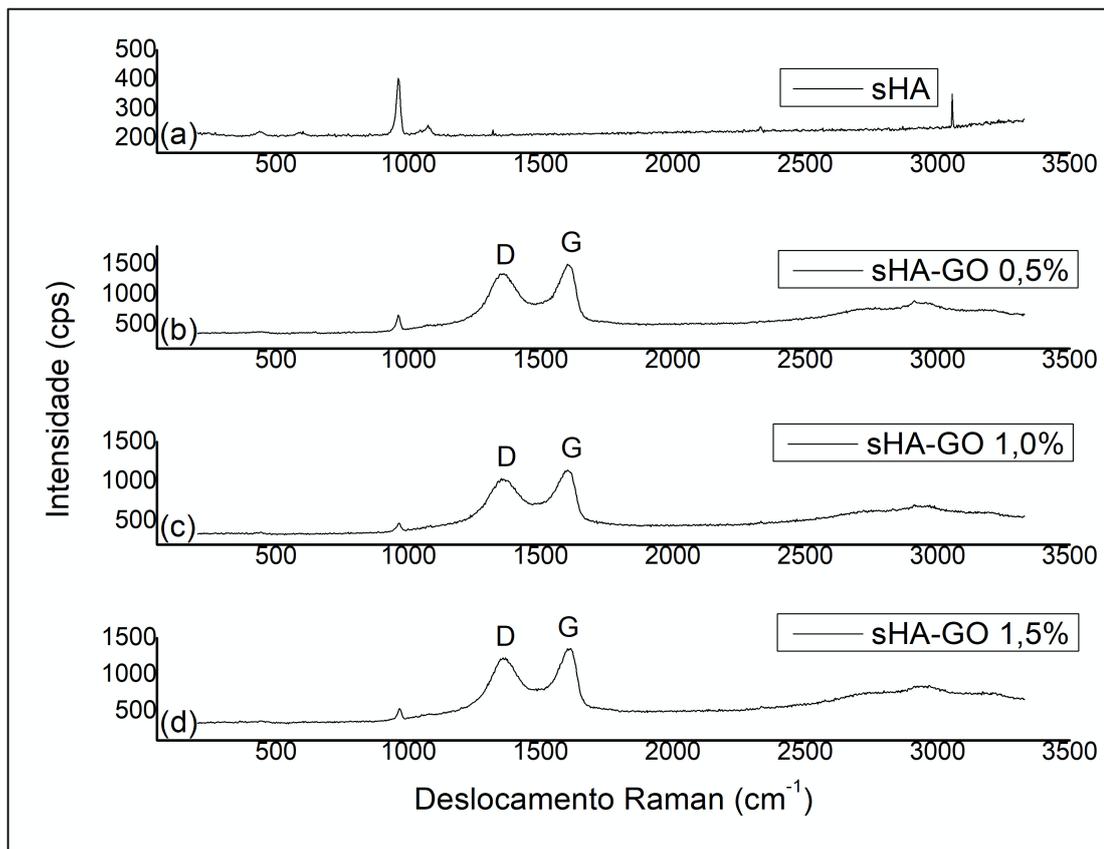


Figura 4.24 Espectro Raman evidenciando as bandas características da (a) sHA, (b) sHA - GO 0,5%, (c) sHA - GO 1,0% e (d) sHA - GO 1,5%.

Tabela 4.9 Banda do espectro Raman observados para a sHA

| Banda (cm ⁻¹) | Descrição |
|---------------------------|---|
| 961,70 | Modo de alongamento simétrico do grupo PO ₄ tetraédrico (ligação P – O). |
| 1074,45 | Modo triplo de alongamento assimétrico degenerado do grupo PO ₄ grupo (ligação P – O). |
| 601,09 | Modo de flexão triplamente degenerada do grupo PO ₄ (ligação O – P – O) |
| 473,09 | Modo de flexão duplamente degenerada do grupo PO ₄ (ligação O – P – O) |

Os modos vibracionais do grupo fosfato também foram identificados nos espectros Raman das amostras sHA - GO, como indicado na Figura 4.24 (b-d). Além disso, as bandas características da estrutura da HA foram preservadas. As bandas típicas do GO foram constatadas após a deconvolução pelo ajuste Lorentziano (Figura 4.25 (b-d)), sendo elas: D, G, D** e D'. As bandas D e G observadas para o nanocompósito sHA - GO contendo 0,5%, 1,0% e 1,5%, em peso de GO, são, respectivamente: 1357,87 e 1590,45 cm⁻¹; 1359,36 e 1588,08

cm⁻¹; e 1362,20 e 1587,87 cm⁻¹. A densidade de defeitos (relação I_D/I_G) encontrada para o nanocompósito sHA - GO, contendo 0,5%, 1,0% e 1,5%, em peso de GO correspondeu a: 1,39, 1,37 e 1,33, respectivamente (Tabela 4.10). Observou-se uma sutil diminuição na razão de intensidade relativa I_D/I_G, quando comparado ao GO (I_D/I_G=1,40). O coeficiente de determinação (R²) para as amostras sHA - GO que demonstra a alta qualidade do ajuste e apontam valores na faixa entre 0,992-0,995. Além disso, a Tabela 4.10. lista as bandas D e G do espectro Raman, bem como a relação I_D/I_G para o GO e as amostras sHA - GO.

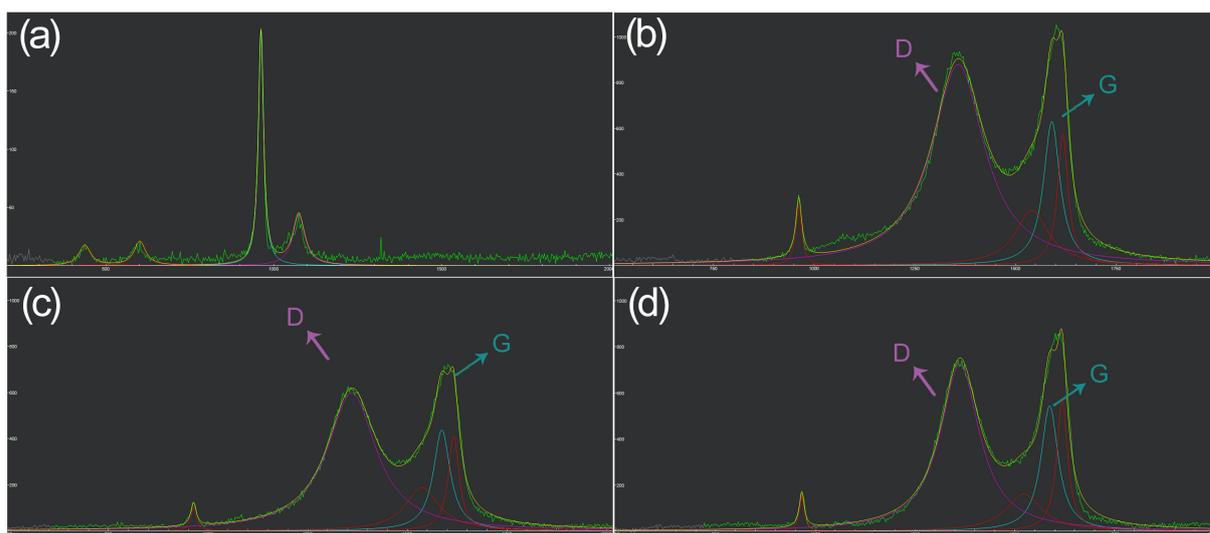


Figura 4.25 Espectro Raman após a deconvolução das bandas características da (a) sHA, (b) sHA - GO 0,5%, (c) sHA - GO 1,0% e (d) sHA - GO 1,5% através do programa Fityk.

Tabela 4.10 Picos do espectro Raman das bandas D e G e a relação I_D/I_G observados para o GO e para os nanocompósitos sHA - GO.

| Amostra | Banda D | Banda G | I _D /I _G |
|----------------|---------|---------|--------------------------------|
| GO | 1355,37 | 1577,65 | 1,40 |
| sHA - GO 0,5% | 1357,87 | 1590,45 | 1,39 |
| sHA - GO 1,0%, | 1359,36 | 1588,08 | 1,37 |
| sHA - GO 1,5%, | 1362,20 | 1587,87 | 1,33 |

Assim como BARADARAN et al. (2014) avaliaram em seu estudo, os resultados obtidos por espectroscopia Raman confirmaram o sucesso da síntese do nanocompósito sHA - GO. O estudo de BARADARAN et al. (2014) revelou a presença de bandas características do grupo fosfato nos compósitos de HA e grafeno, bem como bandas D e G, típicas para o GO. Portanto, apesar da não observação das folhas de GO nos resultados

morfológicos obtidos por MEV e MET das amostras sHA - GO, a análise por Raman comprovou a presença do GO. Sendo assim, acredita-se que as folhas de GO estão totalmente cobertas pelas nanopartículas de HA, o que confirma a aglomeração das partículas de HA sobre a superfície das folhas de GO. Entretanto, a proximidade entre os valores de I_D/I_G para o sHA - GO e o GO pode indicar que houve menor ligação das nanopartículas de HA aos grupos funcionais (e defeitos superficiais) do GO por esta rota. Vale ressaltar, que essa justificativa leva também em consideração a análise morfológica avaliada por MEV e MET dos nanocompósitos sHA - GO e nHA - GO. Acredita-se que para a Rota 2, as interações eletrostáticas entre os grupos funcionais das superfícies do GO e a HA produza um material intercalado ou aglomerado, porém não havendo a deposição das nanopartículas de HA sobre as folhas de GO, como observado por MEV nas amostras nHA - GO (Figura 4.8 (b-d)) (RAJESH *et al.*, 2017).

4.3.5 Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR)

As bandas de absorção características da sHA e dos nanocompósitos sHA - GO contendo 0,5%, 1,0% e 1,5%, em peso de GO são apresentadas na Figura 4.26. Os grupos químicos característicos para a sHA, observados no espectro de FTIR, são: PO_4^{3-} , OH^- , CO_3^{2-} . Todas as bandas observadas neste trabalho foram relatadas por IACOBONI *et al.*, (2019) e estão listadas na Tabela 4.11. As bandas observadas para a sHA são: (i) banda larga entre $3750 - 2500\text{ cm}^{-1}$ atribuída à água adsorvida na sHA; (ii) banda em 3570 cm^{-1} referente ao modo de vibração de estiramento simétrico da hidroxila; (iii) banda em 1640 cm^{-1} , característica do modo vibracional em torno do O - H - O; (iv) bandas devido ao alongamento assimétrico do CO_3^{2-} em 1489 , 1421 e 875 cm^{-1} ; (v) bandas em 1095 , 1037 e 962 cm^{-1} atribuídas ao alongamento e flexão do grupo PO_4^{3-} ; e (vi) bandas de deformação assimétrica do grupo PO_4^{3-} em 601 e 565 cm^{-1} .

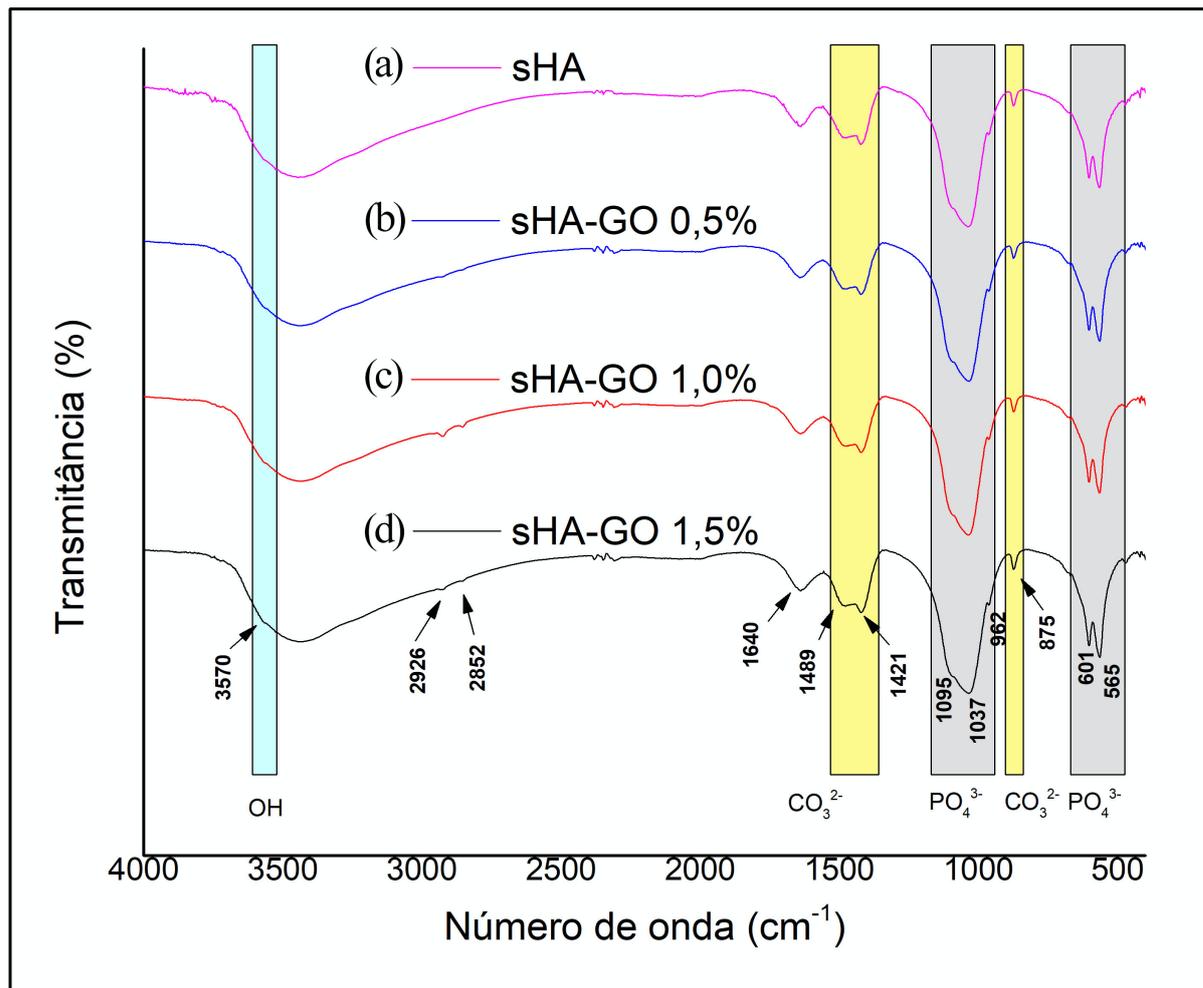


Figura 4.26 Espectros FTIR característicos da sHA, sHA - GO 0,5%, sHA - GO 1,0% e sHA - GO 1,5%.

Tabela 4.11 Banda do espectro FTIR observados para a sHA.

| Banda (cm ⁻¹) | Descrição |
|---------------------------|---|
| 3750-2500 | H ₂ O adsorvida na superfície |
| 3570 | Modo de estiramento da ligação -OH |
| 1640 | Modo vibracional em torno do O-H-O. |
| 1489, 1421 e 875 | Bandas CO ₃ ²⁻ substitutas do íon fosfato |
| 1037; 1095; 962 | Modo de flexão do grupo PO ₄ ³⁻ |
| 601, 565 | Modo de deformação assimétrica do grupo PO ₄ ³⁻ . |

Para os nanocompósitos sHA - GO, o perfil dos espectros FTIR foram semelhantes ao observado para o sHA, como pode ser visualizado na Figura 4.26 (b-d). Com o aumento de 0,5% para 1,5%, em peso de GO, o surgimento das bandas em 2926 e 2852 cm⁻¹, referente aos

estiramentos antissimétrico e simétrico dos grupamentos $-CH_2$, respectivamente, foram observados (GONG *et al.*, 2017; BARADARAN *et al.*, 2014). Logo, o surgimento destas bandas de absorção confirmou a presença das folhas de GO no nanocompósito produzido e, também, pode ser mais um indicativo que não ocorreu uma ligação química entre esses grupos funcionais do GO com os da HA (SUMATHRA *et al.*, 2018).

4.3.6 Análise termogravimétrica (TGA) e a sua Derivada (DTG)

As curvas TGA e DTG das amostras de sHA e dos nanocompósitos sHA - GO 0,5%, sHA - GO 1,0% e sHA - GO 1,5% são apresentados na Figura 4.27. Foi possível verificar que todas as amostras produzidas por esta rota do trabalho apresentaram um perfil de decomposição térmica semelhante. Os resultados da análise termogravimétrica demonstraram três estágios da curva TGA durante o tratamento térmico até 1000 °C. Os dois primeiros estágios de perda de massa estão relacionados à água adsorvida e estrutural da rede, respectivamente. A primeira perda, que ocorreu em baixas temperaturas (até 150°C), é devido à água adsorvida fisicamente sobre a superfície do material; enquanto o segundo evento é explicado pela remoção da água estrutural entre 150°C e 760°C, ocasionando a cristalização do material (LIAO *et al.*, 1999; TONSUAADU *et al.*, 2011). Esses dois eventos apresentaram um total de perda de massa de: 11,26%, 11,41%, 10,99% e 12,64% para a sHA e os nanocompósitos sHA - GO 0,5%, sHA - GO 1,0% e sHA - GO 1,5%, respectivamente.

É importante ressaltar que o perfil de decomposição térmica da HA depende das condições de processamento para sua obtenção (TONSUAADU *et al.*, 2011). Possivelmente, a diferença no processo de secagem, entre as Rotas 1 e 2, proporcionou o aparecimento do terceiro estágio de perda de massa, de acordo com o pico da derivada da curva, entre 760 °C até 1000 °C. A literatura indica que este terceiro estágio pode ser explicado como a remoção de grupos hidroxilas da estrutura da HA, em função da incorporação de grupos carbonatos para o equilíbrio de cargas, provocando a possível decomposição da estrutura da HA em fases secundárias de fosfato de cálcio (como o β -TCP) ou óxido de cálcio (HUANG *et al.*, 2010). Ao final do tratamento térmico, até 1000°C, a massa residual para as amostras foram: 86,91%, 87,18%, 87,05%, 85,57% para a sHA, sHA - GO 0,5%, sHA - GO 1,0% e sHA - GO 1,5%, respectivamente.

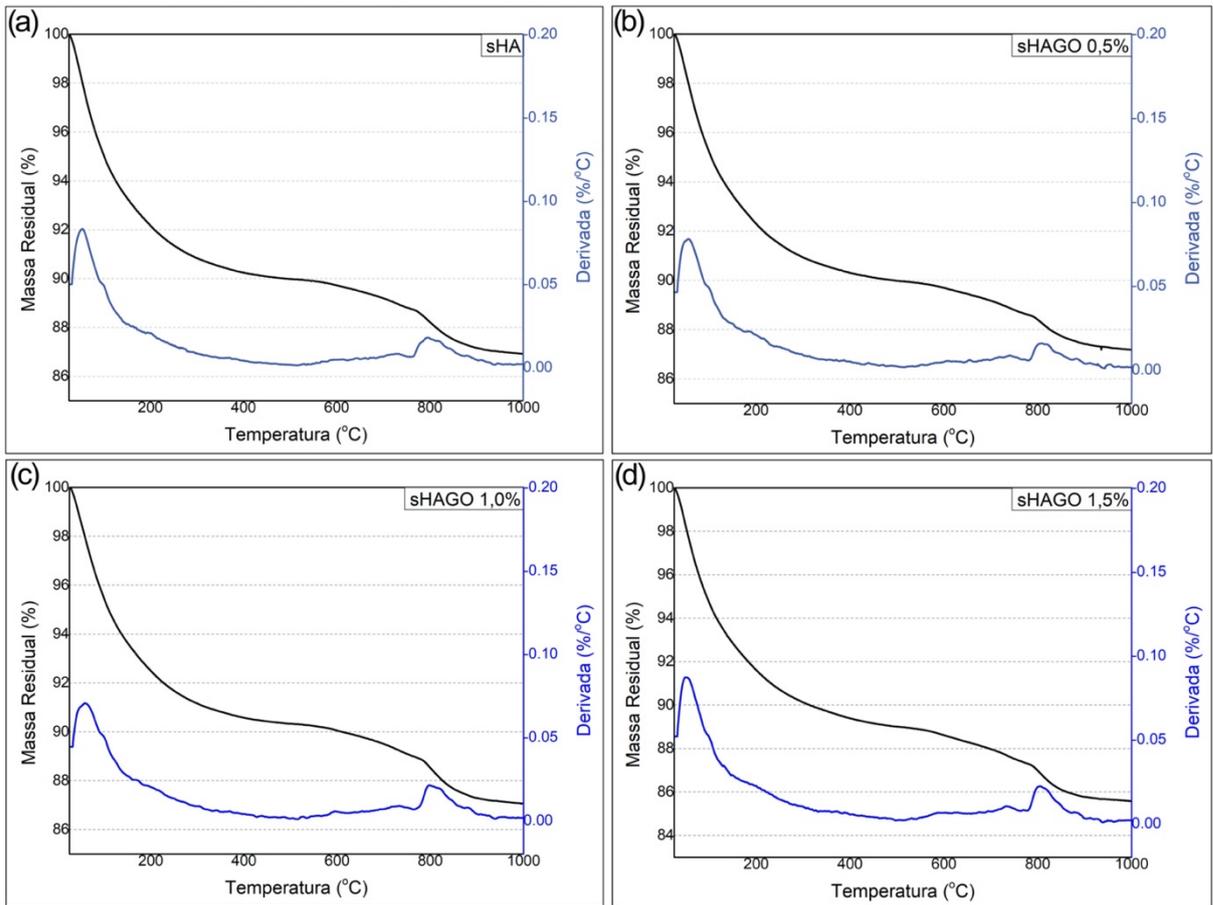


Figura 4.27 Análise termogravimétrica (TGA) e a sua derivada (DTG) da (a) sHA, (b) sHA - GO 0,5%, (c) sHA - GO 1,0% e (d) sHA - GO 1,5%.

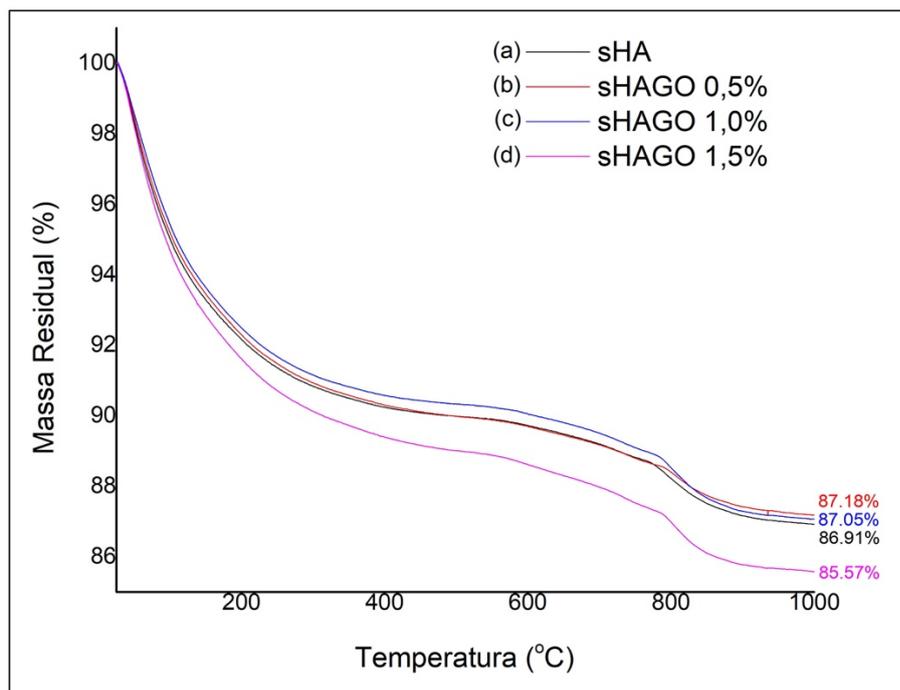


Figura 4.28 Análise termogravimétrica (TGA) comparativa da (a) sHA, (b) sHA - GO 0,5%, (c) sHA - GO 1,0% e (d) sHA - GO 1,5%.

Para a confirmação da decomposição da HA em fases secundárias, foi realizada a análise por DRX após o tratamento térmico à 1000°C dos pós de sHA e sHA - GO. A alta cristalinidade, como pode ser visto pela menor largura a meia altura (FWHM) dos picos, é característica para materiais calcinados e/ou sinterizados. Além disso, observou-se que a decomposição da HA ocorreu somente em uma pequena fração de CaO (JCPDS 37-1497), não havendo a presença de outra fase de fosfato de cálcio (como, por exemplo, o β -TCP). Os difratogramas das amostras sHA e sHA - GO calcinadas podem ser observados na Figura 4.29.

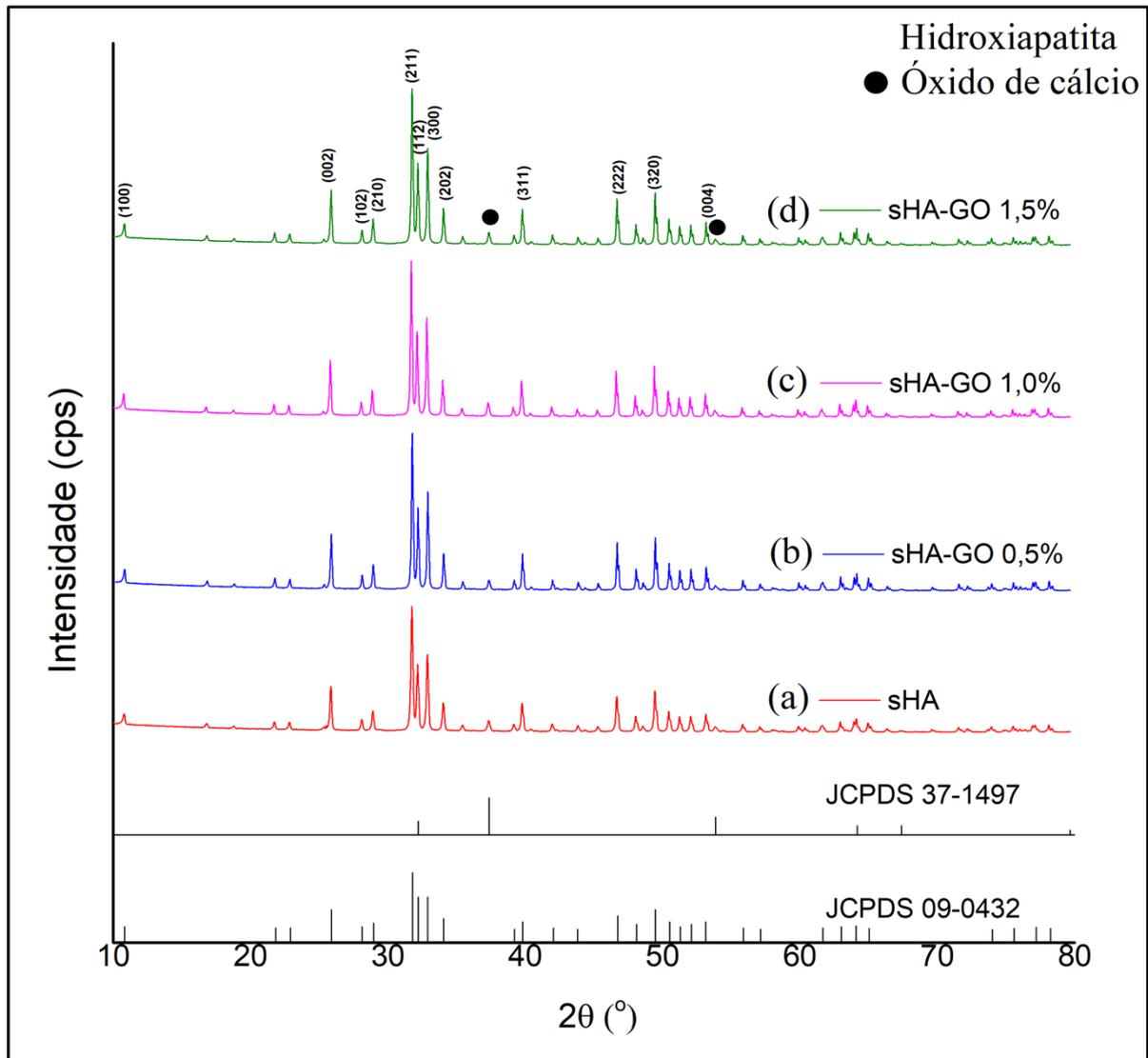


Figura 4.29 Difratograma dos pós (a) sHA, (b) sHA - GO 0,5%, (c) sHA - GO 1,0% e (d) sHA - GO 1,5%, após o tratamento térmico à 1000°C.

4.3.7 Ensaio de Bioatividade *in vitro*

A Figura 4.30 apresenta a micrografia obtida por MEV das amostras sHA e sHA - GO contendo 0,5%, 1,0% e 1,5%, em peso de GO imersas em meio McCoy durante 3, 7 e 14 dias. Para as amostras sHA, verificou-se a presença de aglomerados de morfologia arredondada, demonstrando que a deposição da apatita ocorreu após 3 dias de imersão em meio McCoy, quando em comparação com a amostra controle (0 dias). O crescimento da apatita com morfologia esférica também foi demonstrado por SOSSA *et al.*, (2018) em seu estudo, após a imersão das amostras de HA em solução SBF. No entanto, no presente trabalho, o crescimento da camada de apatita não ocorreu de maneira contínua após 7 e 14 dias de ensaio. Acredita-se que a morfologia encontrada após 3 dias de ensaio pode estar associada às primeiras etapas do mecanismo de formação de depósitos de apatita, devido a troca iônica entre os íons Ca^{2+} e PO_4^{3-} pertencentes à superfície do material com os íons H^+ da solução. Esta primeira etapa de troca iônica, que também pode ser definida como a dissolução superficial, não foi acompanhada por precipitação da apatita após 7 e 14 dias de ensaio. Como consequência, uma porosidade foi formada sobre a superfície da amostra, como observado no estudo de SIQUEIRA e ZANOTTO (2011). Esta tendência também foi observada para o nanocompósito sHA - GO contendo 1,5%, em peso de GO, demonstrando baixa precipitação dos depósitos de apatita após 7 e 14 dias de ensaio.

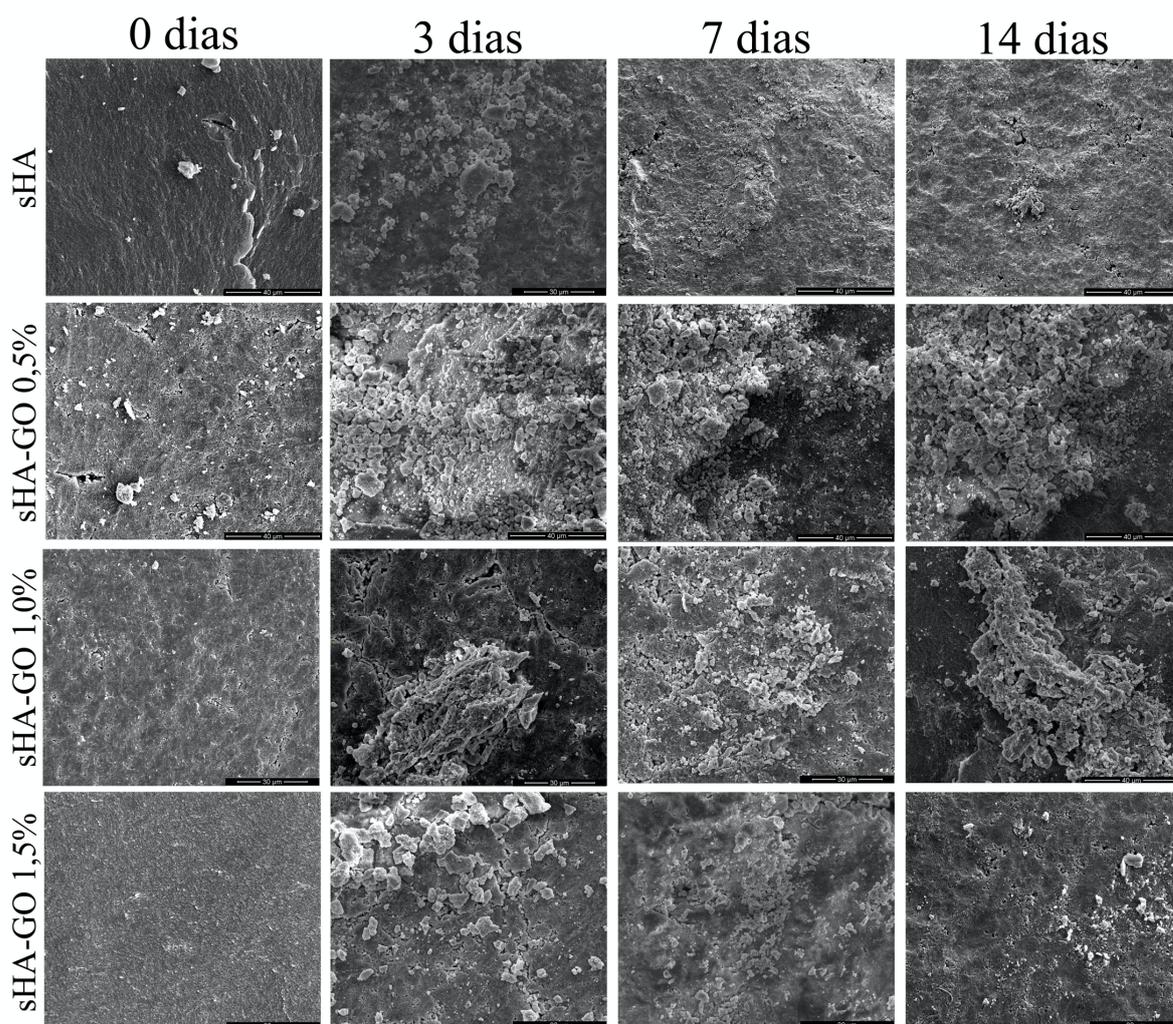


Figura 4.30 Ensaio de bioatividade das amostras sHA, sHA - GO 0,5%, sHA - GO 1,0% e sHA - GO 1,5% após 3, 7 e 14 dias de imersão em meio McCoy. Ampliação de 2.500x.

Já para as amostras sHA - GO 0,5% e sHA - GO 1,0%, o crescimento da camada de apatita foi observado de maneira mais pronunciado, demonstrando a capacidade de biomineralização destes nanocompósitos. Neste trabalho, o nanocompósito sHA - GO 0,5% demonstrou os melhores resultados em relação a bioatividade para os dias de ensaio analisado (3, 7 e 14 dias).

Ao comparar as duas rotas de produção deste trabalho (Rota 1 e 2), a maior ocorrência de depósitos de apatita pode ser visualizada para os nanocompósitos nHA - GO. Este resultado reforça a teoria de que a presença das folhas de grafeno na superfície das amostras esteja contribuindo fortemente para a formação da “*bone-like apatite*”. A alta razão de aspecto (isto é, a alta área superficial específica) e a presença dos grupos funcionais, apresentam-se como

dois fatores importantes que permitem a maior interação das folhas de GO em ambientes fisiológicos, além de providenciarem sítios de precipitação para a apatita (DONG e QI, 2015).

4.3.8 Ensaio de Citotoxicidade Indireta *in vitro*

Os extratos obtidos das amostras sHA e sHA - GO foram encaminhados para o ensaio da citotoxicidade *in vitro* por via indireta com as células-tronco mesenquimais da polpa do dente. O ensaio de viabilidade celular demonstrou que as amostras sHA e sHA - GO (0,5%, 1,0% e 1,5%, em peso de GO) não demonstraram citotoxicidade nos períodos de 24 e 48 horas. Os resultados apresentados na Figura 4.31 estão de acordo com outros estudos, no que diz respeito aos padrões de viabilidade celular de compósitos de HA-grafeno (LIU *et al.*, 2012; RODRÍGUEZ-GONZÁLEZ *et al.*, 2018).

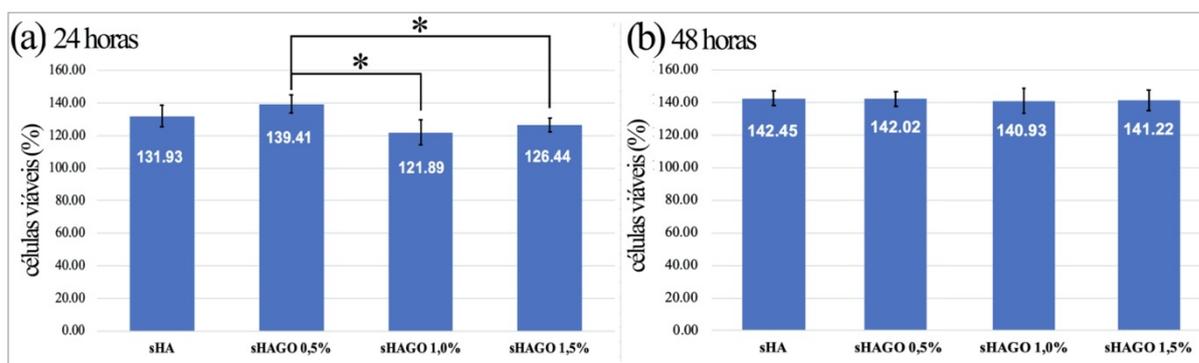


Figura 4.31 Ensaio de citotoxicidade indireta em células-tronco mesenquimais da polpa dentária expostas aos extratos das amostras sHA, sHA - GO 0,5%, sHA - GO 1,0% e sHA - GO 1,5% após 24 e 48 horas. (* valores de $p < 0,05$)

Além disso, todas as amostras apresentaram viabilidade celular maior que 120%, sendo a amostra sHA - GO 0,5% a que exibiu o melhor resultado no tempo de 24h. No entanto, foi observada uma redução na viabilidade celular de acordo o aumento na concentração de GO (1,0% e 1,5%, em peso). A viabilidade celular sobre as amostras sHA - GO 0,5% demonstraram uma diferença estatística significativa em relação às amostras sHA - GO 1,0% e sHA - GO 1,5% ($p < 0,02$ e $p < 0,04$, respectivamente). Esse fato pode estar associado aos bons resultados de citotoxicidade do grafeno quando em baixas concentrações, assim como visto para os nanocompósitos nHA - GO e, também, relatado por outros autores (KIM *et al.*, 2017; LIAO *et al.*, 2018). Estudos indicam que a morfologia das amostras dos nanocompósitos contendo HA-grafeno é um fator crítico para determinar a citotoxicidade para as células de

mamíferos (NIH 3T3) (RAMADAS *et al.*; 2017; RODRÍGUEZ-GONZÁLEZ *et al.*, 2018). Além disso, FATHYUNES *et al.* (2018) demonstraram que a diminuição do tamanho de cristais de HA pode ser um fator favorável para melhores resultados em ensaios por MTT, o que pode indicar a maior porcentagem de células viáveis neste trabalho.

Após 48 horas de ensaio, a alta viabilidade celular confirmou a biocompatibilidade das amostras, mesmo com o aumento da concentração de GO para 1,5%, em peso. Neste tempo de ensaio, não houve diferença estatística significativa entre os grupos (valor de p igual a 0,99). Apesar dos altos valores observados na Rota 2, é importante ressaltar que a diferença nas metodologias utilizadas para a viabilidade celular dos nanocompósitos de nHA - GO e sHA - GO inviabiliza uma comparação entre os ensaios. A avaliação da citotoxicidade para as amostras experimentais nHA - GO e sHA - GO demonstraram que os nanocompósitos produzidos possuem potencial para uso como biomaterial.

5 CONCLUSÕES

Com os resultados obtidos neste trabalho, foi possível chegar às seguintes conclusões:

O método de Hummers modificado para produção do GO mostrou-se adequado para a obtenção do grafeno *multilayer*, comprovado pelas análises por MEV, DRX, espectroscopia Raman, FTIR e TGA/DTG.

As duas metodologias inovadoras adotadas no presente trabalho foram eficazes para produzir compósitos nanoestruturados à base de grafeno, com propriedades bioativas e que não apresentaram citotoxicidade para as células-tronco mesenquimais da polpa do dente, sugerindo-os como materiais promissores para a regeneração de tecidos ósseos.

O aumento da adição de 0,5% para 1,5%, em peso de GO, levou a variação nas intensidades das bandas D e G e nos valores de deslocamento no espectro Raman. Além disso, a relação I_D/I_G , que revela a densidade de defeitos, foi menor para os nanocompósitos: 1,17, 1,14 e 1,02, quando comparado ao GO ($I_D/I_G=1,40$). Portanto, acredita-se que a variação nos valores das bandas D e G nos nanocompósitos, bem como a menor razão I_D/I_G , implicam em uma possível transformação estrutural no GO após a sua interação com as partículas nanométricas de HA.

A densidade de defeitos (relação I_D/I_G) encontrada para o nanocompósito sHA - GO, contendo 0,5%, 1,0% e 1,5%, em peso de GO correspondeu a: 1,39, 1,37 e 1,33, respectivamente. Esses resultados indicam uma sutil diminuição na razão de intensidade relativa I_D/I_G , quando comparado ao GO ($I_D/I_G = 1,40$). A proximidade entre os valores de I_D/I_G para o sHA - GO e o GO pode indicar que as interações eletrostáticas entre os grupos funcionais das superfícies do GO e a HA produza um material intercalado ou aglomerado, porém não havendo a deposição das nanopartículas de HA sobre as folhas de GO, como observado por MEV nas amostras nHA - GO.

Os testes de bioatividade *in vitro* em meio McCoy revelaram a formação da camada de apatita (*bone-like apatite*) nos nanocompósitos nHA - GO e sHA - GO, demonstrando uma maior bioatividade em comparação à HA pura. As folhas de GO, quando presentes na superfície das amostras, atuaram como sítios de nucleação e contribuíram fortemente para o crescimento desta camada de apatita. Além disso, em ensaio de viabilidade celular com células-tronco mesenquimais da polpa dentária, verificou-se a melhora nas propriedades biológicas com a

incorporação de baixas concentrações de GO na HA. Assim, como em outros estudos, a redução na viabilidade celular pode ser verificada em altas concentrações de GO, porém mantendo um alto nível de biocompatibilidade no presente trabalho.

6 SUGESTÕES PARA FUTUROS TRABALHOS

Como sugestões futuras para a continuidade do trabalho ou inovação para a área:

Avaliar o estado químico do GO presente na superfície das amostras por Espectroscopia de Fotoelétrons Excitados por Raios X (XPS);

Realizar tratamento térmico dos nanocompósitos em forno com atmosfera controlada (nitrogênio), avaliando a eficiência térmica e estabilidade do GO;

Fabricar *scaffolds* utilizando diferentes técnicas, como, por exemplo, método de fase de sacrifício, *freeze-casting* e deposição química dos nanocompósitos sobre uma estrutura 3D;

Avaliar os marcadores genéticos para a osteodiferenciação dos *scaffolds* HA - GO.

Realizar estudos *in vivo* dos *scaffolds* HA - GO em animais de pequeno e médio porte, e avaliar o resultado obtido em ensaios pré-clínicos e clínicos de eficácia e segurança.

Avaliar o tempo de degradação do material associado (*in vivo* e *in vitro*).

7 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AIZAWA, M.; HANAZAWA, T.; ITATANI, K.; HOWELL, F. S.; KISHIOKA, A. Characterization of hydroxyapatite powders prepared by ultrasonic spray-pyrolysis technique. **Journal of materials science**, v. 34, n. 12, p. 2865-2873, 1999.

APARICIO, C; GINEBRA, M. P. **Biom mineralization and Biomaterials: Fundamentals and Applications**. 1ª Ed. Cambridge: Elsevier, 2016.

ATTAF, B. **Advances in composite materials for medicine and nanotechnology**. Croácia: InTech, 2011.

BARADARAN, S.; MOGHADDAM, E.; BASIRUN, W. J.; MEHRALI, M.; SOOKHAKIAN, M.; HAMDI, M.; MOGHADDAM, M. N.; ALIAS, Y. Mechanical properties and biomedical applications of a nanotube hydroxyapatite-reduced graphene oxide composite. **Carbon**, v. 69, p. 32-42, 2014.

BASIRUN, W. J.; NASIRI-TABRIZI, B.; BARADARAN, S. Overview of hydroxyapatite–graphene nanoplatelets composite as bone graft substitute: Mechanical behavior and in-vitro biofunctionality. **Critical Reviews in Solid State and Materials Sciences**, v. 43, n. 3, p. 177-212, 2018.

BEN-NISSAN, B. **Advances in Calcium Phosphate Biomaterials**. 1ª Ed. Australia: Springer, 2014

BERTAZZO, S.; ZAMBUZZI, W. F.; CAMPOS, D. D.; OGEDA, T. L.; FERREIRA, C. V.; BERTRAN, C. A. Hydroxyapatite surface solubility and effect on cell adhesion. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 78, n. 2, p.177-184, 2010.

BERZINA-CIMDINA, L.; BORODAJENKO, N. Research of calcium phosphates using Fourier transform infrared spectroscopy. **In Infrared Spectroscopy-Materials Science, Engineering and Technology**, v.12, n. 7, p. 251-263, 2012.

BIANCO, A.; CHENG, H. M.; ENOKI, T.; GOGOTSI, Y.; HURT, R. H.; KORATKAR, N.; KYOTANI, T.; MONTHIOUX, M.; PARK, C. R.; TASCÓN, J. M.; ZHANG, J. All in the graphene family – A recommended nomenclature for two-dimensional carbon materials. **Carbon**, v. 65, p. 1-6, 2013.

BONACCORSO, F.; LOMBARDO, A.; HASAN, T.; SUN, Z.; COLOMBO, L.; FERRARI, A. C. Production and processing of graphene and 2D crystals. **Materials Today**, v. 15, n. 12, p. 564-589, 2012.

BOSH, P; NIÉPCE. J. C. **Ceramic Materials**. 1ª Ed. France: Hermes Science Publication, 2001.

BUSSY, C.; ALI-BOUCETTA, H.; KOSTARELOS, K. Safety considerations for graphene: lessons learnt from carbon nanotubes. **Accounts of Chemical Research**, v. 46, n. 3, p. 692-701, 2012.

CALLISTER, W.D.; RETHWISCH, D.G. **Ciência e Engenharia de Materiais: Uma Introdução**. 8ª Ed. Rio de Janeiro: Editora LTC., 2013.

CANÇADO, L. G.; JORIO, A.; FERREIRA, E. H. M.; STAVALE, F.; ACHETE, C. A.; CAPAZ, R. B.; MOUTINHO, M. V. O.; LOMBARDO, A.; KULMALA, T. S.; FERRARI, A. C. Quantifying defects in graphene via Raman spectroscopy at different excitation energies. **Nano letters**, v. 11, n. 8, p. 3190-3196, 2011.

CASTRO NETO, A. C.; GUINEA, F.; PERES, N. M.; NOVOSELOV, K. S.; GEIM, A. K. The electronic properties of graphene. **Reviews of Modern Physics**, v. 81, n. 1, p. 109-162, 2009.

CASTRO NETO, A. H. The Carbon new age. **Materials Today**, v. 13, p. 12-17, 2010.
DIMIEV, A. M.; TOUR, J. M. Mechanism of Graphene Oxide Formation. **ACS Nano**, v. 8, n. 3, p. 3060-3068, 2014.

DONG, H. S.; QI, S. J. Realising the potential of graphene-based materials for biosurfaces—A future perspective. **Biosurface and Biotribology**, v. 1, n. 4, p. 229-248, 2015.

DOROZHKIN, S. V. Multiphasic calcium orthophosphate (CaPO₄) bioceramics and their biomedical application. **Ceramics International**, v. 42, n. 6, p. 6529-6554, 2016.

DOROZHKIN, S. V. Nanodimensional and nanocrystalline apatites and other calcium orthophosphates in biomedical engineering, biology and medicine. **Materials**, v. 2, n. 4, p. 1975-2045, 2009.

DUAN, P.; SHEN, J.; ZOU, G.; XIA, X.; JIN, B. Biomimetic mineralization and cytocompatibility of nanorod hydroxyapatite/graphene oxide composites. **Frontiers of Chemical Science and Engineering**, v. 12, n. 4, p. 798-805, 2018.

EQTESADI, S.; MOTEALLEH, A.; WENDELBO, R.; ORTIZ, A. L.; MIRANDA, P. Reinforcement with reduced graphene oxide of bioactive glass scaffolds fabricated by robocasting. **Journal of the European Ceramic Society**, v. 37, n. 12, p. 3695-3704, 2017.

FARIA, G. S.; LIMA, A. M.; BRANDÃO, L. P.; COSTA, A. P.; NARDECCHIA, S.; RIBEIRO, A. A.; PINHEIRO, W. A. Produção e caracterização de óxido de grafeno e óxido de grafeno reduzido com diferentes tempos de oxidação. **Revista Matéria**, v. 22, p. 1-9, 2017

FATHYUNES, L.; KHALIL-ALLAFI, J.; SHEYKHOESLAMI, S. O. R.; MOOSAVIFAR, M. Biocompatibility assessment of graphene oxide-hydroxyapatite coating applied on TiO₂ nanotubes by ultrasound-assisted pulse electrodeposition. **Materials Science and Engineering: C**, v. 87, p. 10-21, 2018.

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

FERRARI, A. C.; MEYER, J. C.; SCARDACI, V.; CASIRAGHI, C.; LAZZERI, M.; MAURI, F.; PISCANEC, S.; JIANG, D.; NOVOSELOV, K. S.; ROTH, S.; GEIM, A. K. Raman spectrum of graphene and graphene layers. **The American Physical Society**, v. 97, n. 18, p. 1-4, 2006.

FERRARI, A. C. Raman spectroscopy of graphene and graphite: Disorder, electron–phonon coupling, doping and nonadiabatic effects. **Solid State Communications**, v.143, n. 1-2, p. 47-57, 2007.

FERRARI, A. C.; BASKO, D. M. Raman spectroscopy as a versatile tool for studying the properties of graphene. **Nature Nanotechnology**, v. 8, n. 4, p. 235-246, 2013.

FERRARI, A. C.; BONACCORSO, F.; FAL'KO, V.; NOVOSELOV, K. S.; ROCHE, S.; BØGGILD, P.; BORINI, S.; KOPPENS, F. H.; PALERMO, V.; PUGNO, N.; GARRIDO, J. A. Science and technology roadmap for graphene, related two-dimensional crystals, and hybrid systems. **Nanoscale**, v.7, n. 11, p. 4598-4810, 2015.

FERRAZ, M. P.; MONTEIRO, F. J.; MANUEL, C. M. Hydroxyapatite nanoparticles: A review of preparation methodologies. **Journal of Applied Biomaterials & Biomechanics**, v. 2, n. 2, p. 74-80, 2004.

FERREIRA, J. R. M. **Casca de ovo de avestruz como fonte de cálcio para recobrimento de superfícies de titânio e síntese de hidroxiapatita e hidroxiapatita contendo zinco**. 2015. Tese (Doutorado em Ciência dos Materiais) – Instituto Militar de Engenharia, Rio de Janeiro.

FERREIRA, J. R. M.; NAVARRO DA ROCHA, D.; LOURO, L. H. L.; PRADO DA SILVA, M. H. **Phosphating of Calcium Carbonate for Obtaining Hydroxyapatite From the Ostrich Egg Shell**. In **Key Engineering Materials**, v. 587, p. 69-73, 2014.

FIHRI A.; LEN C.; VARMA R.S.; SOLHY A. Hydroxyapatite: A review of syntheses, structure and applications in heterogeneous catalysis. **Coordination Chemistry Reviews**, v. 347, p. 48-76, 2017.

FONSECA, M. F. **Síntese de Hidroxiapatita Dopada com Prata**. 2015. Tese de Doutorado, Instituto Militar de Engenharia, Rio de Janeiro.

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

GIES, V.; ZOU, S. Systematic toxicity investigation of graphene oxide: evaluation of assay selection, cell type, exposure period and flake size. **Toxicology research**, v. 7, n. 1, p. 93-101, 2018.

GITTENS, R. A.; MCLACHLAN, T.; OLIVARES-NAVARRETE, R.; CAI, Y.; BERNER, S.; TANNENBAUM, R.; SCHWARTZ, Z.; SANDHAGE, K. H.; BOYAN, B. D. The effects of combined micron-/submicron-scale surface roughness and nanoscale features on cell proliferation and differentiation. **Biomaterials**, v. 32, n. 13, p. 3395-3403, 2011.

GONG, M.; ZHAO, Q.; DAI, L.; LI, Y.; JIANG, T. Fabrication of polylactic acid/hydroxyapatite/graphene oxide composite and their thermal stability, hydrophobic and mechanical properties. **Journal of Asian Ceramic Societies**, v. 5, n. 2, p. 160-168, 2017.

GONG, M.; ZHAO, Q.; DAI, L.; LI, Y.; JIANG, T. Fabrication and Friction Coefficient of Graphene Oxide Reinforced Hydroxyapatite Composite. **Journal of Nanoscience and Nanotechnology**, v. 18, n. 3, p. 1893–1900, 2018.

HENCH, L. L. Bioceramics. **Journal of the American Ceramic Society**, v. 81, p. 1705-1707, 1998.

HENCH, L. L. Biomaterials. **Science**, v. 208, p. 826-831, 1980.

HENCH, L. L.; POLAK, J. M. Third-Generation Biomedical Materials. **Science**, v. 295, p. 1014-1017, 2002.

HERNLUND, E.; SVEDBOM, A.; IVERGÅRD, M.; COMPSTON, J.; COOPER, C.; STENMARK, J.; MCCLOSKEY, E.V.; JÖNSSON, B.; KANIS, J.A. Osteoporosis in the European Union: Medical Management, Epidemiology and Economic Burden. **Archives of osteoporosis**, v.8, (1-2), p.136, 2013.

HUANG, Y.; HUANG, W.; SUN, L.; WANG, Q.; HE, A.; HAN, C. C. Phase Transition from a-TCP into b-TCP in TCP/HA Composites. **International Journal of Applied Ceramic Technology**, v. 7, n. 2, p. 184-188, 2010.

HULBERT, S.F.; HENCH, L. L.; FORBERS, D.; BOWMAN, L. S. History of bioceramics. **Ceramics international**, v. 8, n. 4, p. 131-140, 1982.

HUMMERS, W. S.; OFFEMAN, R. E. Preparation of Graphitic Oxide. **Journal of the american chemical society**, v. 80, n. 6, p. 1339, 1958

IACOBONI, I.; PERROZZI, F.; MACERA, L.; TAGLIERI, G.; OTTAVIANO, L.; FIORAVANTI, G. In situ syntheses of hydroxyapatite-grafted graphene oxide composites. **Journal of Biomedical Materials Research Part A**, v. 107, p. 2026-2039, 2019.

JAIN, A.; JAISWAL, S.; VIKEY, A.; BAGULKAR, B.; BHAT, A. Graphene - An emerging star in the field of nanotechnology. **International Journal of Applied Research**, v. 2, p. 1082-1085, 2016.

KANIYOOR, A.; RAMAPRABHU, S. A Raman spectroscopic investigation of graphite oxide derived graphene. **Aip advances**, v. 2, n. 3, p. 1-14, 2012.

KERN, W. **RCA Critical Cleaning Process**. Disponível em: http://www.microtechprocess.com/pdf/MTS_RCA.pdf. Acesso em: 13 de março de 2018.

KIM, J.; KIM, F.; HUANG, J. Seeing graphene-based sheets. **Materials Today**, v. 13, n. 3, p. 29-38, 2010.

KIM, J.W.; SHIN, Y.; LEE, J. J.; BAE, E. B.; JEON, Y. C.; JEONG, C. M.; YUN, M. J.; LEE, S. H.; HAN, D. W.; HUH, J. B. The effect of reduced graphene oxide-coated biphasic calcium phosphate bone graft material on osteogenesis. **International Journal of Molecular Sciences**, v.18, n. 8, p. 1725, 2017.

KOKUBO T. Surface chemistry of bioactive glass-ceramics. **Journal of Non-Crystalline Solids**, v. 120, n. 1-3, p. 138-151, 1990.

KOKUBO, T.; TAKADAMA, H. How useful is SBF in predicting in vivo bone bioactivity? **Biomaterials**, v. 27, n. 15, p. 2907-2915, 2006.

KOKUBO, T.; YAMAGUCHI, S. Simulated body fluid and the novel bioactive materials derived from it. **Journal of Biomedical Materials Research Part A**, v. 107, n. 5, p. 968-977, 2019

KOUTSOPOULOS, S. Synthesis and characterization of hydroxyapatite crystals: A review study on the analytical methods. **Jornal of Biomedical Materials Research.**, v. 62, n. 2002, p. 600-612, 2002.

KUMAR, C.; PATTAMMATTEL, A. **Introduction to Graphene**. 1^a ed. USA: Elsevier, 2017.

KUMAR, S.; GAUTAM, C.; MISHRA, V. K.; CHAUHAN, B. S.; SRIKRISHNA, S.; YADAV, R. S.; TRIVEDI, R.; RAI, S. B. Fabrication of Graphene Nanoplatelet-Incorporated Porous Hydroxyapatite Composites: Improved Mechanical and in Vivo Imaging Performances for Emerging Biomedical Applications. **ACS Omega**, v. 4, n. 4, p. 7448-7458, 2019.

KUTZ, M. **Biomedical Engineering and Design Handbook**. 2^a ed. The McGraw-Hill Companies, 2009.

LAONAPAKUL, T. Synthesis of hydroxyapatite from biogenic wastes. **Engineering and Applied Science Research**, v. 42, n. 3, p. 269-275, 2015.

LEE, C.; WEI, X.; KYSAR, J. W.; HONE, J. Measurement of the elastic properties and intrinsic strength of monolayer graphene. **Science**, v. 321, n. 5887, p. 385-388, 2008.

LEE, D. W.; DE LOS SANTOS V. L.; SEO, J. W.; FELIX, L. L.; BUSTAMANTE D. A.; COLE, J. M.; BARNES, C. H. W. The structure of graphite oxide: investigation of its surface chemical groups. **Journal of Physical Chemistry B**, v. 114, n. 17, p. 5723-5728, 2010.

LEE, J. T.; LENG, Y.; CHOW, K. L.; REN, F.; GE, X.; WANG, K.; LU, X. Cell culture medium as an alternative to conventional simulated body fluid. **Acta Biomaterialia**, v. 7, n. 6, p. 2615-2622, 2011.

LEE, J. H.; SHIN, Y. C.; LEE, S. M.; JIN, O. S.; KANG, S. H.; HONG, S. W.; JEONG, C. M.; HUH, J. B.; HAN, D. W. Enhanced osteogenesis by reduced graphene oxide/hydroxyapatite nanocomposites. **Scientific Reports**, v. 5, p. 1-13, 2015.

LEGEROS, R. Z. Calcium phosphate-based osteoinductive materials. **Chemical Reviews**, v. 108, n. 11, p.4742-4753, 2008.

LI, M.; WANG, Y.; LIU, Q.; LI, Q.; CHENG, Y.; ZHENG, Y.; XI, T.; WEI, S. In situ synthesis and biocompatibility of nano hydroxyapatite on pristine and chitosan functionalized graphene oxide. **Journal of Materials Chemistry B**, v. 1, n. 4, p. 475-484, 2013.

LI, M.; XIONG, P.; YAN, F.; LI, S.; REN, C.; YIN, Z.; LI, A.; LI, H.; JI, X.; ZHENG, Y.; CHENG, Y. An overview of graphene-based hydroxyapatite composites for orthopedic applications. **Bioactive materials**, v. 3, n. 1, p. 1-18, 2018.

LIAO, C. J.; LIN, F. H.; CHEN, K. S.; SUN, J. S. Thermal decomposition and reconstitution of hydroxyapatite in air atmosphere. **Biomaterials**, v. 20, n. 19, p. 1807-1813, 1999.

LIAO, C.; LI, Y.; TJONG, S. C. Graphene nanomaterials: synthesis, biocompatibility, and cytotoxicity. **International journal of molecular sciences**, v. 19, n. 11, p. 3564, 2018.

LIU Q.; HUANG S.; MATINLINNA J. P.; CHEN Z.; PAN H. Insight into Biological Apatite: Physiochemical Properties and Preparation Approaches. **BioMed Research International**, v. 1, p. 1-13, 2013.

LIU, H.; XI, P.; XIE, G.; SHI, Y.; HOU, F.; HUANG, L.; CHEN, F.; ZENG, Z.; SHAO, C.; WANG, J. Simultaneous reduction and surface functionalization of graphene oxide for hydroxyapatite mineralization. **The Journal of Physical Chemistry C**, v. 116, n. 5, p. 3334-3341, 2012.

LOGESH, M.; MARIMUTHU, A.; BALLAMURUGAN, A. M. Fabrication of graphene incorporated biphasic calcium phosphate composite and evaluation of impact of graphene in the in-vitro biomineralization process. **Materials Chemistry and Physics**, v. 232, p. 75-81, 2019.

LUCAS, E. F.; SOARES, B. G.; MONTEIRO, E. E. Caracterização de polímeros, determinação de peso molecular e análise térmica. 1ª ed. Rio de Janeiro: E-papers, 2001.

MARCANO, D. C.; KOSYNKIN, D. V.; BERLIN, J. M.; SINITSKII, A.; SUN, Z.; SLESAREV, A.; ALEMANY, L. B.; LU, W.; TOUR, J. M. Improved Synthesis of Graphene Oxide. **ACS Nano**, v.4, n.8, p.4806-4814, 2010.

MARTINS FERREIRA, E.; MOUTINHO, M. V.; STAVALE, F.; LUCCHESI, M. M.; CAPAZ, R. B.; ACHETE, C. A.; JORIO, A. Evolution of the Raman spectra from single-, few-, and many-layer graphene with increasing disorder. **Physical Review B**, v. 82, n. 12, p. 1-9, 2010

MATOS, C. F. **Materiais nanocompósitos multifuncionais formados por látices poliméricos e grafeno ou óxido de grafeno: síntese, caracterização e propriedades**. Tese de Doutorado. Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2015.

MATSUMOTO, T.; OKAZAKI, M.; INOUE, M.; HAMADA, Y.; TAIRA, M.; TAKAHASHI, J. Crystallinity and solubility characteristics of hydroxyapatite adsorbed amino acid. **Biomaterials**, v. 23, n.10, p. 2241-2247, 2002.

MELEK, L. N. Tissue engineering in oral and maxillofacial reconstruction. **Tanta Dental Journal**, v. 12, n. 3, p. 1-13, 2015.

MERLEN, A.; BUIJNSTERS, J. G.; PARDANAUD, C. A guide to and review of the use of multiwavelength Raman spectroscopy for characterizing defective aromatic carbon solids: From graphene to amorphous carbons. **Coatings**, v. 7, n. 10, p. 153, 2017.

MOBASHERPOUR, I.; HESHAJIN, M. S.; KAZEMZADEH, A.; ZAKERI, M. Synthesis of nanocrystalline hydroxyapatite by using precipitation method. **Journal of Alloys and Compounds**, v. 430, n. 1-2, p. 330-333, 2007.

MOHANDDES, F; SALAVATI-NIASARI, M. Freeze-drying synthesis, characterization and in vitro bioactivity of chitosan/graphene oxide/hydroxyapatite nanocomposite. **RSC Advances**, v. 4, n. 49, p. 25993-26001, 2014.

MUZYKA, R.; DREWNIAK, S.; PUSTELNY, T.; CHRUBASIK, M.; GRYGLEWICZ, G. Characterization of graphite oxide and reduced graphene oxide obtained from different graphite precursors and oxidized by different methods using Raman spectroscopy. **Materials**, v. 11, n. 7, p.1050, 2018

NAIR M.; NANCY D.; KRISHNAN A, G.; ANJUSREE G. S.; VADUKUMPULLY S.; NAIR S. V. Graphene oxide nanoflakes incorporated gelatin–hydroxyapatite scaffolds enhance osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells. **Nanotechnology**, v. 26, n. 16, p. 1-10, 2015.

NAVARRO DA ROCHA, D.; GOBBO, L. A; PRADO DA SILVA, M. Production and characterization of niobate apatite. **J. Mater. Res. Technol.**, v, 2, n.1, p. 24-29, 2013.

NAVARRO, M.; MICHIARDI, A.; CASTANO, O.; PLANELL, J.A. Biomaterials in orthopaedics. **J. R. Soc. Interface**, v. 5, n. 27, p. 1137-1158, 2008.

NAYAK T. R.; ANDERSEN H.; MAKAM V. S.; KHAW C.; BAE S.; XU X.; EE P. L.; AHN J. H.; HONG B. H.; PASTORIN G.; OZYILMAZ B. Graphene for controlled and accelerated osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells. **ACS nano**, v. 11, n. 6, p. 4670-4678, 2011.

NEELGUND, G. M.; OKI, A.; LUO, Z. In situ deposition of hydroxyapatite on graphene nanosheets. **Materials research bulletin**, v. 48, n. 2, p. 175-179, 2013.

NOSENKO, V. V.; YAREMKO, A. M.; DZHAGAN, V. M.; VORONA, I. P.; ROMANYUK, Y. A.; ZATOVSKY, I. V. Nature of some features in Raman spectra of hydroxyapatite-containing materials. **Jornal of Raman Spectroscopy**, v. 47, n. 6, p. 726-730, 2016.

NOVOSELOV, K. S.; FAL, V. I.; COLOMBO, L.; GELLERT, P. R.; SCHWAB, M. G.; KIM, K. A roadmap for graphene. **Nature**, v. 490, n. 7419, p. 192-200, 2012.

NOVOSELOV, K. S.; GEIM, A. K.; MOROZOV, S. V.; JIANG, D.; ZHANG, Y., DUBONOS, S. V.; GRIGORIEVA, I. V.; FIRSOV, A. A. Electric field effect in atomically thin carbon films. **Science**, v. 306, n. 5696, p. 666-669, 2004.

OU, L.; SONG, B.; LIANG, H.; LIU, J.; FENG, X.; DENG, B.; SUN, T.; SHAO, L. Toxicity of graphene-family nanoparticles: a general review of the origins and mechanisms. **Particle and fibre toxicology**, v. 13, n. 1, p. 57, 2016.

PAPAGEORGIOU, D. G.; KINLOCH, I. A.; YOUNG, R. J. Mechanical properties of graphene and graphene-based nanocomposites. **Progress in Materials Science**, v. 90, p. 75–127, 2017.

PARK, C. M.; XIAN, M. Use of phosphorodithioate-based compounds as hydrogen sulfide donors. **In Methods in enzymology**, v. 554, p. 127-142, 2015.

PATEL, N. R.; GOHIL, P. P. A Review on biomaterials: scope, applications & human anatomy significance. **International Journal of Emerging Technology and Advanced Engineering**, v. 2, n. 4, p. 91-101, 2012.

PAZ, A.; GUADARRAMA, D.; LÓPEZ, M.; E GONZÁLEZ, J.; BRIZUELA, N.; ARAGÓN, J. A comparative study of hydroxyapatite nanoparticles synthesized by different routes. **Química Nova**, v. 35, n. 9, p.1724-1727, 2012.

POTTER, J. K.; ELLIS, E. Biomaterials for reconstruction of the internal orbit. **J Oral Maxillofac Surgery**, v. 10, p. 1280-1297, 2004.

POTTER, J. K.; MALMQUIST, M.; ELLIS, E. Biomaterials for reconstruction of the internal orbit. **Oral and Maxillofacial Surgery Clinics**, v. 24, n. 4, p. 609-627, 2012.

PRAMANIK S.; AGARWAL A. K.; RAI K. N.; GARG A. Development of high strength hydroxyapatite by solid-state-sintering process. **Ceramics international**, v. 33, n. 3, p. 419–426, 2007.

PRUNA, A.; PULLINI, D.; BUSQUETS, D. Influence of synthesis conditions on properties of green-reduced graphene oxide. **Journal of nanoparticle research**, v. 15, n. 5, p. 1-11, 2013.

RAJAGOPALAN, B.; CHUNG, J. S. Reduced chemically modified graphene oxide for supercapacitor electrode. **Nanoscale research letters**, v. 9, n. 1, p. 1-10, 2014.

RAJESH, A.; MANGAMMA, G.; SAIRAM, T. N.; SUBRAMANIAN, S.; KALAVATHI, S.; KAMRUDDIN, M.; DASH, S. Physicochemical properties of nanocomposite: hydroxyapatite in reduced graphene oxide. **Materials Science and Engineering: C**, v. 76, p. 203-210, 2017.

RAMADAS, M.; BHARATH, G.; PONPANDIAN, N.; BALLAMURUGAN, A. M. Investigation on biophysical properties of Hydroxyapatite/Graphene oxide (HAp/GO) based

binary nanocomposite for biomedical applications. **Materials Chemistry and Physics**, v. 199, p. 179-184, 2017.

RATNER, B. D.; HOFFMAN, A. S.; SCHOEN, F. J.; LEMONS, J. E. **Biomaterials science: an introduction to materials in medicine**. Estados Unidos: Elsevier, 2013.

RAUCCI, M. G.; GIUGLIANO, D.; LONGO, A.; ZEPPELELLI, S.; CAROTENUTO, G.; AMBROSIO, L. Comparative facile methods for preparing graphene oxide–hydroxyapatite for bone tissue engineering. **Journal of tissue engineering and regenerative medicine**, v. 11, n, 8, p. 2204-2216, 2017.

REZAEI, H. R.; BAKHTIARI, L.; ÖCHSNER, A. **Biomaterials and Their Applications**. 1ª ed. Berlin: Springer, 2015.

RODRÍGUEZ-GONZÁLEZ, C.; CID-LUNA, H. E.; SALAS, P.; CASTAÑO, V. M. Hydroxyapatite-Functionalized Graphene: A New Hybrid Nanomaterial. **Journal of Nanomaterials**, v. 1, p. 1-7, 2014.

RODRÍGUEZ-GONZÁLEZ, C.; SALAS, P.; LÓPEZ-MARÍN, L. M.; MILLÁN-CHIU, B.; DE LA ROSA, E. Hydrothermal synthesis of graphene oxide/multiform hydroxyapatite nanocomposite: its influence on cell cytotoxicity. **Materials Research Express**, v. 5, n. 12, p. 1-10, 2018.

ROURKE, J. P.; PANDEY, P. A.; MOORE, J. J.; BATES, M.; KINLOCH, I. A.; YOUNG, R. J.; WILSON, N. R. The real graphene oxide revealed: stripping the oxidative debris from the graphene-like sheets. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 50, n.14, p. 3173-3177, 2011.

SADAT-SHOJAI M.; KHORASANI M. T.; DINPANAH-KHOSHDARGI E.; JAMSHIDI A. **Synthesis methods for nanosized hydroxyapatite in diverse structures**. **Acta Biomaterialia**, v. 9, n. 8, p. 7591-7621, 2013.

SANCHEZ, V. C.; JACHAK, A.; HURT, R. H.; KANE, A. B. Biological interactions of graphene-family nanomaterials: an interdisciplinary review. **Chemical Research in Toxicology**, v. 25, n. 1, p. 15-34, 2011.

SEABRA, A. B.; PAULA, A. J.; DE LIMA, R.; ALVES, O. L.; DURAN, N. Nanotoxicity of graphene and graphene oxide. **Chemical research in toxicology**, v. 27, n.2, p.159–168, 2014

SHADJOU, N.; HASANZADEH, M.; KHALILZADEH, B. Graphene based scaffolds on bone tissue engineering. **Journal Bioengineered**, v. 9, n. 1, p. 38-47, 2018.

SHEN, Y. LUA, A.C. A facile method for the large-scale continuous synthesis of graphene sheets using a novel catalyst. **Scientific reports**, v.24, n. 3, p. 3037, 2013.

SIQUEIRA, R. L.; ZANOTTO, E. D. Biosilicato®: histórico de uma vitrocerâmica brasileira de elevada bioatividade. **Química nova**, v. 34, n. 7, p. 1231-1241, 2011.

SMITH, L. Ceramic-plastic material as a bone substitute. **Archives of Surgery**, v. 87, n. 4, p. 653-661, 1963.

- SOSSA, P. A. F.; GIRALDO, B. S.; GARCIA, B. C. G.; PARRA, E. R.; ARANGO, P. J. A. Comparative study between natural and synthetic Hydroxyapatite: structural, morphological and bioactivity properties. **Matéria (Rio de Janeiro)**, v. 23, n. 4, p.1-17, 2018.
- STAMMEIER, J. A.; PURGSTALLER, B.; HIPPLER, D.; MAVROMATIS, V.; DIETZEL, M. In-situ Raman spectroscopy of amorphous calcium phosphate to crystalline hydroxyapatite transformation. **MethodsX**, v. 5, p. 1241-1250, 2018.
- SUMATHRA, M.; SADASIVUNI, K. K.; KUMAR, S. S.; RAJAN, M. Cisplatin-Loaded graphene oxide/chitosan/hydroxyapatite composite as a promising tool for osteosarcoma-affected bone regeneration. **ACS omega**, v. 3, n. 11, p. 14620-14633, 2018.
- TAVAFOGHI, M., BRODUSCH, N., GAUVIN, R., & CERRUTI, M. Hydroxyapatite formation on graphene oxide modified with amino acids: arginine versus glutamic acid. **Journal of The Royal Society Interface**, v. 13, n. 114, p. 20150986, 2016.
- THOMAS, S.; THOMAS, R.; ZACHARIAH, A. K.; MISHRA, R. K. Spectroscopic methods for nanomaterials characterization. 2^o ed. Cambridge: Elsevier, 2017.
- THOMPSON, B. C.; MURRAY, E.; WALLACE, G. G. Graphite oxide to graphene. biomaterials to bionics. **Advanced Materials**, v. 27, n. 46, p. 7563-7582, 2015.
- TONSUAADU, K.; GROSS, K. A.; PLŪDUMA, L.; VEIDERMA, M. A review on the thermal stability of calcium apatites. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, v. 110, n. 2, p. 647-659, 2011.
- TOUR, J.M. Top-down versus bottom-up fabrication of graphene-based electronics. **Chemistry of Materials**, v. 26, n.1, p, 163-171, 2014.
- ȚUCUREANU, V.; MATEI, A.; AVRAM, A. M. FTIR Spectroscopy for Carbon Family Study. **Critical reviews in analytical chemistry**, v. 46, n. 6, p. 502-520, 2016.
- VALLET-REGÍ, M.; GONZÁLEZ-CALBET, J. M. **Calcium phosphates as substitution of bone tissues**. Progress in Solid State Chemistry, v. 32, p. 1-31, 2004.
- WALLACE, P. R. The band theory of graphite. **Physical Review**, v. 71, n. 9, p.622-634, 1947.
- WANG, L.; NANCOLLAS, G. H. Calcium orthophosphates: crystallization and dissolution. **Chemical reviews**, v. 108, n. 11, p. 4628-4669, 2008.
- WANG, P.; LI, C.; GONG, H.; JIANG, X.; WANG, H.; LI, K. Effects of synthesis conditions on the morphology of hydroxyapatite nanoparticles produced by wet chemical process. **Powder Technology**, v. 203, n. 2, p. 315-321, 2010.
- WILLIAMS, D. F.; On the nature of biomaterials. **Biomaterials**, v. 30, n. 30, p. 5897-5909, 2009.

WOJDYR, M. Fityk: a general-purpose peak fitting program. **Journal of Applied Crystallography**, v. 43, n. 5-1, p. 1126-1128, 2010.

YANG, H.; LI, H.; ZHAI, J.; SUN, L.; YU, H. Simple synthesis of graphene oxide using ultrasonic cleaner from expanded graphite. **Industrial & Engineering Chemistry Research**, v. 53, n. 46, p. 17878-17883, 2014.

YILMAZ, B.; EVIS, Z. Raman Spectroscopy Investigation of Nano Hydroxyapatite Doped with Yttrium and Fluoride Ions. **Spectroscopy Letters**, v. 47, n.1, p. 24-29, 2014.

ZHANG, L.; LIU, W.; YUE, C.; ZHANG, T.; LI, P.; XING, Z.; CHEN, Y. A tough graphene nanosheet/hydroxyapatite composite with improved in vitro biocompatibility. **Carbon**, v. 61, p. 105-115, 2013.

ZORZI, A. **Bone Grafting**. Croatia: InTech, 2012.