

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E
ENGENHARIA DE MATERIAIS**

Useche dos Santos Inchauspe

**SÍNTESE DE BIOMATERIAIS COMPÓSITOS DE
HIDROXIAPATITA E NANOESTRUTURAS DE CARBONO**

Florianópolis
2017

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E
ENGENHARIA DE MATERIAIS**

Useche dos Santos Inchauspe

**SÍNTESE DE BIOMATERIAIS COMPÓSITOS DE
HIDROXIAPATITA E NANOESTRUTURAS DE CARBONO**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Engenharia de Materiais da Universidade Federal de Santa Catarina para a obtenção do Grau de Mestre em Ciência e Engenharia de Materiais.

Orientador: Prof. Dr.-Ing. Márcio Celso Fredel.

Co-orientador: Prof. Dr. Luiz Dias Probst.

Florianópolis
2017

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Inchauspe, Useche dos Santos
Síntese de biomateriais compósitos de
Hidroxiapatita e nanoestruturas de carbono / Useche
dos Santos Inchauspe ; orientador, Márcio Celso
Fredel, coorientador, Luiz Fernando Dias Probst,
2017.
85 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de
Santa Catarina, Centro Tecnológico, Programa de Pós
Graduação em Ciência e Engenharia de Materiais,
Florianópolis, 2017.

Inclui referências.

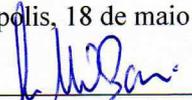
1. Ciência e Engenharia de Materiais. 2.
Biomateriais. 3. Nanoestruturas de Carbono. 4.
Hidroxiapatita. I. Fredel, Márcio Celso. II.
Probst, Luiz Fernando Dias. III. Universidade
Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação
em Ciência e Engenharia de Materiais. IV. Título.

Useche dos Santos Inchauspe

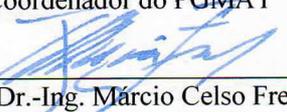
**SÍNTESE DE BIOMATERIAIS COMPÓSITOS DE HIDROXI-
APATITA E NANOESTRUTURAS DE CARBONO**

Esta Dissertação foi julgada adequada para obtenção do Título de Mestre em Ciência e Engenharia de Materiais, e aprovada em sua forma final pelo Programa de Pós-Graduação em Ciência e Engenharia de Materiais.

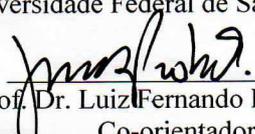
Florianópolis, 18 de maio de 2017.



Prof. Guilherme Oliveira Barra, Dr.
Coordenador do PGMAT

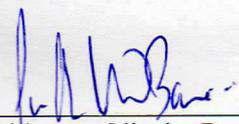


Prof. Dr.-Ing. Márcio Celso Fredel
Orientador
Universidade Federal de Santa Catarina

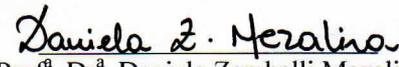


Prof. Dr. Luiz Fernando Dias Probst
Co-orientador
Universidade Federal de Santa Catarina

Banca Examinadora:



Prof. Guilherme Oliveira Barra, Dr.
EMC - UFSC



Prof.ª Dr.ª Daniela Zambelli Mezalira
QMC - UFSC



Prof. Dr. Ricardo Ketel Donato
Universidade Presbiteriana Mackenzie

Em memória do meu pai,
Zé Inchauspe.

AGRADECIMENTOS

Agradeço,

À Universidade Federal de Santa Catarina, na figura de seus representantes Reitores, coordenadores, professores e servidores;

Ao CNPq pela concessão da bolsa de mestrado;

Ao Prof. Fredel e ao Prof. Probst pela boa orientação que me deram ao longo destes dois anos de mestrado.

À minha família, dona Sandra, Jethro e Talaze pelo apoio. Ao meu falecido pai, pela boa educação que me deu.

À minha namorada, Karine, pela compreensão, paciência e carinho em todas as horas. À sua família pela ajuda, ensinamentos e positividade.

Aos meu colegas de laboratório, Ruben Acevedo, César Stüpp, Marcelo Barros, Rafael Pereira, Thaiane Balestreri, Stephanie Roedel, Lisandro Simão, Raul Back, Isadora Deschamps, Henrique Tajiri, André Cabral, Mariah Hoffman, Lívia Daros, Roberto Nallin, Rafael Veit, Rafael Eleutério, Patricia Monich e outros que por ali passaram. Em especial à Roberta Farias pela motivação e companherismo. Também ao pessoal da química: Heitor, Ricardo, Natasha e Prof. Daniele pela ajuda.

Ao Prof. Fernando Peixoto, pelo companherismo nas horas de laboratório e pelo computador com o qual consegui escrever esta dissertação.

Aos professores das disciplinas que cursei pelos bons ensinamentos.

Aos meus amigos do Joaca Rugby, pelo companherismo, diversão e incentivo.

À todos meus amigos, por aquela injeção de ânimo!

À todo pessoal dos laboratórios parceiros, que por ventura tenham ficado de fora desta lista. A colaboração de cada um de vocês foi essencial ao bom andamento do trabalho.

Por último, após a revisão, agradeço à banca presente na minha defesa, pela experiência construtiva e gratificante. Aos professores Ricardo Donato, Guilherme Barra e Daniela Mezalira, minha gratidão pelas correções e encorajamento para seguir nas próximas etapas.

Fortitudine Vincimus

Provérbio Latim

RESUMO

Biomateriais vêm sendo estudados para reposição de tecidos naturais que apresentam falhas. A Hidroxiapatita (HAp) é uma opção para preenchimento ósseo já existente no mercado. Apesar de sua aplicação extensiva no campo de enxertos odontológicos, a HAp apresenta propriedades que não atendem às aplicações que requerem maior rendimento em propriedades mecânicas. Para contornar esta limitação, materiais compósitos são desenvolvidos. Estudos recentes em nanoestruturas de carbono indicam que a aplicação destes nanomateriais como fase de reforço em compósitos propiciam um aumento da resistência mecânica, além de possuírem propriedades elétricas e térmicas únicas. O presente trabalho apresenta a síntese e caracterização de biomateriais compósitos por diferentes métodos. Amostras de hidroxiapatita/óxido de grafeno (HAp/GO) foram sintetizadas por coprecipitação química. Compósitos de hidroxiapatita/nanotubos de carbono (HAp/CNT) foram sintetizados pela deposição química de vapor (CVD) de acetileno sobre pós de HAp contendo catalisador à base de Fe-Co. Os materiais foram caracterizados por DRX, espectroscopia RAMAN, MEV e MET. Nanoestruturas de carbono foram detectados na superfície das partículas de HAp. A análise das bandas D- e G- da espectroscopia Raman indicaram qualidade razoável dos CNTs produzidos. As amostras de HAp/GO contendo 2 w% de solução de GO apresentaram 'folhas' de óxido de grafeno distribuídas na superfície e em contato com as partículas de HAp, podendo atuar como reforço mecânico.

Palavras-chave:

Biomaterias; Nanoestruturas de carbono; Hidroxiapatita

ABSTRACT

Biomaterials have been studied for the replacement of natural tissues that present defects. Hydroxyapatite (HAp) is an option for bone filling already existing in the market. Despite its extensive application in the field of dental grafts, the HAp presents properties that do not meet the applications with higher demands of mechanical properties. To circumvent this limitation, composite materials are developed. Recent studies in carbon nanostructures indicate that the application of these nanomaterials as reinforcement phase in composites increases of the mechanical resistance, besides possessing unique electrical and thermal properties. The present work presents the synthesis and characterization of composite biomaterials by different methods. Hydroxyapatite / graphene oxide (HAp/GO) samples were synthesized by chemical coprecipitation. Hydroxyapatite / carbon nanotubes composites (HAp/CNT) were synthesized by the chemical vapor deposition (CVD) of acetylene on HAp powders containing Fe-Co-based catalyst. The materials were characterized by XRD, RAMAN, SEM and TEM. Carbon nanotubes with diameter of 552 nm were detected on the surface of HAp particles. The analysis of the D- and G- bands of Raman spectroscopy indicated reasonable quality of the CNTs produced. The samples of HAp/GO containing 2 w% of GO solution presented graphene oxide sheets distributed on the surface and in contact with the HAp particles, which could act as mechanical reinforcement.

Keywords: Biomaterials, Carbon Nanostructures; Hydroxyapatite

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Diagrama comparativo das propriedades mecânicas de diversos materiais para aplicações biológicas. O eixo vertical apresenta valores de tenacidade à fratura ($\text{MPa}\cdot\text{m}^{1/2}$) e o eixo horizontal os valores de módulo de elasticidade (GPa).....	27
Figura 2: Modelo da microestrutura do tecido ósseo, onde as fibras de colágeno (cilindros brancos) orientam a cristalização da HAp (plaquetas cinzas).....	29
Figura 3: Estrutura molecular de Hidroxiapatita	31
Figura 4: Diferença estrutural do Grafeno (a) e Óxido de grafeno (b).....	33
Figura 5: Diferentes estruturas dos nanotubos de carbono (a) Armchair, (b) Zig-zag e (c) Quiral.....	35
Figura 6: crescimento de nanotubos de carbono sobre partícula de catalisador.	37
Figura 7:Espectro Raman característico de amostras de SWCNT, sob incidência de luz verde (514 nm) e luz vermelha (785 nm), indicando os picos D- e G- , e RBM.	38
Figura 8: Esquema simplificado do funcionamento de biossensores.....	40
Figura 9: processo simplificado de exfoliação química do óxido de grafeno.....	44
Figura 10: Primeira etapa da preparação do Óxido de grafeno ..	45
Figura 11: Saco de diálise lacrado, contendo solução de óxido de grafite, imerso em água milique	45
Figura 12: esquema do reator de CVD	47
Figura 13: DRX da amostra de Hidroxiapatita pura	49
Figura 14: MEV da amostra de HAp.....	50
Figura 15: MET de HAp Pura	50
Figura 16: Espectroscopia Raman da amostra de HAp pura	51
Figura 17: Imagem MEV da solução de GO 2 w%, com aumento de 500x.....	52
Figura 18: Imagem de MET do GO. A ampliação mostra a ,dobraç da folha.	53
Figura 19: Espectroscopia Raman da amostra de GO	53
Figura 20: Difratoograma das amostras de HAp e Hap com 0,05 w% de GO.....	54
Figura 21: Difratoograma das amostras de HAp e HAp com 2% de GO.....	55

Figura 22: MEV da amostra de HAp/GO 0,05% do grupo 1	56
Figura 23: MEV da amostra de HAp/GO 0,05 w% do grupo 2 .	56
Figura 24: MEV da amostra de HAp/GO 0,05 w% do grupo 3 .	57
Figura 25: MEV da amostra de HAp/GO 0,05 w% do grupo 4 .	57
Figura 26: MEV da amostra de HAp/GO 0,05 w% do grupo 5 .	58
Figura 27: MEV da amostra de HAp/GO 2 w% do grupo 1	58
Figura 28:MEV da amostra de HAp/GO 2 w% do grupo 2	59
Figura 29: MEV da amostra de HAp/GO 2% do grupo 2, aumento de 10000x.....	60
Figura 30: MEV da amostra de HAp/GO 2 w% do grupo 2, contendo ‘folhas’ de GO.....	60
Figura 31: MEV da amostra de HAp/GO 2 w% do grupo 3	61
Figura 32: MEV da amostra de HAp/GO 2 w% do grupo 4	61
Figura 33: MEV da amostra de HAp/GO 2 w% do grupo 5	62
Figura 34: MEV da amostra de HAp/GO 2 w% do grupo 5	62
Figura 35: Difratoograma das amostras de HAp e HAp/CNT em comparação	63
Figura 36: Grânulo de HAp/CNT w2% catalisador, processada a 700°C	64
Figura 37: Grânulo de HAp/CNT 2 w% catalisador, processada a 800°C	65
Figura 38: Espectroscopia RAMAN das amostras de HAp/CNT com 2 w% de catalisador, tratadas à temperaturas de 800 °C e 700 °C	65
Figura 39: MEV da amostra de Hap/CNT contendo 10 w% de catalisador, processada a 700°C, com aumento de 5000x.....	66
Figura 40: MEV da amostra de Hap/CNT contendo 10 w% de catalisador, processada a 800 °C, com aumento de 100x.....	67
Figura 41: MEV da amostra de Hap/CNT contendo 10 w% de catalisador, processada a 800 °C, com aumento de 5000x.....	67
Figura 42: Raman das amostras de HAp/CNT com 10 w% de catalisador, tratadas a temperaturas de 800 °C e 700 °C.....	68
Figura 43: MEV da amostra de HAp/CNT contendo 20% de catalisador, processada a 700°C, aumento de 200x	69
Figura 44: MEV da amostra de HAp/CNT contendo 20 w% de catalisador, processada a 700°C, aumento de 10000x	69
Figura 45: MEV da amostra de HAp/CNT contendo 20 w% de catalisador, processada a 800°C, aumento de 100x	70
Figura 46: MEV da amostra de HAp/CNT contendo 20 w% de catalisador, processada a 800°C, aumento de 1500x	71

Figura 47: MEV da amostra de HAp/CNT contendo 20 w% de catalisador, processada a 800°C, aumento de 5000x.....	71
Figura 48: Espectroscopia Raman das amostras de HAp/CNT com 20% de catalisador, tratadas a temperaturas de 800 °C e 700 °C..	72

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Classe dos biomateriais	26
Tabela 2: Possíveis aplicações de para grafenos, óxidos de grafeno e compósitos com estas fases para meio biológico	34
Tabela 3: Comparação de propriedades dos CNTs e Grafeno com outros materiais de Engenharia	36
Tabela 4: Razão das intensidades dos picos D e G	73

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

HAp	Hidroxiapatita
GO	<i>Graphene Oxide</i> – Óxido de grafeno
CNT	<i>Carbon Nanotubes</i> – Nanotubos de carbono
PE	Polietileno
PA	Poliamida
PMMA	Poli-meta-metil-acrilato
PTFE	Poli-tetra-fluor-etileno
PU	Poluretano
YSZ	Zircônia estabilizada com ítria
AFM	<i>Atomic Force Microscope</i> – Microscópio de força atômica
STM	<i>Scanning tunneling microscope</i> – microscópio de tunelamento
SPR	<i>Surface plasmon resonance</i> – Ressonância Plasma de superfície
E	Módulo de Elasticidade
CVD	<i>Chemical Vapour Deposition</i> – Deposição química de vapor
RBM	<i>Radial Breathing Mode</i> – Modo de respiração radial
BTM	<i>Bone Turnover Markers</i>
SWCNT	<i>Single Wall Carbon Nanotubes</i>
DWCNT	<i>Double Wall Carbon Nanotubes</i>
MWCNT	Multi Wall Carbon Nanotubes
MET	Microscopia Eletrônica de Transmissão
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura
NASA	<i>National Aeronautics and Space Administration</i>

SUMÁRIO

1. Introdução.....	21
2. Objetivos	24
3. Revisão Bibliográfica	25
3.1 <i>Biomateriais</i>	25
3.2 <i>Osso humano</i>	28
3.3 <i>Hidroxiapatita</i>	30
3.4 <i>Óxido de Grafeno</i>	32
3.5 <i>Nanotubos de Carbono</i>	34
3.6 <i>Compósitos</i>	39
3.7 <i>Biosensores</i>	40
4. Materiais e métodos	43
4.1 <i>Síntese química de hidroxiapatita</i>	43
4.2 <i>Óxido de grafeno por exfoliação química</i>	43
4.3 <i>Síntese de compósitos HAp/GO</i>	46
4.4 <i>Síntese de compósitos HAp/CNT</i>	46
4.5 <i>Caracterização</i>	48
5. Resultados e discussão	49
5.1 <i>Análise da Hidroxiapatita</i>	49
5.2 <i>Análise do óxido de grafeno</i>	52
5.3 <i>Análise de HAp/GO</i>	54
5.4 <i>Análise de HAp/CNT</i>	63
6. Conclusão.....	74
7. Sugestões para trabalhos futuros.....	76
8. Referencias bibliográficas	77

1. INTRODUÇÃO

No intuito de melhorar as condições de vida dos seres humanos, os biomateriais vêm sendo explorados no campo científico ao longo dos anos. Biomaterial é qualquer material sintético ou natural com aplicação em tecidos vivos como parte de um aparato médico ou implantes, que possuem propriedades que os tornam adequados ao uso biológico sem causar reações de rejeição [1]. Estes materiais possuem inúmeras aplicações na reposição de tecidos naturais que sofreram desgaste ou quebra ocasionados por acidentes, doenças ou velhice. Nos últimos 35 anos, o campo de biomateriais vem crescendo de forma acelerada. A colaboração entre pesquisadores e cirurgiões vem auxiliando o processo de criação de novas opções em biomateriais, baseados nas necessidades existentes dos pacientes e situações clínicas. As pesquisas mais recentes se direcionam para a interação entre implantes e células ou tecidos adjacentes [1, 2].

O sistema ósseo humano tem papel fundamental na vida de qualquer ser humano. No passado, materiais para substituição óssea na forma de próteses removíveis ou implantadas eram fabricadas a base de metais ou cerâmicos, acreditando-se que, por serem ‘inertes’, essas classes de materiais eram as mais indicadas para essa aplicação. Alguns destes materiais continuam em uso hoje em dia, mas atualmente compreende-se que, do ponto de vista biológico, nenhum material pode ser considerado totalmente inerte, pois qualquer interação em meio biológico pode acarretar em mudanças no sistema [3].

A fase inorgânica do osso humano, a hidroxiapatita (HAp), é um material que pode ser obtido através de síntese química controlada. Sua utilização como próteses, enxertos e preenchimento de cavidades ósseas já existe e é atraente devido as suas propriedades de biocompatibilidade e reabsorção pelo organismo. A odontologia e medicina estética tem feito uso da hidroxiapatita como preenchimento de cavidades ósseas ou faciais [4, 5]. Esta pode ser utilizada na forma de pó[6] ou de estruturas porosas [7, 8] ou como cimentos [9] para suas aplicações finais. Apesar do seu uso comum para tais aplicações, a hidroxiapatita apresenta alguns problemas relacionados às suas propriedades mecânicas que podem ser inadequadas em alguns casos, impedindo ou dificultando seu uso.

Materiais compósitos surgiram com a finalidade de, através da mistura de fases, melhorar ou criar propriedades distintas. Um exemplo de material compósito é o osso humano, que naturalmente possui uma fase inorgânica (HAp) e uma fase orgânica (colágeno). Isto confere ao

osso inúmeras propriedades, tais como excelente resistência mecânica e limite elástico, combinado a uma porosidade otimizada, além da sua capacidade biológica de auto regeneração. O osso humano possui propriedades únicas que existem em decorrência da integração de diferentes fases. Mimetizar estas propriedades de modo controlado em laboratório tem sido um dos desafios da ciência em biomateriais [10].

As nanoestruturas de carbono, tais como fulerenos, grafenos, óxidos de grafeno (GO) e nanotubos de carbono (CNT), inicialmente utilizadas em reações químicas de catálise e outros, mostraram grande prospecto para aplicação em compósitos, devido à suas propriedades mecânicas, elétricas e térmicas elevadas. Recentes estudos toxicológicos [11] destes materiais sugerem, ainda que de forma parcial, a possibilidade de utilização destes nanomateriais como reforço mecânico em biomateriais compósitos, devido à sua baixa toxicidade.

De acordo com a literatura [12, 13], a utilização de nanomateriais pode conferir benefícios extras a materiais de substituição óssea, tais como integração biológica, regeneração, densidade e porosidade otimizados. Biosensores poderiam ser projetados utilizando nanomateriais com propriedades elétricas necessárias para desempenharem funções eletrônicas.

Biosensores são mecanismos inseridos no organismo que podem detectar estímulos químicos e físicos e traduzi-los em sinais elétricos, fornecendo informações essenciais sobre a situação do tecido. Biosensores para aplicação em tecido ósseo estão sendo desenvolvidos utilizando nanoestruturas de carbono como material para detecção de estímulos inerentes à processos biológicos. O grande desafio da comunidade científica encontra-se no processamento e caracterização destes materiais [14].

No viés inovativo de opções em biomateriais, este trabalho objetivou detalhar dois processos de adição de nanoestruturas de carbono em matriz cerâmica para utilização de materiais compósitos como substitutos ósseos. Os materiais resultantes desse trabalho foram: a) Compósitos de hidroxiapatita + óxido de grafeno (HAp/GO) sintetizados por co-precipitação química de soluções contendo precursores de HAp e GO b) Compósitos hidroxiapatita + nanotubos de carbono (HAp/CNT), sintetizados por deposição química de vapor sobre o pó de HAp. Estes materiais foram analisados quanto à influência da fase carbono na matriz HAp, em termos de composição e estrutura.

O trabalho foi realizado nas dependências do Núcleo de Pesquisas em Materiais Cerâmicos e Compósitos (CERMAT) do Departamento de Engenharia Mecânica e Laboratório de Catálise Heterogênea (LABOCATH) do Departamento de Química, ambos situados na Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC). As análises complementares foram realizadas no Laboratório de Caracterização Micro Estrutural (LCME), Laboratório de Materiais (LabMat) e Central de análises do Departamento de Química.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

O objetivo deste trabalho foi desenvolver e caracterizar biomateriais compósitos de hidroxiapatita com nanotubos de carbono (HAp/CNT) e hidroxiapatita com óxido de grafeno (HAp/GO) para substituição óssea.

2.2 Objetivos Específicos

- Obtenção do GO pelo método de Hummers;
- Obtenção da HAp em forma de pó;
- Obter compósitos do tipo HAp/CNT pela deposição química em fase vapor (*chemical vapour deposition* – CVD);
- Obter compósitos de HAp/GO;
- Adquirir informações sobre a estrutura, composição e propriedades dos materiais sintetizados através dos métodos disponíveis;
- Análise e discussão acerca dos resultados obtidos, comparando com outros resultados disponíveis na literatura.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Biomateriais

A natureza é o melhor laboratório de materiais que existe e, inspirada em sua perfeição e complexidade, a comunidade científica tenta recriar o que já ocorre naturalmente na biosfera [15]. Biomateriais são desenvolvidos na tentativa de mimetizar propriedades dos tecidos naturais, para que sejam usados como substitutos de tecidos que apresentam problemas (fraturas, degeneração ou doença).

Os primeiros registros de uso de biomateriais como implantes dentários são dos chineses, em tentativas de utilizar pequenas estacas de bambu no lugar de dentes perdidos, e de egípcios que utilizaram metais preciosos com a mesma finalidade [16]. Na era moderna, o cirurgião ortopédico Per-Ingvar Branemark realizou o primeiro implante dentário de titânio em um ser humano em 1965. Os estudos de Branemark em osteointegração [17] foram a base de uma era de avanços em biomateriais.

Os primeiros biomateriais atendiam a requisitos básicos de operação: biocompatibilidade, resistência mecânica, resistência a corrosão e baixa toxicidade. Metais preciosos (ex.: ouro e prata) foram utilizados para essa finalidade, e categorizam a classe de materiais biotoleráveis, apresentados na Tabela 1. O avanço em pesquisas sobre osteointegração levaram a utilização da segunda classe de biomateriais, os bio-inertes, como é o caso do titânio e ligas [18] e materiais cerâmicos como a alumina [19] e zircônia [20, 21]. Estes materiais apresentam melhor aderência à superfície do tecido ósseo. Hoje, entende-se que nenhum material pode ser considerado totalmente inerte, pois qualquer interação em meio biológico pode acarretar mudanças no sistema [3].

A classe de materiais bio-ativos representam o que há de mais recente na pesquisa. O seu nome define materiais que interagem com tecidos naturais, com propósito de melhorar a condição em este está inserido. Estes materiais possuem, além dos requisitos básicos apresentados nas outras classes, a função de estimularem respostas celulares específicas [1]. Outra vantagem desta classe de biomateriais é a reabsorção do material no sistema hospedeiro. A reabsorção de HAP em implantes é reportada na literatura [22, 23], facilmente observada pela perda de material implantado vs crescimento de tecido natural. Ainda não é claro como o sistema funciona, embora seja cogitado a

teoria de que a absorção de HAp ocorra através das células responsáveis pela remodelagem do tecido ósseo [22, 24].

Tabela 1: Classe dos biomateriais

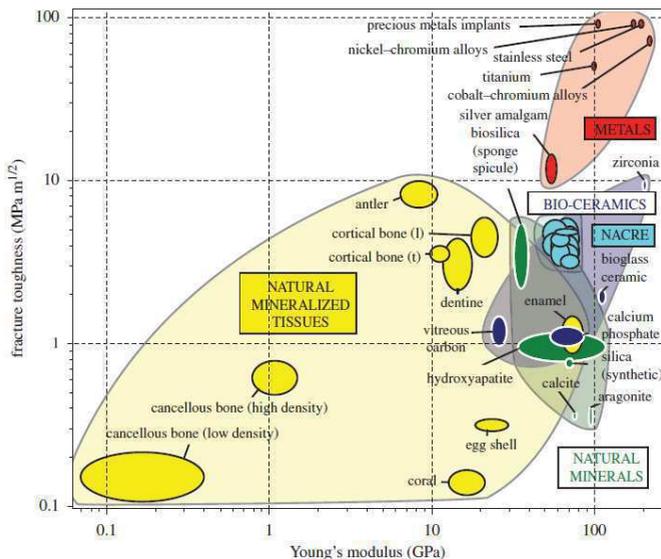
Classe	Metais	Cerâmicos	Polímeros
Bio-tolerável	Ouro		PE
	Ligas de Co-Cr		PA
	Aço	-	PMMA
	Nióbio		PTFE
	Tântalo		PU
Bio-inerte	Titânio Comercial	Alumina (Al_2O_3)	
	Liga de Titânio (Ti-6Al-4V)	Zircônia (ZrO_2) YSZ	-
Bio-ativo	-	Hidroxiapatita; Fosfatos de Cálcio; Biovidros; Carbono-silício	Polímeros reforçados com proteínas

Fonte: adaptado de Saini et al [25]

As propriedades mecânicas (tenacidade à fratura e módulo de elasticidade) de biomateriais para aplicação óssea, em comparativo com outros materiais de engenharia, são apresentados na Figura 1. Nesta imagem, é possível observar uma considerável variação nas propriedades dos materiais ósseos naturais, circulos em amarelo. Os materiais metálicos, apresentados em vermelho, possuem tenacidade à fratura e módulo de elasticidade muito superiores aos tecidos naturais. Essa discrepância de propriedades pode ser um empecilho a sua aplicação, como será apresentado na sequência.

Materiais cerâmicos, representados em azul, e minerais naturais, em verde, apresentam valores de tenacidade à fratura semelhantes aos tecidos naturais. O módulo de elasticidade é elevado quando em comparação ao osso esponjoso (*cancellous bone*). Neste caso, de acordo com Wegst *et al* [26] a rota promissora para síntese de substitutos ósseos é mimetizar a estrutura hierárquica e porosidade de tecidos naturais a partir de materiais conhecidos. Essa rota possibilita projetar peças específicas para suprir as necessidades biológicas e propriedades mecânicas desejadas.

Figura 1: Diagrama comparativo das propriedades mecânicas de diversos materiais para aplicações biológicas. O eixo vertical apresenta valores de tenacidade à fratura ($\text{MPa}\cdot\text{m}^{1/2}$) e o eixo horizontal os valores de módulo de elasticidade (GPa).



Fonte: Wegst et al [26]

Conforme apresentado na Figura 1, materiais ósseos naturais apresentam variação nas suas propriedades, devido à diferenças de composição, estrutura e porosidade. Essas divergências são explicadas pelas diversas funções que o tecido ósseo desempenha no corpo humano. Detalhes acerca da função e morfologia do osso serão explanados no ítem 3.2.

No trabalho de Saini *et al* [25], os autores apresentam em sua revisão as propriedades desejadas em materiais para implantes dentários. Abaixo são consideradas as propriedades mecânicas, propriedades de superfície e propriedades de corrosão e biocompatibilidade.

- i. **Módulo de elasticidade:** O material de implante deve possuir módulo na faixa de 10-20 GPa para garantir uma distribuição uniforme das tensões. Materiais que possuem módulos muito defasados podem ocasionar deslocamentos imprevistos na interface implante/osso.

- ii. **Resistência à compressão, tração e cisalhamento:** O substituto ósseo deve possuir alta resistência à tração e compressão para a prevenção de fraturas.
- iii. **Limite de escoamento e resistência à fadiga:** Devido à aplicação de carregamento cíclico a qual o implante será submetido, o material deve apresentar alto limite de escoamento e resistência à fadiga, prevenindo rupturas.
- iv. **Ductibilidade:** De acordo com a *American Dentistry Association* (ADA), a ductibilidade mínima de 8% é requerida para implantes odontológicos, para que seja possível a modelagem do implante.
- v. **Dureza e tenacidade:** O aumento dessas propriedades diminui a quantidade de material utilizado na estrutura dos implantes. A superfície do material é local de intensa atividade química e física. Em casos de implantes metálicos é interessante evitar corrosão a fim de manter a estrutura do implante intacta, evitando reações tóxicas e problemas relacionados à cargas metálicas. A corrosão controlada do material é desejada nos casos de materiais bio-ativos, pois desta maneira ocorrerá o processo de reabsorção. Propriedades como energia de superfície, rugosidade e resistência à corrosão (galvânica e eletroquímica) devem ser levadas em conta neste caso [25].

Além dos requisitos básicos apresentados, a odontologia moderna apresenta novas exigências a serem alcançadas em biomateriais, tais como coloração, fluorescência, translucidez, e outras características que podem influenciar no aspecto visual do implante. Propriedades térmicas (ex.: dilatação) devem ser ajustadas para não causar desconfortos/limitações no uso da peça ou componente.

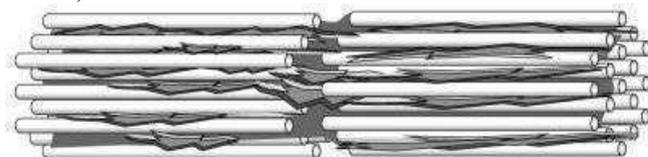
Ademais, as pesquisas estão se encaminhando para a criação de mecanismos que poderiam conferir novas capacidades para um ser humano [15]. Algumas destas inovações são: liberação controlada de fármacos [27, 28], fotoluminescência, radiopacidade e pigmentação personalizada, bioadaptabilidade [29] e biosensores para monitoramento em tempo real [14].

3.2 Osso humano

A função do osso é sustentar e dar mobilidade para o corpo através do sistema ósseo [10]. Essa função exige que os ossos possuam propriedades mecânicas específicas para atender a demanda de

locomoção e impacto que o corpo humano exige. O osso humano é uma estrutura complexa de células ósseas (osteoblastos, osteócitos e osteoclastos) inseridos numa matriz composta de cristais de hidroxiapatita orientados por fibras de colágeno. O tecido ósseo é um material compósito constituído de fases inorgânica e orgânica. A fase orgânica do osso é composta por 90% de colágeno, que contribui significativamente para propriedades do osso, como sua densidade e elasticidade. O colágeno também tem o papel de orientar o crescimento de cristais de HAp, a fase inorgânica do osso, como ilustrado na Figura 2.

Figura 2: Modelo da microestrutura do tecido ósseo, onde as fibras de colágeno (cilindros brancos) orientam a cristalização da HAp (plaquetas cinzas).



Fonte: adaptado de Olszta et al [30]

É essencial conhecer os mecanismos envolvidos no processo de formação do osso para projetar um substituto ósseo, pois o material substituto sofrerá ação desses mecanismos. O osso tem uma enorme capacidade reconstitutiva, constantemente se regenerando e remodelando [31]. Estima-se que para reparar danos microscópicos, o esqueleto humano adulto é totalmente substituído a cada 10 anos através do processo de remodelagem [32]. A formação do osso é dividida em duas etapas, conhecidas como ossificação primária (ou intramembranosa) e secundária (ossificação endocondral).

A formação óssea primária é caracterizada por uma formação desorganizada, citada na literatura como estrutura óssea em forma de ‘lã’, devido à presença de colágeno tipo I na forma de pacotes de pequenas fibras (10-20 nm). Na formação secundária, a estrutura enovelada é remodelada em uma estrutura otimizada, lamelar e concêntrica. As fibras de colágeno tipo I, nessa formação, são maiores, da ordem de 78 nm de diâmetro e criam uma mineralização organizada e empacotada [33].

O processo de formação e remodelagem óssea é promovido por estímulos químicos e físicos. O fenômeno de remodelagem induzida por tensões mostra que existe ao menos um tipo de sensor mecânico celular

dentro do osso. Osteócitos são apontados como responsáveis por detectar estímulos mecânicos e ordenar atividades celulares através de moléculas sinalizadoras [34, 35].

O mecanismo pelo qual células convertem um estímulo mecânico em uma resposta bioquímica é conhecido como transdução mecânica [36]. O processo ainda não é conhecido totalmente, mas evidências mostram que a atividade celular do osso é controlada, ao menos em parte, por moléculas sinalizadoras liberadas por sensores mecânicos, dentre eles os osteócitos [36-38]. Alguns indicadores foram identificados, tais como a Prostaglandina E2 (PGE2) que age em osteoblastos promovendo a formação óssea acelerada. A proteína esclerostina age como antagonista à formação óssea [39].

Os mecanismos de restauração e formação de tecidos ainda não são bem conhecidos, ainda que novos conhecimentos na área de biologia e disciplinas adjacentes estejam ativamente guiando o desenvolvimento de materiais inteligentes que trabalhem com os mecanismos naturais de restauração. Pesquisas atuais objetivam obter materiais capazes de adquirir propriedades de restauração similares às do tecido natural, alcançando o nível de complexidade que o corpo humano faz naturalmente [40].

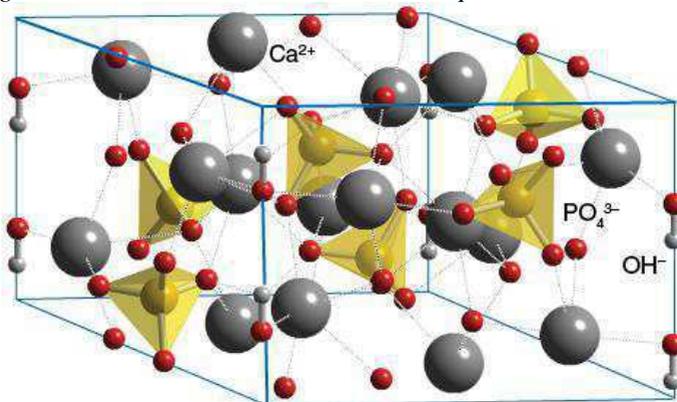
3.3 Hidroxiapatita

As cerâmicas de fosfato de cálcio merecem destaque na área médica por apresentarem ausência de toxicidade e ausência de respostas de corpo estranho ou inflamações por parte do tecido [41]. Dos fosfatos de cálcio existentes como opção para este fim, a hidroxiapatita é a mais indicada para finalidades clínicas. Sua aplicação como biomaterial é atrativa devido à biocompatibilidade [42]. Possui a fórmula química $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$, com razão Ca/P = 1,67 o que a torna muito semelhante ao osso natural.

A hidroxiapatita pode apresentar forma cristalina ou, em menores quantidades, apresentar-se na forma amorfa. Apesar de a HAp cristalizar na forma monoclínica, é a estrutura hexagonal que predomina nos monocristais de hidroxiapatita biológica, devido à presença de impurezas que promovem a estabilidade desta fase. Em sua forma sintética, pode ser obtida por precipitação ou por tratamento térmico a temperaturas elevadas, que confere sua estrutura hexagonal [41].

A Figura 3 ilustra a estrutura da hidroxiapatita, que possui átomos de cálcio distribuídos com grupos fosfato e hidroxilas. Os parâmetros de rede são $a=b=0,94$ nm e $c=0,69$ nm. A hidroxiapatita precipitada pode ser ou não estequiométrica, ou seja, apresentar razão $\text{Ca/P} = 1,67$ dependendo dos reagentes e parâmetros do processo. A HAP estequiométrica possui uma densidade de $3,22 \text{ g/cm}^3$ [43].

Figura 3: Estrutura molecular de Hidroxiapatita



Fonte: retirado de ChemTube3D [44]

A dificuldade na obtenção de hidroxiapatita estequiométrica está relacionada às substituições atômicas, que ocorrem neste composto com grande facilidade. Quando sua precipitação é realizada em meio aquoso sob atmosfera livre de CO_2 a incorporação de carbonatos é evitada. A HAP precipitada possui certo grau de substituição de íons e, por este fato, se assemelha mais à HAP biológica [41].

A hidroxiapatita possui ampla aplicação na área clínica, onde é usada para preenchimentos de cavidades ou implantes com pouca exigência mecânica, devido à sua baixa resistência e tenacidade. Pode ser usada na forma de pó, onde a HAP é moldada por compressão manual, ou em forma de estruturas porosas conhecidas como arcabouços. Estes possuem vantagens como forma de aplicação, devido ao estímulo no crescimento de tecido natural.

Arcabouços de HAP apresentam boa interação com o osteoblastos, estimulando a formação de tecido ósseo [45]. Pesquisas buscam novas alternativas para obtenção de arcabouços com porosidade otimizada, possibilitando uma recuperação ainda mais acelerada [46, 47]. O

aumento da porosidade implica em diminuição de resistência mecânica, que pode ser alcançada através da criação de compósitos de hidroxiapatita e outras fases, visando um melhor desempenho em termos de propriedades mecânicas e de osteointegração.

3.4 Óxido de Grafeno

Materiais nanoestruturados são o grande foco das pesquisas atuais no campo de materiais, em especial materiais derivados do carbono [48]. Devido aos avanços em equipamentos de caracterização, atualmente é possível realizar a detecção de nanoestruturas com relativa facilidade e boa resolução. O potencial de aplicação destes materiais tem atraído atenção de pesquisadores devido às suas propriedades mecânicas combinadas a propriedades térmicas e elétricas.

Ao estudarem as propriedades elétricas de flocos de grafite, Andrei Geim e Kostya Novoselov [49] consideraram a possibilidade de se criar a mais fina camada de carbono, através de uma exfoliação mecânica bastante simples. Usando uma fita adesiva e grafite, os cientistas constataram que era possível “arrancar” camadas do grafite original, e quando feito sequencialmente, poderia levar a partes com poucos e eventualmente 1 átomo de espessura. A ‘descoberta’ de um material que outrora havia sido considerado termodinamicamente instável, nomeado grafeno, rendeu à dupla de cientistas o prêmio Nobel de Física de 2010 [50].

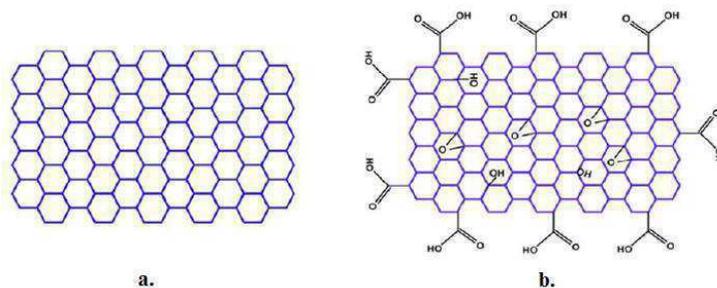
O grafeno é uma rede cristalina de átomos de carbono interligados, caracterizada por ter 1 átomo de espessura, conforme ilustrado na Figura 4 a. Os átomos presentes nessa rede possuem 3 ligações ativas com os átomos vizinhos à rede, e 1 ligação ‘pi’ perpendicular à rede, dando à este material a forma de uma ‘rede’. O comportamento elétrico e térmico do grafeno é explicado baseado na teoria de que elétrons livres na rede se comportam como fônons, propiciando altos valores de condutividade térmica e elétrica ao material [49].

A estrutura característica do grafeno concede propriedades mecânicas, térmicas e elétricas únicas. Como material puramente 2D, pode apresentar valores de mobilidade elétrica (μ) de $15,000 \text{ cm}^2 \text{ V}^{-1} \text{ s}^{-1}$ mesmo à temperatura ambiente ($25 \text{ }^\circ\text{C}$) [49], módulo de elasticidade (E) de 1.0 TPa e resistência de $130 \pm 10 \text{ GPa}$ [51]. Possui condutividade térmica elevada, podendo alcançar valores de $3000 \text{ W m}^{-1} \text{ K}^{-1}$. Devido a essas propriedades, as aplicações para este material variam desde

membranas para dessalinização, materiais eletrônicos flexíveis, sensores bioquímicos [52], transistores, materiais estruturais até limpeza de lixo tóxico [50].

O óxido de grafeno (*graphene oxide*; GO) é o produto obtido da exfoliação química do grafite, podendo ser convertido em óxido de grafeno reduzido (*reduced graphene oxide*; r-GO) através de sua redução termoquímica. A Figura 4 ilustra a diferença estrutural do grafeno e GO. O GO possui duas importantes características: (1) pode ser produzido a baixo custo, usando grafite e reagentes químicos, e (2) é altamente hidrofílico, podendo ser usado para preparar suspensões estáveis, que facilitam o processamento posterior de materiais compósitos e outras aplicações. Estas características associadas ao GO são interessantes quando analisadas do ponto de vista de produção destes materiais em larga escala [53]. A facilidade e baixo custo de produção do GO, relativo as suas propriedades, são pontos positivos na pesquisa e aplicação deste material.

Figura 4: Diferença estrutural do Grafeno (a) e GO (b).



FONTE: Adaptado de Malhotra et al [52]

O GO possui aplicações em meio biológico, que vem sendo alvo de pesquisas recentes [11, 54]. Suas propriedades elétricas, térmicas e mecânicas já citadas são muito atraentes para criação de biomateriais compósitos. Algumas das aplicações possíveis são listadas na Tabela 2. A aplicação de GO em biosensores é muito atraente, uma vez que o material pode ser aplicado como bioreceptor e transdutor, através de funcionalizações e modificações. Mais detalhes acerca de biosensores serão discutidos na seção 3.7.

Em termos de medicina preventiva por imagem, o uso de GO também é alvo de pesquisas recentes. Avanços na funcionalização de grafeno e GO com outras nanopartículas permitem a detecção de

anomalias. A utilização de GO, em muitos casos, é mais vantajosa para aplicações de sonda de imagem, devido à alta bio/ citocompatibilidade [54]. A afinidade do grafeno à biomoléculas contendo anéis aromáticos é usada em sensores do tipo *surface plasmon resonance* (SPR) [11]. Outras aplicações para GO, como *drug-delivery* e utilização em arcabouços estão disponíveis na literatura apresentado na Tabela 2.

Tabela 2: Possíveis aplicações de para grafenos, óxidos de grafeno e seus compósitos para meio biológico

	Função	Ref.
Biosensores	Bioreceptor	[11, 52]
	Transdutor	[11]
Medicina de Imagem	Sonda de imagem para osteossarcoma (MG-63)	[55]
	Imagem de fluorescência <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i>	[56]
Drug-delivery	Fármacos anti-cancer	[57-59]
	Liberação de anti-bióticos e outros fármacos	[60-62]
Engenharia de tecido	Arcabouços	[63, 64]
	Superfície de arcabouços em aplicação óssea	[65]

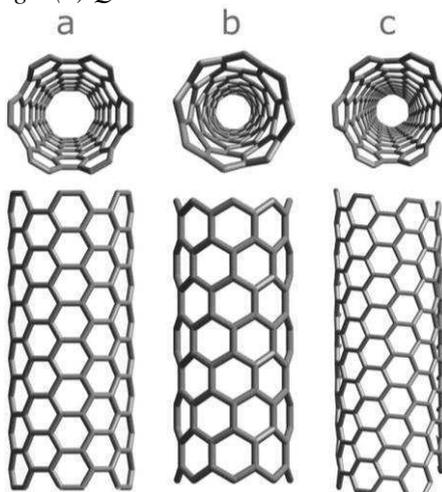
A biocompatibilidade do GO tem sido estudada; a toxicidade deste material é dependente da quantidade no organismo. Doses médias mostraram ter pouco ou nenhum efeito em testes *in vivo* em ratos [66]. Devido à grande variedade de morfologias, recobrimentos e estruturas híbridas possíveis para o grafeno, estudos mais detalhados são necessários antes de implementar as aplicações *in vivo* em seres humanos [11].

3.5 Nanotubos de Carbono

Nanotubos de carbono (*carbon nanotubes* - CNT) foram inicialmente reportados por Ijima em 1991 como microtubulos helicoidais de carbono grafitico [67]. Trata-se de uma rede de átomos de carbono hexagonal, similar ao grafeno, estruturada em forma de tubos, de dimensões nanométricas. Esses ‘tubos’ nanométricos podem apresentar uma camada única (*single wall* - SWCNT) medindo aproximadamente 1.2–1.4 nm de diâmetro [68]. Nanotubos de múltiplas camadas (*multi wall* - MWCNT) apresentam diâmetro de 10–20 nm, em tubos concêntricos separados por uma distância de 3.4 Å [69]. Os

nanotubos de carbono são ainda categorizados quanto à sua quiralidade, apresentados na Figura 5. São divididos em *armchair* (n,n), *zig-zag* (n,0) ou quiral (m,n). Os valores de m e n determinam a quiralidade do nanotubo, que determina as propriedades mecânicas, térmicas e elétricas [68].

Figura 5: Diferentes estruturas dos nanotubos de carbono (a) Armchair, (b) Zig-zag e (c) Quiral



Fonte: retirado de [70]

Devido à estrutura tubular e nanométrica, CNT podem apresentar resistência mecânica na ordem de TeraPascal [71]. Comparado à outros biomateriais para aplicação óssea, CNT apresentam propriedade muito elevadas, que podem gerar compósitos interessantes para tal aplicação. A Tabela 3 apresenta um comparativo do Módulo elástico entre diversos materiais de engenharia, utilizados como substitutos ósseos, e o próprio osso.

Tabela 3: Comparação de propriedades dos CNTs e Grafeno com outros materiais de Engenharia

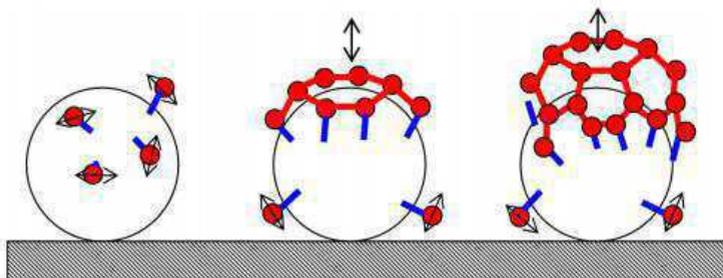
Material	E (GPa)	Referência
Nanotubos de Carbonos	1800	[71]
Óxido de Grafeno	470	[72]
Cobre	110	[73]
Aço 316L	193	[73]
MarkeTech Zirconia	205	[74]
Ossos cortical	10-40	[75]

Técnicas de Obtenção de CNT's

A técnica para obtenção dos primeiros CNT foi a evaporação por descarga de arco voltáico, utilizando eletrodos de grafite, mas esta técnica não possibilitava o controle sobre a estrutura e pureza do material, além de gerar fases secundárias como negro de fumo e outras fases de carbono [48]. Outras técnicas aplicadas para melhorar a eficiência na produção de CNT, tais como ablação a laser, descarga de arco modificada e deposição catalítica química por vapor (CVD) apresentam sucesso, sendo esta última a melhor opção apresentada pela literatura [13, 48, 76-79]. Os benefícios da técnica CVD são muitos, devido à ampla variedade de substratos, catalisadores e gases reagentes que podem ser explorados [76].

A técnica de deposição química por vapor (CVD) é um processo químico utilizado frequentemente para produção de filmes finos na indústria de semicondutores. A técnica consiste em recobrir o substrato com catalisadores voláteis, em geral metálicos, que reagem com gás e criam o recobrimento desejado [80]. Para criação de nanoestruturas de carbono, utilizam-se gases como metano, acetileno e outros como fonte de carbono. Através de fluxo de gases ricos em carbono sobre temperatura elevada, ocorre a dissociação do carbono na superfície das partículas catalíticas. Neste ponto, ocorre a nucleação a partir dos grupos carbono difundindo nas partículas catalíticas, atingindo um estado supersaturado e estruturando-se a ponta do tubo, conforme descrito na Figura 6. O aumento do comprimento dos CNT se dá pela contínua incorporação de átomos de carbono através da difusão, e termina pelo corte no suprimento em forma de gás [81]. As variações existentes do CVD são mudança de fase do fluido (atmosfera, líquido e gás), CVD por plasma, CVD assistido por laser e CVD assistido por fótons.

Figura 6: Crescimento de nanotubos de carbono sobre partícula de catalisador.



Fonte: Retirado de Raty et al [81] com autorização de American Physical Society

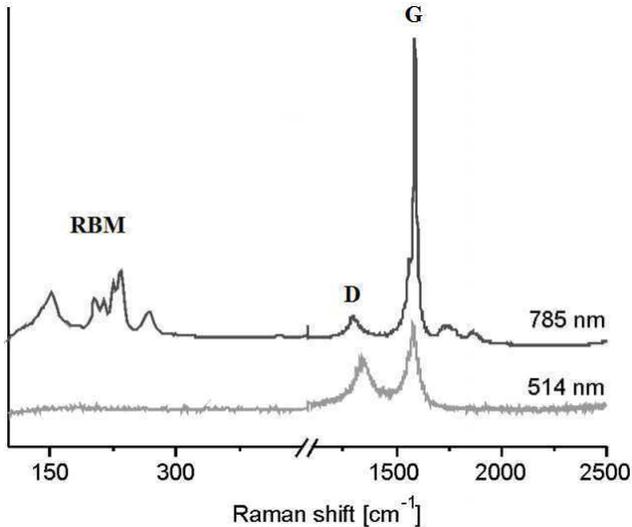
O CVD permite uma grande variação dos catalisadores, substratos e gases utilizados na reação, resultando em diferentes produtos e subprodutos. Mubarak [77] e Shah [76] listaram em suas revisões os diferentes resultados para diferentes reagentes. Estes trabalhos mostram que catalisadores metálicos como ferro, cobre, níquel, molibdênio e cobalto tem obtido sucesso na síntese de CNT. As partículas catalisadoras (metálicas) podem ser removidas através de lavagem oxidante dos nanotubos. Isso pode ser necessário para elevar a pureza dos CNT, removendo partículas metálicas da estrutura.

A espectroscopia Raman é uma excelente forma de caracterizar formas de carbono, através das interações não destrutivas dos feixes de fótons com o material, que geram sinais característicos dos modos vibracionais dos átomos. No espectro resultante da análise Raman, apresentado na Figura 7, dois picos característicos do grafite próximos a 1350 e 1593 cm^{-1} correspondem às bandas D- e G- respectivamente. A banda G é característica de camadas de grafite e corresponde à vibração tangencial de átomos de carbono, indicando o grau de cristalinidade. A banda D corresponde ao sinal emitido por uma rede de carbono defeituosa, através de desordens na hibridização das ligações sp^2 [82].

A comparação da intensidade dessas bandas (razão I_d/I_g) reflete na qualidade das amostras. Quando essa razão é próxima de 1, é um indicativo de grande quantidade de defeitos estruturais. MWCNT apresentam muitos defeitos estruturais, devido à quantidade de camadas gráficas. SWCNT e DWCNT apresentam valores menores para a razão

I_d/I_g . O diâmetro de SWCNT podem ser calculados através do sinal proveniente do Modo de Respiração Radial (*radial breathing mode – RBM*), presente em Raman shifts de 100-350 cm^{-1} [83]. A análise de RBM pode ser feita através da incidência de feixes mais energéticos.

Figura 7: Espectro Raman característico de amostras de SWCNT, sob incidência de luz verde (514 nm) e luz vermelha (785 nm), indicando os picos D- e G-, e RBM.



Fonte: Modificado de Costa et al [83]

Os CNT apresentam um excelente prospecto para aplicações biomédicas. Mukherjee *et al* [84] relatam que o uso de compósito de HAP/CNT resulta em crescimento acelerado nos testes *in vivo* com fêmur de coelhos, com alta adesão do material ao osso hospedeiro. O material não apresentou toxicidade para células de fígado e rim, o que indica a possibilidade de utilização como biomaterial.

Devido às suas propriedades únicas, os nanotubos de carbono surgiram como material promissor para aplicações biomédicas. Recobrimentos à base de CNT recentemente tiveram grandes avanços. Estes podem oferecer condições favoráveis para induzir funções celulares. A adição de CNT pode reforçar recobrimentos e destes se espera uma excelente aplicação na área de implantes ortopédicos de alta carga. Além disso, baseado nas propriedades únicas, CNT podem se ligar a superfície de dentina e cementum, mas não na superfície de

esmalte dentário, sugerindo que dentes recobertos com CNT poderiam ser usados como materiais odontológicos. Em adição, CNT podem ser usados para recobrir polímeros, biovidros, colágeno, e preparar arcabouços bioativos e condutores. Materiais a base de CNT representam o futuro e a próxima geração de materiais de engenharia para aplicações biomédicas [85].

3.6 Compósitos

Compósitos podem ser definidos como combinação de uma ou mais fases descontínuas dispersas em uma matriz contínua, que resultam em um material com propriedades distintas dos materiais constituintes. A fase descontínua em geral atua como reforço mecânico para o compósito, aumentando suas propriedades mecânicas, tais como resistência e rigidez [86, 87]. A fase descontínua pode atuar na mudança de propriedades elétricas [88] e térmicas [89, 90] do compósito. Em biomateriais para substituição óssea, estas mudanças podem influenciar diretamente outras propriedades como biocompatibilidade, osteoindução, osteointegração e o processo de regeneração do tecido [91]. Tais melhorias nas propriedades da HAp poderiam gerar novas funções e aplicações para este material.

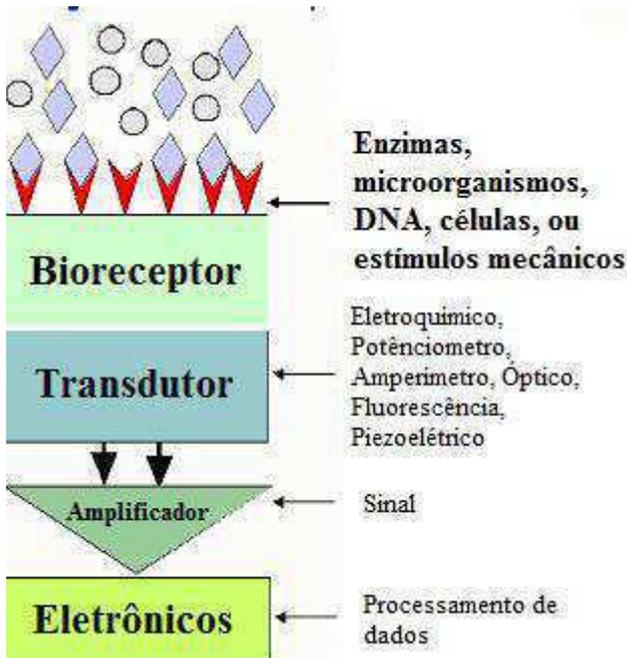
A síntese de compósitos a partir de nanomateriais exige atenção. Um dos maiores desafios nas tentativas de obtenção de compósitos de cerâmicos/ nanomateriais é a aglomeração de fases nanométricas. A aglomeração da fase de reforço tem efeito negativo em compósitos, uma vez que as propriedades desejadas só podem ser alcançadas quando ocorre boa dispersão dessa fase. Uma solução proposta na literatura é a síntese *in situ* de nanomateriais, tais como CNT, sobre o pó cerâmico, de modo a garantir a dispersão homogênea [92].

Nanotubos de carbono e óxido de grafeno vem sendo explorados como fase de reforço em biomateriais compósitos para substituição óssea [93]. A mistura de propriedades de materiais cerâmicos, como a hidroxiapatita, com nanoestruturas de carbono, pode gerar um biomaterial com propriedades mecânicas mais elevadas, melhor biocompatibilidade e até mesmo propriedades magnéticas e de absorção de ondas [94]. A criação destes biomateriais compósitos está possibilitando o desenvolvimento de funções como *drug-delivery*, monitoramento por imagem e biosensores, que serão abordados na próxima secção deste trabalho.

3.7 Biosensores

Um sensor é um dispositivo que transforma um estímulo em um sinal analítico. Em geral, possuem dois componentes conectados em série: um sistema de reconhecimento (receptor) e um sistema de conversão (transdutor). Biosensores são sensores em que o receptor é empregado em meio biológico [95]. O esquema de funcionamento de um biossensor é descrito na Figura 8. Estímulos como o de enzimas, células e outros são detectados por um bioreceptor, que transmite o estímulo para um transdutor e amplificador, capaz de transformar esse estímulo em sinal elétrico amplificado, que é facilmente recebido por dispositivos eletrônicos responsáveis pela leitura de dados.

Figura 8: Esquema simplificado do funcionamento de biossensores



Fonte: adaptado de Salgado[96]

O estímulo a ser detectado pelo sensor pode ser químico (moléculas), biológico (enzimas, agentes, células ou bactérias) ou físico (tensões mecânicas, luz). O biossensor recebe este estímulo e transforma

isto em sinal elétrico, podendo gerar um monitoramento acurado da situação em que está aplicado. Para cada tipo de sensor, utiliza-se um receptor específico que seja sensível ao estímulo esperado.

Um dos métodos utilizados para monitorar a condição do tecido ósseo é a medição de suas tensões. Medidores de tensão são implantados para avaliar o carregamento que ocorre no osso ou no implante envolvido. Sensores implantados com função *wireless* para monitoramento em tempo real do processo de remodelagem óssea já foram desenvolvidos [97, 98]. Sensores de tensão podem fornecer informações valiosas sobre o crescimento ósseo, mas apresentam desvantagens devido à necessidade de cirurgia e tamanho destes aparatos.

Um método não invasivo para monitoramento é a análise por modos de vibração, como a análise de densidade óssea por ultrassom [99] e o *Osteo-Sonic*TM, desenvolvido pela NASA para monitorar fraturas através da resposta vibracional do tecido [100].

Existe uma demanda para criação de novos biossensores que forneçam acesso ao processo de remodelagem do osso, entre outras informações, à baixo custo e que ofereça mais qualidade ao paciente. O método de indicadores de remodelagem óssea (*Bone Turnover Markers* – BTM) é utilizado para acessar informações sobre remodelagem óssea [14]. Este método permite descrever a condição celular e extracelular do osso, mostrando o estado de metabolismo do tecido. Isso ajudaria com o diagnóstico de doenças ósseas [101].

Sensores a base de materiais biodegradáveis ou reabsorvíveis são uma opção para eliminar a necessidade de cirurgia de remoção. Sirivisoot *et al* [102] desenvolveram um biossensor com revestimento polimérico capaz de monitorar e controlar o processo de remodelagem óssea. A degradação do recobrimento de polipirrol e poli-lático-co-glicólico, controlada pelo crescimento ósseo, resultava em mudanças na condutividade do sensor. As mudanças de condutividade eram detectadas por CNT originados na superfície de titânio anodizado do sensor.

Circuitos eletrônicos nanométricos garantem a compatibilidade entre detector e estímulo biológico. Processos biológicos envolvem interações eletrostáticas e de transferência de carga, que é diretamente detectado por nano-circuitos [103]. Isto justifica o uso de nanoestruturas de carbono para tais aplicações. CNT também apresentam elevado desempenho de sinal, mantém suas funções à temperaturas ambiente e corporal, apresentam baixo entupimento superficial (devido à inércia

química), e alta especificidade de estímulo [104]. Biosensores contendo CNT são reportados na literatura como sensores elétricos com transistores de campo (CNT-FET) [104, 105] e sensores eletroquímicos [106] e [54].

Biosensores do tipo CNT-FET consistem de um canal transportador de corrente que conecta uma ‘fonte’ e um ‘dreno’ onde a corrente pode ser controlada por uma porta de voltagem. Este canal condutor de corrente pode ser de SWCNT semi-condutor ou uma rede anisotrópica de CNTs. Através de monitoramento da corrente, o sensor detecta mudanças dentro do sistema biológico. Biosensores do tipo CNT-FET apresentam desempenho superior aos tradicionais transistores do tipo metal-óxido-semicondutor (MOSFETS) [107].

Li et al [36] fabricaram um biosensor do tipo nano-FET para estudar o efeito de transdução mecânica óssea em osteócitos. através da fabricação controlada de nano-fios de silício como componentes de um sensor FET. A utilização de CNT para criar biosensores do tipo nano-FET é possível e atualmente está sendo explorada por pesquisadores.

Com o objetivo de suprir a demanda na área de biosensores, compósitos à base de CNT, grafeno, GO e outras formas nanoestruturadas de carbono representam uma excelente opção para pesquisadores, devido à imensa gama de possibilidades existentes para serem trabalhados com essa classe de materiais [54].

4. MATERIAIS E MÉTODOS

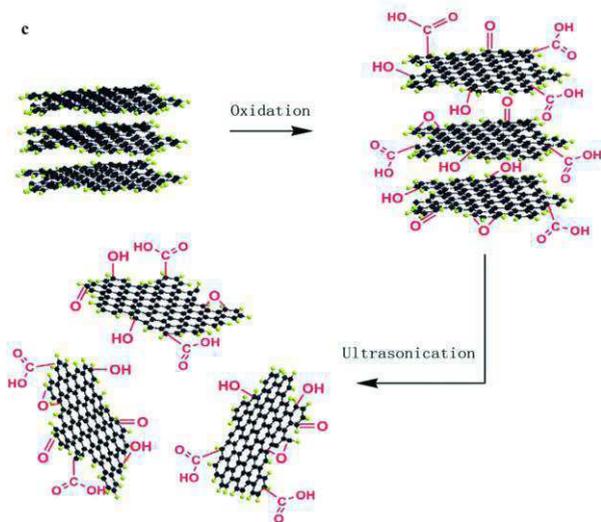
4.1 Síntese química de hidroxiapatita

Para obtenção dos pós de HAp, foi utilizado o método de precipitação química, descrito na literatura por Rabelo *et al* [108]. A síntese consiste em diluir os reagentes em água destilada, na seguinte proporção: fosfato de amônio dibásico $(\text{NH}_3)_2\text{HPO}_4$ a 13,20 g/L e nitrato de cálcio $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ a 39,42 g/L. Após 12 horas da diluição inicial, realiza-se a precipitação de $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ sobre $(\text{NH}_3)_2\text{HPO}_4$, com velocidade de gotejamento de 80 gotas/min. Adiciona-se hidróxido de amônia (NH_4OH) suficiente para a solução contida no Becker atingir e manter pH 10 durante toda a reação (cerca de 50mL). A solução no béquer deve ficar em agitação durante todo o processo de reação e 2h depois de seu término. Após 24 h de maturação, realiza-se a filtragem com pressão de vácuo. A pasta residual da filtragem é então colocada em uma placa de Petry para secagem na estufa durante 24 horas à 70°C. Após a secagem, ocorre a moagem de HAp em cadinho de ágata e calcinação à 900 °C por 2 horas com rampa de 2 °C/min

4.2 Óxido de grafeno por exfoliação química

Dentro dos métodos descritos na literatura para obtenção de GO, a exfoliação química é um dos mais promissores. O método consiste em aumentar o espaçamento interplanar da estrutura do grafite, devido à formação de grupos funcionais nas camadas de grafeno. A exfoliação subsequente através de ultrassom separa as camadas de GO, conforme ilustrado na Figura 9.

Figura 9: processo simplificado de exfoliação química do óxido de grafeno



Fonte: Pei et al [53]

Para a preparação dos óxidos de grafeno, utilizou-se uma variação do método de Hummers, descrito por Chen [109] para obtenção de óxidos de grafeno. O método proposto não diminui o rendimento comparado ao método de Hummers original, e elimina gases tóxicos decorrentes do processo como $\text{NO}_2/\text{N}_2\text{O}_4$. A água usada nas reações é livre de ions Na^+ e NO_3^- , que facilita o descarte.

Para produzir o óxido de grafeno, usou-se 3 g de grafite em pó (Sigma-Aldrich, lote #BCBB5882), adicionado à 70 mL de ácido sulfúrico concentrado, sob agitação. O sistema foi mantido dentro de banho de gelo para controle da temperatura, conforme ilustra a Figura 10. Mantendo a agitação, foi adicionado lentamente 9,0 g de permanganato de potássio (KMnO_4), buscando manter a temperatura do sistema abaixo dos 20 °C. Após misturar por meia hora, 150 mL de água milique foram adicionados lentamente. Em seguida, adiciona-se mais 500 mL de água milique seguido de adição lenta de 15 mL de peróxido de hidrogênio H_2O_2 (30%), que muda a solução do marrom para o amarelo.

Figura 10: Primeira etapa da preparação do Óxido de grafeno



A mistura foi filtrada e lavada em solução de ácido clorídrico (1:10 HCl) para remoção de íons metálicos. A ‘pasta’ resultante dessa lavagem é o óxido de grafite, que foi seco em ar e diluído em 600 mL de água milique. A solução de óxido de grafite foi purificada por diálise usando membranas de diálise (Inlab) com *cut-off* de peso molecular de 12.000-16.000 e porosidade de 25 Å, para remoção de impurezas e partículas metálicas, conforme ilustrado na Figura 11. O processo de diálise durou 1 semana, ocorrendo a troca de água ao se notificar a mudança de pH.

Figura 11: Saco de diálise lacrado, contendo solução de óxido de grafite, imerso em água milique



Após purificada, a solução foi diluída em 1,2 L de água milique, agitada por 12 horas e sonicada em uma ponteira de ultrassom por 1 minuto para que ocorresse a exfoliação, transformando a solução em GO. Essa suspensão de GO foi centrifugada a 3000 rpm por 40 minutos (Baby I 206 BL, FANEM, Brasil). A centrifugação serve para sedimentar a parte de grafite que não foi exfoliada durante a sonicação. Após a centrifugação, o líquido sobrenadante na proveta é a solução de óxido de grafeno de 2% em peso.

4.3 Síntese de compósitos HAp/GO

A síntese de compósitos HAp/GO foi realizada através da adição da solução de GO na solução de fosfato de amônia, $(\text{NH}_3)_2\text{HPO}_4$, precursora de HAp. Utilizou-se uma solução 2w% de GO em água. Baseado em estimativas de rendimento da síntese de HAp, foi possível calcular a massa de solução de GO que deveria ser adicionada à solução precipitante para produzir compósitos de HAp/GO 2w% e HAp/GO 0,05w%.

A solução de GO foi adicionada em períodos diferentes durante a síntese de HAp por precipitação, para verificar se o processo de síntese e maturação interfere na microestrutura do compósito. As misturas de HAp/GO foram categorizadas em :

- 1- Adição da solução de GO feita durante o Sol-gel da HAp;
- 2- Mistura da solução de GO feita antes da agitação;
- 3- Mistura feita após a agitação;
- 4- Adição da solução de GO no início da maturação de HAp
- 5- Adição da solução de GO feita após 12 horas de maturação da HAp.

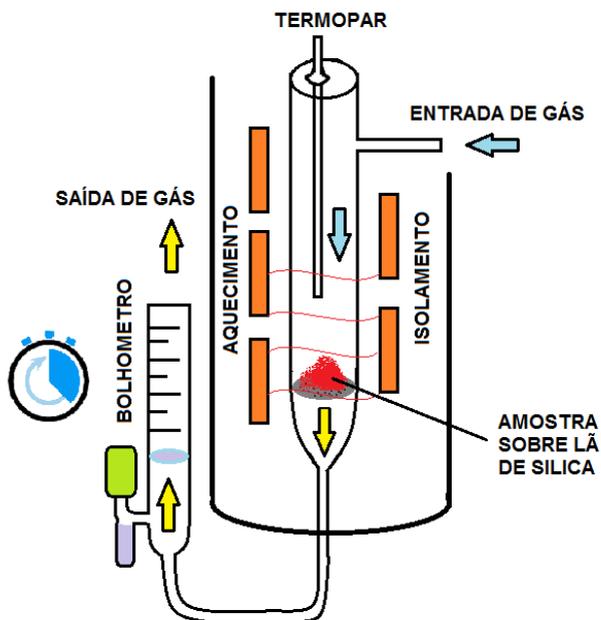
4.4 Síntese de compósitos HAp/CNT

Os CNT utilizados neste estudo foram produzidos por método CVD similar ao relatado por Kosma et al [110]. Soluções contendo catalisador à base de Ferro e Cobalto ($\text{Fe}(\text{NO}_3)_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ e $\text{Co}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) foram preparadas e misturadas com quantidades de pó de HAp, mantendo a relação de massa HAp/Solução em 1:1. Para esse estudo, utilizaram-se três soluções com diferentes concentrações de catalisador (2w%, 10w% e 20w%), com o objetivo de verificar a

influência da concentração de catalisador na síntese CNT. Em seguida, realiza-se a secagem da amostra a 100°C em estufa.

Após a secagem, deposita-se 300 mg do pó de HAp contendo catalisador sobre uma bucha de lã de sílica de alta pureza (Act Ion SiO₂ 99,995%), que encontra-se inserida dentro de um tubo de quartzo. O tubo, orientado verticalmente, é conectado à linha de gases e posicionado dentro de um reator, onde serão monitorados os fluxos de gases (controladores de vazão e bolhometro) e temperatura (termopar 1 e 2). O esquema é ilustrado na Figura 12. O reator é aquecido até a temperatura de reação (700 e 800 °C) com passagem de gás nitrogênio (NO₂) a 40 cm³/min para manter a atmosfera inerte. Ao alcançar a temperatura desejada, inicia-se a introdução de gás acetileno à um fluxo de 10 cm³/min, mantendo a temperatura constante durante 60 min. Após o término da reação, interrompe-se o fluxo de acetileno, mantendo o nitrogênio até o resfriamento completo à temperatura ambiente e retira-se a amostra.

Figura 12: esquema do reator de CVD



4.5 Caracterização

As amostras produzidas foram caracterizadas nos laboratórios parceiros no campus da UFSC. A análise por difração de raios x (DRX) foi realizada na Central de análises, Departamento de Química da UFSC, em difratômetro *Enraf-Nonius*, modelo CAD-4 (Holanda), sendo analisado na faixa 2θ de 5° até 80° , com passo de $0,5^\circ$ e permanência de 5 segundos.

A espectroscopia Raman foi realizada no LABMAT (UFSC) em aparelho *Renishaw* com laser de argônio 514,5 nm de comprimento de onda (luz verde), com câmera digital acoplada ao microscópio.

As imagens de microscopia eletrônica de varredura (MEV) foram realizadas no CERMAT (UFSC) usando um microscópio de bancada HITACHI TM3030. As imagens de microscopia de transmissão (MET) foram realizadas no LME (UFSC) em equipamento modelo JEM-2100 da marca JEOL.

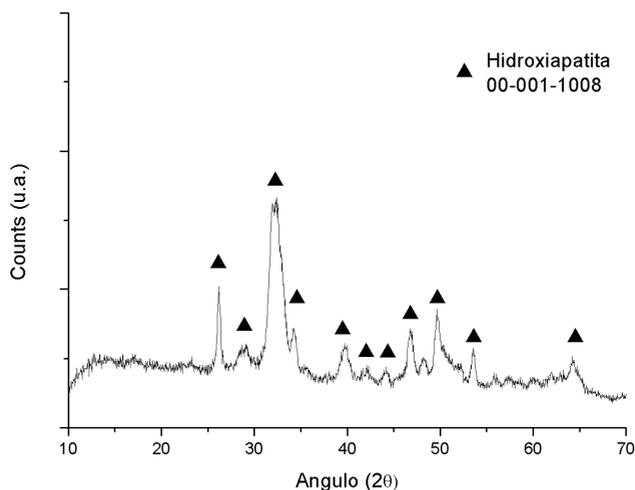
As amostras de Hidroxiapatita Pura, bem como as amostras de HAp/GO foram dissolvidas em água milique e sonicadas no ultrassom por 60 segundos para dispersão das partículas. As amostras de HAp/CNT foram dissolvidas em acetona. Com auxílio de uma micropipeta, 10 μL de solução de cada amostra foram precipitadas sobre *grids* de carbono apoiado sobre papel filtro. Após secagem ao ar, as amostras foram levadas ao microscópio de transmissão.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Análise da Hidroxiapatita

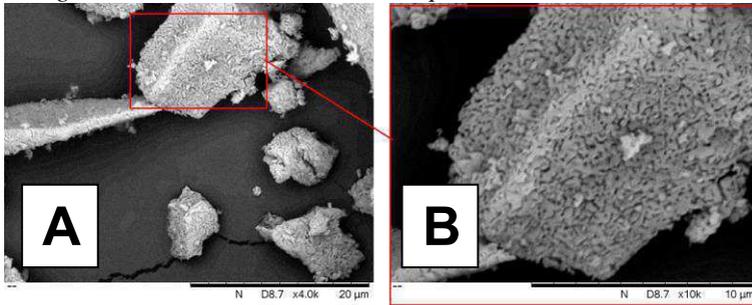
As análises realizadas em DRX da amostra de HAp sintetizada por precipitação química são apresentadas na Figura 13. Verificou-se no difratograma a presença de picos característicos da hidroxiapatita 00-001-1008, de acordo com o *ICDD database*. O espectro indica a presença de fase amorfa na amostra, devido à forma pouco definida dos picos e presença da ‘halos’. Este material pode ser uma HAp cristalina com resíduos de fosfato de cálcio amorfo.

Figura 13: DRX da amostra de Hidroxiapatita pura



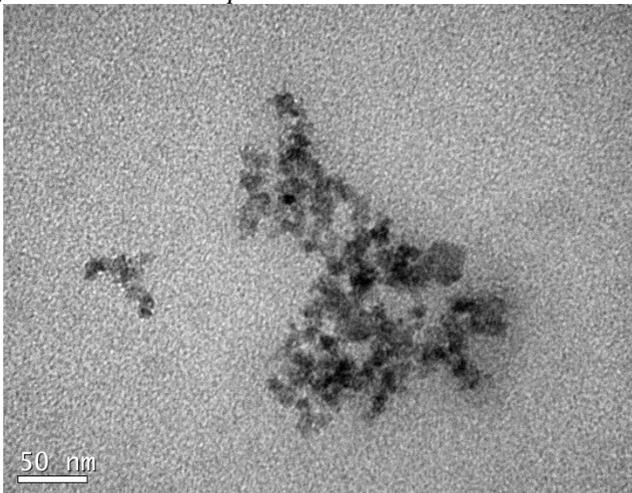
As imagens da amostra de HAp obtidas por MEV são apresentadas na Figura 14 (a) e (b). A Figura 14 (a) revela os grânulos de HAp obtidos do maceramento do pó após sua síntese. O aspecto nanométrico das partículas pode ser observado na Figura (b), onde um dos grânulos, observados em maior aumento, aparenta ser um agregado de nanopartículas de HAp. Este agregamento das nanopartículas pode ser explicado por diversos fatores como umidade, processamento do pó e preparação da amostra.

Figura 14: MEV da amostra de HAp



A Figura 15 apresenta a imagem de MET das partículas de HAp. Através dessa imagem, podem ser constatadas as dimensões nanométricas das partículas que apresentam morfologia esférica e menos aglomeradas quando comparadas às imagens de MEV da Figura 14. A dispersão de HAp em água, através do uso de ultrassom, possibilitou que esta característica fosse detectada.

Figura 15: MET de HAp Pura



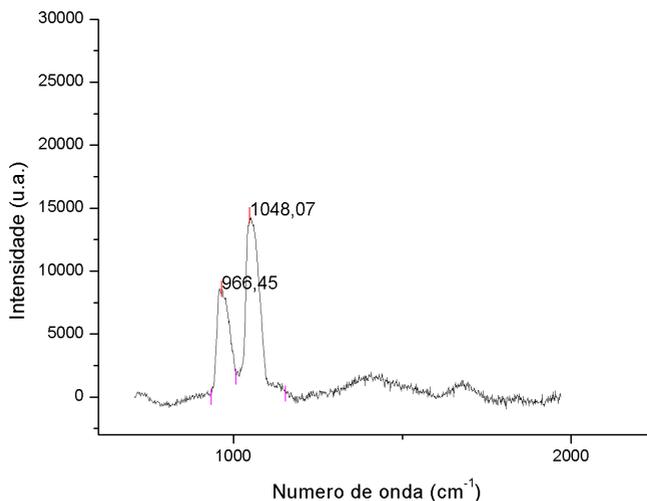
A amostra de HAp pura foi caracterizada por Raman. A espectroscopia resultante é apresentada na Figura 16. A análise numérica revelou duas bandas claras, em 966 cm^{-1} e outra a 1048 cm^{-1} . De acordo com dados encontrados na literatura [111], o espectro Raman da HAp apresenta uma banda muito intensa em 961 cm^{-1} , referente ao

alongamento simétrico do grupo PO_4 , e outro pico médio em 1046 cm^{-1} , referente ao alongamento genérico do mesmo grupo PO_4 .

A diferença entre os valores de literatura e as amostras produzidas, para valores de número de onda, pode ser explicado como erro matemático no processo de ‘*fitting*’ das curvas e cálculo do ponto máximo como referência do pico pelo *software*.

A diferença registrada entre as intensidades dos picos se deve à presença de outras fases na amostra. A intensidade alta do pico 1046 cm^{-1} é característica de fosfatos de cálcio, que pode estar presente na amostra. De acordo com de Aza *et al* [112], os espectros de Raman de TCP e HAp policristalino são muito semelhantes, devido ao modo de vibração similar na presença dominante dos grupos PO_4 .

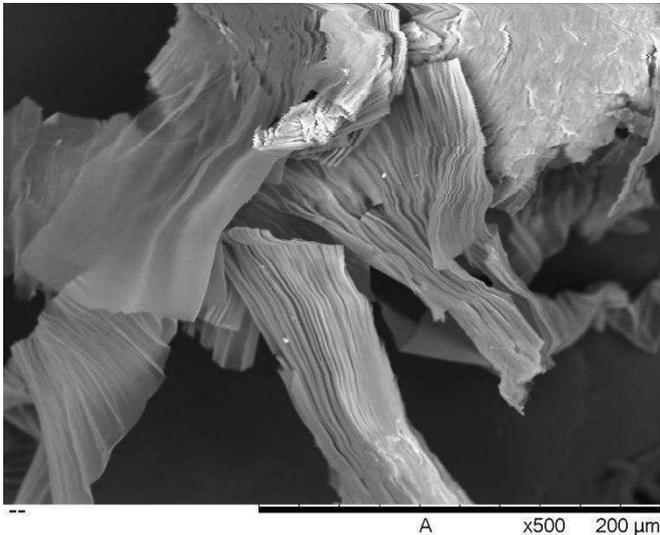
Figura 16: Espectroscopia Raman da amostra de HAp pura



5.2 Análise do óxido de grafeno

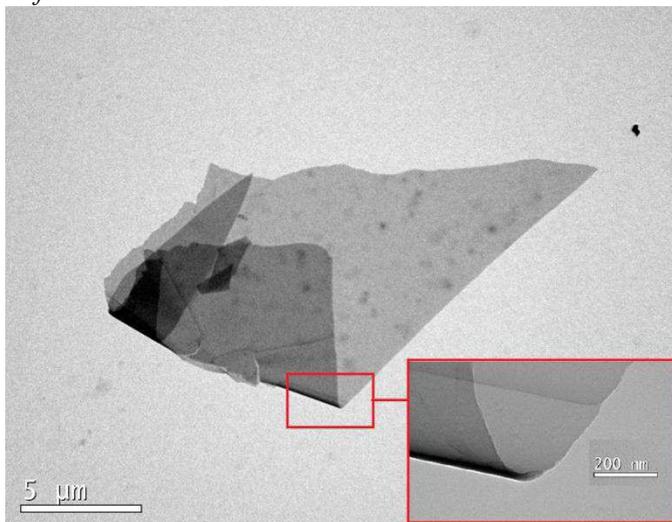
As soluções de GO 2w% foram preparadas por liofilização para serem analisadas em MEV. A Figura 17 apresenta a imagem com aumento de 500x. À esquerda da imagem, é possível observar folhas de óxido de grafeno com aspecto de espessura de apenas 1 átomo, devido à sua transparência. No centro da imagem, as folhas de GO parecem estar ‘empilhadas’, mas com alguma distância entre cada folha, indicando que pode ter acontecido o processo de oxidação, sem ter ocorrido a exfoliação.

Figura 17: Imagem MEV da solução de GO 2 w%, com aumento de 500x.



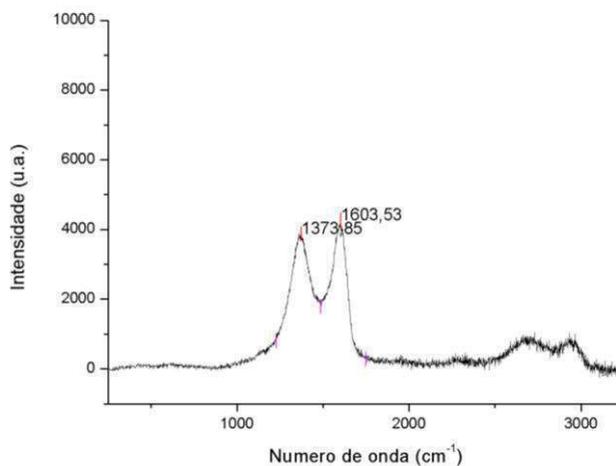
A Figura 18 apresenta a imagem de MET da mesma solução de GO 2 w%. É possível visualizar, através da diferença na tonalidade, que uma camada se sobrepõe à outra. Tons mais escuros indicam que várias camadas estão sobrepostas, enquanto tons mais claros indicam que poucas, ou apenas uma camada existe ali. A ‘folha’ de GO em questão apresenta algo que se parece com uma dobra, apresentada em destaque na Figura 17. Esse destaque indica que a folha está se dobrando sobre si mesma. Outros defeitos como ‘rugas’ são observados nesta imagem.

Figura 18: Imagem de MET do GO. A ampliação mostra a 'dobra' da folha.



A solução liofilizada de GO foi analisada por espectroscopia Raman. O espectro resultante é apresentado na Figura 19. Neste, os picos à 1373 e 1603 cm^{-1} aparecem claramente, indicando as bandas D- e G- do GO.

Figura 19: Espectroscopia Raman da amostra de GO



Atráves das análises feitas, e comparando os resultados com outras referências, é possível caracterizar o material produzido como óxido de grafeno em solução 2 w%. Atráves de cálculos de massa, a solução foi separada e uma parte diluída em 0,05 w% para utilização na síntese dos compósitos.

5.3 Análise de HAp/GO

As amostras de HAp e GO foram classificadas de acordo com o percentual de GO (2% e 0,05%). Os espectros resultantes da análise de DRX são apresentados nas Figuras 20 (amostras com 0,05% de GO) e 21 (amostras com 2% de GO). A análise destes espectros revela que não houve mudança com relação à fase HAp durante o processamento com soluções de GO. Todas as amostras apresentam espectros semelhantes, o que é visível no alinhamento dos picos apresentados no difratograma. As amostras apresentam pequenos 'halos', ao invés de apresentar picos destacados, indicando presença de fase amorfa. Esta pode ser tanto um fosfato de cálcio amorfo, quanto uma fase de carbono amorfo. A presença da fase carbono é notada em $2\theta = 44.38^\circ$ referente ao grafite (1 0 0) e em $2\theta = 26.381^\circ$ referente ao plano (0 0 2) de grafite [78].

Figura 20: Difratograma das amostras de HAp pura e HAp com 0,05 w% de GO.

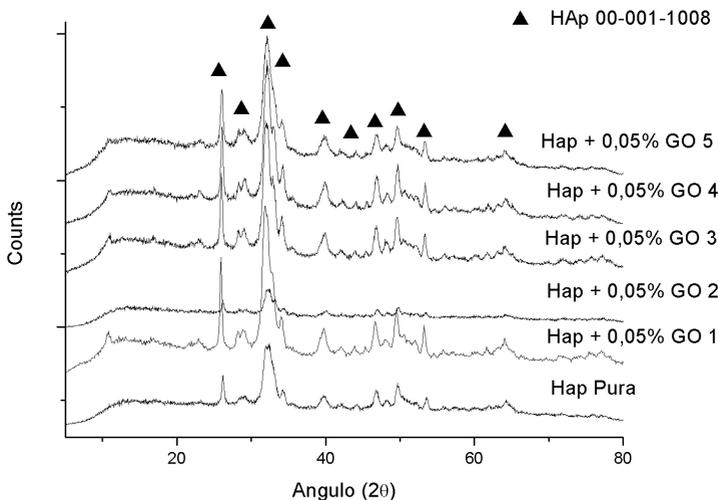
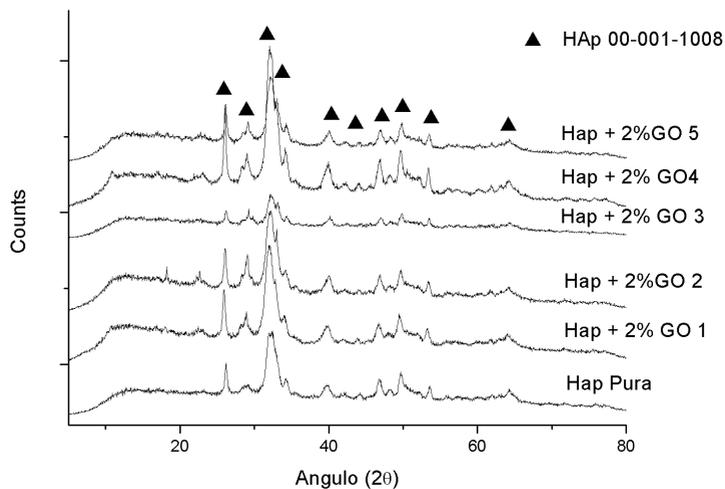


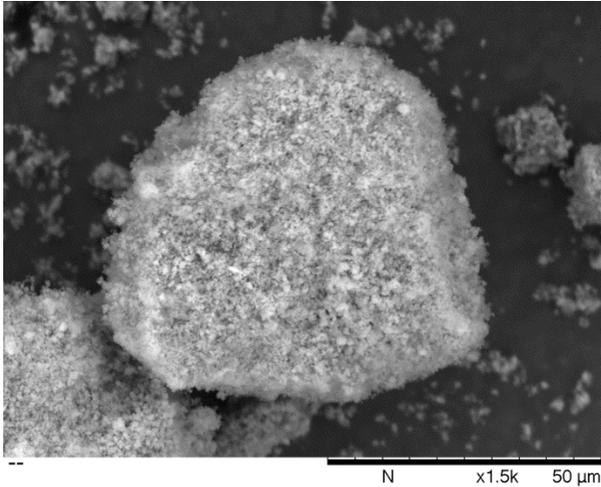
Figura 21: Difratoograma das amostras de HAp pura e HAp com 2% de GO.



HAp/GO 0,05 w%

As imagens obtidas por MEV são apresentadas a seguir. A Figura 22 apresenta o MEV da amostra de HAp/GO contendo 0,05% de GO do grupo 1. Na imagem, é possível notar a morfologia nanométrica das partículas de HAp, formando um grânulo maior. O alto brilho de alguns pontos da imagem pode indicar a retenção de elétrons do feixe de elétrons emitido pelo equipamento.

Figura 22: MEV da amostra de HAp/GO 0,05% do grupo 1



As imagens de MEV das amostras de HAp/GO contendo 0,05 w% de GO dos grupos 2, 3, 4 e 5 são apresentadas nas Figuras 23, 24, 25 e 26 respectivamente. Essas amostras apresentaram semelhança entre si. Nenhuma das amostras apresentou formas semelhantes à GO na análise realizada.

Figura 23: MEV da amostra de HAp/GO 0,05 w% do grupo 2

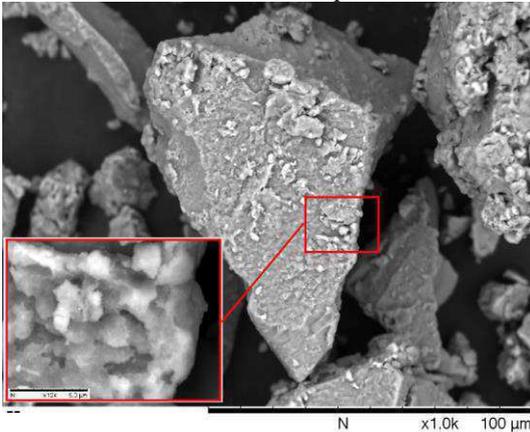


Figura 24: MEV da amostra de HAp/GO 0,05 w% do grupo 3

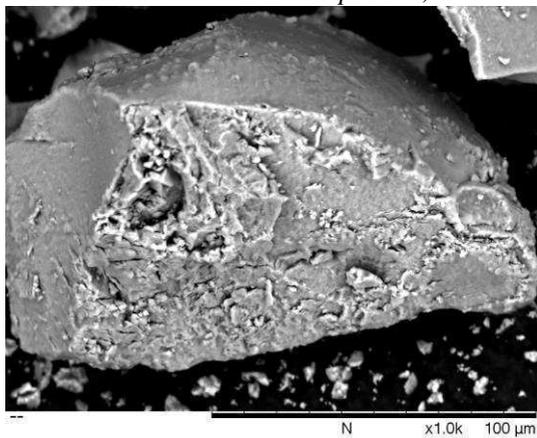


Figura 25: MEV da amostra de HAp/GO 0,05 w% do grupo 4

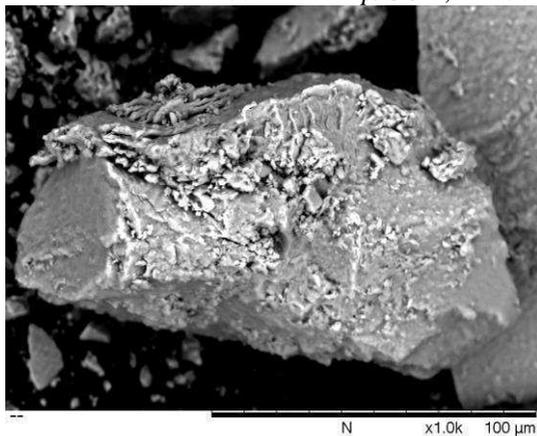
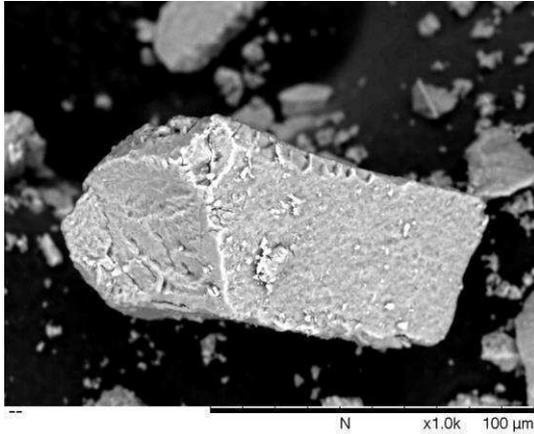


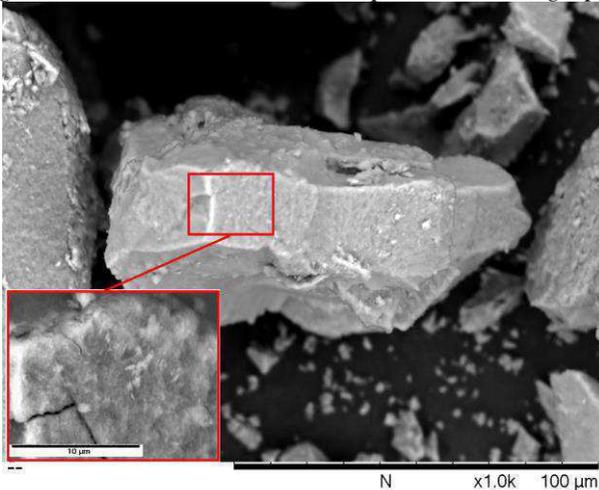
Figura 26: MEV da amostra de HAp/GO 0,05 w% do grupo 5



HAp/GO 2 w%

As imagens de MEV das amostras de HAp/GO contendo 2 w% de GO do grupo 1 é apresentada na Figura 27. Nesta imagem, bem como durante a execução da análise de MEV, não foi possível observar a presença de GO na estrutura.

Figura 27: MEV da amostra de HAp/GO 2 w% do grupo 1



As amostras de HAp/GO contendo 2 w% de GO do grupo 2 revelaram a presença de folhas de GO nas imagens obtidas em MEV. A Figura 28 apresenta a imagem com aumento de 800x, mostrando um aglomerado de HAp/GO com dimensões de aproximadamente 120 μm . No destaque da Figura 28, notou-se a presença de pequenas ‘folhas’ de GO. Visualizando esta área com maior aumento (Figura 29) foi possível confirmar a presença dessas ‘folhas’ de GO. A Figura 30 apresenta a presença da mesma fase de ‘folhas’ de GO em outro sítio da mesma amostra. A presença de GO em pontos isolados pode indicar que ele está presente dentro dos grânulos, e não na sua superfície. Uma cominuição do material é necessária para revelar de que maneira o GO está distribuído na matriz.

Figura 28:MEV da amostra de HAp/GO 2 w% do grupo 2

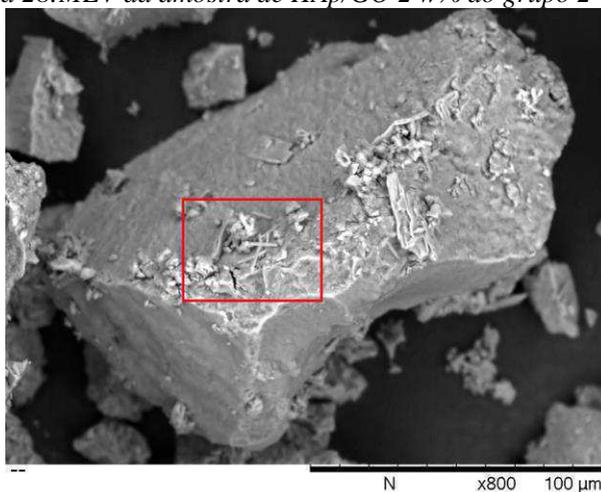


Figura 29: MEV da amostra de HAp/GO 2% do grupo 2, aumento de 10000x

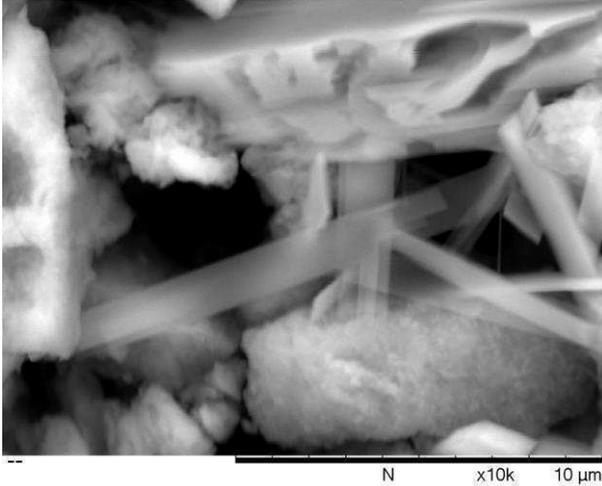
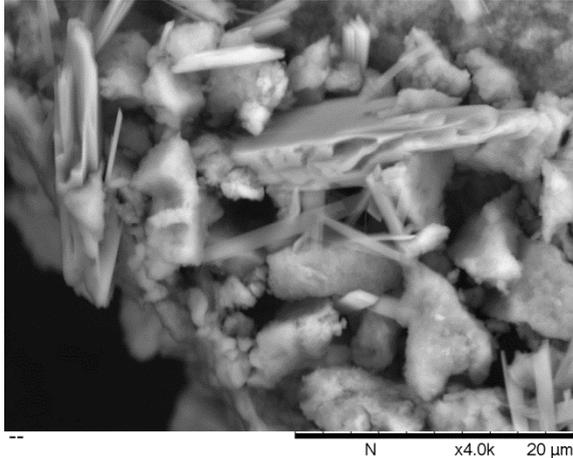


Figura 30: MEV da amostra de HAp/GO 2 w% do grupo 2, contendo 'folhas' de GO



A Figura 31 apresenta a imagem de MEV da amostra de HAp/GO 2 w% do grupo 3. Essa imagem não revela fase GO. Entretanto, o tamanho médio dos grânulos é maior, indicando que a moagem dessa amostra foi diferente. Mais uma vez se faz necessário a moagem

padronizada. A amostra de HAp/GO 2 w% grupo 4 (Figura 32) também não apresentou fase GO.

Figura 31: MEV da amostra de HAp/GO 2 w% do grupo 3

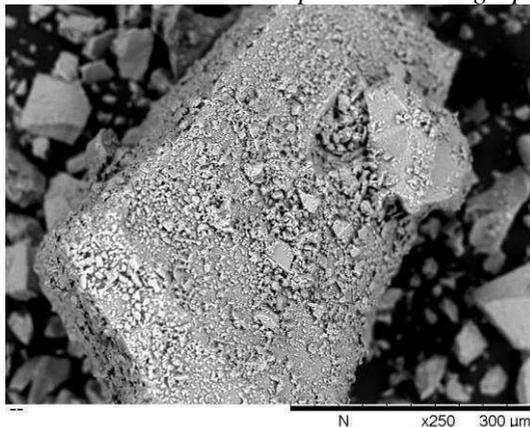
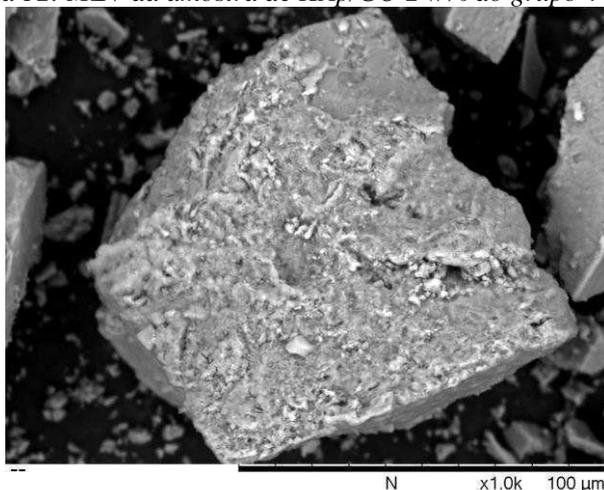


Figura 32: MEV da amostra de HAp/GO 2 w% do grupo 4



A Figura 33 apresenta o MEV da amostra de HAp/GO 2 w% de GO do grupo 5. Em um aumento de 1000x, já se verificam estruturas que se parecem com GO na superfície do grânulo, semelhantes aquelas encontradas na amostra HAp/GO 2% grupo 2. Um aumento de 4000x (Figura 34) revela que essas estruturas mais se parecem com camadas de

GO empilhadas ou aglomeradas. Isso indica que o processo realizado no grupo 5 pode ter aglomerado as 'folhas' de GO.

Figura 33: MEV da amostra de HAp/GO 2 w% do grupo 5

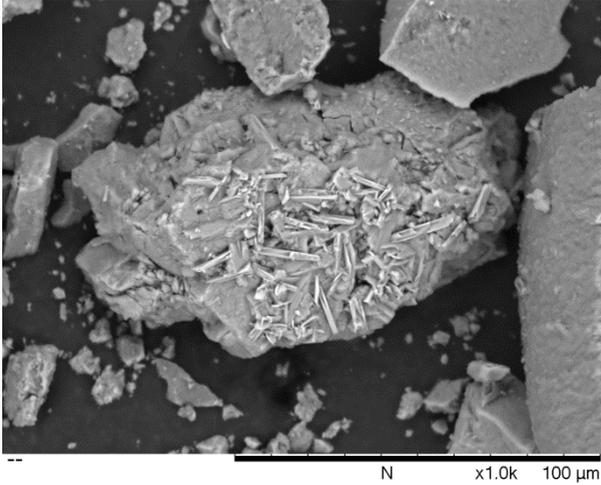
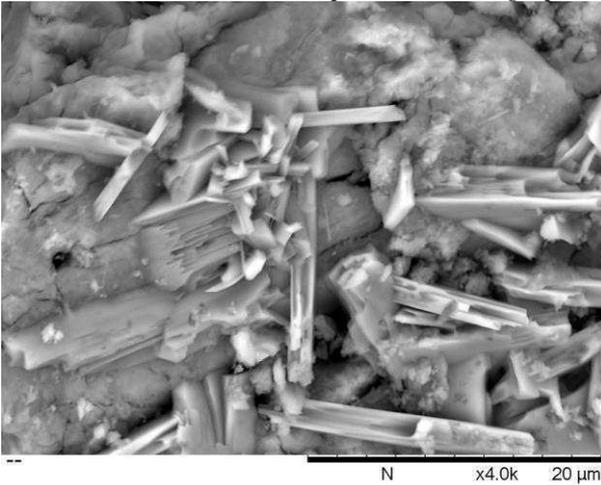


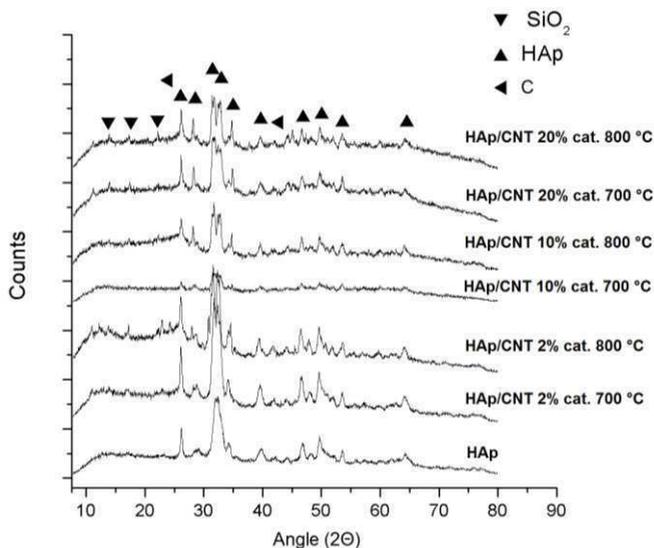
Figura 34: MEV da amostra de HAp/GO 2 w% do grupo 5



5.4 Análise de HAp/CNT

A Figura 35 apresenta o difratograma das amostras de HAp e HAp/CNT. A análise revela que o processo de síntese de CNT não resultou em mudança de fase da HAp, que poderia ter ocorrido pela alta temperatura e presença de catalisadores. Algumas amostras apresentaram picos característicos de sílica (SiO_2) (*ICCD database* 00-016-038), correspondendo à contaminação das amostras pela lã de quartzo presente como suporte no reator. A presença da fase carbono é notada em $2\theta = 44.38^\circ$ referente ao grafite (1 0 0) e em $2\theta = 26.381^\circ$ referente ao plano (0 0 2) de grafite [78].

Figura 35: Difratograma das amostras de HAp pura e HAp/CNT em comparação



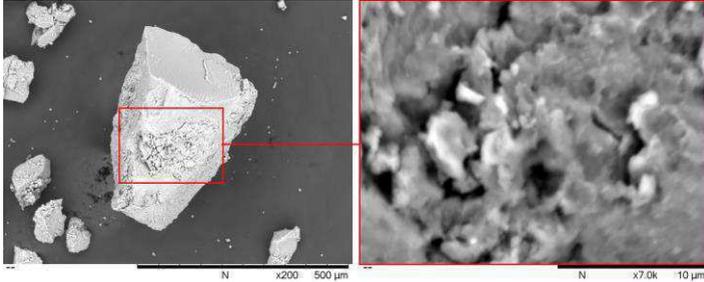
As amostras de HAp/CNT foram analisadas em seus respectivos, grupos, delimitados pela quantidade de catalisador utilizado durante o processo de CVD (2 w%, 10 w% e 20 w%).

HAp/CNT contendo 2 w% de catalisador

A Figura 36 apresenta as imagens de MEV das amostras de HAp/CNT contendo 2 w% de catalisador, processada à 700°C. A

ampliação de 200x mostra o grânulo da amostra. O aumento de 7000x, à direita, não apresenta nenhuma forma de carbono visível, indicando que este pode estar depositado de modo amorfo sobre a HAp.

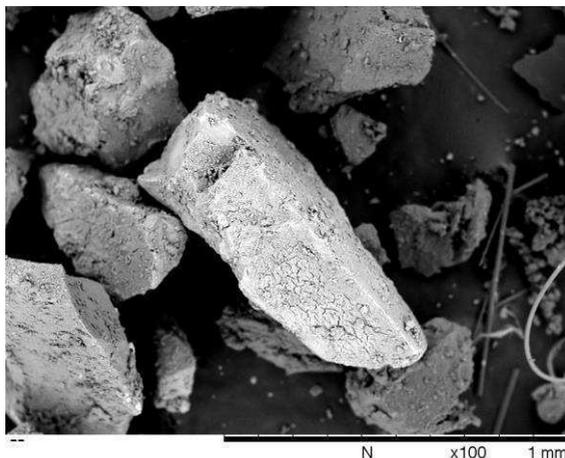
Figura 36: Grânulo de HAp/CNT 2 w% catalisador, processada a 700°C



Comparando com as partículas de HAp pura da Figura 13, percebe-se diferenças na superfície da partícula de HAp/CNT com 2 w% de catalisador. A superfície da partícula tem aparência mais 'lisa', diferente da HAp pura onde foram detectados as nanopartículas de HAp aglomeradas para formar um grânulo.

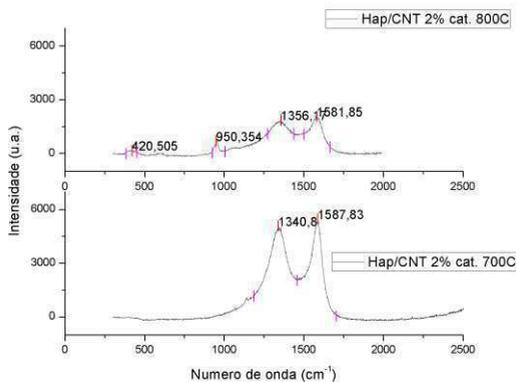
A Figura 37 mostra a imagem de MEV da amostra de HAp/CNT contendo 2% de catalisador processada a 800°C. A superfície deste grânulo apresenta pequenas 'trincas' em sua superfície, indicando que a interação da amostra com acetileno pode ter formado um filme de carbono amorfo. Amplificações maiores não apresentaram informações sobre a morfologia do carbono. À direita da Figura 37 é possível identificar fibras de sílica, provenientes da contaminação das amostra na retirada das amostras do reator.

Figura 37: Grânulo de HAp/CNT 2 w% catalisador, processada a 800°C



A espectroscopia Raman das amostras de HAp/CNT contendo 2 w% de catalisador é apresentada na Figura 38. A razão I_d/I_g para as amostras de HAp/CNT com 2 w% de catalisador processadas a 700 °C e 800 °C é de 0,93. Esse indicador mostra que o carbono presente nas amostras apresenta muitos defeitos, podendo apresentar-se na forma de grafite.

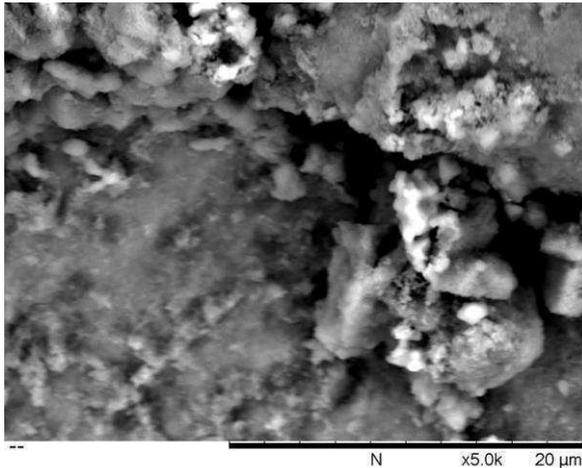
Figura 38: Espectroscopia Raman das amostras de HAp/CNT com 2 w% de catalisador, tratadas à temperaturas de 800 °C e 700 °C



HAp/CNT contendo 10 w% de catalisador

A Figura 39 apresenta a microscopia HAp/CNT com 10 w% de catalisador processada à 700 °C, com aumento de 5000x. Na imagem, não se observa nenhuma característica especial na superfície que diferencie essa amostra da amostra HAp/CNT contendo 2 w% de catalisador.

Figura 39: MEV da amostra de HAp/CNT contendo 10 w% de catalisador, processada a 700°C, com aumento de 5000x.



A Figura 40 apresenta a microscopia da amostra de HAp/CNT contendo 10 w% de catalisador, processada a 800 °C. Nesta imagem, aumentada em 100x , a superfície de um grânulo da amostra (aproximadamente 1 mm em uma de suas dimensões) apresenta uma textura muito característica, diferente das outras amostras. Um aumento de 5000x na mesma região, apresentada na Figura 41, permite visualizar e entender melhor a morfologia do carbono depositado na superfície. Este se apresenta na forma de esferas micrométricas.

Figura 40: MEV da amostra de Hap/CNT contendo 10 w% de catalisador, processada a 800 °C, com aumento de 100x.

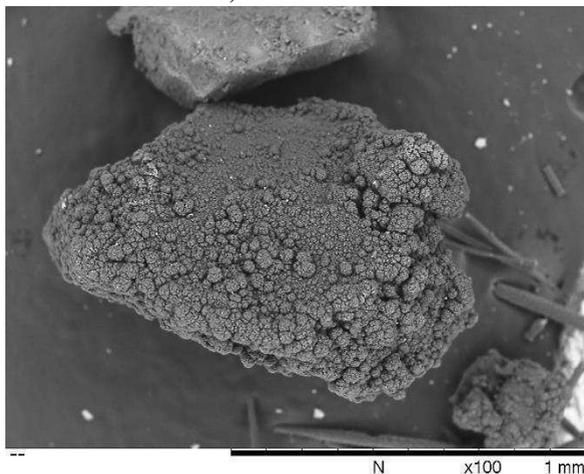
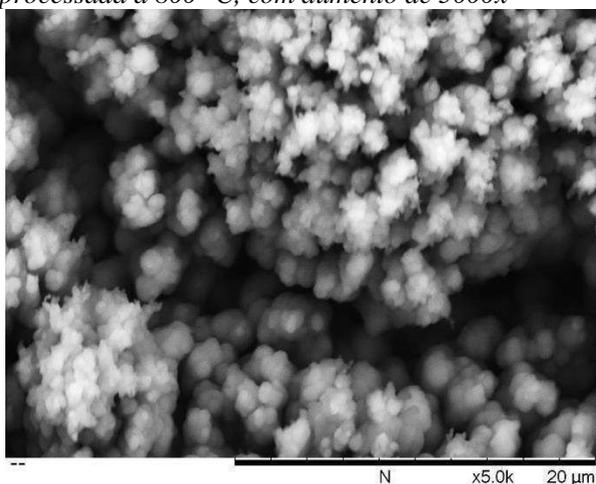


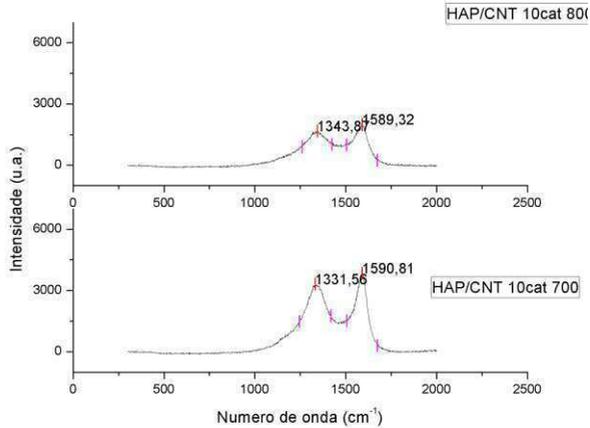
Figura 41: MEV da amostra de Hap/CNT contendo 10 w% de catalisador, processada a 800 °C, com aumento de 5000x



A espectroscopia Raman das amostras de HAp/CNT contendo 10 w% de catalisador é apresentado na Figura 42. Os picos característicos da HAp (960 e 1040 cm^{-1}) são sobrepostos pelas bandas D- e G- do carbono. A razão I_d/I_g da amostra processada a 700 °C é de $0,87$; e para a amostra processada a 800 °C é $0,86$. Esses valores são menores que os

apresentados nas amostras contendo 2 w% de catalisador, indicando uma menor quantidade de defeitos no carbono presente.

Figura 42: Raman das amostras de HAp/CNT com 10 w% de catalisador, tratadas a temperaturas de 800 °C e 700 °C



HAp/CNT contendo 20% de catalisador

A Figura 43 apresenta a microscopia da amostra de HAp/CNT contendo 20 w% de catalisador, processada a 700 °C. Sua superfície, aumentada em 200x, se assemelha à outras amostras de HAp/CNT. Um maior aumento (Figura 44) permite analisar que o carbono se depositou de forma amorfa nesta amostra.

Figura 43: MEV da amostra de HAp/CNT contendo 20% de catalisador, processada a 700°C, aumento de 200x

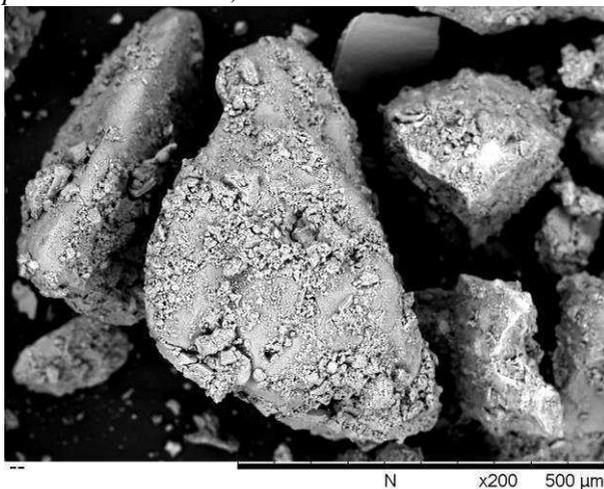
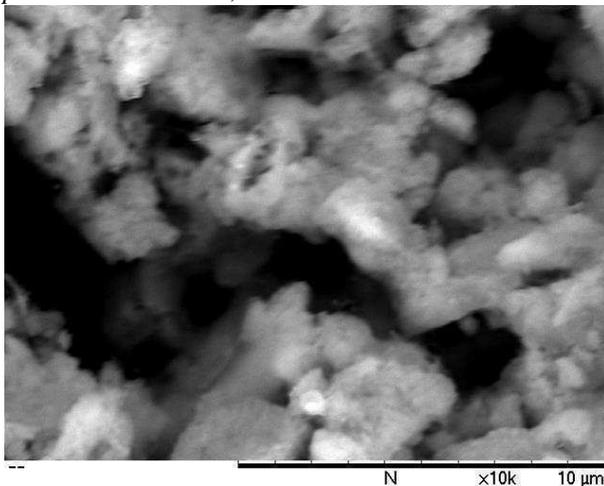


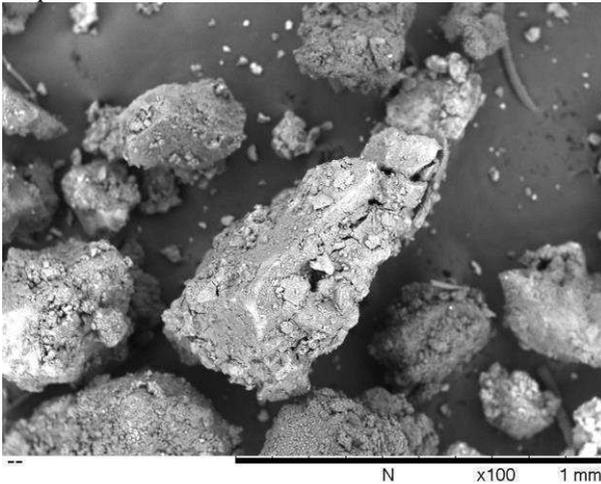
Figura 44: MEV da amostra de HAp/CNT contendo 20 w% de catalisador, processada a 700°C, aumento de 10000x



A Figura 45 apresenta o MEV da amostra de HAp/CNT contendo 20 w% de catalisador, processada a 800 °C, aumento de 100x. Nesta imagem, o grânulo de HAp/CNT se assemelha ao das outras amostras de HAp/CNT. Entretanto, um aumento maior (1500x), apresentado na

Figura 46 revelou estruturas semelhantes à CNT, não presentes em outras amostras. Entretanto, não se pode afirmar que se trata de CNT, devido à baixa resolução de imagem. Outras caracterizações seriam necessárias para elucidar se realmente são CNT's. Essas estruturas encontram-se bem distribuídos e em grande quantidade na superfície do grânulo.

Figura 45: MEV da amostra de HAp/CNT contendo 20 w% de catalisador, processada a 800°C, aumento de 100x



Um aumento maior, da ordem de 5000x, apresentado na Figura 47, revela detalhes das estruturas sintetizadas na superfície do grânulo da amostra. Utilizando o *software* Lince® para quantificação de dados da imagem, determinou-se o diâmetro médio dessas estruturas como sendo 552 nm. Nota-se, entretanto, que o fato de a imagem parecer desfocada pode ter influenciado nestes resultados, sendo necessário uma segunda análise com maior resolução.

Figura 46: MEV da amostra de HAp/CNT contendo 20 w% de catalisador, processada a 800°C, aumento de 1500x

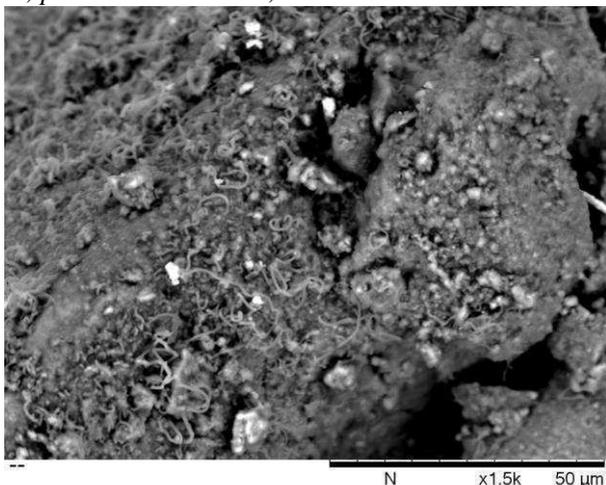
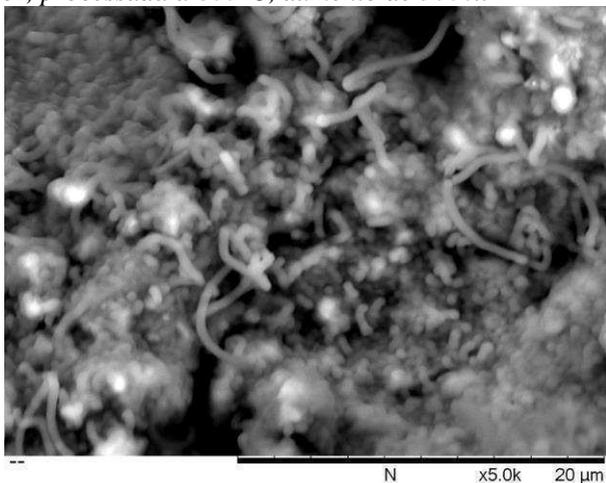


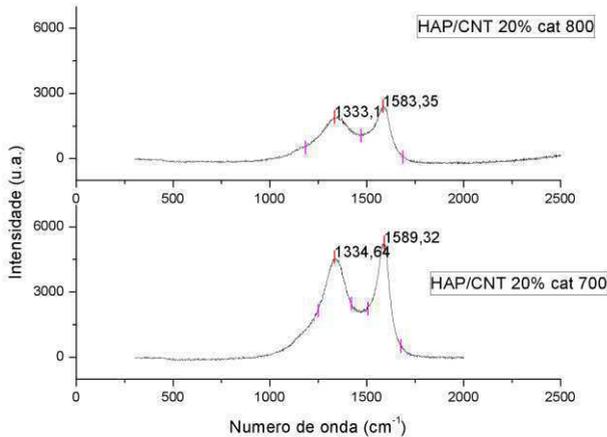
Figura 47: MEV da amostra de HAp/CNT contendo 20 w% de catalisador, processada a 800°C, aumento de 5000x



A Figura 48 apresenta a espectroscopia Raman das amostras de HAp/CNT com 20 w% de catalisador, tratadas a temperaturas de 800 °C e 700°C. A razão I_d/I_g da amostra processada à 700 °C é 0,88. O I_d/I_g da amostra HAp/CNT 20 w%cat. processada à 800 °C é 0,79. O menor

valor da amostra processada à 800 °C, em harmonia com o resultado apresentado no MEV, indica que esta amostra apresenta carbono na forma de nanotubos.

Figura 48: Espectroscopia Raman das amostras de HAp/CNT com 20% de catalisador, tratadas a temperaturas de 800 °C e 700 °C



Os valores de intensidade das bandas D (I_d) e G (I_g) são quantificados e listados na Tabela 3. As amostras de CNT com 2% de catalisador apresentar valores de I_d/I_g próximos de 1, indicando a presença de falhas na rede do carbono, e possível presença de fase amorfa. Apenas a amostra contendo 20 w% de catalisador, processada a 800 °C mostrou uma razão I_d/I_g de 0,79, um valor abaixo das outras amostras. Essa diferença, junto com as imagens de MEV, atestam a existência de nanoestruturas na amostra HAp/CNT 20 w% cat. 800 °C.

Tabela 4: Razão das intensidades dos picos D e G

Amostra	I_d	I_g	I_d/I_g
2% 700°C	6052,47	6504,28	0,930537
2% 800°C	2621,50	2814,68	0,931367
10% 700°C	3893,05	4451,13	0,874621
10% 800°C	2324,98	2674,88	0,86919
20% 700°C	5400,00	6078,36	0,888398
20% 800°C	2704,68	3389,28	0,79801

Os compósitos fibrosos de HAp/CNT produzidos por Kosma et. al [110] atingiram valores de I_d/I_g entre 0,64 e 0,85, mas sem uma relação linear referente aos parâmetros de concentração de catalisador e temperatura de processo. Os nanotubos depositados sobre as fibras de HAp possuem diâmetro de 30-80 nm.

Li et al [78] produziram compósitos de HAp/CNT por CVD utilizando metano e catalisador Fe_2O_3 , obtendo $I_d/I_g = 0,71$ para amostra contendo 5% de catalisador. A sinterização à vácuo não alterou essa propriedade. Os diâmetros dos nanotubos produzidos se encontram na faixa de 10-15 nm.

Lahiri et al [113] mostram valores de I_d/I_g entre 0,6 – 1,28, justificando o aumento de defeitos no carbono devido à sinterização utilizada neste trabalho, sendo que o valor mais baixo é encontrado no pó de HAp/CNT comercial não-sinterizados.

Em comparação com outras referências, a amostra contendo 20% de catalisador processada à 800°C apresentou boa qualidade das nanoestruturas produzidas. As imagens de MEV mostram que as nanoestruturas de carbono foram depositadas de forma a cobrir a superfície dos particulados em questão.

6. CONCLUSÃO

Do trabalho apresentado nesta dissertação de mestrado pode se concluir que:

- As matérias-primas e materiais precursores (HAp, GO, catalisadores), bem como estruturas e equipamentos (reatores e outros), foram preparados com a estrutura e material disponível nos laboratórios;
- Compósitos de HAp/CNT foram produzidos por CVD;
- Compósitos de HAp/GO foram sintetizados por rota química inerente ao processo de síntese de HAp.
- O processo de adição de soluções contendo GO não alterou a matriz HAp para outras fases de fosfato de cálcio.
- A influência da etapa em que se adiciona o GO na síntese de HAp não pode ser constatada. A presença de GO nas imagens de MEV parece estar mais relacionado à concentração de GO, aparecendo nas amostras que continham 2% de GO.
- A fase GO, quando detectada no compósito HAp/GO, apresentou-se de forma aglomerada. A dispersão dessa fase é essencial para as aplicações abordadas e propriedades esperadas na criação de um compósito. A cominuição do material após a sua síntese, de forma padronizada, se faz necessária para analisar se o GO existente na amostra encontra-se dentro dos aglomerados.
- A amostra HAp/CNT contendo 20% de catalisador, processada à 800°C apresentou nanoestruturas de carbono bem dispersas e claramente visíveis na superfície dos grânulos analisados, em análise MEV. Esta rota deve ser explorada mais a fundo para obtenção de compósitos HAp/CNT. Entretanto, outras análises são necessárias para elucidar a estrutura desses componentes.
- As análises de DRX revelaram um ‘halo’ no difratograma, indicando a possibilidade de: (a) contaminação das amostras com fase amorfa, ou (b) erro na síntese que resultou em fosfato de cálcio amorfo. Sob

as duas hipóteses, faz-se necessário uma averiguação mais profunda da situação.

- Através da preparação das amostras para microscopia (transmissão e varredura), foi possível projetar um método para detecção da homogeneidade dos recobrimentos na fase cerâmica, baseado na ideia de que a adição de fases contendo carbono servem como condutores de elétrons, possibilitando a utilização das amostras no MEV sem a necessidade de preparação prévia ou recobrimento.
- O processo de catálise heterogênea nas amostras de HAp/CNT pode ter ocasionado uma pré-sinterização, ou aglomeração de particulados, devido à alta temperatura do processo. Isso foi constatado através da análise da dimensão dos particulados nas imagens de microscopia, comparativamente antes e depois do processo.

7. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Nesta seção, apontam-se as sugestões para trabalhos futuros, baseados na experiência obtida durante a pesquisa,

- Utilização de outros catalisadores sobre HAp e estudo sobre a eficiência destes na produção de CNT;
- Produção de compósitos HAp/GO e HAp/CNT em quantidades maiores, para preparação de corpos de prova e outros estudos;
- Estudo da sinterabilidade dos materiais produzidos;
- Ensaio de propriedades mecânicas para validação de hipóteses feitas sobre a inserção de fases de carbono sobre HAp;
- Estudo das propriedades térmicas e elétricas dos compósitos produzidos;
- Estudo toxicológicos dos materiais compósitos produzidos, para validar sua aplicação biológica ;
- Análise de FEG para avaliação da quantidade de camadas e morfologia dos CNT e GO ;
- Espectroscopia RAMAN de luz vermelha para análise do espectro RBM e caracterização mais precisa do tipo de CNT ou GO obtido nas sínteses;
- Cominuição padronizada dos pós de HAp/GO e HAp/CNT para avaliar se existe a presença das fases de reforço dentro dos grãos.
- Estudo de métodos para facilitar a dispersão de GO e CNT em cerâmicas como a HAp;

8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Gilbert Triplett, R. and O. Budinskaya, *New Frontiers in Biomaterials*. Oral and Maxillofacial Surgery Clinics of North America, 2017. **29**(1): p. 105-115.
2. Anderson, J.M., *The future of biomedical materials*. J Mater Sci Mater Med, 2006. **17**(11): p. 1025-8.
3. Abou Neel, E.A., et al., *Tissue engineering in dentistry*. Journal of Dentistry, 2014. **42**(8): p. 915-928.
4. Aoki, H., *Medical applications of hydroxyapatite*. 1994: Ishiyaku EuroAmerica, Incorporated.
5. Vallet-Regí, M., *Ceramics for medical applications*. Journal of the Chemical Society, Dalton Transactions, 2001(2): p. 97-108.
6. Agrawal, K., et al., *Synthesis and characterization of hydroxyapatite powder by sol-gel method for biomedical application*. Journal of Minerals and Materials Characterization and Engineering, 2011. **10**(08): p. 727.
7. Maas, M., U. Hess, and K. Rezwan, *The contribution of rheology for designing hydroxyapatite biomaterials*. Current Opinion in Colloid & Interface Science, (0).
8. Deville, S., E. Saiz, and A.P. Tomsia, *Freeze casting of hydroxyapatite scaffolds for bone tissue engineering*. Biomaterials, 2006. **27**(32): p. 5480-5489.
9. Lew, D., et al., *Repair of craniofacial defects with hydroxyapatite cement*. Journal of oral and maxillofacial surgery, 1997. **55**(12): p. 1441-1449.
10. Weiner, S. and H.D. Wagner, *THE MATERIAL BONE: Structure-Mechanical Function Relations*. Annual Review of Materials Science, 1998. **28**(1): p. 271-298.
11. Fisher, C., et al., *Applications and Nanotoxicity of Carbon Nanotubes and Graphene in Biomedicine*. Journal of Nanomaterials, 2012. **2012**: p. 19.
12. Zhou, H. and J. Lee, *Nanoscale hydroxyapatite particles for bone tissue engineering*. Acta Biomaterialia, 2011. **7**(7): p. 2769-2781.
13. Lahiri, D., S. Ghosh, and A. Agarwal, *Carbon nanotube reinforced hydroxyapatite composite for orthopedic application: A review*. Materials Science and Engineering: C, 2012. **32**(7): p. 1727-1758.

14. Khashayar, P., et al. *Bone Biosensors: Knowing the present and predicting the future.* in *World CONGRESS ON OSTEOPOROSIS, OSTEOARTHRITIS AND MUSCULOSKELETAL DISEASES.* 2015. Osteoporosis International.
15. Brody, H., *Biomaterials.* Nature, 2015. **519**(7544): p. S1-S1.
16. Misch, C.E., *Contemporary implant dentistry.* 2007: Elsevier Health Sciences.
17. Ödman, J., et al., *Osseointegrated titanium implants—a new approach in orthodontic treatment.* The European Journal of Orthodontics, 1988. **10**(1): p. 98-105.
18. Elias, C., et al., *Biomedical applications of titanium and its alloys.* JOM Journal of the Minerals, Metals and Materials Society, 2008. **60**(3): p. 46-49.
19. Klawitter, J.J., et al., *An evaluation of porous alumina ceramic dental implants.* Journal of dental research, 1977. **56**(7): p. 768-776.
20. Dubrulle, J.-H., et al., *Evaluation of combinations of titanium, zirconia, and alumina implants with 2 bone fillers in the dog.* International Journal of Oral and Maxillofacial Implants, 1999. **14**(2): p. 271-277.
21. Möller, B., et al., *A comparison of biocompatibility and osseointegration of ceramic and titanium implants: an in vivo and in vitro study.* International journal of oral and maxillofacial surgery, 2012. **41**(5): p. 638-645.
22. Bauer, T.W., et al., *Hydroxyapatite-coated femoral stems. Histological analysis of components retrieved at autopsy.* J Bone Joint Surg Am, 1991. **73**(10): p. 1439-1452.
23. Overgaard, S., et al., *Resorption of hydroxyapatite and fluorapatite ceramic coatings on weight-bearing implants: A quantitative and morphological study in dogs.* Journal of Biomedical Materials Research Part A, 1998. **39**(1): p. 141-152.
24. Tonino, A.J., et al., *Bone remodeling and hydroxyapatite resorption in coated primary hip prostheses.* Clinical orthopaedics and related research, 2009. **467**(2): p. 478-484.
25. Saini, M., et al., *Implant biomaterials: A comprehensive review.* World Journal of Clinical Cases : WJCC, 2015. **3**(1): p. 52-57.
26. Wegst, U.G., et al., *Biomaterials by freeze casting.* Philosophical Transactions of the Royal Society A:

- Mathematical, Physical and Engineering Sciences, 2010. **368**(1917): p. 2099-2121.
27. Manzano, M. and M. Vallet-Regí, *Revisiting bioceramics: Bone regenerative and local drug delivery systems*. Progress in Solid State Chemistry, 2012. **40**(3): p. 17-30.
 28. Mouriño, V., et al., *22 - Multifunctional scaffolds for bone tissue engineering and in situ drug delivery*, in *Tissue Engineering Using Ceramics and Polymers (Second Edition)*, A.R. Boccaccini and P.X. Ma, Editors. 2014, Woodhead Publishing. p. 648-675.
 29. Wang, Y., *Bioadaptability: an Innovative Concept for Biomaterials*. Journal of Materials Science & Technology.
 30. Olszta, M.J., et al., *Bone structure and formation: A new perspective*. Materials Science and Engineering: R: Reports, 2007. **58**(3-5): p. 77-116.
 31. Morgan, E.F., G.L. Barnes, and T.A. Einhorn, *Chapter 1 - The Bone Organ System: Form and Function*, in *Osteoporosis (Fourth Edition)*, R.M.F.W.D.L.A. Cauley, Editor. 2013, Academic Press: San Diego. p. 3-20.
 32. Coates, P., *Bone turnover markers*. Australian family physician, 2013. **42**(5): p. 285.
 33. Bonucci, E., *Calcification in biological systems*. 1992, Boca Raton: CRC Press.
 34. Noble, B.S. and J. Reeve, *Osteocyte function, osteocyte death and bone fracture resistance*. Molecular and cellular endocrinology, 2000. **159**(1): p. 7-13.
 35. Aarden, E.M., P.J. Nijweide, and E.H. Burger, *Function of osteocytes in bone*. Journal of cellular biochemistry, 1994. **55**(3): p. 287-299.
 36. Li, J., *Fabrication and Characterization of Nano-FET Biosensors for Studying Osteocyte Mechanotransduction in Mechanical and Industrial Engineering*. 2011, University of Toronto. p. 90.
 37. Jacobs, C., et al., *Differential effect of steady versus oscillating flow on bone cells*. Journal of biomechanics, 1998. **31**(11): p. 969-976.
 38. Malone, A.M., et al., *The role of actin cytoskeleton in oscillatory fluid flow-induced signaling in MC3T3-E1 osteoblasts*. American Journal of Physiology-Cell Physiology, 2007. **292**(5): p. C1830-C1836.

39. Li, X., et al., *Sclerostin Binds to LRP5/6 and Antagonizes Canonical Wnt Signaling*. Journal of Biological Chemistry, 2005. **280**(20): p. 19883-19887.
40. Place, E.S., N.D. Evans, and M.M. Stevens, *Complexity in biomaterials for tissue engineering*. Nat Mater, 2009. **8**(6): p. 457-470.
41. Casadei, A.P., *Arcabouço de PLLA/Hap sinterizado, com potencial de utilização em regeneração de tecido ósseo*, in *Ciência e Engenharia de Materiais*. 2009, Universidade Federal de Santa Catarina.
42. Muralithran, G. and S. Ramesh, *The effects of sintering temperature on the properties of hydroxyapatite*. Ceramics International, 2000. **26**(2): p. 221-230.
43. Santos, C.F.d., *Materiais fosfocálcicos para utilização em sistemas de libertação de fármacos*, in *Departamento de Engenharia Cerâmica e do Vidro*. 2006, Universidade de Aveiro: Universidade de Aveiro.
44. ChemTube3D, *Hydroxyapatite $\text{Ca}_5(\text{OH})(\text{PO}_4)_3$* . 2015, ChemTube3D: ChemTube3D.com.
45. Okumura, M., et al., *Primary bone formation in porous hydroxyapatite ceramic: A light and scanning electron microscopic study*. Cells and materials, 1991. **1**(1): p. 4.
46. Macchetta, A., I.G. Turner, and C.R. Bowen, *Fabrication of HA/TCP scaffolds with a graded and porous structure using a camphene-based freeze-casting method*. Acta Biomaterialia, 2009. **5**(4): p. 1319-1327.
47. Tang, Y., et al., *Two-step freeze casting fabrication of hydroxyapatite porous scaffolds with bionic bone graded structure*. Ceramics International, 2013. **39**(8): p. 9703-9707.
48. Inagaki, M., et al., *Chapter 2 - Carbon Nanotubes: Synthesis and Formation*, in *Advanced Materials Science and Engineering of Carbon*. 2014, Butterworth-Heinemann: Boston. p. 15-40.
49. Geim, A.K. and K.S. Novoselov, *The rise of graphene*. Nature Materials, 2007. **6**(3): p. 183-191.
50. Connor, S., *The graphene story: how Andrei Geim and Kostya Novoselov hit on a scientific breakthrough that changed the world... by playing with sticky tape*. Independent UK, 2013.

51. Rasool, H.I., et al., *Measurement of the intrinsic strength of crystalline and polycrystalline graphene*. Nature communications, 2013. **4**.
52. Malhotra, B.D., S. Srivastava, and S. Augustine, *Biosensors for Food Toxin Detection: Carbon Nanotubes and Graphene*. MRS Online Proceedings Library Archive, 2015. **1725**: p. mrsf14-1725-i05-02 (11 pages).
53. Pei, S. and H.-M. Cheng, *The reduction of graphene oxide*. Carbon, 2012. **50**(9): p. 3210-3228.
54. Han, Z.J., et al., *Chapter 12 - Biological Application of Carbon Nanotubes and Graphene A2 - Tanaka, K*, in *Carbon Nanotubes and Graphene (Second Edition)*, S. Iijima, Editor. 2014, Elsevier: Oxford. p. 279-312.
55. Shen, J., et al., *Graphene quantum dots: emergent nanolights for bioimaging, sensors, catalysis and photovoltaic devices*. Chemical Communications, 2012. **48**(31): p. 3686-3699.
56. Gollavelli, G. and Y.-C. Ling, *Multi-functional graphene as an in vitro and in vivo imaging probe*. Biomaterials, 2012. **33**(8): p. 2532-2545.
57. Zhang, L., et al., *Enhanced Chemotherapy Efficacy by Sequential Delivery of siRNA and Anticancer Drugs Using PEI-Grafted Graphene Oxide*. Small, 2011. **7**(4): p. 460-464.
58. Huang, Y.-S., Y.-J. Lu, and J.-P. Chen, *Magnetic graphene oxide as a carrier for targeted delivery of chemotherapy drugs in cancer therapy*. Journal of Magnetism and Magnetic Materials, 2017. **427**: p. 34-40.
59. Masoudipour, E., S. Kashanian, and N. Maleki, *A targeted drug delivery system based on dopamine functionalized nano graphene oxide*. Chemical Physics Letters, 2017. **668**: p. 56-63.
60. Pandey, H., et al., *Controlled drug release characteristics and enhanced antibacterial effect of graphene nanosheets containing gentamicin sulfate*. Nanoscale, 2011. **3**(10): p. 4104-4108.
61. Aliabadi, M., H. Shagholani, and A. Yunessnia lehi, *Synthesis of a novel biocompatible nanocomposite of graphene oxide and magnetic nanoparticles for drug delivery*. International Journal of Biological Macromolecules, 2017. **98**: p. 287-291.
62. Yao, C., et al., *Graphene oxide and creatine phosphate disodium dual template-directed synthesis of*

- GO/hydroxyapatite and its application in drug delivery*. Materials Science and Engineering: C, 2017. **73**: p. 709-715.
63. Ryoo, S.-R., et al., *Behaviors of NIH-3T3 Fibroblasts on Graphene/Carbon Nanotubes: Proliferation, Focal Adhesion, and Gene Transfection Studies*. ACS Nano, 2010. **4**(11): p. 6587-6598.
64. Mondal, M.K., et al., *Design and synthesis of reduced graphene oxide based supramolecular scaffold: A benign microbial resistant network for enzyme immobilization and cell growth*. Materials Science and Engineering: C, 2017. **75**: p. 1168-1177.
65. Czarnecki, J.S., K. Lafdi, and P.A. Tsonis, *A novel approach to control growth, orientation, and shape of human osteoblasts*. Tissue Engineering Part A, 2008. **14**(2): p. 255-265.
66. Wang, K., et al., *Biocompatibility of Graphene Oxide*. Nanoscale Research Letters, 2011. **6**(1): p. 1-8.
67. Iijima, S., *Helical microtubules of graphitic carbon*. nature, 1991. **354**(6348): p. 56-58.
68. Okpalugo, T.I.T., et al., *High resolution XPS characterization of chemical functionalised MWCNTs and SWCNTs*. Carbon, 2005. **43**(1): p. 153-161.
69. Dasgupta, K., J.B. Joshi, and S. Banerjee, *Fluidized bed synthesis of carbon nanotubes – A review*. Chemical Engineering Journal, 2011. **171**(3): p. 841-869.
70. *Carbon Nanotubes structure*.
71. Treacy, M.M.J., T.W. Ebbesen, and J.M. Gibson, *Exceptionally high Young's modulus observed for individual carbon nanotubes*. Nature, 1996. **381**(6584): p. 678-680.
72. Liu, L., et al., *Mechanical properties of graphene oxides*. Nanoscale, 2012. **4**(19): p. 5910-5916.
73. Committee, A.H., *Metals Handbook: Vol. 2, Properties and selection—nonferrous alloys and pure metals*. American Society for Metals, Metals Park, OH, 1978.
74. *MARKETECH International Inc.* 05/05/2017]; Available from: <https://mkt-intl.com/engineered-ceramics/zirconia/>.
75. Cifuentes, S.C., et al., *Novel PLLA/magnesium composite for orthopedic applications: A proof of concept*. Materials Letters, 2012. **74**: p. 239-242.
76. Shah, K.A. and B.A. Tali, *Synthesis of carbon nanotubes by catalytic chemical vapour deposition: A review on carbon*

- sources, catalysts and substrates*. Materials Science in Semiconductor Processing, 2016. **41**: p. 67-82.
77. Mubarak, N.M., et al., *An overview on methods for the production of carbon nanotubes*. Journal of Industrial and Engineering Chemistry, 2014. **20**(4): p. 1186-1197.
78. Li, H., et al., *Fabrication and properties of carbon nanotubes reinforced Fe/hydroxyapatite composites by in situ chemical vapor deposition*. Composites Part A: Applied Science and Manufacturing, 2008. **39**(7): p. 1128-1132.
79. Kealley, C., et al., *Development of carbon nanotube-reinforced hydroxyapatite bioceramics*. Physica B: Condensed Matter, 2006. **385–386, Part 1**: p. 496-498.
80. Wahl, G., et al., *Thin Films*, in *Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry*. 2000, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA.
81. Raty, J.-Y., F. Gygi, and G. Galli, *Growth of Carbon Nanotubes on Metal Nanoparticles: A Microscopic Mechanism from $Ab\ Initio$ Molecular Dynamics Simulations*. Physical Review Letters, 2005. **95**(9): p. 096103.
82. Miyata, Y., K. Mizuno, and H. Kataura, *Purity and Defect Characterization of Single-Wall Carbon Nanotubes Using Raman Spectroscopy*. Journal of Nanomaterials, 2011. **2011**: p. 7.
83. Costa, S., et al., *Characterization of carbon nanotubes by Raman spectroscopy*. Mater Sci Poland, 2008. **26**(2): p. 433-441.
84. Mukherjee, S., et al., *Enhanced bone regeneration with carbon nanotube reinforced hydroxyapatite in animal model*. Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials, 2016. **60**: p. 243-255.
85. Li, X., et al., *Biomedical investigation of CNT based coatings*. Surface and Coatings Technology, 2011. **206**(4): p. 759-766.
86. Miracle, D.B., et al., *ASM handbook*. Vol. 21. 2001: ASM international Materials Park, OH, USA.
87. Callister, W.D. and D.G. Rethwisch, *Fundamentals of Materials Science and Engineering: An Integrated Approach*. 2012: Wiley.
88. Li, C., E.T. Thostenson, and T.-W. Chou, *Dominant role of tunneling resistance in the electrical conductivity of carbon*

- nanotube-based composites*. Applied Physics Letters, 2007. **91**(22): p. 223114.
89. McLachlan, D.S., M. Blaszkiewicz, and R.E. Newnham, *Electrical Resistivity of Composites*. Journal of the American Ceramic Society, 1990. **73**(8): p. 2187-2203.
90. Zhou, M., et al., *Highly Conductive Porous Graphene/Ceramic Composites for Heat Transfer and Thermal Energy Storage*. Advanced Functional Materials, 2013. **23**(18): p. 2263-2269.
91. Isaacson, B.M., et al., *Developing a Quantitative Measurement System for Assessing Heterotopic Ossification and Monitoring the Bioelectric Metrics from Electrically Induced Osseointegration in the Residual Limb of Service Members*. Annals of Biomedical Engineering, 2010. **38**(9): p. 2968-2978.
92. Affatato, S., A. Ruggiero, and M. Merola, *Advanced biomaterials in hip joint arthroplasty. A review on polymer and ceramics composites as alternative bearings*. Composites Part B: Engineering, 2015. **83**: p. 276-283.
93. Stankovich, S., et al., *Graphene-based composite materials*. Nature, 2006. **442**(7100): p. 282-286.
94. Li, A., et al., *Mechanical properties, microstructure and histocompatibility of MWCNTs/HAp biocomposites*. Materials Letters, 2007. **61**(8-9): p. 1839-1844.
95. Thévenot, D.R., et al., *Electrochemical biosensors: recommended definitions and classification*. Biosensors and Bioelectronics, 2001. **16**(1): p. 121-131.
96. Andrea Medeiros Salgado, L.M.S.a.M.A.Z.C., *Development of Potentiometric Urea Biosensor based on Canavalia ensiformis Urease*. Biosensors - Emerging Materials and Applications. 2011: InTech.
97. Yang, G.Y., et al. *Fabrication and characterization of microscale sensors for bone surface strain measurement*. in *Sensors, 2004. Proceedings of IEEE*. 2004. IEEE.
98. Gattiker, F., et al., *Novel ultrasound read-out for a wireless implantable passive strain sensor (WIPSS)*. Sensors and Actuators A: Physical, 2008. **145**: p. 291-298.
99. J, H., *Ultrasonic bone densitometer*. 1974, Google Patents.
100. Liebschner, M.A., *Noninvasive tissue assessment*. 2008, United States Patent and Trademark Office.
101. Leeming, D., et al., *An update on biomarkers of bone turnover and their utility in biomedical research and clinical practice*.

- European journal of clinical pharmacology, 2006. **62**(10): p. 781-792.
102. Sirivisoot, S., et al. *Developing biosensors for monitoring orthopedic tissue growth*. in *MRS Proceedings*. 2006. Cambridge Univ Press.
 103. Willner, I., *Biomaterials for sensors, fuel cells, and circuitry*. Science, 2002. **298**(5602): p. 2407-2408.
 104. Allen, B.L., P.D. Kichambare, and A. Star, *Carbon Nanotube Field-Effect-Transistor-Based Biosensors*. *Advanced Materials*, 2007. **19**(11): p. 1439-1451.
 105. Gruner, G., *Carbon nanotube transistors for biosensing applications*. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2006. **384**(2): p. 322-335.
 106. Agüí, L., P. Yáñez-Sedeño, and J.M. Pingarrón, *Role of carbon nanotubes in electroanalytical chemistry: A review*. *Analytica Chimica Acta*, 2008. **622**(1-2): p. 11-47.
 107. Roy, S. and Z. Gao, *Nanostructure-based electrical biosensors*. *Nano Today*, 2009. **4**(4): p. 318-334.
 108. Rabelo Neto, J.d.S., et al., *Synthesis and Characterization of Calcium Phosphate Compounds with Strontium and Magnesium Ionic Substitutions*. *International Journal of Morphology*, 2015. **33**: p. 1189-1193.
 109. Chen, J., et al., *An improved Hummers method for eco-friendly synthesis of graphene oxide*. *Carbon*, 2013. **64**: p. 225-229.
 110. Kosma, V., et al., *Fibrous hydroxyapatite-carbon nanotube composites by chemical vapor deposition: In situ fabrication, structural and morphological characterization*. *Materials Science and Engineering: B*, 2013. **178**(7): p. 457-464.
 111. Koutsopoulos, S., *Synthesis and characterization of hydroxyapatite crystals: A review study on the analytical methods*. *Journal of Biomedical Materials Research*, 2002. **62**(4): p. 600-612.
 112. de Aza, P.N., et al., *Vibrational Properties of Calcium Phosphate Compounds. I. Raman Spectrum of β -Tricalcium Phosphate*. *Chemistry of Materials*, 1997. **9**(4): p. 912-915.
 113. Lahiri, D., et al., *Carbon nanotube toughened hydroxyapatite by spark plasma sintering: Microstructural evolution and multiscale tribological properties*. *Carbon*, 2010. **48**(11): p. 3103-3120.