



**Gil Alberto Batista
Gonçalves**

**NANOCOMPÓSITOS DE PMMA/HA/GRAFENO PARA
APLICAÇÕES BIOMÉDICAS**



Universidade de Aveiro Departamento de Engenharia Mecânica
2012

**Gil Alberto Batista
Gonçalves**

NANOCOMPÓSITOS DE PMMA/HA/GRAFENO PARA APLICAÇÕES BIOMÉDICAS

Tese apresentada à Universidade de Aveiro para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Doutor em Engenharia Mecânica, realizada sob a orientação científica da Doutora Paula Alexandrina de Aguiar Pereira Marques, Equiparada a Investigador Auxiliar do Departamento de Engenharia Mecânica da Universidade de Aveiro e do Professor Doutor José Joaquim de Almeida Grácio Professor Catedrático do Departamento de Engenharia Mecânica da Universidade de Aveiro

Apoio financeiro do INL–Portugal/Spain
International Nanotechnology
Laboratory

o júri

presidente

Prof. Doutor João Lemos Pinto
professor catedrático da Universidade de Aveiro

Prof. Doutor António Torres Marques
professor catedrático da Faculdade de Engenharia da Universidade do Porto

Prof. Doutor José Joaquim de Almeida Grácio
professor catedrático da Universidade de Aveiro

Prof^a. Doutora Maria Helena Figueira Vaz Fernandes
professora associada da Universidade de Aveiro

Doutora Maria Teresa Neves Petersen
investigadora coordenadora do Instituto Ibérico de Nanotecnologia (INL)

Doutora Mercedes Vila
investigadora principal da Faculdade de Farmácia da Universidade Complutense de Madrid

Doutora Paula Alexandrina de Aguiar Pereira Marques
investigadora auxiliar da Universidade de Aveiro

agradecimentos

Em primeiro lugar, o meu sincero agradecimento aos meus orientadores, Doutora Paula Marques e o Professor José Grácio, pela orientação científica, pelo seu apoio e disponibilidade constantes durante todo o projeto. Queria também agradecer pela relação de amizade que foi desenvolvida durante este período. E claro gostaria também de salientar o importante contributo no meu desenvolvimento como investigador

Ao Doutor Manoj Singh, pelos importantes conhecimentos que me transmitiu em especial na área dos materiais de carbono. Ao Doutor Duncan Fagg pela contribuição no aperfeiçoamento da língua inglesa. À Prof^a Nazanin Emani pela realização dos testes de XPS e pela experiência na Lulea University of Technology (Suécia). À Doutora Mercedes pela possibilidade da realização dos estudos celulares e discussões em torno da funcionalização e estrutura dos grafenos.

Aos meus colegas de grupo, Sandra e Nuno, e amigos do Departamento de Engenharia Mecânica, Tânia Barbosa, Guilhermina, Evelina, Zé Augusto, Vítor Neto, Joana Madaleno, Ricardo, Eng. Festas, Carla e José Torre agradeço a ajuda na realização de alguns ensaios laboratoriais, discussão de resultados e o contínuo apoio anímico.

Aos Docentes do Grupo dos Materiais Macromoleculares e Lenhocelulósicos, Prof. Alessandro Gandini, Prof. Dmitry Evtugin e Prof^a. Ana Barros na importante discussão de resultados obtidos e sugestões apresentadas.

Aos meus colegas/amigos de todo um percurso académico que já se estende por vários anos, Ricardo, Carlos, Bruno Galinho, Rui Domingues, Rui Magueta pela amizade e convívio.

Ao INL pelo suporte financeiro para a realização do meu Doutoramento.

A toda a minha família, em especial à Magna e à Filipa, não pelo apoio científico claro, mas por tudo o resto...

palavras-chave

Nanocompósitos, Cimentos Ósseos, Polimetilmetacrilato, Hidroxiapatite, Nanotubos de Carbono, Grafeno, e Óxido de Grafeno.

resumo

Os cimentos ósseos à base de PMMA para aplicações em artroplastia da anca apresentam como grande limitação o facto do seu constituinte principal ser um elemento bioinerte o que leva à falta de integração entre as interfaces cimento ósseo/tecido ósseo, comprometendo assim o desempenho mecânico da prótese ortopédica ao longo do tempo.

Esta dissertação tem como objetivo principal a preparação de novas formulações de cimentos ósseos com a capacidade de estabelecer interações com os tecidos vivos circundantes. De modo a melhorar a bioatividade do sistema e facilitar a sua osseointegração, os cimentos ósseos comerciais foram reforçados com cargas significativas de HA. No entanto o recurso a elevadas cargas de HA (~60% m/m) no cimento ósseo promove debilidades do ponto de vista estrutural, levando a uma baixa resistência mecânica do material final. No sentido de ultrapassar esta limitação, foram inseridas nanoestruturas de carbono (GO ou CNTs) em baixas percentagens na matriz polimérica por forma a maximizar a sua performance mecânica através da perfeita integração de todos os componentes.

A primeira fase deste trabalho consistiu no desenvolvimento de metodologias que permitissem a síntese de GO através da exfoliação química da grafite em solução aquosa. Os resultados obtidos demonstraram a obtenção de folhas de GO em larga escala e com número de camadas uniforme. A funcionalização orgânica superficial via ATRP do GO obtido, com cadeias de PMMA possibilitou o desenvolvimento de novos materiais nanocompósitos, no entanto alguns fatores de natureza tecnológica inviabilizaram o seu uso como agente de reforço na matriz idealizada.

O desenvolvimento de novas formulações de cimentos ósseos consistiu numa matriz de PMMA/HA (1:2 (m/m)) reforçada com pequenas percentagens de GO ou CNTs (0,01, 0,1, 0,5 e 1,0% m/m). A síntese destes materiais nanocompósitos resultou da combinação de diversas técnicas: ultrassons, granulação por congelamento e liofilização. A análise estrutural dos nanocompósitos obtidos demonstrou a eficácia da metodologia desenvolvida na homogeneização de todos os elementos do sistema.

Os estudos desenvolvidos após a conformação e caracterização estrutural dos novos materiais nanocompósitos permitiram verificar que as nanoestruturas de carbono apresentavam efeitos adversos na polimerização via radicalar do PMMA. A análise da fração orgânica permitiu verificar a presença de espécies oligoméricas o que reduziu significativamente o comportamento mecânico dos nanocompósitos. Através do estudo do aumento da concentração das espécies radiculares iniciais foi possível suplantar este problema e tirar o máximo rendimento dos agentes de reforço, tendo-se destacado os nanocompósitos reforçados com GO.

resumo (cont.)

A validação do ponto de vista mecânico das novas formulações de cimentos ósseos recaiu sobre o procedimento descrito na norma europeia ISO 5833 de 2002 – Implantes para cirurgia – cimentos acrílicos, tendo sido realizados os testes de compressão e de flexão.

A avaliação biológica do comportamento dos cimentos ósseos assentou em duas abordagens complementares: estudos de mineralização em SBF e estudos de biocompatibilidade em meios celulares. Após a incubação das amostras em SBF ficou demonstrada a excelente capacidade para promoverem a integração de uma camada apatítica. Através de estudos celulares com Fibroblastos L929 e Osteoblastos Saos-2, nos quais foram avaliados a proliferação celular, viabilidade celular, espécies reativas de oxigénio, apoptose e morfologia celular, foi possível verificar bons níveis de biocompatibilidade para os materiais devolvidos.

keywords

Nanocomposites, Bone Cements, Polimetilmetacrilate, Hydroxyapatite, Carbon Nanotubes, Graphene and Graphene Oxide.

abstract

The PMMA based bone cements used for application in hip replacement surgery presents a huge limitation because its principal component is bioinert, which causes lack of integration between cement/bone tissue interfaces, thus compromising the mechanical performance of the orthopedic prosthesis over time.

The main objective of this work is the preparation of new bone cements formulations with the ability to establish interactions with the surrounding living tissue. In order to improve the bioactivity of the system and to enable osseointegration, commercial bone cement has been reinforced with significant loads of HA. However the use of high loads of HA (~ 60% wt/wt) promotes bone cement weaknesses from the structural point of view, leading to low mechanical strength of the final material. To overcome this limitation, small percentages of carbon nanostructures were added (GO or CNTs) to the polymer matrix in order to maximize its mechanical performance through seamless integration of all the components.

The first part of this work was dedicated to the development of an experimental methodology for the synthesis of GO through the chemical exfoliation of graphite in aqueous solution. Good quality GO nanosheets were produced in large scale and with uniform number of layers. The organic surface functionalization of GO with PMMA chains via ATRP was further investigated allowing the development of new nanocomposite materials; however some technological factors hampered its use as a reinforcing agent in the idealized matrix.

The development of new formulations of bone cements consisted in the preparation of a matrix of PMMA/HA (1:2 (wt/wt)) reinforced with small percentages of GO or CNTs (0.01, 0.1, 0.5 and 1.0% wt/wt). The experimental preparation of such nanocomposite materials resulted from the combination of several techniques: ultra-sonication, freeze granulation and freeze-drying. Structural analysis of the nanocomposites demonstrated the efficacy of the developed methodology in the homogenization of all the constituents of the system.

The structural characterization performed after bone cement specimens shape pointed out that the carbon nanostructures presence caused adverse effects on the radical polymerization of PMMA. The analysis of the organic fraction showed the presence of oligomeric species which significantly reduced the mechanical behavior of the nanocomposites. To overcome this problem and get the maximum yield of the reinforcing agent's presence, the rational increase of the initial radical species concentration in the mixture was investigated. This approach was well succeed having been highlighted the nanocomposites reinforced with GO.

Abstract (cont.)

The validation of the mechanical standpoint of the optimized new bone cements formulations followed the procedure described in European Standard ISO 5833 2002 - Implants for surgery - acrylic resin cements, having been performed the compression and bending tests.

The evaluation of the biological behavior of bone cements relied on two complementary approaches: mineralization studies in SBF medium and biocompatibility studies in cellular medium. After samples incubation in SBF solution the excellent ability of the new cements to promote the integration of new calcium phosphate layer was demonstrated. Cell culture studies with fibroblasts L929 and osteoblasts Saos-2, where cell proliferation, cell viability, reactive oxygen species, apoptosis and cell morphology were evaluated, showed high levels of biocompatibility for the developed materials.

Índice geral

CAPÍTULO I - INTRODUÇÃO GERAL	1
1.1 ENQUADRAMENTO	4
1.2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	5
1.2.1 <i>Função biológica do osso</i>	5
1.2.1.1 Estrutura do osso	5
1.2.2 <i>Biomateriais</i>	8
1.2.2.1 Integração óssea de biomateriais	11
1.2.3 <i>Cimentos ósseos à base de PMMA</i>	12
1.2.3.1 Composição dos cimentos ósseos	13
1.2.3.2 Preparação dos cimentos ósseos.....	14
1.2.3.3 Reação de polimerização	15
1.2.3.4 Limitações dos cimentos ósseos	17
1.2.3.5 Novas formulações de cimentos ósseos.....	19
1.2.4 <i>Nanoestruturas de carbono</i>	20
1.2.4.1 Grafeno	22
1.2.4.1.1 Síntese de grafeno.....	22
1.2.4.1.2 Síntese de óxido de grafeno	25
1.2.4.1.2.1 Estrutura química do óxido de grafeno	28
1.2.4.1.3 Redução do óxido de grafeno	30
1.2.4.1.3.1 Redução química.....	31
1.2.4.1.3.2 Redução térmica	34
1.2.4.1.3.3 Redução eletroquímica.....	38
1.2.4.1.3.4 Redução por combinação de diferentes metodologias	40
1.2.4.1.4 Funcionalização dos grafenos.....	41
1.2.4.1.4.1 Funcionalização orgânica dos grafenos.....	42
1.2.4.1.4.1.1 Funcionalização orgânica covalente	42
1.2.4.1.4.1.2 Funcionalização orgânica não-covalente	47
1.2.5 <i>Nanocompósitos</i>	48
1.2.5.1 Nanocompósitos poliméricos.....	50
1.2.5.1.1 Nanocompósitos de PMMA para cimentos ósseos	53

1.3 OBJETIVOS	56
1.4 REFERÊNCIAS	58
CAPÍTULO II - SÍNTESE, CARATERIZAÇÃO E MODIFICAÇÃO SUPERFICIAL DO ÓXIDO DE GRAFENO	77
2.1 INTRODUÇÃO.....	79
2.2 ESFOLIAÇÃO QUÍMICA DA GRAFITE PARA A OBTENÇÃO DE ÓXIDO DE GRAFENO.....	82
2.3 MODIFICAÇÃO SUPERFICIAL DO ÓXIDO DE GRAFENO COM PMMA VIA ATRP	91
2.3.1 <i>Filmes de PMMA reforçados com óxido de grafeno modificado</i>	96
2.4 CONCLUSÃO	103
2.5 PARTE EXPERIMENTAL.....	104
2.5.1 <i>Síntese de óxido de grafeno</i>	104
2.5.1.1 <i>Redução térmica do óxido de grafeno</i>	104
2.5.1.2 <i>Redução química do óxido de grafeno através de hidrazina</i>	104
2.5.2 <i>Modificação superficial do óxido de grafeno com cadeias de PMMA via ATRP</i>	105
2.5.3 <i>Preparação dos filmes de PMMA reforçados com grafenos</i>	105
2.6 CARACTERIZAÇÃO	106
2.7 REFERÊNCIAS	107
CAPÍTULO III - CIMENTOS ÓSSEOS À BASE DE PMMA/HA REFORÇADOS COM NANOESTRUTURAS DE CARBONO.....	115
3.1 INTRODUÇÃO.....	118
3.2 CARACTERIZAÇÃO DAS NANOESTRUTURAS DE CARBONO	120
3.3 SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DE NANOCOMPÓSITOS PMMA/HA REFORÇADOS COM NANOESTRUTURAS DE CARBONO.....	123
3.3.1 <i>Síntese da componente sólida do cimento ósseo</i>	123
3.3.2 <i>Caracterização mecânica dos novos cimentos ósseos</i>	124
3.3.3 <i>Efeito das nanoestruturas de carbono na polimerização radicalar do PMMA</i> . 129	
3.3.4 <i>Caracterização das cadeias poliméricas de PMMA após polimerização radicalar</i>	132

3.4 NANOCOMPÓSITOS DE PMMA/HA REFORÇADOS COM NANOESTRUTURAS DE CARBONO COM INCREMENTO DE AGENTES RADICALARES	136
3.4.1 <i>Controlo da concentração de agentes radicalares</i>	136
3.4.2 <i>Efeito do aumento da concentração de radicais nos nanocompósitos com GO</i>	140
3.5 CARACTERIZAÇÃO DOS NANOCOMPÓSITOS 0.1CNT E 0.5GO SEGUNDO A NORMA ISO 5833	144
3.5.1 <i>Testes de flexão</i>	144
3.5.2 <i>Testes de compressão</i>	146
3.5.3 <i>Teste “Push-out”</i>	147
3.4.1 <i>Estudo do tempo de cura “Setting time”</i>	148
3.6 CONCLUSÃO	150
3.7 PARTE EXPERIMENTAL	151
3.7.1 <i>Hidroxiapatite</i>	151
3.7.2 <i>Preparação do nanocompósito PMMA/HA reforçado com nanoestruturas de carbono</i>	151
3.7.3 <i>Conformação das amostras de cimento ósseo para os diferentes testes</i>	152
3.7.4 <i>Adição de agentes radicalares BPO e DMT a ambos os componentes do cimento ósseo</i>	152
3.7.5 <i>Extração por Soxhlet da fração macromolecular dos nanocompósitos</i>	153
3.8 CARACTERIZAÇÃO	154
3.9 REFERÊNCIAS.....	156
CAPÍTULO IV - BIOATIVIDADE E BIOCOMPATIBILIDADE DOS CIMENTOS ÓSSEOS PMMA/HA REFORÇADOS COM NANOESTRUTURAS DE CARBONO	161
4.1 INTRODUÇÃO	163
4.2 CARACTERIZAÇÃO SUPERFICIAL DAS AMOSTRAS	167
4.3 ESTUDO DE BIOATIVIDADE POR INCUBAÇÃO EM SBF	171
4.3.1 <i>Caracterização da camada de fosfato de cálcio formada</i>	171
4.3.2 <i>Avaliação da integração da camada de fosfato de cálcio formada</i>	175
4.4 ESTUDOS CELULARES DE BIOCOMPATIBILIDADE	177
4.4.1 <i>Estudos de proliferação celular</i>	177

4.4.2 Estudos de morfologia celular	179
4.4.3 Estudos de viabilidade celular e apoptose	180
4.5 CONCLUSÃO	182
4.6 PARTE EXPERIMENTAL	183
4.6.1 Polimento das amostras	183
4.6.2 Estudos de mineralização em SBF	183
4.6.3 Medição de ângulo de contacto na superfície das amostras com água e diclorometano	184
4.6.4 Estabilização das amostras para estudos <i>in vitro</i> de biocompatibilidade*	184
4.6.5 Estudos de proliferação celular*	184
4.6.6 Estudos de morfologia celular por microscopia confocal*	185
4.6.7 Estudos de morfologia celular por SEM*	185
4.6.8 Estudos de viabilidade celular e apoptose por citometria de fluxo*	185
4.6.9 Validação estatística dos resultados por SPSS*	186
4.7 CARACTERIZAÇÃO	187
4.8 REFERÊNCIAS	188
CAPÍTULO V - CONCLUSÃO GERAL	193
5.1 CONSIDERAÇÕES FINAIS	194
APÊNDICES	197
APÊNDICE 1- MATERIAIS E REAGENTES	199
APÊNDICE 2- TÉCNICAS DE CARACTERIZAÇÃO MAIS COMUNS	201
APÊNDICE 3- PUBLICAÇÕES DURANTE O PERÍODO DE DOUTORAMENTO	203

Lista de abreviaturas e símbolos

ADN	Ácido desoxirribonucleico
AFM	Microscopia de Força Atômica
APTS	3-Aminopropiltriétoxissilano
ATRP	Polimerização Radicalar por Transferência de Átomo
BPO	Peróxido de Benzoílo
CNTs	Nanotubos de Carbono
DAPI	4'-6-diamidino-2'-fenillindol
DCB	1,2-Diclorobenzeno
DCC	N,N'-Diciclohexilcarbodiimida
DCE	1,2-Diclorometano
DCPA	Hidrogenofosfato de cálcio anidro
DCPD	Hidrogenofosfato de cálcio di-hidratado
DMA	Análise Dinâmico-Mecânica
DMac	N,N'-Dimetilacetamida
DMEU	1,3-Dimetil-2-Imidazolidinona
DMF	N,N'-Dimetilformamida
DMSO	Dimetilsulfoxido
DMT	Dimetil-para-toluidina
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
EDC	1-Etil-3-(3-Dimetilaminopropil)carbodiimida
F_{ad}	Força de Adesão
FFT	Transformadas de Fourier
F_L	Força de atrito
F_N	Força Normal
FTIR	Espectroscopia de Infravermelho por Transformadas de Fourier
GBL	γ-Butirolactona
GHR	Grafenos Reduzidos por Hidrazina
GICs	Compostos de Intercalação de Grafite
GO	Óxido de Grafeno
GPMMA	Grafenos Modificados com PMMA
GTR	Grafenos Reduzidos Termicamente
HA	Hidroxiapatite
HATU	2-(7-Azo-1H-Benzotriazol-1-il)-1,1,3,3-Tetrametiluronium Hexafluorofosfato
HMPA	Hexametilfosforoamida
HRTEM	Microscopia Eletrônica de Transmissão de Alta Resolução
MMA	Metacrilato de Metilo

Mn	Numero Molecular
Mw	Peso molecular
MWCNTs	Nanotubos de Carbono de Parede Multipla
NMP	N-Metil Pirrolidina
NMR	Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear
OCP	Fosfato octacálcico
PA12	Poliamida
PC	Carbonato de Propileno
PD	Polidispersibilidade
PE	Polietileno
PMMA	Polimetilmetacrilato
PMMA/HA	Matriz de PMMA comercial com HA na razão de (1:2)
PP	Polipropileno
PS	Poliestireno
PVA	Acetato de Polivinilo
PVC	Cloreto de Polivinilo
RAFT	Polimerização por via Transferência de Cadeia Reversível por Adição-Fragmentação
SBF	Fluido Corporal Simulado
SEC	Cromatografia de Exclusão Molecular
SEM	Microscopia eletrônica de varrimento
SWCNTs	Nanotubos de Carbono de Parede Simples
TCP	Tissue culture plastic
α-TCP	α-Fosfato Tricálcico
β-TCP	β- Fosfato Tricálcico
TEM	Microscopia eletrônica de transmissão
THF	Tetrahidrofurano
TTCP	Fosfato Tetracálcico
XPS	Espectroscopia Fotoelectronica de Raios-X
μ	Coeficiente de atrito

Lista de Figuras

Capítulo I	Pág.
Figura 1.1 Representação esquemática da estrutura do osso.	6
Figura 1.2 Imagem de microscopia ótica dos osteoclastos e dos osteoblastos numa matriz óssea.	7
Figura 1.3 Prótese formada a partir de materiais naturais, utilizada para substituir um dedo amputado. Foi descoberta numa escavação antropológica dos túmulos de Tebas Ocidental, Egípto.	8
Figura 1.4 Teoria de Frost's para o mecanismo biológico de osteoindução.	11
Figura 1.5 Representação gráfica típica do processo de cura de cimento ósseo à base de PMMA, em que T_{max} representa o valor máximo de temperatura e T_{set} representa a temperatura de fixação.	15
Figura 1.6 Formação de radicais livres através da reação redox entre DMT e BPO.	16
Figura 1.7 Mecanismo de polimerização do PMMA via radical livre.	17
Figura 1.8 Imagens de SEM mostrando a formação de micro-fissuras através de a) poros ou de b) aglomerados.	18
Figura 1.9 Evolução temporal do número de publicações sobre materiais de carbono.	21
Figura 1.10 Cronograma de eventos na história da preparação, isolamento e caracterização de grafeno.	22
Figura 1.11 A estrutura hexagonal do grafeno é constituída por duas sub-malhas A e B . Um átomo na sub-malha A está ligado a três átomos da sub-malha B e vice-versa com uma distância atômica de aproximadamente 1,42 Å.	23
Figura 1.12 Representação esquemática dos dois tipos de abordagens de síntese de grafenos, I – Bottom-up e II – Top-down.	24
Figura 1.13 Modelos explicativos da estrutura do óxido de grafite: Hofman, Ruess, Scholz-Boehm e Nakajima-Matsuo.	29
Figura 1.14 Modelo Lerf-Klinowski proposto para a estrutura do óxido de grafite.	29
Figura 1.15 Imagem de AFM a) , estruturas do tipo lactona b) identificadas através de NMR de carbono, em polarização cruzada ^1H - ^{13}C (imagem superior) e ^{13}C (imagem inferior), que permitiram o desenvolvimento de um novo modelo estrutural	30

para o óxido de grafite **c**).

Figura 1.16 Representação esquemática da distribuição dos grupos funcionais de oxigênio à superfície do GO: **A**, grupos epóxido no interior dos domínios aromáticos, **A'** grupos epóxido localizados na periferia dos domínios aromáticos. 32

Figura 1.17 Redução do GO a grafeno através de álcoois: metanol, etanol, isopropanol e álcool benzílico. 34

Figura 1.18 Imagem de HRTEM de GO de camada única reduzido. **a**) Os defeitos estruturais estão assinalados a diferentes cores. Área a azul corresponde a zonas desordenadas da malha de carbono que não foram reduzidas, área a vermelho corresponde à introdução de novos átomos na estrutura de carbono, zona verde corresponde a distorções da matriz. Na zona amarela aparecem os defeitos correspondentes a buracos ou a zonas reconstruídas. **(b,c)** defeitos topológicos e deformações no rGO com hexágonos de carbono (azul), pentágonos (magenta) e heptágonos (verde). A linha a tracejado a vermelho indica zonas com forte distorção da malha cristalina. 36

Figura 1.19 Mecanismo de redução térmica do GO através de radicais. 37

Figura 1.20 Análise química da superfície do GO por XPS, a) grupos com oxigênio e b) grupos com carbono. No gráfico c) e d) pode-se ver a diminuição significativa das espécies contendo oxigênio com o aumento da temperatura. O gráfico e) mostra que a dessorção de oxigênio molecular entre 350 e 550K é paralela à remoção de CO e CO₂. 38

Figura 1.21 Representação experimental do processo de redução eletroquímica do GO em substratos **a**) condutores e **b**) não condutores. 39

Figura 1.22 Representação esquemática do procedimento de redução do GO com recurso a diferentes abordagens, redução em solução e redução térmica. 40

Figura 1.23 Representação esquemática da funcionalização covalente dos grafenos através de diferentes abordagens químicas ¹⁶². **I** Redução do GO a grafeno através de vários agentes redutores (**1**, NaBH₄; **2**, KOH/H₂O; **3**, N₂H₄). **II** Funcionalização covalente da superfície dos grafenos reduzidos “via diazonium” (ArN₂X). **III** Funcionalização do GO através da reação com azida de sódio. **IV** Redução do GO-azida através de LiAlH₄ resulta em GO funcionalizado com grupos amina. **V** Funcionalização de GO-azida através de “click chemistry” (R–C≡CH/CuSO₄). **VI** Modificação do GO com longas cadeias alquílicas (**1**, SOCl₂; **2**, RNH₂) através da reação de acetilação. **VII** Esterificação do GO através dos grupos carboxílicos com alquilaminas. **VIII** Reações de abertura de anel entre os grupos epóxidos do GO e os grupos amina terminais das moléculas orgânicas. **IX** Tratamento da superfície do 43

GO com isocianatos orgânicos o que permite a derivatização dos grupos carboxílicos e hidroxilos em amidas ou ésteres de carbamato (RNCO).

Figura 1.24 Modificação superficial do óxido de grafeno com iniciador de ATRP para polimerização com estireno, butilacrilato ou metilmetacrilato. 45

Figura 1.25 Polimerização Ziegler-Natta de propileno à superfície do GO. 46

Figura 1.26 Representação esquemática da funcionalização não covalente do GO através de, **a)** surfactantes **b)** polielectrólitos, **c)** DNA e **d)** polímeros. 48

Figura 1.27 Representação esquemática do tamanho da matéria. 49

Figura 1.28 Imagens de SEM mostrando a morfologia superficial do nanocompósito (CNTs–PMMA/HA) a diferentes ampliações. A seta vermelha mostra a interação entre os CNTs e a matriz PMMA/HA. 54

Figura 1.29 Imagens reais do nanocompósito 0.1%CNTs-PMMA/HA na interface com prótese de titânio após testes de fadiga com 1 milhão de ciclos **a)** e **b)**. Imagem real **c)** e de microscópio ótico **d)** de PMMA comercial mostrando as fissuras na matriz de PMMA após teste de fadiga com um milhão de ciclos. 55

Capítulo II

Figura 2.1 A figura é composta por imagens de GO obtidas por diversas técnicas de caracterização **a)** imagem real de uma solução coloidal de GO em água. Na figura **b)** pode-se observar uma imagem de microscopia ótica de várias folhas de GO. As figuras **c)** e **d)** representam imagens de SEM de folhas de GO a diferentes ampliações. 82

Figura 2.2 Representação esquemática do duplo mecanismo de oxidação da grafite: oxidação planar cruzada e oxidação lateral/central **a)** e **b)** (L – comprimento lateral dos hexágonos, V_p – taxa de penetração da solução e h_c – comprimento da fratura); Imagens de AFM da grafite pirolítica após 6 e 60 s de oxidação superficial **c)** e **d)**. Os gráficos inseridos nas imagens demonstram a distribuição do tamanho de células formadas. 84

Figura 2.3 Representação esquemática do possível processo de oxidação da grafite e respetiva formação de GO. 84

Figura 2.4. Imagens obtidas por AFM do GO depositado numa lamela de Mica extremamente fina a diferentes ampliações. O gráfico representa o perfil de altura correspondente à linha representada na figura. 86

Figura 2.5 Análise de TEM de GO sintetizado através da esfoliação química da grafite. A figura a) mostra uma imagem de TEM do GO numa grelha de carbono perfurado. As figuras b) e c) correspondem a imagem de HRTEM. A figura d) correspondente à imagem obtida por FFT da imagem c) .	87
Figura 2.6 Espectro de FTIR do GO e do grafeno reduzido através de tratamento térmico (GTR) e químico (GHR).	88
Figura 2.7 Medidas de potencial zeta das diferentes suspensões de grafenos, GO, GTR e GHR, em função do pH.	90
Figura 2.8 Representação esquemática do mecanismo de ATRP para o crescimento controlado de cadeias de PMMA à superfície do GO.	91
Figura 2.9 Imagens de TEM do nanocompósito GPMMA. A Figura a) representa uma imagem de TEM de uma folha de GPMMA numa grelha de carbono perfurado. A Figura b) resulta da ampliação da zona do quadrado da Figura a) . A imagem indexada à Figura a) corresponde à imagem real da solução coloidal de GPMMA em clorofórmio.	92
Figura 2.10 Espectro de infravermelho do GO a) e do nanocompósito GPMMA b) .	93
Figura 2.11 Análise de SEC do PMMA removido da superfície do nanocompósito GPMMA por hidrólise.	94
Figura 2.12 Curvas termogravimétricas de PMMA comercial, GO e do GPMMA.	94
Figura 2.13 Representação esquemática do processo de determinação do coeficiente de atrito (μ) e Força de adesão (F_{ad}) de um material por AFM.	95
Figura 2.14 Análise por AFM da superfície do GO a) e do nanocompósito GPMMA b) em modo de fricção. A representação gráfica apresenta os resultados relativos à F_N em função da F_L segundo a equação, $F_L = \mu(F_N + F_{ad})$. As imagens de AFM da topografia do GO e do GPMMA foram obtidas em modo de contacto.	96
Figura 2.15 Imagens de SEM dos filmes de PMMA preparados com 1% (m/m) a) e 3% (m/m) b) de GPMMA. A fotografia demonstra a flexibilidade do filme com 1% (m/m).	97
Figura 2.16 Imagem dos filmes de PMMA preparados A PMMA, B : 0,5% de GPMMA, C : 1% de GPMMA, D : 1% de GO e E : 3% de GPMMA. A imagem 3D é obtida através de medidas de AFM em modo de contacto com uma F_N de ~80 nN. O gráfico de barras corresponde à intensidade da Força de adesão dependente do local de varrimento no filme composto, PMMA (verde) e GO (vermelho). O gráfico da força F_L em função da F_N para a área total da imagem 100 μm^2 , PMMA (A) ou	98

GPMMA (B).

Figura 2.17 Curvas típicas de nanoindentação, Força-Deslocamento, para o filme de PMMA e PMMA reforçados com GO ou GPMMA. 100

Figura 2.18 Curvas típicas de tração uniaxial (Tensão-Deformação) para o filme de PMMA e PMMA reforçados com GO ou GPMMA. 100

Capítulo III

Figura 3.1 Imagens de microscopia de SEM **a)** e **c)** e TEM **b)** e **d)** dos CNTs funcionalizados e do GO, respectivamente. 120

Figura 3.2 Representação esquemática da preparação de nanocompósitos de cimentos ósseos à base de PMMA/HA (1/2) reforçados com nanoestruturas de carbono. Imagem de SEM do nanocompósito após todo o processo de síntese. A imagem ampliada mostra uma partícula de PMMA pré-polimerizado com uma distribuição homogênea de todos os componentes adicionados na sua superfície (HA e GO). 123

Figura 3.3 Módulo de Young dos nanocompósitos PMMA/HA reforçados com diferentes percentagens de GO e CNTs, 0,01, 0,1, 0,5 e 1% (m/m). 124

Figura 3.4 Testes de resistência à flexão dos nanocompósitos PMMA/HA reforçados com diferentes percentagens de GO e CNTs, 0,01, 0,1, 0,5 e 1% (m/m). 125

Figura 3.5 Imagens de SEM das zonas de fratura dos nanocompósitos de cimentos ósseos reforçados com 1% (m/m) de CNTs **a)** e **b)** e 1% (m/m) de GO **c)** e **d)**. 126

Figura 3.6 Módulo de armazenamento em função da temperatura dos nanocompósitos PMMA/HA reforçados com diferentes percentagens de CNTs, 0,01, 0,1, 0,5 e 1% (m/m). 127

Figura 3.7 Módulo de armazenamento em função da temperatura para os nanocompósitos PMMA/HA reforçado com diferentes percentagens de GO, 0,01, 0,1, 0,5 e 1% (m/m). 127

Figura 3.8 *Tan delta* dos nanocompósitos PMMA/HA reforçados com diferentes percentagens de **a)** CNTs e **b)** GO. 128

Figura 3.9 Representação esquemática de um possível mecanismo de polimerização radicalar do PMMA sobre a influência do GO. 130

Figura 3.10 Representação gráfica das temperaturas máximas obtidas para os diferentes nanocompósitos (GO ou CNTs) durante o processo de polimerização do PMMA. 131

Figura 3.11 Espectros de NMR ¹ H de PMMA extraído dos nanocompósitos com a) CNTs e b) GO.	133
Figura 3.12 Valores obtidos de Resistência à flexão dos nanocompósito reforçado com 0,1% (m/m) CNTs, com diferentes concentrações de agentes radicalares.	137
Figura 3.13 Valores obtidos de Módulo de Young para os nanocompósitos reforçados com 0,1% (m/m) CNTs com diferentes concentrações de agentes radicalares.	137
Figura 3.14 Valores obtidos de Módulo de armazenamento dos nanocompósitos reforçados com 0,1% (m/m) de CNTs para diferentes concentrações de agentes radicalares.	138
Figura 3.15 Valores obtidos de tan delta dos nanocompósitos reforçado com 0,1% (m/m) de CNTs para diferentes concentrações de agentes radicalares.	139
Figura 3.16 Valores obtidos de Resistência à flexão dos nanocompósitos reforçados com GO com (2X) e sem adição (0X) de radicais.	141
Figura 3.17 Valores obtidos de módulo de Young dos nanocompósitos reforçados com GO com (2X) e sem adição (0X) de radicais.	141
Figura 3.18 Valores de módulo de armazenamento dos nanocompósitos reforçados com GO, com adição de radicais (2X).	142
Figura 3.19 Valores obtidos de tan delta dos nanocompósitos reforçados com GO, com adição de radicais (2X).	142
Figura 3.20 Valores obtidos para a resistência à flexão dos diferentes materiais nanocompósitos. Fotografia do aparato experimental para a realização dos referidos testes de flexão.	144
Figura 3.21 Imagem de SEM do nanocompósito 0.1CNT a várias ampliações, onde se pode verificar a formação de micro-fissuras a) e b) . No interior das microfissuras pode-se verificar a distribuição homogénea dos CNTs e o seu contributo para o aumento da resistência mecânica do material c) e d) .	145
Figura 3.22 Imagem de SEM do nanocompósito 0.5GO a várias ampliações, onde se pode analisar a distribuição homogénea do GO na matriz de PMMA/HA a) e b) . A análise de uma simples folha de GO permite verificar a sua boa integração na matriz de PMMA/HA c) e d) , pois evidencia a presença de pequenas partículas de matriz na sua superfície após rutura do material d) .	146
Figura 3.23 Valores obtidos para a resistência à compressão dos diferentes materiais nanocompósitos. Fotografia do aparato experimental para a realização dos	147

referidos testes de compressão.

Figura 3.24 Valores obtidos para os testes de “push-out” dos diferentes materiais nanocompósitos. Fotografia do aparato experimental para a realização dos referidos testes de “push-out” e respetiva configuração da amostra. 148

Figura 3.25 Valores de tempo de cura e respetiva temperatura máxima dos diferentes cimentos ósseos, PMMA/HA, 0.5GO e 0.1CNT. 149

Figura 3.26 Distribuição do tamanho de partícula de HA após processo de moagem com vários tempos (0, 10, 20, 40 e 60 min). 151

Capítulo IV

Figura 4.1 Imagem das amostras de nanocompósitos PMMA/HA, 0.1CNT e 0.5GO. Análise de AFM das referidas amostras considerando diferentes áreas (25, 225 e 625 μm^2). 167

Figura 4.2 Rugosidade superficial média (RSM) das amostras PMMA/HA, 0.1CNT e 0.5GO obtida através de estudos de AFM (9, 25, 225 e 625 μm^2). 168

Figura 4.3 Ângulo de contacto de água em função do tempo para as diferentes superfícies dos materiais nanocompósitos: PMMA/HA, 0.1CNT e 0.5GO. 168

Figura 4.4 Imagem de SEM da superfície polida do nanocompósito PMMA/HA. 170

Figura 4.5 Evolução morfológica da camada de fosfato de cálcio formada à superfície do substrato PMMA/HA após incubação em SBF durante, 1, 3, 7, 14 e 30 dias. 171

Figura 4.6 Evolução do pH **a)**, concentração de cálcio **b)** e fósforo **c)** na solução de SBF durante o período de incubação dos substratos, PMMA/HA, 0.1CNT e 0.5GO. 172

Figura 4.7 Análise por raios-X em ângulo rasante da evolução da camada de fosfato de cálcio formada na superfície do substrato PMMA/HA após incubação em SBF para vários períodos de tempo. 173

Figura 4.8 Estudo por FTIR da evolução camada de fosfato de cálcio formada na superfície do substrato PMMA/HA após incubação em SBF para vários períodos de tempo. 174

Figura 4.9 Imagens de SEM da superfície de corte do cimento ósseo após incubação durante 30 dias em SBF. Perspetiva geral da superfície de corte **a)**; zona ilustrativa da interação entre o material nanocompósito e a camada apatítica **b)** e **c)**; zona ilustrativa da falta de interação entre a camada apatítica formada e as partículas de PMMA pré-polymerizado **d)** e **e)**. 175

Figura 4.10 Ensaios de proliferação de fibroblastos L929 na superfície dos discos de nanocompósitos PMMA/HA, 0.1CNT e 0.5GO após cultura de 3 dias. As células cultivadas em redor dos discos em TCP também foram quantificadas. Foram também realizados controlos em TCP na ausência dos materiais compósitos. O nível de significância estatística foi de * $p < 0,05$. 178

Figura 4.11 Ensaios de proliferação de osteoblastos na superfície dos discos de nanocompósitos PMMA/HA, 0.1CNT e 0.5GO após cultura de 3 dias. As células cultivadas em redor dos discos em TCP também foram contadas. Foram também realizados controlos em TCP na ausência dos materiais compósitos. O nível de significância estatística foi de: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,005$. 178

Figura 4.12 Avaliação da morfologia das células de fibroblastos (a, b, c) e osteoblastos (d, e, f) cultivados em discos de PMMA/HA (a, d), 0.1CNT (b, e) e 0.5GO (c, f) através de Microscopia Confocal. 179

Figura 4.13 Avaliação da morfologia das células de fibroblastos (a, b, c) e osteoblastos (d, e, f) cultivados em discos de PMMA/HA (a, d), 0.1CNT (b, e) e 0.5GO (c, f) através de SEM. 180

Lista de Tabelas

Capítulo I	Pág.
Tabela 1.1 Propriedades mecânicas dos tecidos humanos.	7
Tabela 1.2 Classificação dos biomateriais quanto à sua composição química.	9
Tabela 1.3 Composição de alguns cimentos ósseos comerciais, fase líquida e fase sólida.	13
Tabela 1.4 Diferentes metodologias para a obtenção de suspensões coloidais de GO.	27
 Capítulo II	
Tabela 2.1 Análise de XPS dos grupos funcionais na superfície do GO, GTR e GHR.	89
Tabela 2.2 Efeito do grafeno, tipo e quantidade, nas propriedades mecânicas dos filmes de PMMA.	101
 Capítulo III	
Tabela 3.1 Análise de XPS dos grupos funcionais de oxigênio na superfície do GO e dos CNTs.	121
Tabela 3.2 Análise da fração polimérica de PMMA por cromatografia de exclusão molecular dos nanocompósitos com 0,1% (m/m) de CNTs ou GO.	132
Tabela 3.3 Análise da fração polimérica de PMMA por cromatografia de exclusão molecular dos nanocompósitos com 0,1% (m/m) de CNTs com e sem adição de radicais.	140
Tabela 3.4 Análise da fração polimérica de PMMA por cromatografia de exclusão molecular dos nanocompósitos com 0,5% (m/m) de GO com e sem adição de radicais.	143
Tabela 3.5 Quantidades de BPO e DMT adicionadas ao componente sólido (5g) e líquido (1,8 mL) do novo cimento ósseo, respetivamente.	152
 Capítulo IV	
Tabela 4.1 Contribuição polar (γ_s^p) e dispersiva (γ_s^d) para a energia de superfície (γ_s) dos diferentes materiais nanocompósitos: PMMA/HA, 0.1CNT e 0.5GO.	169

Tabela 4.2 Viabilidade celular e apoptose dos fibroblastos L929 e osteoblastos Saos-2 após três dias em cultura nos nanocompósitos, PMMA/HA, 0.1CNT e 0.5GO. As células que cresceram em redor das amostras foram também quantificadas. Os controlos foram sempre realizados na ausência dos materiais nanocompósitos.	181
Tabela 4.3 Reagentes para a preparação de 1L de solução normalizada de Kokubo (SBF).	183

Capítulo I

Introdução Geral

Neste capítulo apresenta-se um enquadramento geral do conteúdo da tese por forma a que seja possível interiorizar o conceito fundamental do trabalho desenvolvido.

É elaborada uma breve descrição dos componentes biológicos que compõe a estrutura óssea. São também descritos alguns processos biológicos associados à regeneração óssea, que caracterizam esta estrutura como um elemento bastante dinâmico. Por outro lado é também elaborado um breve resumo dos diferentes tipos de biomateriais com especial relevância para aplicações destinadas a implantes ortopédicos, dando especial atenção a biomateriais obtidos a partir de sistemas multifásicos, tais como os nanocompósitos. Neste contexto é elaborada uma revisão relativa à síntese, caracterização e modificação superficial do grafeno por forma a valorizar o seu uso enquanto agente de reforço em nanocompósitos.

No último tópico serão apresentados os objetivos da presente tese, que de uma forma muito genérica consistem no desenvolvimento de novas formulações de cimentos ósseos com resistência mecânica e capacidade de osteointegração melhoradas.

Índice

CAPÍTULO I - INTRODUÇÃO GERAL	1
1.1 ENQUADRAMENTO	4
1.2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	5
1.2.1 <i>Função biológica do osso</i>	5
1.2.1.1 Estrutura do osso.....	5
1.2.2 <i>Biomateriais</i>	8
1.2.2.1 Integração óssea de biomateriais.....	11
1.2.3 <i>Cimentos ósseos à base de PMMA</i>	12
1.2.3.1 Composição dos cimentos ósseos	13
1.2.3.2 Preparação dos cimentos ósseos	14
1.2.3.3 Reação de polimerização.....	15
1.2.3.4 Limitações dos cimentos ósseos.....	17
1.2.3.5 Desenvolvimento dos cimentos ósseos	19
1.2.4 <i>Nanoestruturas de carbono</i>	20
1.2.4.1 Grafeno.....	22
1.2.4.1.1 Síntese de grafeno	22
1.2.4.1.2 Síntese de óxido de grafeno	25
1.2.4.1.2.1 Estrutura química do óxido de grafeno.....	28
1.2.4.1.3 Redução do óxido de grafeno.....	30
1.2.4.1.3.1 Redução química	31
1.2.4.1.3.2 Redução térmica.....	34
1.2.4.1.3.3 Redução eletroquímica	38
1.2.4.1.3.4 Redução por combinação de diferentes metodologias	40
1.2.4.1.4 Funcionalização dos grafenos	41
1.2.4.1.4.1 Funcionalização orgânica dos grafenos	42
1.2.4.1.4.1.1 Funcionalização orgânica covalente.....	42

1.2.4.1.4.1.2 Funcionalização orgânica não-covalente	47
1.2.5 <i>Nanocompósitos</i>	48
1.2.5.1 Nanocompósitos poliméricos	50
1.2.5.1.1 Nanocompósitos de PMMA para cimentos ósseos	53
1.3 OBJETIVOS	56
1.4 REFERÊNCIAS	58

1.1 Enquadramento

Ao longo dos últimos anos, o número de cirurgias ortopédicas aumentou significativamente devido essencialmente ao aumento da esperança média de vida e ao aumento de práticas desportivas. É também de assinalar que a reconstrução de defeitos ósseos devido a extração de tumores é uma realidade cada vez mais frequente. Para além disso, doenças degenerativas e inflamações afetam milhões de pessoas em todo o mundo. Na verdade, elas representam metade de todas as doenças crónicas em pessoas com mais de 50 anos de idade nos países desenvolvidos, prevendo-se que a percentagem de pessoas afetadas por doenças ósseas com mais de 50 anos irá duplicar até 2020 (<http://www.boneandjointdecade.org/>).

Um dos últimos estudos desenvolvidos acerca do mercado ortopédico global demonstrou que este tem sofrido um crescimento acentuado nos últimos anos (2007, 2008 e 2009 – 11,4%, 10,3% e 4,4% respetivamente), estimando que mesmo neste quadro recessivo na economia a nível mundial o crescimento do mercado ortopédico global em 2010 e 2011 continue a ser uma realidade, perspetivando-se um crescimento na ordem dos 3,1 e 4,4% respetivamente (<http://www.gbiresearch.com/>).

Neste contexto, a procura de materiais ortopédicos para substituição e regeneração óssea tem aumentado consideravelmente ao longo dos anos. O crescimento de indústrias que desenvolvem e comercializam esta gama de produtos tem sido notável. As multinacionais que mais se destacam neste segmento de mercado ortopédico a nível de volume de negócios são a Zimmer Holdings Inc., Johnson & Johnson e a Stryker Corporation com cotas de mercado de cerca 24,3%, 23,5% e 22,2% em 2011.

Apesar das doenças músculo-esqueléticas apresentarem a maior taxa de casos clínicos, estas não se encontram no top 10 das áreas de saúde com maior receitas para investigação. Este facto pode ser entendido pela baixa taxa de mortalidade quando comparado com outras áreas de saúde como doenças cardiovasculares e respiratórias. Contudo, os custos associados a este tipo de doenças são tremendos, pois restringem as atividades dos pacientes na sua vida quotidiana, promovem o absentismo ao trabalho e são fonte de dores crónicas (<http://www.cdc.gov/nchs/nhis.htm>).

Estes dados descritos anteriormente demonstram que, de facto, as doenças de foro ortopédico se tratam de um problema de saúde pública, quer pela ordem de grandeza dos casos clínicos, quer pelos montantes financeiros envolvidos. Neste sentido devem ser efetuados esforços por parte da comunidade científica, médica e industrial por forma a melhorar as condições de vida dos pacientes e reduzir os custos dos procedimentos e materiais ortopédicos.

1.2 Revisão bibliográfica

1.2.1 Função biológica do osso

O osso é o principal constituinte dos esqueletos dos animais vertebrados, por exemplo o esqueleto humano de um adulto é constituído por cerca de 208 ossos. As estruturas ósseas apresentam como principais funções a sustentação do corpo, permitir a realização de movimentos, proteção dos órgãos internos vitais e a produção de elementos celulares do sangue.

Os ossos apresentam variações morfológicas dependendo da função que desempenham. Nesse sentido os ossos do corpo humano são normalmente classificados mediante as suas dimensões: longos (ossos que apresentam um comprimento sobressaindo sobre as outras dimensões), curtos (ossos que apresentam o comprimento, largura e espessura homogêneos), chatos (ossos que apresentam um comprimento e uma largura sobressaindo sobre a espessura) e irregulares (ossos com formas bastante irregulares).

Apesar da formação dos ossos se iniciar durante as primeiras semanas de vida do feto, a constituição definitiva de todos os ossos do esqueleto apenas se obtêm no final da adolescência. Nos primeiros anos de vida o esqueleto é apenas constituído por cartilagem, um tecido muito flexível e elástico que não apresenta minerais na sua constituição. Contudo com o desenvolvimento do corpo humano a cartilagem é parcialmente substituída por osso através de um processo denominado de ossificação.

O processo biológico de ossificação pode ser definido de uma forma simples por um mecanismo constituído duas etapas: A primeira etapa consiste no revestimento do osso por células especializadas denominadas por condroblastos, responsáveis pela formação de uma substância amorfa sobre a qual os elementos minerais e nutrientes irão ser depositados. A segunda fase ocorre a partir da morte das referidas células já maduras, condrocitos, que permitem que as células ósseas ativas, os osteoblastos, se depositem com o objetivo de criar centros de nucleação e crescimento ósseo.

1.2.1.1 Estrutura do osso

Do ponto de vista biológico, o osso é estruturalmente constituído por três componentes distintos: o perióstio, o tecido ósseo e a medula óssea (Figura 1.1).¹ O perióstio é a camada fibrosa externa do osso, fina e branca, constituído por bastantes vasos sanguíneos e nervos que fornecem, respetivamente, alimento e sensibilidade ao osso.

Na parte intermédia do osso encontra-se o tecido ósseo, esta matriz óssea é composta por duas fases principais, uma orgânica (proteínas) e outra inorgânica (minerais) ambas com dimensões à nanoescala, o que confere ao osso um bom exemplo de um

nanocompósito (Figura 1.1). A fase orgânica, denominada colagénio, é o maior constituinte proteico que atua como unidade estrutural na qual são incorporados os minerais que na sua maior parte são nanocristais de hidroxiapatite. O colagénio tem uma estrutura fibrosa típica, cujo diâmetro varia de 100 a 2000 nm enquanto os nanocristais de HA têm uma estrutura lamelar com um comprimento de 20-80 nm e espessura de 2-5 nm.^{2, 3} Ao primeiro componente são normalmente atribuídas as características do tecido ósseo, flexibilidade e elasticidade, ao segundo componente são atribuídas a dureza, a resistência ao choque ou ao movimento típico do osso.

Na parte mais interna do osso encontra-se uma parte cilíndrica esponjosa denominada por medula óssea (Figura 1.1). A medula óssea é um tecido gelatinoso responsável pelo fabrico de todas as células do sangue, glóbulos vermelhos (eritrócidos), glóbulos brancos (leucócitos) e plaquetas (trombócitos). É também constituída por células responsáveis pelo crescimento e regeneração do osso, osteoblastos e osteoclastos, e por células reticuladas e fibras que compõem uma malha por forma a sustentar todas as células referidas anteriormente.

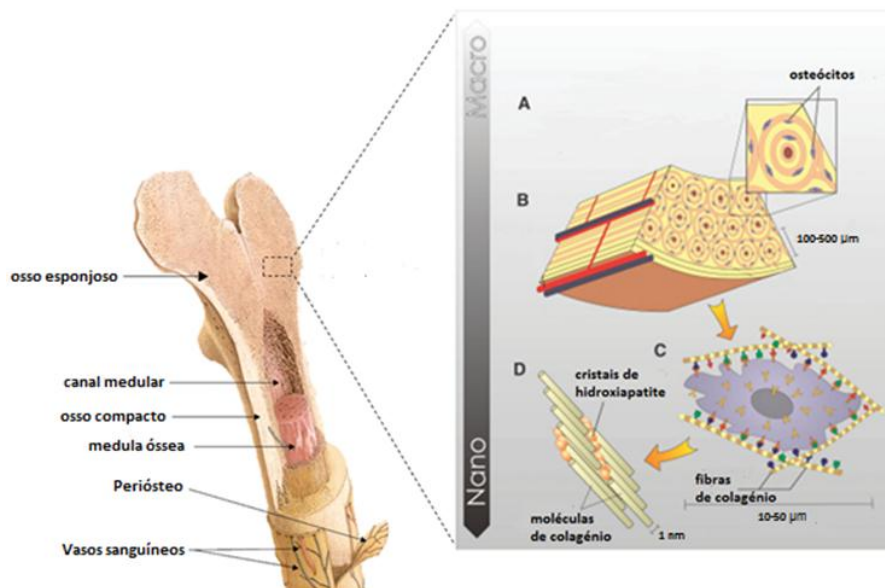


Figura 1.1 Representação esquemática da estrutura do osso

(<http://www.sciencemag.org/content/310/5751/1135/F1.expansion.html>).

De uma maneira geral, pensa-se que o osso é um tecido inerte após atingir a maturidade, contudo, ao longo da vida, o osso passa por constantes fases de regeneração, com os tecidos mais velhos a serem constantemente regenerados por tecidos novos. Neste processo de renovação óssea, os osteoclastos são responsáveis pela destruição do tecido envelhecido criando cavidades ocas que permitem a deposição dos osteoblastos, sendo estes responsáveis pela produção de tecido ósseo novo. Contudo este processo

de regeneração óssea sofre um declínio constante ao longo do envelhecimento, mas persiste durante toda a vida.

Em caso de fratura do osso, o processo biológico de reparação é muito semelhante ao descrito anteriormente para a regeneração do tecido ósseo, no qual os osteoclastos e os osteoblastos (Figura 1.2) têm também um papel preponderante. Neste caso os osteoclastos são responsáveis pela remoção dos resíduos de osso quebrado no local da fratura através de um processo denominado fagocitose, enquanto os osteoblastos são responsáveis pela formação do novo tecido ósseo na zona da fratura.

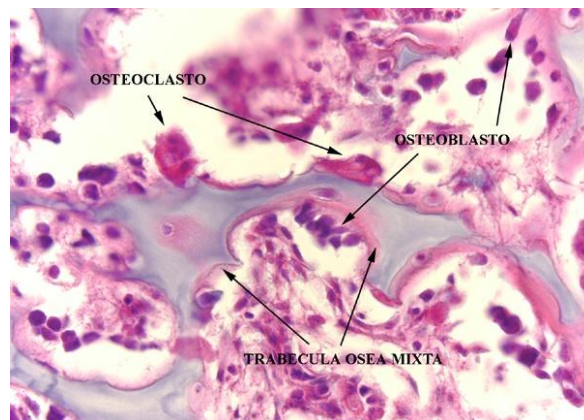


Figura 1.2 Imagem de microscopia ótica dos osteoclastos e dos osteoblastos numa matriz óssea (<http://www.med.uva.es/biocel/Practicas/PHistologia/Practica9.html>).

Em algumas fraturas mais graves os cirurgiões recorrem a biomateriais para substituir as zonas lesionadas e simultaneamente estimular o crescimento do tecido ósseo na zona de fratura. Estes materiais ao serem aplicados devem respeitar as propriedades e as características estruturais das estruturas ósseas que vão substituir. Na tabela seguinte estão descritas algumas das propriedades mecânicas de diversos tecidos ósseos existentes no corpo humano.

Tabela 1.1 Propriedades mecânicas dos tecidos humanos.⁴

Tecidos ósseos	Resistência à tração (MPa)	Resistência à compressão (MPa)	Módulo de Young (GPa)	Tenacidade (MPa ml/2)
Ossos esponjosos	7,4	4-12	0,02-0,5	-
Ossos corticais	60-160	130-180	3-30	2-12
Cartilagens	3,7-10,5	-	0,7-15,3 (MPa)	-
Ligamentos	13-46	-	0,065-0,541	-
Tendões	24-112	-	0,143-2,31	-

A estrutura anisotrópica dos tecidos ósseos leva a que as suas propriedades mecânicas exibam direccionalidade. Por outro lado a função do tecido ósseo no corpo humano também influencia propriedades como a dureza e a tenacidade.

1.2.2 Biomateriais

O uso de biomateriais data desde a época dos Maias, Egípcios e Fenícios. Descobertas arqueológicas demonstraram que estes povos já utilizavam diferentes materiais para suprimir algumas debilidades anatómicas.

A descoberta mais antiga de uma prótese data dos anos 1000-600 A.C., foi encontrada em território egípcio e trata-se de um dedo grande do pé feito de madeira e cabedal, e que ficou mundialmente conhecido como “Cairo Toe” devido à sua funcionalidade (Figura 1.3).⁵



Figura 1.3 Prótese formada a partir de materiais naturais, utilizada para substituir um dedo amputado. Foi descoberta numa escavação antropológica dos túmulos de Tebas Ocidental, Egípto.⁵

Dados arqueológicos da civilização Maia, datados do séc. VIII, demonstraram o recurso a implantes de prótese dentária. A análise de uma mandíbula humana permitiu verificar que o implante usado consistiu na substituição de três dentes por fragmentos de concha. Através da análise por raios-X foi possível verificar o primeiro caso de osteointegração entre o material da prótese e o osso. A escolha do material para o sucesso do implante foi essencial, devido ao facto de que as conchas serem compostas maioritariamente por fosfatos de cálcio.⁵

O termo “biomaterial” apenas reuniu consenso relativamente ao seu significado no final do século XX. Em 1986, na conferência de Chester da Sociedade Europeia de

Biomateriais foi definido o significado de “biomaterial” como sendo um material que pode ser usado em implantes ou dispositivos médicos, com a intenção de interagir com os sistemas biológicos.⁶ Contudo, avanços científicos e tecnológicos recentes, como por exemplo o desenvolvimento de materiais bioativos, ou seja materiais concebidos para estimular respostas celulares específicas a nível molecular,⁷ têm incitado para uma definição mais lata do termo.

De uma forma geral os biomateriais podem ser classificados segundo um de dois critérios: composição química ou comportamento biológico. Neste sentido a primeira premissa divide os biomateriais nas seguintes classes: metais e ligas, cerâmicos e vidros, polímeros, compósitos e nanocompósitos. A tabela seguinte descreve de uma maneira muito sintética os diferentes tipos de biomateriais, as suas respetivas aplicações clínicas, vantagens e desvantagens na sua aplicação.

Tabela 1.2 Classificação dos biomateriais quanto à sua composição química.⁸

Biomateriais	Vantagens	Desvantagens	Aplicações
<p>Polímeros</p> <p>(Poliétileno, Teflon, Poliester, Poliuretano, Polimetacrilatos, Silicone)</p>	Elasticidade e baixa densidade	Baixa resistência mecânica, degradação ao longo do tempo	Suturas, artéria, veias: maxilofacial (nariz, orelha, maxilar, mandíbula, dente); tendão; cimentos ósseos; oftalmologia
<p>Metais e ligas</p> <p>(Aço inoxidável 316L, titânio, liga de titânio Ti6Al4V, liga Co-Cr)</p>	Resistência mecânica elevada, alta resistência a desgaste, energia de deformação alta	Baixa biocompatibilidade, corrosão em meio fisiológico, perda das propriedades mecânicas em presença de tecidos conjuntivos moles, alta densidade	Fixação ortopédica (parafusos, placas, hastes); implantes dentários
<p>Cerâmicos e vidros</p> <p>(Alumina, zirconia, fosfatos de cálcio, porcelana, carbono, vidros bioativos)</p>	Boa biocompatibilidade, resistência à corrosão, quimicamente inertes, alta resistência à compressão	Baixa força de tensão, baixa resistência mecânica, baixa elasticidade, alta densidade	Ossos, juntas, dentes e válvulas, tendões, vasos sanguíneos e traqueia artificial
<p>Compósitos</p> <p>(Fibra de carbono-resinas, CNT-polímeros, argila-polímeros, fosfatos de cálcio-colagenio)</p>	Boa compatibilidade, quimicamente inertes, resistência à corrosão, alta tensão de rotura	Falta de Técnicas de processamento para obter homogeneidade do materiais e boas interfaces entre os componentes	Válvula cardíaca artificial, implantes ósseos, juntas de joelho
<p>Nanocompósitos</p> <p>(Nano-HA/colagénio, Nano-HA/quitosano, Nano-HA/PLLA)</p>	Grande área superficial, alta reactividade superficial, forte interação nas interfaces, aumento das propriedades mecânicas relativamente aos microcompositos	As técnicas de processamento ainda não estão optimizadas, homogeneidade de todas as fases do material	Materiais ortopédicos, engenharia de tecidos e libertação controlada de fármacos

A outra abordagem para tentar classificar os biomateriais baseia-se na sua capacidade para interagir com os tecidos vivos do corpo humano. Baseado nesta premissa Hench⁷ tentou dividi-los em três diferentes gerações: materiais bioinertes (primeira geração), materiais bioativos e biodegradáveis (segunda geração) e materiais concebidos para estimular respostas celulares específicas a nível molecular (terceira geração). Estas três gerações não devem ser interpretadas como cronológicas, mas conceituais, uma vez que cada geração representa uma evolução sobre os requisitos e as propriedades dos materiais envolvidos. Isto significa que no presente, investigação e desenvolvimento são ainda dedicados a biomateriais que de acordo com as suas propriedades, podem ser considerados de primeira ou segunda geração.

Quando os primeiros materiais sintéticos começaram a ser utilizados em aplicações biomédicas, a única exigência era atingir a combinação adequada entre as propriedades mecânicas e a toxicidade. Neste sentido, os biomateriais de primeira geração eram considerados “inertes” para tentar reduzir ao mínimo a resposta imunitária do organismo relativamente ao corpo estranho.⁴ Estes materiais de primeira geração podem ter origem metálica, cerâmica ou polimérica.⁹

A segunda geração de biomateriais teve início nos anos 80 e foi caracterizada pela capacidade dos materiais interagirem com o ambiente biológico de forma a melhorar a resposta biológica e a interação das superfícies tecido/biomaterial, bem como pelo desenvolvimento de materiais com propriedades de bioabsorção, isto é, com a capacidade de sofrer uma degradação progressiva ao longo do tempo enquanto o tecido se repara ou regenera.⁹

A terceira geração de biomateriais consiste nos novos materiais capazes de estimular respostas celulares específicas a nível molecular.⁷ Para estes biomateriais, os conceitos de bioatividade e biodegradabilidade estão intimamente relacionados. Contudo, a estas propriedades ainda deve estar associada a capacidade para sinalizar e estimular a atividade e comportamento celular. Estruturas porosas tridimensionais temporárias que estimulem a difusão, adesão e multiplicação celular através de superfícies funcionalizadas com peptídeos tem vindo a ser alvo de intensa investigação.¹⁰⁻¹² Adicionalmente alguns destes sistemas também conseguem fazer a libertação controlada de fármacos ou agentes bioquímicos que induzem um determinado comportamento nas células.¹³

1.2.2.1 Integração óssea de biomateriais

O osso é uma estrutura bastante dinâmica ao longo do seu tempo de vida, em especial nos seus primeiros anos de formação. Mas para além disso as estruturas ósseas quando solicitadas (traumas ou procedimentos cirúrgicos) apresentam uma dinâmica bastante apreciável por forma a implementar uma resposta muito eficaz a essas solicitações. São três os fenómenos biológicos que normalmente são citados em artigos de ortopedia que pretendem descrever a resposta dos tecidos ósseos à presença de corpos estranhos, no entanto ainda não apresentam total consenso relativamente à sua definição: *Osteoindução*, *Osteocondução* e *Osseointegração*.¹⁴

A *osteoindução* é normalmente definida como a capacidade que um material apresenta para a estimular a estrutura óssea com vista à formação de linhagem de células capazes de produzir osso, este processo é denominado por osteogénese. Normalmente este fenómeno é responsável pelo osso recém-formado, como por exemplo após fraturas ou inserção de implantes. O mecanismo biológico associado à osteoindução consiste numa primeira fase na estimulação das células sobreviventes ao dano (fratura/implante) por forma a ter uma resposta imediata, por outro lado são enviados mensageiros bioquímicos/biofísicos para induzir a diferenciação e a organização celular por forma a repor os tecidos danificados, tecido ósseo e capilares (Figura 1.4).

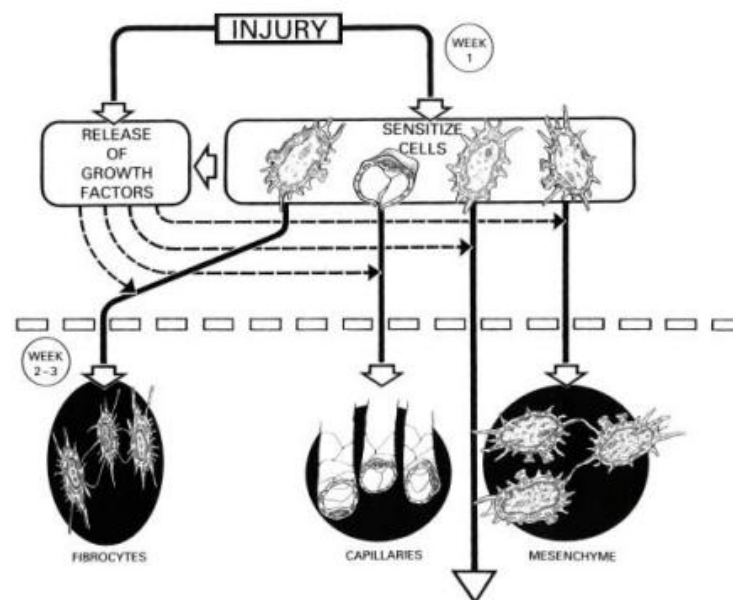


Figura 1.4 Teoria de Frost's para o mecanismo biológico de osteoindução.^{15, 16}

O processo biológico de *osteocondução* consiste na capacidade que um material apresenta para estimular o crescimento ósseo na sua superfície, ou promover a migração óssea através da sua estrutura porosa ou através de canais.

Finalmente, o termo osseointegração suscita ainda algumas dúvidas quanto a sua correta definição, contudo uma das definições mais usadas é que a osseointegração consiste na ancoragem direta de um implante pela formação de tecido ósseo sem o crescimento de tecido fibroso na interface osso/implante.

Podemos contudo afirmar que os três processos biológicos descritos anteriormente não são fenómenos isolados uns dos outros e apresentam até uma certa dependência. Por exemplo se um material for tóxico e não apresentar qualquer estímulo celular para o crescimento ósseo, vai inviabilizar o processo de osteocondução resultando na ausência de integração com o tecido ósseo.

No caso dos implantes o material pode ser osteoindutivo, mas este não é um pré-requisito para a que indução óssea ocorra, no entanto a osteocondução e osseointegração dependem não só de fatores biológicos, mas também da resposta ao material do implante.

1.2.3 Cimentos ósseos à base de PMMA

O polímero polimetilmetacrilato (PMMA) foi descoberto em 1902 por Otto Rohm. Contudo o primeiro cimento ósseo baseado neste polímero foi desenvolvido e aplicado em cirurgia ortopédica em 1958 por Charnley.¹⁷ Após a aplicação do PMMA como cimento ósseo vários outros tipos de cimentos ósseos foram sendo desenvolvidos para tentar colmatar algumas das suas debilidades. Porém o PMMA continua até hoje a ser um dos materiais mais utilizados em próteses ortopédicas de substituição.^{4, 18}

Os cimentos à base PMMA são amplamente utilizados em aplicações ortopédicas, principalmente como agentes de ligação entre o implante e o osso ou na reconstrução óssea. Cerca de 500 mil pessoas realizam cirurgias de substituição (incluindo anca e joelho) em cada ano. No entanto, este tipo de implantes tem um tempo de vida de cerca de 10 a 15 anos, período após o qual os pacientes necessitam de uma nova cirurgia de retificação devido à falha entre o osso e o implante. Normalmente este fenómeno deve-se essencialmente à falta de integração entre a superfície do cimento e as superfícies do osso e da prótese.

1.2.3.1 Composição dos cimentos ósseos

É importante referir que os cimentos ósseos comerciais não são apenas constituídos por polímero, mas sim por uma série de constituintes que desempenham um papel importante em todo o processo de aplicação e durabilidade da prótese ortopédica. Na tabela seguinte estão definidos os constituintes químicos e respetivas funções de alguns cimentos ósseos comerciais.

Tabela 1.3 Composição de alguns cimentos ósseos comerciais, fase líquida e fase sólida.¹⁹

Constituintes	Função	CMW 1 Gentamicin (Johnson&Johnson)	Osteopal G (Merck)	AKZ (Stryker)
Fase sólida		(g)	(g)	(g)
Polímero (PMMA)	Polimetilmetacrilato - matriz	33,89	33,14	29,51
Co-polímeros (MA-MMA)	Alterar as propriedades físicas	-	-	5,91
Sulfato de bário ou dióxido de zircônia	Agente rádio-opacificante	3,60	6,26	4,0
BPO	Iniciador redox	0,82	0,63	0,58
Antibióticos	Tratamento de possíveis infeções	1,69	1,67	0,24
Corante	Distinguir o osso do cimento	-	0,4 mg	-
Fase líquida				
Monómero (MMA)	Polimerizar	18,22	18,40	12,15
DMT	Iniciador redox	0,15	0,38	0,48
Hidroquinona	Estabilizador, evita a polimerização prematura	25 ppm		1,5 mg
Corante	Distinguir o osso do cimento	-	0,4 mg	-

Os cimentos ósseos comerciais à base de PMMA são normalmente sistemas bi-fásicos, constituídos por uma fase líquida e uma fase sólida. A fase sólida é constituída por PMMA pré-polimerizado, peróxido de benzoílo (BPO) como iniciador e em alguns casos é adicionado um corante e/ou um antibiótico. A fase líquida é constituída maioritariamente pelo monómero, metacrilato de metilo (MMA), pelo iniciador dimetil-para-toluidina (DMT) e por um estabilizante, hidroquinona (ou 1-4 dihidroxibenzeno), que é adicionado para evitar a polimerização do monómero durante o período de armazenamento.

Para produzir o cimento, a fase líquida e sólida são misturadas dando-se o início da polimerização. Durante este processo a viscosidade do cimento vai aumentando continuamente até formar um corpo sólido. Este processo denomina-se normalmente por cura. O processo de cura dos cimentos acrílicos é determinado em grande parte pela sua composição química.^{20, 21} No entanto fatores como a temperatura, humidade relativa, relação sólido-líquido, tempo de inserção na cavidade do osso e espessura de cimento também têm uma grande preponderância no processo de cura.²² A melhor relação sólido-líquido parece ser 2:1 para a maioria dos cimentos, tendo em consideração que um aumento da concentração de monómero corresponde a um aumento de temperatura e tempo de conformação.^{23, 24}

1.2.3.2 Preparação dos cimentos ósseos

O processo de preparação do cimento ósseo à base de PMMA engloba vários passos: mistura, espera, manipulação e conformação.²¹ A mistura consiste na integração total dos componentes líquido e sólido através do recurso a dispositivos mecânicos ou manuais. A espera consiste no período de tempo durante o qual o aumento da viscosidade permite que o cimento ósseo seja trabalhado. No final desta fase o cimento pode ser manipulado e aplicado na respetiva prótese. No final da conformação o cimento fica totalmente endurecido.

Numa cirurgia de artroplastia comum, o cirurgião ortopédico determina a fase de polimerização do cimento ósseo pelo exame físico, contudo este procedimento é muito subjetivo e requer um alto grau de experiência.²⁵ No entanto o cirurgião pode, sempre que necessário, consultar os dados incluídos na embalagem do cimento ou recorrer às normas internacionais, ISO 5833 (Europa)²⁶ e ASTM Standard F-451 (EUA),²⁷ que fornecem orientações relativas às condições experimentais de cada fase de manipulação. Na primeira fase de preparação do cimento ósseo (Dough time) procede-se à mistura e homogeneização do componente líquido e sólido do cimento ósseo. Através do recurso à norma ISO 5833 (Implants for surgery — Acrylic resin cements) considera-se por terminado este processo quando o cimento não se cola às luvas, o que leva 2-3 minutos após o início da mistura. A segunda fase corresponde à manipulação do cimento (working time) e corresponde ao tempo que o cirurgião tem para inserir a prótese e ajustar o seu posicionamento. A última fase do processo corresponde ao aumento da dureza do cimento ósseo (Setting time), que segundo a norma ISO 5833 tem início quando a temperatura da polimerização atinge metade do valor máximo. É também nesta fase que se atinge o pico exotérmico da reação de polimerização (Figura 1.5).

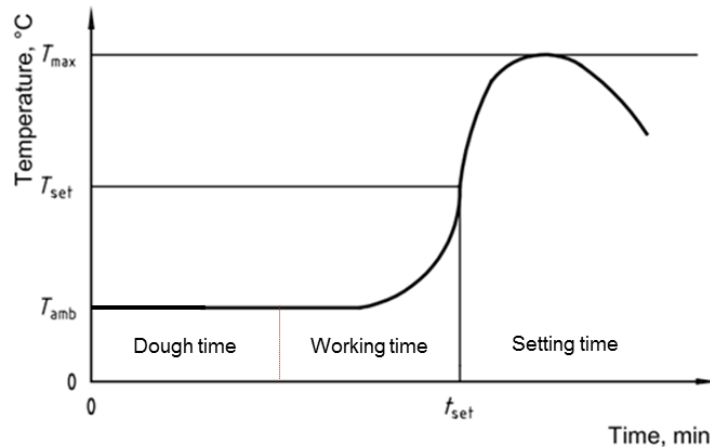


Figura 1.5 Representação gráfica típica do processo de cura de cimento ósseo à base de PMMA, em que T_{\max} representa o valor máximo de temperatura e T_{set} representa a temperatura de fixação.²⁶

1.2.3.3 Reação de polimerização

O PMMA é um homopolímero da família dos acrilatos, constituído por unidades monoméricas de metacrilato de metilo (MMA), com estrutura química $\text{CH}_2=\text{C}(\text{CH}_3)\text{COOH}$. O monómero MMA é um líquido incolor, volátil, com um odor frutado.

O PMMA é um termoplástico, rígido, transparente e quimicamente inerte o que o torna especialmente atrativo para as aplicações biomédicas, cirurgia ortopédica (artroplastia: cimentos ósseos), oftalmologia (lentes intra-oculares), cirurgia maxilofacial (reconstrução craniofacial – próteses), cirurgia plástica e reconstrutiva (próteses), estomatologia (prótese dentária), radiologia (escudo de radiação), podologia (orteses) e anatomia patológica (corrosão vascular).²⁸

Estas características devem-se essencialmente à sua estrutura química. A ligação alternada à cadeia principal de grupos metilo e metacrilato origina bloqueios espaciais consideráveis. Esta configuração aleatória dos átomos de carbono assimétricos origina uma estrutura maioritariamente amorfa, rígida.

A estrutura do monómero de metacrilato de metilo permite a polimerização do PMMA à temperatura ambiente, com recurso a iniciadores. No caso dos cimentos ósseos a polimerização do PMMA é baseada num mecanismo típico de polimerização via radical livre, com três etapas bem definidas: Iniciação, Propagação e Terminação.²⁹ A primeira fase da reação consiste na formação de radicais através da reação redox entre o peróxido de benzoilo (BPO) e a dimetil-para-toluidina (DMT) como ilustra a Figura 1.6.

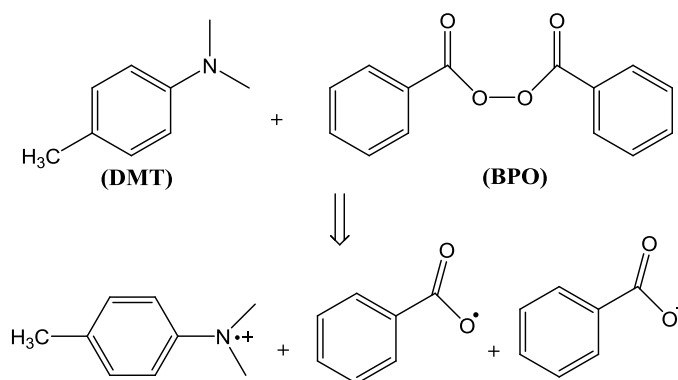


Figura 1.6 Formação de radicais livres através da reação redox entre DMT e BPO.²⁹

O mecanismo de formação de radicais através de amins cíclicas terciárias é sobejamente conhecido²⁹. Resultados experimentais têm demonstrado que as amins terciárias reagem com o BPO com formação de radicais livres cíclicos e radicais N-metil como representado na Figura 1.6. Estes radicais são parte decisiva no processo de iniciação da polimerização do PMMA (Figura 1.7- Iniciação). O radical reage com o monómero ativando-o através da cedência do seu eletrão livre, seguidamente este processo repete-se pela ligação de mais unidades monoméricas levando à formação de macromoléculas de PMMA (Figura 1.7- Propagação). O processo de terminação pode ocorrer de duas formas distintas: através da simples desprotonação da cadeia na posição β e a respetiva formação de uma ligação dupla, ou através do mecanismo de recombinação, que consiste na reação de duas cadeias poliméricas ativas através dos seus eletrões desemparelhados formando assim uma nova ligação química covalente (Figura 1.7 - Terminação). No final as macromoléculas formadas têm tamanhos moleculares diferentes dependendo do processo de terminação desencadeado.

A polimerização em massa do MMA é extremamente exotérmica (130 cal/g por unidade monomérica), o que conseqüentemente provoca um aumento de temperatura, este efeito é normalmente denominado efeito de Trommsdorff.¹⁸ Este fenómeno é característico da polimerização radicalar dos acrilatos e consiste na taxa de terminação ser drasticamente reduzida devido ao aumento da viscosidade.

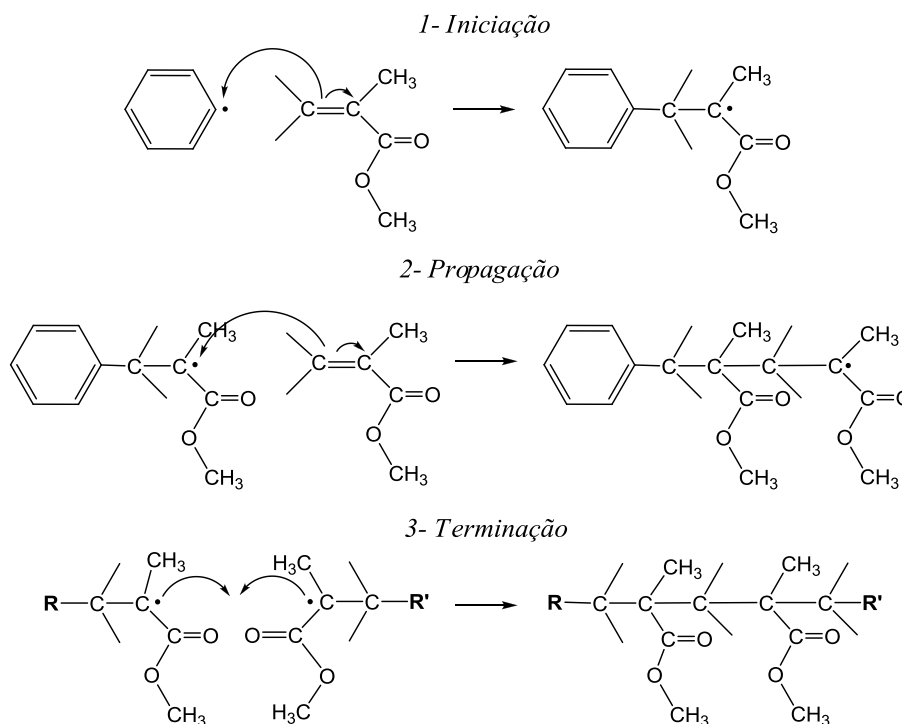


Figura 1.7 Mecanismo de polimerização do PMMA via radical livre.²⁹

1.2.3.4 Limitações dos cimentos ósseos

Os cimentos ósseos comerciais apresentam ainda algumas lacunas relativamente à sua aplicação, a nível do seu comportamento mecânico e biológico, o que condiciona o tempo de vida do implante. Seguidamente serão referidas as principais debilidades dos cimentos ortopédicos à base de PMMA claramente identificadas por investigadores e cirurgiões ortopédicos.³⁰

A principal finalidade do uso de cimentos ósseos em próteses ortopédicas da anca é permitir uma transferência efetiva de forças entre o implante metálico e o osso, nesse sentido o controlo do processo de polimerização do cimento ósseo é um fator determinante para o tempo de vida da prótese. Uma das principais falhas do uso de cimentos ósseos à base de PMMA deriva efetivamente do seu próprio processo de polimerização. O facto de ser uma reação bastante exotérmica pode provocar a formação de necroses térmicas, levando à morte dos tecidos circundantes e impedindo a circulação sanguínea, o que pode levar à falta de integração do implante.³¹

Um outro fenómeno relacionado com o processo de polimerização é o facto de esta não ser completa, ou seja, o monómero adicionado não ser consumido a 100% durante o processo de crescimento das cadeias de polímero. As quantidades de monómero residual chegam a atingir valores na ordem dos 5%, o que potencia o aparecimento de

necroses devido à sua toxicidade.³² Por outro lado, é também conhecido que a presença de unidades monoméricas de MMA pode atuar como plasticizante o que influencia as propriedades mecânicas e a resistência ao desgaste do cimento ósseo.^{33, 34}

Durante o processo de polimerização ocorre a contração do volume da camada de cimento ósseo aplicada o que também debilita o desempenho final da prótese. Este mecanismo de contração do cimento ósseo ao longo do processo de polimerização origina a formação de áreas com altos níveis de tensão (stress) o que promove a formação de micro-fissuras como mecanismo de aliviar essas tensões.³⁵ Estas pequenas fissuras podem vir a ser a causa da falha mecânica do implante, pois o movimento associado ao implante promove o aumento e propagação das fissuras.

As fases preliminares à aplicação do cimento ósseo são também de extrema importância no processo de polimerização do PMMA. Lewis³⁶ descreve que o peso molecular do polímero tem um efeito significativo no desempenho mecânico da prótese. O aumento das cadeias poliméricas permite um aumento de interações entre elas o que leva a uma maior resistência mecânica ao desgaste e ao aparecimento e propagação de micro-fissuras. Por outro lado, a porosidade³⁷ e a presença de agregados do agente radiopacificante³⁸ nos cimentos ósseos é também um parâmetro essencial para a performance da prótese e está estritamente relacionada com o processo de mistura de ambas as fases, líquida e sólida. A presença de poros/agregados no cimento permite não só o aparecimento de micro-fissuras como também facilita a sua propagação o que leva à falha mecânica do implante (Figura 1.8).^{35, 39-43}

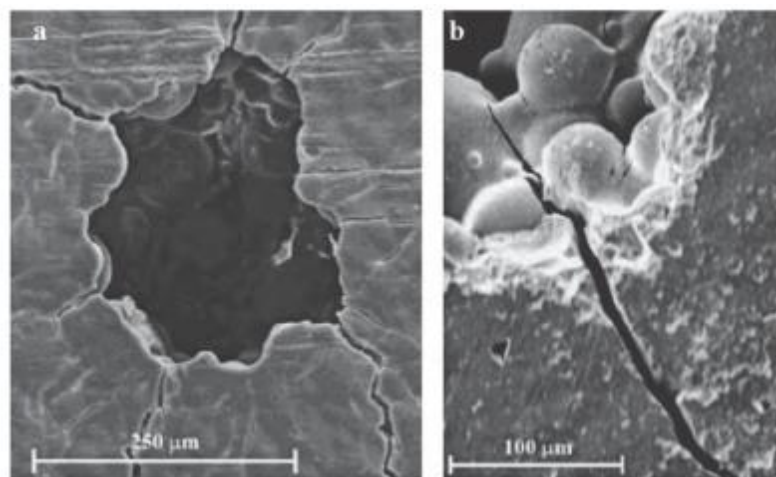


Figura 1.8 Imagens de SEM mostrando a formação de micro-fissuras através de **a)** poros ou de **b)** aglomerados.⁴³

Uma outra debilidade encontrada na utilização de cimentos ósseos é a formação de pequenas partículas de compósito resultante do desgaste. A presença destas pequenas partículas pode levar quer à falha mecânica (enfraquecimento do material), quer à falha biológica (zonas de inflamação) da prótese.

A nível biológico uma das maiores debilidades do uso de cimentos ósseos à base de PMMA é o facto do seu principal constituinte ser biologicamente inerte o que compromete drasticamente a interface cimento/osso. Alguns estudos realizados sobre implantes ortopédicos em pacientes revelaram que um dos maiores problemas do uso do PMMA como cimento ósseo era a falta de conectividade entre as interfaces do tecido ósseo e o biomaterial.^{32, 44} A formação de cápsulas fibrosas e desmineralização do osso junto do implante mostraram ser as causas principais do insucesso.^{45, 46} Como o osso é um material dinâmico, mudando continuamente a sua estrutura para acompanhar os requisitos ao seu redor, a prolongada redução de forças sobre o osso pode resultar num fenómeno conhecido como blindagem “stress shielding”, levando ao aumento porosidade óssea.

Após a identificação das principais debilidades dos cimentos ósseos à base de PMMA, têm vindo a ser investigadas novas formulações de cimentos ósseos de modo a tentar colmatar as falhas mecânicas e biológicas reconhecidas.

1.2.3.5 Novas formulações de cimentos ósseos

Ao longo dos tempos as formulações dos cimentos ósseos tem vindo a ser alteradas por forma a suprir algumas debilidades quer a nível mecânico quer a nível biológico. As áreas de atuação têm-se centrado essencialmente a dois níveis distintos, aumento das propriedades mecânicas e/ou aumento da bioatividade dos materiais. A estratégia utilizada por forma a atingir estes objetivos passa pela adição de uma nova fase (orgânica/inorgânica) à composição base do cimento ósseo comercial.

A hidroxiapatite (HA) é sobejamente conhecida como sendo um material bioativo na reparação e substituição óssea devido à sua excelente biocompatibilidade e à sua afinidade química e biológica pelo tecido ósseo.³⁹ Uma das soluções adotadas para a falta de interação biológica de alguns cimentos foi a transformação destes em respetivos materiais compósitos, introduzindo uma fase inorgânica (HA) numa fase polimérica maioritária (PMMA), o que permitiu assim fazer uma reprodução sintética do osso, resultando num cimento bioativo com propriedades biológicas semelhantes às do osso.

No final da década de 90 começaram a ser desenvolvidos os primeiros compósitos para cimento ósseo, PMMA reforçado HA.⁴⁷ Estes novos materiais permitiram um aumento da

ostecondutividade entre o osso e o cimento e também possibilitaram que o crescimento e diferenciação dos osteoblastos na interface dos materiais fossem significativamente melhorados. A partir do ano 2000 começaram a surgir outro tipo de materiais de reforço com o intuito de melhorar a biocompatibilidade dos cimentos ósseos, tais como, vidros bioativos,^{45, 48, 49} quitosano,⁵⁰ partículas de osso,⁵¹ para além da contínua aposta na hidroxiapatite.^{25, 51, 52} É importante também referir que apesar de o principal objetivo da adição dos reforços referidos anteriormente se prender essencialmente com o aumento da bioatividade do cimento ósseo, em alguns casos foi também possível também verificar um aumento nas propriedades mecânicas nas condições experimentais utilizadas.

Posteriormente começaram a surgir cimentos ósseos com antibióticos, o que permitiu prevenir o aparecimento de infeções após aplicação do cimento ósseo, reduzindo assim o risco da necessidade de realização de operações de revisão da prótese. Hoje em dia o uso de cimentos ósseos com antibióticos é já uma prática rotineira em artroplastia da anca, sendo que um dos antibióticos mais utilizados é o sulfato de gentamicina.⁵³⁻⁵⁵

Relativamente ao incremento das propriedades mecânicas dos cimentos ósseos vários tipos de agentes de reforço têm sido utilizados, tais como fibras de carbono,⁵⁶⁻⁶⁰ polietileno,^{61, 62} fibras de titânio^{63, 64} e fibras de aço.⁶⁵ O aumento das propriedades mecânicas foi verificado a vários níveis, compressão, tração, resistência à flexão, módulo da elasticidade, tenacidade à fratura e resistência à fadiga. Para além do aumento das propriedades mecânicas do cimento ósseo também se verificou que para o caso dos reforços que apresentavam boa condutividade térmica, fibras de carbono e fibras de aço, uma diminuição na temperatura de polimerização. Este é um fator também muito importante pois permite reduzir a possibilidade de formação de necroses térmicas, e como descrito anteriormente este é um elemento determinante para a diminuição do tempo de vida da prótese.

Ultimamente os nanotubos de carbono tem sobressaído como um dos agentes de reforço como maiores potencialidades para a utilização em cimentos ósseos, não só pelas excelentes propriedades mecânicas e térmicas mas também pela facilidade da manipulação da sua superfície.

1.2.4 Nanoestruturas de carbono

As nanoestruturas de carbono são um dos membros mais importantes na classe dos materiais em nanotecnologia. A descoberta e a investigação subsequente das nanoestruturas de carbono teve um impacto significativo na área da nanotecnologia,

estimulando e contribuindo significativamente para a evolução científica em áreas como a física, química, mecânica, biologia e medicina.

Do ponto de vista histórico, o interesse científico pelo desenvolvimento de materiais baseados em nanoestruturas de carbono tem vindo a aumentar devido essencialmente à descoberta de novas formas alotrópicas (Figura 1.9). Os primeiros materiais a despertar interesse na comunidade científica na área dos materiais de carbono foram os compostos de intercalação de grafite, os chamados GICs (Graphite Intercalation Compounds), descobertos nos anos 70 por Boehm.⁶⁶ Contudo, a descoberta dos fulerenos em 1985⁶⁷ que culminou na atribuição do prémio Nobel da Química em 1996, direcionou a atenção da comunidade científica estudiosa das estruturas de carbono a desenvolver esforços no sentido de potencializar este tipo de materiais. Mas o verdadeiro “Boom” do desenvolvimento de materiais baseados em nanoestruturas de carbono começou em 1993 com a descoberta dos nanotubos de carbono de parede simples pelo grupo de investigação de Iijima,⁶⁸ e que se desenvolveu com a descoberta de outras variantes de nanotubos carbono. A descoberta do grafeno por Geim e Novoselov em 2004⁶⁹ que culminou com o prémio Nobel da Física em 2010 veio de certo modo redefinir as atuais atenções dos cientistas mundiais. A simplicidade do método utilizado para a obtenção de monocamadas de carbono (“scotch-tape”) não constitui por si só um passo preponderante no desenvolvimento científico e tecnológico, contudo esta abordagem permitiu demonstrar que é possível obter um cristal único de carbono de alta qualidade a duas dimensões, estável nas condições ambientais e contínuo a uma escala macroscópica, o que possibilitou a realização de estudos fundamentais.

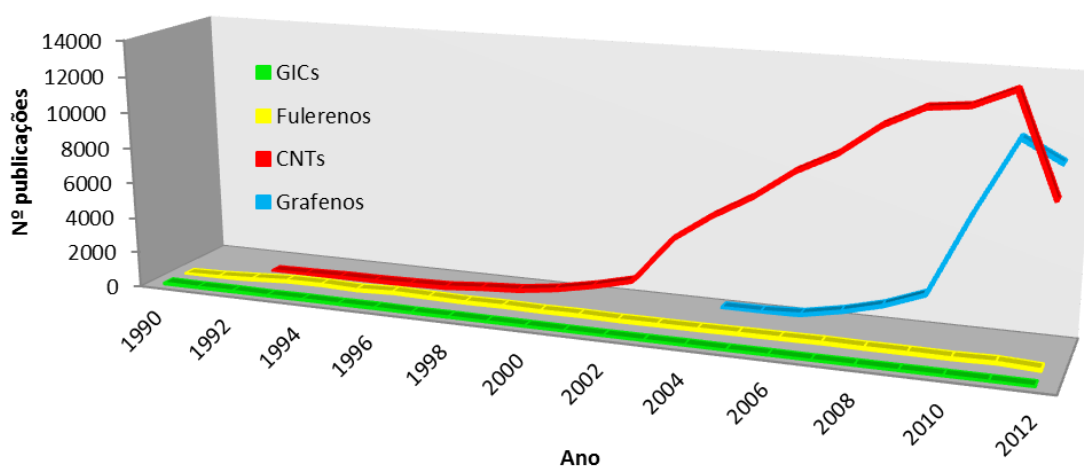


Figura 1.9 Evolução temporal do número de publicações sobre materiais de carbono.⁶⁶

Contudo é necessário evidenciar que a descoberta do grafeno não foi um ato isolado de pura inspiração, mas sim o culminar de um processo evolutivo científico que começou há muitos anos atrás com a descoberta dos GICs e que se veio a desenvolver com pequenas contribuições de vários cientistas, como se pode verificar na representação esquemática seguinte (Figura 1.10).

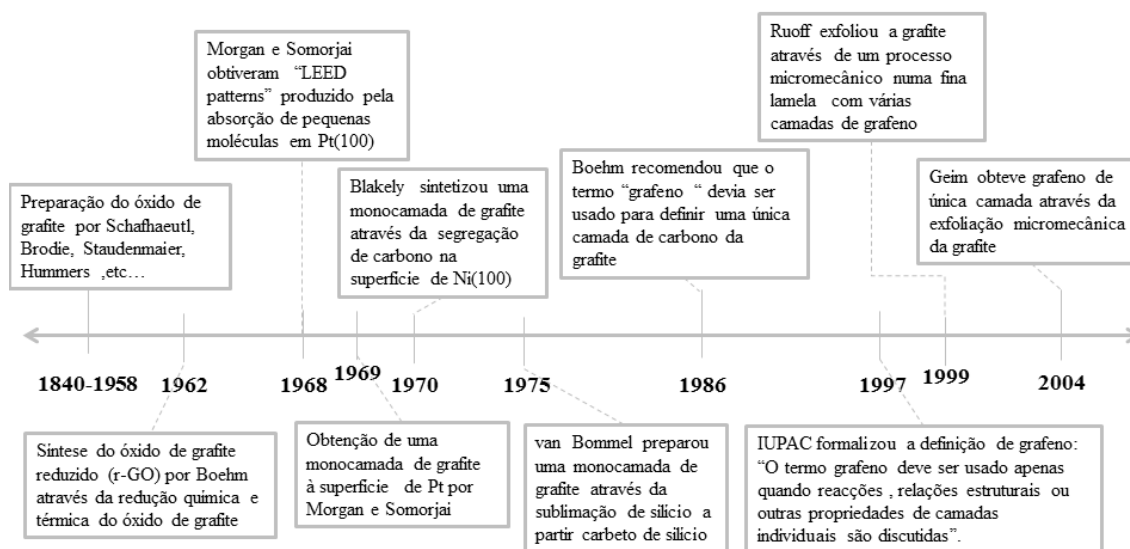


Figura 1.10 Cronograma de eventos na história da preparação, isolamento e caracterização de grafeno.⁷⁰

Este trabalho pioneiro lançou novos desafios à comunidade científica, não só do ponto de vista tecnológico com a tentativa de procura de novas metodologias de síntese por forma a obter grafeno de alta qualidade em grande escala, mas também do ponto de vista científico com a pesquisa e desenvolvimento de novos materiais funcionais baseados em grafeno através de funcionalização orgânica e inorgânica da sua superfície.

1.2.4.1 Grafeno

1.2.4.1.1 Síntese de grafeno

O grafeno é um dos alótropos de carbono com mais interesse, não apenas do ponto de vista da curiosidade académica mas também tendo em conta as suas potenciais aplicações. A estrutura 2D de átomos de carbono distribuídos de forma hexagonal com ligações do tipo sp^2 permite a obtenção de propriedades físico-químicas ímpares (Figura 1.11), não se podendo afirmar que o grafeno é "apenas" um nanotubo de carbono 2D. As propriedades intrínsecas do grafeno, área superficial específica ($2630 \text{ m}^2\text{g}^{-1}$), elevada mobilidade de cargas ($200000 \text{ cm}^2\text{v}^{-1}\text{s}^{-1}$), elevado módulo de Young ($\sim 1.0\text{TPa}$), elevada

condutividade térmica ($\sim 5000 \text{ Wm}^{-1}\text{K}^{-1}$) e elevada transmitância ($\sim 97.7\%$), permitem o desenvolvimento de uma panóplia de sistemas que podem revolucionar os conceitos até agora desenvolvidos em várias áreas, tais como semicondutores, sensores, baterias, supercapacitadores, armazenamento de hidrogénio e agentes de reforço em materiais compósitos.^{71, 72}

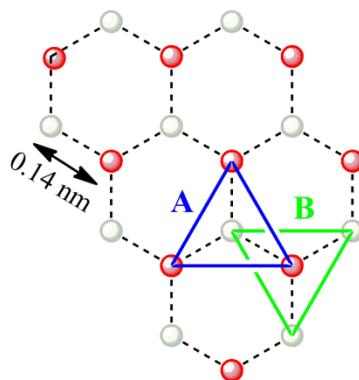


Figura 1.11 A estrutura hexagonal do grafeno é constituída por duas sub-malhas **A** e **B**. Um átomo na sub-malha **A** está ligado a três átomos da sub-malha **B** e vice-versa com uma distância atômica de aproximadamente 1,42 Å.

Existem diversos métodos de síntese de grafeno, podendo estes métodos dividir-se em dois grandes grupos, a abordagem “Bottom-up” e a abordagem “Top-down”. De uma maneira muito simplista tal como a própria designação em inglês indica, a abordagem “Bottom-up” consiste no crescimento das folhas de grafenos através da junção de unidades estruturais básicas. Nesta abordagem inserem-se os métodos de síntese orgânica, que proporcionam o crescimento de grafenos diretamente através de precursores moleculares orgânicos.⁷³ Normalmente estes precursores consistem em moléculas de anéis benzénicos com grupos funcionais com elevada reatividade (Figura 1.12- I), o que permite obter um crescimento controlado 2D da folha de grafeno.⁷⁴⁻⁷⁸ Um outro tipo de métodos bastante usados no crescimento das folhas 2D de grafeno são os métodos baseados no crescimento *in situ* em substratos catalisadores (Cu, Ni, Fe...) tais como deposição química em fase de vapor (CVD- chemical vapour deposition),⁷⁹⁻⁸⁴ descarga por arco⁸⁵⁻⁸⁹ e crescimento epitaxial em SiC.⁹⁰⁻⁹⁴ A grande limitação da aplicação destas técnicas é que ainda não permitem obter grafeno em grande quantidade e de modo uniforme e apresentam um custo elevado.

A abordagem “Top-down” consiste na quebra das ligações Van der Waals interplanares existentes na grafite. Por forma a obter folhas 2D com apenas uma camada de átomos de carbono distribuídos de forma hexagonal com ligações covalentes entre si (Figura 3- II).

Normalmente neste tipo de abordagem inserem-se os métodos de esfoliação química e mecânica da grafite.⁹⁵⁻¹⁰⁰

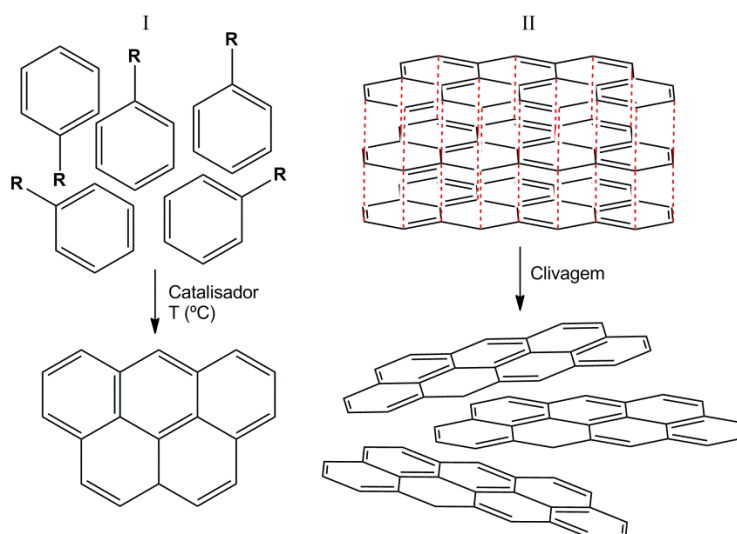


Figura 1.12- Representação esquemática dos dois tipos de abordagens de síntese de grafenos, I – Bottom-up e II – Top-down.

Qualquer uma destas abordagens tem limitações quanto à concessão do cristal 2D de grafeno. A esfoliação da grafite, mecânica ou química, não permite um controlo absoluto do número de camadas de carbono no grafeno obtido e da qualidade da malha do cristal 2D, limitando assim o seu desempenho em diversos dispositivos.¹⁰¹⁻¹⁰⁴ Em especial a esfoliação da grafite em solução necessita de uma modificação superficial extensiva por forma a quebrar as ligações de Van der Waals, promovendo assim a formação de defeitos estruturais na rede de carbono do grafeno.^{99, 105} Normalmente as espécies intermediárias obtidas através deste tipo de processamento designam-se por óxido de grafeno (GO) devido à sua elevada densidade de grupos funcionais de oxigénio, e que posteriormente podem ser convertidos em grafeno através de simples processos de redução.

Neste estudo em concreto será dedicada maior atenção à abordagem “top-down” devido a vários fatores: a simplicidade dos equipamentos usados no processamento, o facto de a síntese poder ser realizada em larga escala, e o custo efetivo do processamento ser bastante baixo quando comparado com as outras técnicas disponíveis. Porém este tipo de síntese apresenta ainda alguns desafios, como por exemplo, o controlo da distribuição de camadas de carbono por grafeno, dimensões das partículas de grafeno e distribuição de defeitos na estrutura do cristal.

1.2.4.1.2 Síntese de óxido de grafeno

A grafite possui características químicas muito interessantes devido ao facto de poder participar em reações como agente redutor (dador de eletrões) ou como agente oxidante (aceitador de eletrões), sendo isto consequência direta da sua estrutura eletrónica e que resulta nas propriedades anisotrópicas apresentadas pela grafite. As orbitais atómicas s , p_x e p_y em cada carbono hibridizam para formarem ligações covalentes do tipo sp^2 . As restantes orbitais atómicas p_z em cada carbono sobrepõem-se com três carbonos vizinhos para formar uma banda com orbitais π completas, chamada a banda de valência, e uma banda com orbitais π^* desocupadas, chamada a banda de condução. Enquanto três dos quatro eletrões da banda de valência em cada carbono formam as ligações σ (simples), o quarto eletrão forma as ligações π deslocalizadas com os outros carbonos vizinhos. Na direção perpendicular ao plano as interações são extremamente fracas, do tipo Van der Waals.

Esta distribuição eletrónica dos átomos de carbono na grafite permite obter uma estrutura muito peculiar relativamente aos outros alótropos de carbono, sendo considerado um material lamelar. Assim a grafite pode ser definida como um material com infinitas camadas atómicas de carbono, cada camada apresenta uma distribuição hexagonal de átomos de carbono com ligações covalentes entre si, com um empilhamento alternado do tipo ABAB... e com uma distância interplanar de cerca de 3,354 Å.

Os estudos pioneiros relativos aos compostos de intercalação de grafite, os chamados GICs, constituíram o primeiro passo para a síntese de grafeno através da esfoliação química da grafite. A primeira referência à tentativa de explorar a estrutura da grafite reporta a 1859 e foi realizada por Brodie.¹⁰⁶ A reação consistiu na adição de clorato de potássio ($KClO_3$) a uma mistura de grafite com ácido nítrico (HNO_3). Este estudo permitiu-lhe verificar um aumento da massa da grafite e que o material resultante da reação era composto maioritariamente por hidrogénio, oxigénio e carbono. Aproximadamente 40 anos após as descobertas de Brodie, Staudenmaier alterou o procedimento através da adição de pequenas alíquotas de clorato de potássio durante a reação e recorreu à mistura de ácido sulfúrico concentrado e ácido nítrico para tornar o meio reacional mais ácido.¹⁰⁷ Estas pequenas modificações permitiram aumentar o rendimento da reação de oxidação dos planos da grafite (C:O/2:1).

Em 1958, quase 100 anos após a descoberta do óxido de grafite, Hummers e Offeman,¹⁰⁸ desenvolveram um método alternativo para a reação de oxidação de grafite, que consistia no uso do permanganato de potássio ($KMnO_4$) como agente oxidante e ácido sulfúrico

(H₂SO₄) concentrado como acidificante. Contudo este novo procedimento experimental mostrou níveis de oxidação da grafite similares aos descritos por Staudenmaier.

A presença de grupos funcionais de oxigénio nas diversas camadas do óxido de grafite significa um aumento da distância interplanar entre os planos de carbono na grafite. Por exemplo, a distância entre as camadas de carbono da grafite de cerca 0,34 nm passa para aproximadamente 1 nm após a intercalação de unidades funcionais de oxigénio,¹⁰⁹ este aumento da distância entre as várias camadas da grafite significa uma diminuição das forças de Van der Waals e conseqüentemente maior facilidade na obtenção de folhas de GO isoladas.

Em 2006, foi referida a obtenção da primeira folha de GO de camada única através do processamento em solução, hoje em dia também denominado por esfoliação química da grafite, pelo grupo de investigação de Ruoff.⁹⁵⁻⁹⁷ O método foi baseado no trabalho pioneiro de Hummers, que consiste na formação de uma espécie intermediária da grafite que facilmente se dispersa em água, o óxido de grafite. A qual é posteriormente sujeita a agitação mecânica ou ultrassons por forma a quebrar as ligações entre as camadas de carbono. Normalmente o recurso aos ultrassons permite uma clivagem mais rápida e efetiva do óxido de grafite do que a agitação mecânica, contudo também provoca maiores danos estruturais nas folhas de GO obtendo-se larga distribuições de tamanhos e maior densidade de defeitos.^{96, 110, 111} É preciso também salientar que o próprio processo de oxidação também leva à quebra da estrutura gráfitica em pequenos segmentos.^{96, 110}

Este fenómeno de quebra de ligações entre os planos de carbono de óxido de grafite é devido essencialmente às interações fortes entre as moléculas de água e as unidades funcionais na superfície dos planos do óxido de grafite introduzidas durante a oxidação.^{112, 113} Esta elevada hidrofiliçidade leva a que a água rapidamente se intercale entre as diversas camadas promovendo a obtenção de folhas de GO individuais. Devido às repulsões electroestáticas entre as folhas de GO é possível a obtenção de soluções coloidais estáveis durante longos períodos de tempo. Medidas de carga superficial (potencial zeta) do GO demonstraram que são carregados negativamente quando dispersos em água.¹¹⁴

Após a publicação desta primeira abordagem para a síntese de GO em solução, vários outros autores têm publicado diversos trabalhos com o mesmo propósito. De um modo geral o princípio básico para a obtenção do óxido de grafite, tem seguido as metodologias já descritas anteriormente (Brodie, Staudenmaier e Hummers) com o recurso a vários ácidos e oxidantes fortes, contudo o processo de esfoliação propriamente dito pode apresentar pequenas variâncias. O trabalho de revisão elaborado por Ruoff¹¹⁵ e seus

colaboradores apresenta uma perspetiva geral da panóplia de metodologias desenvolvidas para a síntese do GO em solução (Tabela 1.4).

Tabela 1.4 Diferentes metodologias para a obtenção de suspensões coloidais de GO.¹¹⁵

Precusores	Solventes	[] mg/ml	Tamanho lateral	Espessura (nm)
GO/MH	H ₂ O	1	-	-
GO/MH	H ₂ O	0,5	centenas nm	~1
GO/MH	H ₂ O	0,1	-	~1.7
GO/MH	H ₂ O	7	centenas nm	~1
GO/H	H ₂ O/metanol acetona, acetonitrilo	3-4	centenas nm	~1.2
GO/MH	DMF, NMP, DMSO, HMPA	1	~560nm	~1
GO/H	H ₂ O, acetona, etanol 1-propanol, etileno glicol DMSO, DMF, NMP, piridina THF	0,5	100-1000nm	1,0-1,4
GO/O	DMF, THF, CCl ₄ , DCE	0,5	-	0,5-2,5
Grafite fluorada	DCB, MC, THF	0,002-0,54	1600	~0,95
GO/S	DCB, DMAc, NMP	1	centenas nm	1,8-2,2
GO/MH	hidrazina	1,5	>20µm x 40µm	~0,6
GO/S	THF	<0,48	-	1-2
GO/S	NMP, DMF, DCB, THF, nitrometano	0,1	100-2500nm	1,1-3,5
GO/H	etanol	1	centenas nm	~2
Grafite	NMP, DMAc, GBL, DMEU	0,01	µm	1-5
GIC	NMP	0,15	centenas nm	~0.35
EG	DCE	0,0005	<10nm	1-1,8
EG	DMF	-	~250nm	~1
EG	H ₂ O, DMF, DMSO	0,015-0,020	nm-µm	2-3 camadas
Grafite	DMF, DMSO, NMP	1	500-700nm	~1,1

GO- óxido de grafeno; **MH-** método de Hummers modificado; **H-** método de Hummers; **S-** método de Staudenmayer; **EG-** grafite expansível; **GIC** compostos de intercalação de grafite; **DMF-** dimetilformamida; **DMac-** N,N-dimetilacetamida, **DMF-** dimetilsulfóxido; **NMP-** N-metil pirrolidona; **THF-** tetrahidrofurano; **MC-** diclorometano; **DCE-** 1,2-dicloroetano; **DCB-** 1,2-diclorobenzeno; **HMPA-** hexametilfosforamida; **GBL-** γ-butirolactona; **DMEU-** 1,3-dimetil-2-imidazolidinona (*as abreviaturas encontram-se em inglês)

Como se pode verificar através da Tabela 1.4 é possível preparar suspensões coloidais de GO em soluções aquosas ou em vários solventes orgânicos polares, tais como etileno glicol, DMF, NMP e THF. No entanto em soluções aquosas consegue-se obter concentrações superiores a 3,0 mg/mL enquanto na maioria dos solventes orgânicos as concentrações máximas atingem cerca dos 0,5 mg/mL. Este fenómeno pode ser facilmente explicável se tivermos em conta quer a polaridade dos solventes quer as cargas superficiais do GO.

Se por um lado a dispersão do GO está intimamente ligado com o tipo de solvente usado, por outro poder-se-á também dizer, pela análise da tabela, que o tamanho e a espessura das folhas de GO obtidas estão também relacionados quer com os solventes usados quer com os métodos precursores. O desenvolvimento de metodologias que permitem a dispersão do GO em solventes orgânicos é de especial relevância quando se pretende efetuar a modificação superficial com moléculas orgânicas ou dispersá-los numa matriz polimérica, pois permite uma melhor interação molecular entre o agente funcionalizante e a superfície do GO.

1.2.4.1.2.1 Estrutura química do óxido de grafeno

A definição estrutural do GO continua hoje em dia a não ser clara muito devido ao facto de que o nível de oxidação dos planos de carbono e a percentagem de defeitos estruturais esta intimamente ligado ao processo de síntese usado, sendo por isso difícil obter uma proposta de estrutura genérica para o GO.

Na tentativa de explicar a estrutura química do óxido de grafeno, quais os grupos funcionais predominantes e a sua localização preferencial, foram desenvolvidos vários modelos explicativos (Figura 1.13). A primeira tentativa foi proposta por Hofman e Holst's e consistia na distribuição aleatória de grupos epóxidos nos planos basais de carbono.¹¹⁶ Seguidamente Ruess veio propor não só a presença de grupos epóxidos mas também a incorporação de grupos hidroxilo, devido à presença de hidrogénio na estrutura química do GO, sendo que estes grupos funcionais provocavam a distorção 3D da rede de carbono.¹¹⁷ Outros modelos foram-se sucedendo o que permitiu uma discussão alargada sobre este tópico, de entre os quais se destacam os modelos de Scholz-Boehm ¹¹⁸ e Nakajima-Matsuo.¹¹⁹

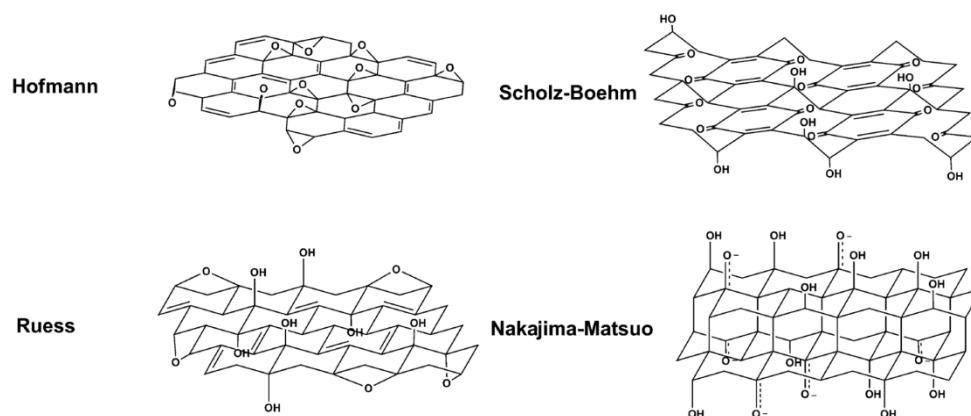


Figura 1.13- Modelos explicativos da estrutura do óxido de grafite: Hofman,¹¹⁶ Ruess,¹¹⁷ Scholz-Boehm¹¹⁸ e Nakajima-Matsuo¹¹⁹.

Os modelos mais recentes abandonaram a premissa anterior baseada na malha de carbono estequiométrica e passaram a basear os seus modelos em alternativas não estequiométricas amorfas. Um dos modelos mais unânime hoje em dia é o modelo de Lerf e Klinowski (Figura 1.14).^{120, 121} A obtenção deste modelo foi baseada em estudos de ressonância magnética de estado sólido de ¹³C do óxido de grafite. Os resultados obtidos sugerem que a rede de carbono gráfitico é fortemente perturbada após a oxidação, sendo que uma fração significativa desta rede de carbono estabelece ligações com os grupos hidroxilo ou participa na formação de grupos epóxidos nos planos basais de carbono. Os grupos carboxílicos e carbonilos aparecem em menor quantidade e preferencialmente nas periferias da rede de carbono. Contudo este trabalho ainda não apresenta nenhuma indicação acerca da distribuição e orientação espacial dos grupos funcionais na matriz gráfitica.

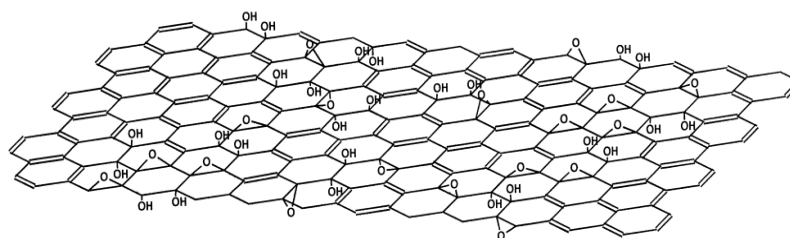


Figura 1.14 Modelo Lerf-Klinowski proposto para a estrutura do óxido de grafite.¹²¹

Recentemente Gao e seus colaboradores propuseram um novo modelo explicativo da estrutura do óxido de grafite, também baseado essencialmente em estudos de NMR de ¹³C e XPS.¹²² Apesar da concordância com os modelos anteriores em que definem as espécies maioritárias como sendo os grupos epóxidos e hidróxido, a novidade insere-se na presença de estruturas lactonas com anéis de cinco e seis membros na periferia das

folhas do óxido de grafite. Os estudos de NMR de ^{13}C por polarização cruzada efetuados vêm corroborar esta informação através da presença de uma banda a 101 ppm, geralmente atribuída às estruturas do tipo lactona (Figura 1.15).

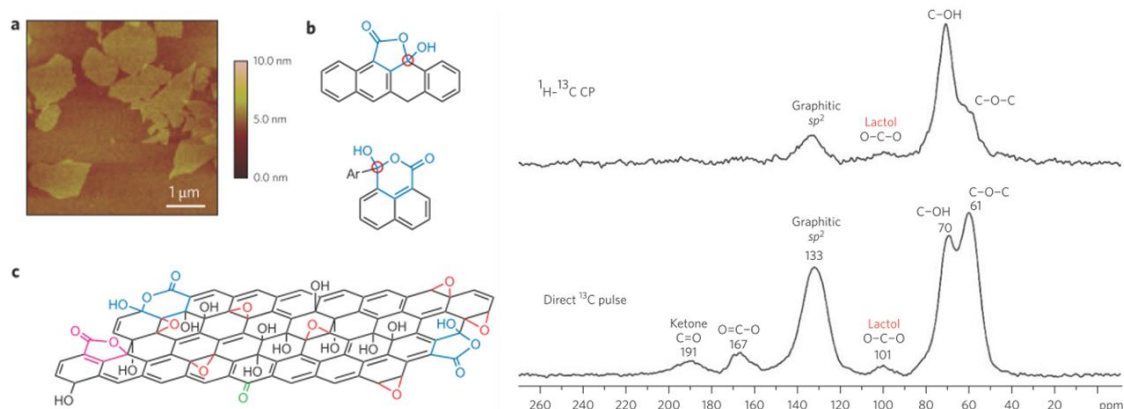


Figura 1.15 Imagem de AFM do óxido de grafite **a)**, estruturas do tipo lactona **b)** identificadas através de NMR de carbono, em polarização cruzada $^1\text{H}-^{13}\text{C}$ (imagem superior) e ^{13}C (imagem inferior), que permitiram o desenvolvimento de um novo modelo estrutural para o óxido de grafite **c)**.¹²²

Atualmente a estrutura do GO é normalmente representada por uma estrutura planar de carbono composta por grupos epóxido e hidróxido aleatoriamente distribuídos na sua superfície e por grupos carboxílicos e carbonilos nas suas extremidades, sendo que as maiores dúvidas da ainda enigmática estrutura do GO surgem maioritariamente na definição da estrutura dos grupos funcionais periféricos e nos defeitos estruturais da malha de carbono.

1.2.4.1.3 Redução do óxido de grafeno

O processo de redução do GO é muito importante pois permite obter produtos de reação com propriedades semelhantes às do grafeno. Por uma questão de clareza deve-se desde já definir que o GO reduzido apresenta contudo diferenças estruturais significativas quando comparado com o grafeno. É importante no entanto salientar que o principal objetivo da redução química do GO é obter grafeno com as propriedades mecânicas e condutoras semelhantes ao grafeno obtidos pelo método de “scotch tape”.

A redução do GO permite uma regeneração da estrutura gráfica através de processos de desoxigenação e desidratação, o que possibilita restaurar a condutividade dos materiais. A condutividade elétrica é uma medida indireta que permite avaliar se as ligações do tipo sp^2 foram efetivamente restruturadas na matriz de carbono. Se tivermos

em conta que o GO apresenta condutividade quase nula e que após a redução pode apresentar valores superiores $2 \times 10^4 \text{ Sm}^{-1}$, similares à grafite, permite concluir que houve uma efetiva reestruturação dos sistemas π conjugados.¹²²

A redução do GO pode ser realizada através de várias metodologias: métodos químicos, com recurso a agentes redutores como a hidrazina,^{97, 99, 123, 124} plasma de hidrogénio,¹⁰⁵ dimetilhidrazina,¹²⁵ hidroquinona,¹²⁶ borohidreto de sódio,^{127, 128} ácido ascórbico,¹²⁹ álcoois,^{130, 131} soluções alcalinas fortes,^{98, 132} métodos eletroquímicos,¹³³⁻¹³⁵ métodos térmicos^{136, 137} e métodos com recurso raios ultravioleta.¹³⁸ É no entanto necessário salientar que a condutividade final dos GO reduzidos depende quer da metodologia seguida para a oxidação da grafite quer da metodologia seguida na redução, e é por norma inferior à condutividade do grafeno obtido por outras metodologias de síntese. Os defeitos estruturais infringidos durante o processo de oxidação da grafite levam também à remoção de átomos de carbono da estrutura aromática dos planos de carbono, criando assim zonas nanométricas de descontinuidade impossíveis de recuperar através do processo de redução.

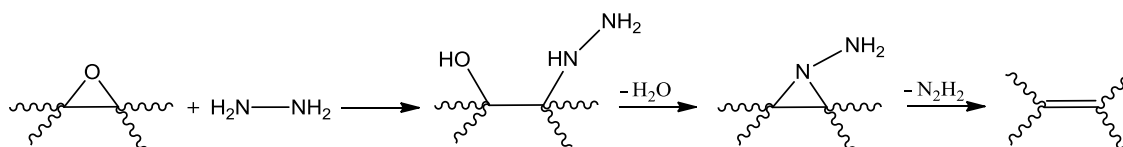
1.2.4.1.3.1 Redução química

O método mais comum e dos primeiros a ser descrito para a redução química de GO foi baseado no recurso a hidrazina monohidratada.⁹⁷ Enquanto a maioria dos agentes redutores fortes têm uma reatividade muito forte com a água, a hidrazina monohidratada apresenta uma reatividade mais suave, tornando-se uma opção mais atrativa para reduzir dispersões aquosas de GO.

Após a redução do GO com hidrazina monohidratada, o material resultante tem tendência a aglomerar e precipitar em solução apresentando uma tonalidade negra (contrastando com a tonalidade acastanhada do GO). Normalmente os precipitados de carbono produzidos através desta metodologia apresentam áreas superficiais elevadas, cerca de $470 \text{ m}^2\text{g}^{-1}$, elevados rácios de C/O 12:1 (2:1 GO) e elevadas condutividades elétricas, $2420 \pm 200 \text{ Sm}^{-1}$ ($0,021 \pm 0,002 \text{ Sm}^{-1}$ GO), que são concordantes com os materiais altamente exfoliados e reduzidos.⁹⁷

Embora ainda não seja clara a forma como a hidrazina atua na redução do GO, pelo menos um mecanismo (Esquema 1.1) tem sido proposto baseado nos conhecimentos anteriores sobre a forma como a hidrazina reduz outros sistemas orgânicos.⁹⁷ O mecanismo proposto por Stankovich tem especial incidência na eliminação dos grupos epóxidos, já que se pensa que se trata de uma das espécies maioritárias tal como os grupos hidroxilo.^{120, 121, 139, 140} A interpretação dada por este autor sugere que a hidrazina

reage com o grupo epóxido permitindo a abertura do anel e a formação de uma espécie intermédia com unidades amino-aziridina, que posteriormente podem ser eliminadas na forma de diimida, resultando na formação das ligações duplas. Esta reação permite restabelecer a estrutura gráfica característica dos grafenos. Todavia continua ainda por explicar qual o papel da hidrazina na remoção dos grupos hidroxilo.



Esquema 1.1 Mecanismo de redução de epóxidos através da hidrazina.⁹⁷

Recentemente, o trabalho desenvolvido por Gao *et al.* baseado em resultados experimentais e métodos computacionais veio sugerir novos mecanismos de remoção dos grupos epóxido da superfície do GO através da redução com hidrazina, contudo nenhuma sugestão foi apresentada para a remoção dos grupos hidroxilos, carboxílicos e carbonilos.¹⁴¹ Uma das novidades que este modelo insere é que o mecanismo de redução dos grupos epóxidos por hidrazina depende da sua localização na matriz gráfica, sugerindo que a redução dos grupos epóxidos ligados no interior dos domínios aromáticos do GO é termodinamicamente espontânea à temperatura ambiente (Figura 1.16 (A)), enquanto a redução dos grupos epóxido localizados na periferia dos domínios aromáticos é termodinamicamente mais estável Figura 1.16 (A').

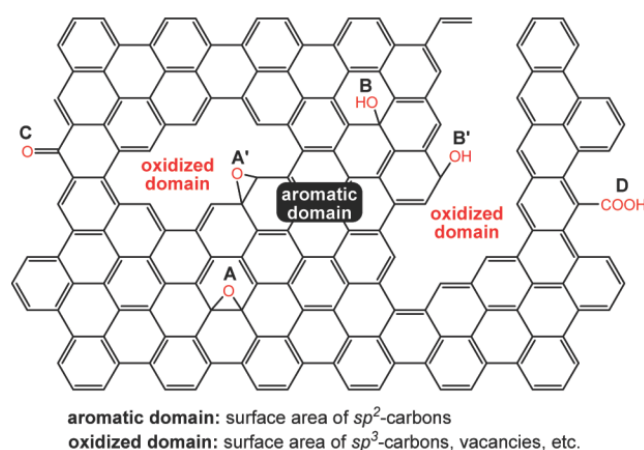


Figura 1.16 Representação esquemática da distribuição dos grupos funcionais de oxigênio à superfície do GO: **A**, grupos epóxido no interior dos domínios aromáticos, **A'** grupos epóxido localizados na periferia dos domínios aromáticos.¹⁴¹

Uma das desvantagens de usar métodos químicos para a redução do GO é a introdução de contaminantes,^{97, 142} em particular quando se recorre à hidrazina. Apesar de ser um agente bastante efetivo para a remoção dos grupos funcionais de oxigénio permite porém a formação de grupos funcionais C-N, tais como hidrazonas, aminas, aziridinas e outras estruturas similares.¹⁴³ Estes grupos têm especial influência na estrutura eletrónica dos grafenos, funcionando como dopantes do tipo N.¹⁴⁴

O GO pode ser também reduzido com recurso a outros tipos de aminas, tais como, dimetilhidrazina, fenilhidrazina, etilenodiamina.^{96, 145, 146} A grande vantagem do uso destes sistemas prende-se com a facilidade de dispersar os óxidos de grafenos reduzidos em solventes orgânicos, uma vez que estes agentes simultaneamente reduzem e funcionalizam o grafeno. Por exemplo a redução dos GO através de fenilhidrazina permite a formação de soluções coloidais estáveis em vários solventes orgânicos polares apróticos, DMAc, DMF, PC e NMP.¹⁴⁵ Esta maior estabilidade em solventes orgânicos pode ser entendida pelo facto de que durante o processo de redução, os grupos fenol da fenilhidrazina podem funcionalizar a superfície do GO reduzidos através de ligações do tipo hidrazona. Análise por XPS demonstrou a presença de cerca de 3% at. em N.

O tamanho e a densidade eletrónica deste tipo de grupos à superfície do GO reduzido permitem obter uma maior estabilização em solução pois impedem a agregação. É também importante salientar que a redução através da fenilhidrazina é bastante efetiva, pois os valores de condutividade apresentados, 2100 Sm^{-1} , demonstram uma clara reestruturação dos sistemas π conjugados da matriz grafitica.

Resultados publicados recentemente demonstraram que a utilização de borohidreto de sódio (NaBH_4) é uma alternativa bastante viável para a substituição da hidrazina na reação de redução do GO. Apesar do NaBH_4 ser hidrolisado em água mais lentamente, este processo continua a ser cineticamente favorável para a redução do GO permitindo uma remoção efetiva dos grupos funcionais de oxigénio.

Estudos de resistividade demonstraram que a resistência apresentada por GO reduzido com NaBH_4 é bastante inferior ($59 \text{ K}\Omega\text{sq}^{-1}$) aos valores apresentados pelos materiais reduzidos por hidrazina ($780 \text{ K}\Omega\text{sq}^{-1}$), estes resultados podem ser entendidos por uma relação C/O maior no caso do NaBH_4 , 13,4/1, em comparação com os resultados obtidos para a hidrazina 6,2/1.¹⁴⁷ Consistente com o demonstrado em outras reações orgânicas, o NaBH_4 demonstrou ser um agente mais efetivo na redução das espécies funcionais de oxigénio, contudo demonstra baixa eficácia em espécies como epóxidos e ácidos carboxílicos. Um dos principais contaminantes produzidos durante a reação de redução é a formação de álcoois, resultante da hidrólise do éster borónico.

O recurso a outros agentes redutores como hidroquinona e soluções alcalinas mostrou um poder redutor inferior do GO comparativamente aos relatados anteriormente quer para a hidrazina quer para o borohidreto de sódio.

Por forma a obter resultados mais efetivos na redução do GO os investigadores têm recorrido a processos mistos em que utilizam tratamentos combinados entre os diversos agentes redutores,¹²⁷ contudo o benefício destas abordagens tem sido limitado devido à eficácia obtida nos tratamentos apenas com hidrazina ou borohidreto de sódio.

O recurso a álcoois, tais como metanol, etanol, isopropanol e álcool benzílico mostrou também ser um tratamento efetivo na redução de GO,¹³⁰ apresentando respetivamente rácios C/O bastante interessantes, 4,0/1, 6,0:1, 6,9:1 e 30:1, em especial para o caso do álcool benzílico pois o grafeno reduzido apresenta condutividades na ordem dos 4600 Sm⁻¹.

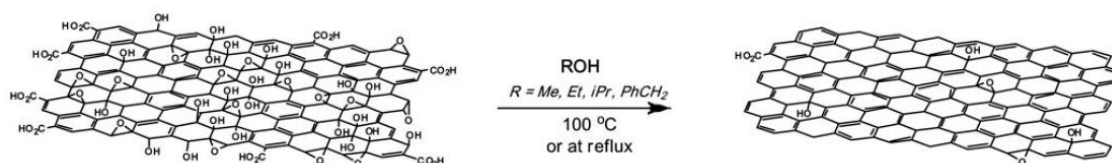


Figura 1.17 Redução do GO a grafeno através de álcoois: metanol, etanol, isopropanol e álcool benzílico.¹³⁰

Alguns autores sugerem que o mecanismo de redução com recurso a álcoois se deve essencialmente à formação de radicais do tipo OH dissociados das moléculas de álcool a temperatura elevada usada durante o tratamento, o que permite a remoção dos grupos funcionais de oxigénio da superfície do GO.¹³¹ Contudo o mecanismo efetivo de redução do GO por álcoois não se encontra ainda identificado, pois os álcoois não apresentam um comportamento típico de agentes redutores, o que pode sugerir que este comportamento seja apenas inerente ao GO ou materiais de carbono.

1.2.4.1.3.2 Redução térmica

Para além de se poder remover as unidades funcionais de oxigénio da superfície gráfica através de métodos químicos em solução, também é possível criar as condições termodinâmicas favoráveis para que este procedimento seja realizado com recurso a altas temperaturas.^{148, 149} A redução térmica é também uma das metodologias empregues para reduzir o GO, tendo sido já utilizada em 1962 por Boehm e seus colaboradores na redução de óxido de grafite.¹⁵⁰

A esfoliação do óxido de grafite em grafeno acontece quando se aquece o material a elevadas temperaturas (1050 °C) durante período de tempos curtos, em atmosfera inerte (Ar, H₂, NH₃, ultra-alto vácuo), o que promove um aumento de pressão entre os planos de carbono devido à libertação de dióxido e monóxido de carbono e água.^{136, 137} A cerca de 1000 °C consegue-se atingir pressões de cerca de 130 MPa, sendo que a constante de Hamaker prevê ser apenas necessário 2,5 MPa para quebrar as ligações entre os planos de carbono.¹³⁷

Contudo este método violento de esfoliação do óxido de grafite promove danos estruturais na malha de carbono,¹³⁶ é referido que aproximadamente 30% da massa inicial é perdida após o processamento.¹⁵¹ A caracterização por microscopia eletrónica de transmissão de alta resolução permite obter uma ideia muito efetiva dos tipos de defeitos e a sua densidade na folha de grafeno reduzido.¹⁵² Os resultados obtidos indicam que GO reduzido é composto por 60% de zonas intactas com tamanhos aproximados de 3-6 nm intercaladas com zonas amorfas. A extensão dos defeitos topológicos corresponde a cerca de 5% da superfície e apresentam um tamanho médio de cerca de 1-2 nm de diâmetro. Estes defeitos são normalmente associados à reestruturação das ligações do tipo sp² da malha de carbono através da redução das áreas oxidadas, o que permite a incorporação predominante de pentágonos, heptágonos e hexágonos de carbono a uma escala nanometria (Figura 1.18). Este tipo de defeitos induz deformações no plano e nas zonas periféricas do grafeno reduzido.

Como referido anteriormente os defeitos estruturais são normalmente sinónimo de uma redução significativa das propriedades mecânicas e condutoras. Porém, os resultados obtidos mostram que os materiais possuem valores de condutividade na ordem dos 1000-2300 Sm⁻¹, o que indica uma restauração bastante efetiva da estrutura eletrónica do grafeno reduzido termicamente.

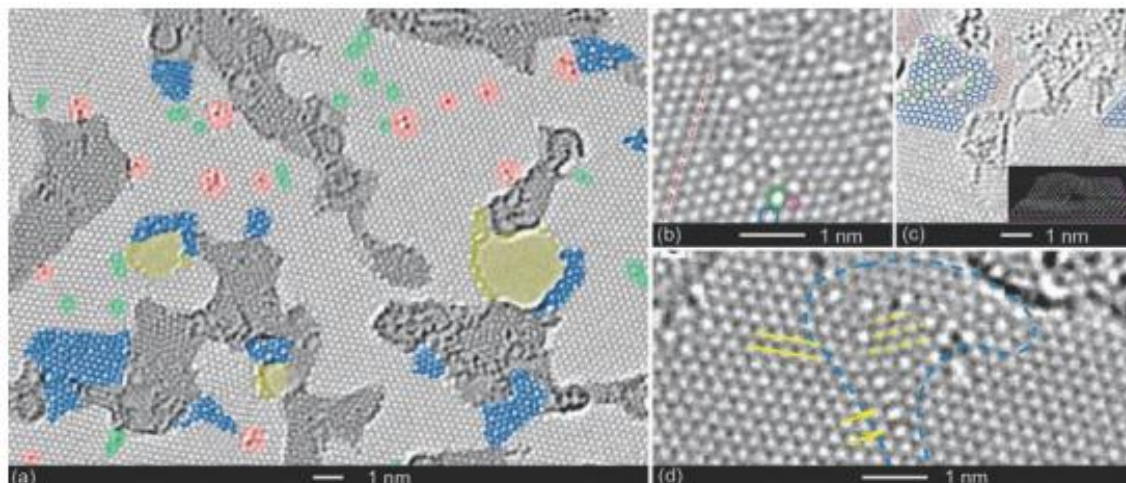


Figura 1.18 Imagem de HRTEM de GO de camada única reduzido. **a)** Os defeitos estruturais estão assinalados a diferentes cores. Área a azul corresponde a zonas desordenadas da malha de carbono que não foram reduzidas, área a vermelho corresponde à introdução de novos átomos na estrutura de carbono, zona verde corresponde a distorções da matriz. Na zona amarela aparecem os defeitos correspondentes a buracos ou a zonas reconstruídas. **(b,c)** defeitos topológicos e deformações no rGO com hexágonos de carbono (azul), pentágonos (magenta) e heptágonos (verde). A linha a tracejado a vermelho indica zonas com forte distorção da malha cristalina.¹⁵²

Compreender os mecanismos das reações térmicas é essencial para definir rotas alternativas capazes de limitar a densidade de defeitos gerados na estrutura gráfica dos grafenos. Recentemente Acik *et al.* propuseram um novo mecanismo para a redução térmica do GO, baseado em estudos exaustivos por espectroscopia de infravermelho.¹⁵³ Segundo o autor, o mecanismo de redução acontece em três passos distintos, Iniciação, Propagação e Terminação (Figura 1.19). No primeiro passo, Iniciação, acontece a formação de diversas espécies radiculares através da degradação térmica da água adsorvida, entre as quais se destacam os, OH^\cdot , $\text{R}^\cdot(\text{H}_3\text{O})$ e os HO_2 (Figura 1.19 i). Durante o segundo passo, propagação, acontece o ataque dos radicais aos diversos grupos funcionais da superfície dos GO: **a)** grupos hidróxilo, **b)** grupos carboxílicos e **c)** grupos epóxidos (Figura 1.19 ii). No último passo, terminação, ocorre a eliminação de todas as espécies radiculares através da formação de CO , CO_2 e H_2O e consequentemente a reestruturação da rede de carbono do grafeno, quer em hexágonos ou pentágonos (Figura 19 iii).

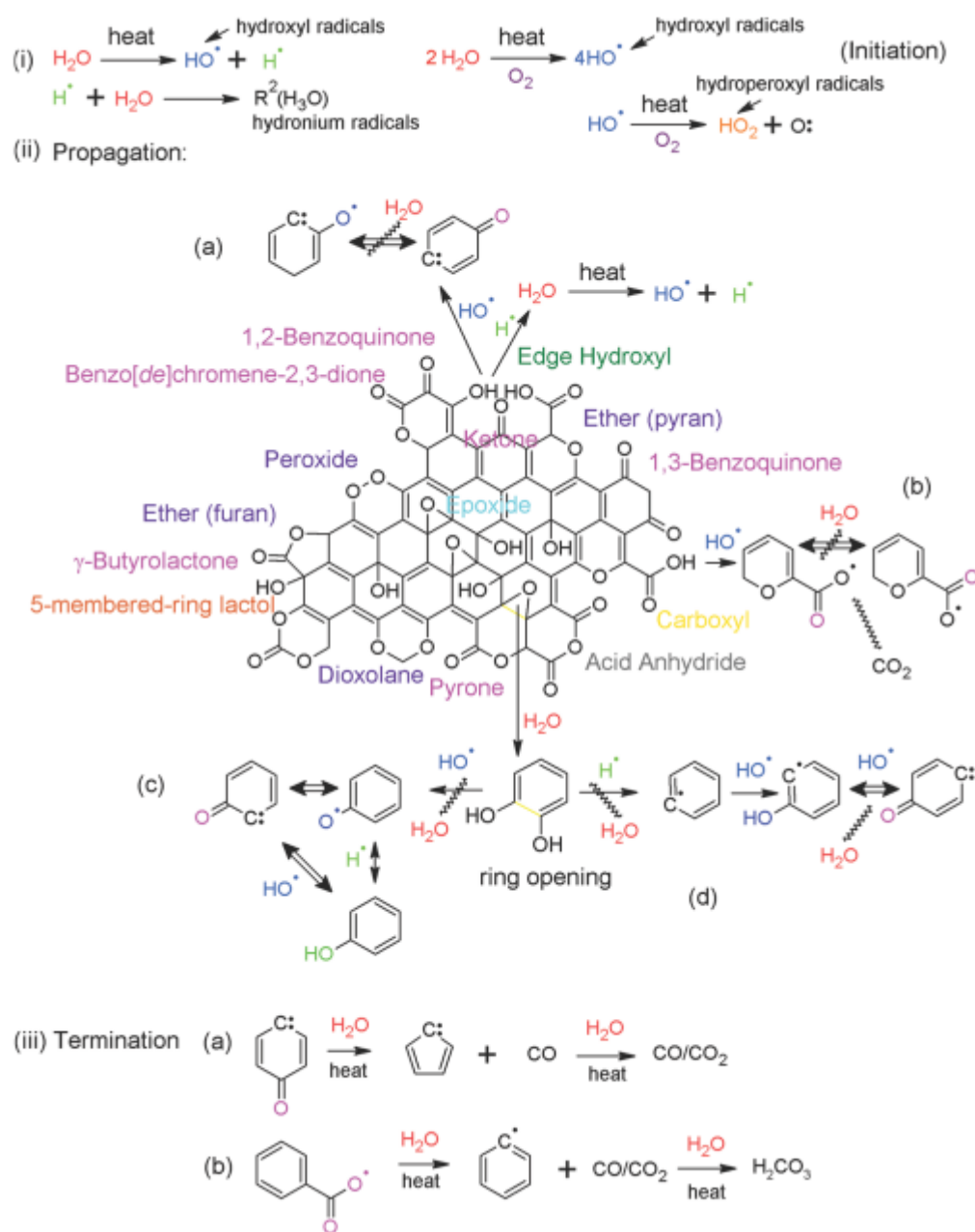


Figura 1.19 Mecanismo de redução térmica do GO através de radicais.¹⁵³

Estudos realizados por Larciprete *et al.* baseados em análises de XPS e cálculos teóricos permitiram desenvolver uma outra perspectiva quanto ao mecanismo de redução térmica do GO.¹⁵⁴ A teoria é baseada na difusão das espécies de oxigénio ao longo da estrutura de carbono seguido de eliminação. Nesta proposta foram definidas duas abordagens diferentes, a primeira relacionada com os grupos epóxidos, na qual os oxigénios destes grupos migram pela estrutura de carbono até se encontrarem e serem eliminados sob a forma de O_2 , sendo esta mobilidade sustentada pelo fornecimento de energia. Por outro

lado, grupos mais estáveis como éteres, quinonas e lactonas podem também reagir com o oxigénio das espécies vizinhas dos epóxidos permitindo a eliminação através da formação de espécies contendo carbono, CO e CO₂ (Figura 1.20).

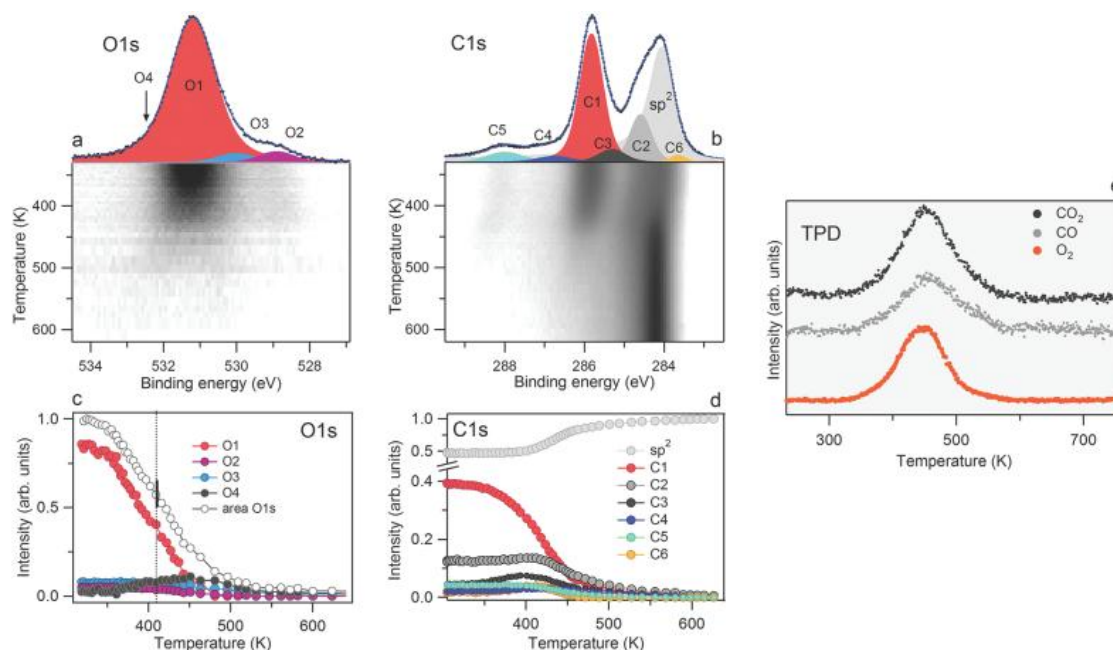


Figura 1.20 Análise química da superfície do GO por XPS, **a)** grupos com oxigénio e **b)** grupos com carbono. No gráfico **c)** e **d)** pode-se ver a diminuição significativa das espécies contendo oxigénio com o aumento da temperatura. O gráfico **e)** mostra que a dessorção de oxigénio molecular entre 350 e 550K é paralela à remoção de CO e CO₂.¹⁵⁴

O consenso a nível do mecanismo preferencial para a redução térmica do GO ainda não foi atingido, contudo as diversas propostas apresentam uma boa sustentabilidade analítica para se desenvolverem ideias mais concretas. Porém a dificuldade da definição de um mecanismo preferencial reside no facto de o GO ser obtido através de metodologias diferentes, o que promove diferentes níveis de oxidação, defeitos e contaminantes, direcionando os mecanismos para casos particulares e não genéricos.

1.2.4.1.3.3 Redução eletroquímica

A redução eletroquímica, ao contrário das outras metodologias já descritas, é uma técnica recente no que concerne à redução do GO,¹³³⁻¹³⁵ que se baseia como o próprio nome indica na remoção dos grupos funcionais de oxigénio através de reações eletroquímicas. Esta metodologia tem como grande vantagem o não recurso a agentes redutores perigosos como o caso da hidrazina (tóxico e inflamável), e por outro lado não apresenta produtos secundários de reação.

Basicamente o procedimento experimental da redução eletroquímica do GO consiste na deposição do material num substrato condutor ou isolante (vidro, plástico óxido de índio, carbono ou ouro) no qual os elétrodos são inseridos em lados opostos. A amostra é colocada numa solução tampão de fosfato de sódio e posteriormente é aplicado um ciclo voltamétrico linear (Figura 1.21). A redução começa com diferenças de potencial de cerca de -0,60 V e decorre até um máximo de -0,87 V.

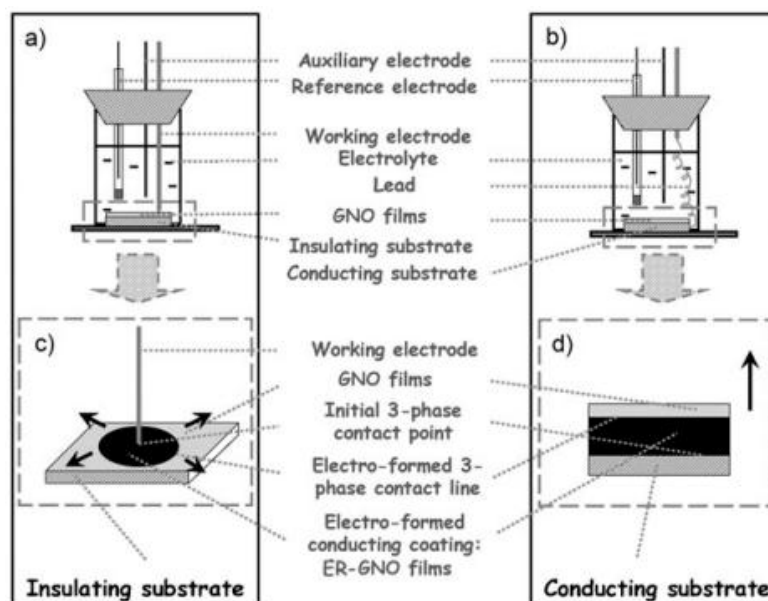


Figura 1.21 Representação experimental do processo de redução eletroquímica do GO em substratos **a)** condutores e **b)** não condutores.¹³³

A análise da relação C/O na amostra reduzida é 23,9/1 e a sua condutividade 8500 Sm^{-1} , demonstrando que ocorre uma efetiva reestruturação eletrónica da camada gráfica.¹³³

Este mecanismo de redução é ainda algo enigmático, contudo os autores acreditam que os iões de hidrogénio na solução tampão desempenham um papel crucial no mecanismo de redução. Os dados obtidos apresentam um desvio para valores negativos do pico catódico durante o processo de electro-redução à medida que o pH aumenta, o que é consistente com mecanismo de protonação ($\text{GO} + a\text{H}^+ + be^- \rightarrow r\text{GO} + c\text{H}_2\text{O}$).

Esta via parece ser extremamente eficaz na redução dos grupos funcionais de oxigénio à superfície do GO, no entanto esta metodologia ainda foi apenas demonstrada para amostras em pequena escala. Uma das limitações experimentais prende-se com a deposição de grandes quantidades do GO entre os elétrodos de modo a que a redução seja efetiva.

1.2.4.1.3.4 Redução por combinação de diferentes metodologias

De acordo com o que já foi dito anteriormente, a utilização de agentes redutores em solução do GO, permite uma eliminação preferencial dos grupos epóxidos. Por outro lado a utilização de processos térmicos permite ir mais além com a eliminação dos grupos carboxílicos e carbonilos. Tendo por base estas premissas é de crer que a combinação destes dois mecanismos permita obter grafenos altamente reduzidos.^{141, 155}

Uma das primeiras abordagens a ser testada consistiu na aplicação de dois processos de redução do GO sobejamente conhecidos e que tinham evidenciado por si só os melhores resultados na eliminação dos grupos funcionais de oxigénio: i) exposição a hidrazina e ii) o tratamento térmico a 1100 °C. Mattevi *et al.*¹⁵⁵ obtiveram rácios de C/O de 12,5 para grafeno reduzido através desta abordagem, sendo a condutividade obtida na ordem de 5500 Scm⁻¹. Gao *et al.*¹⁴¹ combinou uma redução em solução por borohidreto de sódio com posterior acidificação com H₂SO₄ e por fim um tratamento térmico a elevadas temperaturas (1100 °C), como demonstra a representação esquemática seguinte (Figura 1.22).

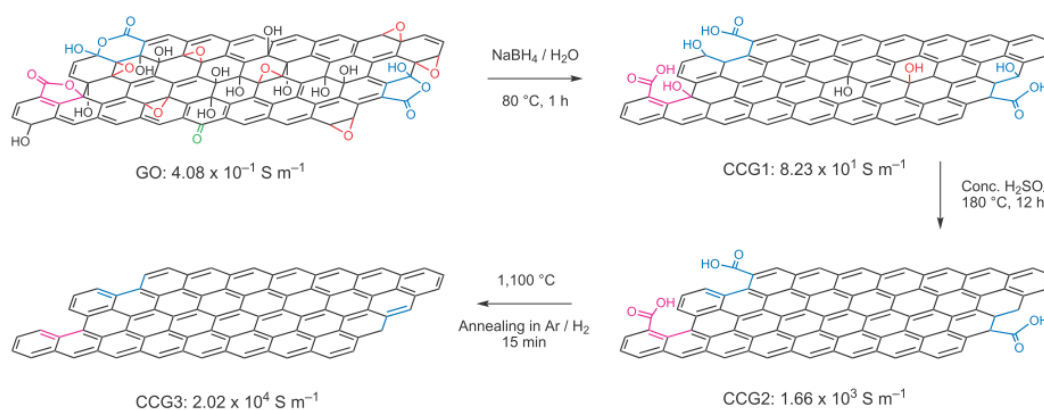


Figura 1.22 Representação esquemática do procedimento de redução do GO com recurso a diferentes abordagens, redução em solução e redução térmica.¹²²

A avaliação da reestruturação das orbitais π deslocalizadas na superfície do GO pode ser seguida de duas formas distintas, ou por avaliação da condutividade do material ou pela percentagem de grupos funcionais de oxigénio. Neste trabalho Gao *et al.* usaram as duas abordagens, primeiramente confirmaram o que há muito tinha sido descrito, que o GO pode ser considerado um material isolador, com uma percentagem de oxigénio de aproximadamente 50%. Após o primeiro tratamento de redução em solução, com recurso a NaBH₄ e posteriormente com H₂SO₄, o material passou a apresentar uma condutividade já assinalável de $1,66 \times 10^3 \text{ Sm}^{-1}$, devido essencialmente à remoção dos

grupos epóxido, cetona, álcool, lactonas e alguns ésteres (oxigénio total na estrutura 12,68%), que permitiu o restabelecimento parcial das orbitais π . A última etapa do processo de redução, o tratamento térmico, permitiu obter um material com propriedades semelhantes à grafite, quer nas suas propriedades condutoras $2,02 \times 10^4 \text{ Sm}^{-1}$, quer na percentagem de oxigénio 0,5%, através da eliminação dos grupos carbonilos e carboxílicos periféricos. Estes resultados indicam claramente que uma grande percentagem da estrutura grafítica inicial foi reconstituída, permitindo obter grafeno de elevada qualidade.

1.2.4.1.4 Funcionalização dos grafenos

Para além de todas as extraordinárias propriedades já descritas anteriormente relativamente ao grafeno, a sua funcionalização através de modificações orgânicas ou inorgânicas permite obter novos materiais multifuncionais com enormes potencialidades ao nível de aplicações e desempenho em diversos sistemas.

A funcionalização química possibilita a manipulação física e química das propriedades dos materiais em geral e dos grafenos em particular o que permite uma melhor compreensão dos mecanismos de interação com o ambiente que os rodeia.

Inicialmente o grafeno apenas foi usado como modelo teórico por forma a compreender o comportamento dos nanotubos de carbono. Após a descoberta do grafeno e das suas excelentes propriedades a funcionalização química do grafeno tornou-se um foco de interesse especial na química e física contemporâneas.¹⁵⁶⁻¹⁵⁸ A este nível muito se deve ao trabalho pioneiro de Ruoff e seus colaboradores,^{95, 96, 159} ao prepararem soluções coloidais estáveis de grafeno em água e vários solventes orgânicos em grande escala. Este primeiro passo teve um impacto bastante importante no desenvolvimento da química do grafeno pois permitiu resolver o problema relativo à insolubilidade e à manipulação característica dos materiais de carbono em geral e do grafeno em particular.

É importante também referir que o conhecimento adquirido até então sobre a funcionalização dos CNTs permitiu um rápido desenvolvimento da funcionalização do grafeno, uma vez que o grafeno tem propriedades químicas muito semelhantes aos CNTs devido a ambos possuírem uma estrutura aromática conjugada.

Estes materiais de carbono permitem a funcionalização por ligações covalentes através dos grupos funcionais superficiais resultantes de uma oxidação prévia ou ligações não covalentes através de interações do tipo π - π , Van der Waals, pontes de hidrogénio ou iónicas. Tal como os CNTs, a funcionalização covalente do grafeno acontece preferencialmente nas zonas de defeitos da matriz grafítica,¹⁶⁰ sendo que nas zonas de

fronteira o grafeno apresenta maior reatividade devido ao elevado número de defeitos estruturais em comparação com CNTs.¹⁶¹ Uma outra diferença assinalável é o facto de que a reatividade das folhas de grafenos ser semelhante em ambos os lados, no caso dos CNTs a reatividade no interior da estrutura é diferente da reatividade no seu exterior. Normalmente a funcionalização do grafeno deriva de sistemas binários (salvo raras exceções em sistemas muito específicos), sendo que o segundo componente são normalmente, pequenas moléculas orgânicas, polímeros, dopantes, metais, óxidos, etc...

1.2.4.1.4.1 Funcionalização orgânica dos grafenos

A funcionalização orgânica do grafeno tem especial interesse quando se pretende usar o grafeno como reforço de matrizes poliméricas, pois permite compatibilizar o reforço com o polímero por forma a desenvolver materiais multifuncionais através do aumento das propriedades elétricas, térmicas, mecânicas ou redução da penetração de gases.

A funcionalização do grafeno pode ser efetuada de dois modos distintos, por ligações covalentes ou não covalentes. Para além de outros fatores, a natureza da ligação na interface do reforço com o polímero tem implicações bastante significativas nas propriedades finais dos nanocompósitos. Por exemplo o uso de ligações covalentes entre o grafeno e as matrizes poliméricas permite uma transferência de carga mais efetiva aliviando as tensões impostas nos materiais o que é bastante importante quando se fala de reforços mecânicos, contudo é necessário referir que a funcionalização covalente do grafeno cria zonas discretas de descontinuidade da rede sp^2 hibridizada não permitindo a condução de eletrões, o que tem implicações significativas na redução da condutividade do nanocompósito final. Neste caso a funcionalização não covalente dos grafenos, através de interações fracas minimiza este efeito pois não intervém em qualquer desestabilização da estrutura aromática do grafeno.

Torna-se por isso preponderante avaliar bem que tipo de sistema se pretende desenvolver por forma a maximizar todas as suas potencialidades em função do tipo de ligações a estabelecer entre o grafeno e o agente de funcionalização.

1.2.4.1.4.1.1 Funcionalização orgânica covalente

A funcionalização covalente dos materiais de carbono é normalmente precedida de uma oxidação da matriz gráfica por forma a obter grupos funcionais de oxigénio que servem de precursores para a ancoragem de moléculas orgânicas desejadas. Como referido anteriormente, o GO é caracterizado por ser altamente funcionalizado por grupos de oxigénio que chegam à razão C/O de 2:1, sendo maioritariamente constituídos por grupos

epóxido e hidróxido no plano gráfitico e por grupos carboxílicos e carbonilos na sua periferia. Esta disponibilidade de grupos funcionais permite o recurso a várias abordagens já desenvolvidas em química orgânica por forma a funcionalizar o GO (Figura 1.23). Em termos de reações químicas, a acilação está entre as abordagens mais comuns para promover a ligação covalente de precursores moleculares com os grupos funcionais à superfície do GO.¹⁶² Por exemplo, a acilação dos grupos carboxílicos do GO com octadecilamina permite a funcionalização com cadeias alquílicas longas, obtendo-se assim um material hidrofóbico.

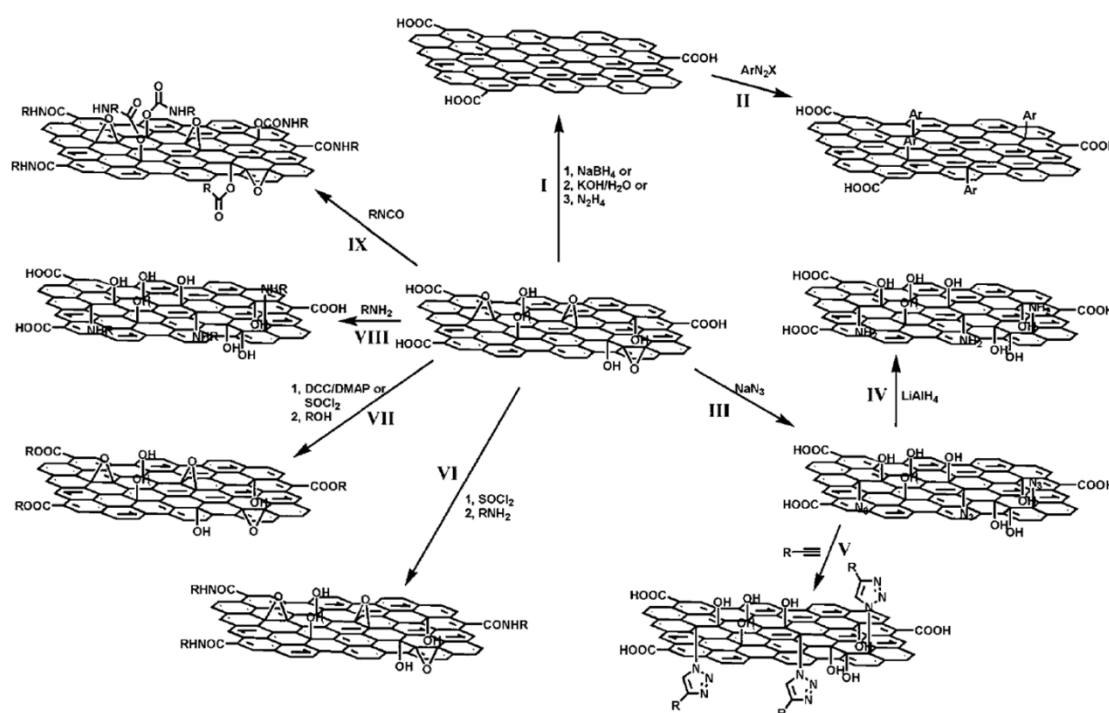


Figura 1.23 Representação esquemática da funcionalização covalente dos grafenos através de diferentes abordagens químicas¹⁶². **I** Redução do GO a grafeno através de vários agentes redutores (**1**, NaBH_4 ; **2**, $\text{KOH}/\text{H}_2\text{O}$; **3**, N_2H_4). **II** Funcionalização covalente da superfície dos grafenos reduzidos “via diazonium” (ArN_2X). **III** Funcionalização do GO através da reação com azida de sódio. **IV** Redução do GO-azida através de LiAlH_4 resulta em GO funcionalizado com grupos amina. **V** Funcionalização de GO-azida através de “click chemistry” ($\text{R}-\text{C}\equiv\text{CH}/\text{CuSO}_4$). **VI** Modificação do GO com longas cadeias alquílicas (**1**, SOCl_2 ; **2**, RNH_2) através da reação de acilação. **VII** Esterificação do GO através dos grupos carboxílicos com alquilaminas. **VIII** Reações de abertura de anel entre os grupos epóxidos do GO e os grupos amina terminais das moléculas orgânicas. **IX** Tratamento da superfície do GO com isocianatos orgânicos o que permite a derivatização dos grupos carboxílicos e hidroxilos em amidas ou ésteres de carbamato (RNCO).¹⁶²

Este tipo de funcionalização não só permite a formação de soluções coloidais estáveis numa série de diferentes solventes, tais como água, acetona, etanol, 1-propanol, etileno glicol, diclorometano, piridina, DMF, THF (tetrahidrofurano), DMSO (dimetilsulfoxido), NMP, acetonitrilo, hexano, éter dietílico e tolueno,^{142, 163, 164} como também melhora a dispersão e reforça as interações interfaciais entre o grafeno e as matrizes poliméricas.

Stankovich e seus colaboradores demonstraram a funcionalização da superfície do GO com derivados de isocianatos com grupos funcionais aromáticos e alifáticos, através da formação de grupos amida e ésteres de carbamato com os grupos carboxílicos e hidroxilo, respetivamente, à superfície do GO.¹⁵⁹ Os resultados apresentados demonstraram que estes novos materiais híbridos apresentavam a formação de soluções coloidais estáveis em diferentes solventes apróticos polares, tais como, DMF, NMP, DMSO ou HMPA (hexametilfosforoamida).

Uma outra abordagem que permite a adição de novos grupos funcionais à superfície do GO é a silanização.^{165, 166} Yang e os seus colaboradores descreveram a ligação covalente entre o 3-aminopropiltriétoxissilano (APTS) à superfície do GO, através de reações nucleofílicas S_N2 entre os grupos epóxido da superfície do GO e os grupos amina do APTS. Este tipo de modificação tem especial interesse na dispersão do GO funcionalizado em diferentes tipos de solventes (polares ou apolares), pois a família dos silanos apresenta uma grande variedade de grupos funcionais terminais.

No caso da funcionalização através dos ácidos carboxílicos é possível uma ativação prévia destes grupos através de diversos agentes, tais como, cloreto de tionilo (SOCl₂),¹⁶⁷⁻¹⁷¹ EDC (1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida),¹⁷² DCC (N,N'-diciclohexilcarbodiimida)¹⁷³ e HATU (2-(7-azo-1H-benzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametilurónio hexafluorofosfato).¹⁷⁴ Posterior adição de espécies nucleofílicas, tais como aminas e hidroxilos, permite a formação de ligações covalentes com os grupos funcionais do GO através da formação de grupos amida ou ésteres.

Uma outra estratégia para a funcionalização superficial do GO passa pelo recurso aos grupos epóxidos na superfície dos planos gráfiticos, que facilmente podem ser modificados sobre determinadas condições através de reações de abertura-anel. O mecanismo preferencial para este tipo de reações passa por um ataque nucleofílico do carbono-α por aminas. O trabalho realizado por Wang *et al.* usando esta metodologia permitiu a modificação superficial do GO com octadecilamina.¹⁷⁵ Yang *et al.* usou o mesmo procedimento para estabelecer ligações entre um líquido iónico com grupos amina terminais e os grupos epóxidos da superfície do grafeno. Esta modificação

superficial tem especial interesse quando se pretende dispersar os GO em solventes polares.¹⁷⁶

Como referido anteriormente uma das principais razões para a modificação superficial do GO com moléculas orgânicas é a possibilidade de integrar estas estruturas a nível molecular em diversas matrizes poliméricas.

Um mecanismo sobejamente conhecido para o crescimento controlado de cadeias poliméricas à superfície dos GO é a polimerização radicalar por transferência de átomo (abreviatura em inglês ATRP). Normalmente nestes casos os grupos carboxílicos do GO são modificados com diaminas através da formação de grupos amida, permitindo obter GO funcionalizado com grupos amina terminais. Estes grupos amina e também alguns grupos hidróxidos da superfície do GO permitem a ligação dos agentes iniciadores da polimerização ATRP,^{177, 178} que normalmente são compostos com bromo. Após a adição do agente iniciador à superfície do GO é possível realizar o crescimento controlado das cadeias poliméricas (Figura 1.24), dependendo apenas do tipo de monómero escolhido. Estireno¹⁷⁷⁻¹⁷⁹, 2-(Dimetilamino)etil metacrilato,¹⁸⁰ butilacrilato,^{178, 181} ou metilmetacrilato^{178, 182, 183} são apenas alguns dos monómeros já utilizados. A versatilidade deste mecanismo permite também o crescimento controlado de copolímeros, pois se a polimerização radicalar continuar viva poder-se-á proceder ao crescimento de outra cadeia polimérica alterando para isso apenas o monómero desejado.

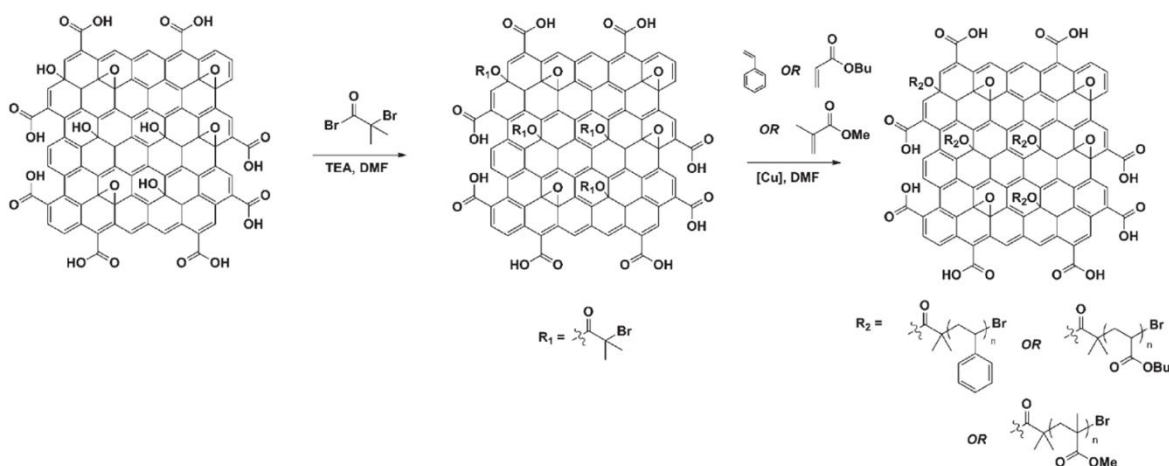


Figura 1.24 Modificação superficial do GO com iniciador de ATRP para polimerização com estireno, butilacrilato ou metilmetacrilato.¹⁷⁸

A polimerização por via transferência de cadeia reversível por adição-fragmentação (abreviatura em inglês RAFT) também tem apresentado resultados bastante interessantes na funcionalização de materiais de carbono. Tal como descrito

anteriormente para a polimerização via ATRP a polimerização via RAFT necessita de uma prévia imobilização do agente iniciador na superfície dos GO. A polimerização via RAFT é uma técnica bastante versátil no controlo da polimerização radicalar viva, possibilitando a utilização de vários tipos de monómeros. Esta abordagem permite o crescimento controlado das cadeias de polímero, distribuição de peso molecular baixo, e também predefinir quais os grupos funcionais terminais. O processamento deste tipo de materiais passa por uma primeira modificação superficial do GO com SOCl_2 resultando na formação de grupos tionilo, que posteriormente permitem a ligação de um agente iniciador da polimerização via RAFT. A partir deste ponto pode-se definir o monómero a usar no crescimento das cadeias poliméricas.¹⁸⁴ Contudo esta abordagem não tem sido merecedora de tanta atenção para a funcionalização dos GO como a polimerização via ATRP.

A funcionalização covalente do GO através do mecanismo Ziegler-Natta (Figura 1.25) também demonstrou ser uma opção a considerar quando se pretende fazer o crescimento de cadeias poliméricas. A funcionalização prévia do GO com o reagente de Grinard (BuMgCl) permite a imobilização de TiCl_4 na sua superfície, que posteriormente possibilita o crescimento das cadeias poliméricas por adição de catalisador AlEt_3 e do monómero desejado.¹⁸⁵

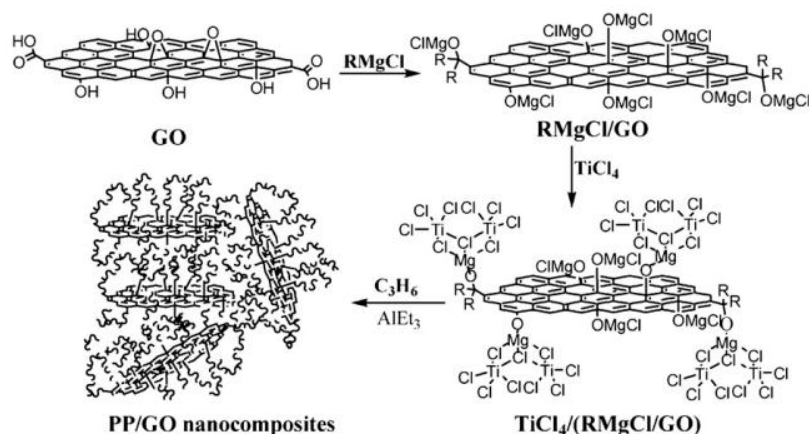


Figura 1.25- Polimerização Ziegler-Natta de propileno à superfície do GO.¹⁸⁵

A polimerização através do mecanismo de abertura de anel também já foi descrita para a funcionalização do GO com poliamidas através de reações de condensação entre os grupos carboxílicos do GO e os grupos amina do monómero, contudo os resultados demonstraram baixo peso molecular do polímero.¹⁸⁶

Em alguns casos é possível estabelecer ligações covalentes entre a matriz polimérica e o GO durante a polimerização sem a necessidade de realizar uma modificação prévia da

superfície do GO com grupos funcionais específicos. Estes materiais podem ser obtidos através de reações do tipo reticuladas entre os grupos funcionais epóxido e carboxílicos da superfície do GO e os grupos funcionais dos polímeros. Esta estratégia já foi adotada em matrizes poliméricas epoxi, poliuretanos e poli(alilamina).¹⁸⁷⁻¹⁹⁰

A funcionalização do GO com moléculas orgânicas tem também permitido o desenvolvimento de novos materiais híbridos para aplicações em nano-eletrónica¹⁹¹ e opto-eletrónica.^{169, 192} Neste contexto a funcionalização covalente do GO com aminoporfirinas através da formação de ligações do tipo amida permite a funcionalização da superfície com espécies fotoactivas, o que resulta num aumento da fotossensibilidade dos materiais híbridos.

Nesta breve descrição de metodologias para a funcionalização covalente superficial do GO pretende-se apenas ilustrar as que são mais usuais, contudo existem muito mais tipos de abordagens com pequenas moléculas orgânicas que permitem obter materiais funcionais bastante interessantes. É no entanto importante salientar que todos estes tipos de funcionalizações descritas anteriormente dependem da presença dos grupos funcionais de oxigénio na superfície dos grafenos para o estabelecimento de ligações covalentes.

1.2.4.1.4.1.2 Funcionalização orgânica não-covalente

O GO pode também formar diversos materiais multifuncionais através de ligações não covalentes, do tipo Van der Waals ou iónicas. Estas ligações podem ser estabelecidas essencialmente devido ao facto da superfície do GO ser carregada negativamente pela presença dos grupos funcionais de oxigénio e também devido à sua estrutura aromática com orbitais π deslocalizadas que permitem interações do tipo π - π .

Como já anteriormente referido, a funcionalização covalente do GO pode ser desejável em determinadas circunstâncias, todavia induz na maioria dos casos formação de defeitos na estrutura grafítica que podem contribuir para a redução das propriedades mecânicas e ou elétricas dos grafenos. Por outro lado, a funcionalização não covalente mantém a estrutura grafítica sem qualquer alteração estrutural e normalmente este tipo de interações é reversível. Assim, a funcionalização não covalente apresenta algumas vantagens em determinadas áreas, tais como sensores químicos e materiais biomédicos. Neste contexto, vários polímeros,¹⁹³⁻¹⁹⁵ surfactantes,¹⁹⁶⁻¹⁹⁸ polielectrólitos¹⁹⁹⁻²⁰¹ e biomoléculas²⁰²⁻²⁰⁶ podem ser usados para funcionalizar a superfície dos GO (Figura 1.26). Estudos recentes demonstram um crescente interesse em funcionalizar o grafeno com vários tipos de biomoléculas, tais como DNA, proteínas, peptídios, bactérias, células

e enzimas através de adsorção física ou interações químicas. Estes novos sistemas biológicos com propriedades únicas apresentam grande potencialidade como plataformas biológicas em áreas como a nano-eletrónica e biotecnologia.²⁰⁷

Um bom exemplo é a adsorção de biomoléculas de ADN na superfície do GO facilitada devido às interações não covalentes (electroestáticas/pontes de hidrogénio) entre as amins primárias das cadeias de ADN de hélice simples e os grupos carboxílicos do GO. Os resultados obtidos demonstram que estes sistemas são estáveis em soluções aquosas durante vários meses em concentrações inferiores a 2,5 mg/mL.²⁰² Esta abordagem foi também desenvolvida para cadeias de ADN de dupla hélice, contudo os resultados demonstraram que as suspensões aquosas de GO eram menos estáveis, provavelmente devido ao emparelhamento das hélices o que pode limitar as interações com a superfície hidrofílica do GO.

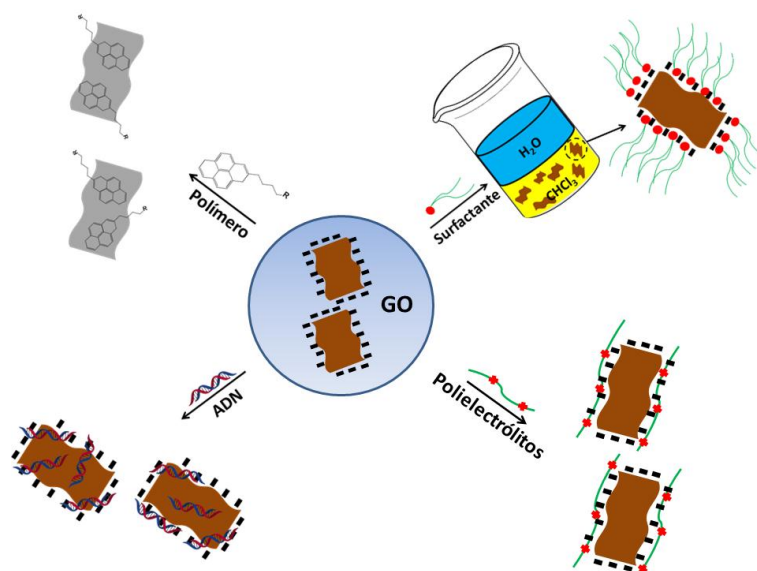


Figura 1.26 Representação esquemática da funcionalização não covalente do GO através de, **a)** surfactantes **b)** polielectrólitos, **c)** DNA e **d)** polímeros.

1.2.5 Nanocompósitos

A nanotecnologia tem sido uma área do conhecimento que veio de alguma forma revolucionar a área de investigação em materiais, abrindo um mundo de oportunidades para o desenvolvimento de novos sistemas e novas propriedades. Apesar das nanociências e nanotecnologias serem uma disciplina relativamente recente, o número de publicações e patentes nesta área tem crescido significativamente nos últimos anos, o que demonstra as grandes potencialidades desta área multidisciplinar (química, física, biologia entre outras).^{208, 209}

A definição para material nanométrico ainda é alvo de alguma controvérsia, se por um lado se afirma que um material que apresente dimensões abaixo de 100 nm pode ser considerado nanométrico por outro define-se material nanométrico como aquele que devido à diminuição das suas dimensões apresenta propriedades distintas das apresentadas à escala superior (Figura 1.27). Estas propriedades podem ser de diversa ordem, condutividade elétrica ou térmica, magnetismo, elasticidade, maior resistência mecânica, óticas, etc...

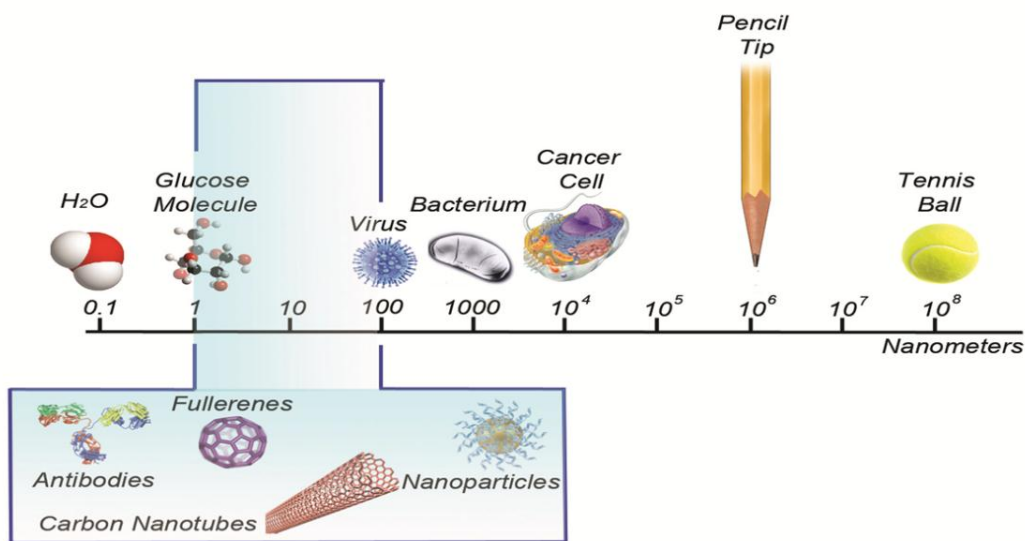


Figura 1.27 Representação esquemática do tamanho da matéria.

(<http://nanoscience.massey.ac.nz/>)

Os materiais nanocompósitos surgiram com o principal intuito de criar materiais de alto desempenho através da combinação das propriedades únicas dos nanomateriais com uma matriz ou substrato, permitindo o desenvolvimento de novos materiais “hi-tech”. Sendo que a definição de nanocompósito implica que pelo menos um componente do compósito apresente dimensões à ordem da nanoescala.

Dependendo da natureza da nano-fase e da matriz/substrato as possibilidades de combinação de materiais para o desenvolvimento de novos nanocompósitos são enormes, daí se tentar catalogar os novos nanocompósitos em função da posição ocupada pela fase “nano”: encapsulado, dispersão em matriz, filme fino, multicamadas etc...

Quando se atingem dimensões nanométricas em materiais não é apenas o aparecimento de novas propriedades que torna os materiais interessantes, mas também o facto de a reatividade das interfaces aumentar significativamente. Este facto tem bastante relevância quando se pretende estabelecer interações entre diversas fases como é o

caso dos nanocompósitos. Este fenómeno pode ser entendido pelo facto de a relação área superficial/volume dos materiais de reforço aumentar significativamente quando os materiais têm dimensões nanométricas. Contudo esta vantagem pode também facilmente tornar-se numa limitação, pois a maior energia superficial apresentada pelos nanomateriais torna-os instáveis permitindo facilmente a sua agregação,²¹⁰ o que pode condicionar a dispersão homogénea na matriz/substrato do nanocompósito.

1.2.5.1 Nanocompósitos poliméricos

O número de materiais poliméricos que são usados na área da engenharia de tecidos tem aumentado enormemente na última década. Várias são as causas para este rápido desenvolvimento, desde novas técnicas de processamento mais avançadas, micro ou nano-manufatura, desenvolvimento de novos sistemas através de modificações superficiais e os avanços significativos na área da nanotecnologia. O desenvolvimento de novos materiais à escala nano com propriedades singulares, permitiu um rápido crescimento de novos sistemas nanocompósitos multifuncionais. O estabelecimento de sinergias entre a matriz e a nanofase possibilita obter o melhor de ambos num único material, o que permite muitas vezes alargar o seu campo de aplicação.

Um dos parâmetros mais importante quando se projeta a arquitetura de um nanocompósito é compatibilizar a estrutura química de ambas as fases (nano-fase/matriz) por forma a maximizar as interações entre eles. Normalmente uma das estratégias mais utilizadas para obter uma integração efetiva é com o recurso à funcionalização da nano-fase. Através da modificação superficial da nano-fase poder-se-á obter ligações fortes com a matriz (covalentes) ou ligações mais fracas (pontes de hidrogénio ou iónicas).

O processo de síntese dos nanocompósitos de base polimérica pode ser efetuado com o recurso a várias técnicas, contudo estas podem-se dividir em três grupos principais. A primeira abordagem consiste na dissolução do polímero num solvente no qual é também dispersa a nanofase através de ultrassons ou agitação magnética. Posteriormente procede-se à eliminação do solvente por evaporação (a terminologia inglesa é “solvent casting”). Neste caso, a dissolução do polímero permite um aumento da mobilidade das cadeias poliméricas possibilitando uma integração mais efetiva da nanofase após a precipitação.

Uma outra abordagem bastante utilizada para a síntese de nanocompósitos poliméricos é o processamento a quente, ou seja, o polímero é extrudido através do aumento de temperatura o que permite uma diminuição da viscosidade, ponto após o qual é adicionada a nanofase por forma a obter a máxima homogeneização possível com a

matriz. A última abordagem para o processamento de nanocompósitos de base polimérica é a chamada síntese “in situ”, que consiste na síntese dos materiais através dos seus precursores moleculares. Nesta situação pode-se partir das unidades monoméricas para produzir a matriz polimérica ou pode-se partir de precursores moleculares para se obter a nanofase no interior da matriz polimérica. Nesta situação é possível obter uma maior integração entre ambos componentes do nanocompósito e, em princípio, uma dispersão mais efetiva da nanofase.

As potencialidades dos nanocompósitos de base polimérica são enormes, e os seus campos de aplicação são bastante vastos. São usados como materiais com efeito de barreira ou seja não permitem a penetração de gases, são também utilizados como agentes retardadores de chama reduzindo o tempo de propagação de chama. Através da incorporação de nanopartículas nos polímeros é possível obter novos efeitos óticos, por exemplo é possível aumentar a transparência através da adição de óxido de zinco ou induzir novas cores através da adição de nanopartículas de ouro ou seleneto de cádmio. É também possível obter nanocompósitos poliméricos com propriedades catalíticas, através da adição de nanopartículas catalíticas como Pd e Pt, ou com propriedades magnéticas através da adição de nanopartículas magnéticas como óxido de ferro. É também possível obter nanocompósitos com propriedades antifúngicas e antibacterianas através da adição de nanopartículas de prata ou de dióxido de titânio. A introdução de hidroxiapatite em biomateriais de matrizes poliméricas permite um aumento da biocompatibilidade do mesmo.

É também possível aumentar a resistência mecânica, resistência ao desgaste, condutividade térmica e elétrica, e biocompatibilidade dos polímeros através da adição de nanoestruturas de carbono, tais como: grafenos, CNTs, nano-diamante, nano-fibras de carbono, C₆₀ etc... A Tabela 1.5 apresenta uma pequena descrição dos diferentes tipos de nanocompósitos reforçados com SWCNTs, MWCNTs ou grafeno para aplicações ortopédicas. Uma análise detalhada permite verificar que os CNTs apresentam já uma posição bastante bem consolidada nesta área de aplicação, enquanto que os nanocompósitos com grafenos começaram há relativamente pouco tempo a dar os primeiros passos nesse sentido.

Tabela 1.5 Nanocompósitos de CNTs ou grafenos para aplicações ortopédicas

Nanoestruturas de carbono	Objetivos da adição das nanoestruturas
MWCNTs	<p>Melhorar a resistência à fadiga e propriedades mecânicas dos cimentos ósseos.²¹¹⁻²¹³</p> <p>Aumentar a resistência à compressão, condutividade elétrica e de bioatividade de matrizes de vidro bioativo.^{214, 215}</p> <p>Melhorar a resistência à flexão e módulo de flexão de nanocompósitos polímero / MWCNT.^{216, 217}</p> <p>Aumentar a resistência à flexão, tenacidade à fratura e resistência à fadiga de nanocompósitos polímero/MWCNT.²¹⁸</p> <p>Melhorar a resistência ao desgaste de nanocompósitos polímero/MWCNT.²¹⁹</p> <p>Melhorar a biocompatibilidade e adesão de células ósseas (fixação e proliferação) em nanocompósitos de colagénio/MWCNT,²²⁰ PLGA/HA/MWCNT,²²¹ PMMA/HA/MWCNT,²²² PLLA/MWCNT,²²³ e UHMWPE/MWCNT.²¹⁹</p> <p>Promover o crescimento de novo tecido ósseo em nanocompósitos polímero/MWCNT.^{224, 225}</p> <p>Apresentar propriedades eletroquímicas promissoras para a detecção de crescimento ósseo “in situ” próximo do implante ósseo.²²⁶</p>
SWCNTs	<p>Promover a formação de hidroxiapatite em filmes de SWCNTs modificados.²²⁷</p> <p>Aumentar da atividade celular das células ósseas e mineralização da matriz “in vitro”.²²⁸</p> <p>Melhorar na formação do osso “in vivo” e capacidades de reparação óssea dos nanocompósitos²²⁸ e sistemas de hidrogel²²⁹</p> <p>Aumentar da formação e deposição de estruturas de cálcio em nanocompósitos.²³⁰⁻²³²</p> <p>Reduzir da densidade de células inflamatórias e aumento do tecido conjuntivo nas matrizes polímero/SWCNT.²³³</p> <p>Aumentar o módulo de compressão, módulo de flexão, e resistência à flexão dos nanocompósitos polímero/SWCNT.^{234, 235}</p>
Grafenos	<p>Aumentar a proliferação celular do tecido ósseo (nanocompósitos G/Au/HA).²³⁶</p> <p>Incrementar das propriedades mecânicas e biocompatibilidade em nanocompósitos polímero/GO.²³⁷</p> <p>Estimular para crescimento de osteoblastos em matrizes de quitosano/GO²³⁸</p> <p>Aumentar da bioatividade em nanocompósitos CaCO₃/GO para regeneração óssea.²³⁹</p> <p>Acelerar a diferenciação celular em células ósseas.^{240, 241}</p>

1.2.5.1.1 Nanocompósitos de PMMA para cimentos ósseos

A evolução dos materiais compósitos de PMMA nos últimos anos tem sido significativa sendo um dos fatores relevantes para o desenvolvimento, os progressos realizados na área da nanotecnologia. Neste contexto, pequenas adições de nanopartículas inorgânicas ao cimento ósseo à base de PMMA, tais como, hidroxiapatite (HA),²⁴² dióxido de titânio,²⁴³ alumina²⁴⁴ e sulfato de bário²⁴⁵ permitiram uma melhoria das propriedades mecânicas e/ou biocompatibilidade. Por outro lado, pequenas adições de nanopartículas, como por exemplo de óxido de magnésio, permitiram aumentar a condutividade térmica do cimento diminuindo o risco de necroses térmicas dos tecidos vivos.²⁴⁶

A adição de HA à matriz de PMMA é feita com o intuito de promover a osteointegração. Sendo a nano-HA o componente inorgânico maioritário na estrutura do osso, é expectável que a sua presença numa matriz polimérica facilite a integração óssea. No entanto, um dos problemas da adição de nano-HA ao PMMA prende-se com a dificuldade de dispersão das nanopartículas na matriz polimérica, o que dificulta a obtenção de materiais homogêneos.²⁴⁷ Nesse sentido alguns autores optaram pela modificação superficial da HA com unidades monoméricas de MMA, tirando partido dos seus grupos hidroxilo livres.^{247, 248} As nanopartículas revestidas por uma camada de polímero são consideravelmente mais estáveis contra agregação, devido ao facto de que a sua energia de superfície ser bastante mais reduzida em comparação com nanopartículas não modificadas HA.²⁴⁹ No entanto, a modificação da superfície deve satisfazer diversos requisitos, por exemplo, a não toxicidade, a biocompatibilidade e não provocar alterações das propriedades físico-químicas ou biológicas. Por outro lado, foram também desenvolvidos novos métodos de processamento de nanocompósitos de PMMA-nanoHA que permitiram a obtenção de materiais bastante homogêneos.

Os CNTs têm sido de relevante interesse para o desenvolvimento de novos nanocompósitos de PMMA para aplicações como cimento ósseo.³⁰ Contudo, de forma a tirar total partido dos CNTs é necessário primeiro garantir a sua distribuição uniforme na matriz polimérica e segundo maximizar o nível de interações entre o reforço e a matriz.²¹⁸ A interface CNT/polímero é um parâmetro crítico para o tempo de vida do cimento ósseo pois permite controlar a transferência de cargas da matriz para os nanotubos e assim aliviar as tensões induzidas pelo movimento.

Por forma a melhorar a dispersão e integração dos CNTs na matriz de PMMA tem-se recorrido especialmente a dois tipos de funcionalização superficial, com grupos carboxílicos (CNT-COOH) ou grupos amina (CNT-NH₂).^{213, 250, 251} Os resultados obtidos demonstraram que os nanocompósitos com CNTs modificados com grupos carboxílicos

apresentam melhores propriedades mecânicas. Estes resultados foram atribuídos ao facto de o grau de funcionalização dos CNTs com grupos amina ser inferior, o que promove uma menor dispersão/interação dos CNTs com a matriz de PMMA.

Vários trabalhos têm demonstrado as enormes potencialidades a nível mecânico e de condutividade térmica pela incorporação de CNTs em matrizes de PMMA,^{211, 213, 218, 250} contudo nem todos têm relevância do ponto de vista clínico pois o seu processamento exige o uso de temperaturas elevadas.^{211, 218}

Com o objetivo já referido anteriormente de melhorar as formulações de cimentos ósseos aumentando a bioatividade e simultaneamente as propriedades mecânicas, foi desenvolvido um nanocompósito para cimento ósseo com base numa matriz PMMA/HA (1/2) reforçada com CNTs.²⁵² Neste trabalho demonstrou-se que a utilização de pequenas concentrações de CNTs funcionalizados com grupos carboxílicos (0,1 %m/m) melhorou de forma significativa as propriedades mecânicas do cimento ósseo.

Neste trabalho a mistura homogénea dos três componentes revelou-se fundamental para a obtenção de boas propriedades mecânicas do nanocompósito, para tal usou-se a técnica de granulação por congelamento. Com recurso a esta metodologia conseguiu-se uma boa homogeneização da mistura. As imagens de SEM (Figura 1.28) mostram a morfologia superficial dos nanocompósitos com 0,1% (m/m) de CNTs. Através de uma análise detalhada das imagens pode-se verificar uma perfeita integração dos três componentes: HA, PMMA e CNTs. Contudo com o aumento da concentração de CNTs na matriz polimérica verificou-se uma agregação dos mesmos, provocando zonas de defeito o que resultou num decréscimo das propriedades mecânicas.

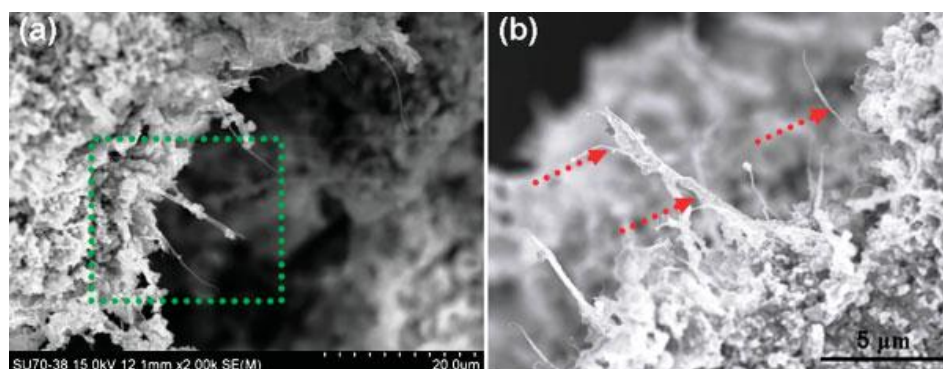


Figura 1.28 Imagens de SEM mostrando a morfologia superficial do nanocompósito (CNTs–PMMA/HA) a diferentes ampliações. A seta vermelha mostra a interação entre os CNTs e a matriz PMMA/HA.²⁵²

Os espectros de Raman realizados demonstraram que existe uma interação química entre os grupos carboxílicos dos CNTs (-COOH) e os grupos éster (-C=O) do PMMA.

Para verificar a resistência do novo nanocompósito na fixação de próteses metálicas foram realizados alguns testes de fadiga em ossos artificiais (Figura 1.29). Após os ensaios com 1 milhão de ciclos, o nanocompósito de composição 0,1%CNTs–PMMA/HA não apresentava qualquer sinal de degradação do cimento ósseo (Figura 1.29 a) e b)). Contudo quando os mesmos ensaios foram repetidos nos cimentos apenas com PMMA verificou-se claramente a presença de pequenas fissuras (Figura 1.29 c) e d)), o que é indicativo da menor resistência à fadiga do material sem aditivos.

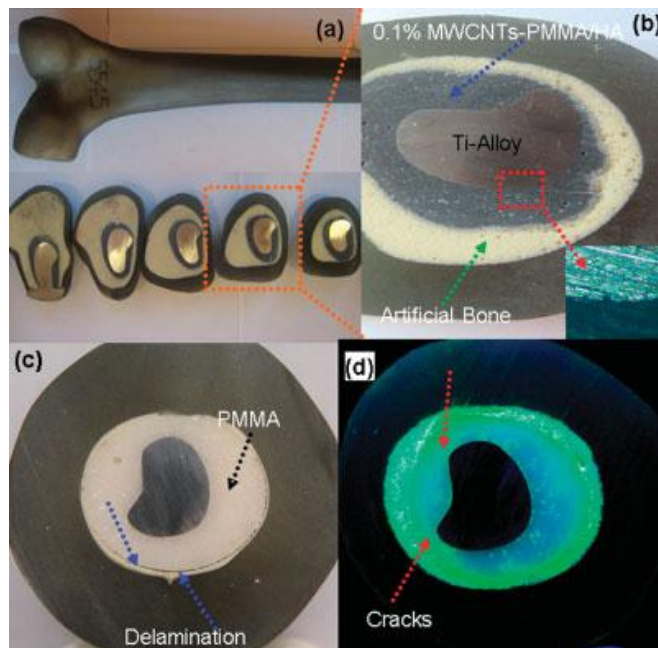


Figura 1.29 Imagens reais do nanocompósito 0.1%CNTs-PMMA/HA na interface com prótese de titânio após testes de fadiga com 1 milhão de ciclos a) e b). Imagem real c) e de microscópio ótico d) de PMMA comercial mostrando as fissuras na matriz de PMMA após teste de fadiga com um milhão de ciclos.²⁵²

Os estudos *in vitro* preliminares demonstraram que os substratos do material nanocompósito 0,1%CNTs-PMMA/HA favoreceram o crescimento e proliferação celular não apresentando qualquer nível de toxicidade.²²² Estes resultados, embora preliminares, mostram claramente que a formulação de cimento ósseo reforçado com CNTs poderá apresentar potencialidades para aplicação médica.

1.3 Objetivos

Tendo por base a ordem de grandeza dos casos clínicos na área ortopédica relatados anteriormente e através da identificação de algumas limitações detetadas na utilização clínica dos biomateriais disponíveis, o trabalho de investigação da presente tese foi direcionado no sentido de contribuir para a criação de um novo conceito de biomaterial para aplicações biomédicas, mais precisamente para a aplicação como cimento ósseo em implantes ortopédicos, tendo em consideração os mais recentes avanços da ciência.

O presente projeto pretende explorar as potencialidades e a relevância que a nanotecnologia tem vindo a evidenciar nos nossos dias para a melhoria do desempenho de cimentos ósseos no corpo humano. Os novos bionanocompósitos a desenvolver baseiam-se em sistemas trifásicos: Polimetilmetacrilato (PMMA)/Hidroxiapatite (HA)/nanoestruturas de carbono.

O PMMA foi descoberto na década de 60 e continua até hoje a ser um dos materiais mais utilizados como cimento ósseo, no entanto sendo um material bioinerte compromete a interface cimento/osso, diminuindo o tempo de vida da prótese.

A HA é o principal constituinte inorgânico dos ossos e dentes, como tal a HA sintética tem recebido uma atenção crescente como material para implante ósseo, pela sua capacidade em estabelecer ligações químicas com os tecidos ósseos. No entanto a utilização de implantes cerâmicos de HA em zonas de carga elevada não é possível devido à fraca resistência mecânica destes materiais. A HA pode no entanto ser usada como aditivo em materiais compósitos conferindo-lhes a capacidade de interagirem com os tecidos vivos circundantes e promoverem a osseointegração.

O GO tem vindo a ser estudado como agente de reforço em matrizes poliméricas apresentando resultados bastante promissores ao nível das propriedades mecânicas e biocompatibilidade. Neste contexto faz todo o sentido utilizar esta nanoestrutura de carbono como agente de reforço da matriz PMMA/HA de modo a melhorar o seu comportamento mecânico.

De uma maneira geral os objetivos deste trabalho centram-se nos seguintes pontos:

- (I) Desenvolver de metodologias eficientes para a síntese de folhas de GO de elevada qualidade. Otimizar o processo de síntese do GO a partir da esfoliação química da grafite de modo a obter GO uniforme quanto ao número de camadas e em larga escala. Explorar a funcionalização do GO através do crescimento controlado de cadeias de PMMA na sua superfície por forma a melhorar a integração destas nanoestruturas com a matriz de polímero (PMMA).

- (II) Obter uma dispersão homogênea da fase nano no sistema PMMA/HA (1:2) garantindo assim propriedades uniformes em todo o compósito e promovendo uma boa interação interfacial entre todos os elementos da mistura, de forma a atingir um nível adequado de transferência de tensão.
- (III) Avaliar o comportamento mecânico dos nanocompósitos à base de PMMA/HA reforçados com nanoestruturas de carbono através de testes mecânicos descritos na norma europeia ISO 5833 de 2002 para a validação mecânica das novas composições para aplicações como cimentos ósseos.
- (IV) Analisar a bioatividade dos diferentes materiais nanocompósitos através do estudo do processo de mineralização por incubação em SBF. Avaliar a biocompatibilidade dos diversos nanocompósitos por incubação *in vitro* com células Fibroblastos L929 e Osteoblastos Saos-2 através da análise de diversos parâmetros celulares: proliferação, viabilidade, morfologia e apoptose.

1.4 Referências

1. J. Currey, *Bones: structure and mechanics*. Princeton University Press: New Jersey, 2002.
2. W. H. FS Kaplan, TM Keaveny, A Boskey, TA Einhorn, JP Lannotti, *Orthopedic Basic Science*. American Academy of Orthopedic Surgeons: Rosemont, 1994.
3. Y. Fung, *Biomechanics: Mechanical properties of living tissue*. Springer-Verlag: New York, 1993.
4. L. L. Hench, "Biomaterials" *Science* 1980, 208, (4446), 826-831.
5. N. Huebsch, D. J. Mooney, "Inspiration and application in the evolution of biomaterials" *Nature* 2009, 462, (7272), 426-432.
6. D. F. Williams, *Progress in Biomedical Engineering (Proceedings of a consensus conference of the European Society for Biomaterials)*. Elsevier: Amsterdam, 1987; Vol. 4.
7. L. L. Hench, J. M. Polak, "Third-generation biomedical materials" *Science* 2002, 295, (5557), 1014-1017.
8. A. Paula. Reações de superfície de cerâmicos de fosfato de cálcio em plasma simulado. Universidade de Aveiro, Aveiro, 2003.
9. M. Navarro, A. Michiardi, O. Castano, J. A. Planell, "Biomaterials in orthopaedics" *J. Soc. Interface* 2008, 5, (27), 1137-1158.
10. D. W. Hutmacher, "Scaffold design and fabrication technologies for engineering tissues - state of the art and future perspectives" *J. Biomat. Sci-Polym E*. 2001, 12, (1), 107-124.
11. J. S. Temenoff, A. G. Mikos, "Review: tissue engineering for regeneration of articular cartilage" *Biomaterials* 2000, 21, (5), 431-440.
12. C. M. Agrawal, R. B. Ray, "Biodegradable polymeric scaffolds for musculoskeletal tissue engineering" *J. Biomed. Mater. Res*. 2001, 55, (2), 141-150.
13. N. Butoescu, O. Jordan, E. Doelker, "Intra-articular drug delivery systems for the treatment of rheumatic diseases: A review of the factors influencing their performance" *Eur. J. Pharm. Biopharma*. 2009, 73, (2), 205-218.
14. T. Albrektsson, C. Johansson, "Osteoinduction, osteoconduction and osseointegration" *Eur. Spine J*. 2001, 10, S96-S101.
15. H. M. Frost, "The biology of fracture –healing – An overview for clinicians.1" *Clin. Orthop. Relat. R*. 1989, (248), 283-293.
16. H. M. Frost, "The biology of fracture-healing – An overview for clinicians.2" *Clin. Orthop. Relat. R*. 1989, (248), 294-309.

17. J. Charnley, "Anchorage of the femoral head prosthesis to the shaft of the femur" *J. Bone Joint Surg. Br.* 1960, 42, (1), 28-30.
18. J. C. J. Webb, R. F. Spencer, "The role of polymethylmethacrylate bone cement in modern orthopaedic surgery" *J. Bone Joint Surg. Br.* 2007, 89B, (7), 851-857.
19. T. D. Yaszemski MJ, Lewandrowski K, Hasirci V, Altobelli DE, Wise DL, *Biomaterials in orthopedics.* Marcel Dekker: New York, 2004.
20. T. Endogan, K. Serbetci, N. Hasirci, "Effects of Ingredients on Thermal and Mechanical Properties of Acrylic Bone Cements" *J. Appl. Polym. Sci.* 2009, 113, (6), 4077-4084.
21. A. Maffezzoli, D. Ronca, G. Guida, I. Pochini, L. Nicolais, "In-situ polymerization behaviour of bone cements" *J. Mater. Sci-Mater. M.* 1997, 8, (2), 75-83.
22. N. J. Dunne, J. F. Orr, "Curing characteristics of acrylic bone cement" *J. Mater. Sci-Mater. M.* 2002, 13, (1), 17-22.
23. I. Rehman, E. J. Harper, W. Bonfield, "In situ analysis of the degree of polymerization of bone cement by using FT-Raman spectroscopy" *Biomaterials* 1996, 17, (16), 1615-1619.
24. C. Hagan, J. Orr, C. Mitchell, N. Dunne, "Real time monitoring of the polymerisation of PMMA bone cement using Raman spectroscopy" *J. Mater. Sci-Mater. Med.* 2009, 20(12)2427-2431.
25. S. M. Kenny, M. Buggy, "Bone cements and fillers: A review" *J. Mater. Sci-Mater M.* 2003, 14, (11), 923-938.
26. *ISO 5833 (International organisation for standards), Geneva, 2002.*
27. *ASTM Standard F-451 (Standard specification for acrylic bone cement), West Conshohocken, 2000.*
28. P. A. Leggat, D. R. Smith, U. Kedjarune, "Surgical Applications of Methyl Methacrylate: A Review of Toxicity" *Arch. Environ. Occup. H.* 2009, 64, (3), 207-212.
29. D. C. Rui L R, *Polymer based systems on tissue engineering, replacement and regeneration.* Kluwer Academic Publishers: Alvor, 2001; Vol. 86.
30. N. D. a. R. W. Ormsby, Carbon Nanotubes - Growth and Applications. In *MWCNT Used in Orthopaedic Bone Cements*, InTech: 2011.
31. K. Y. Huang, J. J. Yan, R. M. Lin, "Histopathologic findings of retrieved specimens of vertebroplasty with polymethylmethacrylate cement - Case control study" *Spine* 2005, 30, (19), E585-E588.
32. M. Stanczyk, B. van Rietbergen, "Thermal analysis of bone cement polymerisation at the cement-bone interface" *J. Biomech.* 2004, 37, (12), 1803-1810.

33. C. I. Vallo, T. R. Cuadrado, P. M. Frontini, "Mechanical and fracture behaviour evaluation of commercial acrylic bone cements" *Polym. Int.* 1997, 43, (3), 260-268.
34. G. Lewis, S. I. Janna, "Effect of fabrication pressure on the fatigue performance of Cemex XL acrylic bone cement" *Biomaterials* 2004, 25, (7-8), 1415-1420.
35. J. F. Orr, N. J. Dunne, J. C. Quinn, "Shrinkage stresses in bone cement" *Biomaterials* 2003, 24, (17), 2933-2940.
36. G. Lewis, "Fatigue testing and performance of acrylic bone-cement materials: State-of-the-art review" *J. Biomed. Mater. Res. B* 2003, 66B, (1), 457-486.
37. G. Lewis, "Properties of acrylic bone cement: State of the art review" *J. Biomed. Mater. Res.* 1997, 38, (2), 155-182.
38. S. M. Kurtz, M. L. Villarraga, K. Zhao, A. A. Edidin, "Static and fatigue mechanical behavior of bone cement with elevated barium sulfate content for treatment of vertebral compression fractures" *Biomaterials* 2005, 26, (17), 3699-3712.
39. M. Jasty, W. J. Maloney, C. R. Bragdon, D. O. Oconnor, T. Haire, W. H. Harris, "The initiation of failure in cemented femoral components of the hip arthroplasties" *J. Bone Joint Surg-Br.* 1991, 73, (4), 551-558.
40. N. E. Bishop, S. Ferguson, S. Tepic, "Porosity reduction in bone cement at the cement-stem interface" *J. Bone Joint Surg-Br.* 1996, 78B, (3), 349-356.
41. B. A. O. McCormack, P. J. Prendergast, "Microdamage accumulation in the cement layer of hip replacements under flexural loading" *J. Biomech.* 1999, 32, (5), 467-475.
42. P. J. Prendergast, The functional performance of orthopaedic bone cement. In *Functional Biomaterials*, Katsube, N. S. W. O. S. M., Ed. 2001; 198-1, 291-299.
43. B. P. Murphy, P. J. Prendergast, "The relationship between stress, porosity, and nonlinear damage accumulation in acrylic bone cement" *J. Biomed. Mater. Res.* 2002, 59, (4), 646-654.
44. W. H. Harris, "Osteolysis and particle disease in Hip-replacement - A review" *Acta Orthop. S.* 1994, 65, (1), 113-123.
45. W. F. Mousa, M. Kobayashi, S. Shinzato, M. Kamimura, M. Neo, S. Yoshihara, T. Nakamura, "Biological and mechanical properties of PMMA-based bioactive bone cements" *Biomaterials* 2000, 21, (21), 2137-2146.
46. M. Kamimura, J. Tamura, S. Shinzato, K. Kawanabe, M. Neo, T. Kokubo, T. Nakamura, "Interfacial tensile strength between polymethylmethacrylate-based bioactive bone cements and bone" *J. Biomed. Mater. Res.* 2002, 61, (4), 564-571.

47. M. J. Dalby, L. Di Silvio, E. J. Harper, W. Bonfield, "In vitro evaluation of a new polymethylmethacrylate cement reinforced with hydroxyapatite" *J. Mater. Sci-Mater M.* 1999, 10, (12), 793-796.
48. G. Koller, J. Roether, K. Bruce, S. Deb, "Antimicrobial potential of bioactive bone cements" *J. Appl. Biomater. Biom.* 2008, 6, (1), 16-22.
49. S. Shinzato, M. Kobayashi, W. F. Mousa, M. Kamimura, M. Neo, Y. Kitamura, T. Kokubo, T. Nakamura, "Bioactive polymethyl methacrylate-based bone cement: Comparison of glass beads, apatite- and wollastonite-containing glass-ceramic, and hydroxyapatite fillers on mechanical and biological properties" *J. Biomed. Mater. Res.* 2000, 51, (2), 258-272.
50. S. B. Kim, Y. J. Kim, T. R. Yoon, S. A. Park, I. H. Cho, E. J. Kim, I. A. Kim, J. W. Shin, "The characteristics of a hydroxyapatite-chitosan-PMMA bone cement" *Biomaterials* 2004, 25, (26), 5715-5723.
51. K. T. Chu, Y. Oshida, E. B. Hancock, M. J. Kowolik, T. Barco, S. L. Zunt, "Hydroxyapatite/PMMA composites as bone cements" *Bio-Med. Mater. Eng.* 2004, 14, (1), 87-105.
52. T. G. Tihan, M. D. Ionita, R. G. Popescu, D. Iordachescu, "Effect of hydrophilic-hydrophobic balance on biocompatibility of poly(methyl methacrylate) (PMMA)-hydroxyapatite (HA) composites" *Mater. Chem. Phys.* 2009, 118, (2-3), 265-269.
53. D. Neut, O. S. Kluin, J. Thompson, H. C. van der Mei, H. J. Busscher, "Gentamicin release from commercially-available gentamicin-loaded PMMA bone cements in a prosthesis-related interfacial gap model and their antibacterial efficacy" *Bmc Musculoskeletal Dis.* 2010, 11.
54. K. Anagnostakos, J. Kelm, "Enhancement of Antibiotic Elution From Acrylic Bone Cement" *J. Biomed. Mater. Res. B* 2009, 90B, (1), 467-475.
55. M. Baleani, L. Cristofolini, C. Minari, A. Toni, "Fatigue strength of PMMA bone cement mixed with gentamicin and barium sulphate vs pure PMMA" *P. I. Mech. Eng.H* 2003, 217, (H1), 9-12.
56. R. M. Pilliar, R. Blackwell, I. Macnab, H. U. Cameron, "Carbon fiber-reinforced bone cement in orthopedic surgery" *J. Biomed. Mater. Res.* 1976, 10, (6), 893-906.
57. R. P. Robinson, T. M. Wright, A. H. Burstein, "Mechanical-properties of Poly(methyl Methacrylate) bone cements" *J. Biomed. Mater. Res.* 1981, 15, (2), 203-208.
58. T. M. Wright, R. P. Robinson, "Fatigue crack-propagation in polymethylmethacrylate bone cements" *J. Mater. Sci.* 1982, 17, (9), 2463-2468.
59. S. Pal, S. Saha, "Stress-relaxation and creep-behavior of normal and carbon-fiber reinforced acrylic bone-cement" *Biomaterials* 1982, 3, (2), 93-96.

60. S. Saha, S. Pal, "Mechanical characterization of commercially made Carbon-Fiber-Reinforced Polymethylmethacrylate" *J. Biomed. Mater. Res.* 1986, 20, (6), 817-826.
61. J. M. Yang, P. Y. Huang, M. C. Yang, S. K. Lo, "Effect of MMA-g-UHMWPE grafted fiber on mechanical properties of acrylic bone cement" *Journal of Biomedical Materials Research* 1997, 38, (4), 361-369.
62. K. K. Narva, L. V. J. Lassila, P. K. Vallittu, "Flexural fatigue of denture base polymer with fiber-reinforced composite reinforcement" *Compos. Part A-Appl. S.* 2005, 36, (9), 1275-1281.
63. L. D. T. Topoleski, P. Ducheyne, J. M. Cuckler, "Flow intrusion characteristics and fracture properties of titanium-fibre-reinforced bone cement" *Biomaterials* 1998, 19, (17), 1569-1577.
64. S. P. Kotha, C. Li, P. McGinn, S. R. Schmid, J. J. Mason, "Improved mechanical properties of acrylic bone cement with short titanium fiber reinforcement" *J. Mater Sci-Mater. M.* 2006, 17, (12), 1403-1409.
65. S. P. Kotha, C. Li, S. R. Schmid, J. J. Mason, "Fracture toughness of steel-fiber-reinforced bone cement" *J. Biomed. Mater. Res. A* 2004, 70A, (3), 514-521.
66. M. S. Dresselhaus, P. T. Araujo, "Perspectives on the 2010 Nobel Prize in Physics for Graphene" *ACS Nano* 2010, 4, (11), 6297-6302.
67. H. W. Kroto, J. R. Heath, S. C. O'Brien, R. F. Curl, R. E. Smalley, "C-60 - Buckminsterfullerene" *Nature* 1985, 318, (6042), 162-163.
68. S. Iijima, T. Ichihashi, "Single-shell carbon nanotubes of 1-nm diameter" *Nature* 1993, 363, (6430), 603-605.
69. K. S. Novoselov, A. K. Geim, S. V. Morozov, D. Jiang, Y. Zhang, S. V. Dubonos, I. V. Grigorieva, A. A. Firsov, "Electric field effect in atomically thin carbon films" *Science* 2004, 306, (5296), 666-669.
70. D. R. Dreyer, R. S. Ruoff, C. W. Bielawski, "From Conception to Realization: An Historical Account of Graphene and Some Perspectives for Its Future" *Angew. Chem. Int. Ed.* 2010, 49, (49), 9336-9344.
71. D. C. Wei, Y. Q. Liu, "Controllable Synthesis of Graphene and Its Applications" *Adv. Mater.* 2010, 22, (30), 3225-3241.
72. Y. W. Zhu, S. Murali, W. W. Cai, X. S. Li, J. W. Suk, J. R. Potts, R. S. Ruoff, "Graphene and Graphene Oxide: Synthesis, Properties, and Applications" *Adv. Mater.* 2010, 22, (35), 3906-3924.
73. W. Pisula, X. L. Feng, K. Mullen, "Charge-Carrier Transporting Graphene-Type Molecules" *Chem. Mater.* 2011, 23, (3), 554-567.

74. M. Muller, C. Kubel, K. Mullen, "Giant polycyclic aromatic hydrocarbons" *Chem-Eur. J.* 1998, 4, (11), 2099-2109.
75. N. Tyutyulkov, G. Madjarova, F. Dietz, K. Mullen, "Is 2-D graphite an ultimate large hydrocarbon? 1. Energy spectra of giant polycyclic aromatic hydrocarbons" *J. Phys. Chem. B* 1998, 102, (50), 10183-10189.
76. X. Y. Yang, X. Dou, A. Rouhanipour, L. J. Zhi, H. J. Rader, K. Mullen, "Two-dimensional graphene nanoribbons" *J. Am. Chem. Soc.* 2008, 130, (13), 4216-4217.
77. J. S. Wu, W. Pisula, K. Mullen, "Graphenes as potential material for electronics" *Chem. Rev.* 2007, 107, (3), 718-747.
78. L. J. Zhi, K. Mullen, "A bottom-up approach from molecular nanographenes to unconventional carbon materials" *J. Mater. Chem.* 2008, 18, (13), 1472-1484.
79. K. S. Kim, Y. Zhao, H. Jang, S. Y. Lee, J. M. Kim, J. H. Ahn, P. Kim, J. Y. Choi, B. H. Hong, "Large-scale pattern growth of graphene films for stretchable transparent electrodes" *Nature* 2009, 457, (7230), 706-710.
80. A. Reina, X. T. Jia, J. Ho, D. Nezich, H. B. Son, V. Bulovic, M. S. Dresselhaus, J. Kong, "Large Area, Few-Layer Graphene Films on Arbitrary Substrates by Chemical Vapor Deposition" *Nano Lett.* 2009, 9, (1), 30-35.
81. X. S. Li, W. W. Cai, J. H. An, S. Kim, J. Nah, D. X. Yang, R. Piner, A. Velamakanni, I. Jung, E. Tutuc, S. K. Banerjee, L. Colombo, R. S. Ruoff, "Large-Area Synthesis of High-Quality and Uniform Graphene Films on Copper Foils" *Science* 2009, 324, (5932), 1312-1314.
82. S. J. Chae, F. Gunes, K. K. Kim, E. S. Kim, G. H. Han, S. M. Kim, H. J. Shin, S. M. Yoon, J. Y. Choi, M. H. Park, C. W. Yang, D. Pribat, Y. H. Lee, "Synthesis of Large-Area Graphene Layers on Poly-Nickel Substrate by Chemical Vapor Deposition: Wrinkle Formation" *Adv. Mater.* 2009, 21, (22), 2328-+.
83. A. Reina, S. Thiele, X. T. Jia, S. Bhaviripudi, M. S. Dresselhaus, J. A. Schaefer, J. Kong, "Growth of Large-Area Single- and Bi-Layer Graphene by Controlled Carbon Precipitation on Polycrystalline Ni Surfaces" *Nano Res.* 2009, 2, (6), 509-516.
84. D. C. Wei, Y. Q. Liu, H. L. Zhang, L. P. Huang, B. Wu, J. Y. Chen, G. Yu, "Scalable Synthesis of Few-Layer Graphene Ribbons with Controlled Morphologies by a Template Method and Their Applications in Nanoelectromechanical Switches" *J. Am. Chem. Soc.* 2009, 131, (31), 11147-11154.
85. K. S. Subrahmanyam, L. S. Panchakarla, A. Govindaraj, C. N. R. Rao, "Simple Method of Preparing Graphene Flakes by an Arc-Discharge Method" *J. Phys. Chem. C* 2009, 113, (11), 4257-4259.

86. C. N. R. Rao, A. K. Sood, K. S. Subrahmanyam, A. Govindaraj, "Graphene: The New Two-Dimensional Nanomaterial" *Angew. Chem. Int. Ed.* 2009, 48, (42), 7752-7777.
87. I. Levchenko, O. Volotskova, A. Shashurin, Y. Raitses, K. Ostrikov, M. Keidar, "The large-scale production of graphene flakes using magnetically-enhanced arc discharge between carbon electrodes" *Carbon* 2010, 48, (15), 4570-4574.
88. O. Volotskova, I. Levchenko, A. Shashurin, Y. Raitses, K. Ostrikov, M. Keidar, "Single-step synthesis and magnetic separation of graphene and carbon nanotubes in arc discharge plasmas" *Nanoscale* 2010, 2, (10), 2281-2285.
89. Y. P. Wu, B. Wang, Y. F. Ma, Y. Huang, N. Li, F. Zhang, Y. S. Chen, "Efficient and large-scale synthesis of few-layered graphene using an arc-discharge method and conductivity studies of the resulting films" *Nano Res.* 2010, 3, (9), 661-669.
90. E. Rollings, G. H. Gweon, S. Y. Zhou, B. S. Mun, J. L. McChesney, B. S. Hussain, A. Fedorov, P. N. First, W. A. de Heer, A. Lanzara, "Synthesis and characterization of atomically thin graphite films on a silicon carbide substrate" *J. Phys. Chem. Solids* 2006, 67, (9-10), 2172-2177.
91. W. A. de Heer, C. Berger, X. S. Wu, P. N. First, E. H. Conrad, X. B. Li, T. B. Li, M. Sprinkle, J. Hass, M. L. Sadowski, M. Potemski, G. Martinez, "Epitaxial graphene" *Solid State Commun.* 2007, 143, (1-2), 92-100.
92. Z. H. Ni, W. Chen, X. F. Fan, J. L. Kuo, T. Yu, A. T. S. Wee, Z. X. Shen, "Raman spectroscopy of epitaxial graphene on a SiC substrate" *Phys. Rev. B* 2008, 77, (11).
93. P. W. Sutter, J. I. Flege, E. A. Sutter, "Epitaxial graphene on ruthenium" *Nat. Mater.* 2008, 7, (5), 406-411.
94. M. Sprinkle, P. Soukiassian, W. A. de Heer, C. Berger, E. H. Conrad, "Epitaxial graphene: the material for graphene electronics" *Phys. Status Solidi-R.* 2009, 3, (6), A91-A94.
95. S. Stankovich, R. D. Piner, X. Q. Chen, N. Q. Wu, S. T. Nguyen, R. S. Ruoff, "Stable aqueous dispersions of graphitic nanoplatelets via the reduction of exfoliated graphite oxide in the presence of poly(sodium 4-styrenesulfonate)" *J. Mater. Chem.* 2006, 16, (2), 155-158.
96. S. Stankovich, D. A. Dikin, G. H. B. Dommett, K. M. Kohlhaas, E. J. Zimney, E. A. Stach, R. D. Piner, S. T. Nguyen, R. S. Ruoff, "Graphene-based composite materials" *Nature* 2006, 442, (7100), 282-286.
97. S. Stankovich, D. A. Dikin, R. D. Piner, K. A. Kohlhaas, A. Kleinhammes, Y. Jia, Y. Wu, S. T. Nguyen, R. S. Ruoff, "Synthesis of graphene-based nanosheets via chemical reduction of exfoliated graphite oxide" *Carbon* 2007, 45, (7), 1558-1565.
98. D. Li, M. B. Muller, S. Gilje, R. B. Kaner, G. G. Wallace, "Processable aqueous dispersions of graphene nanosheets" *Nat. Nanotechnol.* 2008, 3, (2), 101-105.

99. S. Gilje, S. Han, M. Wang, K. L. Wang, R. B. Kaner, "A chemical route to graphene for device applications" *Nano Lett.* 2007, 7, (11), 3394-3398.
100. Y. Hernandez, V. Nicolosi, M. Lotya, F. M. Blighe, Z. Y. Sun, S. De, I. T. McGovern, B. Holland, M. Byrne, Y. K. Gun'ko, J. J. Boland, P. Niraj, G. Duesberg, S. Krishnamurthy, R. Goodhue, J. Hutchison, V. Scardaci, A. C. Ferrari, J. N. Coleman, "High-yield production of graphene by liquid-phase exfoliation of graphite" *Nat. Nanotechnol.* 2008, 3, (9), 563-568.
101. S. V. Morozov, K. S. Novoselov, M. I. Katsnelson, F. Schedin, D. C. Elias, J. A. Jaszczak, A. K. Geim, "Giant intrinsic carrier mobilities in graphene and its bilayer" *Phys. Rev. Lett.* 2008, 100, (1).
102. E. V. Castro, K. S. Novoselov, S. V. Morozov, N. M. R. Peres, J. Dos Santos, J. Nilsson, F. Guinea, A. K. Geim, A. H. C. Neto, "Biased bilayer graphene: Semiconductor with a gap tunable by the electric field effect" *Phys. Rev. Lett.* 2007, 99.
103. J. C. Meyer, A. K. Geim, M. I. Katsnelson, K. S. Novoselov, D. Obergfell, S. Roth, C. Girit, A. Zettl, "On the roughness of single- and bi-layer graphene membranes" *Solid State Commun.* 2007, 143, (1-2), 101-109.
104. J. Yan, E. A. Henriksen, P. Kim, A. Pinczuk, "Observation of anomalous phonon softening in bilayer graphene" *Phys. Rev. Lett.* 2008, 101, (13).
105. C. Gomez-Navarro, R. T. Weitz, A. M. Bittner, M. Scolari, A. Mews, M. Burghard, K. Kern, "Electronic transport properties of individual chemically reduced graphene oxide sheets" *Nano Lett.* 2007, 7, (11), 3499-3503.
106. B. Brodie, "Sur le poids atomique du graphite" *Ann. Chem. Phys.* 1860, (59), 466-471.
107. L. Staudenmaier, "Verfahren zur Darstellung der Graphitsaure" *Ber. Deut. Chem.* 1898, (31), 1481-1487.
108. W. S. Hummers, R. E. Offeman, "Preparation of graphitic oxide" *J. Am. Chem. Soc.* 1958, 80, (6), 1339-1339.
109. M. S. Dresselhaus, G. Dresselhaus, "Intercalation compounds of graphite" *Adv. in Phys.* 2002, 51, (1), 1-186.
110. H. A. Becerril, J. Mao, Z. Liu, R. M. Stoltenberg, Z. Bao, Y. Chen, "Evaluation of solution-processed reduced graphene oxide films as transparent conductors" *ACS Nano* 2008, 2, (3), 463-470.
111. J. I. Paredes, S. Villar-Rodil, A. Martinez-Alonso, J. M. D. Tascon, "Graphene oxide dispersions in organic solvents" *Langmuir* 2008, 24, (19), 10560-10564.
112. S. Cervený, F. Barroso-Bujans, A. Alegria, J. Colmenero, "Dynamics of Water Intercalated in Graphite Oxide" *J. Phys. Chem. C* 2010, 114, (6), 2604-2612.

113. M. Acik, C. Mattevi, C. Gong, G. Lee, K. Cho, M. Chhowalla, Y. J. Chabal, "The Role of Intercalated Water in Multilayered Graphene Oxide" *ACS Nano* 2010, 4, (10), 5861-5868.
114. G. Goncalves, P. Marques, C. M. Granadeiro, H. I. S. Nogueira, M. K. Singh, J. Gracio, "Surface Modification of Graphene Nanosheets with Gold Nanoparticles: The Role of Oxygen Moieties at Graphene Surface on Gold Nucleation and Growth" *Chem. Mater.* 2009, 21, (20), 4796-4802.
115. S. Park, R. S. Ruoff, "Chemical methods for the production of graphenes" *Nat. Nanotechnol.* 2009, 4, (4), 217-224.
116. U. Hofmann, R. Holst, "The acidic nature and the methylation of graphitoxide" *Berichte Der Deutschen Chemischen Gesellschaft* 1939, 72, 754-771.
117. G. Ruess, "U" ber das Graphitoxhydroxyd (Graphitoxyd)" *Monatsh. Chem.* 1946, 76, 381-417.
118. W. Scholz, H. P. Boehm, "Graphite oxide .6. Structure of graphite oxide" *Z. Anorg. Allg. Chem.* 1969, 369, (3-6), 327-332.
119. T. Nakajima, A. Mabuchi, R. Hagiwara, "A new struture model of graphite oxide" *Carbon* 1988, 26, (3), 357-361.
120. A. Lerf, H. Y. He, M. Forster, J. Klinowski, "Structure of graphite oxide revisited" *J. Phys. Chem. B* 1998, 102, (23), 4477-4482.
121. H. Y. He, J. Klinowski, M. Forster, A. Lerf, "A new structural model for graphite oxide" *Chem. Phys. Lett.* 1998, 287, (1-2), 53-56.
122. W. Gao, L. B. Alemany, L. J. Ci, P. M. Ajayan, "New insights into the structure and reduction of graphite oxide" *Nature Chem.* 2009, 1, (5), 403-408.
123. J. R. Lomeda, C. D. Doyle, D. V. Kosynkin, W. F. Hwang, J. M. Tour, "Diazonium Functionalization of Surfactant-Wrapped Chemically Converted Graphene Sheets" *J. Am. Chem. Soc.* 2008, 130, (48), 16201-16206.
124. V. C. Tung, M. J. Allen, Y. Yang, R. B. Kaner, "High-throughput solution processing of large-scale graphene" *Nat. Nanotechnol.* 2009, 4, (1), 25-29.
125. X. Du, I. Skachko, A. Barker, E. Y. Andrei, "Approaching ballistic transport in suspended graphene" *Nat. Nanotechnol.* 2008, 3, (8), 491-495.
126. G. X. Wang, J. Yang, J. Park, X. L. Gou, B. Wang, H. Liu, J. Yao, "Facile synthesis and characterization of graphene nanosheets" *J. Phys. Chem. C* 2008, 112, (22), 8192-8195.
127. Y. Si, E. T. Samulski, "Synthesis of water soluble graphene" *Nano Lett.* 2008, 8, (6), 1679-1682.

128. R. Muszynski, B. Seger, P. V. Kamat, "Decorating graphene sheets with gold nanoparticles" *J. Phys. Chem. C* 2008, 112, (14), 5263-5266.
129. J. L. Zhang, H. J. Yang, G. X. Shen, P. Cheng, J. Y. Zhang, S. W. Guo, "Reduction of graphene oxide via L-ascorbic acid" *Chem. Commun.* 2010, 46, (7), 1112-1114.
130. D. R. Dreyer, S. Murali, Y. Zhu, R. S. Ruoff, C. W. Bielawski, "Reduction of graphite oxide using alcohols" *J. Mater. Chem.* 2011.
131. C. Y. Su, Y. P. Xu, W. J. Zhang, J. W. Zhao, A. P. Liu, X. H. Tang, C. H. Tsai, Y. Z. Huang, L. J. Li, "Highly Efficient Restoration of Graphitic Structure in Graphene Oxide Using Alcohol Vapors" *ACS Nano* 2010, 4, (9), 5285-5292.
132. X. B. Fan, W. C. Peng, Y. Li, X. Y. Li, S. L. Wang, G. L. Zhang, F. B. Zhang, "Deoxygenation of Exfoliated Graphite Oxide under Alkaline Conditions: A Green Route to Graphene Preparation" *Adv. Mater.* 2008, 20, (23), 4490-4493.
133. M. Zhou, Y. L. Wang, Y. M. Zhai, J. F. Zhai, W. Ren, F. A. Wang, S. J. Dong, "Controlled Synthesis of Large-Area and Patterned Electrochemically Reduced Graphene Oxide Films" *Chem. Eur. J.* 2009, 15, (25), 6116-6120.
134. R. S. Sundaram, C. Gomez-Navarro, K. Balasubramanian, M. Burghard, K. Kern, "Electrochemical modification of graphene" *Adv. Mater.* 2008, 20, (16), 3050-3053.
135. Y. Y. Shao, J. Wang, M. Engelhard, C. M. Wang, Y. H. Lin, "Facile and controllable electrochemical reduction of graphene oxide and its applications" *J. Mater. Chem.* 2010, 20, (4), 743-748.
136. H. C. Schniepp, J. L. Li, M. J. McAllister, H. Sai, M. Herrera-Alonso, D. H. Adamson, R. K. Prud'homme, R. Car, D. A. Saville, I. A. Aksay, "Functionalized single graphene sheets derived from splitting graphite oxide" *J. Phys. Chem. B* 2006, 110, (17), 8535-8539.
137. M. J. McAllister, J. L. Li, D. H. Adamson, H. C. Schniepp, A. A. Abdala, J. Liu, M. Herrera-Alonso, D. L. Milius, R. Car, R. K. Prud'homme, I. A. Aksay, "Single sheet functionalized graphene by oxidation and thermal expansion of graphite" *Chem. Mater.* 2007, 19, (18), 4396-4404.
138. G. Williams, B. Seger, P. V. Kamat, "TiO₂-graphene nanocomposites. UV-assisted photocatalytic reduction of graphene oxide" *ACS Nano* 2008, 2, (7), 1487-1491.
139. H. Y. He, T. Riedl, A. Lerf, J. Klinowski, "Solid-state NMR studies of the structure of graphite oxide" *J. Phys. Chem.* 1996, 100, (51), 19954-19958.
140. A. Lerf, H. Y. He, T. Riedl, M. Forster, J. Klinowski, "C-13 and H-1 MAS NMR studies of graphite oxide and its chemically modified derivatives" *Solid State Ionics* 1997, 101, 857-862.

141. X. F. Gao, J. Jang, S. Nagase, "Hydrazine and Thermal Reduction of Graphene Oxide: Reaction Mechanisms, Product Structures, and Reaction Design" *J. Phys. Chem. C* 2010, 114, (2), 832-842.
142. D. R. Dreyer, S. Park, C. W. Bielawski, R. S. Ruoff, "The chemistry of graphene oxide" *Chem. Soc. Rev.* 2010, 39, (1), 228-240.
143. H. J. Shin, K. K. Kim, A. Benayad, S. M. Yoon, H. K. Park, I. S. Jung, M. H. Jin, H. K. Jeong, J. M. Kim, J. Y. Choi, Y. H. Lee, "Efficient Reduction of Graphite Oxide by Sodium Borohydride and Its Effect on Electrical Conductance" *Adv. Funct. Mater.* 2009, 19, (12), 1987-1992.
144. S. J. Kang, C. Kocabas, T. Ozel, M. Shim, N. Pimparkar, M. A. Alam, S. V. Rotkin, J. A. Rogers, "High-performance electronics using dense, perfectly aligned arrays of single-walled carbon nanotubes" *Nat. Nanotechnol.* 2007, 2, (4), 230-236.
145. V. H. Pham, T. V. Cuong, T.-D. Nguyen-Phan, H. D. Pham, E. J. Kim, S. H. Hur, E. W. Shin, S. Kim, J. S. Chung, "One-step synthesis of superior dispersion of chemically converted graphene in organic solvents" *Chem. Commun.* 2010, 46, (24), 4375-4377.
146. J. Che, L. Shen, Y. Xiao, "A new approach to fabricate graphene nanosheets in organic medium: combination of reduction and dispersion" *J. Mater. Chem.* 2010, 20, (9), 1722-1727.
147. H.-J. Shin, K. K. Kim, A. Benayad, S.-M. Yoon, H. K. Park, I.-S. Jung, M. H. Jin, H.-K. Jeong, J. M. Kim, J.-Y. Choi, Y. H. Lee, "Efficient Reduction of Graphite Oxide by Sodium Borohydride and Its Effect on Electrical Conductance" *Adv. Funct. Mater.* 2009, 19, (12), 1987-1992.
148. D. D. L. Chung, "Exfoliation of graphite" *J. Mater. Sci.* 1987, 22, (12), 4190-4198.
149. S. H. Anderson, D. D. L. Chung, "Exfoliation of intercalated graphite" *Carbon* 1984, 22, (3), 253-263.
150. H. P. Boehm, A. Clauss, G. O. Fischer, U. Hofmann, "Das adsorptionsverhalten sehr dunner kohlenstoff-folien" *Z. Anorg. Allg. Chem.* 1962, 316, (3-4), 119-127.
151. K. N. Kudin, B. Ozbas, H. C. Schniepp, R. K. Prud'homme, I. A. Aksay, R. Car, "Raman spectra of graphite oxide and functionalized graphene sheets" *Nano Lett.* 2008, 8, (1), 36-41.
152. C. Gomez-Navarro, J. C. Meyer, R. S. Sundaram, A. Chuvilin, S. Kurasch, M. Burghard, K. Kern, U. Kaiser, "Atomic Structure of Reduced Graphene Oxide" *Nano Lett.* 2010, 10, (4), 1144-1148.
153. M. Acik, G. Lee, C. Mattevi, A. Pirkle, R. M. Wallace, M. Chhowalla, K. Cho, Y. Chabal, "The Role of Oxygen during Thermal Reduction of Graphene Oxide Studied by Infrared Absorption Spectroscopy" *J. Phys. Chem. C* 2011, 115, (40), 19761-19781.

154. R. Larciprete, S. Fabris, T. Sun, P. Lacovig, A. Baraldi, S. Lizzit, "Dual Path Mechanism in the Thermal Reduction of Graphene Oxide" *J. Am. Chem. Soc.* 2011, 133, (43), 17315-17321.
155. C. Mattevi, G. Eda, S. Agnoli, S. Miller, K. A. Mkhoyan, O. Celik, D. Mostrogiovanni, G. Granozzi, E. Garfunkel, M. Chhowalla, "Evolution of Electrical, Chemical, and Structural Properties of Transparent and Conducting Chemically Derived Graphene Thin Films" *Adv. Funct. Mater.* 2009, 19, (16), 2577-2583.
156. A. K. Geim, K. S. Novoselov, "The rise of graphene" *Nat. Mater.* 2007, 6, (3), 183-191.
157. M. I. Katsnelson, "Graphene: carbon in two dimensions" *Mater. Today* 2007, 10, (1-2), 20-27.
158. A. H. Castro Neto, F. Guinea, N. M. R. Peres, K. S. Novoselov, A. K. Geim, "The electronic properties of graphene" *Rev. Mod. Phys.* 2009, 81, (1), 109-162.
159. S. Stankovich, R. D. Piner, S. T. Nguyen, R. S. Ruoff, "Synthesis and exfoliation of isocyanate-treated graphene oxide nanoplatelets" *Carbon* 2006, 44, (15), 3342-3347.
160. D. W. Boukhvalov, M. I. Katsnelson, "Chemical Functionalization of Graphene with Defects" *Nano Lett.* 2008, 8, (12), 4373-4379.
161. X. Jia, J. Campos-Delgado, M. Terrones, V. Meunier, M. S. Dresselhaus, "Graphene edges: a review of their fabrication and characterization" *Nanoscale* 2011, 3, (1), 86-95.
162. K. P. Loh, Q. L. Bao, P. K. Ang, J. X. Yang, "The chemistry of graphene" *J. Mater. Chem.* 2010, 20, (12), 2277-2289.
163. C. N. R. Rao, K. Biswas, K. S. Subrahmanyam, A. Govindaraj, "Graphene, the new nanocarbon" *J. Mater. Chem.* 2009, 19, (17), 2457-2469.
164. S. Park, J. H. An, I. W. Jung, R. D. Piner, S. J. An, X. S. Li, A. Velamakanni, R. S. Ruoff, "Colloidal Suspensions of Highly Reduced Graphene Oxide in a Wide Variety of Organic Solvents" *Nano Lett.* 2009, 9, (4), 1593-1597.
165. H. F. Yang, F. H. Li, C. S. Shan, D. X. Han, Q. X. Zhang, L. Niu, A. Ivaska, "Covalent functionalization of chemically converted graphene sheets via silane and its reinforcement" *J. Mater. Chem.* 2009, 19, (26), 4632-4638.
166. S. F. Hou, S. J. Su, M. L. Kasner, P. Shah, K. Patel, C. J. Madarang, "Formation of highly stable dispersions of silane-functionalized reduced graphene oxide" *Chem. Phys. Lett.* 2010, 501, (1-3), 68-74.
167. S. Niyogi, E. Bekyarova, M. E. Itkis, J. L. McWilliams, M. A. Hamon, R. C. Haddon, "Solution properties of graphite and graphene" *J. Am. Chem. Soc.* 2006, 128, (24), 7720-7721.

- 168.** X. D. Zhuang, Y. Chen, G. Liu, P. P. Li, C. X. Zhu, E. T. Kang, K. G. Neoh, B. Zhang, J. H. Zhu, Y. X. Li, "Conjugated-Polymer-Functionalized Graphene Oxide: Synthesis and Nonvolatile Rewritable Memory Effect" *Adv. Mater.* 2010, 22, (15), 1731-1735.
- 169.** N. Karousis, S. P. Economopoulos, E. Sarantopoulou, N. Tagmatarchis, "Porphyrin counter anion in imidazolium-modified graphene-oxide" *Carbon* 2010, 48, (3), 854-860.
- 170.** X. Zhang, Y. Huang, Y. Wang, Y. Ma, Z. Liu, Y. Chen, "Synthesis and characterization of a graphene-C60 hybrid material" *Carbon* 2009, 47, (1), 334-337.
- 171.** Z. B. Liu, Y. F. Xu, X. Y. Zhang, X. L. Zhang, Y. S. Chen, J. G. Tian, "Porphyrin and Fullerene Covalently Functionalized Graphene Hybrid Materials with Large Nonlinear Optical Properties" *J. Phys. Chem. B* 2009, 113, (29), 9681-9686.
- 172.** Z. Liu, J. T. Robinson, X. M. Sun, H. J. Dai, "PEGylated nanographene oxide for delivery of water-insoluble cancer drugs" *J. Am. Chem. Soc.* 2008, 130, (33), 10876-10877.
- 173.** L. M. Veca, F. S. Lu, M. J. Mezziani, L. Cao, P. Y. Zhang, G. Qi, L. W. Qu, M. Shrestha, Y. P. Sun, "Polymer functionalization and solubilization of carbon nanosheets" *Chem. Commun.* 2009, (18), 2565-2567.
- 174.** N. Mohanty, V. Berry, "Graphene-Based Single-Bacterium Resolution Biodevice and DNA Transistor: Interfacing Graphene Derivatives with Nanoscale and Microscale Biocomponents" *Nano Lett.* 2008, 8, (12), 4469-4476.
- 175.** S. Wang, P. J. Chia, L. L. Chua, L. H. Zhao, R. Q. Png, S. Sivaramakrishnan, M. Zhou, R. G. S. Goh, R. H. Friend, A. T. S. Wee, P. K. H. Ho, "Band-like transport in surface-functionalized highly solution-processable graphene nanosheets" *Adv. Mater.* 2008, 20, (18), 3440-+.
- 176.** H. F. Yang, C. S. Shan, F. H. Li, D. X. Han, Q. X. Zhang, L. Niu, "Covalent functionalization of polydisperse chemically-converted graphene sheets with amine-terminated ionic liquid" *Chem. Commun.* 2009, (26), 3880-3882.
- 177.** M. Fang, K. G. Wang, H. B. Lu, Y. L. Yang, S. Nutt, "Covalent polymer functionalization of graphene nanosheets and mechanical properties of composites" *J. Mater. Chem.* 2009, 19, (38), 7098-7105.
- 178.** S. H. Lee, D. R. Dreyer, J. H. An, A. Velamakanni, R. D. Piner, S. Park, Y. W. Zhu, S. O. Kim, C. W. Bielawski, R. S. Ruoff, "Polymer Brushes via Controlled, Surface-Initiated Atom Transfer Radical Polymerization (ATRP) from Graphene Oxide" *Macromol. Rapid Commun.* 2010, 31, (3), 281-288.
- 179.** M. Fang, K. G. Wang, H. B. Lu, Y. L. Yang, S. Nutt, "Single-layer graphene nanosheets with controlled grafting of polymer chains" *J. Mater. Chem.* 2010, 20, (10), 1982-1992.

- 180.** Y. F. Yang, J. Wang, J. Zhang, J. C. Liu, X. L. Yang, H. Y. Zhao, "Exfoliated Graphite Oxide Decorated by PDMAEMA Chains and Polymer Particles" *Langmuir* 2009, 25, (19), 11808-11814.
- 181.** L. Wang, H. B. Wang, Z. H. Liu, C. Xiao, S. M. Dong, P. X. Han, Z. Y. Zhang, X. Y. Zhang, C. F. Bi, G. L. Cui, "A facile method of preparing mixed conducting LiFePO₄/graphene composites for lithium-ion batteries" *Solid State Ionics* 2010, 181, (37-38), 1685-1689.
- 182.** G. Goncalves, P. Marques, A. Barros-Timmons, I. Bdkin, M. K. Singh, N. Emami, J. Gracio, "Graphene oxide modified with PMMA via ATRP as a reinforcement filler" *J. Mater. Chem.* 2010, 20, (44), 9927-9934.
- 183.** R. K. Layek, S. Samanta, D. P. Chatterjee, A. K. Nandi, "Physical and mechanical properties of poly(methyl methacrylate) -functionalized graphene/poly(vinylidene fluoride) nanocomposites Piezoelectric beta polymorph formation" *Polymer* 2010, 51, (24), 5846-5856.
- 184.** Y. Li, X. Li, C. Dong, J. Y. Qi, X. J. Han, "A graphene oxide-based molecularly imprinted polymer platform for detecting endocrine disrupting chemicals" *Carbon* 2010, 48, (12), 3427-3433.
- 185.** Y. J. Huang, Y. W. Qin, Y. Zhou, H. Niu, Z. Z. Yu, J. Y. Dong, "Polypropylene/Graphene Oxide Nanocomposites Prepared by In Situ Ziegler-Natta Polymerization" *Chem. Mater.* 2010, 22, (13), 4096-4102.
- 186.** Z. Xu, C. Gao, "In situ Polymerization Approach to Graphene-Reinforced Nylon-6 Composites" *Macromolecules* 2010, 43, (16), 6716-6723.
- 187.** H. F. Yang, C. S. Shan, F. H. Li, Q. X. Zhang, D. X. Han, L. Niu, "Convenient preparation of tunably loaded chemically converted graphene oxide/epoxy resin nanocomposites from graphene oxide sheets through two-phase extraction" *J. Mater. Chem.* 2009, 19, (46), 8856-8860.
- 188.** Y. R. Lee, A. V. Raghu, H. M. Jeong, B. K. Kim, "Properties of Waterborne Polyurethane/Functionalized Graphene Sheet Nanocomposites Prepared by an in situ Method" *Macromol. Chem. Phys.* 2009, 210, (15), 1247-1254.
- 189.** H. Kim, Y. Miura, C. W. Macosko, "Graphene/Polyurethane Nanocomposites for Improved Gas Barrier and Electrical Conductivity" *Chem. Mater.* 2010, 22, (11), 3441-3450.
- 190.** S. Park, D. A. Dikin, S. T. Nguyen, R. S. Ruoff, "Graphene Oxide Sheets Chemically Cross-Linked by Polyallylamine" *J. Phys. Chem. C* 2009, 113, (36), 15801-15804.
- 191.** X.-D. Zhuang, Y. Chen, G. Liu, P.-P. Li, C.-X. Zhu, E.-T. Kang, K.-G. Noeh, B. Zhang, J.-H. Zhu, Y.-X. Li, "Conjugated-Polymer-Functionalized Graphene Oxide: Synthesis and Nonvolatile Rewritable Memory Effect" *Adv. Mater.* 2010, 22, (15), 1731-1735.
- 192.** Y. Xu, Z. Liu, X. Zhang, Y. Wang, J. Tian, Y. Huang, Y. Ma, X. Zhang, Y. Chen, "A Graphene Hybrid Material Covalently Functionalized with Porphyrin: Synthesis and Optical Limiting Property" *Adv. Mater.* 2009, 21, (12), 1275-1279.

- 193.** H. T. Hu, X. B. Wang, J. C. Wang, L. Wan, F. M. Liu, H. Zheng, R. Chen, C. H. Xu, "Preparation and properties of graphene nanosheets-polystyrene nanocomposites via in situ emulsion polymerization" *Chem. Phys. Lett.* 2010, 484, (4-6), 247-253.
- 194.** J. Q. Liu, W. R. Yang, L. Tao, D. Li, C. Boyer, T. P. Davis, "Thermosensitive Graphene Nanocomposites Formed Using Pyrene-Terminal Polymers Made by RAFT Polymerization" *J. Polym. Sci. Pol. Chem.* 2010, 48, (2), 425-433.
- 195.** J. Q. Liu, L. Tao, W. R. Yang, D. Li, C. Boyer, R. Wuhrer, F. Braet, T. P. Davis, "Synthesis, Characterization, and Multilayer Assembly of pH Sensitive Graphene-Polymer Nanocomposites" *Langmuir* 2010, 26, (12), 10068-10075.
- 196.** Y. Y. Liang, D. Q. Wu, X. L. Feng, K. Mullen, "Dispersion of Graphene Sheets in Organic Solvent Supported by Ionic Interactions" *Adv. Mater.* 2009, 21, (17), 1679-1683.
- 197.** R. Hao, W. Qian, L. H. Zhang, Y. L. Hou, "Aqueous dispersions of TCNQ-anion-stabilized graphene sheets" *Chem. Commun.* 2008, (48), 6576-6578.
- 198.** Y. X. Xu, H. Bai, G. W. Lu, C. Li, G. Q. Shi, "Flexible graphene films via the filtration of water-soluble noncovalent functionalized graphene sheets" *J. Am. Chem. Soc.* 2008, 130, (18), 5856-5857.
- 199.** X. Y. Qi, K. Y. Pu, X. Z. Zhou, H. Li, B. Liu, F. Boey, W. Huang, H. Zhang, "Conjugated-Polyelectrolyte-Functionalized Reduced Graphene Oxide with Excellent Solubility and Stability in Polar Solvents" *Small* 2010, 6, (5), 663-669.
- 200.** P. Hasin, M. A. Alpuche-Aviles, Y. Y. Wu, "Electrocatalytic Activity of Graphene Multi layers toward I-/I-3(-): Effect of Preparation Conditions and Polyelectrolyte Modification" *J. Phys. Chem. C* 2010, 114, (37), 15857-15861.
- 201.** L. L. Tian, M. J. Meziani, F. S. Lu, C. Y. Kong, L. Cao, T. J. Thorne, Y. P. Sun, "Graphene Oxides for Homogeneous Dispersion of Carbon Nanotubes" *ACS Appl. Mater. Interfaces* 2010, 2, (11), 3217-3222.
- 202.** A. J. Patil, J. L. Vickery, T. B. Scott, S. Mann, "Aqueous Stabilization and Self-Assembly of Graphene Sheets into Layered Bio-Nanocomposites using DNA" *Adv. Mater.* 2009, 21, (31), 3159-3164.
- 203.** C. H. Lu, H. H. Yang, C. L. Zhu, X. Chen, G. N. Chen, "A Graphene Platform for Sensing Biomolecules" *Angew. Chem. Int. Ed.* 2009, 48, (26), 4785-4787.
- 204.** S. Husale, S. Sahoo, A. Radenovic, F. Traversi, P. Annibale, A. Kis, "ssDNA Binding Reveals the Atomic Structure of Graphene" *Langmuir* 2010, 26, (23), 18078-18082.
- 205.** P. Wu, Q. A. Shao, Y. J. Hu, J. A. Jin, Y. J. Yin, H. Zhang, C. X. Cai, "Direct electrochemistry of glucose oxidase assembled on graphene and application to glucose detection" *Electrochim. Acta* 2010, 55, (28), 8606-8614.

206. P. Laaksonen, M. Kainlahti, T. Laaksonen, A. Shchepetov, H. Jiang, J. Ahopelto, M. B. Linder, "Interfacial Engineering by Proteins: Exfoliation and Functionalization of Graphene by Hydrophobins" *Angew. Chem. Int. Ed.* 2010, 49, (29), 4946-4949.
207. Y. Wang, Z. Li, J. Wang, J. Li, Y. Lin, "Graphene and graphene oxide: biofunctionalization and applications in biotechnology" *Trends Biotechnol.* 2011, 29, (5), 205-212.
208. K. J. Klabunde, *Nanoscale Materials in Chemistry*. Wiley-VCH: 2005.
209. G. Schmid, *Nanotechnology: Assessment and Perspectives*. In Gethmann Springer-Verlag: Berlin 2006.
210. M. Seipenbusch, S. Rothenbacher, M. Kirchhoff, H. J. Schmid, G. Kasper, A. P. Weber, "Interparticle forces in silica nanoparticle agglomerates" *J. Nanopart. Res.* 2010, 12, (6), 2037-2044.
211. B. Marrs, R. Andrews, T. Rantell, D. Pienkowski, "Augmentation of acrylic bone cement with multiwall carbon nanotubes" *J. Biomed. Mater. Res. A* 2006, 77A, 269-276.
212. Y.-H. Nien, C.-L. Huang, "The mechanical study of acrylic bone cement reinforced with carbon nanotube" *Mater. Sci. Eng. B-Adv* 2010, 169, (1-3), 134-137.
213. R. Ormsby, T. McNally, C. Mitchell, N. Dunne, "Influence of multiwall carbon nanotube functionality and loading on mechanical properties of PMMA/MWCNT bone cements" *J. Mater. Sci. Mater* 2010, 21, (8), 2287-2292.
214. D. Meng, J. Ioannou, A. R. Boccaccini, "Bioglass(A (R))-based scaffolds with carbon nanotube coating for bone tissue engineering" *J. Mater. Sci. Mater. M.* 2009, 20, (10), 2139-2144.
215. A. R. Boccaccini, F. Chicatun, J. Cho, O. Bretcanu, J. A. Roether, S. Novak, Q. Chen, "Carbon nanotube coatings on Bioglass-Based tissue engineering scaffolds" *Adv. Funct. Mater.* 2007, 17, (15), 2815-2822.
216. Z.-k. Wang, Q.-l. Hu, L. Cai, "Chitosan and multi-walled carbon nanotube composite rods" *Chin. J. Polym. Sci.* 2010, 28, (5), 801-806.
217. Y. Sato, A. Yokoyama, T. Kasai, S. Hashiguchi, M. Ootsubo, S.-i. Ogino, N. Sashida, M. Namura, K. Motomiy, B. Jeyadevan, K. Tohji, "In vivo rat subcutaneous tissue response of binder-free multi-walled carbon nanotube blocks cross-linked by de-fluorination" *Carbon* 2008, 46, (14), 1927-1934.
218. B. Marrs, R. Andrews, D. Pienkowski, "Multiwall carbon nanotubes enhance the fatigue performance of physiologically maintained methyl methacrylate-styrene copolymer" *Carbon* 2007, 45, (10), 2098-2104.
219. J. Reis, S. Kanagaraj, A. Fonseca, M. T. Mathew, F. Capela-Silva, J. Potes, A. Pereira, M. S. A. Oliveira, J. A. Simoes, "In vitro studies of multiwalled carbon nanotube/ultrahigh molecular

weight polyethylene nanocomposites with osteoblast-like MG63 cells" *Braz. J. of Med. and Biol. Res.* 2010, 43, (5), 476-482.

220. E. Hirata, M. Uo, Y. Nodasaka, H. Takita, N. Ushijima, T. Akasaka, F. Watari, A. Yokoyama, "3D collagen scaffolds coated with multiwalled carbon nanotubes: Initial cell attachment to internal surface" *J. Biomed. Mater. Res. B* 2010, 93B, (2), 544-550.

221. H. Zhang, Z. Chen, "Fabrication and Characterization of Electrospun PLGA/MWNTs/Hydroxyapatite Biocomposite Scaffolds for Bone Tissue Engineering" *J. Bioact. Compat. Polym.* 2010, 25, (3), 241-259.

222. M. K. Singh, J. Gracio, P. LeDuc, P. P. Goncalves, P. A. A. P. Marques, G. Goncalves, F. Marques, V. S. Silva, F. Capela e Silva, J. Reis, J. Potes, A. Sousa, "Integrated biomimetic carbon nanotube composites for in vivo systems" *Nanoscale* 2010, 2, (12), 2855-2863.

223. I. Armentano, L. Marinucci, M. Dottori, S. Balloni, E. Fortunati, M. Pennacchi, E. Becchetti, P. Locci, J. M. Kenny, "Novel Poly(L-lactide) PLLA/SWNTs Nanocomposites for Biomedical Applications: Material Characterization and Biocompatibility Evaluation" *J. Biomat. Sci-Polym. E.* 2011, 22, (4-6), 541-556.

224. W. Wang, F. Watari, M. Omori, S. Liao, Y. Zhu, A. Yokoyama, M. Uo, H. Kimura, A. Ohkubo, "Mechanical properties and biological behavior of carbon nanotube/polycarbosilane composites for implant materials" *J. Biomed. Mater. Res. B* 2007, 82B, (1), 223-230.

225. A. Abarategi, M. C. Gutierrez, C. Moreno-Vicente, M. J. Hortiguera, V. Ramos, J. L. Lopez-Lacomba, M. L. Ferrer, F. del Monte, "Multiwall carbon nanotube scaffolds for tissue engineering purposes" *Biomaterials* 2008, 29, (1), 94-102.

226. S. Sirivisoot, T. J. Webster, "Multiwalled carbon nanotubes enhance electrochemical properties of titanium to determine in situ bone formation" *Nanotechnology* 2008, 19, (29).

227. I. Armentano, M. Antonio Alvarez-Perez, B. Carmona-Rodriguez, I. Gutierrez-Ospina, J. M. Kenny, H. Arzate, "Analysis of the biomineralization process on SWNT-COOH and F-SWNT films" *Mater. Sci. Eng. C* 2008, 28, (8), 1522-1529.

228. M. Bhattacharya, P. Wutticharoenmongkol-Thitiwongsawet, D. T. Hamamoto, D. Lee, T. Cui, H. S. Prasad, M. Ahmad, "Bone formation on carbon nanotube composite" *J. Biomed. Mater. Res. A* 2011, 96A, (1), 75-82.

229. R. M. Mendes, G. A. B. Silva, M. V. Caliari, E. E. Silva, L. O. Ladeira, A. J. Ferreira, "Effects of single wall carbon nanotubes and its functionalization with sodium hyaluronate on bone repair" *Life Sci.* 2010, 87, (7-8), 215-222.

230. W. Tutak, K. H. Park, A. Vasilov, V. Starovoytov, G. Fanchini, S.-Q. Cai, N. C. Partridge, F. Sesti, M. Chhowalla, "Toxicity induced enhanced extracellular matrix production in osteoblastic cells cultured on single-walled carbon nanotube networks" *Nanotechnology* 2009, 20, (25).

231. D. E. Green, J. P. Longtin, B. Sitharaman, "The Effect of Nanoparticle-Enhanced Photoacoustic Stimulation on Multipotent Marrow Stromal Cells" *ACS Nano* 2009, 3, (8), 2065-2072.
232. W. Tutak, M. Chhowalla, F. Sesti, "The chemical and physical characteristics of single-walled carbon nanotube film impact on osteoblastic cell response" *Nanotechnology* 2010, 21, (31).
233. B. Sitharaman, X. Shi, X. F. Walboomers, H. Liao, V. Cuijpers, L. J. Wilson, A. G. Mikos, J. A. Jansen, "In vivo biocompatibility of ultra-short single-walled carbon nanotube/biodegradable polymer nanocomposites for bone tissue engineering" *Bone* 2008, 43, (2), 362-370.
234. X. Shi, J. L. Hudson, P. P. Spicer, J. M. Tour, R. Krishnamoorti, A. G. Mikos, "Injectable nanocomposites of single-walled carbon nanotubes and biodegradable polymers for bone tissue engineering" *Biomacromolecules* 2006, 7, (7), 2237-2242.
235. X. Shi, B. Sitharaman, Q. P. Pham, F. Liang, K. Wu, W. E. Billups, L. J. Wilson, A. G. Mikos, "Fabrication of porous ultra-short single-walled carbon nanotube nanocomposite scaffolds for bone tissue engineering" *Biomaterials* 2007, 28, (28), 4078-4090.
236. A. R. Biris, M. Mahmood, M. D. Lazar, E. Dervishi, F. Watanabe, T. Mustafa, G. Baciut, M. Baciut, S. Bran, S. Ali, A. S. Biris, "Novel Multicomponent and Biocompatible Nanocomposite Materials Based on Few-Layer Graphenes Synthesized on a Gold/Hydroxyapatite Catalytic System with Applications in Bone Regeneration" *J. Phys. Chem. C* 2011, 115, (39), 18967-18976.
237. C. Y. Wan, B. Q. Chen, "Poly(epsilon-caprolactone)/graphene oxide biocomposites: mechanical properties and bioactivity" *Biomed. Mater.* 2011, 6, (5).
238. D. Depan, B. Girase, J. S. Shah, R. D. K. Misra, "Structure-process-property relationship of the polar graphene oxide-mediated cellular response and stimulated growth of osteoblasts on hybrid chitosan network structure nanocomposite scaffolds" *Acta Biomater.* 2011, 7, (9), 3432-3445.
239. S. Kim, S. H. Ku, S. Y. Lim, J. H. Kim, C. B. Park, "Graphene-Biomineral Hybrid Materials" *Adv. Mater.* 2011, 23, (17), 2009-2014.
240. W. C. Lee, C. H. Y. X. Lim, H. Shi, L. A. L. Tang, Y. Wang, C. T. Lim, K. P. Loh, "Origin of Enhanced Stem Cell Growth and Differentiation on Graphene and Graphene Oxide" *ACS Nano* 2011, 5, (9), 7334-7341.
241. T. R. Nayak, H. Andersen, V. S. Makam, C. Khaw, S. Bae, X. Xu, P.-L. R. Ee, J.-H. Ahn, B. H. Hong, G. Pastorin, B. Oezylmaz, "Graphene for Controlled and Accelerated Osteogenic Differentiation of Human Mesenchymal Stem Cells" *ACS Nano* 2011, 5, (6), 4670-4678.
242. T. J. Webster, C. Ergun, R. H. Doremus, R. W. Siegel, R. Bizios, "Enhanced osteoclast-like cell functions on nanophase ceramics" *Biomaterials* 2001, 22, (11), 1327-1333.

- 243.** K. Goto, J. Tamura, S. Shinzato, S. Fujibayashi, M. Hashimoto, M. Kawashita, T. Kokubo, T. Nakamura, "*Bioactive bone cements containing nano-sized titania particles for use as bone substitutes*" *Biomaterials* 2005, 26, (33), 6496-6505.
- 244.** T. J. Webster, E. L. Hellenmeyer, R. L. Price, "*Increased osteoblast functions on theta plus delta nanofiber alumina*" *Biomaterials* 2005, 26, (9), 953-960.
- 245.** M. P. Ginebra, L. Albuixech, E. Fernandez-Barragan, C. Aparicio, F. J. Gil, J. San Roman, B. Vazquez, J. A. Planell, "*Mechanical performance of acrylic bone cements containing different radiopacifying agents*" *Biomaterials* 2002, 23, (8), 1873-1882.
- 246.** P. Liu-Snyder, T. J. Webster, "*Developing a new generation of bone cements with nanotechnology*" *Curr. Nanosci.* 2008, 4, (1), 111-118.
- 247.** M. Supova, "*Problem of hydroxyapatite dispersion in polymer matrices: a review*" *J. Mater. Sci-Mater. M.* 2009, 20, (6), 1201-1213.
- 248.** Q. Liu, J. R. de Wijn, C. A. van Blitterswijk, "*Covalent bonding of PMMA, PBMA, and poly(HEMA) to hydroxyapatite particles*" *J. Biomed. Mater. Res.* 1998, 40, (2), 257-263.
- 249.** B. A. Rozenberg, R. Tenne, "*Polymer-assisted fabrication of nanoparticles and nanocomposites*" *Prog. Polym. Sci.* 2008, 33, (1), 40-112.
- 250.** R. Ormsby, T. McNally, C. Mitchell, N. Dunne, "*Incorporation of multiwalled carbon nanotubes to acrylic based bone cements: Effects on mechanical and thermal properties*" *J. Mech. Behav. Biomed.* 2010, 3, (2), 136-145.
- 251.** R. Ormsby, T. McNally, P. O'Hare, G. Burke, C. Mitchell, N. Dunne, "*Fatigue and biocompatibility properties of a poly(methyl methacrylate) bone cement with multi-walled carbon nanotubes*" *Acta Biomater.*, 2011, 8, (3), 1201-1212.
- 252.** M. K. Singh, T. Shokuhfar, J. J. D. Gracio, A. C. M. de Sousa, J. M. D. Ferreira, H. Garmestani, S. Ahzi, "*Hydroxyapatite modified with carbon-nanotube-reinforced poly(methyl methacrylate): A nanocomposite material for biomedical applications*" *Adv. Funct. Mater.* 2008, 18, (5), 694-700.

Capítulo II

Síntese, caracterização e modificação superficial do óxido de grafeno

Neste capítulo será dada especial relevância ao desenvolvimento de metodologias de síntese que permitam a obtenção de grafeno e óxido de grafeno em larga escala, de modo uniforme relativamente ao número de camadas de carbono e com baixa densidade de defeitos estruturais. É apresentado um trabalho de caracterização química da superfície do grafeno e óxido de grafeno por forma a determinar quais os grupos funcionais de maior relevância presentes nestes materiais.

Neste capítulo será também descrita a modificação superficial covalente do óxido de grafeno através da adição de cadeias de PMMA, recorrendo para isso à polimerização via ATRP. Com o objetivo de testar a relevância destes novos materiais funcionais enquanto agente de reforço, foram preparados vários filmes de matriz polimérica de PMMA. Os filmes de PMMA sintetizados foram sujeitos a testes mecânicos de nanoindentação e ensaios de tração uniaxial.

Índice

CAPÍTULO II - SÍNTESE, CARATERIZAÇÃO E MODIFICAÇÃO SUPERFICIAL DO ÓXIDO DE GRAFENO	77
2.1 INTRODUÇÃO.....	79
2.2 ESFOLIAÇÃO QUÍMICA DA GRAFITE PARA A OBTENÇÃO DE ÓXIDO DE GRAFENO.....	82
2.3 MODIFICAÇÃO SUPERFICIAL DO ÓXIDO DE GRAFENO COM PMMA VIA ATRP.....	91
2.3.1 Filmes de PMMA reforçados com óxido de grafeno modificado	96
2.4 CONCLUSÃO	103
2.5 PARTE EXPERIMENTAL.....	104
2.5.1 Síntese de óxido de grafeno.....	104
2.5.1.1 Redução térmica do óxido de grafeno.....	104
2.5.1.2 Redução química do óxido de grafeno através de hidrazina	104
2.5.2 Modificação superficial do óxido de grafeno com cadeias de PMMA via ATRP	105
.....	105
2.5.3 Preparação dos filmes de PMMA reforçados com grafenos	105
2.6 CARACTERIZAÇÃO	106
2.7 REFERÊNCIAS	107

2.1 Introdução

Atualmente o grafeno é um dos materiais mais interessantes em investigação, não só por curiosidade acadêmica, mas também pelas suas potenciais aplicações. O grafeno, tal como já foi dito anteriormente, é um material de carbono bidimensional, que assume a forma de um retículo planar com uma estrutura hexagonal de átomos de carbono com ligações covalentes do tipo sp^2 , com uma distância atômica carbono-carbono de 0,142 nm. Este foi considerado o primeiro material realmente bidimensional, cristalino e com espessura atômica e estável às condições ambientais.¹

O grafeno exibe uma variedade de propriedades bastante interessantes, incluindo alta mobilidade eletrônica à temperatura ambiente ($250\ 000\ \text{cm}^2/\text{Vs}$), condutividade térmica elevada ($5000\ \text{Wm}^{-1}\text{K}^{-1}$) e excepcionais propriedades mecânicas (módulo de Young de 1 TPa).²⁻⁶ Assim, as folhas de grafeno possuem uma panóplia de propriedades eletrônicas, mecânicas e térmicas excepcionais, e espera-se que se possam repercutir nas mais diversas aplicações,^{7, 8} tais como sensores, baterias, supercapacitores, sistemas de armazenamento de hidrogénio e reforço em materiais nanocompósitos, etc...

A atribuição conjunta do Prémio Nobel de Física 2010 para Andre Geim e Konstantin Novoselov,⁹ como afirma a Real Academia Sueca, "para experiências inovadoras em relação ao material bidimensional grafeno", destaca a importância desta camada atômica de carbono. Esta descoberta foi considerada um avanço significativo na era da nanotecnologia, trazendo o conceito de componente atômico único mais perto da realidade.

Mesmo antes dos estudos realizados por Novoselov e Geim, foram realizadas várias tentativas para preparar grafite muito fina ou grafenos com várias camadas de carbono, uma vez que era esperado obter propriedades interessantes destes materiais.¹⁰ Contudo, havia bastante dificuldade em isolar experimentalmente camadas únicas, de tal forma que se pudessem realizar medições elétricas, e para além disso havia dúvidas se era realmente possível obter tal material. A sua descoberta marcou o início da física experimental com grafeno, o que se tornou então relevante para visitar com sucesso todos os outros métodos para produzir grafeno que tinham supostamente falhado nas últimas quatro décadas.¹¹⁻¹³

A abordagem "top-down" original de esfoliação mecânica da grafite utilizando o método "Scotch tape" permitiu a obtenção de grafenos de elevada qualidade, no entanto o método não permite a obtenção de amostra em grande quantidade e de forma homogênea, ou seja a probabilidade de encontrar folhas individuais de grafeno é frequentemente baixa. A fim de esfoliar uma única folha de grafeno, é necessário quebrar

as ligações de van der Waals entre a primeira e segunda camada sem perturbar as folhas subsequentes.¹⁴ Neste sentido outros métodos têm-se destacado dentro deste tipo de abordagem, tais como a esfoliação química da grafite¹⁵ ou a esfoliação da grafite através de ultrassons.¹⁶ A nível de abordagens “bottom-up” destacam-se como metodologias mais utilizadas e com resultados mais promissores a deposição química de vapor¹⁷ e o crescimento epitaxial.¹⁸

Cada um destes métodos apresenta vantagens e desvantagens que se baseiam essencialmente em três pilares custo/qualidade/quantidade. Neste momento, a redução de derivados de grafeno tais como o GO destaca-se como uma das principais estratégias que permite a obtenção de grafeno em massa,¹⁹⁻²¹ embora não isento de defeitos, mas altamente processáveis.

A síntese do GO consiste numa primeira fase na oxidação da grafite a óxido de grafite através da intercalação de grupos funcionais de oxigénio entre os planos de carbono, o que permite um aumento da distância interplanar e conseqüente enfraquecimento das forças de Van der Waals entre as camadas adjacentes. De forma a levar à separação definitiva das folhas de carbono, o óxido de grafite é sujeito normalmente a um tratamento por ultrassons em solução aquosa, o que permite obter suspensões de GO individualizados, estabilizadas por interações electrostáticas (atractivas e repulsivas). A grande vantagem desta metodologia de síntese é que permite obter grandes quantidades de GO, através de processos relativamente simples e pouco dispendiosos. Através das diversas estratégias de redução disponíveis é possível transformar o GO em grafeno o que oferece enormes oportunidades para o desenvolvimento de novos materiais nanocompósitos.²²

Do ponto de vista químico, a presença de grupos funcionais de oxigénio na superfície do GO torna-o muito interessante, pois fornece locais reativos para a realização de modificações químicas através de metodologias sobejamente conhecidas da química de carbono. Neste quadro, é possível realizar o crescimento controlado de cadeias poliméricas com diferentes formas, dimensões, arquiteturas e grupos funcionais através de uma série de diferentes abordagens. São já diversas as abordagens descritas na literatura para o crescimento controlado de cadeias poliméricas na superfície do GO, polimerização *in situ*,²³⁻³⁰ reações de acoplamento (coupling reaction)³¹⁻³⁸ e polimerizações via radicalar (surface-initiated controlled radical polymerization), ATRP³⁹⁻⁴⁵ ou RAFT⁴⁶⁻⁴⁹. Efetivamente as duas primeiras abordagens apresentam como grande vantagem a sua simplicidade de síntese, enquanto as abordagens através de polimerização radicalar permitem obter um controlo mais efetivo do peso molecular e

polidispersibilidade das cadeias poliméricas e dos grupos funcionais terminais (formação de copolímeros).

Efetivamente o GO, por causa da sua relativa facilidade de produção, dispersão e manipulação (funcionalização química relativamente simples), começa a emergir como um material versátil para aplicações em nanociências e nanotecnologia, em especial no desenvolvimento de novos materiais nanocompósitos.^{50, 51}

Este capítulo aborda a síntese do GO através do método de esfoliação química da grafite. Foi também de interesse meramente acadêmico obter grafeno a partir do GO produzido, este procedimento foi realizado através de duas metodologias diferentes a redução térmica e a redução química com o recurso à hidrazina. Durante este processo foram identificados e quantificados os grupos funcionais de oxigênio na camada de carbono dos diferentes materiais.

É também descrita uma metodologia que permite potenciar a aplicação do GO enquanto agente de reforço. Nesse sentido procedeu-se à manipulação química do GO por forma a proporcionar as condições necessárias para o crescimento controlado de cadeias poliméricas de PMMA através do mecanismo de polimerização ATRP. Estes novos materiais nanocompósitos demonstram grande interesse em aplicações como agente de reforço em matrizes poliméricas de PMMA.

2.2 Esfoliação química da grafite para a obtenção de óxido de grafeno

A esfoliação química da grafite em folhas finas de GO foi baseada no método pioneiro descrito por Hummers e Offeman¹³ depois de introduzidas algumas alterações.⁵² A reação da grafite em solução aquosa com ácido e agente oxidante forte (parte experimental – síntese de óxido de grafeno) permitiu obter uma suspensão estável de GO após várias lavagens com água (Figura 2.1 a)). A imagem de microscopia ótica mostra as folhas de GO com morfologias distintas dispersas numa superfície de silício (Figura 2.1 b)). As imagens de SEM revelam folhas de GO translúcidas com rugas e dobras a diferentes ampliações (Figura 2.1 c) e d)).

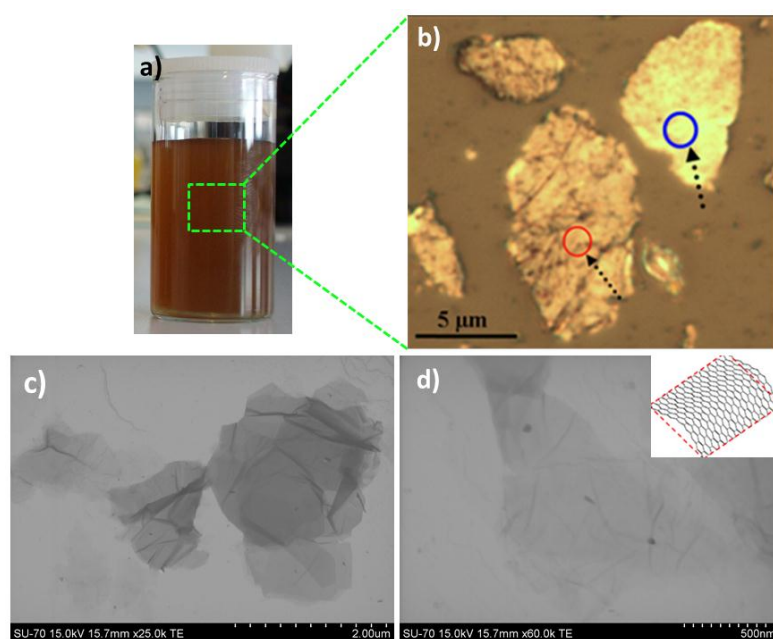
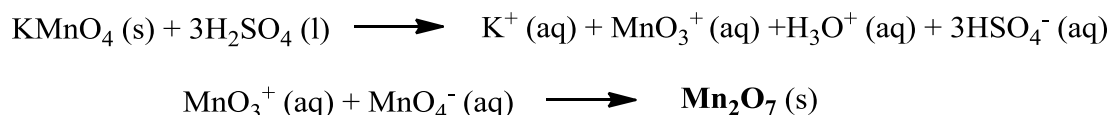


Figura 2.1 A figura é composta por imagens de GO obtidas por diversas técnicas de caracterização **a)** imagem real de uma solução coloidal de GO em água. Na figura **b)** pode-se observar uma imagem de microscopia ótica de várias folhas de GO. As figuras **c)** e **d)** representam imagens de SEM de folhas de GO a diferentes ampliações.

A nível de reação química, a quebra dos planos da grafite em camadas finas de carbono funcionalizadas com espécies de oxigénio baseia-se na reação do permanganato de potássio com ácido sulfúrico. Tendo em consideração que o permanganato de potássio é normalmente utilizado como agente oxidante forte, a sua combinação com o ácido sulfúrico permite a obtenção de espécies ainda mais reativas como o óxido de manganês (VII), que se verifica pela obtenção de uma solução viscosa de cor avermelhada escura (Esquema 2.1).



Esquema 2.1 Reação de formação do óxido de manganês (VII) através de permanganato de potássio e ácido sulfúrico.

O óxido de manganês (VII) é conhecido por se fragmentar quando aquecido a valores superiores a 55 °C ou quando em presença de compostos orgânicos.^{53, 54} Este composto apresenta especial seletividade para a oxidação de estruturas insaturadas, tais como as ligações duplas aromáticas, o que permite obter alterações significativas na estrutura do grafite durante o processo reacional.⁵⁵ Por outro lado os defeitos inerentes à estrutura do grafite podem também servir como catalisadores no processo de oxidação. Alguns estudos teóricos tentaram descrever o mecanismo e os precursores de oxigênio responsáveis pela nucleação e crescimento dos defeitos no GO. Os resultados obtidos por Sun *et al.* demonstraram que a difusão de grupos epóxi na malha gráfica promove a nucleação e crescimento de defeitos lineares, os quais desempenham um papel central no corte oxidativo da estrutura de carbono.⁵⁶ Pan *et al.* verificaram que a reação oxidativa do grafite em solução ocorre através de dois mecanismos predominantes e simultâneos, a oxidação planar cruzada e a oxidação lateral/central (Figura 2.2). O processo de oxidação planar cruzada consiste na quebra periódica da folha de GO, formando células, limitando assim o seu tamanho (Figura 2.2 c e d). Esta fissuração periódica é descrita como resultado do balanço entre a energia de deformação elástica infringida pelos grupos hidroxilo e epóxi, a energia necessária para a formação de fissuras e a interação entre os planos de carbono.⁵⁷ O processo de oxidação lateral/central é definido pelo fluxo da solução oxidante através das paredes laterais para o centro da partícula (Figura 2.2 a)). Sendo que cada tipo de mecanismo origina GOs com dimensões diferentes. Ainda segundo este autor, o uso de uma fonte externa de energia (agitação ou ultrassons) durante o processo de oxidação cria movimento do fluido o que resulta na formação de uma carga de tração nas folhas, resultando assim na redução adicional das suas dimensões.

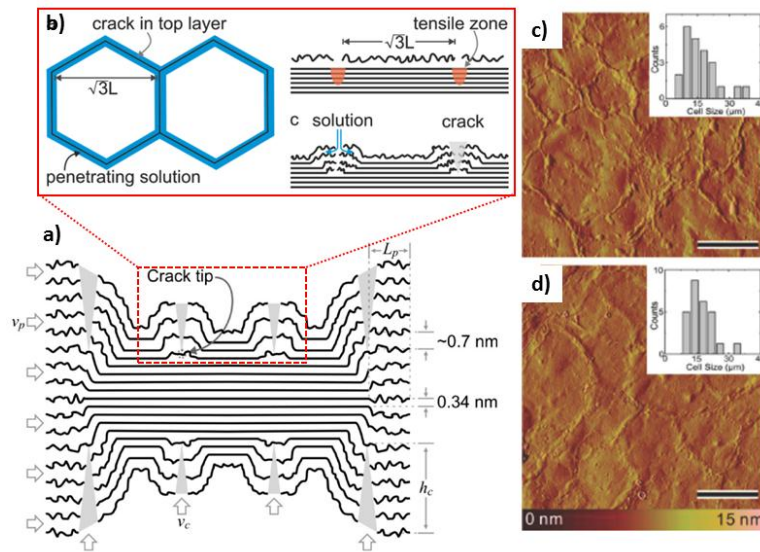


Figura 2.2 Representação esquemática do duplo mecanismo de oxidação da grafite: oxidação planar cruzada e oxidação lateral/central **a)** e **b)** (L - comprimento lateral dos hexágonos, v_p - taxa de penetração da solução e h_c - comprimento da fractura); Imagens de AFM da grafite pirolítica após 6 e 60 s de oxidação superficial **c)** e **d)**. Os gráficos inseridos nas imagens demonstram a distribuição do tamanho de células formadas.⁵⁷

A complexidade da estrutura da grafite aliada à vasta possibilidade de defeitos inerentes a essa mesma estrutura, torna bastante difícil arquitetar um mecanismo preciso do processo de oxidação (Figura 2.3).

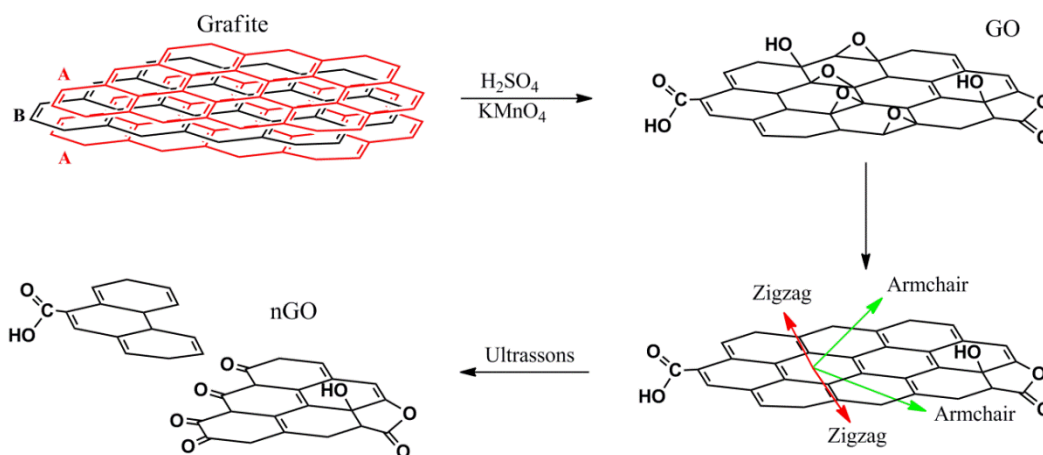


Figura 2.3 Representação esquemática do possível processo de oxidação da grafite e respectiva formação de GO.

A relação estequiométrica entre os elementos que constituem o GO não é fixa, varia dependendo do nível de oxidação, contudo esta variação não é ilimitada. Assim,

independentemente do método de preparação utilizado a composição e estrutura do GO não se altera significativamente após atingir um certo grau de oxidação (TOD – threshold oxidation degree). A análise através de diversas técnicas de caracterização (FTIR, XPS e NMR) da estrutura do GO preparado através das três metodologias mais comuns, Hummers, Brodie e Staudenmayer,¹¹⁻¹³ indicam resultados qualitativos e quantitativos similares. Os rácios C/O dos GO sintetizados através das diferentes três metodologias situa-se na ordem $1,8 < \text{TOD} < 2,5$, sendo que o valor mais comum é ~ 2 .⁵⁸⁻⁶¹

Dimiev *et al*⁶² acreditam que mais do que o tipo de grafite usada ou o processo de oxidação, a estrutura do GO depende significativamente dos processos de purificação utilizados. Os resultados obtidos sugerem que a simples lavagem sucessiva do GO com água promove numa primeira fase a hidrólise dos grupos sulfatos previamente induzidos na sua superfície pela reação com H_2SO_4 e numa segunda fase leva à reestruturação de algumas ligações duplas da matriz gráfica à custa de álcoois terciários e da rutura de ligações C-C. Efetivamente do ponto de vista experimental pode-se verificar que ocorrem mudanças óticas significativas na solução de GO durante do processo de lavagem com água, no início a solução é castanha clara e no final apresenta cor castanha escura.

A caracterização por AFM foi usada para estimar a espessura das folhas individuais de GO (Figura 2.4). Através da análise das imagens obtidas por AFM pode-se verificar que a metodologia utilizada no presente trabalho para a síntese do GO é bastante efetiva, pois verifica-se que a amostra é homogénea quanto ao número de camadas de carbono por grafeno. O facto de que o gradiente de cor da imagem ser bastante semelhante demonstra efetivamente que a amostra é homogénea, apresentando apenas algumas regiões mais claras correspondentes à sobreposição de folhas durante a deposição do GO no substrato de mica.

A espessura média da maioria das folhas de GO obtidas foi cerca de 1,2 nm, valor relativamente superior ao referido na literatura para grafeno de camada única, 0,6 nm.^{9, 63}

A justificação para este facto poderá dever-se a vários fatores, entre eles: a presença dos grupos funcionais de oxigénio em ambos os lados das superfícies do GO que aumentam a espessura das folhas devido às deformações impostas na matriz de carbono em comparação com o grafeno não funcionalizado;⁶⁴ por outro lado, a espessura da folha de GO está diretamente associada com o seu grau de hidratação, sendo que se torna bastante difícil obter medições de AFM de GO totalmente desidratada, às condições ambientais;⁶⁵ e atendendo ainda a algumas limitações relativas ao instrumento de medida. Podemos assim considerar que a amostra de GO obtida é maioritariamente constituída por estruturas com uma ou duas camadas de carbono. Este resultado sugere

a eficiência do tratamento químico aplicado para esfoliar grafite em folhas de GO individuais.

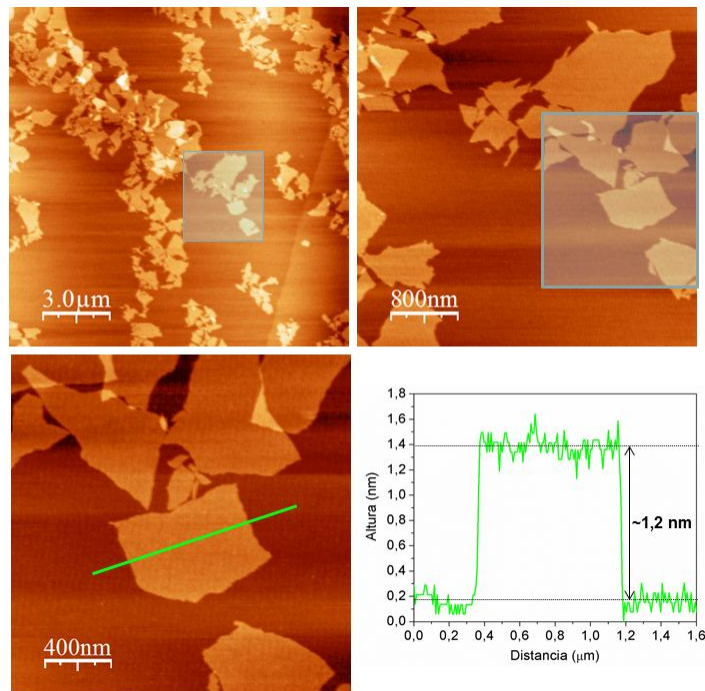


Figura 2.4 Imagens obtidas por AFM do GO depositado numa lamela de Mica extremamente fina a diferentes ampliações. O gráfico representa o perfil de altura correspondente à linha representada na figura.

A Figura 2.5 ilustra uma visão geral de uma folha de GO numa grelha de TEM de carbono perfurado, na qual se pode observar claramente que as zonas de fronteira tendem a enrolar sobre si próprias. É também perceptível pelas diferentes tonalidades apresentadas na imagem, que a folha de GO não apresenta apenas uma única camada em toda a sua extensão, ou que se encontra dobrada sobre si própria. A Figura 2.5 b), corresponde a uma área ampliada da Figura 2.5 a). Efetivamente através desta imagem ampliada pode-se verificar que a estrutura apresenta zonas com tonalidades mais escuras, o que sugere que a folha de GO apresenta algumas dobras sobre si própria dando a sensação de dupla camada de carbono. A Figura 2.5 c) corresponde a uma área ampliada da Figura 2.5 a) situada numa região mais plana, neste caso observa-se apenas uma estrutura aparentemente homogénea. A mesma imagem depois de filtrada no domínio da frequência por forma a remover o ruído indesejado (FFT- Fast Fourier Transform) é convertida na Figura 2.5 d), na qual se podem observar duas malhas distintas de carbono (vermelho e azul), o que é indicativo da presença de pelo menos duas camadas de carbono na respetiva folha de GO.

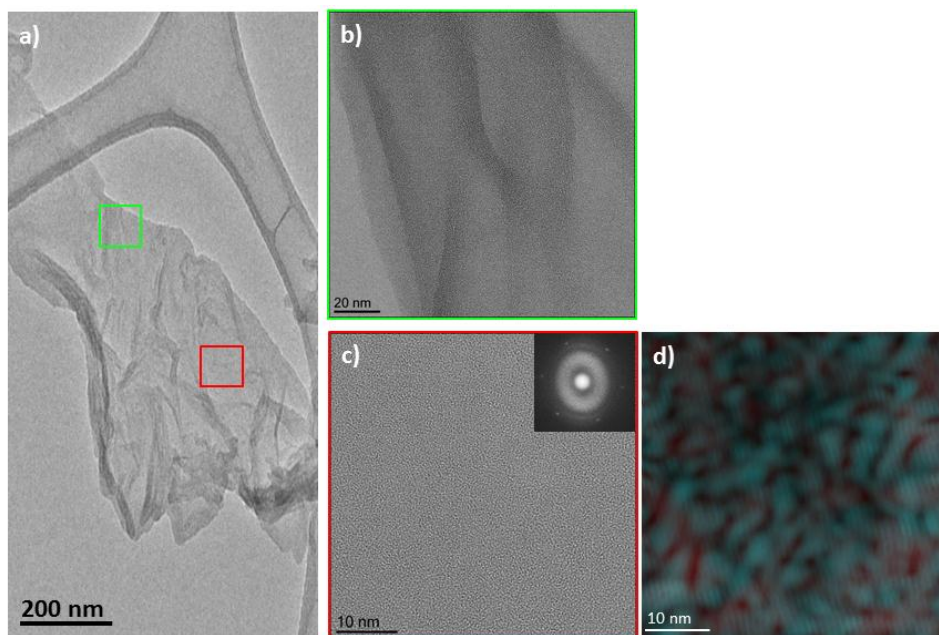


Figura 2.5 Análise de TEM de GO sintetizado através da esfoliação química da grafite. A figura **a)** mostra uma imagem de TEM do GO numa grelha de carbono perfurado. As figuras **b)** e **c)** correspondem a imagem de HRTEM. A figura **d)** correspondente à imagem obtida por FFT da imagem **c)**.

Após a análise morfológica do GO é também de extrema relevância proceder à caracterização química da sua superfície, por forma a obter uma caracterização completa da estrutura de carbono. A análise química da superfície do GO é também um parâmetro de estudo muito importante, não só pelo facto de se conhecer melhor a sua estrutura como também pelas vantagens que daí advém para o desenvolvimento de novos materiais.

Neste estudo, o GO foi submetido a diferentes métodos de redução da sua superfície por forma a convertê-lo em grafeno. Nesse sentido, utilizou-se a redução química com hidrazina (GHR) e a redução térmica, a 1050 °C (GTR). A principal ideia para este estudo foi tentar compreender a evolução dos grupos funcionais de oxigénio na superfície do GO quando este é convertido em grafeno através dos diferentes tratamentos de redução.

A identificação dos grupos funcionais de oxigénio na superfície dos diferentes materiais de carbono, GO e grafenos reduzidos, foi efetuada através de espectroscopia de infravermelho (FTIR). A Figura 2.6 mostra o espectro típico de FTIR obtido para os três substratos, GO, GTR e GHR. As bandas características no espectro de FTIR do GO são as bandas de absorção associados aos modos de vibração dos grupos carboxílicos (-COOH) a 1738 cm^{-1} , dos grupos epóxido (C-O-C) a 1162 cm^{-1} e dos grupos hidroxilo (C-OH) a 1114 cm^{-1} .⁶⁶⁻⁶⁸ O espectro também confirma a presença da banda a 1620 cm^{-1}

correspondente às ligações C=C características da vibração no plano da matriz grafitica.⁶⁹ É também possível identificar uma região de sobreposição de sinais envolvendo contribuições de grupos C-O e C=O na região entre 1300-1500 cm^{-1} , considerada por alguns autores como “zona γ ”.⁷⁰

Os espectros de FTIR obtidos para GTR e GHR após tratamento térmico e químico do GO, respetivamente, apresentam efetivamente uma diminuição significativa da intensidade das bandas correspondentes aos grupos carboxílicos, carbonilo, epóxido e hidróxido, mas não a sua eliminação completa. Note-se contudo que todos os espectros mostram a banda a 1620 cm^{-1} atribuída a ligações duplas de carbono aromático, o que indica que não houve deterioração da matriz grafitica durante os tratamentos de redução.

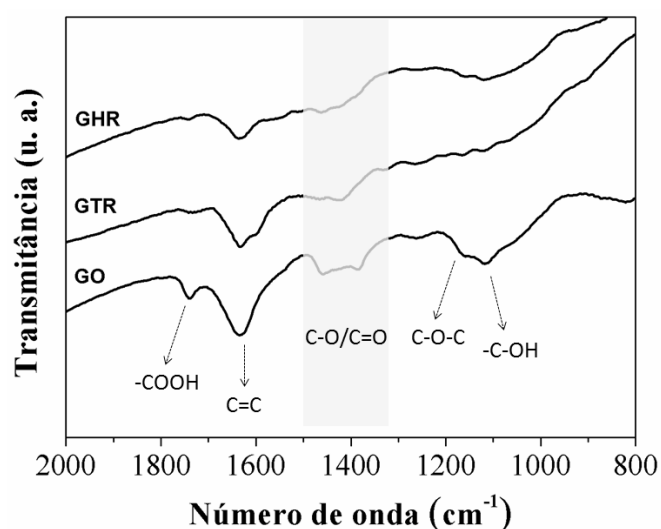


Figura 2.6 Espectro de FTIR do GO e do grafeno reduzido através de tratamento térmico (GTR) e químico (GHR).

Pela diminuição mais significativa da intensidade relativa das bandas dos grupos oxigénio na amostra reduzida quimicamente (GHR) é sugerido que nas condições experimentais aplicadas, os grupos funcionais de oxigénio à superfície do GO sejam mais sensíveis à redução química (hidrazina) do que térmica.

A análise por XPS dos diferentes tipos de grafenos e do GO permitiu identificar e quantificar os grupos funcionais de oxigénio nas respetivas superfícies de carbono, os quais se encontram descritos na tabela seguinte. Os resultados obtidos demonstram efetivamente que quer o tratamento térmico ou químico de redução do GO são eficazes na reconstrução da estrutura C-C da matriz grafitica, veja-se o aumento da percentagem atômica das ligações C-C após redução (Tabela 2.1).

Tabela 2.1 Análise de XPS dos grupos funcionais na superfície do GO, GTR e GHR.⁶⁵

Amostras	C1s		N1s	
	Be (eV)	AC (% at.)	Be (eV)	AC (% at.)
GO	285,0 (C-C (sp ²))	18,38	-	-
	287,0 (C-O/C-OH)	41,05		
	288,6 (C=O/COOH)	5,12		
GTR	284,5 (C-C (sp ²))	73,91	-	-
	286,5 (C-O/C-OH)	5,90		
	287,7 (C=O/COOH)	2,99		
GHR	284,5 (C-C (sp ²))	70,42	399,3 (C-N)	1,24
	286,5 (C-O/C-OH)	4,12		
	287,6 (C=O/COOH)	3,87		

No método de redução do GO com hidrazina verifica-se uma maior eficiência relativa na redução dos grupos C-O/C-OH, porém na redução dos grupos C=O/COOH a situação inverte-se. É também evidente que a redução com hidrazina leva à introdução de átomos de N na estrutura de carbono através essencialmente da formação de grupos pirazola.⁷¹ Park et al. descrevem no seu estudo da redução do GO com hidrazina que existe uma eliminação total dos grupos epóxidos, a eliminação quase total dos grupos hidroxilo e sugere a eliminação dos grupos carboxílicos através da redução em grupos hidroxilo (contudo não apresenta evidências de que este seja o mecanismo preferencial de eliminação dos grupos carboxílicos).⁷¹ Por outro lado demonstrou que a redução do GO com hidrazina promove a introdução de contaminantes do tipo N na estrutura de carbono do grafeno, através da formação de grupos pirazola e da possível conversão dos grupos carboxílicos em grupos amida.

Na redução térmica do GO verifica-se uma redução mais acentuada dos grupos C=O/COOH e menos acentuada nos grupos C-O/C-OH. Bagri et al.⁷² no seu estudo de redução térmica do GO verificaram a eliminação dos grupos epóxidos, carboxílicos e hidroxilos e a formação de grupos éter e carbonilos. Estes resultados podem ser

entendidos com a formação de grupos lactonas o que permite estabilizar a estrutura de carbono após a redução.

De modo a melhor compreender o comportamento dos diversos materiais de carbono sintetizados em solução aquosa, foi medido o potencial zeta de suspensões aquosas de GO, GTR e GHR em função do pH (Figura 2.7). Como esperado a redução superficial do número de grupos funcionais de oxigénio quer no caso do GTR e GHR quando comparados com o GO, permite evidenciar um maior carácter hidrofóbico o que resulta numa menor capacidade para a sua dispersão em água, sendo necessário a realização dos testes de medição de potencial zeta num curto período de tempo após a dispersão em solução aquosa através de ultrassons.

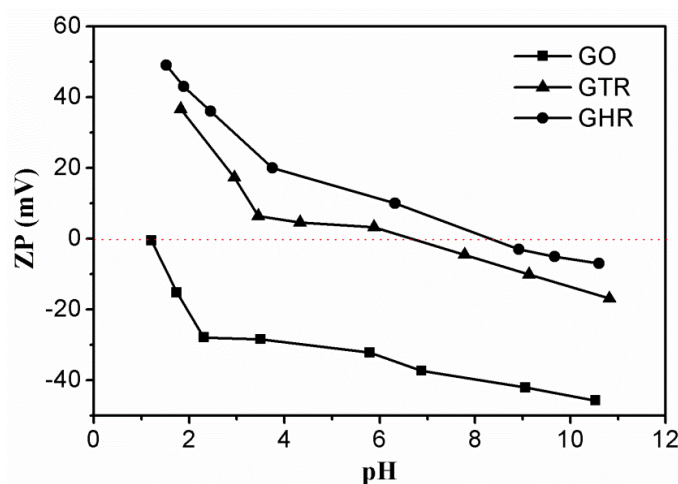


Figura 2.7 Medidas de potencial zeta das diferentes suspensões de grafenos, GO, GTR e GHR, em função do pH.

Os resultados obtidos demonstraram claramente que as folhas de GO possuem carga superficial negativa com um valor de potencial Zeta médio de -35 mV no intervalo de pH entre 3 e 9, que deve ser atribuído à presença de espécies de oxigénio descritos anteriormente na superfície de GO. Ao contrário, GTR e GHR mostraram valores de potencial zeta próximos de zero para o mesmo intervalo de pH, o que é indicativo de uma baixa densidade de cargas negativas nesses tipos de grafeno.

O conhecimento aprofundado da química de superfície dos diversos tipos de grafeno preparados tem bastante relevância pois permite definir previamente estratégias para a funcionalização (especialmente orgânica) deste tipo de materiais, e para além disso permite prever qual o seu comportamento em diferentes solventes tendo em conta a sua polaridade.

2.3 Modificação superficial do óxido de grafeno com PMMA via ATRP

A funcionalização orgânica via ATRP do GO é bastante facilitada pelo facto de a sua superfície estar decorada com grupos funcionais de oxigénio, tal como demonstrado na secção anterior, o que permitiu explorar a possibilidade de crescimento controlado de pequenas cadeias poliméricas de PMMA. Para tal adaptaram-se os procedimentos descritos na literatura para a funcionalização orgânica de estruturas de carbono (Parte experimental, 2.5.2 Modificação superficial do óxido de grafeno com cadeias de PMMA via ATRP).^{73, 74} Numa primeira fase os grupos ácidos carboxílicos na superfície do GO são convertidos em grupos $-COCl$ através da reacção com cloreto de tionilo, que posteriormente são tratados com etileno glicol para formar grupos hidroxilos livres (passo I). Na segunda etapa da reacção, o iniciador de ATRP é ligado covalentemente à superfície das folhas do GO através dos grupos $-OH$ livres (passo II), o que permite o crescimento controlado das cadeias PMMA via ATRP através da adição do monómero MMA (passo III). A representação esquemática para funcionalização da superfície do GO com cadeias poliméricas de PMMA (GPMMA) está ilustrada na Figura 2.8.

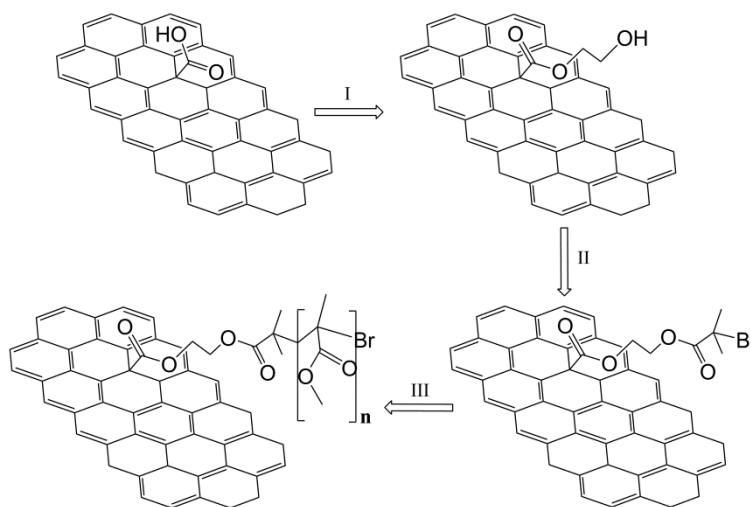


Figura 2.8 Representação esquemática do mecanismo de ATRP para o crescimento controlado de cadeias de PMMA à superfície do GO.

Após a modificação da superfície de GO com PMMA a cor da mistura reacional passou de castanha para preta. Um método expedito usado para verificar o sucesso da conversão do GO em GPMMA, passa pela tentativa de dispersão em água do produto final da reacção sendo esta extremamente difícil, enquanto que a dispersão em clorofórmio se torna bastante facilitada. A suspensão do GPMMA em clorofórmio é ilustrada na inserção da Figura 2.9.

De forma a avaliar a estrutura e morfologia do GPMMA foi realizado um estudo por HRTEM. A Figura 2.9 mostra uma visão global de uma folha de GPMMA numa grelha de TEM de carbono perfurado, ilustrando claramente a forma planar característica do GO, contudo são evidentes algumas manchas escuras na sua superfície. A Figura 2.9b) representa a ampliação da área indicada pelo quadrado na Figura 2.9a). A imagem ampliada permite evidenciar diferenças estruturais significativas relativamente ao GO, onde se pode verificar efetivamente a integração de um novo componente presente na superfície do grafeno modificado. A presença de tais estruturas pode ser atribuída ao PMMA, pois já foram descritas anteriormente por outros autores estruturas análogas para diferentes tipos de polímeros.^{75, 76} De acordo com Yang,⁷⁵ as cadeias de polímero na superfície de um substrato em solução apresentam uma boa dispersão devido à sua solubilidade no solvente, no entanto, após a secagem, o polímero colapsa na superfície da folha de GO formando domínios nanométricos, que correspondem aos pontos escuros observados.

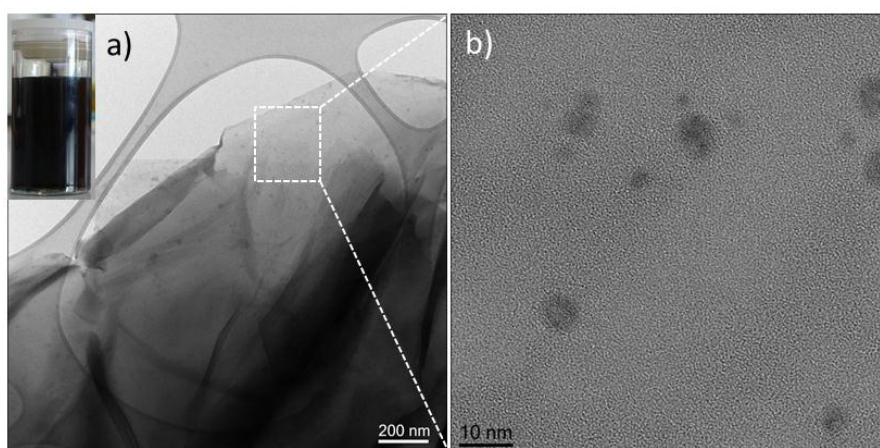


Figura 2.9 Imagens de TEM do nanocompósito GPMMA. A Figura **a)** representa uma imagem de TEM de uma folha de GPMMA numa grelha de carbono perfurado. A Figura **b)** resulta da ampliação da zona do quadrado da Figura **a)**. A imagem indexada à Figura **a)** corresponde à imagem real da solução coloidal de GPMMA em clorofórmio.

A superfície do GPMMA foi também caracterizada por espectroscopia de infravermelho em comparação com o GO (Figura 2.10). As bandas de absorção características do GO no espectro de FTIR são as bandas correspondentes às elongações C=O dos grupos carbonilos e carboxílicos a 1720 cm^{-1} , elongação do grupo C-OH a 1227 cm^{-1} , e as vibrações C-O dos grupos epóxidos a 1139 cm^{-1} e 873 cm^{-1} .^{15, 77} O espectro de FTIR também mostra uma banda em 1620 cm^{-1} atribuída aos carbonos das ligações duplas

aromáticas.⁵² Depois da funcionalização com cadeias de PMMA, a presença dos grupos C=O não é útil para determinar se ocorreu qualquer alteração significativa, uma vez que já estava presente no GO. No entanto, o aumento da intensidade da banda do carbonilo e a presença de bandas características de -CH₂ a 2850 e 2920 cm⁻¹ no espectro de GPMMA é indicativo da presença de cadeias do polímero. A espectroscopia de Raman foi utilizada para avaliar a modificação da superfície de GO. Como era esperado, foi observado um aumento de intensidade das bandas característica do grafeno D (1330 cm⁻¹) e G (1590 cm⁻¹) no espectro GPMMA em relação ao que foi observado para GO. Este facto está associado aos defeitos na superfície criados durante o tratamento de superfície.⁷⁶

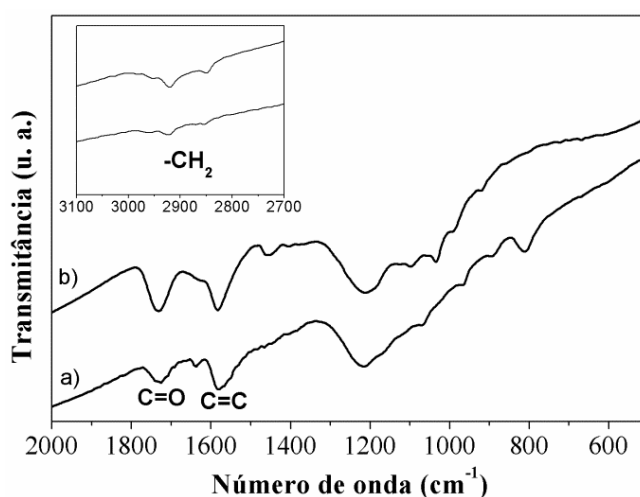


Figura 2.10 Espectro de infravermelho do GO a) e do nanocompósito GPMMA b).

As modificações superficiais introduzidas no GO implicam modificações ao nível da energia de superfície dos materiais obtidos. Nesse sentido foram efetuadas medidas de ângulos de contacto com água nos diferentes materiais. No caso do GO a gota de água foi imediatamente absorvida após contacto com a superfície, enquanto no caso do substrato GPMMA o ângulo de contacto obtido foi de $67,4 \pm 0,4^\circ$, valor este que se encontra de acordo com o valor descrito na literatura no caso de um substrato de PMMA puro (68°).⁷⁸

A caracterização das cadeias de PMMA crescidas na superfície do GO foi efetuada através de análise por SEC (cromatografia de exclusão molecular), o que permitiu obter informações importantes sobre os parâmetros relativos às cadeias poliméricas sintetizadas, peso molecular (Mw), número molecular (Mn) e distribuição do peso molecular (PD). De forma a realizar este estudo procedeu-se previamente à separação das cadeias de PMMA da superfície do GO por meio de hidrólise, seguindo para isso o

trabalho descrito por Bazkaran.⁷⁹ A análise de SEC obtida está ilustrada na Figura 2.11, a qual evidencia claramente que a polimerização é muito bem controlada, com um M_{WD} (ou PD) de 1,09. Por outro lado, o grau de polimerização foi de apenas 11. O baixo valor de M_w (1280) sugere também que a modificação da superfície do GO com o iniciador ATRP foi bastante eficiente, pois permitiu a formação de vários sítios ativos concorrentes pelo monómero disponível.

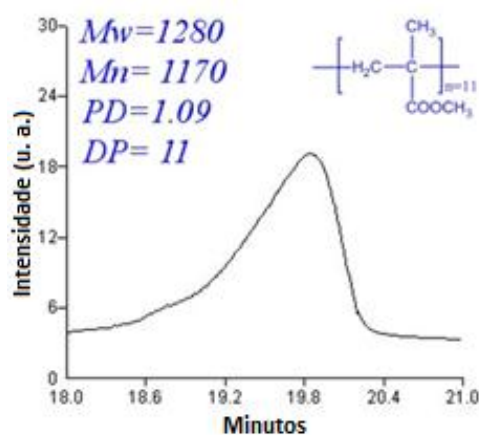


Figura 2.11 Análise de SEC do PMMA removido da superfície do nanocompósito GPMMA por hidrólise.

De modo a melhor compreender a estrutura dos nanocompósitos GPMMA foram efetuados estudos de decomposição térmica, por termogravimetria (Figura 2.12). O perfil de degradação térmica de um PMMA comercial foi traçado para comparação apesar de se verificarem características distintas entre o PMMA comercial e as cadeias de PMMA crescidas na superfície do GO, como por exemplo M_w e M_{WD} .

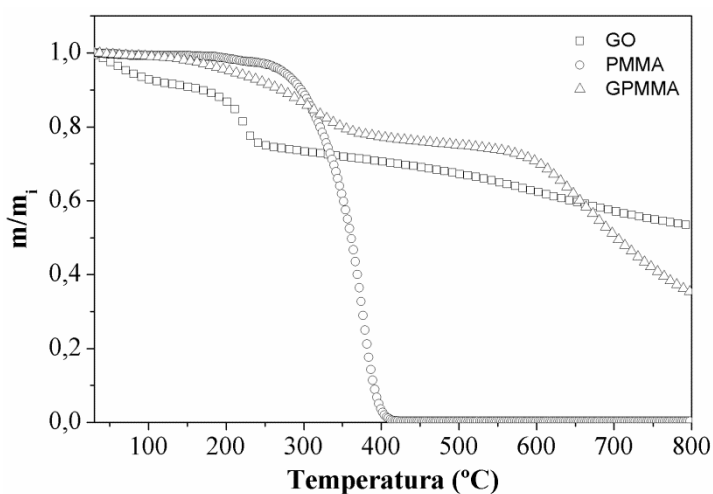


Figura 2.12 Curvas termogravimétricas de PMMA comercial, GO e do GPMMA.

Verifica-se que os perfis de decomposição dos três materiais são diferentes. A perda de peso de 25% entre 176 e 247 °C registado para o GO pode ser atribuída à decomposição dos grupos funcionais de oxigénio superficiais.⁸⁰ Após este decréscimo, o GO é estável até 500 °C valor após o qual ocorre a decomposição da estrutura do carbono.

Quanto ao nanocompósito GPMMA é observada uma perda de peso de cerca 35% entre 145 e 397 °C, enquanto para a amostra de PMMA comercial a degradação térmica só começa a valores de temperatura de aproximadamente 270 °C. A diferença entre o GPMMA e o PMMA comercial é provavelmente devida à decomposição térmica de grupos contendo oxigénio presente na superfície GPMMA resultantes de tratamentos de superfície anteriores do GO. Outras diferenças podem também ser observadas para temperaturas mais elevadas. Embora a amostra de PMMA comercial seja completamente degradada a 400 °C, o PMMA na superfície do GO é estável até 560 °C. O aumento da estabilidade térmica observada para o PMMA ancorado na superfície do grafeno pode ser atribuído à capacidade da superfície do grafeno para capturar radicais livres gerados durante a decomposição térmica.

Por forma a obter informações complementares às análises descritas anteriormente, foram realizados estudos por AFM em modo de fricção do GO e do nanocompósito GPMMA. A força de adesão (F_{ad}) e o coeficiente de atrito (μ) de um material dependem de sua estrutura atómica e podem ser calculados através da equação $F_L = \mu(F_N + F_{ad})$, onde F_L é a força lateral, também conhecida como força de atrito, e F_N a força normal (Figura 2.13).

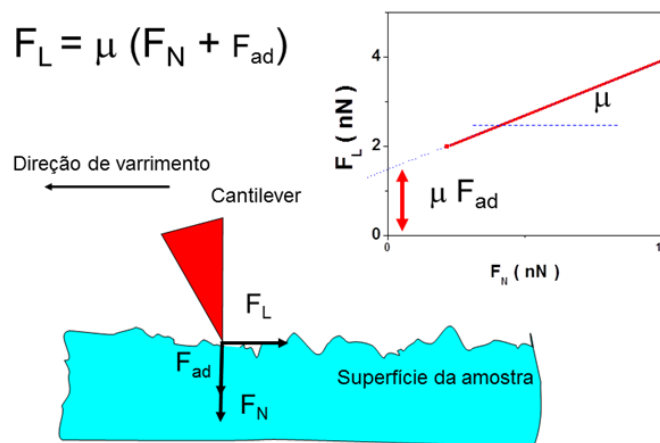


Figura 2.13 Representação esquemática do processo de determinação do coeficiente de atrito (μ) e Força de adesão (F_{ad}) de um material por AFM.

Os valores destes parâmetros foram calculados e encontram-se representados nos gráficos da Figura 2.14 onde é possível ver a resposta dos diferentes materiais à

aplicação de três forças normais diferentes. Os resultados mostram que os coeficientes de atrito são relativamente semelhantes em ambas as amostras. No entanto, a força de adesão é três vezes maior no caso das folhas de GO em relação ao GPMMA, $F_{ad}(GO)=11,8$ nN e $F_{ad}(GPMMA)= 3,4$ nN. Estes resultados podem ser atribuídos às diferenças químicas entre as superfícies do GO e do GPMMA que resultam em diferentes interações atômicas com o cantilever de AFM. Uma análise cuidadosa dos gráficos mostra uma relação linear entre as F_N e F_L , que apontam para uma distribuição homogênea das cadeias de polímero na superfície GO.

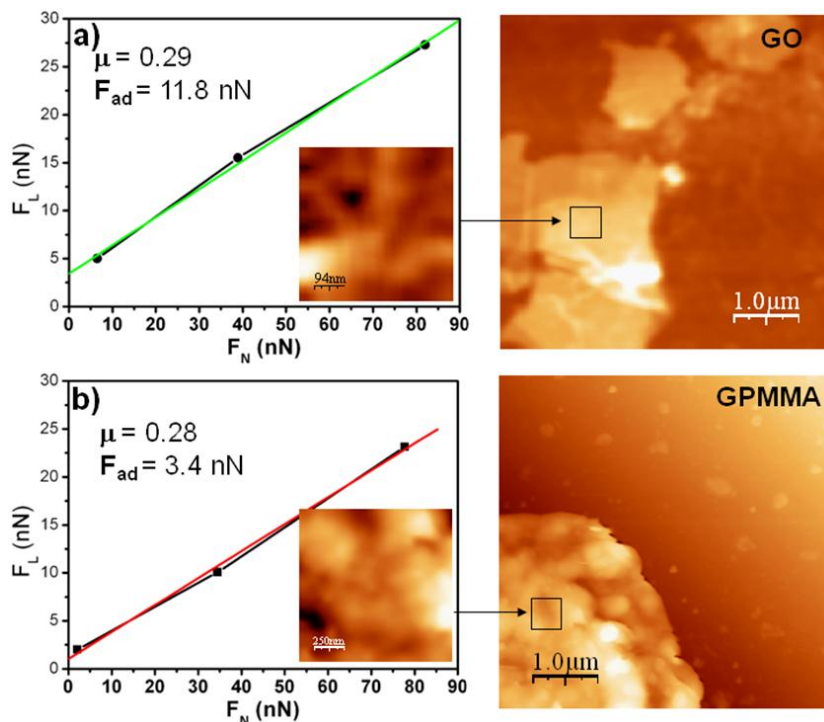


Figura 2.14 Análise por AFM da superfície do GO **a)** e do nanocompósito GPMMA **b)** em modo de fricção. A representação gráfica apresenta os resultados relativos à F_N em função da F_L segundo a equação, $F_L = \mu(F_N + F_{ad})$. As imagens de AFM da topografia do GO e do GPMMA foram obtidas em modo de contacto.

2.3.1 Filmes de PMMA reforçados com óxido de grafeno modificado

Uma das principais potencialidades do grafeno modificado com PMMA (GPMMA) destina-se obviamente à aplicação como agente de reforço em matrizes poliméricas de PMMA.⁴⁵ Com o objetivo de investigar a compatibilidade entre o grafeno modificado e a matriz de PMMA, foram preparados diversos filmes de PMMA com diferentes quantidades de GPMMA, 0,5, 1 e 3% (m/m). Na tentativa de melhor compreender o efeito real da integração do agente de reforço GPMMA na matriz de PMMA, foram também preparados

filmes de PMMA sem adição de qualquer agente de reforço e filmes com 1% (m/m) de GO, para comparação. Durante a preparação das suspensões ficou bem evidente que a dispersão do agente de reforço GPMMA na solução de PMMA em clorofórmio era muito mais efetiva do que para o caso do GO.

As imagens de SEM dos filmes de PMMA reforçados com grafeno modificado indiciam uma distribuição homogênea para filmes com cargas de 1% (m/m) (Figura 2.15a)), em contraste com os filmes com cargas de 3% (m/m) de grafeno modificado onde parece existir aglomeração na matriz de PMMA (Figura 2.15b)).

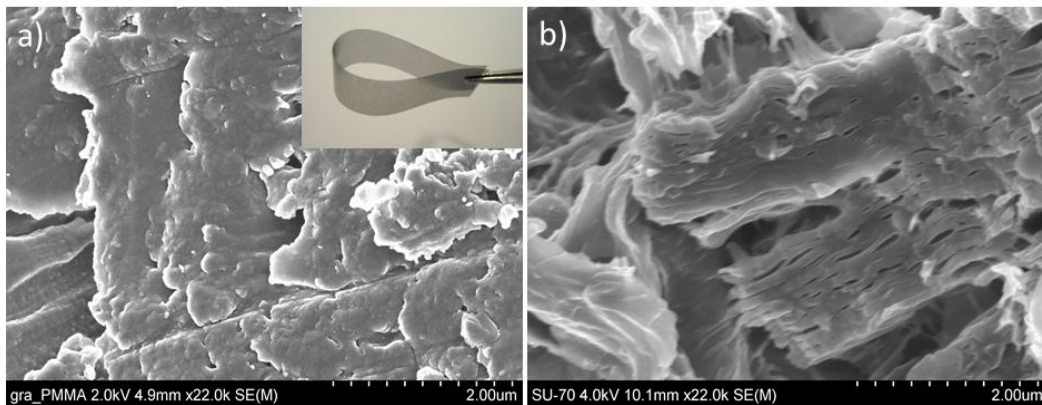


Figura 2.15 Imagens de SEM dos filmes de PMMA preparados com 1% (m/m) **a)** e 3% (m/m) **b)** de GPMMA. A fotografia demonstra a flexibilidade do filme com 1% (m/m).

Os filmes obtidos através do método de evaporação do solvente estão ilustrados na Figura 2.16 a). No caso dos filmes com o mesmo nível de carga **B** e **D** (1% (m/m) respetivamente de GPMMA e de GO) a diferença de dispersão é por demais evidente. Quando se usou GPMMA, obteve-se uma dispersão muito mais eficiente do que no caso do GO.

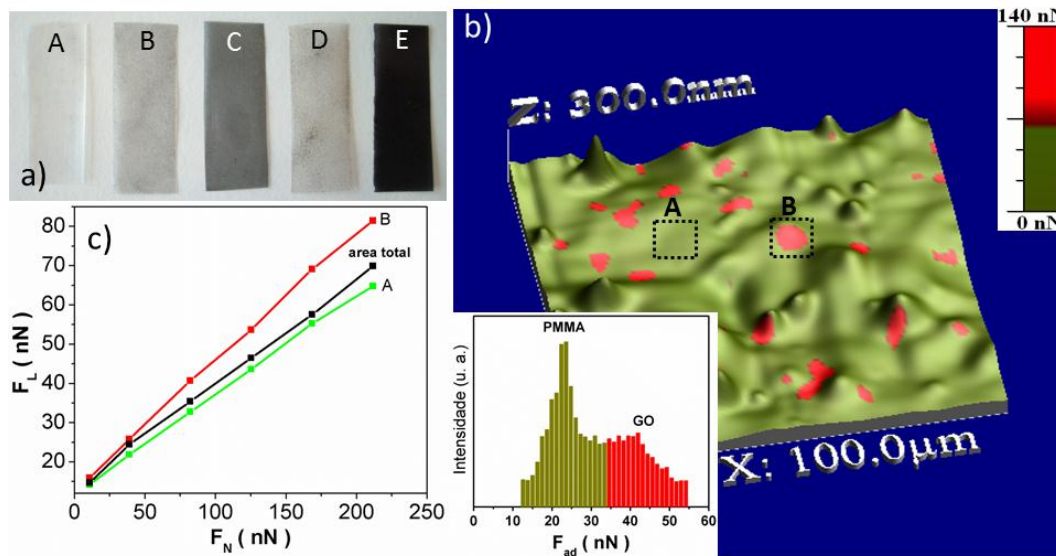


Figura 2.16 Imagem real dos filmes de PMMA preparados **A** PMMA, **B**: 0,5% de GPMMA, **C**: 1% de GPMMA, **D**: 1% de GO e **E**: 3% de GPMMA. A imagem 3D é obtida através de medidas de AFM em modo de contacto com uma F_N de ~ 80 nN. O gráfico de barras corresponde à intensidade da Força de adesão dependente do local de varrimento no filme compósito, PMMA (verde) e GO (vermelho). O gráfico da força F_L em função da F_N para a área total da imagem $100 \mu\text{m}^2$, PMMA (**A**) ou GPMMA (**B**).

A análise por AFM em modo de fricção permitiu obter resultados da distribuição dos grafenos modificados na matriz de PMMA. A Figura 2.16 b) representa uma imagem topográfica 3D (escala vertical) do filme preparado usando 1% (m/m) de GPMMA obtida com uma força normal de $F_N=80\text{nN}$. A superfície do filme exibe uma rugosidade superficial média (RMS) de aproximadamente 100 nm.

Através das medidas convencionais de AFM não é possível obter uma distinção clara entre o reforço e a matriz polimérica, contudo a análise de AFM em modo de fricção com diferentes forças aplicadas no cantiliver (F_N) permitiu uma abordagem que possibilitou a investigação da distribuição de grafeno na superfície dos filmes de PMMA. Enquanto a matriz de PMMA (Figura 2.16 -região A) apresenta uma força de atrito média de 22 nN, a zona com GPMMA (Figura 2.16- região B) apresenta uma força de atrito média de 42 nN. Estes valores podem ser justificados pela inferior interação atômica entre a ponta do cantiliver do AFM e a matriz de PMMA quando comparado com a região onde se encontram o grafeno modificado.⁸¹

Através da equação descrita anteriormente na qual se estabelece a relação entre a F_L e a F_N (representação esquemática 2.13), pode-se obter o μ e a F_{ad} para o PMMA (região A) e para o GPMMA (região B). A F_{ad} obtida para PMMA e para o GPMMA foi de 38,8 e 16,5

nN, respetivamente e o μ foi de 0,326 para o PMMA e de 0,516 para o GPMMA (Figura 2.16 c)).

O valor de F_{ad} mais elevado foi obtido para a matriz de PMMA e pode ser explicado pela mais fácil flexão da superfície do PMMA sob a ponta de AFM, o que como consequência, permite uma variação da área de contacto efetiva entre a amostra e a ponta de AFM. No que diz respeito à área de superfície total do filme considerada na Figura 2.16 b), é possível verificar que uma concentração bastante reduzida de GPMMA (1% (m/m)) leva a um aumento considerável da F_{ad} . O valor médio do μ de 0,32 para o PMMA está bem correlacionado com os dados encontrados na literatura.⁸²

O comportamento mecânico dos filmes compósitos foi também estudado através de ensaios de nanoindentação e de tração uniaxial. Em relação aos testes de nanoindentação, os dados obtidos para as curvas de penetração em função da força aplicada permitem obter informação sobre o tipo de comportamento dos diferentes filmes de nanocompósitos, deformação viscoelástica, elástica ou plástica.⁸³ A Figura 2.17 exhibe as curvas típicas de nanoindentação⁸⁴ para filmes de PMMA puro e para os filmes preparados com 0,5, 1 e 3% (m/m) de GPMMA e 1% (m/m) de GO. Os resultados indicam que a incorporação de cargas na matriz de PMMA aumenta a resistência à penetração do nanoindentador. Para o filme de PMMA puro, a penetração máxima de indentação à carga máxima de 1,0 mN foi 760 nm, sendo que para o caso do nanocompósito com 1% (m/m) de GO a penetração reduziu a 420 nm quando aplicada a mesma força. Esta redução foi ainda mais significativa para a série de filmes preparados com GPMMA, onde a penetração máxima foi de: 380 nm para o nanocompósito 0,5% (m/m), 290 nm para o nanocompósito 1% (m/m) e 350 nm para o nanocompósito 3% (m/m). Os resultados obtidos para as cargas 1% (m/m) para o GO e GPMMA permitem evidenciar que o efeito do reforço GPMMA é significativamente mais eficaz, o que permite concluir que de facto a modificação superficial do GO com pequenas cadeias de PMMA permite uma melhor integração na matriz de PMMA, como era expectável. Além disso, os resultados obtidos demonstram que os maiores valores de dureza são obtidos para o nanocompósito com 1% (m/m) de GPMMA. Isto pode estar associado a efeitos de percolação. Segundo Schaefer,⁸⁵ quando uma dispersão de partículas lamelares com carga superficial é colocada para secar, a intensidade da interação entre as lamelas pode levar a uma orientação local, proporcionando um processo de percolação ou formação de regiões mais ordenadas, o que explicaria em parte os melhores resultados obtidos para este nível de carga.

Por outro lado um elevado nível de agente de reforço pode levar a uma degradação das propriedades mecânicas dos nanocompósitos através de efeitos de saturação da matriz (3% (m/m)).

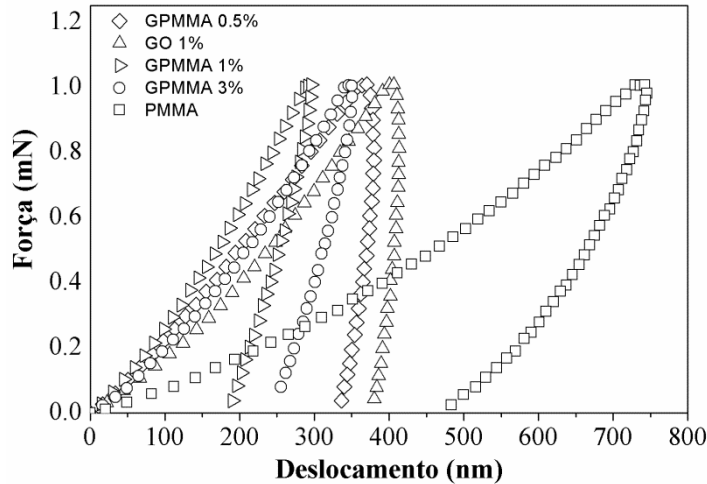


Figura 2.17 Curvas típicas de nanoidentação, Força-Deslocamento, para o filme de PMMA e PMMA reforçados com GO ou GPMMA.

Na tentativa de obter uma melhor compreensão da integração do GO ou GPMMA na matriz de PMMA foram também realizados testes de tração uniaxial. As curvas de tensão-deformação do filme de PMMA puro e dos filmes preparados com 0,5, 1 e 3% (m/m) de GPMMA e 1% de GO estão representadas na Figura 2.18. Os respectivos valores obtidos para os diferentes parâmetros mecânicos estão descritos na Tabela 2.2.

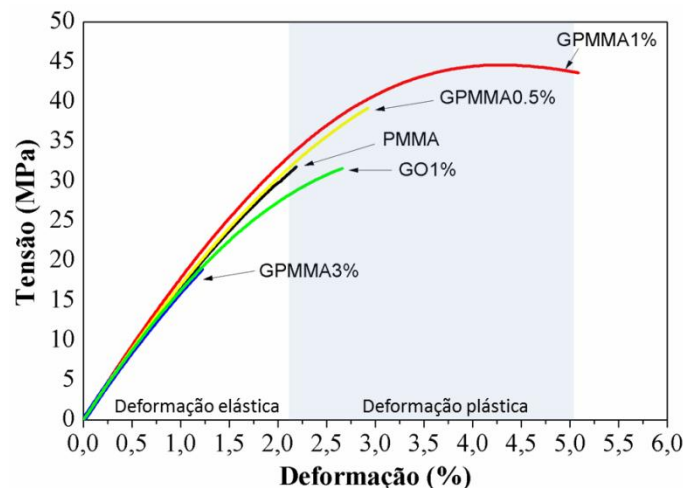


Figura 2.18 Curvas típicas de tração uniaxial (Tensão-Deformação) para o filme de PMMA e PMMA reforçados com GO ou GPMMA.

Para valores de tensão-deformação baixos, todas as amostras apresentam um comportamento elástico com um módulo de Young que varia entre 18,7 MPa para o PMMA puro e 21,8 MPa para os filmes preparados com 1% (m/m) de GPMMA (o valor mais elevado obtido). O nanocompósito com 1% (m/m) de GPMMA também apresentou um regime acentuado de deformação plástica quando comparado com os outros materiais, apresentando valores de alongação máxima médios de 4,8% para níveis de força máxima de 42,0 MPa (à rutura). Tais melhorias mecânicas podem ser atribuídas à transferência de carga mais eficiente entre a folha de grafeno modificado e a matriz de PMMA. No entanto, o aumento da concentração de GPMMA para valores de cerca de 3% (m/m) originou um deterioramento do comportamento mecânico do filme compósito. Declínios semelhantes das propriedades mecânicas de materiais compósitos poliméricos contendo MWCNTs modificados foram também referenciados, e atribuídos a efeitos de agregação.^{86, 87}

Tabela 2.2 Efeito do grafeno, tipo e quantidade, nas propriedades mecânicas dos filmes de PMMA.

Propriedades mecânicas	Grafeno (% m/m)				
	0	0,5(GPMMA)	1(GPMMA)	3(GPMMA)	1(GO)
Módulo de Young (MPa)	18,7±0,2	20,9±0,9	21,8±0,6	15,6±0,9	14,5±0,8
Resistência à tração (MPa)	35,5±2,2	37,1±3,8	42,0±2,4	21,4±1,8	32,7±2,3
Alongamento na rutura (%)	2,3±0,2	3,5±0,8	4,8±0,3	0,9±0,1	2,7±0,2

No caso dos filmes preparados com 1% (m/m) de GO, os valores obtidos para o módulo de elasticidade, resistência à tração e alongamento à rutura são comparativamente menores do que os valores obtidos para 0,5 e 1% (m/m) de GPMMA na matriz de PMMA. Estes resultados indicam que as folhas de GO não estabelecem interfaces apropriadas com a matriz de PMMA, ou seja, pode haver uma falta de transferência de carga da matriz para as folhas de GO o que se reflete diretamente no comportamento mecânico do compósito como um todo. Os valores de módulo de Young e resistência à tração são ainda menores do que os valores obtidos para o filme de PMMA puro. Além disso, o alongamento à rutura para o nanocompósito GO 1% (m/m) é de cerca de 2,7%, o que é

ligeiramente superior do que o PMMA puro (2,3%). Este comportamento pode ser devido à presença de folhas de grafeno que são conhecidas por ter um comportamento elasto-plástico.^{65, 88-90}

2.4 Conclusão

O método de síntese utilizado na preparação do GO através da esfoliação química da grafite demonstrou enormes potencialidades, pois tal como os resultados indicam é possível obter uma boa esfoliação com folhas de GO maioritariamente com 2 camadas de carbono. Por outro lado verificou-se que a redução térmica ou química de GO permite a obtenção de grafeno com baixa densidade de grupos funcionais de oxigénio e com integridade da malha de carbono.

Neste trabalho foi também evidente que a funcionalização química do GO permite obter novos materiais nanocompósitos. A funcionalização orgânica covalente do GO através do crescimento de cadeias poliméricas de PMMA por polimerização via ATRP demonstrou ser um método bastante efetivo. Neste processo de síntese ficou evidente que os grupos funcionais na superfície do GO (especialmente carboxílicos e hidroxilos) têm um papel preponderante, pois atuam como sítios reativos na ligação do agente iniciador de ATRP.

A grande vantagem da modificação superficial do GO através do mecanismo de polimerização ATRP é de por um lado permitir obter um controlo efetivo do crescimento das cadeias poliméricas e de por outro lado apresentar uma grande versatilidade. Esta versatilidade consiste no facto de após a ancoragem do agente iniciador de ATRP à superfície do GO ser possível realizar o crescimento de diversos polímeros ou copolímeros dependendo para isso apenas da escolha adequada do monómero (esta versatilidade não foi estudada neste trabalho).

Contudo este tipo de polimerização apresenta também algumas limitações que condicionam a sua aplicação. Este tipo de polimerização é bastante efetiva quando preparada em pequena escala, todavia quando se pretende realizar a modificação superficial do GO em larga escala por este método, o tamanho das cadeias apresenta maior polidispersibilidade e a modificação superficial dos GO deixa de ser homogénea, obtendo-se alguns GO não modificados.

A análise dos resultados obtidos através da incorporação de grafenos modificados em filmes de PMMA permitiu evidenciar que é essencial compatibilizar as interfaces dos materiais para que se obtenha o máximo rendimento de todos os componentes inseridos no sistema nanocompósito. Neste trabalho foi possível verificar através da comparação efetuada entre as propriedades mecânicas dos filmes de PMMA com GO ou com GPMMA que é crucial um controlo efetivo da química de superfície do reforço por forma a maximizar a dispersão e as interações na matriz polimérica de PMMA e assim obter o máximo benefício das propriedades mecânicas no sistema.

2.5 Parte experimental

2.5.1 Síntese de óxido de grafeno

A esfoliação química da grafite foi baseada no método descrito por Hummers e Offeman.¹³ Num balão de vidro de 250 mL foram adicionados 50 mL de H₂SO₄ concentrado e 2 g de grafite à temperatura ambiente. O balão foi arrefecido até 0 °C num banho de gelo, e posteriormente foram adicionados lentamente 7 g de KMnO₄. Elevou-se a temperatura da mistura reativa até 35 °C num banho de água e manteve-se a agitação magnética durante duas horas. Seguidamente, a mistura reacional foi novamente arrefecida em banho de gelo e adicionou-se água destilada em excesso seguida de uma solução de H₂O₂ (30% em água) até a libertação de gases cessar.

A suspensão resultante foi extensivamente lavada, primeiro com uma solução diluída de HCl (0,1 moldm⁻³) e posteriormente com água destilada através do processo de filtração. Finalmente o material foi centrifugado a 3000 rpm várias vezes e lavado por forma a remover os resíduos de grafite não exfoliada e vestígios de oxidantes.

O material resultante foi seco através de um processo de liofilização por forma a evitar aglomeração das partículas. Este material resultante será referido como GO.

2.5.1.1 Redução térmica do óxido de grafeno

O óxido de grafeno preparado anteriormente (20 mg) foi inserido num tubo de quartzo em atmosfera de argón. Posteriormente, o tubo foi inserido numa mufla previamente aquecida a 1050 °C durante 30 s. Este tratamento permite uma esfoliação mais extensiva do grafeno e ao mesmo tempo permite a remoção de grande parte dos grupos funcionais de oxigénio com libertação de CO₂ e H₂O. Este material será referido como grafeno termicamente reduzido (GTR, do inglês graphene termically reduced).

2.5.1.2 Redução química do óxido de grafeno através de hidrazina

Cem miligramas de GO foram inseridos num balão de fundo redondo de 250 mL com 100 mL de água. O GO foi disperso na solução aquosa com auxílio de ultrassons, resultando numa solução coloidal homogénea de cor acastanhada. Como agente redutor, foi adicionado 1 mL de hidrazina (32,1 mmol) à solução anterior que posteriormente foi aquecida num banho de óleo a 100 °C durante 24h, à medida que o processo de redução ocorria o GO foi gradualmente formando aglomerados de cor preta. Por fim o material foi lavado extensivamente com água por centrifugação e isolado por liofilização. O material resultante será denominado como grafeno reduzido por hidrazina (GHR, Graphene hydrazine reduced).

2.5.2 Modificação superficial do óxido de grafeno com cadeias de PMMA via ATRP

Este procedimento envolve uma reação com três passos distintos como ilustra o esquema da Figura 2.6.⁴⁵ Na Etapa I o GO (200 mg) foi dissolvido em SOCl_2 (20 mL) e agitado com barra magnética durante 24 h a 65 °C num balão de fundo redondo equipado com um condensador em atmosfera inerte (N_2). Após a reação, o excesso de SOCl_2 foi removido por centrifugações sucessivas e redispersão usando THF. O sólido resultante foi disperso em etileno glicol (20 mL) num balão de fundo redondo equipado com um condensador e a suspensão foi agitada durante 48 h a 120 °C. Tal como anteriormente, o excesso de etileno glicol foi removido por centrifugações sucessivas e redispersão usando THF. O sólido foi então seco sob vácuo para produzir grafeno funcionalizado com grupos hidroxilos (G-OH).

Na etapa II o G-OH (200 mg) foi disperso em CHCl_3 (15 mL) num balão de fundo redondo. A suspensão foi purgada com N_2 durante uma hora, em seguida foi adicionada trietilamina (1,64 mmol) e 4-dimetilaminopiridina (1,64 mmol) e a mistura foi agitada durante 1 h. Seguidamente, foi adicionado à mistura o iniciador ATRP (brometo de 2-bromo-2-metilpropionil) (13,0 mmol), que foi mantida em agitação durante 48 h à temperatura ambiente. O grafeno modificado com o iniciador de ATRP (G-Br) foi purificado por centrifugações sucessivas e redispersão em CHCl_3 .

Na etapa III o G-Br (200 mg) foi dissolvido em DMF (6 mL) ao qual foi adicionado CuBr (0,27 mmol) e PMDETA (0,27 mmol). Após purga do sistema reacional com N_2 durante 30 min, foi adicionado metacrilato de metilo (28 mmol) e a temperatura foi aumentada para 65 °C. A polimerização foi realizada durante 24 h. O grafeno modificado com PMMA (GPMMA) foi isolado por centrifugações sucessivas e redispersão em CHCl_3 . Todas as etapas de modificação foram monitoradas através de testes de solubilidade.

2.5.3 Preparação dos filmes de PMMA reforçados com grafenos

A preparação dos filmes de PMMA foi baseada no método de evaporação de solvente (solvent casting). Primeiro, as quantidades específicas de grafenos (modificados ou não) foram dispersas em clorofórmio através de ultrassons durante 30 minutos à temperatura ambiente, posteriormente o PMMA foi dissolvido no mesmo meio. As misturas resultantes foram lentamente depositadas em placas de Teflon e secas a 85 °C durante a noite. Finalmente, os filmes secos foram removidos das placas de Teflon e armazenados numa câmara a 25 °C e com 40% de humidade antes da análise. Os filmes obtidos apresentavam uma espessura média de $0,065 \pm 0,002$ mm.

2.6 Caracterização

Microscopia eletrônica de transmissão em alta resolução (HRTEM)

Ver apêndice II (pág. 201)

Microscopia eletrônica de varrimento (SEM)

Ver apêndice II (pág. 201)

Espectroscopia vibracional de infravermelho (IV)

Os espectros de infravermelho das diferentes amostras foram obtidos através de pastilhas de KBr (Aldrich, 99%, FT-IR grade) com um espectrofotômetro Mattson 7000 FT-IR com uma resolução 4 cm^{-1} e 256 acumulações.

Determinação do potencial zeta (ZP)

As medições de potencial zeta foram obtidas com recurso ao equipamento Zeta Sizer Nano Series (Malvern). Para estas medições, as soluções aquosas de grafenos foram previamente tratadas através de ultrassons por forma a obter uma boa dispersão.

Microscopia de força atômica (AFM)

Ver apêndice II (pág. 201)

Termogravimetria (TGA)

As análises termogravimétricas foram obtidas através do equipamento Shimadzu TGA 50 equipado com uma célula de platina. As amostras foram aquecidas a uma velocidade constante $10^{\circ}\text{C}/\text{min}$, desde a temperatura ambiente até 600°C , em atmosfera de N_2 .

Cromatografia de exclusão molecular (SEC)

Ver apêndice II (pág. 201)

2.7 Referências

1. R. Mas-Balleste, C. Gomez-Navarro, J. Gomez-Herrero, F. Zamora, "2D materials: to graphene and beyond" *Nanoscale* 2011, 3, (1), 20-30.
2. C. Lee, X. D. Wei, J. W. Kysar, J. Hone, "Measurement of the elastic properties and intrinsic strength of monolayer graphene" *Science* 2008, 321, (5887), 385-388.
3. Y. B. Zhang, Y. W. Tan, H. L. Stormer, P. Kim, "Experimental observation of the quantum Hall effect and Berry's phase in graphene" *Nature* 2005, 438, (7065), 201-204.
4. A. A. Balandin, S. Ghosh, W. Z. Bao, I. Calizo, D. Teweldebrhan, F. Miao, C. N. Lau, "Superior thermal conductivity of single-layer graphene" *Nano Lett.* 2008, 8, (3), 902-907.
5. K. I. Bolotin, K. J. Sikes, Z. Jiang, M. Klima, G. Fudenberg, J. Hone, P. Kim, H. L. Stormer, "Ultrahigh electron mobility in suspended graphene" *Solid State Commun.* 2008, 146, (9-10), 351-355.
6. I. W. Frank, D. M. Tanenbaum, A. M. Van der Zande, P. L. McEuen, "Mechanical properties of suspended graphene sheets" *J. Vac. Sci. Technol B* 2007, 25, (6), 2558-2561.
7. Soldano C., Mahmood, D. E., "Production, properties and potential of graphene." *Carbon* 2010, 48, (8), 2127-2150.
8. L. P. Biro, P. Nemes-Incze, P. Lambin, "Graphene: nanoscale processing and recent applications" *Nanoscale* 2012.
9. K. S. Novoselov, A. K. Geim, S. V. Morozov, D. Jiang, Y. Zhang, S. V. Dubonos, I. V. Grigorieva, A. A. Firsov, "Electric field effect in atomically thin carbon films" *Science* 2004, 306, (5296), 666-669.
10. H.-P. Boehm, "Graphene—How a Laboratory Curiosity Suddenly Became Extremely Interesting" *Angew. Chem. Int. Ed.* 2010, 49, (49), 9332-9335.
11. L. Staudenmaier, "Verfahren zur Darstellung der Graphitsäure" *Ber Deut Chem* 1898, (31), 1481-1487.
12. B. Brodie, "Sur le poids atomique du graphite" *Ann Chem Phys* 1860, (59), 466-471.
13. W. S. Hummers, R. E. Offeman, "Preparation of graphitic oxide" *J. Am. Chem. Soc.* 1958, 80, (6), 1339-1339.
14. M. J. Allen, V. C. Tung, R. B. Kaner, "Honeycomb Carbon: A Review of Graphene" *Chem. Rev.* 2010, 110, (1), 132-145.
15. S. R. Wang, Y. Zhang, N. Abidi, L. Cabrales, "Wettability and Surface Free Energy of Graphene Films" *Langmuir* 2009, 25, (18), 11078-11081.

16. M. Lotya, Y. Hernandez, P. J. King, R. J. Smith, V. Nicolosi, L. S. Karlsson, F. M. Blighe, S. De, Z. Wang, I. T. McGovern, G. S. Duesberg, J. N. Coleman, "Liquid Phase Production of Graphene by Exfoliation of Graphite in Surfactant/Water Solutions" *J. Am. Chem. Soc.* 2009, 131, (10), 3611-3620.
17. L. Zhao, K. T. Rim, H. Zhou, R. He, T. F. Heinz, A. Pinczuk, G. W. Flynn, A. N. Pasupathy, "Influence of copper crystal surface on the CVD growth of large area monolayer graphene" *Solid State Commun.* 2011, 151, (7), 509-513.
18. Ushio S, Arata Yoshii, Naoto Tamai, Noboru Ohtani, T. Kaneko, "Wide-range temperature dependence of epitaxial graphene growth on 4H-SiC (0 0 0 -1): A study of ridge structures formation dynamics associated with temperature." *J. Cryst. Growth* 2011, 318, (1), 590-594.
19. W. Gao, L. B. Alemany, L. Ci, P. M. Ajayan, "New insights into the structure and reduction of graphite oxide" *Nat. Chem.* 2009, 1, (5), 403-408.
20. X. Gao, J. Jang, S. Nagase, "Hydrazine and Thermal Reduction of Graphene Oxide: Reaction Mechanisms, Product Structures, and Reaction Design" *J. Phys. Chem. C* 2010, 114, (2), 832-842.
21. C. Gomez-Navarro, J. C. Meyer, R. S. Sundaram, A. Chuvilin, S. Kurasch, M. Burghard, K. Kern, U. Kaiser, "Atomic Structure of Reduced Graphene Oxide" *Nano Lett.* 2010, 10, (4), 1144-1148.
22. S. Mao, H. Pu, J. Chen, "Graphene oxide and its reduction: modeling and experimental progress" *Rsc Advances* 2012, 2, (7), 2643-2662.
23. J. R. Potts, S. H. Lee, T. M. Alam, J. An, M. D. Stoller, R. D. Piner, R. S. Ruoff, "Thermomechanical properties of chemically modified graphene/poly(methyl methacrylate) composites made by in situ polymerization" *Carbon* 2011, 49, (8), 2615-2623.
24. S. Das, A. S. Wajid, J. L. Shelburne, Y.-C. Liao, M. J. Green, "Localized In situ Polymerization on Graphene Surfaces for Stabilized Graphene Dispersions" *Acs Appl. Mater. Interf.* 2011, 3, (6), 1844-1851.
25. X. Wang, Y. Hu, L. Song, H. Yang, W. Xing, H. Lu, "In situ polymerization of graphene nanosheets and polyurethane with enhanced mechanical and thermal properties" *J. Mater. Chem.* 2011, 21, (12), 4222-4227.
26. L. Kan, Z. Xu, C. Gao, "General Avenue to Individually Dispersed Graphene Oxide-Based Two-Dimensional Molecular Brushes by Free Radical Polymerization" *Macromolecules* 2011, 44, (3), 444-452.
27. K. Liu, L. Chen, Y. Chen, J. Wu, W. Zhang, F. Chen, Q. Fu, "Preparation of polyester/reduced graphene oxide composites via in situ melt polycondensation and simultaneous thermo-reduction of graphene oxide" *J. Mater. Chem.* 2011, 21, (24), 8612-8617.

28. K. P. Pramoda, H. Hussain, H. M. Koh, H. R. Tan, C. B. He, "Covalent Bonded Polymer-Graphene Nanocomposites" *J. Polym. Sci. Pol. Chem.* 2010, 48, (19), 4262-4267.
29. S. M. Kang, S. Park, D. Kim, S. Y. Park, R. S. Ruoff, H. Lee, "Simultaneous Reduction and Surface Functionalization of Graphene Oxide by Mussel-Inspired Chemistry" *Adv. Funct. Mater.* 2011, 21, (1), 108-112.
30. Y. Wang, Z. Shi, J. Fang, H. Xu, X. Ma, J. Yin, "Direct exfoliation of graphene in methanesulfonic acid and facile synthesis of graphene/polybenzimidazole nanocomposites" *J. Mater. Chem.* 2011, 21, (2), 505-512.
31. S. Sun, P. Wu, "A one-step strategy for thermal- and pH-responsive graphene oxide interpenetrating polymer hydrogel networks" *J. Mater. Chem.* 2011, 21, (12), 4095-4097.
32. B. Zhang, Y. Chen, X. Zhuang, G. Liu, B. Yu, E.-T. Kang, J. Zhu, Y. Li, "Poly(*N*-Vinylcarbazole) Chemically Modified Graphene Oxide" *J. Polym. Sci. Pol. Chem.* 2010, 48, (12), 2642-2649.
33. Y. Deng, Y. Li, J. Dai, M. Lang, X. Huang, "An Efficient Way to Functionalize Graphene Sheets with Presynthesized Polymer via ATNRC Chemistry" *J. Polym. Sci. Pol. Chem.* 2011, 49, (7), 1582-1590.
34. P. Zhang, K. Jiang, C. Ye, Y. Zhao, "Facile synthesis of V-shaped copolymer brushes grafted onto the surface of graphene oxide via coupling reactions" *Chem. Commun.* 2011, 47, (33), 9504-9506.
35. D. Vuluga, J.-M. Thomassin, I. Molenberg, I. Huynen, B. Gilbert, C. Jerome, M. Alexandre, C. Detrembleur, "Straightforward synthesis of conductive graphene/polymer nanocomposites from graphite oxide" *Chem. Commun.* 2011, 47, (9), 2544-2546.
36. Y. Cao, Z. Lai, J. Feng, P. Wu, "Graphene oxide sheets covalently functionalized with block copolymers via click chemistry as reinforcing fillers" *J. Mater. Chem.* 2011, 21, (25), 9271-9278.
37. H. He, C. Gao, "General Approach to Individually Dispersed, Highly Soluble, and Conductive Graphene Nanosheets Functionalized by Nitrene Chemistry" *Chem. Mater.* 2010, 22, (17), 5054-5064.
38. X. Yang, L. Li, S. Shang, X.-m. Tao, "Synthesis and characterization of layer-aligned poly(vinyl alcohol)/graphene nanocomposites" *Polymer* 2010, 51, (15), 3431-3435.
39. M. Fang, K. Wang, H. Lu, Y. Yang, S. Nutt, "Single-layer graphene nanosheets with controlled grafting of polymer chains" *J. Mater. Chem.* 2010, 20, (10), 1982-1992.
40. S. H. Lee, D. R. Dreyer, J. An, A. Velamakanni, R. D. Piner, S. Park, Y. Zhu, S. O. Kim, C. W. Bielawski, R. S. Ruoff, "Polymer Brushes via Controlled, Surface-Initiated Atom Transfer Radical Polymerization (ATRP) from Graphene Oxide" *Macromol. Rapid Comm.* 2010, 31, (3), 281-288.

41. G. L. Li, G. Liu, M. Li, D. Wan, K. G. Neoh, E. T. Kang, "Organo- and Water-Dispersible Graphene Oxide-Polymer Nanosheets for Organic Electronic Memory and Gold Nanocomposites" *J. Phys. Chem. C* 2010, 114, (29), 12742-12748.
42. Y. Yang, J. Wang, J. Zhang, J. Liu, X. Yang, H. Zhao, "Exfoliated Graphite Oxide Decorated by PDMAEMA Chains and Polymer Particles" *Langmuir* 2009, 25, (19), 11808-11814.
43. J. Iruthayaraj, S. Chernyy, M. Lillethorup, M. Ceccato, T. Ron, M. Hinge, P. Kingshott, F. Besenbacher, S. U. Pedersen, K. Daasbjerg, "On Surface-Initiated Atom Transfer Radical Polymerization Using Diazonium Chemistry To Introduce the Initiator Layer" *Langmuir* 2011, 27, (3), 1070-1078.
44. M. Fang, K. Wang, H. Lu, Y. Yang, S. Nutt, "Covalent polymer functionalization of graphene nanosheets and mechanical properties of composites" *J. Mater. Chem.* 2009, 19, (38), 7098-7105.
45. G. Goncalves, P. Marques, A. Barros-Timmons, I. Bdkin, M. K. Singh, N. Emami, J. Gracio, "Graphene oxide modified with PMMA via ATRP as a reinforcement filler" *J. Mater. Chem.* 2010, 20, (44), 9927-9934.
46. B. Zhang, Y. Chen, L. Xu, L. Zeng, Y. He, E.-T. Kang, J. Zhang, "Growing Poly(*N*-vinylcarbazole) from the Surface of Graphene Oxide via RAFT Polymerization" *J. Polym. Sci. Polym. Chem.* 2011, 49, (9), 2043-2050.
47. H. M. Etmimi, M. P. Tonge, R. D. Sanderson, "Synthesis and Characterization of Polystyrene-Graphite Nanocomposites via Surface RAFT-Mediated Miniemulsion Polymerization" *J. Polym. Sci. Polym. Chem.* 2011, 49, (7), 1621-1632.
48. Y. Li, X. Li, C. Dong, J. Qi, X. Han, "A graphene oxide-based molecularly imprinted polymer platform for detecting endocrine disrupting chemicals" *Carbon* 2010, 48, (12), 3427-3433.
49. K. Jiang, C. Ye, P. Zhang, X. Wang, Y. Zhao, "One-Pot Controlled Synthesis of Homopolymers and Diblock Copolymers Grafted Graphene Oxide Using Couplable RAFT Agents" *Macromolecules* 2012, 45, (3), 1346-1355.
50. V. Singh, D. Joung, L. Zhai, S. Das, S. I. Khondaker, S. Seal, "Graphene based materials: Past, present and future" *Prog. Mater. Sci.* 2011, 56, (8), 1178-1271.
51. T. Kuilla, S. Bhadra, D. Yao, N. H. Kim, S. Bose, J. H. Lee, "Recent advances in graphene based polymer composites" *Prog. Polym. Sci.* 2010, 35, (11), 1350-1375.
52. G. Goncalves, P. Marques, C. M. Granadeiro, H. I. S. Nogueira, M. K. Singh, J. Gracio, "Surface Modification of Graphene Nanosheets with Gold Nanoparticles: The Role of Oxygen Moieties at Graphene Surface on Gold Nucleation and Growth" *Chem. Mater.* 2009, 21, (20), 4796-4802.

53. K. R. Koch, P. F. Krause, "Oxidation by Mn_2O_7 – An impressive demonstration of the powerful oxidizing property of dimanganeseheptoxide" *J. Chem. Educ.* 1982, 59, (11), 973-974.
54. A. Simon, R. Dronskowski, B. Krebs, B. Hettich, "The crystal-structure of Mn_2O_7 " *Angew. Chem. Int. Ed.* 1987, 26, (2), 139-140.
55. M. Tromel, M. Russ, "Diamanganese heptoxide for the selective oxidation of organic substrates" *Angew. Chem. Int. Ed.* 1987, 26, (10), 1007-1009.
56. T. Sun, S. Fabris, "*Mechanisms for Oxidative Unzipping and Cutting of Graphene*" *Nano Lett.* 2011, 12, (1), 17-21.
57. S. Pan, I. A. Aksay, "*Factors Controlling the Size of Graphene Oxide Sheets Produced via the Graphite Oxide Route*" *Acs Nano* 2011, 5, (5), 4073-4083.
58. M. Mermoux, Y. Chabre, A. Rousseau, "*FTIR and C-13 NMR-Study of graphite oxide*" *Carbon* 1991, 29, (3), 469-474.
59. T. Nakajima, A. Mabuchi, R. Hagiwara, "*A new structure model of graphite oxide*" *Carbon* 1988, 26, (3), 357-361.
60. T. Szabo, O. Berkesi, P. Forgo, K. Josepovits, Y. Sanakis, D. Petridis, I. Dekany, "*Evolution of surface functional groups in a series of progressively oxidized graphite oxides*" *Chem. Mater.* 2006, 18, (11), 2740-2749.
61. T. Szabo, E. Tombacz, E. Illes, I. Dekany, "*Enhanced acidity and pH-dependent surface charge characterization of successively oxidized graphite oxides*" *Carbon* 2006, 44, (3), 537-545.
62. A. M. Dimiev, D. V. Kosynkin, L. B. Alemany, P. Chaguine, J. M. Tour, "*Pristine Graphite Oxide*" *J. Am. Chem. Soc.* 2012, 134, (5), 2815-2822.
63. A. Gupta, G. Chen, P. Joshi, S. Tadigadapa, P. C. Eklund, "*Raman scattering from high-frequency phonons in supported n-graphene layer films*" *Nano Lett.* 2006, 6, (12), 2667-2673.
64. H. C. Schniepp, J. L. Li, M. J. McAllister, H. Sai, M. Herrera-Alonso, D. H. Adamson, R. K. Prud'homme, R. Car, D. A. Saville, I. A. Aksay, "*Functionalized single graphene sheets derived from splitting graphite oxide*" *J. Phys. Chem. B* 2006, 110, (17), 8535-8539.
65. S. Stankovich, D. A. Dikin, R. D. Piner, K. A. Kohlhaas, A. Kleinhammes, Y. Jia, Y. Wu, S. T. Nguyen, R. S. Ruoff, "*Synthesis of graphene-based nanosheets via chemical reduction of exfoliated graphite oxide*" *Carbon* 2007, 45, (7), 1558-1565.
66. S. Stankovich, R. D. Piner, S. T. Nguyen, R. S. Ruoff, "*Synthesis and exfoliation of isocyanate-treated graphene oxide nanoplatelets*" *Carbon* 2006, 44, (15), 3342-3347.
67. J. I. Paredes, S. Villar-Rodil, A. Martinez-Alonso, J. M. D. Tascon, "*Graphene oxide dispersions in organic solvents*" *Langmuir* 2008, 24, (19), 10560-10564.

68. A. B. Bourlinos, D. Gournis, D. Petridis, T. Szabo, A. Szeri, I. Dekany, "Graphite oxide: Chemical reduction to graphite and surface modification with primary aliphatic amines and amino acids" *Langmuir* 2003, 19, (15), 6050-6055.
69. C. Xu, X. Wang, J. W. Zhu, "Graphene-Metal Particle Nanocomposites" *J. Phys. Chem. C* 2008, 112, (50), 19841-19845.
70. M. Acik, G. Lee, C. Mattevi, M. Chhowalla, K. Cho, Y. J. Chabal, "Unusual infrared-absorption mechanism in thermally reduced graphene oxide" *Nat. Mater.* 2010, 9, (10), 840-845.
71. S. Park, Y. Hu, J. O. Hwang, E.-S. Lee, L. B. Casabianca, W. Cai, J. R. Potts, H.-W. Ha, S. Chen, J. Oh, S. O. Kim, Y.-H. Kim, Y. Ishii, R. S. Ruoff, "Chemical structures of hydrazine-treated graphene oxide and generation of aromatic nitrogen doping" *Nature Commun.* 2012, 3.
72. A. Bagri, C. Mattevi, M. Acik, Y. J. Chabal, M. Chhowalla, V. B. Shenoy, "Structural evolution during the reduction of chemically derived graphene oxide" *Nat. Chem.* 2010, 2, (7), 581-587.
73. Z. Spitalsky, D. Tasis, K. Papagelis, C. Galiotis, "Carbon nanotube-polymer composites: Chemistry, processing, mechanical and electrical properties" *Progr. Polym. Sci.* 2010, 35, (3), 357-401.
74. A. O. Nidermayer, "Gas chromatographic analysis of C₂-C₁₆Acyl chorides as butanol-2 esters" *Anal. Chem.* 1967, 39, (8), 953-955.
75. Y. F. Yang, J. Wang, J. Zhang, J. C. Liu, X. L. Yang, H. Y. Zhao, "Exfoliated Graphite Oxide Decorated by PDMAEMA Chains and Polymer Particles" *Langmuir* 2009, 25, (19), 11808-11814.
76. M. Fang, K. G. Wang, H. B. Lu, Y. L. Yang, S. Nutt, "Single-layer graphene nanosheets with controlled grafting of polymer chains" *J. Mater. Chem.* 2010, 20, (10), 1982-1992.
77. H. F. Yang, F. H. Li, C. S. Shan, D. X. Han, Q. X. Zhang, L. Niu, A. Ivaska, "Covalent functionalization of chemically converted graphene sheets via silane and its reinforcement" *J. Mater. Chem.* 2009, 19, (26), 4632-4638.
78. Y. Ma, X. Y. Cao, X. J. Feng, Y. M. Ma, H. Zou, "Fabrication of super-hydrophobic film from PMMA with intrinsic water contact angle below 90 degrees" *Polymer* 2007, 48, (26), 7455-7460.
79. D. Baskaran, J. W. Mays, M. S. Bratcher, "Polymer-grafted multiwalled carbon nanotubes through surface-initiated polymerization" *Angew. Chem. Int. Ed.* 2004, 43, (16), 2138-2142.
80. X. B. Fan, W. C. Peng, Y. Li, X. Y. Li, S. L. Wang, G. L. Zhang, F. B. Zhang, "Deoxygenation of Exfoliated Graphite Oxide under Alkaline Conditions: A Green Route to Graphene Preparation" *Adv. Mater.* 2008, 20, (23), 4490-4493.

81. C. Lee, X. Wei, Q. Li, R. Carpick, J. W. Kysar, J. Hone, "*Elastic and frictional properties of graphene*" *Phys. Status Solidi B* 2009, 246, (11-12), 2562-2567.
82. H. C, *Polymer Materials : An Introduction for Technologists and Scientists*. 2nd ed.; London, 1989.
83. K. Yusoh, J. Jin, M. Song, "*Subsurface mechanical properties of polyurethane/organoclay nanocomposite thin films studied by nanoindentation*" *Progr. Org. Coat.* 2010, 67, (2), 220-224.
84. H. N. Dhakal, Z. Y. Zhang, M. O. W. Richardson, "*Nanoindentation behaviour of layered silicate reinforced unsaturated polyester nanocomposites*" *Polym. Test.* 2006, 25, (6), 846-852.
85. D. W. Schaefer, R. S. Justice, "*How Nano Are Nanocomposites?*" *Macromolecules* 2007, 40, 8501-8517.
86. B.-X. Yang, J.-H. Shi, K. P. Pramoda, S. H. Goh, "*Enhancement of the mechanical properties of polypropylene using polypropylene-grafted multiwalled carbon nanotubes*" *Comp. Sci. Tech.* 2008, 68, (12), 2490-2497.
87. D. Blond, V. Barron, M. Ruether, K. P. Ryan, V. Nicolosi, W. J. Blau, J. N. Coleman, "*Enhancement of modulus, strength, and toughness in poly(methyl methacrylate)-based composites by the incorporation of poly(methyl methacrylate)-functionalized nanotubes*" *Adv. Funct. Mater.* 2006, 16, (12), 1608-1614.
88. S. Stankovich, D. A. Dikin, G. H. B. Dommett, K. M. Kohlhaas, E. J. Zimney, E. A. Stach, R. D. Piner, S. T. Nguyen, R. S. Ruoff, "*Graphene-based composite materials*" *Nature* 2006, 442, (7100), 282-286.
89. M. Topsakal, S. Ciraci, "*Elastic and plastic deformation of graphene, silicene, and boron nitride honeycomb nanoribbons under uniaxial tension: A first-principles density-functional theory study*" *Phys. Rev. B* 2010, 81, (2).
90. T. Tallinen, J. A. Astrom, J. Timonen, "*The effect of plasticity in crumpling of thin sheets*" *Nat. Mater.* 2009, 8, (1), 25-29.

Capítulo III

Cimentos ósseos à base de PMMA/HA reforçados com nanoestruturas de carbono

Neste capítulo será investigada a influência da adição de nanoestruturas de carbono numa nova matriz para cimento ósseo composta por Polimetilmetacrilato/Hidroxiapatite (PMMA/HA) na razão de 1:2 nas propriedades finais do compósito. O método de preparação da nova fração sólida do cimento ósseo consiste na homogeneização de todos os componentes em solução aquosa (PMMA, HA e GO ou CNTs) através do recurso a várias técnicas e posterior eliminação da água por liofilização. A conformação dos cimentos ósseos baseia-se na simples mistura dos componentes líquido e sólido o que promove a polimerização radicalar do PMMA.

Por forma a obter uma dispersão máxima das nanoestruturas de carbono em solução aquosa, maximizar as interações químicas com a matriz de PMMA/HA e consequentemente obter uma valorização máxima das propriedades mecânicas finais no material compósito, as nanoestruturas de carbono foram usadas no seu estado oxidado. O nível de cargas usado foi diferenciado por forma a maximizar as propriedades mecânicas no compósito final, quer para o caso do GO quer para os CNTS.

Índice

CAPÍTULO III - CIMENTOS ÓSSEOS À BASE DE PMMA/HA REFORÇADOS COM NANOESTRUTURAS DE CARBONO	115
3.1 INTRODUÇÃO.....	118
3.2 CARACTERIZAÇÃO DAS NANOESTRUTURAS DE CARBONO	120
3.3 SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DE NANOCOMPÓSITOS PMMA/HA REFORÇADOS COM NANOESTRUTURAS DE CARBONO.....	123
3.3.1 Síntese da componente sólida do cimento ósseo.....	123
3.3.2 Caracterização mecânica dos novos cimentos ósseos.....	124
3.3.3 Efeito das nanoestruturas de carbono na polimerização radicalar do PMMA.	129
3.3.4 Caracterização das cadeias poliméricas de PMMA após polimerização radicalar	132
3.4 NANOCOMPÓSITOS DE PMMA/HA REFORÇADOS COM NANOESTRUTURAS DE CARBONO COM INCREMENTO DE AGENTES RADICALES	136
3.4.1 Controlo da concentração de agentes radicalares.....	136
3.4.2 Efeito do aumento da concentração de radicais nos nanocompósitos com GO	140
3.5 CARACTERIZAÇÃO DOS NANOCOMPÓSITOS 0.1CNT E 0.5GO SEGUNDO A NORMA ISO 5833	144
3.5.1 Testes de flexão.....	144
3.5.2 Testes de compressão	146
3.5.3 Teste “Push-out”.....	147
3.4.1 Estudo do tempo de cura “Setting time”.....	148
3.6 CONCLUSÃO	150
3.7 PARTE EXPERIMENTAL	151
3.7.1 Hidroxiapatite	151
3.7.2 Preparação do nanocompósito PMMA/HA reforçado com nanoestruturas de carbono.....	151
3.7.3 Conformação das amostras de cimento ósseo para os diferentes testes	152
3.7.4 Adição de agentes radicalares BPO e DMT a ambos os componentes do cimento ósseo	152
3.7.5 Extração por Soxhlet da fração macromolecular dos nanocompósitos	153

3.8 CARACTERIZAÇÃO	154
3.9 REFERÊNCIAS.....	156

3.1 Introdução

Como referido anteriormente, o objetivo principal desta tese é o estudo e desenvolvimento de novas formulações de cimento ósseos à base de PMMA com elevado nível de bioatividade para com os tecidos ósseos circundantes.

O processo biológico de osteointegração pode ser efetivamente incrementado através da incorporação de agentes osteoindutores na matriz de PMMA, o que permite melhorar a resposta biológica ao cimento por parte do tecido ósseo circundante ao implante, e assim beneficiar a sua integração óssea.^{1, 2} A HA é um fosfato de cálcio sintético que se assemelha quimicamente à componente mineral dos tecidos ósseos, que evidencia efeitos osteocondutores e osteoindutivos.³

No entanto a adição de material particulado (tal como por exemplo a HA) à matriz de cimento ósseo encontra-se limitado a pequenas frações (<10% vol.), sem que se tenha um efeito prejudicial grave nas propriedades mecânicas do nanocompósito final.^{4, 5} Mas por outro lado, alguns estudos também revelam ser necessário cargas de material bioativo superiores a 60% em massa (~35% vol.) numa matriz de PMMA para que a interação biológica com os tecidos circundantes seja significativa,⁶ pois os fosfatos de cálcio são apenas ativos quando expostos.⁷ Neste sentido torna-se assim pertinente utilizar uma carga elevada de HA na formulação dos novos cimentos ósseos. Por forma a evitar a degradação das propriedades mecânicas dos materiais compósitos por excesso de carga inorgânica pode-se usar como agente de reforço dos elementos descritos anteriormente (PMMA e HA) as nanoestruturas de carbono. O objetivo final passa pela obtenção de um equilíbrio entre a bioatividade e a integridade mecânica do nanocompósito.

Este conceito foi já pontualmente estudado por Singh *et al.* que propuseram uma nova formulação de cimento ósseo de PMMA com 67% em massa (~42% vol.) de HA reforçada com CNTs.⁸ Este nanocompósito apresenta um conteúdo de HA superior ao limite inferior mínimo para que um cimento se torne bioativo e ao mesmo tempo apresenta propriedades mecânicas interessantes devido à presença do agente de reforço na matriz os CNTs. Estudos biológicos (*in vitro* e *in vivo*) destes novos materiais nanocompósitos demonstraram que estes apresentam a capacidade para acelerar a maturação celular (*in vitro*), o que possibilita o desenvolvimento mais rápido da matriz óssea na zona do implante facilitando assim o processo de osseointegração *in vivo*.^{2, 8}

Com o aparecimento do grafeno, uma forma alotrópica de carbono com uma geometria completamente nova (espessura atómica e bidimensional), a atenção tem sido dedicada a este tipo de material devido às propriedades que derivam da sua morfologia singular:

excepcionais propriedades térmicas, eletrônicas e mecânicas.⁹ Além disso, o grafeno pode melhorar significativamente as propriedades físicas de polímeros com baixas cargas de reforço.¹⁰⁻¹³ Naturalmente, o grafeno é referido como um substituto natural dos CNTs para o reforço mecânico de matrizes poliméricas.^{14, 15} Na verdade, o facto de o grafeno poder ser produzido de uma forma relativamente simples, em grande escala, e em combinação com baixos custos de produção, torna-o um material sobejamente atraente para o desenvolvimento de novos nanocompósitos poliméricos multifuncionais.¹⁴

Uma das questões chaves para no uso de nanoestruturas de carbono (CNT ou GO) como agente de reforço em matrizes poliméricas é a forma como estes permitem incrementar as propriedades mecânicas do material nanocompósito final.¹⁴⁻¹⁷ Os resultados dependem de vários aspetos, tais como a escolha do polímero, as metodologias de síntese, percentagem de cargas, interfaces, entre outros. As principais conclusões apontam que a melhoria das propriedades físico-químicas dos nanocompósitos depende essencialmente da distribuição do reforço na matriz polimérica, o que para isso muito contribui a afinidade química entre as interfaces de ambos.¹⁸ O tipo de interação entre o reforço e o polímero vai determinar as propriedades finais dos nanocompósitos.¹⁹

No presente trabalho pretende-se compreender a influência do grafeno nas propriedades mecânicas da nova formulação de cimento ósseo PMMA/HA (1:2). A fim de melhor compreender a interação das nanoestruturas de carbono com a matriz de PMMA/HA, os nanocompósitos reforçados com CNTs também foram comparativamente estudados.

O grafeno foi utilizado no seu estado oxidado, ou seja sob a forma de GO, uma vez que estudos anteriores mostraram que a presença de grupos funcionais de oxigênio na superfície nanoestruturas de carbono facilita a sua dispersão na matriz polimérica, reduzindo simultaneamente a sua toxicidade.^{2, 8, 20, 21} Além disso, a combinação de nanoestruturas funcionalizadas com a polimerização *in situ* é considerado um excelente método para produzir efeitos verdadeiramente sinérgicos entre os diferentes materiais do compósito.²²

3.2 Caracterização das nanoestruturas de carbono

Os nanotubos de carbono de parede múltipla utilizados neste trabalho foram adquiridos comercialmente (Nanocyl-3150, pureza > 95%) e posteriormente funcionalizados com diversos grupos de oxigénio através da oxidação com uma mistura reacional de ácido sulfúrico e nítrico (3:1).⁸ A imagem de SEM permite verificar que o tamanho dos nanotubos é da ordem de grandeza de alguns microns e com uma espessura entre 30 e 50 nm (Figura 3.1 a)). Através da análise da imagem de TEM pode-se verificar que os CNTs são constituídos por uma zona central oca e com paredes laterais com uma espessura média de cerca de $3,73 \pm 0,31$ nm (Figura 3.1 b)). Esta espessura mais elevada das paredes laterais dos nanotubos de carbono deve-se ao facto de estes se encontrarem no estado oxidado.

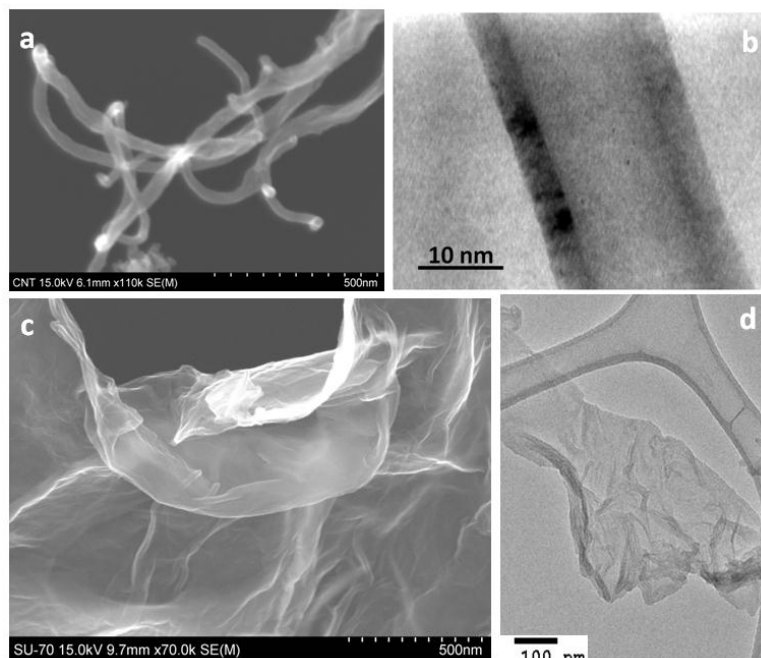


Figura 3.1 Imagens de microscopia de SEM **a)** e **c)** e TEM **b)** e **d)** dos CNTs funcionalizados e do GO, respetivamente.

As folhas de GO sintetizadas, como descritas no capítulo anterior consistem em finas camadas de carbono como se pode verificar através das análises de microscopia de SEM e TEM na Figura 3.1 c) e d). É possível também verificar a textura enrugada da superfície do GO, o que pode ser uma característica bastante importante para um material que atua como agente de reforço.

A distribuição de tamanhos das folhas de GO e a respetiva espessura foram obtidas por análise de AFM. O tamanho médio das folhas de GO encontra-se no intervalo entre cerca

de 200 nm até 3 µm enquanto que a sua espessura média é na ordem dos 1,2 nm, o que consiste em folhas com cerca de 2 camadas de carbono (para análise mais detalhada da estrutura físico-química do GO consultar o Capítulo II - Síntese caracterização e modificação superficial do óxido de grafeno).

A análise por Espectroscopia de foto-eletrões de raios-X (XPS) foi utilizada para determinar os grupos funcionais de oxigénio presentes na superfície das nanoestruturas, CNTs e GO (Tabela 3.1). Os resultados indicam um nível mais elevado de oxidação da superfície do GO quando comparado com os CNTs. Considerando todos os grupos funcionais de oxigénio,²³⁻²⁵ os resultados mostram um valor médio global de 48,6% at. para o GO e 13,9% at. para os CNTs.

Os resultados relativos dos diferentes tipos de grupos funcionais de oxigénio predominantes na superfície de ambas as nanoestruturas estão também descritos na Tabela 3.1, na qual se pode verificar que o GO apresenta uma maior predominância de grupos epóxido (42,55% at.) e de grupos carbonilo (4,14% at.) quando comparado com os CNTs (6,57% at. e 3,51% at. respetivamente). Por outro lado é possível verificar que os CNTs apresentam alguma predominância ao nível de grupos carboxílicos (3,88% at.) quando comparados com o GO (1,88% at.).

Tabela 3.1 Análise de XPS dos grupos funcionais de oxigénio na superfície do GO e dos CNTs.

C1s	GO		CNTs	
	Be (eV)	AC (% at.)	Be (eV)	AC (% at.)
C-C	285	15,67	285,4	12,89
C-O	286,9	42,55	286,4	6,57
C=O	288,2	4,14	287,4	3,51
C(O)O	289,2	1,88	288,6	3,88

O maior grau de funcionalização do GO pode ser entendido pelo facto de que o nível de defeitos estruturais no GO ser também mais elevado, muito em parte devido ao elevado número de zonas de fratura dos planos de carbono e defeitos internos na matriz de carbono.²⁶ Por outro lado, o facto da superfície interna e externa dos CNTs não terem o

mesmo grau de reatividade²⁷ (devido a questões dimensionais) torna o GO mais versátil a nível de oxidação, pois ambas as superfícies apresentam reatividades idênticas.

3.3 Síntese e caracterização de nanocompósitos PMMA/HA reforçados com nanoestruturas de carbono

3.3.1 Síntese da componente sólida do cimento ósseo

O processo de síntese dos nanocompósitos à base de PMMA e HA (1:2) reforçados com nanoestruturas de carbono envolve vários passos, como se pode verificar na representação esquemática seguinte (Figura 3.2), que se refere especificamente ao caso de o agente de reforço ser o GO (contudo o procedimento experimental é semelhante para os CNTs). O primeiro passo consiste na obtenção de uma dispersão homogênea em solução aquosa de hidroxiapatite e da respetiva nanoestrutura de carbono (na percentagem em massa previamente definida) através de ultrassons. Após este passo, procede-se à adição da fração sólida do cimento ósseo comercial (**Apêndice 1**- Cimento ósseo comercial CMW1) através de simples agitação mecânica. De forma a obter uma fração sólida o mais homogênea possível utiliza-se o processo de granulação por congelamento (Freeze granulation), que consiste na pulverização de pequenas gotículas da suspensão anterior em azoto liquido para que estas passem rapidamente ao estado solido e mantenham a sua homogeneidade. Após este procedimento a água é eliminada através de um processo de liofilização, o que permite manter a homogeneidade da composição após eliminação do solvente (Figura 3.2).

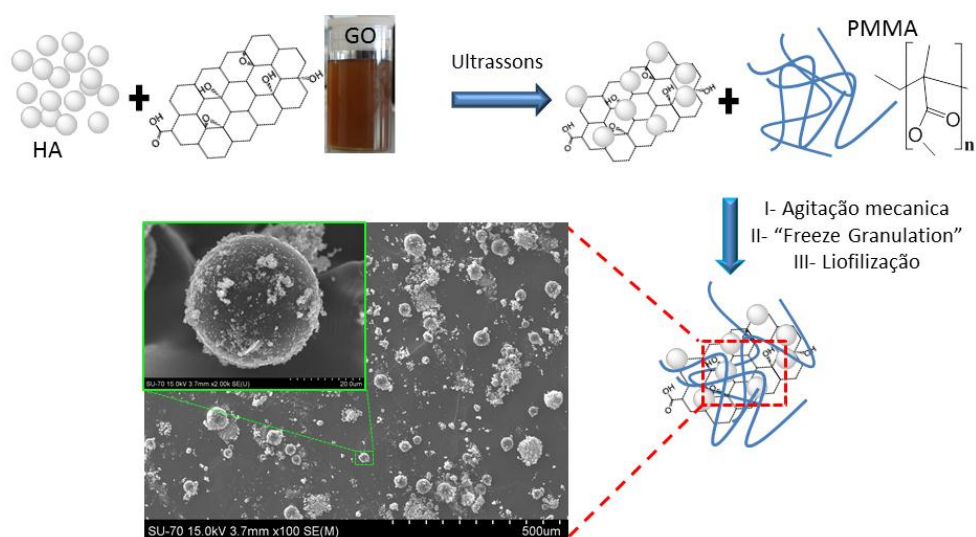


Figura 3.2 Representação esquemática da preparação de nanocompósitos de cimentos ósseos à base de PMMA/HA (1:2) reforçados com nanoestruturas de carbono. Imagem de SEM do nanocompósito após todo o processo de síntese. A imagem ampliada mostra uma partícula de PMMA pré-polimerizado com uma distribuição homogênea de todos os componentes adicionados na sua superfície (HA e GO).

A conformação dos cimentos ósseos consiste na adição do componente líquido polimerizante do cimento ósseo comercial à nova fração sólida desenvolvida, na proporção indicada na parte experimental (3.7.2 Conformação das amostras de cimento ósseo para os diferentes testes). Após a adição destas duas frações tem início o processo de polimerização o que permite a sua conformação num corpo sólido rígido no molde pretendido.

3.3.2 Caracterização mecânica dos novos cimentos ósseos

Com o objetivo de melhor compreender a influência das nanoestruturas de carbono na matriz de PMMA/HA foram elaborados diversos nanocompósitos com diferentes percentagens de agente de reforço (CNTs ou GO), 0,01, 0,1, 0,5 e 1% (m/m). Os provetes de PMMA/HA com diferentes cargas de nanoestruturas de carbono foram caracterizados através de diversos testes mecânicos standardizados para este tipo de materiais.

A presença das nanoestruturas de carbono na matriz de PMMA/HA permitiu aumentar o valor do módulo de Young, sendo que o valor inicial era de ~ 6 GPa. Com a incorporação de 0,1% (m/m) de CNTs na matriz atingiu-se o valor máximo de 8,47 GPa, valor superado para o caso dos nanocompósitos reforçados com GO nas diferentes percentagens, sendo que o valor máximo foi atingido para cargas de GO de 1% (m/m), 10,22 GPa.

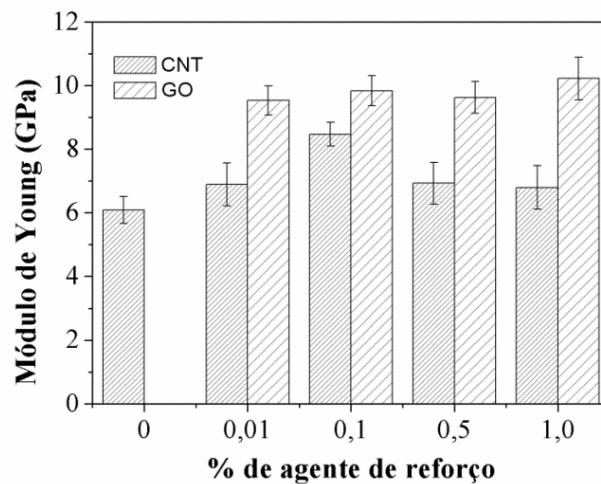


Figura 3.3 Módulo de Young dos nanocompósitos PMMA/HA reforçados com diferentes percentagens de GO e CNTs, 0,01, 0,1, 0,5 e 1% (m/m).

Considerando a resistência à flexão destes materiais, os nanocompósitos reforçados com CNTs parecem ser afetados negativamente quando comparados com os valores apresentados pela matriz de PMMA/HA. Pelo contrário, a presença de GO influenciou

positivamente a resistência à flexão, quando comparado com a matriz de PMMA/HA (20,00 MPa), apresentando o maior valor de resistência à flexão de cerca de 28,28 MPa para os nanocompósitos reforçados com 1% (m/m) de GO (Figura 3.4).

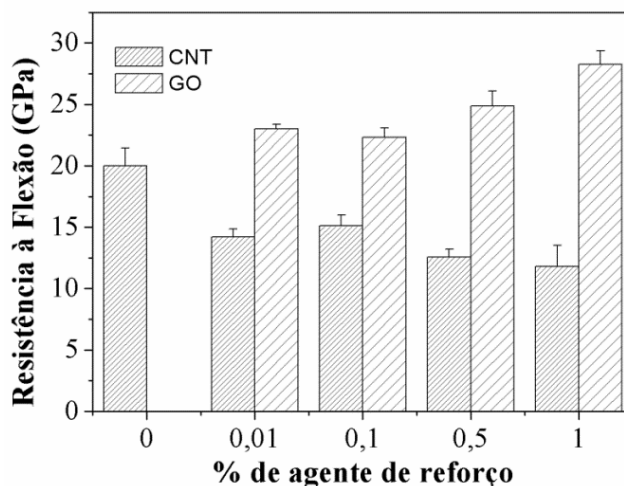


Figura 3.4 Testes de resistência à flexão dos nanocompósitos PMMA/HA reforçados com diferentes percentagens de GO e CNTs, 0,01, 0,1, 0,5 e 1% (m/m).

Este efeito da degradação das propriedades mecânicas dos cimentos reforçados com CNTs tinha já sido verificado anteriormente no trabalho realizado por Ormsby, em que o aumento da concentração de CNTs funcionalizados com grupos carboxílicos na matriz de cimento ósseo provocou uma diminuição das propriedades mecânicas.²⁸ A razão para este comportamento, segundo os autores, foi atribuída à falta de dispersão dos CNTs na matriz de cimento ósseo para concentrações $\geq 0,5\%$ (m/m). Assim, segundo estes autores, a presença de aglomerados poderia acelerar a degradação mecânica do material nanocompósito quando sujeito a forças. No entanto esta justificação não parece ser a mais plausível, pois neste estudo verificou-se que pequenas adições de CNTs (0,01% (m/m)) levam a uma elevada degradação das propriedades mecânicas dos nanocompósitos.

Para melhor compreender os resultados obtidos nos testes de flexão foram obtidas algumas imagens de SEM da superfície de fratura dos nanocompósitos (Figura 3.5). Efetivamente no caso dos materiais reforçados com CNTs nota-se um aumento da porosidade com o aumento da percentagem de cargas. Na Figura 3.5a) verifica-se que o material contendo 1% (m/m) de CNTs é extremamente poroso o que constitui certamente uma razão para a degradação das suas propriedades mecânicas, como verificado anteriormente.

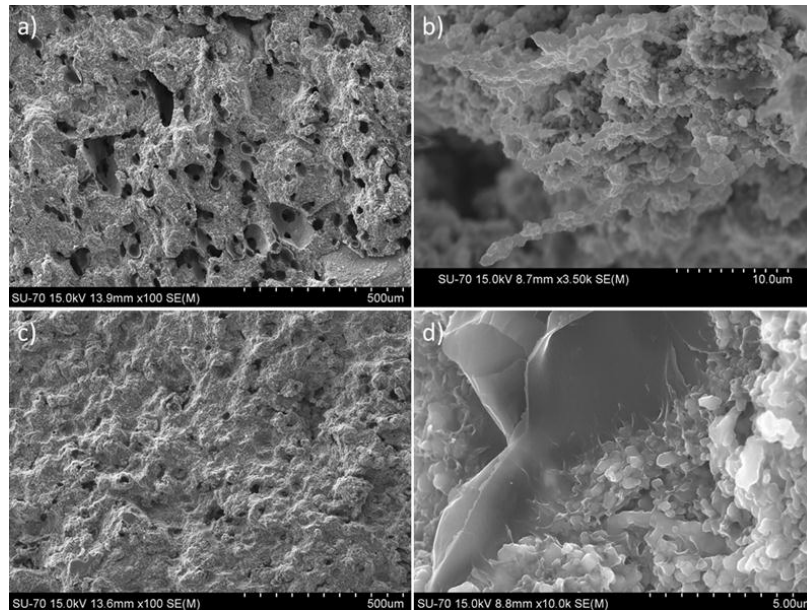


Figura 3.5 Imagens de SEM das zonas de fratura dos nanocompósitos de cimentos ósseos reforçados com 1% (m/m) de CNTs **a)** e **b)** e 1% (m/m) de **GO c)** e **d)**.

No caso do nanocompósito preparado com 1% (m/m) de GO, a densidade de poros é relativamente menor (Figura 3.5c)). Estes resultados sugerem que as nanoestruturas de carbono, particularmente os CNTs, possam ter uma influência preponderante no processo de polimerização radicalar do MMA, prejudicando o seu curso normal. Assim, a origem desta porosidade poderá estar associada à libertação de monómero MMA durante o processo de polimerização, sendo que este monómero é volátil à temperatura ambiente.

Ainda em relação análise de SEM, é importante destacar a boa integração das nanoestruturas de carbono na matriz de PMMA/HA como pode ser observado na Figura. 3.5b) e 3.5d), para os CNTs e GO, respetivamente. Estas evidências demonstram a eficiência das metodologias experimentais utilizadas para dispersar e homogeneizar as diferentes fases dos nanocompósitos.

Estudos de DMA (Dynamic mechanical analysis) permitiram obter resultados relativos ao módulo de armazenamento (*storage modulus*) dos diferentes nanocompósitos. Os valores de módulo de armazenamento obtidos para os nanocompósitos reforçados com CNTs apresentam valores relativamente inferiores aos valores obtidos para a matriz de PMMA/HA (2,67 GPa). De facto este decréscimo é mais acentuado com o aumento da percentagem de CNTs, 0,5 e 1% (m/m) (Figura 3.6).

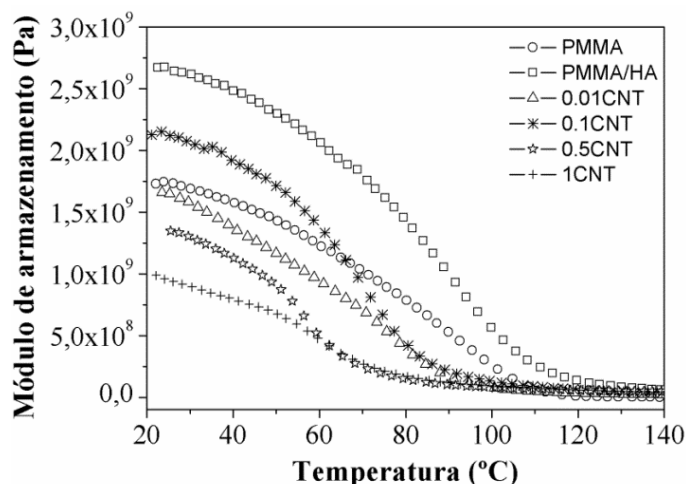


Figura 3.6 Módulo de armazenamento em função da temperatura dos nanocompósitos PMMA/HA reforçados com diferentes percentagens de CNTs, 0,01, 0,1, 0,5 e 1 % (m/m).

No caso dos nanocompósitos reforçados com GO os valores de módulo de armazenamento são também inferiores aos valores obtidos para a matriz de PMMA/HA (Figura 3.7). Contudo neste caso verifica-se que os valores de módulo de armazenamento obtidos para os diferentes nanocompósitos reforçados com GO não apresentam uma tão grande sensibilidade ao aumento da percentagem do agente de reforço como no caso dos CNTs.

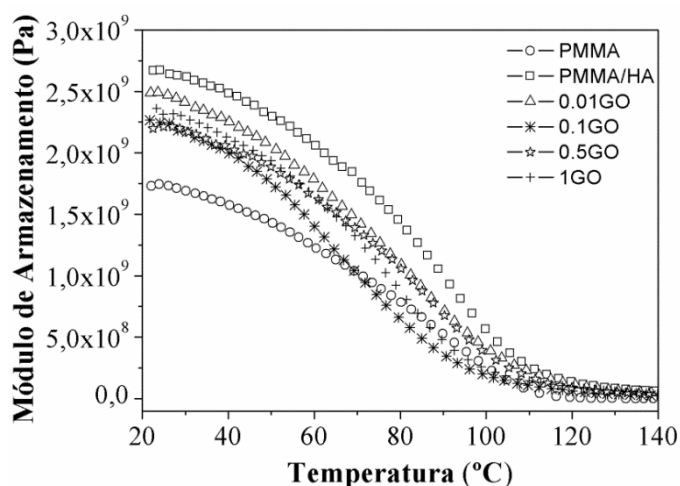


Figura 3.7 Módulo de armazenamento em função da temperatura dos nanocompósitos PMMA/HA reforçados com diferentes percentagens de GO, 0,01, 0,1, 0,5 e 1 % (m/m).

Os estudos de DMA permitiram também obter os valores de T_g para os nanocompósitos reforçados com diferentes quantidades de CNT ou GO, e estão representados

respetivamente, na Figura 3.8 a) e 3.8 b). Em geral, a altura dos picos *tan delta* dos diferentes nanocompósitos diminuiu e alargou apenas com a introdução de HA na matriz de PMMA, este fenómeno reflete as restrições impostas pela fase inorgânica à mobilidade das cadeias de polímero. No caso dos nanocompósitos reforçados com CNTs, o aumento do seu teor na matriz de PMMA/HA originou uma diminuição clara nos valores de Tg do polímero, 120 °C (PMMA) > 118 °C (PMMA/HA) > 95 °C (0.01CNT) > 91 °C (0.1CNT) > 70 °C (0.5CNT) > 68 °C (1CNT). No caso dos nanocompósitos reforçados com GO este efeito não foi tão acentuado, em especial no caso com menor teor de GO 0,01% (m/m), apresentando apenas uma pequena variação nos valores de Tg de 120 °C para 118 °C. Com o aumento do teor de GO na matriz de PMMA/HA verifica-se claramente um alargamento de banda para valores inferiores de Tg, mantendo um primeiro pico a 118 °C e formando um novo a 98 °C.

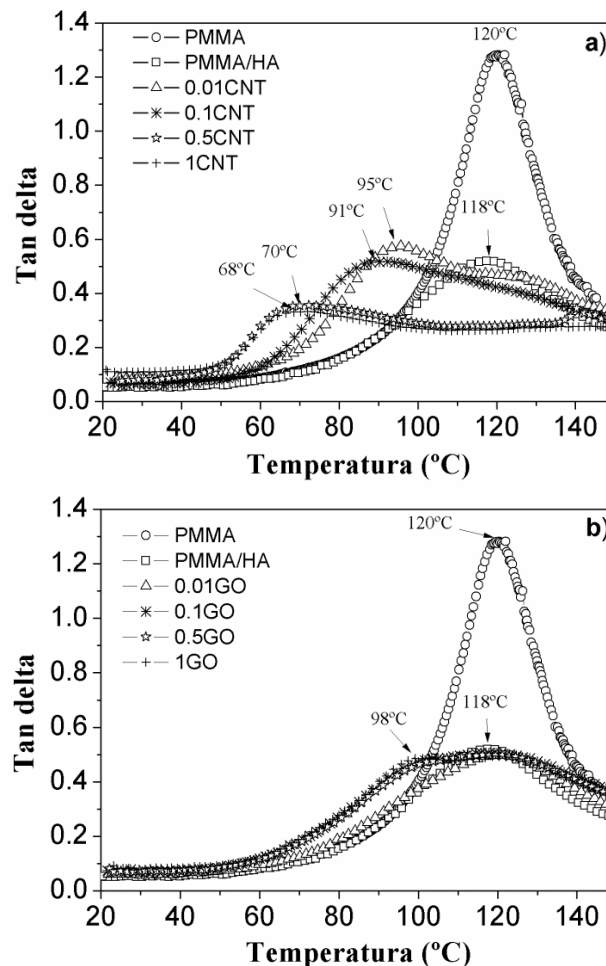


Figura 3.8 *Tan delta* dos nanocompósitos PMMA/HA reforçados com diferentes percentagens de a) CNTs e b) GO.

Através da análise de DMA pode-se concluir que a estrutura química das cadeias poliméricas de PMMA é claramente afetada pela presença das nanoestruturas de carbono durante o processo de polimerização via radicalar, especialmente no caso dos CNTs. O alargamento de banda *tan delta* para valores inferiores significa uma diminuição dos valores de Tg do polímero, o que pode ser atribuída ao facto de o tamanho das cadeias poliméricas de PMMA formadas durante o processo de polimerização seja reduzido.

3.3.3 Efeito das nanoestruturas de carbono na polimerização radicalar do PMMA

O objetivo inicial deste estudo foi testar a eficiência/eficácia do uso das nanoestruturas de carbono como agente de reforço mecânico numa matriz de PMMA/HA (1/2) para o desenvolvimento de novas formulações de cimentos ósseos. Efetivamente os resultados obtidos através do estudo das propriedades mecânicas não atingiram as expectativas desejadas, este facto veio recentrar o interesse numa melhor compreensão do papel que as nanoestruturas de carbono desempenham durante a polimerização radicalar do PMMA, uma característica que é frequentemente negligenciada por alguns investigadores que estudam sistemas semelhantes.²⁸⁻³⁰

Os resultados anteriormente descritos sugerem que o crescimento das cadeias de PMMA por polimerização radicalar é severamente afetada pelo aumento da concentração de nanoestruturas de carbono na matriz de PMMA/HA, especialmente no caso dos CNTs. Os estudos de DMA, demonstraram que existe uma diminuição dos valores de Tg com o aumento de cargas de nanoestruturas de carbono, podendo ser este fenómeno atribuído a um menor peso molecular médio das cadeias poliméricas.

A reação de polimerização do PMMA começa logo após a formação dos radicais livres. Isso acontece quando os componentes líquido e sólido do cimento ósseo são misturados. A DMT (na fase líquida) e o BPO (na fase sólida) reagem um com o outro formando os radicais primários, estes radicais posteriormente atacam o monómero MMA permitindo assim iniciar o processo de polimerização, processo que se denomina cura numa linguagem da especialidade. De facto, uma das causas apontadas para a influência negativa no crescimento das cadeias poliméricas de PMMA pode ser atribuída à diminuição drástica da concentração de espécies radicalares ativas durante o processo de polimerização.

As nanoestruturas de carbono, são caracterizadas por possuírem uma estrutura aromática de átomos de carbono em grande extensão, com uma grande capacidade de aceitar/doar eletrões. Esta propriedade específica das nanoestruturas de carbono torna-se bastante importante na reatividade para com os radicais livres.³¹⁻³³

Neste contexto, propõe-se que as nanoestruturas de carbono podem ser participantes ativos na polimerização do PMMA seguindo o mecanismo ilustrado na Figura 3.9, exemplificado para o caso do GO.

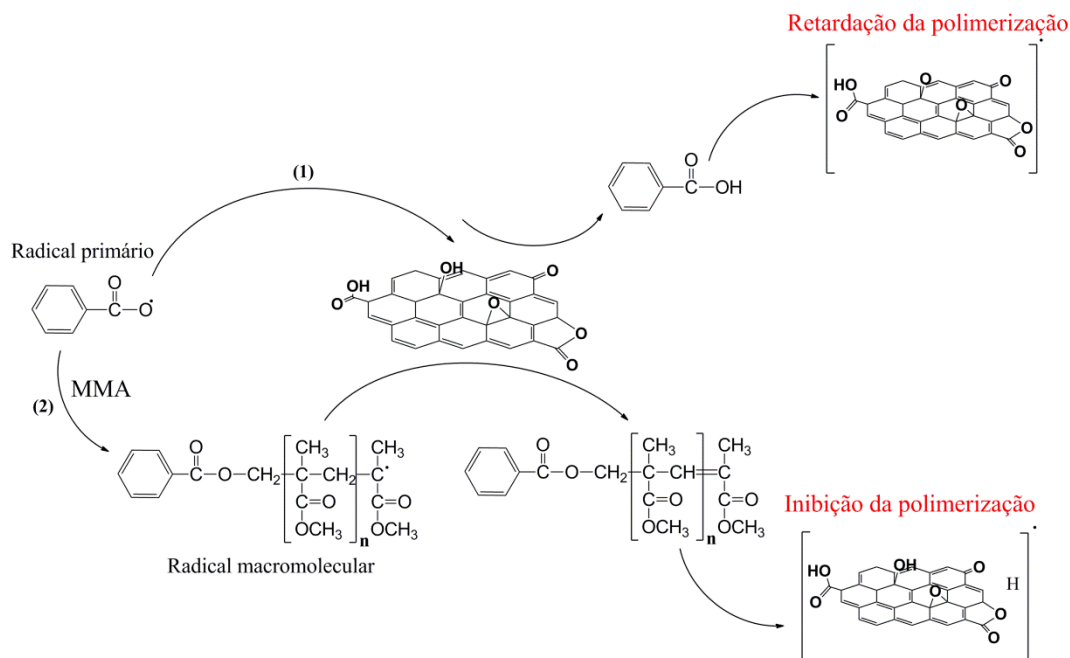


Figura 3.9 Representação esquemática de um possível mecanismo de polimerização radicalar do PMMA sobre a influência do GO.

Neste esquema distinguem-se dois tipos diferentes de ação atribuída às nanoestruturas de carbono e que podem restringir a polimerização radicalar do PMMA: **(1)** retardação da polimerização (perda parcial da atividade radicalar na fase de iniciação) - os radicais primários formados através da reação do BPO com DMT, quando em contato com a superfície aromática do GO perdem os elétrons desemparelhados dando origem a espécies não-ativas, **(2)** inibição de polimerização (terminação da cadeia em espécies oligoméricas) - durante o crescimento da cadeia de radicais macromoleculares ocorre a transferência dos elétrons desemparelhados para a superfície aromática do GO, terminando assim o crescimento da cadeia do polímero, resultando na formação de espécies oligoméricas. Estes dois eventos podem ocorrer simultaneamente e/ou competitivamente durante o processo de polimerização do PMMA.

Um parâmetro importante para avaliar a extensão da reação de polimerização do PMMA é a libertação de energia sob a forma de calor, sendo que se trata de uma reação de polimerização exotérmica. A energia produzida durante a polimerização é de cerca de 57 KJ/mol de MMA, resultando em temperaturas que podem ultrapassar os 100 °C.²⁸ A

incorporação de CNTs em cimentos ósseos de PMMA tem também sido justificada para ajudar na dissipação do calor produzido durante a reação exotérmica de polimerização, sendo este efeito dependente da carga de CNTs.³⁰ Neste trabalho foram estudadas as temperaturas máximas atingidas pelos nanocompósitos com CNTs ou GO durante o processo de polimerização do PMMA (Figura 3.10).

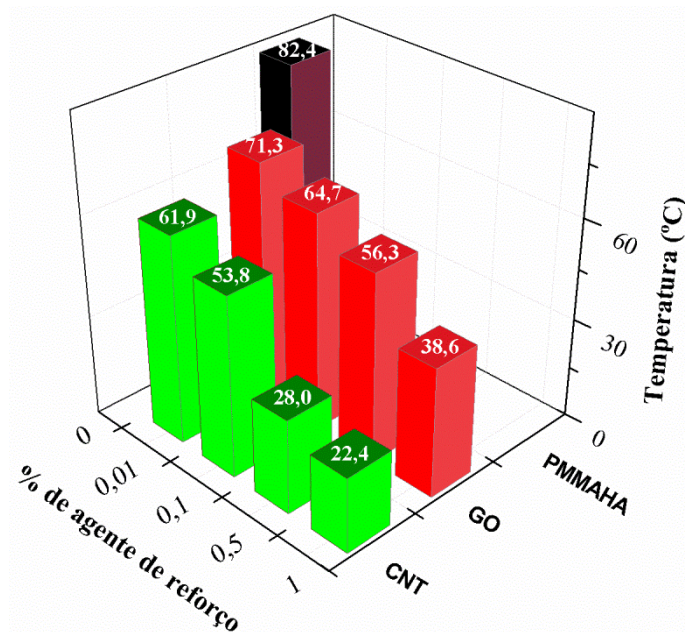


Figura 3.10 Representação gráfica das temperaturas máximas obtidas para os diferentes nanocompósitos (GO ou CNTs) durante o processo de polimerização do PMMA.

Os resultados obtidos através do estudo das temperaturas máximas atingidas pelos nanocompósitos durante o processo de polimerização demonstram que o aumento da concentração de nanoestruturas de carbono permite diminuir esse valor, em especial no caso do nanocompósitos reforçados com CNTs.

A análise cuidada dos resultados anteriores permite concluir que as nanoestruturas de carbono podem apresentar uma dicotomia relativamente ao decréscimo do valor máximo de temperatura da polimerização do PMMA: primeiro o facto de exibirem uma boa condutividade térmica por parte das nanoestruturas permite uma dissipação da energia de modo mais eficiente,^{34, 35} em segundo o facto de as nanoestruturas de carbono apresentarem um efeito de inibição/retardamento da polimerização, como proposto, implica que a polimerização seja efetuada de um modo muito lento o que prolonga a libertação de energia no tempo em quantidades mais reduzidas. De facto, se se analisarem os resultados obtidos para os nanocompósitos com maior percentagem de CNTs (0,5 e 1% (m/m)) pode-se verificar que todo o processo reacional ocorre à

temperatura ambiente, o que indica que neste caso o efeito de inibição/retardamento da polimerização prevalece.

3.3.4 Caracterização das cadeias poliméricas de PMMA após polimerização radicalar

A fim de corroborar o mecanismo proposto para o efeito das nanoestruturas de carbono na polimerização radicalar do MMA, o polímero dos materiais nanocompósitos foi extraído por Soxhlet e analisado por diversas técnicas de caracterização (3.7.3 Extração por Soxhlet da fração macromolecular dos nanocompósitos). A análise da distribuição de tamanhos das macromoléculas de PMMA foi baseada em estudos de cromatografia de exclusão molecular (SEC), e a análise estrutural das macromoléculas de PMMA foi realizada por estudos de NMR de próton (NMR ^1H).

Os resultados obtidos por SEC para os nanocompósitos preparados com 0,1% (m/m) de CNTs e GO estão resumidos na Tabela 3.2. A fração orgânica extraída a partir do nanocompósito preparado com CNTs exibe duas bandas principais, que correspondem a duas frações com pesos moleculares médios (M_w) de 40400 e 870. No caso de GO, a fração polimérica extraída apenas apresenta uma banda com um peso molecular médio de 47700 (M_w). Estes resultados confirmam que os CNTs têm um efeito negativo mais acentuado no processo de polimerização do MMA, com o aparecimento de uma fração oligomérica (inativação dos radicais macromoleculares), em comparação com GO.

Tabela 3.2 Análise da fração polimérica de PMMA por cromatografia de exclusão molecular dos nanocompósitos com 0,1% (m/m) de CNTs ou GO.

Amostras	Fração macromolecular		
	Banda 1	Banda 2	
0.1CNT	Mw	40400	870
	Mn	28230	570
	PDI	1,43	1,51
0.1GO	Mw	47700	-
	Mn	22800	-
	PDI	2,09	-

Os espectros de NMR ^1H das frações de polímero extraídas dos nanocompósitos preparados com 0,1% (m/m) de GO ou CNT estão ilustrados na Figura 3.11, onde se podem verificar os sinais de próton característicos do PMMA, $\delta = 3,63$ ppm ($-\text{OCOCH}_3$), $\delta = 1,85$ ppm ($-\text{CH}_2-$) e os três diferentes tipos de conformações do grupo metilo (CH_3-), $\delta = 1,29$ ppm (isotático), $\delta = 1,05$ ppm (heterotático) e $\delta = 0,87$ ppm (sindiotático). É interessante verificar que a taticidade do polímero é dependente do tipo de nanoestruturas de carbono que o polímero esteve em contato durante o processo de polimerização. As conformações heterotática e sindiotática são dominantes no PMMA polimerizado na presença de CNTs, enquanto que no caso do polímero em contato com o GO, a conformação predominante é a isotática. A origem desta diferença não é clara, contudo pensa-se que algumas restrições espaciais induzidas pelas diferentes formas das nanoestruturas de carbono podem contribuir para este fenómeno.

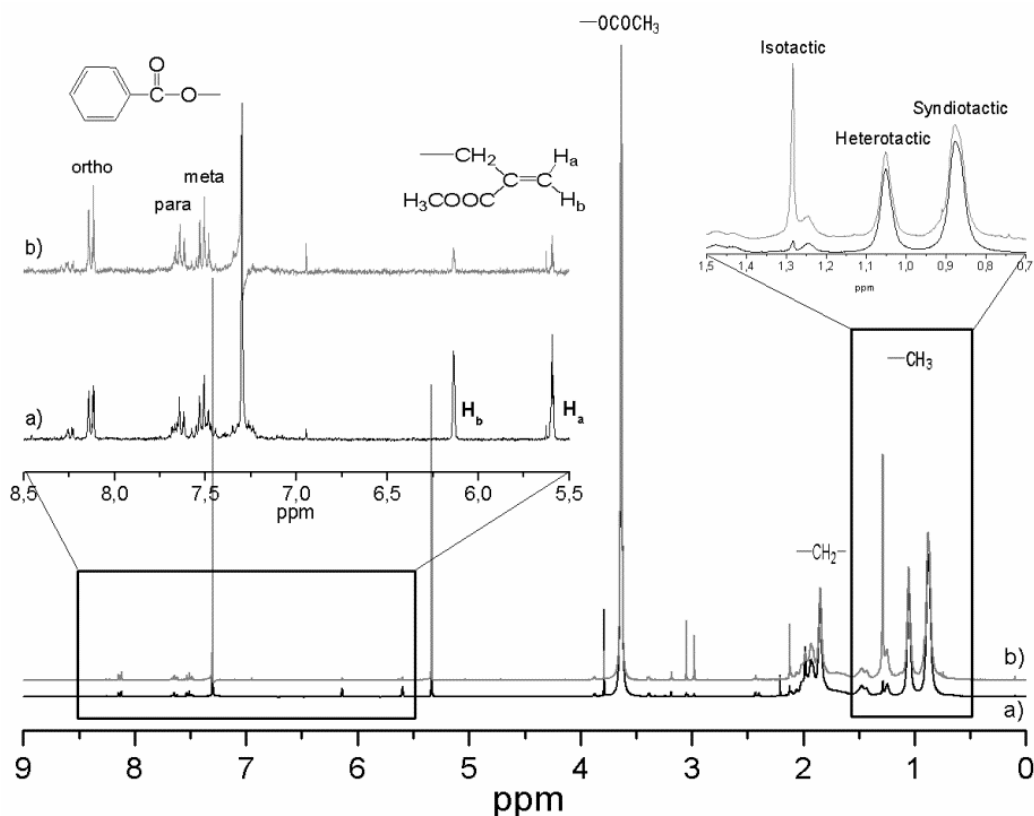


Figura 3.11 Espectros de NMR ^1H de PMMA extraído dos nanocompósitos com **a)** CNTs e **b)** GO.

Os sinais de ^1H obtidos a 8,12 ppm (orto), 7,64 ppm (para) e 7,51 ppm (meta) podem ser atribuídos aos grupos terminais benzoiloxi,³⁶ neste caso o processo de terminação da polimerização ocorre através da reação do radical macromolecular com um radical

primário benzoiloxi. Quando a terminação é favorecida por um processo dismutação, os sinais dos grupos terminais correspondem a uma estrutura terminal insaturada são identificados na Figura 3.11 na região entre 6,25 e 5,5 ppm, ou seja, o próton H_a a 5,58 ppm e H_b a 6,13 ppm.³⁶ A análise da intensidade relativa dos sinais dos dois diferentes tipos de grupos terminais identificados acima mostrou que, no caso do crescimento do polímero na presença CNTs prevaleceram os grupos terminais insaturados, enquanto que no caso do crescimento do polímero na presença do GO os grupos terminais favorecidos foram os benzoiloxi.

Tendo em consideração todos os dados de caracterização obtidos anteriormente sobre a influência das nanoestruturas de carbono na polimerização do MMA, podemos de facto concluir que se encontram de acordo com o mecanismo proposto. No caso dos CNTs é suposto haver uma grande competição entre a captura de radicais ativos e o início da reação de polimerização, o que resulta num baixo rendimento da reação de polimerização. Como consequência, a concentração de radicais primários ativos no final da reação não é suficiente para promover a terminação dos macroradicais ativos, sendo por isso favorecido o processo de terminação pela formação de estruturas insaturadas. Este resultado pode ser confirmado pela análise do espectro de NMR ¹H, onde os sinais atribuídos aos grupos insaturados são predominantes quando comparados com os grupos terminais benzoiloxi. No caso do GO, a grande densidade de grupos funcionais de oxigénio à sua superfície, e consequentemente uma menor densidade de ligações duplas, evita de certa forma que a competição por radicais primários se dê no sentido do GO direcionando-os maioritariamente para a polimerização radicalar, assim se percebe que a terminação da polimerização do MMA ocorra preferencialmente através de grupos benzoiloxi.

Jia W. *et al.* foram provavelmente um dos primeiros autores que propôs a participação ativa de CNTs na polimerização radicalar do MMA.³⁷ No seu estudo, foi usado como agente iniciador o AIBN (2,2'-azobis(isobutironitrilo)), o qual se verificou ter a capacidade para atacar os CNTs através das suas ligações π. Após a reação verificou-se ser possível estabelecer ligação química covalente C-C entre os CNTs e o PMMA, mas para além disso verificou-se também uma forte restrição no crescimento das cadeias de PMMA. Estes dados têm sido utilizados por diversos investigadores por forma a explicar os seus resultados menos positivos na utilização de CNTs como reforço de matrizes de PMMA.^{22, 28-30}

No entanto, nas condições experimentais deste trabalho, no qual se usou um iniciador diferente (BPO), que é ativado à temperatura ambiente, torna-se altamente improvável

que as ligações π das nanoestruturas de carbono possam estabelecer ligações covalentes com as cadeias poliméricas de PMMA. As ligações π das nanoestruturas de carbono em vez disso parecem muito mais propensas para agir como inativadores de radicais, tal como discutido anteriormente, devido à grande capacidade que estas estruturas apresentam para acomodar elétrons livres.³⁸⁻⁴⁰

3.4 Nanocompósitos de PMMA/HA reforçados com nanoestruturas de carbono com incremento de agentes radicalares

Uma vez identificado o motivo pelo qual as nanoestruturas de carbono não apresentam o comportamento mecânico esperado em termos de reforço mecânico da matriz de PMMA/HA, foi objetivo deste trabalho elaborar uma metodologia que permita suprimir o efeito negativo das nanoestruturas de carbono no processo de polimerização de PMMA. Para suprimir o efeito negativo das referidas cargas de carbono na polimerização radicalar dos cimentos ósseos à base de PMMA poder-se-á recorrer a duas metodologias diferentes: a primeira consiste na modificação da superfície das nanoestruturas de carbono com pequenas cadeias de PMMA através de mecanismos de síntese orgânica.⁴¹ Tal como descrito no capítulo anterior, estes materiais permitiram obter uma boa integração entre o reforço e a matriz de PMMA, e conseqüentemente melhorar as propriedades mecânicas do nanocompósito final. Além disso, estando as nanoestruturas de carbono superficialmente modificadas com cadeias de PMMA, o efeito do consumo de radicais durante o processo de polimerização do cimento ósseo será certamente evitado. No entanto, uma das limitações desta metodologia é a produção em grande escala. A segunda abordagem consiste no aumento da concentração das espécies radicalares durante o processo de polimerização, tentando com isso compensar o efeito da atividade de inativação de radicais pelas nanoestruturas de carbono. Esta foi a abordagem considerada no presente estudo devido à sua simplicidade e facilidade de execução.

3.4.1 Controlo da concentração de agentes radicalares

O estudo do controlo da concentração de agentes radicalares foi inicialmente realizado nos nanocompósitos reforçados com CNTs, por estes apresentarem efeitos mais severos na inibição/retardamento da polimerização do PMMA. Este estudo consistiu na determinação das concentrações ideais de agentes radicalares BPO (na fase sólida) e DMT (na fase líquida) por forma a maximizar as propriedades mecânicas do nanocompósito 0,1% (m/m) CNTs, pois foi o que apresentou a melhor performance a nível de propriedades mecânicas.^{2, 8} As concentrações estudadas foram 0X (sem adição), 1X, 2X, 3X e 10X (maior que a concentração inicial), as quantidades usadas podem ser verificadas na parte experimental (3.7.4 Adição de agentes radicalares BPO e DMT a ambos os componentes do cimento ósseo). O incremento é igual em ambos os agentes radicalares pois eles reagem na proporção de 1:1.

O estudo das propriedades mecânicas dos nanocompósitos permitiu obter uma resposta expedita sobre o efeito do aumento da concentração de agentes radicalares. Os resultados obtidos para os testes de flexão demonstraram que o aumento de

concentração de 1X ou 2X dos agentes radicalares permite obter aumentos significativos (~100%) na resistência à flexão (Figura 3.12). Estes aumentos também foram verificados relativamente ao módulo de Young, que apesar de não se obter incrementos tão acentuados são também bastante interessantes, em especial para o caso de 2X (Figura 3.13).

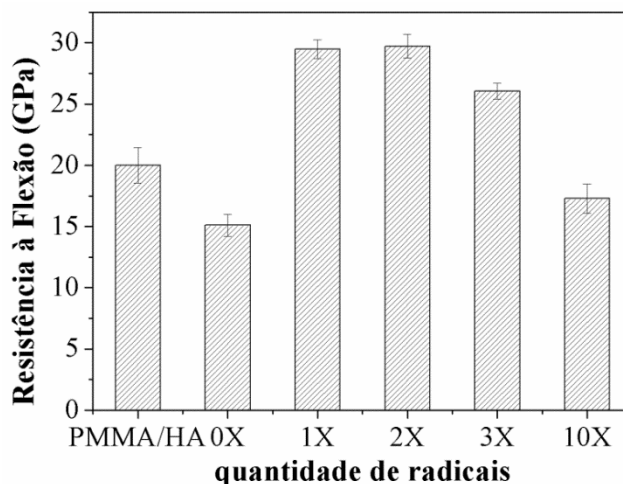


Figura 3.12 Valores obtidos de Resistência à flexão dos nanocompósito reforçado com 0,1% (m/m) CNTs, com diferentes concentrações de agentes radicalares.

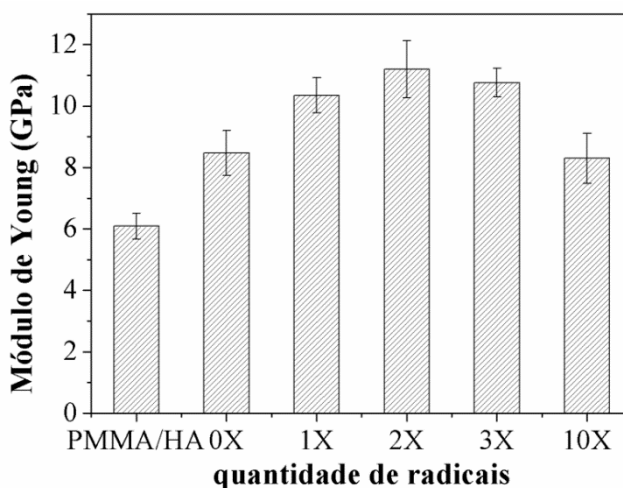


Figura 3.13 Valores obtidos de Módulo de Young para os nanocompósitos reforçados com 0,1% (m/m) CNTs com diferentes concentrações de agentes radicalares.

Contudo o aumento da concentração de radicais durante o processo de polimerização não pode ser feito de uma maneira aleatória, sendo que isso leva ao decréscimo das propriedades mecânicas. A análise dos gráficos anteriores demonstra isso mesmo, quando se aumenta a concentração de radicais de um modo extremo (10X) as

propriedades mecânicas resultantes sofrem um declínio acentuado. Efetivamente este resultado era expectável pois a elevada concentração de radicais no processo de iniciação de polimerização provavelmente favorece o aparecimento de pequenas cadeias oligoméricas em detrimento do processo de crescimento das cadeias poliméricas de PMMA.

A análise por DMA permite obter uma melhor noção do comportamento das cadeias de PMMA com o aumento da concentração de agentes radicalares (Figura 3.14). Os resultados demonstram que um incremento na concentração de agentes radicalares de 1X e 2X permitem obter valores de módulo de armazenamento bastante superiores de que no caso da não adição (0X) e do que no caso da matriz, PMMA/HA. Por outro lado é também possível verificar que os valores de módulo de armazenamento para o nanocompósito com adição de agentes radicalares de 10X se degradaram completamente.

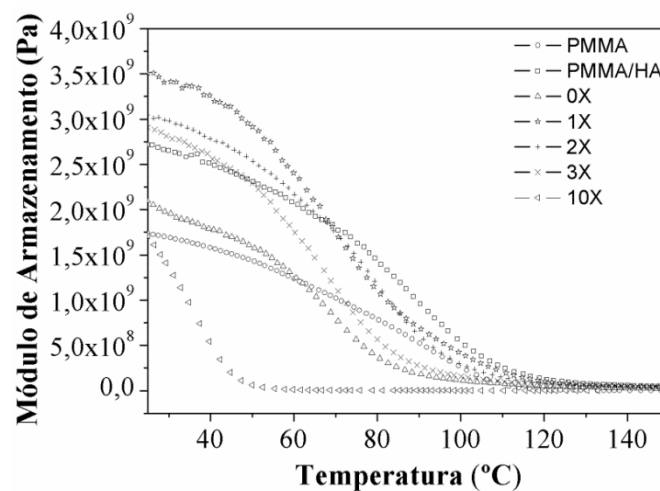


Figura 3.14 Valores obtidos de Módulo de armazenamento dos nanocompósitos reforçados com 0,1% (m/m) de CNTs para diferentes concentrações de agentes radicalares.

Os resultados obtidos por *tan delta* permitem compreender melhor o comportamento macromolecular dos nanocompósitos com as diferentes adições de agentes radicalares (Figura 3.15). Facilmente se verifica que existe um aumento do valor de Tg com a adição de agentes radicalares (1X- 114 °C; 2X- 109 °C) quando comparado com o caso em que não é realizada qualquer adição (0X- 89 °C). Contudo a adição excessiva de agentes radicalares (10X) leva a que os valores de Tg desçam significativamente para 52 °C, o que é indicativo da formação maioritária de espécies oligoméricas.

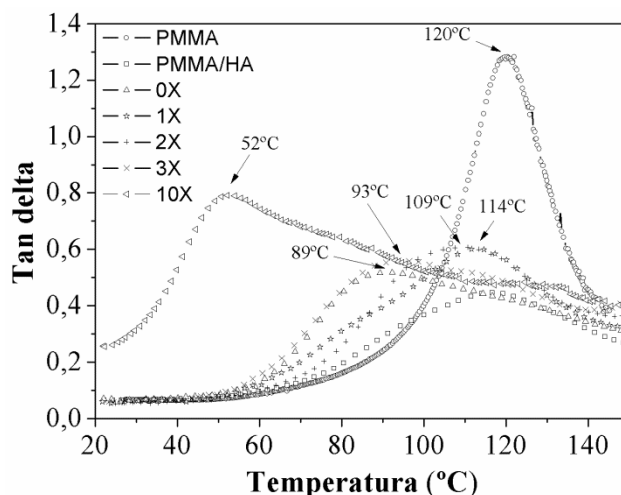


Figura 3.15 Valores obtidos de tan delta dos nanocompósitos reforçado com 0,1% (m/m) de CNTs para diferentes concentrações de agentes radicalares.

Do ponto de vista químico poder-se-á dizer que a abordagem seguida com a adição de agentes radicalares se verificou ser bastante efetiva. O aumento do valor de T_g nos nanocompósitos com o aumento da concentração de agentes radicalares permite verificar que as cadeias poliméricas de PMMA tiveram um aumento significativo no seu peso molecular. Estes resultados permitem concluir que o efeito de inativação dos radicais é suplementado pelo aumento da concentração inicial de radicais, o que permite direcionar este excesso para o crescimento das cadeias poliméricas. Contudo, o excesso de radicais não pode ser arbitrário, pois quando se aumenta muito a concentração de radicais (10X) beneficia-se muito a fase de iniciação da polimerização o que resulta na formação de muitas espécies com baixo peso molecular, ou seja oligoméricas (T_g 52 °C). A influência da adição de radicais nas cadeias poliméricas de PMMA no nanocompósito 0,1% (m/m) CNT foi também avaliada por cromatografia de exclusão molecular (Tabela 3.3). Os resultados obtidos demonstram claramente que o peso molecular das cadeias poliméricas de PMMA aumentou com a adição de agentes radicalares (40400 para 44070), e que por outro lado foi eliminada a fração oligomérica no material nanocompósito.

Tabela 3.3 Análise da fração polimérica de PMMA por cromatografia de exclusão molecular dos nanocompósitos com 0,1% (m/m) de CNTs com e sem adição de radicais.

Amostra	Fração macromolecular			
	Sem adição de radicais (0X)		Com adição de radicais (2X)	
	Banda 1	Banda 2	Banda 1	
0.1CNT	Mw	40400	870	44070
	Mn	28230	570	26620
	PDI	1,43	1,51	1,66

De um modo geral através dos resultados obtidos anteriormente verifica-se que o nanocompósito 0,1% (m/m) CNT com adição de 2X de agentes radicalares apresenta as melhores propriedades mecânicas de entre todos os sistemas testados, por isso esta concentração de agentes radicalares será também testada para os nanocompósitos reforçados com GO.

3.4.2 Efeito do aumento da concentração de radicais nos nanocompósitos com GO

De fato, os resultados anteriores demonstraram ser possível preparar materiais com propriedades mecânicas superiores, particularmente para o caso do nanocompósitos preparados com 0,1% (m/m) CNTs, aumentando para isso a quantidade de BPO e DMT em duas vezes a concentração inicial. No estudo seguinte será averiguado o efeito do aumento de radicais (2X) para os nanocompósitos de PMMA/HA com diferentes percentagens de GO através da evolução das suas propriedades mecânicas.

Na Figura 3.16 e 3.17 é possível observar o efeito positivo da adição do GO à matriz da PMMA/HA em diversas percentagens. Verifica-se que, através da adição duas vezes superior (2X) de espécies radicalares aos nanocompósitos, o efeito do agente de reforço aumentou significativamente, como esperado. Este efeito foi mais pronunciado no caso do nanocompósito preparado com 0,5% (m/m) GO para os valores de resistência à flexão. No caso do módulo de Young houve um aumento significativo em relação aos nanocompósitos sem adição de radicais, contudo nenhum dos nanocompósitos se destacou entre si.

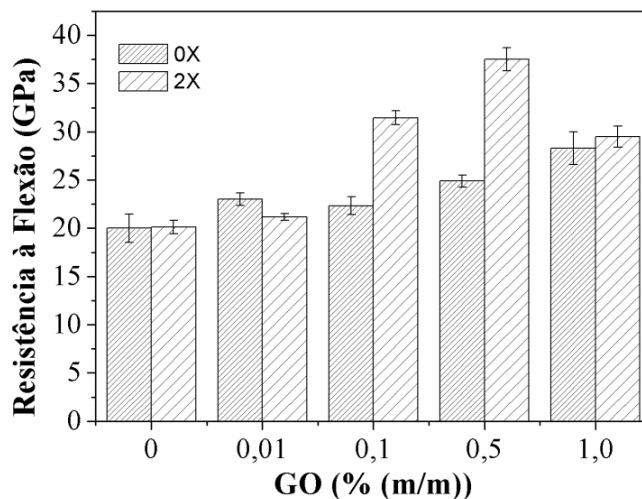


Figura 3.16 Valores obtidos de Resistência à Flexão dos nanocompósitos reforçados com GO com (2X) e sem adição (0X) de radicais.

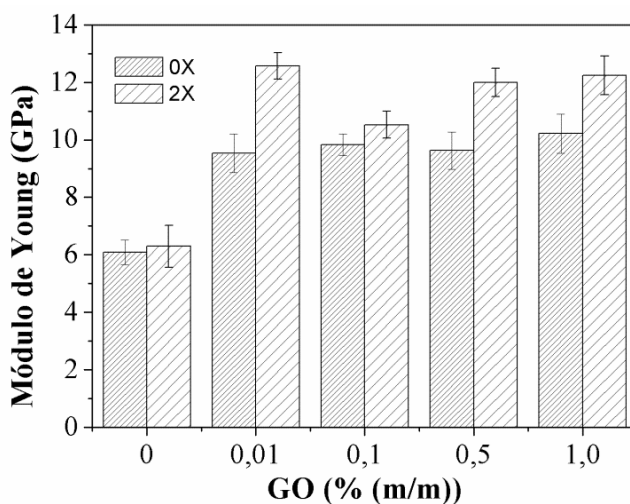


Figura 3.17 Valores obtidos de Módulo de Young dos nanocompósitos reforçados com GO (% (m/m)) com (2X) e sem adição (0X) de radicais.

A análise por DMA também evidenciou um aumento nos valores de módulo de armazenamento para os nanocompósitos reforçados com GO, apresentando valores superiores ao da matriz, PMMA/HA (Figura 3.18). Estes resultados não se tinham observado anteriormente quando não foram adicionadas quantidades adicionais de radicais.

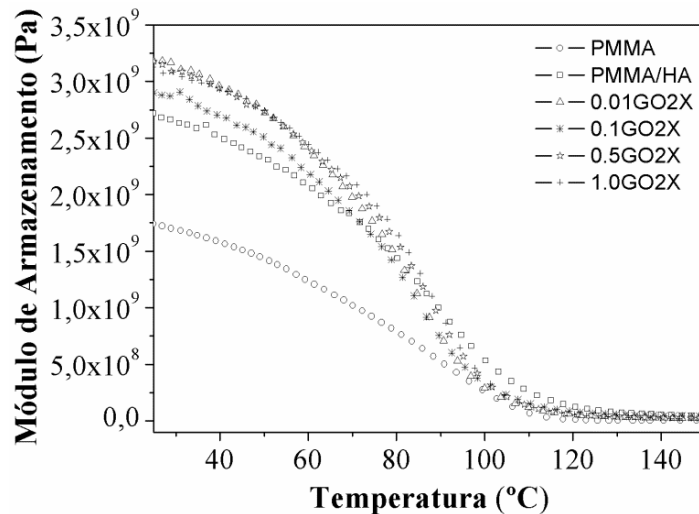


Figura 3.18 Valores de módulo de armazenamento dos nanocompósitos reforçados com GO, com adição de radicais (2X).

Os resultados obtidos por *tan delta* demonstraram efetivamente um aumento nos valores de Tg obtidos, com quase todos a situarem-se na ordem dos 112 °C. Por outro lado pode-se também verificar que distribuição dos valores de Tg é também muito menor devido ao estreitamento da banda, o que significa que os pesos moleculares obtidos para as cadeias de PMMA são bastante mais uniformes (Figura 3.19). Efetivamente os resultados obtidos permitem concluir que o GO também apresenta uma influência negativa na polimerização do PMMA, pois verifica-se agora uma melhoria relativamente aos resultados anteriores (sem adição de radicais).

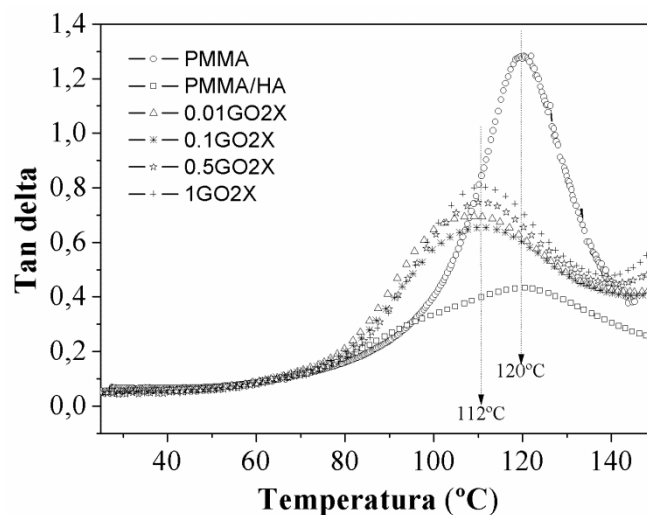


Figura 3.19 Valores obtidos de tan delta dos nanocompósitos reforçados com GO, com adição de radicais (2X).

Através da análise por cromatografia de exclusão molecular da fração polimérica do nanocompósito 0.5GO com e sem adição de radicais pode-se verificar que o valor de peso molecular aumenta quase para o dobro, de 47700 para 79100 (Tabela 3.4). Estes valores evidenciam que a abordagem seguida com o aumento da concentração de radicais foi bastante efetiva, e isso reflete-se nas propriedades mecânicas dos nanocompósitos.

Tabela 3.4 Análise da fração polimérica de PMMA por cromatografia de exclusão molecular dos nanocompósitos com 0,5% (m/m) de GO com e sem adição de radicais.

Amostra	Fração macromolecular		
	Sem adição de radicais (0X)	Com adição de radicais (2X)	
	Banda 1	Banda 1	
0.5GO	Mw	47700	79100
	Mn	22800	57100
	PDI	2,09	1,38

A partir dos resultados globais, o nanocompósito com 0,5% (m/m) de GO preparado com a adição de uma quantidade duas vezes superior de radicais é o que mais se destaca em termos de propriedades mecânicas. O incremento obtido quando comparado com o material sem adição suplementar de radicais é respectivamente de 51%, 25% e 48% para a resistência à flexão, módulo de elasticidade e módulo de armazenamento.

Em conclusão, aplicando a estratégia de adição de espécies radicalares, mostrou-se que é possível superar a atividade de inativação de radicais por parte da superfície do GO e obter um material final com melhores propriedades mecânicas como idealizado.

3.5 Caracterização dos nanocompósitos 0.1CNT e 0.5GO segundo a norma ISO 5833

A norma ISO 5833 regulamenta a utilização de cimentos acrílicos para implantes ortopédicos na União Europeia, sendo que a última versão data de 2002. No presente trabalho foram realizados os testes de compressão e flexão descritos na norma. Os testes mecânicos referidos anteriormente foram realizados no Instituto de Biomecânica de Valencia (IBV), o qual se encontra creditado para o efeito.

Estes testes foram realizados nos materiais que apresentaram um melhor desempenho nos testes mecânicos realizados durante o processo de otimização, sendo eles 0.5GO e 0.1CNT com adição de 2X de radicais. Como termo de comparação foi usada a matriz de PMMA/HA e o cimento comercial CMW que aqui é denominado simplesmente por PMMA.

3.5.1 Testes de flexão

Os resultados obtidos para os testes de flexão dos materiais nanocompósitos descritos anteriormente demonstram efetivamente que o cimento ósseo PMMA apresenta os maiores valores de resistência à flexão 51 ± 3 MPa, o que era relativamente esperado porque a carga de HA nos outros materiais é bastante elevada o que torna os materiais mais frágeis. Contudo é de salientar os efeitos positivos da adição das nanoestruturas de carbono à matriz de PMMA/HA (1/2), os valores obtidos de resistência à flexão foram de $28,38 \pm 3,33$ MPa para o PMMA/HA, $32,86 \pm 1,50$ MPa para 0.1CNT e $36,73 \pm 1,85$ MPa para 0.5GO. A nível percentual estes resultados constituem um aumento significativo, 29% para a adição de GO e 16% para o caso da adição de CNTs.

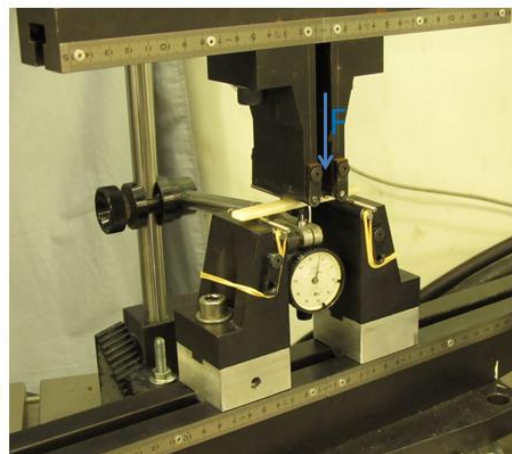
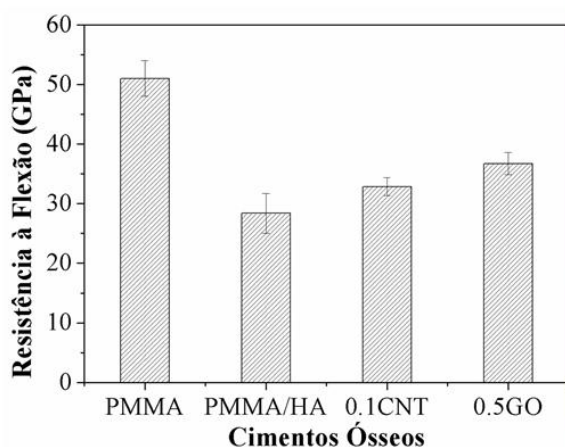


Figura 3.20 Valores obtidos para a resistência à flexão dos diferentes materiais nanocompósitos. Imagem do equipamento para a realização dos testes de flexão.

A análise de SEM da zona de fratura dos nanocompósitos após os testes de flexão permite avaliar a dinâmica de todos os elementos do material nanocompósito após a solitação de forças até à rutura. A falha mecânica dos cimentos ósseos à base de PMMA pode ser definida por um sistema com três etapas, (1) formação de pequenas fissuras devido a imperfeições iniciais do material, (2) crescimento lento das fissuras e (3) rápida propagação até à fratura.⁴²

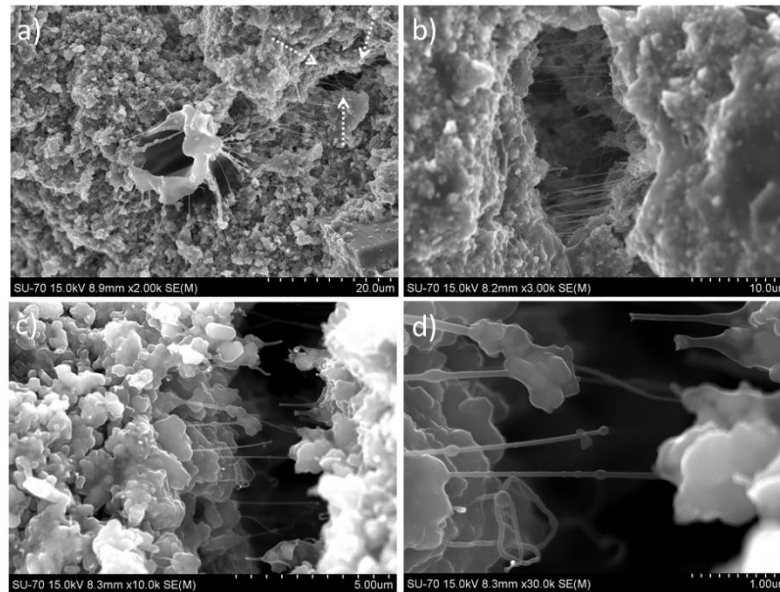


Figura 3.21 Imagem de SEM do nanocompósito 0.1CNT a várias ampliações, onde se pode verificar a formação de micro-fissuras **a)** e **b)**. No interior das microfissuras pode-se verificar a distribuição homogénea dos CNTs e o seu contributo para o aumento da resistência mecânica do material **c)** e **d)**.

No caso do material nanocompósito reforçado com CNTs pode-se verificar através da formação das microfissuras que existe uma distribuição homogénea destes na matriz PMMA/HA (Figura 3.21). Efetivamente, a distribuição homogénea dos CNTs, a forte interação com a matriz e a sua elevada resistência mecânica parecem ser os elementos essenciais para prevenir/retardar a formação inicial de microfissuras e a sua respetiva propagação, o que permite aumentar a longevidade do cimento ósseo.²⁹ Esta observação parece pertinente tendo em conta que os valores obtidos de resistência à flexão são superiores do que no caso da matriz simples (PMMA/HA).

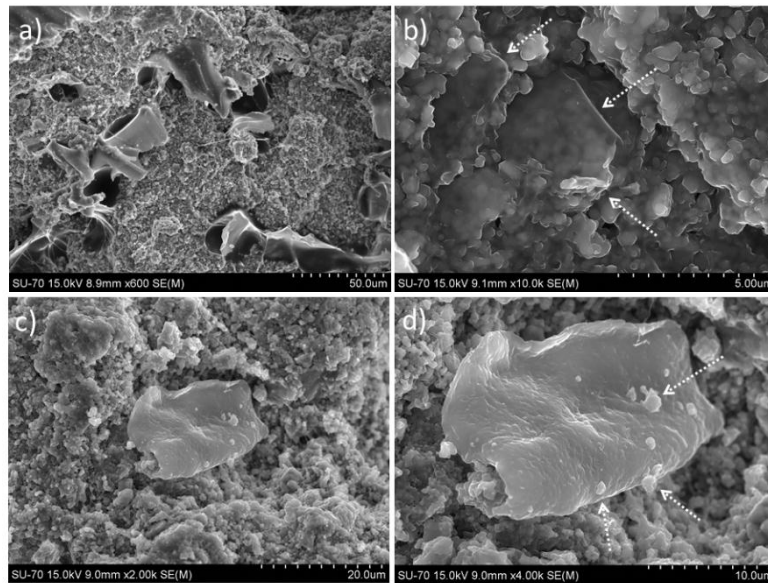


Figura 3.22 Imagem de SEM do nanocompósito 0.5GO a várias ampliações, onde se pode analisar a distribuição homogénea do GO na matriz de PMMA/HA **a)** e **b)**. A análise de uma folha de GO permite verificar a sua boa integração na matriz de PMMA/HA **c)** e **d)**, pois evidencia a presença de pequenas partículas de matriz na sua superfície após rutura do material **d)**.

Nos nanocompósitos reforçados com GO e pela observação microscópica, a formação de microfissuras não é um fenómeno tão frequente como observado no caso dos nanocompósitos com CNTs. A atuação do GO durante o processo de rutura da amostra parece um pouco diferente do caso dos CNTs, provavelmente devido às suas dimensões micrométricas numa dimensão e estrutura planar. Neste caso, a estrutura planar flexível do GO deverá promover uma melhor integração de todos os componentes do sistema aumentando assim a sua resistência mecânica. A análise das imagens da Figura 3.22 sugere efetivamente que o GO apresenta uma distribuição homogénea e uma forte interação na matriz PMMA/HA. A Figura d) demonstra que após a rutura da amostra algumas partículas de nanocompósito ainda permanecem ligadas à superfície do GO, o que é indicativo de uma forte interação entre os componentes.

3.5.2 Testes de compressão

Os resultados obtidos para os testes de compressão apresentaram valores de resistência à compressão superiores aos obtidos para o cimento comercial, devido à elevada carga inorgânica que contém. No caso do cimento comercial o valor obtido foi de $90,47 \pm 1,71$ MPa, para a nova matriz PMMA/HA $104,88 \pm 2,05$ MPa, para o sistema com CNTs foi de $118,61 \pm 2,04$ MPa e para o sistema com GO foi de $112,78 \pm 1,65$ MPa (Figura 3.23). Neste

caso podemos também verificar que as nanoestruturas de carbono permitem obter um incremento significativo da resistência à compressão, contudo os CNTs demonstraram ser mais efetivos neste caso. A nível percentual o incremento com a adição de CNTs à matriz de PMMA/HA foi de 13% e no caso da adição de GO foi de 7,5%.

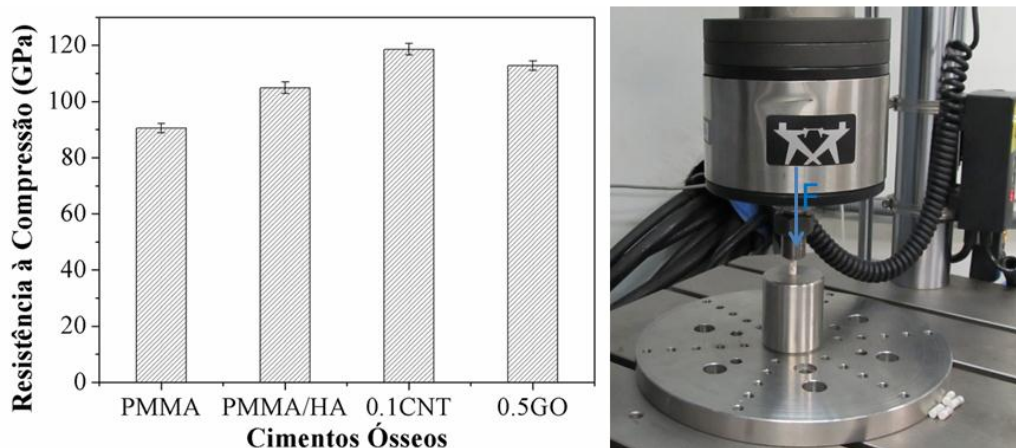


Figura 3.23 Valores obtidos para a resistência à compressão dos diferentes materiais nanocompósitos. Fotografia do aparato experimental para a realização dos referidos testes de compressão.

3.5.3 Teste “Push-out”

O teste seguinte não se encontra descrito na norma ISO 5833, contudo parece bastante pertinente na discussão da aplicação dos novos materiais compósitos como cimentos ósseos, uma vez que permite avaliar a adesão entre o cimento e a prótese metálica. Este teste é denominado “Push-out” que em português significa “empurrar para fora” e consiste na inserção de 4 provas metálicas de titânio (material utilizado nas próteses) na matriz de material compósito a testar. O objetivo deste estudo é verificar a adesão das provas metálicas ao cimento ósseo através da aplicação de uma força externa (Figura 3.24). Após aplicação da força, a prova metálica sofre deslocamento a um determinado nível de força máxima, e esse valor será utilizado como indicador da adesão da prova metálica ao cimento ósseo.

Os resultados obtidos após aplicação deste teste aos cimentos em estudo, indicam que o cimento ósseo comercial apresenta um melhor nível de adesão ao cilindro metálico, sendo necessário aplicar uma força média de 1000 ± 89 N para promover o movimento do respetivo cilindro na matriz de PMMA. No caso do nanocompósito PMMA/HA a força média necessária para promover o movimento do cilindro foi de apenas 700 ± 74 N, valor este inferior ao obtido para o PMMA. Este resultado pode ser entendido mais uma vez

pela elevada percentagem de HA, o que torna o material menos aderente ao metal e consequentemente mais frágil na sua interface quando sujeito a forças. Após a adição de GO à matriz de PMMA/HA o valor médio da força máxima aplicada passou para 909 ± 83 N, o que indica claramente que o GO melhora a integração de todos os componentes do nanocompósito resultando num material com melhor coesão com a interface metálica. O valor mais baixo foi obtido para o nanocompósito reforçado com CNTs tendo sido de 580 ± 34 N, neste caso não é assim tão evidente a razão pela qual isto acontece. Efetivamente e como já verificado anteriormente os nanocompósitos com CNTs são os mais sensíveis ao efeito de retardamento/inibição da polimerização e deve-se ter agravado nestas circunstâncias.

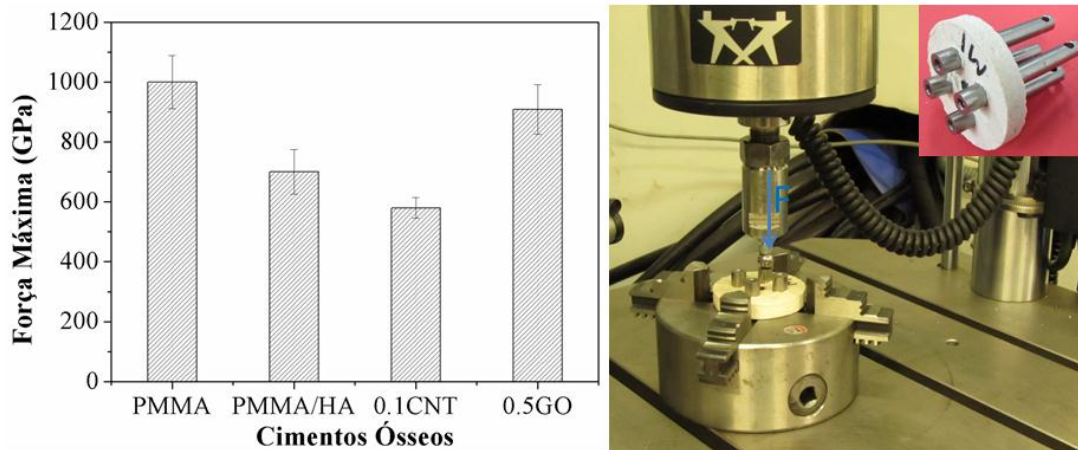


Figura 3.24 Valores obtidos para os testes de “push-out” dos diferentes materiais nanocompósitos. Fotografia do aparato experimental para a realização dos referidos testes de “push-out” e respetiva configuração da amostra.

3.4.1 Estudo do tempo de cura “Setting time”

Um outro parâmetro bastante importante a analisar segundo a Norma ISO 5833 para a validação de um cimento ósseo é o “Setting time”, que corresponde ao período de tempo que o cimento leva até endurecer (cura).

A Figura 3.25 corresponde à representação gráfica da evolução da temperatura em função do tempo obtida para os diferentes cimentos ósseos durante o período de polimerização, após uma mistura prévia de 2 minutos de ambos os componentes sólido e líquido (doughing time).

Uma primeira análise permite evidenciar que o tempo de cura dos cimentos ósseos é acelerado quando é incrementada a concentração de radicais (setting time), pois como se pode verificar o tempo de cura do 0.1CNT (381 s) e do 0.5GO (524 s) é muito inferior ao

tempo de cura da matriz PMMA/HA (1713 s). Por outro lado, também é perceptível que a polimerização do PMMA no nanocompósito PMMA/HA é mais efetiva do que nos restantes pois como se pode verificar a temperatura máxima atingida é de cerca de 82 °C, 78 °C e 74 °C, respetivamente. Como referido anteriormente a energia libertada é proporcional ao número de moles de MMA polimerizadas. Verifica-se assim que com o aumento da concentração de radicais se conseguiu atingir níveis de polimerização semelhantes entre os nanocompósitos reforçados e não reforçados.

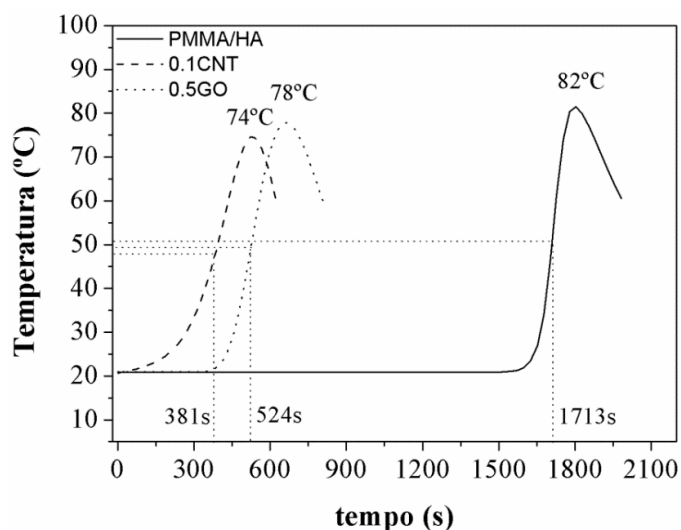


Figura 3.25 Valores de tempo de cura e respetiva temperatura máxima dos diferentes cimentos ósseos, PMMA/HA, 0.5GO e 0.1CNT.

É no entanto importante referir que uma menor temperatura de polimerização é favorável para evitar a degradação dos tecidos vivos circundantes (necroses térmicas), neste sentido, os valores obtidos respeitantes à $T_{máx}$ para os cimentos ósseos reforçados com nanoestruturas de carbono permitem verificar que estes apresentam uma melhor dissipação de energia.

No geral, após a realização destes testes baseados na norma ISO 5833 pode-se concluir que os nanocompósitos reforçados com GO apresentam um melhor comportamento mecânico, sugerindo ser o material com maiores potencialidades na futura aplicação como cimento ósseo.

3.6 Conclusão

Através deste trabalho foi possível evidenciar que a simples introdução de um agente de reforço numa matriz polimérica nem sempre desempenha o papel desejado, sendo necessário considerar fatores secundários resultantes de interações entre os vários componentes com contribuições importantes em todo o sistema.

Os resultados de caracterização obtidos demonstraram que a incorporação de nanoestruturas de carbono num cimento à base de PMMA interfere com a reação de polimerização do MMA, causando fenómenos de inibição/retardamento do crescimento das cadeias de polímero, o que resulta num decréscimo das propriedades mecânicas finais dos nanocompósitos, anulando assim o efeito desejado de reforço das cargas nanométricas.

Neste estudo ficou demonstrado que a razão fundamental para esta interferência é a capacidade das nanoestruturas de carbono para acomodar eletrões. Este efeito é dependente do tipo e concentração das nanoestruturas de carbono sendo este mais pronunciado no caso dos CNTs quando comparado com o GO, devido à maior densidade de ligações duplas conjugadas nos CNTs.

Neste trabalho também ficou bem patente que é possível suprimir este efeito negativo e tirar vantagem das cargas nanométricas através do aumento da concentração de espécies radicalares durante a reação de polimerização. Este procedimento permitiu obter um aumento significativo das propriedades mecânicas dos nanocompósitos reforçados com CNTs em especial para o caso de 0,1% (m/m). Mas efetivamente os materiais reforçados com GO destacam-se claramente pelo aumento mais significativo das propriedades mecânicas, sendo o material com 0,5% (m/m) aquele que apresenta um maior equilíbrio em todas as vertentes estudadas.

Neste contexto, acredita-se que a morfologia das folhas de GO, com uma dimensão micrométrica e uma superfície enrugada e altamente funcionalizada, permite contribuir decisivamente para a obtenção de uma melhor integração de todos os componentes. Contudo é muito importante enfatizar que não é apenas o comportamento mecânico que determina a viabilidade de um biomaterial é também essencial que o seu comportamento biológico seja bastante aceitável. Este ponto será discutido no próximo capítulo.

3.7 Parte experimental

3.7.1 Hidroxiapatite

Neste estudo foi usada uma hidroxiapatite comercial adquirida à empresa AGORAMAT. O tamanho médio de grão inicial de 8 μm foi reduzido através de um processo de moagem no Moinho de almofariz RM 100 (Retsch RM100 - Germany). O tempo de moagem foi otimizado para o tamanho inicial e distribuição de tamanhos de partícula pretendida, tendo este sido de 60 minutos. A análise do tamanho de partícula foi determinada através do equipamento LS Particle Size Analyzer (Figura 3.26). O valor médio final de tamanho de partícula usado neste trabalho foi de 800 nm.

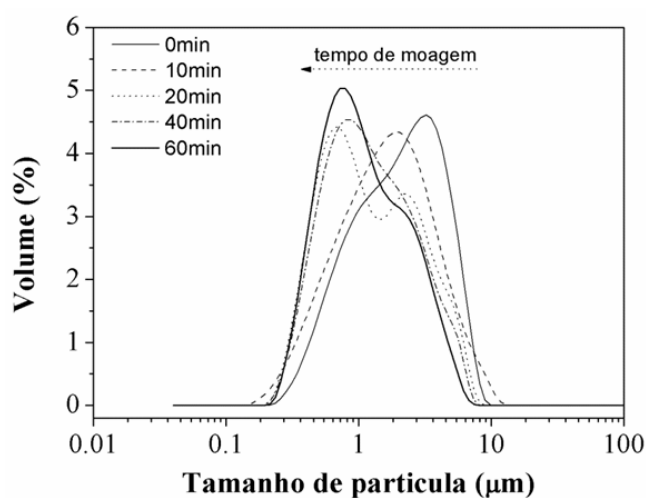


Figura 3.26 Distribuição do tamanho de partícula de HA após processo de moagem com vários tempos (0, 10, 20, 40 e 60 min).

3.7.2 Preparação do nanocompósito PMMA/HA reforçado com nanoestruturas de carbono

A preparação dos nanocompósitos de PMMA/HA reforçados com nanoestruturas de carbono foi baseada numa metodologia constituída por três etapas. A primeira etapa consistiu na integração dos três componentes sólidos do nanocompósito (HA, PMMA e nanoestrutura). Para tal, uma mistura aquosa contendo estes componentes nas proporções pretendidas foi homogeneizada através de uma sonda de ultrassons durante 30 minutos (Sonics Modelo VC 130, 20 kHz, ponta de sonda 6 mm de diâmetro, amplitude de 80%, 2,2 kW). O segundo passo consistiu no uso da técnica de granulação por congelamento, (Power Pro Congelar granulador-L5-2), a fim de manter a homogeneidade do material. Posteriormente, a amostra foi seca por liofilização. Após

esse tratamento final, o nanocompósito foi mantido em um excicador para evitar a absorção da humidade do ar por parte da hidroxiapatite.

3.7.3 Conformação das amostras de cimento ósseo para os diferentes testes

As amostras de cimento ósseo foram produzidas através da adição do componente sólido (5g) ao componente líquido (1,8 mL) (ver composição na secção de materiais) nas condições ambientais (temperatura 22 °C e humidade relativa $\geq 40\%$). A mistura foi realizada à mão num almofariz limpo e seco. Os componentes foram misturados cuidadosamente por forma a minimizar o aprisionamento de ar, seguindo as indicações descritas na embalagem de cimento ósseo comercial CMW1.

Após a mistura apropriada dos componentes sólido e líquido, a mistura foi colocada em moldes de Teflon e prensados a 100 Kg/cm³ durante 10 minutos por forma a obter as dimensões desejadas para realizar os diversos testes, mecânicos e biológicos. As amostras incluem o cimento ósseo comercial - PMMA, o cimento ósseo com hidroxiapatite - PMMA/HA (1/2) e o cimento ósseo com hidroxiapatite reforçado com CNTs ou GO (0,01, 0,1, 0,5 e 1% (m/m)).

3.7.4 Adição de agentes radicalares BPO e DMT a ambos os componentes do cimento ósseo

De forma a suprimir o efeito da inativação de radicais por parte das nanoestruturas de carbono, foram incrementadas as concentrações de agentes radicalares no componente líquido e no componente sólido do cimento ósseo, através da adição de diversas quantidades de DMT e BPO, respetivamente (Tabela 3.5).

Tabela 3.5 Quantidades de BPO e DMT adicionadas ao componente sólido (5 g) e líquido (1,8 mL) do novo cimento ósseo, respetivamente.

Amostras	Agentes radicalares	
	BPO (Fase sólida)	DMT (fase líquida)
0X	-	-
1X	0,04g (0,165 mmol)	26,25µL (0,182 mmol)
2X	0,08g (0,330 mmol)	52,5µL (0,364 mmol)
3X	0,12g (0,495 mmol)	78,75µL (0,546 mmol)
10X	0,4g (1,65 mmol)	262,5µL (1,819 mmol)

3.7.5 Extração por Soxhlet da fração macromolecular dos nanocompósitos

A extração por Soxhlet teve como objetivo principal extrair a fração polimérica dos outros componentes do nanocompósito para análise posterior. Neste sentido, 1,5 g do material polimerizado foi introduzido no cartucho de Soxhlet inserido num balão onde foram adicionados 150 mL de diclorometano, a temperatura foi aumentada até à ebulição e a extração decorreu durante um período de 8h. Posteriormente a fração líquida foi recolhida e centrifugada por forma a eliminar alguns resíduos sólidos.

3.8 Caracterização

Espectroscopia fotoeletrônica de raios X

A composição elementar e a percentagem atômica de cada um dos componentes em cada uma das nanoestruturas de carbono foram determinadas utilizando espectroscopia fotoeletrônica de raios-X (XPS) (VG Scientific ESCALAB 200 A;UK).

Microscopia eletrônica de transmissão em alta resolução (HRTEM)

Ver apêndice II (pág. 201)

Microscopia eletrônica de varrimento (SEM)

Ver apêndice II (pág. 201)

Cromatografia de exclusão molecular (SEC)

Ver Apêndice II (pág. 201)

Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (NMR)

Na análise de espectroscopia de ressonância magnética nuclear de ^1H , as amostras de polímero foram previamente dissolvidas em clorofórmio deuterado, e posteriormente os espectros foram adquiridos espectrômetro Bruker DRX 500 (Germany), operando a 300,13 Mhz.

Análise dinâmico-mecânica (DMA)

Os ensaios dinâmicos mecânicos foram realizados no equipamento Tritec 2000 (UK) com amostras de dimensões 20x4x2,2 mm, em modo de flexão, com uma frequência constante de 1 Hz, uma amplitude de 0,010mm e uma taxa de aquecimento de 2 °C/min, desde a temperatura ambiente (~22 °C) até 150 °C. As propriedades obtidas foram o módulo de armazenamento (E'), módulo de perda (E'') e o fator de amortecimento ($\tan \delta$), em função da temperatura (T). A temperatura correspondente ao pico $\tan \delta$ Vs T corresponde à T_g do polímero no material nanocompósito. Para cada grupo de estudo foram testadas 5 amostras.

Determinação do módulo de elasticidade

O módulo de elasticidade (E) foi determinado usando uma técnica de excitação por impulso (ASTM C1259-96). Os provetes de cimento ósseo utilizados apresentavam as dimensões: 25,0x10,0x3,3 mm. Cada grupo de estudo consistiu em 5 réplicas.

Determinação da temperatura de polimerização

As temperaturas obtidas durante a fase de polimerização dos cimentos ósseos (T) foi determinada através da norma ISO 5833, usando um termopar tipo k de Ni–Cr–Al e um sistema de aquisição de dados comercialmente disponíveis (Software de aquisição de dados PicoLog; Pico Technology Ltd., UK). Para cada grupo de estudo, os testes foram executados em triplicado.

Ensaio de compressão

Os testes de compressão foram realizados no equipamento INSTRON 8874/429 com amostras de formato cilíndrico com dimensões de 12 mm de altura e 6 mm de diâmetro. A velocidade de deslocamento do atuador foi de 20 mm/min. Os ensaios foram realizados às condições ambientais de 24 °C e 46% de humidade.

Ensaio de flexão a 4 pontos

Os testes de flexão a 4 pontos foram realizados no equipamento INSTRON 8874/429 com amostras de formato cilíndrico com dimensões de 75x10x3,3 mm. A distância entre os cilindros externos foi de 60 mm e a distância entre os cilindros centrais foi de 20mm (tal como a distancia entre um cilindro central e um externo), esta configuração encontra-se descrita na norma ISO 5583 (2002). A velocidade de deslocamento do atuador foi de 5 mm/min. Os ensaios foram realizados às condições ambientais de 24 °C e 46% de humidade.

Ensaio de Push-out

Os testes de push-out foram realizados no equipamento INSTRON 8874/429. As amostras consistiram na introdução de 4 cilindros metálicos de 10 mm de diâmetro em cada um dos tipos de cimento, a espessura de cimento ósseo é de 10 mm (Figura 3.22). Para a realização do teste cada um dos cilindros metálicos é inserido no atuador da máquina de ensaios ao qual é aplicado uma carga de compressão, à velocidade de 0,01 mm/s. O ensaio é finalizado quando ocorre o deslizamento do cilindro metálico na matriz de cimento ósseo, e a força necessária para provocar esse deslocamento é registada como $F_{m\acute{a}x}$. Os ensaios foram realizados às condições ambientais de 24 °C e 46% de humidade

3.9 Referências

1. S. Deb, "A review of improvements in acrylic bone cements" *J. Biomater. Appl* 1999, 14, (1), 16-47.
2. M. K. Singh, J. Gracio, P. LeDuc, P. P. Goncalves, P. A. A. P. Marques, G. Goncalves, F. Marques, V. S. Silva, F. Capela e Silva, J. Reis, J. Potes, A. Sousa, "Integrated biomimetic carbon nanotube composites for in vivo systems" *Nanoscale* 2010, 2, (12), 2855-2863.
3. P. K. Stephenson, M. A. R. Freeman, P. A. Revell, J. Germain, M. Tuke, C. J. Pirie, "The effect of hydroxyapatite coating on ingrowth of bone into cavities in an implant" *J. Arthroplasty* 1991, 6, (1), 51-58.
4. M. J. Dalby, L. Di Silvio, E. J. Harper, W. Bonfield, "Increasing hydroxyapatite incorporation into poly(methylmethacrylate) cement increases osteoblast adhesion and response" *Biomaterials* 2002, 23, (2), 569-576.
5. M. J. Dalby, L. Di Silvio, E. J. Harper, W. Bonfield, "Initial interaction of osteoblasts with the surface of a hydroxyapatite-poly(methylmethacrylate) cement" *Biomaterials* 2001, 22, (13), 1739-1747.
6. T. Tsukeoka, M. Suzuki, C. Ohtsuki, A. Sugino, Y. Tsuneizumi, J. Miyagi, K. Kuramoto, H. Moriya, "Mechanical and histological evaluation of a PMMA-based bone cement modified with [gamma]-methacryloxypropyltrimethoxysilane and calcium acetate" *Biomaterials* 2006, 27, (21), 3897-3903.
7. J. M. Holzwarth, P. X. Ma, "Biomimetic nanofibrous scaffolds for bone tissue engineering" *Biomaterials* 2011, 32, (36), 9622-9629.
8. M. K. Singh, T. Shokuhfar, J. J. d. A. Gracio, A. C. M. de Sousa, J. M. D. F. Ferreira, H. Garmestani, S. Ahzi, "Hydroxyapatite Modified with Carbon-Nanotube-Reinforced Poly(methyl methacrylate): A Nanocomposite Material for Biomedical Applications" *Advanced Functional Materials* 2008, 18, (5), 694-700.
9. Y. Zhu, S. Murali, W. Cai, X. Li, J. W. Suk, J. R. Potts, R. S. Ruoff, "Graphene and Graphene Oxide: Synthesis, Properties, and Applications" *Adv. Mater.* 2010, 22, (35), 3906-3924.
10. S. Stankovich, D. A. Dikin, G. H. B. Dommett, K. M. Kohlhaas, E. J. Zimney, E. A. Stach, R. D. Piner, S. T. Nguyen, R. S. Ruoff, "Graphene-based composite materials" *Nature* 2006, 442, (7100), 282-286.
11. B. G. Choi, J. Hong, Y. C. Park, D. H. Jung, W. H. Hong, P. T. Hammond, H. Park, "Innovative Polymer Nanocomposite Electrolytes: Nanoscale Manipulation of Ion Channels by Functionalized Graphenes" *ACS Nano* 2011, 5, (6), 5167-5174.

12. Y. Li, "Effect of nano inclusions on the structural and physical properties of polyethylene polymer matrix" *Polymer* 2011, 52, (10), 2310-2318.
13. L. L. Tian, P. Anilkumar, L. Cao, C. Y. Kong, M. J. Mezzani, H. J. Qian, L. M. Veca, T. J. Thorne, K. N. Tackett, T. Edwards, Y. P. Sun, "Graphene Oxides Dispersing and Hosting Graphene Sheets for Unique Nanocomposite Materials" *ACS Nano* 2011, 5, (4), 3052-3058.
14. T. Kuilla, S. Bhadra, D. Yao, N. H. Kim, S. Bose, J. H. Lee, "Recent advances in graphene based polymer composites" *Prog. Polym. Sci.* 2010, 35, (11), 1350-1375.
15. M. A. Rafiee, J. Rafiee, Z. Wang, H. Song, Z.-Z. Yu, N. Koratkar, "Enhanced Mechanical Properties of Nanocomposites at Low Graphene Content" *ACS Nano* 2009, 3, (12), 3884-3890.
16. T. Chatterjee, K. Yurekli, V. G. Hadjiev, R. Krishnamoorti, *Adv. Funct. Mater.* 2005, 15, (null), 1832.
17. J. Du, L. Zhao, Y. Zeng, L. Zhang, F. Li, P. Liu, C. Liu, "Comparison of electrical properties between multi-walled carbon nanotube and graphene nanosheet/high density polyethylene composites with a segregated network structure" *Carbon* 2011, 49, (4), 1094-1100.
18. M. M. Gudarzi, F. Sharif, "Molecular level dispersion of graphene in polymer matrices using colloidal polymer and graphene" *Journal of Colloid and Interface Science* 2012, 366, (1), 44-50.
19. J. M. Wernik, S. A. Meguid, "Recent Developments in Multifunctional Nanocomposites Using Carbon Nanotubes" *Appl. Mech. Rev.* 2010, 63, (5), 050801.
20. S. K. Smart, A. I. Cassady, G. Q. Lu, D. J. Martin, "The biocompatibility of carbon nanotubes" *Carbon* 2006, 44, (6), 1034-1047.
21. H. Hu, Y. C. Ni, V. Montana, R. C. Haddon, V. Parpura, "Chemically functionalized carbon nanotubes as substrates for neuronal growth" *Nano Lett.* 2004, 4, (3), 507-511.
22. C. Velasco-Santos, A. L. Martinez-Hernandez, F. T. Fisher, R. Ruoff, V. M. Castano, "Improvement of thermal and mechanical properties of carbon nanotube composites through chemical functionalization" *Chem. Mater.* 2003, 15, (23), 4470-4475.
23. T. C. Chiang, F. Seitz, "Photoemission spectroscopy in solids" *Annalen der Physik* 2001, 10, (1-2), 61-74.
24. S. Yumitori, "Correlation of C-1s chemical state intensities with the O-1s intensity in the XPS analysis of anodically oxidized glass-like carbon samples" *Journal of Materials Science* 2000, 35, (1), 139-146.
25. D. R. Dreyer, S. Park, C. W. Bielawski, R. S. Ruoff, "The chemistry of graphene oxide" *Chem. Soc. Rev.* 2010, 39, (1), 228-240.

26. C. Gomez-Navarro, J. C. Meyer, R. S. Sundaram, A. Chuvilin, S. Kurasch, M. Burghard, K. Kern, U. Kaiser, "Atomic Structure of Reduced Graphene Oxide" *Nano Lett.* 2010, 10, (4), 1144-1148.
27. D. Tasis, N. Tagmatarchis, A. Bianco, M. Prato, "Chemistry of carbon nanotubes" *Chem. Rev.* 2006, 106, (3), 1105-1136.
28. R. Ormsby, T. McNally, C. Mitchell, N. Dunne, "Influence of multiwall carbon nanotube functionality and loading on mechanical properties of PMMA/MWCNT bone cements" *J. Mater. Sci-Mater Med.* 2010, 21, (8), 2287-2292.
29. R. Ormsby, T. McNally, C. Mitchell, N. Dunne, "Incorporation of multiwalled carbon nanotubes to acrylic based bone cements: Effects on mechanical and thermal properties" *J. Mech. Behav. Biomed. Mater.* 2010, 3, (2), 136-145.
30. R. Ormsby, T. McNally, C. Mitchell, P. Halley, D. Martin, T. Nicholson, N. Dunne, "Effect of MWCNT addition on the thermal and rheological properties of polymethyl methacrylate bone cement" *Carbon* 2011, 49, (9), 2893-2904.
31. M. Francisco-Marquez, A. Galano, A. Martinez, "On the Free Radical Scavenging Capability of Carboxylated Single-Walled Carbon Nanotubes" *J. Phys. Chem. C* 2010, 114, (14), 6363-6370.
32. A. Galano, "Carbon nanotubes: promising agents against free radicals" *Nanoscale* 2010, 2, (3), 373-380.
33. A. Martinez, A. Galano, "Free Radical Scavenging Activity of Ultrashort Single-Walled Carbon Nanotubes with Different Structures through Electron Transfer Reactions" *J. Phys. Chem. C* 2010, 114, (18), 8184-8191.
34. A. A. Balandin, S. Ghosh, W. Bao, I. Calizo, D. Teweldebrhan, F. Miao, C. N. Lau, "Superior thermal conductivity of single-layer graphene" *Nano Lett.* 2008, 8, (3), 902-907.
35. S. Berber, Y. K. Kwon, D. Tomaneck, "Unusually high thermal conductivity of carbon nanotubes" *Phys. Rev. Lett.* 2000, 84, (20), 4613-4616.
36. K. Hatada, T. Kitayama, K. Ute, Y. Terawaki, T. Yanagida, "End-Group Analysis of Poly(methyl methacrylate) Prepared with Benzoyl Peroxide by 750 MHz High-Resolution ¹H NMR Spectroscopy" *Macromolecules* 1997, 30, (22), 6754-6759.
37. Z. J. Jia, Z. Y. Wang, C. L. Xu, J. Liang, B. Q. Wei, D. H. Wu, S. W. Zhu, "Study on poly(methyl methacrylate)/carbon nanotube composites" *Mat. Sci. and Eng. A-Struct* 1999, 271, (1-2), 395-400.
38. P. J. Krusic, E. Wasserman, P. N. Keizer, J. R. Morton, K. F. Preston, "Radical reactions of C₆₀" *Science* 1991, 254, (5035), 1183-1185.

39. P. C. P. Watts, P. K. Fearon, W. K. Hsu, N. C. Billingham, H. W. Kroto, D. R. M. Walton, "Carbon nanotubes as polymer antioxidants" *J. Mater. Chem.* 2003, 13, (3), 491-495.
40. I. Fenoglio, M. Tomatis, D. Lison, J. Muller, A. Fonseca, J. B. Nagy, B. Fubini, "Reactivity of carbon nanotubes: Free radical generation or scavenging activity?" *Free Radical Bio. Med.* 2006, 40, (7), 1227-1233.
41. G. Goncalves, P. Marques, A. Barros-Timmons, I. Bdkin, M. K. Singh, N. Emami, J. Gracio, "Graphene oxide modified with PMMA via ATRP as a reinforcement filler" *J. Mater. Chem.* 2010, 20, (44), 9927-9934.
42. L. D. T. Topoleski, P. Ducheyne, J. M. Cuckler, "The effects of centrifugation and titanium fiber reinforcement on fatigue failure mechanisms in poli(methyl methacrylate) bone-cement" *J. Biomed. Mater. Res.* 1995, 29, (3), 299-307.

Capítulo IV

Bioatividade e biocompatibilidade dos cimentos ósseos PMMA/HA reforçados com nanoestruturas de carbono

Neste capítulo serão avaliadas a bioatividade e a biocompatibilidade dos novos cimentos ósseos à base de PMMA/HA reforçados com CNTs ou GO. Para este estudo foram escolhidos os nanocompósitos que anteriormente evidenciaram melhores propriedades mecânicas, 0.1CNT e 0.5GO e a matriz PMMA/HA como termo de comparação.

A bioatividade dos materiais foi analisada através da incubação dos cimentos em solução de fluido corporal simulado, por forma a avaliar a capacidade destes materiais favorecerem ou não o crescimento e integração de uma camada de fosfato de cálcio na sua superfície.

A biocompatibilidade dos nanocompósitos foi testada recorrendo a dois tipos de linhas celulares, Fibroblastos L929 e Osteoblastos Saos-2. A análise dos distintos parâmetros biológicos: proliferação celular, viabilidade celular e apoptose e morfologia celular, permitiram avaliar o comportamento celular nos materiais estudados.

Índice

CAPÍTULO IV - BIOATIVIDADE E BIOCOMPATIBILIDADE DOS CIMENTOS ÓSSEOS PMMA/HA REFORÇADOS COM NANOESTRUTURAS DE CARBONO	161
4.1 INTRODUÇÃO.....	163
4.2 CARACTERIZAÇÃO SUPERFICIAL DAS AMOSTRAS.....	167
4.3 ESTUDO DE BIOATIVIDADE POR INCUBAÇÃO EM SBF	171
4.3.1 <i>Caracterização da camada de fosfato de cálcio formada</i>	<i>171</i>
4.3.2 <i>Avaliação da integração da camada de fosfato de cálcio formada.....</i>	<i>175</i>
4.4 ESTUDOS CELULARES DE BIOCOMPATIBILIDADE	177
4.4.1 <i>Estudos de proliferação celular</i>	<i>177</i>
4.4.2 <i>Estudos de morfologia celular</i>	<i>179</i>
4.4.3 <i>Estudos de viabilidade celular e apoptose.....</i>	<i>180</i>
4.5 CONCLUSÃO	182
4.6 PARTE EXPERIMENTAL	183
4.6.1 <i>Polimento das amostras</i>	<i>183</i>
4.6.2 <i>Estudos de mineralização em SBF.....</i>	<i>183</i>
4.6.3 <i>Medição de angulo de contacto na superfície das amostras com água e diclorometano.....</i>	<i>184</i>
4.6.4 <i>Estabilização das amostras para estudos in vitro de biocompatibilidade</i>	<i>184</i>
4.6.5 <i>Estudos de proliferação celular</i>	<i>184</i>
4.6.6 <i>Estudos de morfologia celular por microscopia confocal</i>	<i>185</i>
4.6.7 <i>Estudos de morfologia celular por SEM.....</i>	<i>185</i>
4.6.8 <i>Estudos de viabilidade celular e apoptose por citometria de fluxo</i>	<i>185</i>
4.6.9 <i>Validação estatística dos resultados por SPSS</i>	<i>186</i>
4.7 CARACTERIZAÇÃO	187
4.8 REFERÊNCIAS	188

4.1 Introdução

O desenvolvimento de biomateriais baseados em fosfato de cálcio para a utilização como substituto ósseo em ortopedia deve-se essencialmente à sua semelhança química e estrutural com a composição mineral do osso. A crescente compreensão dos sistemas biológicos a nível atômico e molecular e os grandes avanços científicos na área da nanotecnologia possibilitam mimetizar as estruturas biológicas através de processos sintéticos.¹ Esta similaridade permite desencadear alguns processos biológicos de bioatividade e biocompatibilidade.

O conceito de bioatividade, a capacidade um material ligar com o osso recentemente formado, foi primeiramente descrito por Hench *et al* para o caso de vidros bioativos.² Este mecanismo é descrito por uma sequência de onze passos em que os primeiros cinco consistem em processos químicos responsáveis pela formação de novas ligações químicas e os últimos seis consistem em mecanismos biológicos tais como colonização por osteoblastos, seguido de proliferação e diferenciação das células de modo a obter novo osso com forte ligação à superfície do implante. Este mecanismo de bioatividade foi posteriormente adaptado aos fosfatos de cálcio, no qual os três primeiros passos foram substituídos por reações de dissolução parcial da HA.³

A chamada "apatite biológica" é formada nos organismos vivos, como resultado de processos de biomineralização, contudo este mecanismo biológico ainda não se encontra totalmente esclarecido. Este processo inclui reações de dissolução, precipitação e crescimento de fosfatos de cálcio pouco cristalinos em matriz orgânica, por exemplo colagénio no caso de ossos,^{4, 5} na presença de fluidos corporais. Portanto, a melhor maneira para simular o processo de biomineralização seria realizar experiências utilizando fluidos corporais (plasma sanguíneo, saliva, etc...), mas isso não é fácil devido à variabilidade da composição química e bioquímica dos fluidos corporais e problemas com o seu armazenamento.

As soluções de eletrólitos de diferentes composições, projetadas para mimetizar o plasma humano, tornaram-se uma maneira expedita de testar as capacidades dos materiais bioativos estabelecerem ligações com o osso. As primeiras tentativas para a obtenção de fluido corporal simulado remontam à década de 40 através do desenvolvimento do EBSS (Earle's balanced salt solution, 1943)⁶ e do HBSS (Hank's balanced salt solution, 1949)⁷. Em 1990, Kokubo *et al.*⁸ popularizou uma metodologia que permitiu reproduzir a formação *in vivo* de estruturas apatíticas através da incubação do biomaterial em fluido corporal simulado (SBF) com concentração de iões semelhante ao plasma sanguíneo humano. Esta abordagem permite que a bioatividade de um material

possa ser prevista através do seu comportamento *in vitro* por imersão numa solução de SBF. Outras variâncias deste método tem sido descritas na literatura, os quais apresentam pequenas alterações na tentativa de melhor incorporarem as características do plasma sanguíneo, c-SBF (1991),⁹ r-SBF (2003)¹⁰ e n-SBF (2004)¹¹.

As condições experimentais de realização dos testes por incubação em SBF (*in vitro*) não são claramente idênticas às condições *in vivo*, apresentando assim algumas diferenças significativas no processo de cristalização dos fosfatos de cálcio (composição química, rácio Ca/P, cristalinidade, tamanho de grão, etc...) comparativamente com as apatites biológicas:⁴

- As concentrações de cálcio e ortofosfatos assim como outras moléculas e iões são mantidas rigorosamente constantes durante a mineralização biológica (o mesmo é válido para o pH da solução), o que não ocorre na mineralização *in vitro*.
- A cristalização *in vitro* é um processo rápido (escala de minutos ou dias), enquanto a cristalização biológica é um processo lento (escala de semanas a anos).
- A presença de estruturas biológicas nos fluidos corporais permite a indução de diferentes tarefas como inibição, nucleação ou mesmo template para o crescimento da hidroxiapatite biológica. Além disso, podem de alguma forma influenciar a cinética de cristalização.
- A mineralização química é caracterizada por um processo passivo, enquanto a mineralização biológica é fortemente influenciada pelas células e ocorre por mecanismos de auto-organização.

Para além das limitações do ponto de vista experimental no uso do protocolo de SBF nem sempre os resultados obtidos podem ser assumidos como similares à incorporação biológica. Bohmer *et al.* afirma que o facto de um material apresentar a capacidade de formar uma camada apatítica não significa que este tenha capacidade de estabelecer ligações com o osso vivo e vice-versa,¹² sendo mesmo que em alguns casos se verificou falsos positivos e falsos negativos. Porém o autor considera que para além desta crítica o uso do protocolo *in vitro* continua a ser um conceito atrativo, mas que as conclusões a tirar devem ser avaliadas com muito cuidado.

O processo biológico de reparação óssea é bastante complexo, sendo caracterizado por uma série bem ordenada de eventos que envolvem uma diversidade de atividades celulares, tais como: proliferação, diferenciação, quimiotaxia e a produção de matriz extracelular. O recrutamento de células estaminais mesenquimais indiferenciadas ao local da ferida e indução destas células para a linhagem de osteoblastos são todos

procedimentos necessários para restaurar osso danificado de volta para um tecido funcional.¹³ Este processo é altamente regulado por um conjunto de fatores de crescimento que são sintetizados por uma variedade de tipos de células, e expressos de modo tempo/concentração durante o período de cura.¹⁴ A sinalização coordenada entre os fatores de crescimento é conhecida por controlar identidade da célula, proliferação e diferenciação na linhagem específica.¹⁵

A viabilidade de um material enquanto biomaterial ortopédico não está apenas restrita ao facto de este permitir a interação com o osso, é também necessário avaliar a sua biocompatibilidade, ou seja verificar se o material é tóxico ou não para as células e tecidos vivos circundantes. Existem duas possibilidades para avaliar a biocompatibilidade de um material: através de estudos celulares com linhagens de células similares às humanas (osteoblastos e fibroblastos) o que se denomina estudos *in vitro*, ou através do implante do biomaterial em animais e posterior avaliação da influência nos tecidos vivos circundantes o denominado estudo *in vivo*.¹¹ Efetivamente ambos apresentam vantagens e desvantagens, o primeiro é bastante mais simples e de fácil implementação contudo os resultados não são tão rigorosos, por outro lado o segundo apresenta alguns problemas éticos (não se pode realizar como prática rotineira), exigência nos protocolos a seguir, mas os resultados são mais fiáveis e mais semelhantes com a realidade.

O desenvolvimento de novos biomateriais com o recurso a CNTs apresenta desde logo algumas preocupações com o seu nível de toxicidade. Embora muitos esforços tenham sido feitos para investigar cuidadosamente a toxicidade dos CNTs *in vitro* e *in vivo*, os investigadores continuam a não alcançar consenso relativamente aos possíveis efeitos em células, órgãos e organismos.¹⁶ A dificuldade na obtenção de resultados coerentes prende-se com o facto de os testes serem realizados com CNTs com diferente estrutura e morfologia: comprimento, diâmetro, funcionalização ou não, grau e tipo de funcionalização, presença de contaminantes (Ni, Fe e Co...) o que impede uma generalização dos resultados.¹⁶ No entanto verifica-se que quando os CNTs são funcionalizados¹⁷⁻¹⁹ ou incorporados numa matriz^{20, 21} podem até beneficiar o crescimento e a diferenciação celular. Estudos celulares realizados recentemente em cimentos ósseos à base de PMMA reforçados com MWCNTs demonstraram excelente biocompatibilidade.²²⁻²⁴

Os estudos de biocompatibilidade desenvolvidos com grafenos ainda se encontram numa fase preliminar, contudo já se podem identificar resultados ambivalentes.^{25, 26} Estudos celulares para avaliar a biocompatibilidade entre CNTs e grafenos demonstraram maiores níveis de toxicidade para o caso dos CNTs, sendo os resultados obtidos dependentes da

morfologia e composição química.^{27, 28} Outros parâmetros como caracter hidrofílico²⁹ e níveis dosagem²⁶ do grafeno demonstraram contribuir de forma determinante para a avaliação da toxicidade do material. É no entanto importante salientar que os grafenos e materiais derivados apresentam uma multiplicidade de morfologias e estruturas químicas, o que requer estudos de toxicidade/biocompatibilidade a longo termo por forma a validar estes materiais em futuras aplicações biomédicas.

Neste capítulo será feita uma tentativa para avaliar como as propriedades físico-químicas e estruturais das nanoestruturas de carbono podem influenciar as propriedades biológicas dos cimentos ósseos à base de PMMA/HA (1:2). Os resultados anteriores demonstraram efetivamente que baixos teores de GO ou CNTs em nanocompósitos de PMMA/HA têm um impacto significativo nas propriedades mecânicas dos materiais, e espera-se que esta influência também se repercuta nas propriedades biológicas.

A primeira abordagem para avaliar a bioatividade dos materiais consiste no estudo do processo de mineralização dos nanocompósitos em solução SBF ao longo do tempo, para um período máximo de 30 dias. Os resultados obtidos mostram a formação de uma camada apatítica na superfície dos materiais nanocompósitos.

O estudo da biocompatibilidade dos diferentes materiais foi realizado através de ensaios *in vitro* com fibroblastos L929 e osteoblasto Saos-2. A análise dos diferentes parâmetros celulares, tais como a proliferação celular, viabilidade celular, morfologia celular e apoptose demonstraram uma excelente biocompatibilidade dos materiais nanocompósitos.

4.2 Caracterização superficial das amostras

As amostras dos diferentes nanocompósitos (PMMA/HA, 0.1CNT e 0.5GO) foram previamente polidas antes da realização dos testes de mineralização e de biocompatibilidade, com o objetivo de uniformizar as superfícies expostas. A rugosidade média final das amostras foi avaliada por AFM, a Figura 4.1 ilustra as imagens 3D obtidas através da análise de diferentes áreas da superfície das amostras (25, 225 e 625 μm^2). Na Figura 4.2 estão representado graficamente os resultados obtidos para a rugosidade superficial média em função da área de varrimento das diferentes amostras. Os resultados demonstram efetivamente que com o aumento da área de varrimento do cantiliver aumenta a rugosidade média das amostras. De facto, este efeito deixa de ser relevante quando se consideram áreas superiores a 250 μm^2 , passando o valor da rugosidade a ser independente da área considerada.

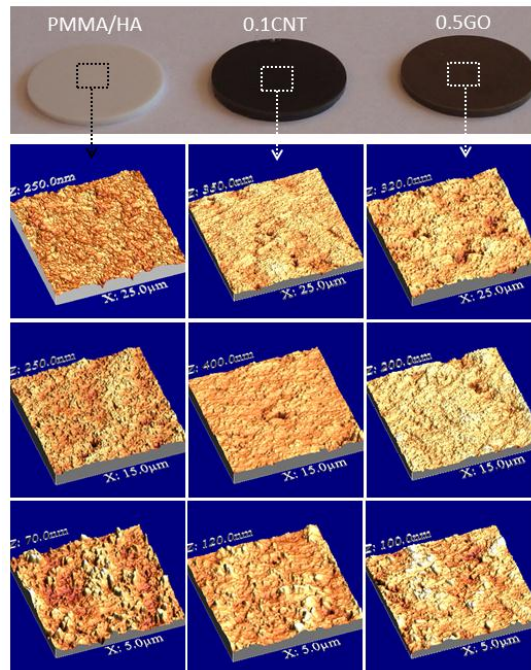


Figura 4.1 Imagem das amostras de nanocompósitos PMMA/HA, 0.1CNT e 0.5GO. Análise de AFM das referidas amostras considerando diferentes áreas (25, 225 e 625 μm^2).

Os resultados obtidos demonstram que o polimento foi efetivo na uniformização da superfície das diferentes amostras (parte experimental: 4.6.1 Polimento das amostras), sendo que o menor valor de rugosidade média foi obtido para o substrato PMMA/HA. No entanto este valor não deverá ser considerado muito significativo pois são diferenças na ordem de grandeza de 5 nm relativamente aos outros substratos.

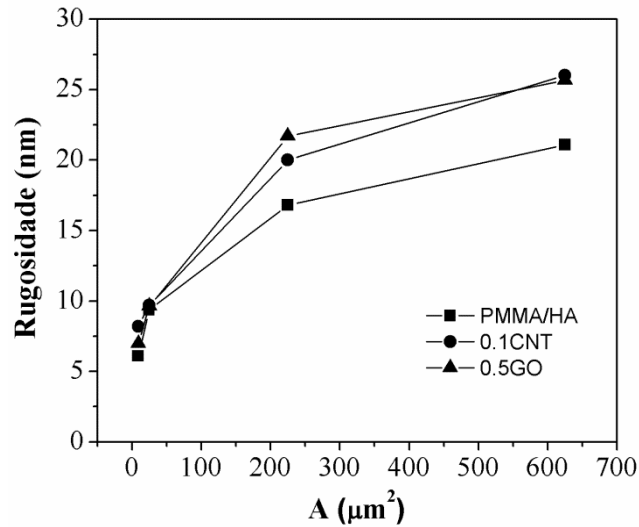


Figura 4.2 Rugosidade superficial média (RSM) das amostras PMMA/HA, 0.1CNT e 0.5GO obtida através de estudos de AFM (9, 25, 225 e 625 μm²).

A molhabilidade dos cimentos foi avaliada por medidas de ângulos de contato com água. A dependência do ângulo de contato em função do tempo para os três materiais em estudo está representada na Figura 4.3.

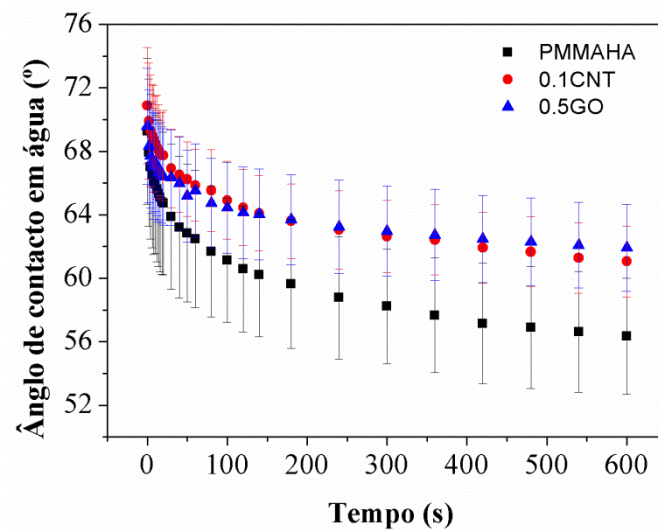


Figura 4.3 Ângulo de contacto de água em função do tempo para as diferentes superfícies dos materiais nanocompósitos: PMMA/HA, 0.1CNT e 0.5GO.

O PMMA é considerado um polímero hidrofílico pois o seu ângulo de contacto com a água é inferior a 90°, sendo aproximadamente 68° para o polímero puro.³⁰ A molhabilidade depende maioritariamente de dois fatores intrínsecos ao material, a química de superfície e a rugosidade. Uma vez que a avaliação anterior da rugosidade

através de ensaios de AFM indicou que esta era bastante semelhante para todos os materiais considerados, as possíveis diferenças observadas deverão ser atribuídas exclusivamente à química de superfície dos materiais.

Os resultados obtidos demonstram que a molhabilidade da superfície dos cimentos ósseos é dependente do tempo de contacto, sendo o seu valor inicial muito semelhante ao descrito na literatura para o PMMA puro. A evolução temporal do ângulo de contacto da água demonstra um decréscimo do seu valor para aproximadamente 63° no caso dos nanocompósitos 0.1CNT e 0.5GO e para aproximadamente 56° para o nanocompósito PMMA/HA após 600 s. Estes resultados, apesar do erro associado, permitem concluir que efetivamente a HA se encontra disponível na superfície do material tornando-a mais hidrofílica.

O decréscimo mais acentuado do valor do ângulo de contato para o PMMA/HA em relação aos nanocompósitos com CNTs e GO, permite também inferir que as nanoestruturas de carbono poderão ter um contributo na molhabilidade das superfícies dos nanocompósitos. Sabendo que estas estruturas de carbono têm uma grande superfície de carbono não oxidado (ligações C-C tipo sp²) é assim plausível que confirmam aos nanocompósitos um ângulo de contacto em água superior, tal como verificado.

Os resultados obtidos para os ângulos de contacto de água e diodometano na superfície dos materiais compósitos, após 10 minutos, permitem determinar os valores para a energia de superfície e polaridade (Tabela 4.1). A energia de superfície pode ser obtida pela soma da contribuição polar e dispersiva $\gamma_s = \gamma_s^d + \gamma_s^p$,³¹ sendo que os resultados obtidos demonstram que a incorporação de nanoestruturas de carbono na matriz polimérica influencia preferencialmente a contribuição polar obtendo assim valores de menor energia de superfície dos nanocompósitos finais.

Tabela 4.1 Contribuição polar (γ_s^p) e dispersiva (γ_s^d) para a energia de superfície (γ_s) dos diferentes materiais nanocompósitos: PMMA/HA, 0.1CNT e 0.5GO.

	PMMA/HA	0.1CNT	0.5GO
γ_s^d (mJ m ⁻²)	32±1	33±1	33±1
γ_s^p (mJ m ⁻²)	18±3	14±2	14±2
γ_s (mJ m ⁻²)	50±3	47±2	47±2
Polaridade	0,36±0,05	0,30±0,04	0,29±0,03

A análise por SEM da superfície polida do nanocompósito PMMA/HA permite observar uma superfície lisa com uma distribuição homogênea das esferas de PMMA pré-polimerizado na matriz de PMMA e HA (Figura 4.4). As imagens superficiais foram também obtidas para nanocompósitos 0.1CNT e 0.5GO, sendo estas idênticas às anteriores para o mesmo nível de ampliação. Não é possível averiguar as diferenças através desta técnica microscópica, pois o aumento da ampliação por forma a tentar observar as nanoestruturas de carbono leva a que o feixe de elétrons do SEM degrade a estrutura polimérica, inviabilizando a captura de imagens.

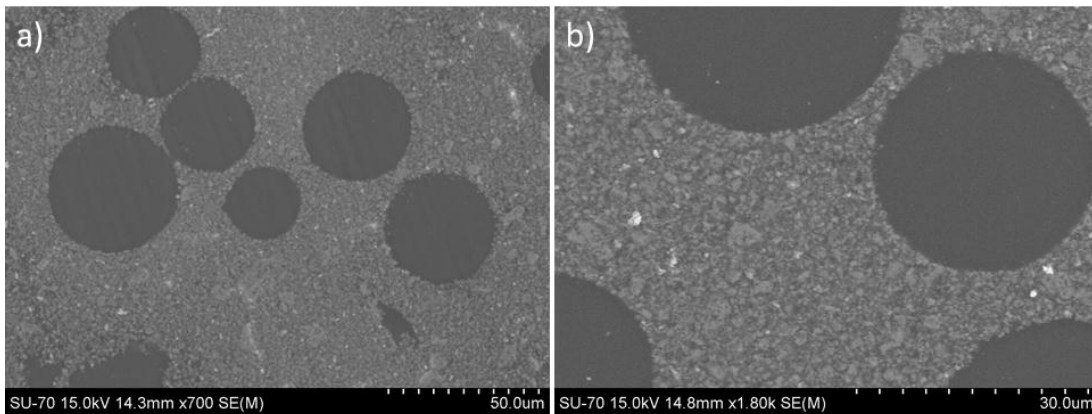


Figura 4.4 Imagem de SEM da superfície polida do nanocompósito PMMA/HA.

4.3 Estudo de bioatividade por incubação em SBF

Os estudos de mineralização consistiram na incubação das diferentes amostras de cimentos ósseos em solução de SBF para diferentes períodos de tempo até um máximo de 30 dias (parte experimental: 4.6.2 Estudos de mineralização em SBF). De salientar que as amostras em forma de disco foram colocadas em posição vertical dentro do frasco de incubação, para evitar qualquer deposição de camada devida a qualquer evento de supersaturação na solução que pudesse favorecer deposição gravitacional na superfície da amostra.

4.3.1 Caracterização da camada de fosfato de cálcio formada

A análise por SEM permitiu verificar a evolução da morfologia da camada apatítica formada à superfície das amostras, exemplificada na Figura 4.5 para a amostra PMMA/HA. As imagens de SEM da camada apatítica formada na superfície dos outros substratos, 0.1CNT e 0.5GO, são extremamente semelhantes ao caso da amostra PMMA/HA, não sendo por isso relevante mostra-las comparativamente.

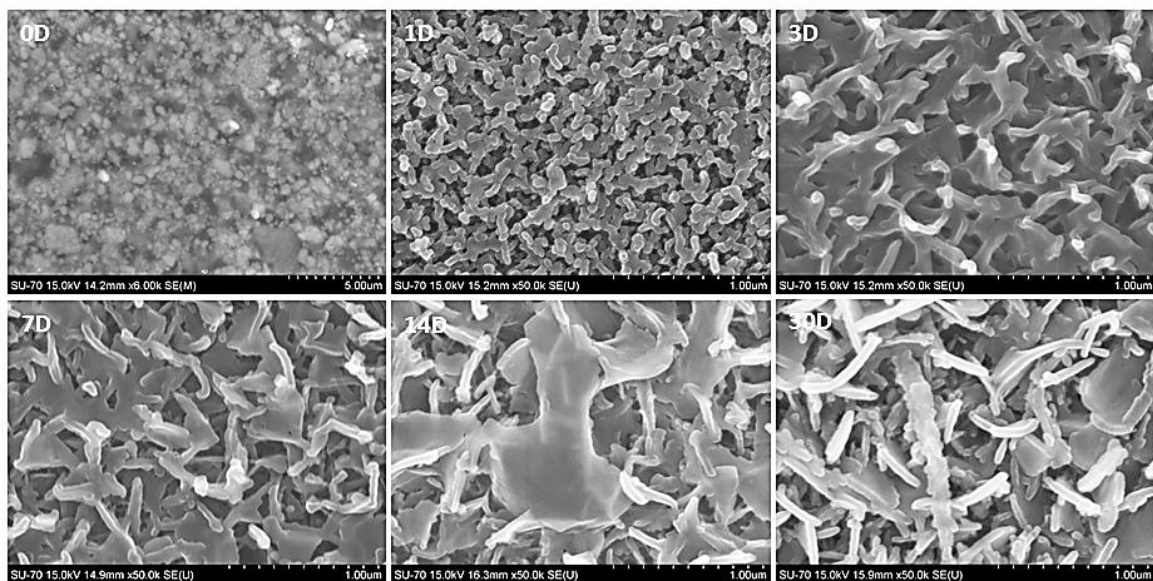


Figura 4.5 Evolução morfológica da camada de fosfato de cálcio formada à superfície do substrato PMMA/HA após incubação em SBF durante, 1, 3, 7, 14 e 30 dias.

Na imagem 0D da Figura 4.5 pode-se observar a superfície da amostra PMMA/HA antes de incubação em SBF, onde se verifica uma distribuição homogênea das partículas de HA na matriz de PMMA. Após 1 dia de incubação da amostra em SBF verifica-se a formação de uma estrutura apatítica granular na superfície do nanocompósito (1D). Com a evolução no tempo de incubação da amostra verifica-se a transformação das estruturas

apatíticas em placas, e após 30 dias de incubação verifica-se que a densificação da camada apatítica é muito mais significativa (30D).

Os fosfatos de cálcio são moderadamente solúveis em água variando na seguinte ordem: TTCP > α -TCP > DCPD > DCPA > OCP ~ β -TCP > HA,³² sendo que a HA apresenta a menor solubilidade entre eles. Assim, considerando a HA como praticamente insolúvel esta não participa ativamente no processo de remodelação óssea.³³ Não será de esperar que o processo de mineralização ocorra devido a fenómenos de dissolução/reprecipitação como o que acontece por exemplo em cerâmicos de trifosfato de cálcio.³⁴ No entanto em contacto com os fluidos corporais pode participar com agente indutor de sítios ativos para a formação de uma camada superficial de fosfato de cálcio. A determinação da concentração de iões cálcio e fósforo nas soluções de SBF que estiveram em contacto com as amostras permitem avaliar a cinética da formação da camada de fosfato de cálcio à superfície dos diferentes materiais.

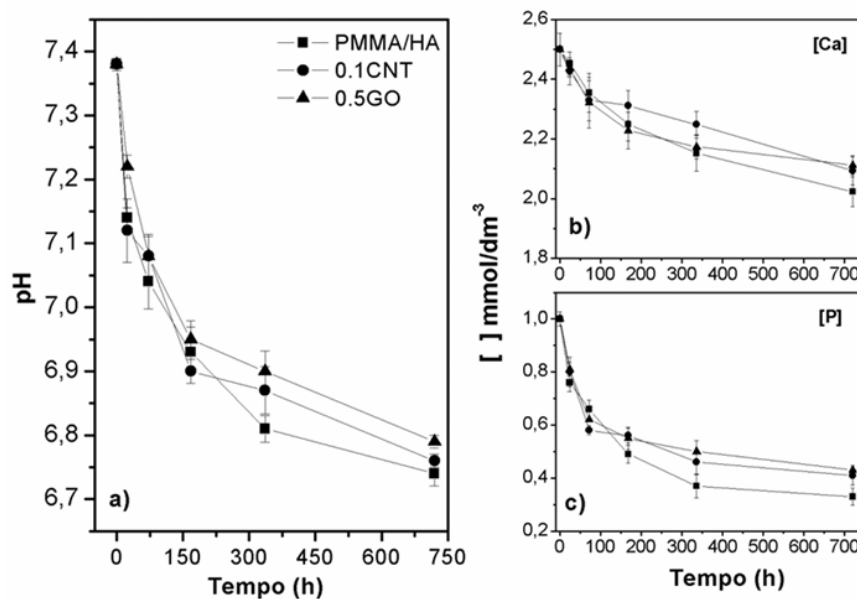


Figura 4.6 Evolução do pH **a)**, concentração de cálcio **b)** e fósforo **c)** na solução de SBF durante o período de incubação dos substratos, PMMA/HA, 0.1CNT e 0.5GO.

A Figura 4.6 representa a evolução das concentrações totais de cálcio e fósforo e do pH ao longo do tempo nas soluções de SBF em contacto com as amostras dos nanocompósitos (PMMA/HA, 0.1CNT e 0.5GO), os resultados obtidos evidenciam um decréscimo acentuado das concentrações de cálcio e fósforo, assim como do pH nos três primeiros dias de incubação o que permite concluir que a superfície das amostras possui uma grande capacidade para induzir o crescimento de fosfatos de cálcio na sua

superfície. Após três dias de incubação, este decréscimo não é tão acentuado devido à diminuição da sobressaturação relativa da solução em relação aos fosfatos de cálcio. De uma maneira geral, os resultados obtidos demonstram que não existem grandes diferenças nas concentrações de cálcio e fósforo na solução para os diferentes substratos ao longo do tempo, contudo pode-se considerar uma tendência, em ambos os casos, para que a concentração de cálcio e fósforo em solução decresça mais quando em contacto com o substrato PMMA/HA (Figura 4.6 b) e c)). Uma explicação plausível para este acontecimento pode ser construída através do estudo de molhabilidade realizado anteriormente, o qual demonstrou que o PMMA/HA é o material mais hidrofílico permitindo assim uma maior difusão dos elementos da solução aquosa para a sua superfície.

A análise por raios-X de ângulo rasante permitiu identificar as estruturas cristalinas que se formaram ao longo do tempo na superfície do nanocompósito após incubação em SBF. De facto a presença de uma grande quantidade de HA no substrato não facilita a verificação do aparecimento de novos picos, devido ao facto de que a intensidade inicial dos picos de HA ser bastante acentuada (Figura 4.7).

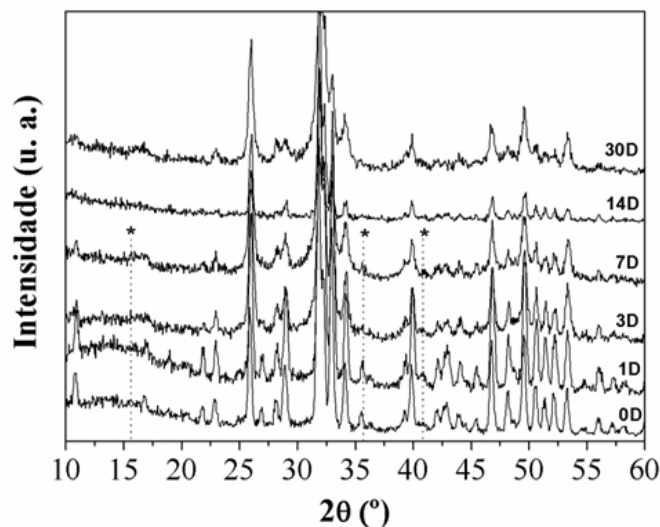


Figura 4.7 Análise por raios-X em ângulo rasante da evolução da camada de fosfato de cálcio formada na superfície do substrato PMMA/HA após incubação em SBF para vários períodos de tempo.

Ao longo do tempo de incubação das amostras em SBF verifica-se claramente um atenuar da intensidade dos picos iniciais do substrato de HA até ao 14º dia, o que pode ser explicado pela formação de uma camada apatítica superficial pouco cristalina identificada como fosfato octacálcico ($\text{Ca}_8\text{H}_2(\text{PO}_4)_6 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$), 15,6, 26,9 e 40,8°. ³⁵ Após 30

dias de incubação em SBF já se verifica um aumento da intensidade dos picos, o que se explica por uma reestruturação do fosfato octacálcico (fase transiente) na fase mais estável, hidroxiapatite ($\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3\text{OH}$).³⁵

A análise por FTIR das amostras após a incubação em SBF, permitiu avaliar a transformação biomimética de fase de um fosfato cálcio amorfo inicial para uma apatite pouco cristalina (Figura 4.8), tal como verificado anteriormente por XRD. Após o primeiro dia de incubação (1D) das amostras é possível verificar o aparecimento de algumas novas bandas comparativamente aos substratos (0D), CO_3^{2-} a 1450 e 1410 cm^{-1} e $\text{HPO}_4^{2-}/\text{CO}_3^{2-}$ a 870 cm^{-1} . Estes resultados permitem comprovar a formação de apatites carbonatadas e do OCP num período inicial de reação.³⁶ É também perceptível a formação de um ombro a 1115 cm^{-1} , que corresponde à formação de PO_4^{3-} em ambiente de HA pouco cristalina, ligeiramente diferente do ambiente na HA inicial, 1030 cm^{-1} .³⁷ No entanto após o 7D de incubação os grupos fosfatos em ambiente HA pouco cristalina apresentam uma tendência para se deslocarem para ambiente HA mais cristalino.

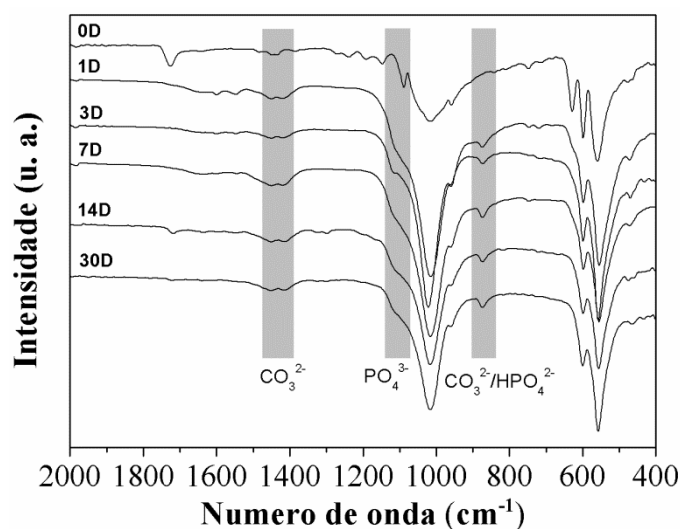
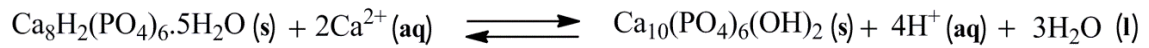


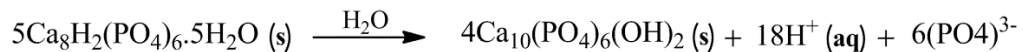
Figura 4.8 Estudo por FTIR da evolução camada de fosfato de cálcio formada na superfície do substrato PMMA/HA após incubação em SBF para vários períodos de tempo.

O OCP é considerado como um intermediário transitório durante a precipitação dos ortofosfatos de cálcio termodinamicamente mais estáveis, como a HA, em soluções aquosas. O OCP é instável e tende a atingir um equilíbrio dinâmico com a HA através do consumo de iões cálcio.³⁸



Esquema 4.1 Conversão de OCP em HA através do consumo de íons cálcio.

A semelhança na estrutura cristalina entre OCP (triclínica P1, $a=19,69$, $b=9,63$, $c=6,85\text{Å}$; $\alpha=90,13$, $\beta=92,13$, $\gamma=108,36$) e HA (hexagonal P63/m, $a=9,418$, $c=6,884\text{ Å}$) é também uma das razões pelas quais o crescimento epitaxial destas fases é muitas vezes observado.^{39, 40} A camada hidratada da célula unitária do OCP pode formar uma interfase entre HA e a solução circundante. Se isso ocorrer, o intercrescimento epitaxial entre OCP e HA é favorecido.^{4, 38} A "inclusão central OCP" (também conhecido como "linha central escura") foi identificada por TEM em apatites biológicas^{41, 42} e foi entendida como a distorção inerente à interface entre a rede cristalina do OCP e da HA.^{38, 43}



Esquema 4.2 Reação de hidrólise do OCP em HA

4.3.2 Avaliação da integração da camada de fosfato de cálcio formada

Após a avaliação estrutural e química da camada apatítica formada à superfície da amostra de cimento ósseo PMMA/HA, foi também observada a interface entre ambos os materiais através de um estudo detalhado por SEM da zona de fratura (Figura 4.9).

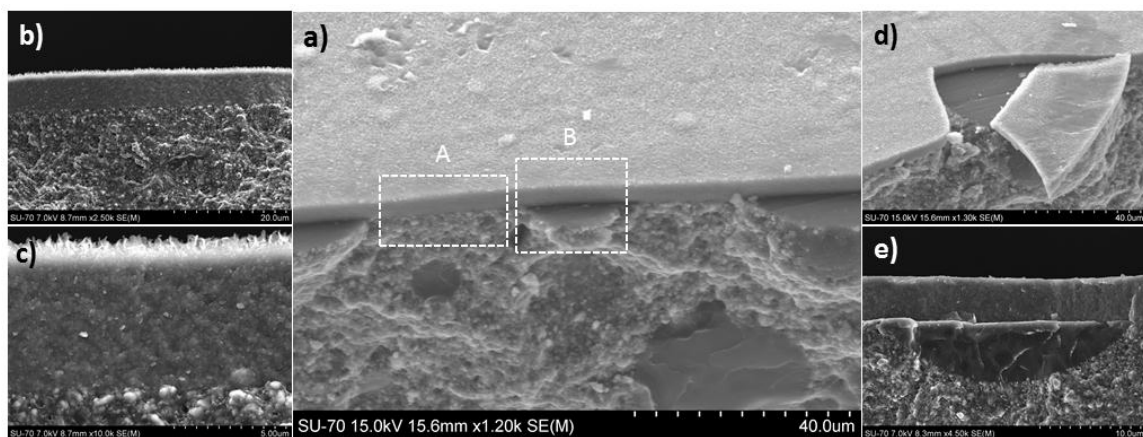


Figura 4.9 Imagens de SEM da superfície de corte do cimento ósseo após incubação durante 30 dias em SBF. Perspetiva geral da superfície de corte **a)**; zona ilustrativa da interação entre o material nanocompósito e a camada apatítica **b)** e **c)**; zona ilustrativa da falta de interação entre a camada apatítica formada e as partículas de PMMA pré-polimerizado **d)** e **e)**.

Os resultados obtidos apresentam dois tipos de interfaces bastante distintos e que podem ser observados na Figura 4.9 a): na região A pode-se observar uma zona de continuidade entre a superfície do material nanocompósito e a camada apatítica, as imagens b) e c) corroboram essa integração perfeita entre ambos os materiais; na região B pode-se verificar uma zona de descontinuidade entre a camada apatítica e as partículas de PMMA pré-polimerizado, as imagens d) e e) permitem observar a fragilidade destas interfaces.

Os resultados obtidos evidenciam claramente a importância da presença de elevadas cargas de HA na matriz de PMMA para o comportamento que estes materiais apresentam em contacto com uma solução fisiológica simulada, deixando antever a sua importância num contexto de implantação *in vivo*. As imagens de SEM apresentadas na Figura 4.9 mostram a continuidade existente entre a camada apatítica recentemente formada e a zona do cimento onde está exposta a HA, sugerindo zonas de crescimento epitaxial. Pelo contrário, as zonas onde as esferas de PMMA estão expostas não mostram qualquer tipo de ligação com a nova camada formada.

4.4 Estudos celulares de biocompatibilidade

No presente estudo de biocompatibilidade foram usadas duas linhas celulares diferentes, fibroblastos L929 de rato e osteoblastos Saos-2 humanos, como referência para a avaliação *in vitro* da biocompatibilidade dos diferentes materiais destinados à reparação óssea: PMMA/HA, 0.1CNT e 0.5GO. Uma vez que a topografia e outras características superficiais dos materiais têm um papel ativo na adesão celular, os discos destes três materiais foram estudados com as respectivas superfícies polidas. Assim, de forma a avaliar as interações células/biomaterial, ambos os tipos de células foram cultivadas nas superfícies de PMMA/HA, 0.1CNT e 0.5GO e diversos parâmetros do comportamento celular foram analisados após 3 dias de cultura: proliferação, morfologia, viabilidade e apoptose. O crescimento celular em redor dos discos foi também analisado por forma a avaliar os efeitos indiretos dos materiais na sua vizinhança.

4.4.1 Estudos de proliferação celular

Uma vez que um potencial biomaterial deve permitir a adesão e proliferação celular na sua superfície, o número de células, fibroblastos L929 ou osteoblastos Saos-2, foi analisado após um período de incubação de 3 dias na superfície dos diferentes materiais nanocompósitos, PMMA/HA, 0.1CNT e 0.5GO. As células em redor dos discos mas na superfície de plástico (TCP- tissue culture plastic) foram também contadas. Os controlos com células cultivadas em TCP na ausência de materiais foram sempre realizados em conjunto com os restantes testes. Os valores de proliferação celular foram corrigidos tendo em conta a área de superfície dos discos (cm^2), em torno dos discos e nos poços de controlo de TCP.

As Figuras 4.10 e 4.11 mostram a capacidade destes três materiais para manter a adesão e proliferação celular nas suas superfícies. Os melhores resultados foram obtidos com os fibroblastos cultivados nos discos de PMMA/HA (Figura 4.10), que apresentam valores de proliferação semelhantes aos obtidos para o controlo. Embora os materiais com CNTs e GO também permitam a adesão e proliferação celular, o número de células sobre as suas superfícies é significativamente menor do que no controlo (Figura 4.10). Em relação aos efeitos indiretos destes três materiais, foi estudado o crescimento dos fibroblastos em TCP em torno dos discos de PMMA/HA, 0.1CNT e 0.5 GO, os quais não evidenciaram diferenças significativas em relação aos controlos (ausência do material).

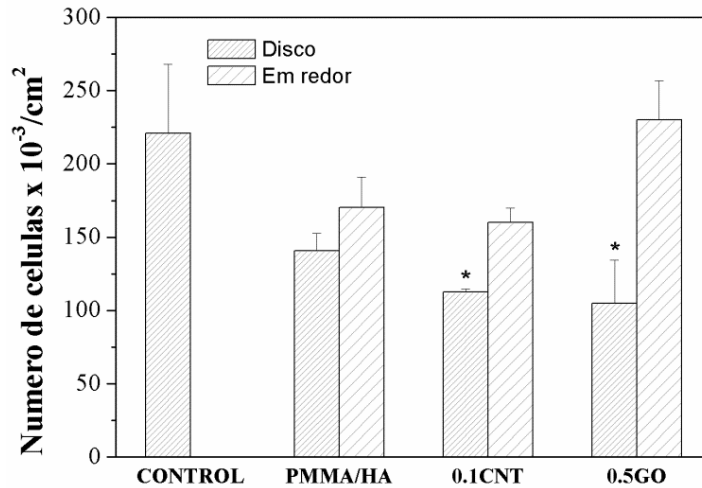


Figura 4.10 Ensaio de proliferação de fibroblastos L929 na superfície dos discos de nanocompósitos PMMA/HA, 0.1CNT e 0.5GO após cultura de 3 dias. As células cultivadas em redor dos discos em TCP também foram quantificadas. Foram também realizados controlos em TCP na ausência dos materiais compósitos. O nível de significância estatística foi de * $p < 0,05$.

O cultivo de osteoblastos Saos-2 humanos na presença dos discos de PMMA/HA, permitiu verificar a adesão e proliferação deste tipo de células na superfície e em torno deste biomaterial, mas apresentando uma sensibilidade diferente em comparação com os fibroblastos L929. Assim, os valores obtidos para a proliferação de osteoblastos Saos-2 na superfície dos discos de PMMA/HA são significativamente inferiores quando comparados com os valores de controlo (Figura 4.11).

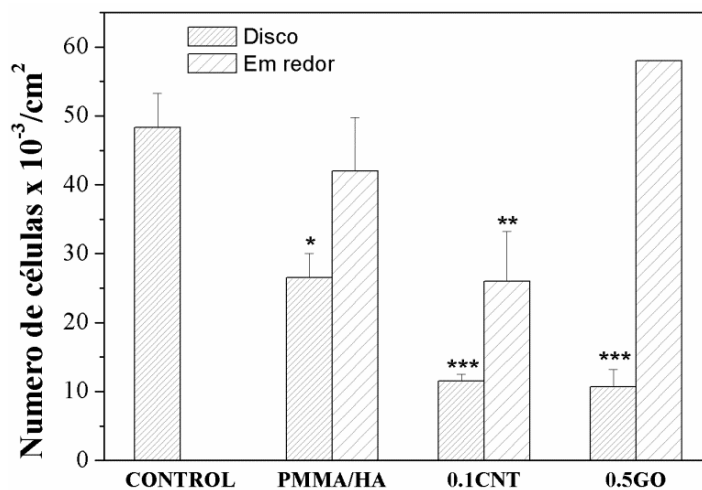


Figura 4.11 Ensaio de proliferação de osteoblastos na superfície dos discos de nanocompósitos PMMA/HA, 0.1CNT e 0.5GO após cultura de 3 dias. As células cultivadas em redor dos discos em TCP também foram quantificadas. Foram também realizados controlos em TCP na ausência dos materiais compósitos. O nível de significância estatística foi de: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,005$.

A elevada sensibilidade dos osteoblastos Saos-2 é também observada na presença dos discos de 0.1CNT (Figura 4.11), a qual se verifica através de um atraso significativo da proliferação celular nas suas superfícies e em redor dos discos. Por outro lado, o comportamento dos osteoblastos Saos-2 na presença de discos de 0.5GO (Figura 4.11) mostra também uma diminuição significativa do crescimento celular nas suas superfícies em relação ao controlo, mas sem alterações ao redor dos discos.

4.4.2 Estudos de morfologia celular

Uma vez que a qualidade da adesão celular influencia a morfologia celular e a capacidade de proliferação e diferenciação sobre a superfície de um biomaterial, foram realizados estudos morfológicos por Microscopia Fluorescência Confocal (Figura 4.12) e de varrimento (Figura 4.13) dos fibroblastos L929 e dos osteoblastos Saos-2 cultivados sobre a superfície dos discos de PMMA/HA, 0.1CNT e 0.5GO.

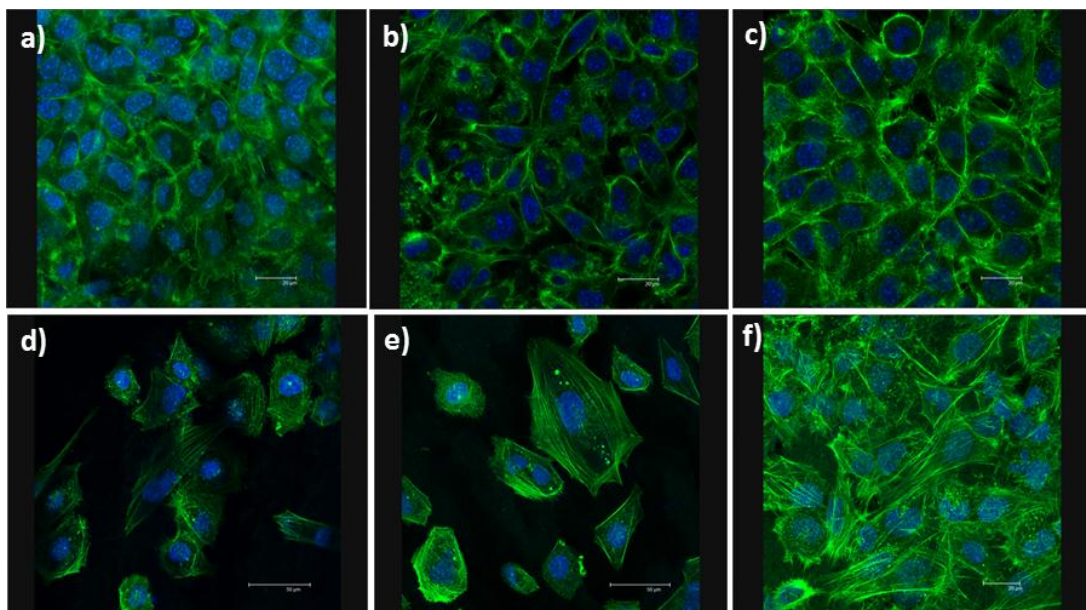


Figura 4.12 Avaliação da morfologia das células de fibroblastos (a, b, c) e osteoblastos (d, e, f) cultivados em discos de PMMA/HA (a, d), 0.1CNT (b, e) e 0.5GO (c, f) através de Microscopia Confocal.

Como se pode observar na Figura 4.12 (a-c), os fibroblastos L929 aderiram e proliferaram sobre as superfícies dos três materiais testados. As células exibem a morfologia característica de fibroblastos (estrutura alongada em forma de estrela) com uma rede distinta de actina. Não foram identificados núcleos apoptóticos por coloração com DAPI. Os osteoblastos Saos-2 também demonstram boa capacidade de adesão e proliferação nas superfícies dos discos de PMMA/HA, 0.1CNT e 0.5GO (Figura 4.12 d-f). Esta

interação não alterou a morfologia dos osteoblastos, mostrando as características típicas deste tipo de células ósseas, forma cubica e tamanho grande.

A morfologia dos fibroblastos L929 e dos osteoblastos Saos-2 cultivados na superfície dos discos PMMA/HA, 0.1CNT e 0.5GO foi também analisada por microscopia eletrônica de varrimento (Figura 4.13). Como pode ser observado, ambos os tipos de células colonizam a superfície destes três materiais e exibem a sua morfologia característica, tal como verificado anteriormente. A aderência dos seus prolongamentos para as células adjacentes e para o biomaterial permite a criação de uma rede de filamentos de actina o que também podem ser observados na Figura 4.13.

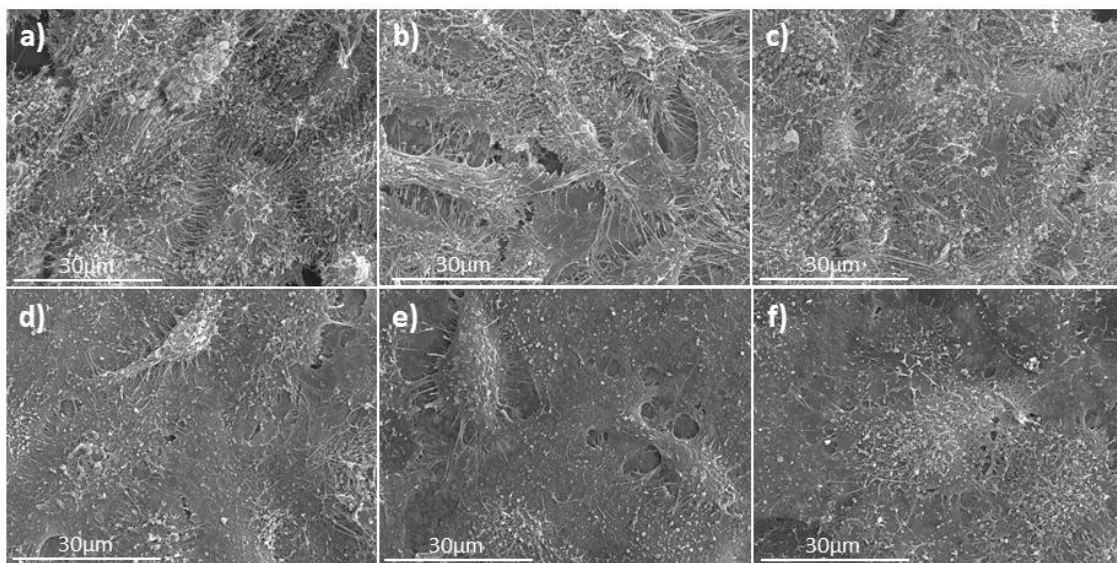


Figura 4.13 Avaliação da morfologia das células de fibroblastos (a, b, c) e osteoblastos (d, e, f) cultivados em discos de PMMA/HA (a, d), 0.1CNT (b, e) e 0.5GO (c, f) através de SEM.

4.4.3 Estudos de viabilidade celular e apoptose

A viabilidade celular dos fibroblastos L929 e dos osteoblastos Saos-2 após incubação na presença dos substratos PMMA/HA, 0.1CNT e 0.5GO, foi determinada através do estudo por exclusão com iodeto de propídio e posterior avaliação por citometria de fluxo. A tabela 4.2 apresenta os resultados para a viabilidade e apoptose dos fibroblastos e osteoblastos, na superfície do material de controlo, na superfície e em redor e dos diferentes materiais nanocompósitos, PMMA/HA, 0.1CNT e 0.5GO. Os resultados obtidos mostram níveis elevados de viabilidade celular (até 87%) para os diferentes nanocompósitos e tipos celulares, à exceção dos fibroblastos L929 cultivados nas amostras 0.5GO que mostram uma diminuição ligeira para 77% de células viáveis.

Tabela 4.2 Viabilidade celular e apoptose dos fibroblastos L929 e osteoblastos Saos-2 após três dias em cultura nos nanocompósitos, PMMA/HA, 0.1CNT e 0.5GO. As células que cresceram em redor das amostras foram também quantificadas. Os controlos foram sempre realizados na ausência dos materiais nanocompósitos.

Amostras		FIBROBLASTOS		OSTEOBLASTOS	
		Viabilidade (%)	Apoptose (%)	Viabilidade (%)	Apoptose (%)
CONTROLO		98±4	0,1±0,0	97±5	0,5±0,0
PMMA/HA	No disco	92±4	0,1±0,0	97±5	1,4±0,1
	Em redor	94±5	0,3±0,1	97±5	1,5±0,1
0.1CNT	No disco	89±3	0,1±0,0	96±3	1,3±0,1
	Em redor	95±3	0,1±0,0	97±3	3,5±0,1
0.5GO	No disco	77±3	0,3±0,0	96±5	2,2±0,1
	Em redor	91±5	0,5±0,0	100±3	1,9±0,1

A apoptose é um mecanismo de eliminação de células em desenvolvimento através de um processo de desmantelamento celular, culminando na formação de corpos celulares que são eliminados por fagocitose na ausência de uma resposta inflamatória.⁴⁴ O ciclo celular dos fibroblastos L929 e osteoblastos Saos-2 cultivados sobre e em torno das amostras de PMMA/HA, 0.1CNT e 0.5GO foi estudado por citometria de fluxo e a fração SubG₁ atribuída a células com DNA fragmentado foi utilizada como indicador da apoptose.^{45, 46} Como pode ser observado na Tabela 4.2, os valores de fase SubG₁ indica que estes biomateriais induzem baixos níveis de apoptose em ambos os tipos de células, mas ligeiramente maior nos osteoblastos Saos-2 (0,5-3,5%) do que nos fibroblastos (0-0,8%), de acordo com a maior sensibilidade de osteoblasto observada nos dados de proliferação celular e também indicado em estudos anteriores com outros materiais.^{47, 48}

4.5 Conclusão

Os estudos realizados demonstraram que os materiais desenvolvidos apresentam níveis de bioatividade e biocompatibilidade elevados.

A bioatividade dos materiais foi comprovada através da capacidade para o crescimento epitaxial de uma camada de fosfato de cálcio na sua superfície após incubação em SBF, o que sugere que os materiais apresentam boas propriedades de osteoindução, osteocondução e osseointegração. De facto, este estudo também demonstrou que as partículas de PMMA pré-polimerizado atuam como um agente passivo no crescimento da camada apatítica, o que ajuda de alguma forma a compreender a falta de bioatividade dos cimentos ósseos feitos exclusivamente à base de PMMA.

A biocompatibilidade dos materiais foi analisada através da incubação em dois tipos de células diferentes, fibroblastos L929 e osteoblastos Saos-2. Ambos os tipos celulares aderiam e cresceram nas suas superfícies com elevado níveis de viabilidade celular e baixos níveis de apoptose. Análises por microscopia eletrónica de varrimento e confocal revelaram que as células se encontravam bem distribuídas na superfície dos materiais, com uma rede de filamentos de actina e com a morfologia celular característica de cada tipo celular.

De acordo com os resultados obtidos a presença das nanoestruturas de carbono nos cimentos ósseos não favorece o comportamento celular em relação à matriz (PMMA/HA), não constituindo no entanto um impedimento ao seu desenvolvimento.

4.6 Parte experimental

4.6.1 Polimento das amostras

O polimento das amostras foi efetuado através de uma polidora Struers Rotopol-21, através do uso de diferentes lixas, Struers Komung 1200 (15,2 μm), 2400 (10,0 μm) e 4000 (5,0 μm) sendo o acabamento final realizado com uma lixa de polimento.

4.6.2 Estudos de mineralização em SBF

Os estudos de mineralização dos diferentes substratos foram obtidos através da incubação em solução de SBF, descrita por Kokubo *et al.*,⁹ ao longo do tempo para um período máximo de 30 dias. As concentrações e reagentes usados na preparação da solução de SBF estão descritos na tabela seguinte.

Tabela 4.3 Reagentes para a preparação de 1L de solução normalizada de Kokubo (SBF).¹¹

Ordem de adição	Reagentes	Massa (g)
1	NaCl	7,996
2	NaHCO ₃	0,350
3	KCl	0,224
4	K ₂ HPO ₄ .3H ₂ O	0,228
5	HCl (0,1 mol.dm ⁻³)	40 cm ³
6	MgCl ₂ .6H ₂ O	0,305
7	CaCl ₂ .6H ₂ O	0,548
8	Na ₂ SO ₄	0,071
9	NH ₂ C(CH ₂ OH) ₃	6,057

Os discos das amostras de cimentos ósseos foram inseridos nos contentores na posição vertical por forma a evitar a deposição gravítica dos fosfatos de cálcio formados. As amostras em SBF foram mantidas em estufa à temperatura de 37 °C durante o período de incubação.

O estudo da variação das concentrações de cálcio e fósforo no meio e a variação do pH, foram realizados através de diversos tempos de incubação em solução de SBF: 1, 3, 7, 14 e 30 dias. Os ensaios foram realizados em triplicado para cada tempo de incubação.

4.6.3 Medição de ângulo de contacto na superfície das amostras com água e diclorometano

A medição de ângulos de contacto foi realizada através de pequenas gotas (4-6 μ L) em contacto com a superfície do material. As imagens foram obtidas através de uma câmara de vídeo (JAI CV-A50) equipada num microscópio (Wild M3Z) e ligada a um detetor de imagens (JAI CV-A50). A sequência de imagens foi gravada durante 600 s, a partir do momento da deposição da gota, o que permite o acompanhamento da evolução do ângulo durante este período. Aquisição e análise das imagens foram realizadas utilizando software ADSA-P (Axisymmetric Drop Shape Analyses-Profile). Os resultados correspondem à média de doze medições.

4.6.4 Estabilização das amostras para estudos in vitro de biocompatibilidade*

As amostras em forma de disco de PMMA/HA, 0.1CNT e 0.5GO (12 mm de diâmetro e 2 mm de altura), foram esterilizados através de radiação UV durante 1 hora (de cada lado), em seguida submersas para estabilização em Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM, Sigma Chemical Company, St. Louis, MO, USA) com penicilina (800 μ g/ml, BioWhittaker Europe, Bélgica) e estreptomicina (800 μ g/ml, BioWhittaker Europe, Bélgica), sob uma atmosfera de CO₂ (5%) e a 37 °C durante 4 dias antes da cultura celular.

4.6.5 Estudos de proliferação celular*

Ambas as células fibroblastos L929 (ratos) e osteoblastos Saos-2 (humanos) foram cultivadas nas superfícies dos cimentos ósseos, previamente introduzidas em 24 poços de placas de cultura, com uma densidade de 10⁵ células/mL em DMEM enriquecido com 10% de soro fetal bovino (FBS, Gibco, BRL), 1 mM L-glutamine (BioWhittaker Europe, Belgium), penicilina (200 μ g/ml, BioWhittaker Europe, Bélgica), e estreptomicina (200 μ g/ml, BioWhittaker Europe, Bélgica), sob uma atmosfera (5%) de CO₂ e 37 °C durante 3 dias. O plástico de cultura de tecidos foi utilizado como superfície de controlo.

Para avaliar os efeitos do material na proliferação celular, o meio foi aspirado após 3 dias de cultura, as células não aderidas foram removidas por lavagem das culturas com uma solução tampão de fosfato salino (PBS – Phosphate Buffer Saline) e os discos foram removidos dos poços iniciais e colocados em novos poços a fim de analisar tanto as células aderidas aos discos (colocados em novos poços) e em redor dos discos (células

cultivadas nos poços iniciais em redor dos discos). As células foram colhidas através da adição de 0,25% de solução de tripsina-EDTA aos poços novos e iniciais, respetivamente, e foram contadas com um hemocítmetro Neubauer.

4.6.6 Estudos de morfologia celular por microscopia confocal*

Os estudos morfológicos foram realizados por microscopia confocal para ambos os tipos de células, fibroblastos L929 e osteoblastos Saos-2, após a sua cultura nas superfícies polidas dos discos de PMMA/HA, 0.1CNT e 0.5GO durante 3 dias. Os controlos sem material foram sempre realizados. Após a fixação com paraformaldeído 3,7% em PBS durante 10 min, as amostras foram lavadas com PBS e permeabilizadas com Triton X-100 0,1% entre 3 a 5 min. As amostras foram então lavadas com PBS e pré-incubadas com PBS contendo 1% BSA durante 20 a 30 min. Em seguida, as células foram incubadas durante 20 min em Alexa-488 phalloidin (diluição de 1:40, Molecular Probes) que colora os filamentos da actina F. As amostras foram então lavadas com PBS e os núcleos das células foram corados com DAPI (4'-6-diamidino-2'-fenilindol, 3 μ M em PBS, Molecular Probes). Após coloração e lavagem com PBS, as células foram examinadas por um Microscópio Confocal de Varrimento a Laser LEICA SP2. A Alexa-488 foi excitada a 488 nm e a fluorescência emitida foi medida a 530/30 nm. A DAPI foi excitada a 405 nm e a fluorescência medida a 420-480 nm.

4.6.7 Estudos de morfologia celular por SEM*

Os estudos morfológicos foram também realizados por Microscopia Eletrónica de Varrimento (SEM) em ambos os tipos de células, fibroblastos L929 e osteoblastos Saos-2, após cultura em discos de PMMA/HA, 0.1CNT e 0.5GO durante 3 dias. Para os estudos de SEM, as células ligadas ao biomaterial foram fixadas com glutaraldeído (PBS 2,5%) durante 45 min. A desidratação da amostra foi realizada através da substituição lenta da água usando série de soluções de etanol (30%, 50%, 70%, 90%) durante 30 min e com uma desidratação final em etanol absoluto durante 60 min, permitindo que as amostras a sequem à temperatura ambiente sob vácuo. Seguidamente, as amostras foram dispostas no porta-amostra e revestido com um filme fino de ouro-paládio sob vácuo. As células foram examinadas com um Microscópio Eletrónico de Varrimento JEOL JSM-6400.

4.6.8 Estudos de viabilidade celular e apoptose por citometria de fluxo*

As células foram cultivadas durante 3 dias em ambas as superfícies polida e não-polida dos discos PMMA/HA, 0.1CNT e 0.5GO durante 3 dias. Em seguida, as células foram

lavadas duas vezes com PBS e os discos foram removidos dos poços iniciais e colocados em novos poços. As células ligadas e em redor dos discos foram colhidas através da adição de solução de tripsina-EDTA 0,25% aos poços iniciais e novos, respetivamente, e incubadas a 37 °C com solução tripsina-EDTA para remover as células. Após 5 min, a reação foi parada com meio de cultura, as células foram centrifugadas a 310 x g durante 10 min e ressuspensas em meio fresco.

A viabilidade celular foi determinada através da adição de iodeto de propídio (PI; 0,005% em PBS, Sigma-Aldrich Corporation, St. Louis, MO, USA) para colorar o DNA das células mortas. O PI foi excitado por um laser a 488 nm (15 mW) e a fluorescência emitida foi medida a 650 nm num citómetro de fluxo Becton Dickinson FACScalibur.

Para a análise do ciclo celular e deteção de apoptose, as suspensões de células foram incubadas em Hoechst 33258 (Polysciences, Inc., Warrington, PA) (Hoechst 5 µg/ml, 30% de etanol, e 1% de BSA em PBS), utilizado como um corante do ácido nucleico, durante 30 min à temperatura ambiente no escuro. A Hoechst foi excitada a 350 nm e a fluorescência emitida foi medida a 450 nm num citómetro de fluxo Becton Dickinson LSR. A percentagem de células em cada fase do ciclo foi calculado com o programa CellQuest da Becton Dickinson e a fração SubG1 (células com DNA fragmentado) foi utilizada como indicativo de apoptose.

As condições para a aquisição de dados e análise foram estabelecidos utilizando controlos negativos e positivos com o Programa CellQuest da Becton Dickinson e essas condições foram mantidas durante todas as experiências. Cada experiência foi realizada três vezes e experiências únicas representativas são também apresentadas. Para a significância estatística, pelo menos, 10 000 células foram analisadas em cada amostra e a média dos valores de fluorescência emitida por estas células isoladas foram usados.

4.6.9 Validação estatística dos resultados por SPSS*

Os dados estão expressos como médias \pm desvio-padrão de três experiências realizadas em triplicado. A análise estatística foi realizada utilizando o software Statistical Package for the Social Sciences (SPSS) versão 19. As comparações estatísticas foram realizadas por análise de variância (ANOVA). Teste de Scheffé foi utilizado para a avaliação *post-hoc* de diferenças estatisticamente significativas entre os grupos. Em todas as avaliações estatísticas, $p < 0,05$ foi considerado como estatisticamente significativo.

*Os estudos celulares foram efetuados no Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Faculdade de Ciências Químicas, Universidade Complutense, 28040-Madrid, Espanha.

4.7 Caracterização

Espectroscopia vibracional de Infravermelho

Os espectros de absorção no infravermelho foram registados a partir das amostras solidas num espectrómetro com transformadas de Fourier, BRUKER IFS-55. Os espectros de infravermelho em modo de ATR foram obtidos na gama de número de onda 250 a 4000 cm^{-1} , com resolução de 4 cm^{-1} e 256 acumulações.

Difração de raios-X em ângulo rasante

Os difractogramas de raios-X da camada de fosfato de cálcio formada à superfície dos materiais nanocompósitos foi registada à temperatura ambiente num difractómetro Philips X'pert MPD usando radiação Cu-K α ($\lambda = 1.5418 \text{ \AA}$) a 45 kV e 40 mA. Os difractogramas foram adquiridos com um passo de $0,05^\circ$ e velocidade de varrimento de 1.5 s por passo.

Espectrometria de emissão atómica por ICP

As análises químicas dos elementos Ca e P foram realizadas num espectrómetro ICP-OES Horiba, Jobin Yvon. As amostras de SBF foram diluídas 10x em água ultra-pura acidificada com HNO_3 a 1% (vol.).

4.8 Referências

1. P. Liu-Snyder, T. J. Webster, "Developing a new generation of bone cements with nanotechnology" *Curr. Nanosci.* 2008, 4, (1), 111-118.
2. L. L. Hench, "Bioceramics – From concept to clinic" *J. Am. Ceram. Soc.* 1991, 74, (7), 1487-1510.
3. R. Z. LeGeros, "Calcium Phosphate-Based Osteoinductive Materials" *Chem. Rev.* 2008, 108, (11), 4742-4753.
4. S. V. Dorozhkin, "Calcium Orthophosphates in Nature, Biology and Medicine" *Materials* 2009, 2, (2), 399-498.
5. L. C. Palmer, C. J. Newcomb, S. R. Kaltz, E. D. Spoerke, S. I. Stupp, "Biomimetic Systems for Hydroxyapatite Mineralization Inspired By Bone and Enamel" *Chem. Rev.* 2008, 108, (11), 4754-4783.
6. W. R. Earle, "Production of malignancy in vitro. IV. The mouse fibroblast cultures and changes seen in the living cells" *J. Natl. Cancer I.* 1943, 4, 165-212.
7. J. H. Hanks, R. E. Wallace, "Relation of oxygen and temperature in the preservation of tissues by refrigeration" *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 1949, 71, (2), 196-200.
8. T. Kokubo, H. Kushitani, S. Sakka, T. Kitsugi, T. Yamamuro, "Solutions able to reproduce in vivo surface-structure changes in Bioactive glass-ceramic A-W3" *J. Biomed. Mater. Res.* 1990, 24, (6), 721-734.
9. T. Kokubo, "Bioactive glass-ceramics – Properties and applications" *Biomaterials* 1991, 12, (2), 155-163.
10. A. Oyane, H. M. Kim, T. Furuya, T. Kokubo, T. Miyazaki, T. Nakamura, "Preparation and assessment of revised simulated body fluids" *J. Biomed. Mater. Res. A* 2003, 65A, (2), 188-195.
11. H. M. Takadama H, Mizuno M, Kokubo T, "Round-robin test of SBF for in vitro measurement of apatite-forming ability of synthetic materials" *Phos. Res. Bull.* 2004, 17, 119-25.
12. M. Bohner, J. Lemaître, "Can bioactivity be tested in vitro with SBF solution?" *Biomaterials* 2009, 30, (12), 2175-2179.
13. W. J. O'Connor, T. Botti, S. N. Khan, J. M. Lane, "The use of growth factors in cartilage repair" *Orthop. Clin. North Am.* 2000, 31, (3), 399-410.
14. M. E. Bolander, "Regulation of fracture repair by growth -factors" *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 1992, 200, (2), 165-170.
15. A. Fakhry, C. Ratisoontorn, C. Vedhachalam, I. Salhab, E. Koyama, P. Leboy, M. Pacifici, R. E. Kirschner, H. D. Nah, "Effects of FGF-2/-9 in calvarial bone cell cultures: differentiation stage-

dependent mitogenic effect, inverse regulation of BMP-2 and noggin, and enhancement of osteogenic potential" Bone 2005, 36, (2), 254-266.

16. X. Zhao, R. Liu, "Recent progress and perspectives on the toxicity of carbon nanotubes at organism, organ, cell, and biomacromolecule levels" *Environ. Inter.* 2012, 40, 244-55.
17. H. Hu, Y. C. Ni, V. Montana, R. C. Haddon, V. Parpura, "Chemically functionalized carbon nanotubes as substrates for neuronal growth" *Nano Lett.* 2004, 4, (3), 507-511.
18. H. Hu, Y. C. Ni, S. K. Mandal, V. Montana, N. Zhao, R. C. Haddon, V. Parpura, "Polyethyleneimine functionalized single-walled carbon nanotubes as a substrate for neuronal growth" *J. Phys. Chem. B* 2005, 109, (10), 4285-4289.
19. M. P. Mattson, R. C. Haddon, A. M. Rao, "Molecular functionalization of carbon nanotubes and use as substrates for neuronal growth" *J. Mol. Neurosci.* 2000, 14, (3), 175-182.
20. A. Abarrategi, M. C. Gutierrez, C. Moreno-Vicente, M. J. Hortiguela, V. Ramos, J. L. Lopez-Lacomba, M. L. Ferrer, F. del Monte, "Multiwall carbon nanotube scaffolds for tissue engineering purposes" *Biomaterials* 2008, 29, (1), 94-102.
21. B. Zhao, H. Hu, S. K. Mandal, R. C. Haddon, "A bone mimic based on the self-assembly of hydroxyapatite on chemically functionalized single-walled carbon nanotubes" *Chem. Mat.* 2005, 17, (12), 3235-3241.
22. M. K. Singh, J. Gracio, P. LeDuc, P. P. Goncalves, P. A. A. P. Marques, G. Goncalves, F. Marques, V. S. Silva, F. Capela e Silva, J. Reis, J. Potes, A. Sousa, "Integrated biomimetic carbon nanotube composites for in vivo systems" *Nanoscale* 2010.
23. P. P. Goncalves, M. K. Singh, V. S. Silva, F. Marques, A. Marques, P. R. LeDuc, J. Gracio, P. A. A. P. Marques, G. Goncalves, A. C. M. Sousa, "Automated high-throughput screening of carbon nanotube-based bio-nanocomposites for bone cement applications" *Pure Appl. Chem.* 2011, 83, (11), 2063-2069.
24. R. Ormsby, T. McNally, P. O'Hare, G. Burke, C. Mitchell, N. Dunne, "Fatigue and biocompatibility properties of a poly(methyl methacrylate) bone cement with multi-walled carbon nanotubes" *Acta Biomater.* 2012, 8, (3), 1201-1212.
25. X. Y. Zhang, J. L. Yin, C. Peng, W. Q. Hu, Z. Y. Zhu, W. X. Li, C. H. Fan, Q. Huang, "Distribution and biocompatibility studies of graphene oxide in mice after intravenous administration" *Carbon* 2011, 49, (3), 986-995.
26. K. Wang, J. Ruan, H. Song, J. L. Zhang, Y. Wo, S. W. Guo, D. X. Cui, "Biocompatibility of Graphene Oxide" *Nanoscale Res. Lett.* 2011, 6.
27. Y. B. Zhang, S. F. Ali, E. Dervishi, Y. Xu, Z. R. Li, D. Casciano, A. S. Biris, "Cytotoxicity Effects of Graphene and Single-Wall Carbon Nanotubes in Neural Phaeochromocytoma-Derived PC12 Cells" *Acs Nano* 2010, 4, (6), 3181-3186.

28. S. Agarwal, X. Z. Zhou, F. Ye, Q. Y. He, G. C. K. Chen, J. Soo, F. Boey, H. Zhang, P. Chen, "*Interfacing Live Cells with Nanocarbon Substrates*" *Langmuir* 2010, 26, (4), 2244-2247.
29. A. Sasidharan, L. S. Panchakarla, P. Chandran, D. Menon, S. Nair, C. N. R. Rao, M. Koyakutty, "*Differential nano-bio interactions and toxicity effects of pristine versus functionalized graphene*" *Nanoscale* 2011, 3, (6), 2461-2464.
30. Y. Ma, X. Cao, X. Feng, Y. Ma, H. Zou, "*Fabrication of super-hydrophobic film from PMMA with intrinsic water contact angle below 90 degrees*" *Polymer* 2007, 48, (26), 7455-7460.
31. D. K. Owens, R. C. Wendt, "*Estimation of the surface free energy of polymers*" *J. Appl. Polym. Sci.* 1969, 13, (8), 1741-1747.
32. L. C. C. E. D. Eanes, Octacalcium Phosphate. In Karger: Basel, Switzerland, 2001.
33. A. C. Tas, Participation of calcium phosphate bone substitutes in the bone remodeling process: Influence of materials chemistry and porosity. In *Euro Ceramics VIII, Pts 1-3*, Mandal, H. O. L., Ed. 2004; Vol. 264-268, pp 1969-1972.
34. P.A.A.P. Marques, S.C.P. Cachinho, M.C.F. Magalhaes, R. N. Correia, M. H. V. Fernandes, "Mineralisation of bioceramics in simulated plasma with physiological CO₂/HCO₃-buffer and albumin" *J. Mater. Chem.* 2004, 14, (12), 1861-1866.
35. M. J. Arellano-Jimenez, R. Garcia-Garcia, J. Reyes-Gasga, "*Synthesis and hydrolysis of octacalcium phosphate and its characterization by electron microscopy and X-ray diffraction*" *J. Phys. Chem. Solids* 2009, 70, (2), 390-395.
36. S. Koutsopoulos, "*Synthesis and characterization of hydroxyapatite crystals: A review study on the analytical methods*" *J. Biomed. Mater. Res.* 2002, 62, (4), 600-612.
37. S. J. Gadaleta, E. P. Paschalis, F. Betts, R. Mendelsohn, A. L. Boskey, "*Fourier transform infrared spectroscopy of the solution-mediated conversion of amorphous calcium phosphate to hydroxyapatite: New correlations between X-ray diffraction and infrared data*" *Calcified Tissue Inter.* 1996, 58, (1), 9-16.
38. L. J. Wang, G. H. Nancollas, "*Calcium Orthophosphates: Crystallization and Dissolution*" *Chem. Rev.* 2008, 108, (11), 4628-4669.
39. W. E. Brown, J. P. Smith, A. W. Frazier, J. R. Lehr, "Crystallographic and chemical relations between octacalcium phosphate and hidroxiapatite" *Nature* 1962, 196, (4859), 1050-&.
40. D. R. Taves, "Similarity of octacalcium phosphate and hydroxyapatite structures" *Nature* 1963, 200, (491), 1312-&.
41. M. Iijima, D. G. A. Nelson, Y. Pan, A. T. Kreinbrink, M. Adachi, T. Goto, Y. Moriwaki, "*Fluoride analysis of apatite crystals with a central planar OCP inclusion: Concerning the role of F-ions on apatite/OCP/apatite structure formation*" *Calcified Tissue Int.* 1996, 59, (5), 377-384.

42. T. Aoba, H. Komatsu, Y. Shimazu, H. Yagishita, Y. Taya, "Enamel mineralization and an initial crystalline phase" *Connect. Tissue Res.* 1998, 38, (1-4), 129-137.
43. A. K. Lynn, W. Bonfield, "A novel method for the simultaneous, titrant-free control of pH and calcium phosphate mass yield" *Accounts Chem. Res.* 2005, 38, (3), 202-207.
44. N. N. Danial, S. J. Korsmeyer, "Cell death: Critical control points" *Cell* 2004, 116, (2), 205-219.
45. M. Facompre, N. Watez, J. Kluza, A. Lansiaux, C. Bailly, "Relationship between cell cycle changes and variations of the mitochondrial membrane potential induced by etoposide" *Molecular cell biology research communications : MCBRC* 2000, 4, (1), 37-42.
46. D. Nishimura, H. Ishikawa, K. Matsumoto, H. Shibata, Y. Motoyoshi, M. Fukuta, H. Kawashimo, T. Goto, N. Taura, T. Ichikawa, K. Hamasakv, K. Nakao, K. Umezawa, K. Eguchi, "DHMEQ, a novel NF-kappa B inhibitor, induces apoptosis and cell-cycle arrest in human hepatoma cells" *Inter. J. Oncol.* 2006, 29, (3), 713-719.
47. M. Alcaide, M. C. Serrano, R. Pagani, S. Sanchez-Salcedo, A. Nieto, M. Vallet-Regi, M. T. Portoles, "L929 fibroblast and SAOS-2 osteoblast response to hydroxyapatite-beta TCP/agarose biomaterial" *J. Biomed. Mater. Res. A* 2009, 89A, (2), 539-549.
48. M. Alcaide, M.-C. Serrano, R. Pagani, S. Sanchez-Salcedo, M. Vallet-Regi, M.-T. Portoles, "Biocompatibility markers for the study of interactions between osteoblasts and composite biomaterials" *Biomaterials* 2009, 30, (1), 45-51.

Capítulo V

Conclusão Geral

Neste capítulo é feita uma reflexão sobre o trabalho experimental realizado e sobre os resultados obtidos. É também salientada a importância dos novos materiais nanocompósitos desenvolvidos para a aplicação como cimentos ortopédicos, mais especificamente em artroplastia da anca, tendo em conta os objetivos apresentados no início desta dissertação.

São também identificados os pontos fortes relativamente à realização experimental e resultados obtidos de modo a compreender e suplantar algumas lacunas claramente identificadas. Por último são apresentados algumas linhas de orientação que podem sugerir direções de trabalho futuro, na expectativa de proporcionar uma sustentação para novos trabalhos nesta área.

5.1 Considerações finais

O conceito inicial para o desenvolvimento deste projeto de tese passava pelo incremento da bioatividade de modo a suprimir uma das lacunas claramente identificadas no desempenho dos cimentos ósseos comerciais. O design experimental passou pela introdução de um nível elevado de cargas inorgânicas no sistema, mais especificamente HA, de modo a obter as características desejadas. Efetivamente esta introdução da carga inorgânica promove debilidades mecânicas no material compósito o que se tentou compensar pela incorporação de nanoestruturas de carbono. Os CNTs eram já conhecidos pela sua capacidade de reforço em matrizes poliméricas, apresentando contudo alguma ambiguidade (níveis de toxicidade) na sua aplicação em sistemas para aplicações biomédicas. Com o crescente interesse na investigação por grafeno foram muitas as potencialidades que surgiram, tendo sido por isso pertinente a sua aplicação como agente de reforço na matriz de PMMA/HA.

O desenvolvimento de um material compósito com três fases completamente distintas a nível químico e estrutural consiste num desafio extremamente exigente de modo a obter um material homogéneo com as características desejadas. Sendo previamente definido que o solvente utilizado seria a água de modo a evitar contaminações e sendo que todas as fases utilizadas se comportam de maneiras distintas neste solvente, foi necessário encontrar um compromisso que permitisse obter uma harmonia na integração de todas as fases envolvidas. Este ponto foi claramente atingido durante o processo experimental o que foi evidenciado através das técnicas de caracterização utilizadas.

Os desafios nos trabalhos de investigação muitas das vezes passam também por questões imponderáveis, e este não foi diferente. Efetivamente verificou-se durante o trabalho experimental e caracterização mecânica que a introdução de nanoestruturas de carbono na matriz PMMA/HA não produzia os efeitos desejados. Um estudo exaustivo da fração polimérica dos nanocompósitos demonstrou que as nanoestruturas de carbono apresentavam efeitos adversos na polimerização radicalar do PMMA, atuando como agentes inibidores. Com base nestes resultados elaborou-se um mecanismo explicativo do efeito inibidor/retardador das nanoestruturas de carbono no processo de polimerização radicalar do PMMA. Alguns efeitos adversos tinham já sido identificados na tentativa de reforço de algumas matrizes poliméricas com nanotubos de carbono, mas as causas ainda não tinham sido claramente identificadas, sendo normalmente efeitos atribuídos a fenómenos de aglomeração na matriz. De salientar que o mecanismo proposto tem sustentabilidade experimental baseada na caracterização exaustiva das cadeias de PMMA formadas.

A solução encontrada para minorar os efeitos superficiais das nanoestruturas de carbono passou por contrabalançar a absorção de radicais livres na superfície das nanoestruturas de carbono com uma maior concentração inicial de agentes radicais (BPO e DMT). Os resultados obtidos demonstraram a eficiência desta medida através de aumentos significativos nas propriedades mecânicas nos nanocompósitos finais.

A caracterização mecânica dos materiais nanocompósitos através da norma específica que regula o desenvolvimento de novos cimentos ósseos acrílicos para aplicações ortopédicas ISO 5833 de 2002 permitiu verificar que a nível de ensaios de flexão não foram atingidos os limites mínimos exigidos, ao contrário do que não se verificou para o caso dos testes de compressão. Efetivamente isto não significa que o material é inviável do ponto de vista de aplicação, pois as características de bioatividade podem muito bem suprimir esta lacuna.

De facto os estudos de mineralização através da incubação das amostras em SBF, demonstraram a elevada capacidade dos materiais nanocompósitos para promoverem o desenvolvimento de uma nova camada apatítica e verificou-se também que existe uma integração perfeita desta camada com o material compósito, ao contrário do que se verificou com a componente de PMMA pré-polimerizado onde a ligação nas interfaces foi completamente inexistente.

Os estudos de biocompatibilidade através de células fibroblastos L929 e osteoblastos Saos-2 demonstraram também que o nível de toxicidade dos materiais é baixo após a avaliação de diversos parâmetros celulares, tais como a proliferação celular, viabilidade celular, morfologia celular, apoptose e espécies reativas de oxigénio.

A nível de trabalho futuro os estudos in vivo são um ponto essencial a realizar por forma a determinar efetivamente se os novos cimentos ósseos são viáveis e verificar se se consegue atingir o objetivo inicial de aumento de bioatividade dos materiais, isto é, de uma ligação efetiva entre o osso e o cimento sem formação de uma camada fibrosa impeditiva dessa ligação. Estes estudos permitirão também verificar se o tempo de recuperação pós cirúrgico diminui e avaliar concretamente qual a capacidade do tecido ósseo de se integrar com o material nanocompósito.

Apêndices

Apêndice 1- Materiais e Reagentes

Cimento ósseo comercial CMW1

Tabela 1 Composição do cimento ósseo comercial CMW1

Componente sólido:	
Polymethyl methacrylate (% m/m)	88,85
Benzoyl peroxide (BPO) (% m/m))	2,05
Barium sulfate (% m/m)	9,10
Componente líquido:	
Methyl methacrylate (% m/m)	98,5
N,N-Dimethyl-p-toluidine (DMT) (% m/m)	1,50
Hydroquinone/ppm	75

Reagentes e solventes

Todos os reagentes químicos e solventes foram usados sem qualquer processo de purificação adicional e foram fornecidos pela Aldrich, Merck e Panreac.

Apêndice 2- Técnicas de caracterização mais comuns

Microscopia eletrônica de varrimento (SEM)

A microscopia eletrônica de varrimento foi realizada num microscópio FE-SEM Hitachi SU70-47 operando a 30 kV. As amostras em solução foram dispersas em água, tendo-se colocado uma alíquota na superfície da porta amostras. No caso das amostras solidas foram inseridas na porta amostras através do uso de cola de carbono.

Microscopia eletrônica de transmissão de alta resolução (HR-TEM)

A microscopia eletrônica de transmissão de alta resolução foi realizada no microscópio (HR) TEM (JEOL 2200F TEM/STEM) operando a 200 KV, com uma resolução de 0,16nm e equipado com um espectrómetro GIF-2000. As amostras para TEM foram preparadas através da deposição de uma pequena alíquota de suspensão de grafeno numa grelha de carbono perfurado suspensa numa folha de papel de filtro, por fim deixa-se evaporar o solvente.

Cromatografia de exclusão molecular (SEC)

Na análise de cromatografia de exclusão molecular, a amostra de polímero (5 mg) foi dissolvida em 1 mL de dimetilacetamida (DMA) a 20 °C durante 30 min., posteriormente foi filtrada por um filtro de 0,3 µm. A análise foi efetuada em duas colunas PLgel 10mmMixed B 300x7,5 mm protegida por uma pre-coluna PLgel 10 mm (Polymer Laboratories, UK) no equipamento PL-GPC 110 system (Polymer Laboratories, UK). As colunas, sistema de injeção e o detetor (RI) foram mantidos a 70 °C durante a análise. O eluente foi bombeado a um fluxo de 0,9 mLmin⁻¹. As colunas analíticas foram previamente calibradas com uma referência de poliestireno (Polymer Laboratories, UK) com um intervalo de tamanhos de 1,7-100,0 KDa. Os volumes de amostra injetados foram de 100 µL.

Microscopia de força atômica (AFM)

Para a análise topológica superficial do óxido de grafeno foram efetuadas medições por microscopia de força atômica (AFM- Atomic Force Microscopy, Digital Instruments Multimode scanning probe microscope (SPM) - Nanoscope IIIA controller), em modo de contacto.

Apêndice 3- Publicações durante o período de doutoramento

G. Gonçalves, P.A.A.P. Marques, Carlos M. Granadeiro, Helena I.S. Nogueira, M.K. Singh, J. Grácio "Surface modification of graphene nanosheets with gold nanoparticles: the role of oxygen moieties at graphene surface on gold nucleation and growth" *Chem Mater*, 21 (2009) 4796-4802

M.K. Singh, T. Elby, **G Gonçalves**, P.A.A.P. Marques, B. Igor, A.L. Kholkin and José J Gracio, Atomic-scale observation of rotational misorientation in suspended few-layer graphene sheets, *Nanoscale*, 2 (2010) 700-708

M.K. Singh, J Gracio, Philip Leduc, Paula Gonçalves, Paula Marques, **G Gonçalves**, Filipa Marques, Virgília Silva, Fernando Capela Silva, Joana Reis, José Potes and António Sousa, Integrated Biomimetic carbon nanotube composites for In Vivo systems, *Nanoscale*, 2 (2010), 2855-2863

G Gonçalves, Paula A. A. P. Marques, Ana Barros-Timmons, Igor Bdkin, Manoj K. Singh, Nazanin Emami and José Grácio, Graphene oxide modified with PMMA via ATRP as a reinforcement filler *J. Mater. Chem.*, 20 (2010), 9927-9934

Paula P. Gonçalves, Manoj K. Singh, Virgília S. Silva, Filipa Marques, Ana Marques, Philip R. LeDuc, José Grácio, Paula A. A. P. Marques, **G Gonçalves**, and António C. M. Sousa, Automated high-throughput screening of carbon nanotube-based bio-nanocomposites for bone cement applications, *Pure Appl. Chem.*, 83 (2011), 2063–2069.

G Gonçalves, Sandra M. A. Cruz, A. Ramalho, José Grácio and Paula A. A. P. Marques, Graphene oxide versus functionalized carbon nanotubes as a reinforcing agent in a PMMA/HA bone cement, *Nanoscale*, 4 (2012) 2937-2945

M.Vila, M.T. Portolés, P.A.A.P. Marques, M.J.Feito, M.C. Matesanz, C. Ramírez-Santillán, **G. Gonçalves**, S.M.A. Cruz, A.Nieto-Peña, M.Vallet-Regi Cell uptake survey of pegylated nano graphene oxide, *Nanotechnology* (2012) Accepted

G Gonçalves, M.T. Portolés, C. Ramírez-Santillán, M. Vallet-Regí, Ana Paula Serro, J. Grácio, PAAP Marques, PMMA/high load HA bone cement formulation reinforced with carbon nanostructures: Biocompatibility and mechanical properties", *Adv. Healthcare Mater.* 2012 Submitted.

Chapter book: Paula Marques, **G Gonçalves**, Sandra Cruz, Nuno Almeida, Manoj Singh, José Grácio and António Sousa (2011). Functionalized Graphene Nanocomposites, *Advances in Nanocomposite Technology*, Abbass Hashim (Ed.), ISBN: 978-953-307-347-7, InTech, Available from: <http://www.intechopen.com/articles/show/title/functionalized-graphene-nanocomposites>.