



**Isabel Maria Ribeiro  
de Abreu e Sousa**

**Plataformas de nanotubos de carbono para  
diferenciação celular**





**Isabel Maria Ribeiro  
de Abreu e Sousa**

**Plataformas de nanotubos de carbono para  
diferenciação celular**

Dissertação apresentada à Universidade de Aveiro para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Materiais e Dispositivos Biomédicos realizada sob a orientação científica da Doutora Margarida Isabel dos Santos Amaral, Estagiária de Pós-Doutoramento do Departamento de Engenharia de Materiais e Cerâmica e do Departamento de Física da Universidade de Aveiro e coorientação do Professor Doutor Rui Ramos Ferreira e Silva, Professor Associado do Departamento Engenharia de Materiais e Cerâmica da Universidade de Aveiro

Apoio financeiro do POCTI no âmbito  
do III Quadro Comunitário de Apoio.

Apoio financeiro da FCT e do FSE no  
âmbito do III Quadro Comunitário de  
Apoio.

PTDC/CTM-NAN/119184/2010



## **o júri**

presidente

**Prof. Doutor José Maria da Fonte Ferreira**

Professor associado com agregação do Departamento de Engenharia de Materiais e Cerâmica da Universidade de Aveiro

**Prof. Doutora Maria Luisa Rocha Durães**

Professora auxiliar do Departamento de Engenharia Química da Faculdade de Ciências e Tecnologias da Universidade de Coimbra

**Doutora Margarida Isabel dos Santos Amaral**

Estagiária de Pós-Doutoramento do Departamento de Engenharia de Materiais e Cerâmica e do Departamento de Física da Universidade de Aveiro



## **agradecimentos**

Desejo expressar os meus sinceros agradecimentos a todos aqueles que de certa forma contribuíram para que este trabalho fosse realizado.

Em primeiro lugar agradeço aos meus orientadores, Doutora Margarida Amaral por toda a dedicação, força, motivação e todo o conhecimento que me transmitiu durante este trabalho e Professor Doutor Rui Silva por toda a disponibilidade, acolhimento com que me abriu as portas do seu laboratório e por toda a sua análise crítica que me permitiu a elaboração de um melhor trabalho.

Ao Doutor Filipe Oliveira por toda a sua disponibilidade e colaboração.

Ao Doutor Miguel Ângelo Neto pela ajuda na construção do equipamento para deitar os nanotubos de carbono bem como na medição da resistividade elétrica dos materiais.

Ao Diogo Mata e Ricardo Silva por todo o apoio, total disponibilidade e transmissão de conhecimentos.

Agradeço a todas as pessoas do laboratório pelo companheirismo, carinho e todo o apoio.

A todas as pessoas responsáveis pela ajuda nas demais caracterizações utilizadas neste trabalho.

Aos amigos que estiveram sempre presentes durante estes dois anos.

Ao meu namorado por todo o seu carinho, companheirismo e paciência.

Por fim quero agradecer aos meus pais por todo o incentivo e suporte que possibilitou este meu trajeto académico e à restante família pela incansável preocupação e apoio.





**palavras-chave**

Nanotubos de carbono, polidimetilsiloxano, compósito, condutividade elétrica

**resumo**

Os nanotubos de carbono (CNTs) têm sido alvo de recentes estudos no que respeita à sua capacidade para promover a diferenciação de várias linhagens celulares. A ideia é motivada pelas características únicas dos CNTs que imitam as características físicas e químicas da matriz extracelular natural. Os CNTs mostram também potencial para serem usados como mediadores da estimulação elétrica de células estaminais. Esta estimulação foi referida como indutora da diferenciação neuronal e do crescimento de neurites. No entanto, não existem estudos que demonstrem a utilização de nanotubos de carbono como mediadores da diferenciação de células estaminais pluripotentes induzidas (iPSCs). O objetivo deste trabalho é, precisamente, a produção de substratos compósitos condutores de polidimetilsiloxano/nanotubos de carbono (PDMS/CNTs) para a modulação da diferenciação de células estaminais pluripotentes induzidas em células neuronais através de estímulos elétricos.

Florestas de nanotubos de carbono verticalmente alinhados (VA-CNTs), com 0,5 a 1,5 mm de altura, foram crescidas por deposição química em fase vapor num reator de paredes quentes (TCVD) em substratos de Si/SiO<sub>2</sub>/Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>/Fe e posteriormente submetidas a tratamento térmico com objetivo de eliminar o carbono amorfo mostrando-se o tratamento de 30 minutos o mais eficaz.

Para a produção dos compósitos PDMS/CNTs, nanotubos de carbono de parede múltipla (MWCNTs) comerciais (c-MWCNTs) foram purificados termicamente (p-MWCNTs) e funcionalizados com grupos carboxilos através de dois tratamentos, um com HNO<sub>3</sub> (pf1-MWCNTs) e outro com uma solução de HNO<sub>3</sub> e H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (pf2-MWCNTs). Os pf1-MWCNTs apresentaram menos defeitos estruturais e maior estabilidade térmica.

A resistividade elétrica dos compósitos foi medida e a condutividade elétrica calculada. De modo a alcançar um compromisso entre biosegurança e a condutividade a opção escolhida para a fabricação das plataformas para estimulação elétrica de iPSCs foi o PDMS/pf1-MWCNTs.

Plataformas de PDMS foram produzidas e revestidas com filme adesivo de PDMS por spin-coating. Uma floresta de VA-CNTs foi transferida para o substrato de PDMS e o filme curado. Através de um equipamento de rolamento mecânico construído para este propósito, os VA-CNTs presos no substrato de PDMS foram transformados em CNTs horizontalmente alinhados (HA-CNTs), sendo esta a forma final de apresentação das plataformas compósitas PDMS/CNTs.

Como trabalho futuro, estas plataformas serão testadas para se proceder à estimulação elétrica de células mediada pelos compósitos PDMS/MWCNTs e pelas florestas de HA-CNTs.



**keywords**

Carbon nanotubes, polydimethylsiloxane, composites, electrical conductivity

**abstract**

Carbon nanotubes (CNTs) have been subject of recent studies with regard to their ability to promote differentiation of several cells lines. The idea is motivated by unique features of CNTs that mimic the physical and chemical characteristics of natural extracellular matrix. CNTs also show potential to be used as mediators in electrical stimulation of stem cells. This stimulation has been reported to induce neural differentiation and neurite outgrowth. However, there are no studies showing the use of carbon nanotubes as mediators of the differentiation of mesenchymal stem cells from the umbilical cord.

The aim of this work is the production of conductive polydimethylsiloxane (PDMS)/CNTs composite substrates for the modulation of the differentiation of induced pluripotent stem cells into neuronal cells, using electrical stimuli.

Forests of VA-CNTs, with height between 0,5 to 1,5 mm, were successfully grown by thermal CVD on Si/Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>/Fe wafers and they were subject to a thermal treatment with the aim of eliminate amorphous carbon impurities. The 30 minutes thermal treatment was the most efficient in that purpose.

Comercial multi walled CNTs (c-MWCNTs) were purified by thermal treatment (p-MWCNTs) and funcionalized with carboxyl groups by a chemical treatment with HNO<sub>3</sub> (pf1-MWCNTs) and another one with a HNO<sub>3</sub> and H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> solution (pf2-MWCNTs) to produce PDMS/MWCNTs composites. The pf1-MWCNTs presented fewer structural defects and increased thermal stability.

The electrical resistivity of the composites was measured for estimaty the electrical conductivity. In order to reach a compromise between biosecurity and conductivity of platforms for manufacturing to electrical stimulation of iPSCs the best choice was PDMS/pf1-MWCNTs composites.

PDMS platforms were produced and coated with an adhesive PDMS film by spin-coating. A piece of VA-CNTs on a Si substrate was transferred to the surface of the PDMS film wich was cured. Afterwards, the VACNT forest was transformed in horizontally aligned CNTs (HA-CNTs) by mechanical rolling using a home-built bench top apparatus, leading to the final PDMS/CNTs composite templates.

As future work, these platforms will be tested to make cell electrical stimulation mediated by PDMS / MWCNTs composite and forests of HA-CNTs.



# Índice

Introdução .....	1
Capítulo I – Revisão Bibliográfica .....	5
1 Nanotubos de carbono .....	3
1.1 Estrutura.....	3
1.2 Propriedades e aplicações.....	5
1.3 Métodos de produção .....	5
1.3.1 Deposição por descarga elétrica em arco .....	6
1.3.2 Ablação laser.....	6
1.3.3 Deposição química em fase de vapor.....	7
1.4 Nanotubos de carbono verticalmente alinhados .....	7
1.4.1 Mecanismo de nucleação e crescimento dos VA-CNTs.....	8
1.5 Purificação.....	10
1.6 Funcionalização .....	11
2 Compósitos polidimetilsiloxano/CNTs.....	13
2.1 O polidimetilsiloxano.....	13
2.2 Método de produção.....	14
2.3 Propriedades e aplicações.....	15
3 Plataforma de nanotubos de carbono para diferenciação celular.....	16
3.1 Células estaminais pluripotentes induzidas .....	16
3.2 Aplicação dos CNTs na diferenciação de iPSCs .....	17
3.3 Estimulação elétrica.....	18
Capítulo II – Procedimento Experimental .....	23
1 Produção de nanotubos de carbono .....	25
1.1 Preparação do substrato para o crescimento dos CNTs .....	25
1.2 Deposição de florestas de VA-CNTs.....	27
1.3 Tratamento térmico das florestas de CNTs.....	29

2	Produção das plataformas compósitas .....	30
2.1	Produção do substrato de PDMS.....	30
2.2	Produção do compósito PDMS/CNTs.....	30
2.3	Transferência de florestas de VA-CNTs para substratos de PDMS.....	32
2.4	Transformação dos VA-CNTs em HA-CNTs .....	33
3	Caracterização dos materiais.....	35
Capítulo III – Resultados e Discussão .....		39
1	Produção de nanotubos de carbono .....	41
1.1	Preparação do substrato para o crescimento dos CNTs.....	41
1.2	Deposição de florestas de VA-CNTs.....	41
1.3	Tratamento térmico das florestas de VA-CNTs.....	43
2	Produção das plataformas compósitas .....	46
2.1	Purificação e Funcionalização dos MWCNTs .....	46
2.2	Produção do compósito PDMS/MWCNTs .....	50
2.3	Transformação dos VA-CNTs em HA-CNTs .....	57
Conclusões .....		61
Referências .....		67

## Índice de Figuras

Figura 1 – Proposta à produção da plataforma. Esta será constituída por 3 camadas: um substrato de PDMS onde será depositado um filme adesivo compósito de PDMS com nanotubos de carbono, adquiridos comercialmente, onde será colocado um tapete de nanotubos de carbono horizontalmente alinhados produzidos aqui na universidade. ....	2
Figura 2 – Representação esquemática da estrutura dos nanotubos de carbono: (A) nanotubo de carbono de parede simples (SWCNT); (B) nanotubo de carbono de parede múltipla (MWCNT). ....	4
Figura 3 – Esquema genérico dos modelos de CNTs exibindo diferentes quiralidades: configuração em poltrona (A), zig-zag (B) e quiral (C). ....	4
Figura 4 - Representação esquemática dos dois mecanismos de crescimento dos nanotubos de carbono. (A) crescimento pelo topo; (B) crescimento pela base. ....	9
Figura 5 – TGA de MWCNTs e C <sub>60</sub> . Os nanotubos são claramente mais resistentes à oxidação comparativamente com o pó de C <sub>60</sub> . ....	11
Figura 6 - Representação ilustrativa da estrutura molecular do monómero dimetilsiloxano .	13
Figura 7 – As células somáticas diferenciadas podem ser reprogramadas em iPSCs através da expressão retroviral de quatro fatores, Klf4, Sox2, Oct4 e Myc, tendo assim potencialidade para se diferenciarem em todas todos os tipos linhagens celulares. ....	17
Figura 9 – Equipamento de pulverização catódica por magnetron utilizado na deposição dos filmes de Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub> e de Fe e respetivo magnetron com alvo de Fe (A) e porta substratos com substrato de Si/SiO <sub>2</sub> já revestido com os filmes (B). ....	25
Figura 8 – Ilustração representativa da bolacha de silício revestida com a barreira de difusão (Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub> ) e com o catalisador (Fe). ....	25
Figura 10 – Fotografia do reator TCVD utilizado para a deposição de florestas de VA-CNTs e porta substratos no interior do tubo de quartzo (A). ....	28
Figura 11 – Porta substratos do reator TCVD com substratos para o crescimento de VA-CNTs. ....	28
Figura 12 – Zona do TCVD onde se realiza o tratamento térmico dos VA-CNTs. ....	29
Figura 13 – Substrato de PDMS com 1 cm de largura e 1 mm de espessura. ....	30
Figura 14 – Esquema representativo da deposição do filme compósito PDMS/CNTs pelo método de <i>spin-coating</i> . ....	33
Figura 15 – Ilustração representativa da transferência das florestas de VA-CNTs para a superfície do filme adesivo de PDMS/CNTs A primeira imagem mostra as florestas de VA-CNTs ainda com a bolacha de Si que serviu de substrato ao seu crescimento; a segunda	

representa a plataforma já pronta para transformar posteriormente os VA-CNTs em nanotubos horizontalmente alinhados (HA-CNTs, do inglês <i>horizontally aligned carbon nanotubes</i> ).....	33
Figura 16 – Ilustração do equipamento construído para transformar os VA-CNTs em HA-CNTs. A figura A mostra o equipamento numa visão geral e a figura B mostra, a pormenor, o rolamento mecânico que permite a transformação.....	34
Figura 17 – Fotografia (A) e esquema representativo (B) da transformação dos VA-CNTs em HA-CNTs pelo rolamento mecânico construído.....	34
Figura 18 – Esquema representativo da medição da resistividade elétrica dos compósitos....	36
Figura 19 – Substrato de Si/SiO <sub>2</sub> antes (A) e após (B) deposição de filme de Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub> e Fe.....	41
Figura 21 – Micrografia SEM da morfologia da superfície do catalisador (Fe) antes (A) e após (B) etapa de pré-tratamento. ....	42
Figura 20 – Ilustração representativa do efeito do pré-tratamento do filme de Fe.....	42
Figura 22 – Fotografia (A) e micrografias SEM (B e C) de florestas de VA-CNTs.....	43
Figura 23- Espectros Raman de florestas de VA-CNTs com diferentes tempos de tratamento térmico. ....	44
Figura 24 – Curvas de TGA de florestas de VA-CNTs submetidas a diferentes tempos de tratamentos térmicos para purificação. ....	45
Figura 25 - Espectro de FTIR dos MWCNTs comerciais (c-MWCNTs), purificados (p-MWCNTs), funcionalizados pelo tratamento 1 (pf1-MWCNTs) e pelo tratamento 2 (pf2-MWCNTs).....	46
Figura 26 – Espectroscopia de Raman dos diferentes MWCNTs.....	48
Figura 27 – Curvas TGA dos MWCNTs comerciais (c-MWCNTs), purificados (p-MWCNTs), funcionalizados pelo tratamento em HNO <sub>3</sub> (pf1-MWCNTs) e pela solução de HNO <sub>3</sub> e H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (pf2-MWCNTs).....	49
Figura 28 – A funcionalização dos nanotubos com grupos carboxilos provoca a quebra de ligações π e danos colaterais na estrutura dos CNTs, através da criação de sítios ativos que proporcionam pontos de ataque para posterior degradação oxidativa, levando ao encurtamento e desenredamento dos tubos.....	50
Figura 29 - Fotografia dos compósitos PDMS produzidos com 1% em peso de c-MWCNTs, p-MWCNTs, pf1-MWCNTs e pf2-MWCNTs.....	51
Figura 30 – Micrografias SEM do corte transversal dos compósitos produzidos pelo procedimento A com c-MWCNTs (A), p-MWCNTs (B), pf1-MWCNTs (C) e pf2-MWCNTs (D).	52



Figura 31 - Micrografias SEM do corte transversal dos compósitos produzidos pelo procedimento B com agitação magnética a 360 rpm com c-MWCNTs (A), p-MWCNTs (B) pf1-MWCNTs (C) e pf2-MWCNTs (D). .....	52
Figura 32 - Micrografias SEM do corte transversal dos compósitos produzidos pelo procedimento B com agitação magnética a 240 rpm com c-MWCNTs (A), p-MWCNTs (B) pf1-MWCNTs (C) e pf2-MWCNTs (D). .....	53
Figura 33 - Gráfico I-V dos compósitos PDMS produzidos pelo procedimento A com 1% em peso de MWCNTs comerciais (c-MWCNTs), purificados através de tratamento térmico (p-MWCNTs), funcionalizados pelo tratamento 1 (pf1-MWCNTs) e tratamento 2 (pf2-MWCNTs). .....	55
Figura 34 - Condutividade elétrica dos compósitos produzidos pelo procedimento A em função do tipo de MWCNTs. ....	55
Figura 35 - Gráficos I-V dos compósitos PDMS/CNTs produzidos pelo procedimento B: (A) - MWCNTs comerciais (c-MWCNTs) e purificados (p-MWCNTs); e (B) - funcionalizados pf1-MWCNTs e pf2-MWCNTs.....	56
Figura 36 - Condutividade elétrica dos compósitos produzidos pelo procedimento B em função do tipo de MWCNTs (A) - MWCNTs comerciais (c-MWCNTs) e purificados (p-MWCNTs); e (B) - funcionalizados pf1-MWCNTs e pf2-MWCNTs.....	56
Figura 37 - Micrografias SEM de floresta de VA-CNTs transferidas para substrato de PDMS (A) e HA-CNTs após procedimento por rolamento mecânico (B). .....	58
Figura 38 - Plataforma compósita PDMS/CNTs com HA-CNTs. ....	58



## Índice de Tabelas

Tabela I – Propriedade dos MWCNTs.....	5
Tabela II - Propriedades do polidimetilsiloxano . .....	13
Tabela III – Condições de deposição dos filmes de Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub> e Fe.....	26
Tabela IV – Condições do pré-tratamento do catalisador e crescimento de VA-CNTs por TCVD. .....	28
Tabela V – Parâmetros dos espectros Raman das diferentes florestas de VA-CNTs. ....	44
Tabela VI - Parâmetros dos espectros Raman dos diferentes MWCNTs. ....	48



## Introdução

A dissertação desenvolveu-se no âmbito do projeto StemCelCan (PTDC/CTM-NAN/119184/2010), iniciado este ano e que tem colaboração de 3 instituições (Universidade de Aveiro, Universidade do Minho e BioCant). O trabalho está enquadrado na terapia celular que só é possível se se produzir em laboratório quantidades suficientes de células a aplicar no paciente. Até ao momento ainda não existe tecnologia que permita essa manipulação celular em grande escala e sem recurso a componentes animais. Uma outra proposta para esta terapia celular é a estimulação elétrica das células em meio de cultura. Para isso há a necessidade de recorrer a compósitos poliméricos condutores de modo a ser possível a aplicação desse estímulo elétrico.

A combinação de características como a facilidade de incorporarem uma elevada densidade de péptidos para diferenciação neural, a sua topografia e a sua condutividade elétrica fazem dos nanotubos de carbono uma excelente plataforma para a indução da diferenciação neural de células estaminais pluripotentes induzidas (iPSC).

O trabalho a realizar tem então como objetivo a produção de plataformas compósitas de polidimetilsiloxano/nanotubos de carbono (PDMS/CNTs), Figura 1, para manipulação da diferenciação de iPSC em células neuronais de modo a evitar a utilização de meios que envolvam o contacto com componentes animais.

O desenvolvimento desta plataforma com nanotubos de carbono se executado com sucesso poderá abrir uma nova porta para a terapia de doenças neuro degenerativas como o caso do Parkinson.

A presente dissertação está dividida em três capítulos. No Capítulo I é apresentada uma revisão bibliográfica sobre nanotubos de carbono, compósitos PDMS/CNTs e plataformas compósitas para a diferenciação celular.

No Capítulo II está descrito o procedimento experimental utilizado na deposição de nanotubos de carbono, a funcionalização de nanotubos de carbono comerciais e produção de compósitos PDMS/CNTs, produção das plataformas compósitas e caracterização dos materiais.

A análise e discussão dos resultados são o conteúdo do terceiro capítulo. Por último, no Capítulo V estão presentes as conclusões fundamentais do trabalho.

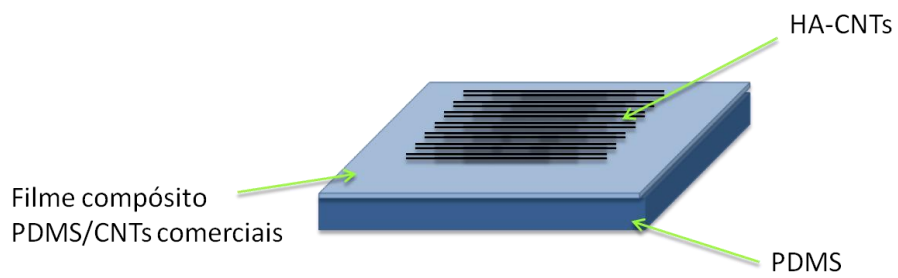


Figura 1 – Proposta à produção da plataforma. Esta será constituída por 3 camadas: um substrato de PDMS onde será depositado um filme adesivo compósito de PDMS com nanotubos de carbono, adquiridos comercialmente, onde será colocado um tapete de nanotubos de carbono horizontalmente alinhados produzidos aqui na universidade.







# Capítulo I – Revisão Bibliográfica

---



# 1 Nanotubos de carbono

## 1.1 Estrutura

O carbono é um elemento com capacidade de surgir em diferentes formas alotrópicas, como a grafite, diamante, fulereno e os nanotubos. Os nanotubos de carbono (CNTs, do inglês *carbon nanotubes*), descobertos em 1991 por Sumio Iijima [1], podem surgir sob a forma de nanotubos de parede simples (SWCNT, do inglês *single-walled carbon nanotubes*), Figura 2A, ou sob a forma de nanotubos de parede múltipla (MWCNT, do inglês *multi-walled carbon nanotubes*), Figura 2 B. Normalmente, a estrutura dos nanotubos é imaginada como sendo uma folha de grafeno enrolada. Na camada atômica da folha de grafeno as três orbitais  $sp^2$  de cada átomo formam ligações  $\sigma$  covalentes com cada um dos outros três átomos de carbono. Cada átomo contém também uma orbital  $2p$  não hibridizada que é perpendicular ao plano do anel de carbono e, no caso dos MWCNTs, se combina para formar ligações  $\pi$  (forças do tipo van der Waals) com átomos das paredes dos tubos vizinhos.

Os CNTs são classificados de acordo com a direção de enrolamento da folha de grafeno, em poltrona, zig-zag e quiral. A Figura 3 representa as diferentes direções em que a folha de grafeno se pode enrolar. Desta forma, os nanotubos são definidos por um vetor e um ângulo quiral. O vetor quiral,  $C_h$ , liga dois pontos da rede, por exemplo os pontos O e A. Este vetor,  $C_h = na_1 + ma_2$ , é definido na rede pelos vetores unitários  $a_1$  e  $a_2$ , pelos índices quirais (números inteiros)  $n$  e  $m$  e pelo ângulo quiral  $\theta$ . Se a folha de grafeno se enrolar segundo o vetor quiral OA estamos perante um nanotubo com configuração em poltrona ( $\theta = 30^\circ$  e  $n = m$ ) (Figura 3A), segundo OB estamos perante um nanotubo em zig-zag ( $\theta = 0^\circ$  e  $m = 0$ ) (Figura 3B), os nanotubos com ângulo quiral entre  $0^\circ$  e  $30^\circ$ , vetor OC, têm forma quiral (Figura 3C). Os MWCNTs, por serem constituídos por vários nanotubos podem apresentar várias quiralidades.

Os nanotubos de carbono, tal como o nome indica têm dimensões nanométricas. As suas dimensões típicas são [2]:

- Diâmetro externo: 2-20 nm;
- Diâmetro interno: 1-3 nm;
- Comprimento: 1-100  $\mu\text{m}$ .

Para os MWCNTs ainda se considera a distância entre os nanotubos que é aproximadamente 0,34 nm.

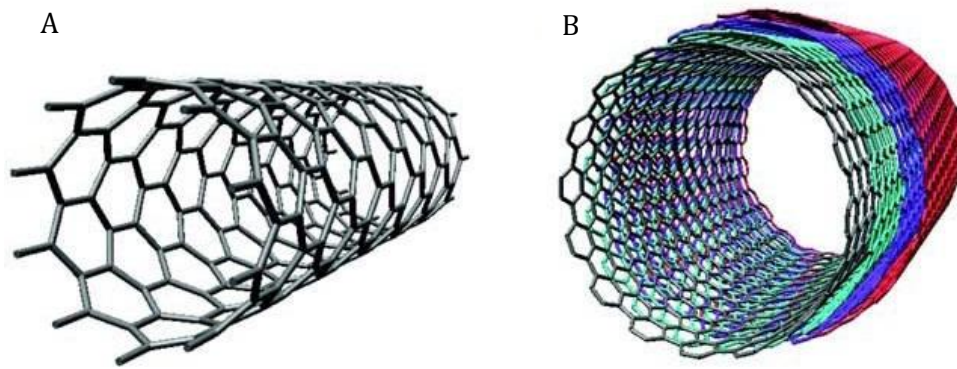


Figura 2 - Representação esquemática da estrutura dos nanotubos de carbono: (A) nanotubo de carbono de parede simples (SWCNT); (B) nanotubo de carbono de parede múltipla (MWCNT) (retirada de [3]).

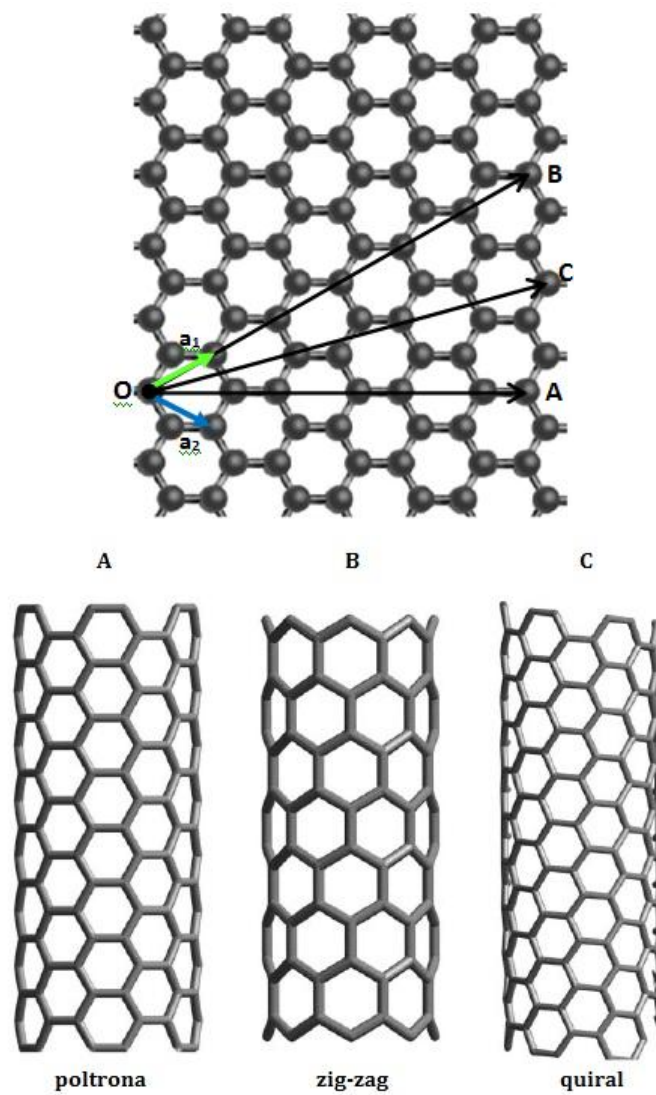


Figura 3 - Esquema genérico dos modelos de CNTs exibindo diferentes quiralidades: configuração em poltrona (A), zig-zag (B) e quirál (C) (adaptada de [4]).

## 1.2 Propriedades e aplicações

As propriedades dos nanotubos de carbono fazem deles um material de grande interesse em diversas aplicações tais como: sensores químicos, dispositivos eletrônicos, baterias de lítio e em compósitos como reforço da matriz polimérica, cerâmica ou metálica. Nas aplicações biomédicas são potenciais promissores para o uso no campo de diagnóstico, libertação controlada de fármacos, terapia e regeneração de tecidos.

Os nanotubos de carbono são um material de elevada resistência mecânica mas ao mesmo tempo flexíveis. São excelentes condutores elétricos e térmicos e são quimicamente estáveis. Dependendo do tipo de quiralidade os nanotubos podem ter comportamento metálico ou semicondutor. Algumas das propriedades dos MWCNTs são apresentadas na Tabela I.

Tabela I – Propriedade dos MWCNTs.

Propriedade	Valor	Unidades	Ref.
Massa volúmica	2,6	g/cm <sup>3</sup>	[5]
Módulo de Young	1,2	TPa	[5]
Resistência à tração	150	GPa	[5]
Resistência à flexão	14,2	GPa	[6]
Condutividade térmica	3000	W/m.K	[7]
Condutividade elétrica	$1,85 \times 10^3$	S/cm	[8]
Densidade de corrente	$1,32 \times 10^7$	A/cm <sup>2</sup>	[8]

## 1.3 Métodos de produção

Existem três métodos mais comuns de produção de nanotubos de carbono: deposição por descarga elétrica de arco, ablação laser e deposição química em fase vapor. Nesta secção serão descritos sucintamente esses métodos.

### 1.3.1 Deposição por descarga elétrica em arco

A deposição por descarga elétrica em arco foi o método usado na primeira produção de CNTs [1]. A deposição em arco consiste no colapso elétrico de moléculas de gás localizadas no espaço entre dois eletrodos de carbono. As condições para a produção dos nanotubos envolvem a passagem de corrente entre 80 e 100 A através dos dois eletrodos de grafite de elevada pureza, ocorrendo uma descarga elétrica através de gases não condutores. Os gases usados são, geralmente, gases inertes, como hélio (He) e árgon (Ar), a pressões entre 5000-7000 Pa, mas também podem ser adicionados hidrogénio (H) ou metano (CH<sub>4</sub>) como modificadores das condições de síntese. O gás é então transformado em plasma, gerando temperaturas suficientemente elevadas (3700-4700°C) para vaporizar o material dos eletrodos. Os CNTs formam-se, normalmente, na região do plasma onde a temperatura se encontra entre 1000-1500°C. O material produzido é frequentemente encontrado depositado no cátodo, depois de um certo período de tempo de evaporação do ânodo.

Com esta técnica consegue-se obter um elevado grau de cristalinidade do material. Contudo, não existe controlo das dimensões dos nanotubos, tanto do comprimento como da largura. Podem também ser produzidas estruturas não desejadas, tais como fulerenos, partículas de metal encapsuladas ou ocorrer a formação de carbono amorfo. Os custos associados à produção de SWCNTs e MWCNTs através deste método são muito elevados [4], [9].

### 1.3.2 Ablação laser

A ablação laser foi desenvolvida por Smalley em 1995 visando o incremento da pureza do produto final. Este método consiste em focar um feixe de laser energético num alvo, maioritariamente constituído por carbono e pequenas quantidades de um metal de transição, o qual é vaporizado resultando numa pluma laser. A pluma laser contém carbono vaporizado e nanopartículas metálicas que levam ao rearranjo do carbono sob a forma de nanotubos. A deposição é feita a uma temperatura de aproximadamente 1200°C na presença de um gás inerte [9].

A maior diferença deste método para o descrito anteriormente reside no tipo de nanotubos produzidos. Enquanto a deposição por descarga elétrica em arco é capaz de produzir MWCNTs e SWCNTs, a ablação laser tem mostrado só ser capaz de produzir SWCNTs [4]. Esta técnica não é indicada para a produção em massa. Contudo, a qualidade e controlo do diâmetro faz deste método uma escolha para a produção de SWCNTs [2].

### 1.3.3 Deposição química em fase de vapor

O método de deposição química em fase de vapor (CVD, do inglês *chemical vapor deposition*) foi usado pela primeira vez para a produção de nanotubos de carbono em 1994 por Ivanov *et al.* [10]. Este método utiliza uma mistura de gás ( $H_2/Ar$ ) e hidrocarbonetos, normalmente etileno ( $C_2H_4$ ) ou acetileno ( $C_2H_2$ ), num substrato em presença de um catalisador, no interior de um tubo reator a temperaturas entre 550-800°C [11]. Os catalisadores usados são metais de transição, sendo o cobalto (Co), o níquel (Ni) e o ferro (Fe) os mais comuns [11, 12]. Na síntese de CNTs, a fonte de átomos de carbono difunde-se nas nanopartículas do catalisador e os átomos de carbono segregam na sua superfície para formar nanotubos. Cada nanopartícula catalisadora dá origem a um nanotubo de carbono (SWCNT ou MWCNT) e quanto maior o diâmetro da partícula maior será o diâmetro do nanotubo produzido. Os catalisadores têm grande importância no crescimento de CNTs porque, para além do efeito sobre o diâmetro, também têm grande influência na taxa de crescimento, morfologia e estrutura dos mesmos [13]. O tamanho das nanopartículas depende da natureza do metal, composição e pressão dos gases na câmara de deposição e da natureza do substrato, bem como da duração e temperatura de pré-tratamento. Sendo assim, o controlo destas variáveis é importante para controlar o diâmetro do catalisador e consequentemente as características do nanotubo [9]. O crescimento dos nanotubos de carbono pode ocorrer em dois mecanismos diferentes, crescimento pelo topo ou pela base, que serão abordados mais à frente.

O CVD é um método bastante explorado para a produção de CNTs pela sua simplicidade e utilização de temperaturas relativamente baixas, comparativamente aos outros métodos descritos, sendo este escolhido como método de síntese para o presente trabalho. É uma técnica com baixos custos associados, sendo o método mais promissor para a produção industrial. Para além disso, produz CNTs com elevada pureza, elevada taxa de produção e com bom alinhamento vertical [2, 13, 14].

## 1.4 Nanotubos de carbono verticalmente alinhados

O crescimento de nanotubos de carbono verticalmente alinhados (VA-CNTs, do inglês *vertically aligned carbon nanotubes*) dá-se sobre uma bolacha de silício revestida com uma dupla barreira de difusão,  $SiO_2/Al_2O_3$ , e por um filme metálico que serve de catalisador para o crescimento. A barreira de difusão de  $Al_2O_3$  tem como função prevenir a difusão do catalisador (Fe) no substrato, permitindo assim que haja maior número de partículas

catalisadoras disponíveis para o crescimento de VA-CNTs. Sem o difusor de barreira de alumina as partículas de ferro reagiriam com a superfície de  $\text{SiO}_2$  e de Si, levando à formação de partículas estáveis de siliceto de ferro ( $\text{FeSi}_2$ ) e faialite ( $\text{Fe}_2\text{SiO}_4$ ), inibindo assim o crescimento dos VA-CNTs [15, 16]. O filme de  $\text{Al}_2\text{O}_3$  permite também a formação de partículas catalisadoras de tamanho apropriado, aproximadamente 20 nm, e impede a agregação destas durante o crescimento dos VA-CNTs [16, 17].

Para o revestimento das bolachas de Si/ $\text{SiO}_2$  com a barreira de difusão e com o catalisador pode-se recorrer a métodos de deposição física em fase vapor (PVD, do inglês *physical vapor deposition*), como a pulverização catódica por magnetron [18] ou a evaporação por feixe de elétrons [19]. No primeiro método de modificação de superfícies, os átomos de um material alvo são ejetados através do bombardeamento de partículas energéticas, tais como íons gasosos acelerados por plasma, e depositados na superfície de um substrato. Este método de PVD realiza-se numa câmara sob vácuo, na qual é injetado um fluxo de gás. A câmara é constituída por um ânodo e um cátodo onde são colocados o alvo e o substrato, respetivamente. O plasma é produzido por uma diferença de potencial entre o ânodo e o cátodo. No caso da barreira de difusão, como se trata de um material cerâmico não condutor, utiliza-se para a sua deposição uma fonte de radiofrequência (RF) e no caso da deposição do filme de ferro utiliza-se uma fonte de corrente contínua (DC) [20]. No processo de evaporação por feixe de elétrons, o material a depositar é colocado num cadinho, abaixo do qual existe um filamento. Ao aplicar uma tensão no filamento este aquece formando um feixe de elétrons que é acelerado, deflectido e focado sobre o material a ser evaporado por meio de campos magnéticos ou elétricos. Quando o feixe de elétrons atinge a superfície do alvo, a energia cinética do movimento é transformada pelo impacto em energia térmica aquecendo o material e conseqüentemente a sua evaporação. Este processo ocorre no interior de uma câmara em vácuo que permite que o material evapore na câmara e condense na superfície do substrato [20].

### 1.4.1 Mecanismo de nucleação e crescimento dos VA-CNTs

O crescimento dos VA-CNTs pode dar-se através de dois mecanismos, crescimento pelo topo, Figura 4A, e crescimento pela base, Figura 4B, e ocorre na presença de um catalisador metálico que serve de suporte ao crescimento de VA-CNTs. No primeiro mecanismo a partícula catalisadora separa-se do substrato onde está depositada acompanhando o



crescimento do nanotubo. No mecanismo de crescimento pela base a partícula catalisadora permanece no substrato durante todo o processo.

O crescimento dos nanotubos ocorre devido ao rápido movimento das espécies de carbono através do catalisador, por processos de difusão. A difusão do carbono através da partícula catalisadora baseia-se na reação de pirólise de hidrocarbonetos [4]. O carbono difunde-se ao longo do gradiente de concentração e precipita nas regiões de crescimento preferencial, em defeitos atômicos ou nas interfaces metal/substrato. O tamanho da partícula catalisadora determina o diâmetro do nanotubo. Como o diâmetro das partículas é reduzido, a curvatura do filamento aumenta, impondo uma pressão crescente nos planos basais dos cristais forçando-os a assumir a forma da superfície contínua filamentososa dos nanotubos de carbono. Uma superfície contínua é energeticamente mais favorável e são formados VA-CNTs. Os planos basais dos cristais de grafeno são orientados tangencialmente à superfície curva da partícula catalisadora, com isto a formação posterior de estruturas cilíndricas torna-se quase impossível devido ao significativo aumento da tensão nos planos basais, resultando na formação da estrutura oca dos CNTs [21, 22].

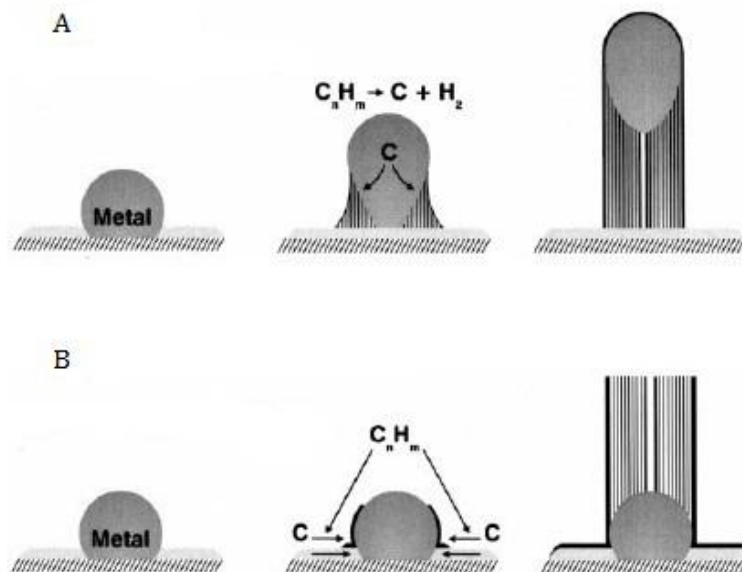


Figura 4 - Representação esquemática dos dois mecanismos de crescimento dos nanotubos de carbono. (A) crescimento pelo topo; (B) crescimento pela base (adaptada de [22]).

## 1.5 Purificação

Após a produção dos nanotubos de carbono estes poderão conter impurezas, tais como: outros alótropos de carbono, partículas metálicas que serviram como catalisadores ao seu crescimento e, até mesmo, variações estruturais. As impurezas interferem com as propriedades dos CNTs e limitam as suas aplicações, sendo então necessária a sua purificação. A purificação dos nanotubos é muito importante para certas aplicações biológicas e microeletrônicas [23]. É um processo também essencial para a incorporação dos nanotubos numa matriz polimérica uma vez que os agregados metálicos são prejudiciais devido à sua capacidade de induzir quebras nas cadeias poliméricas, bem como reações de ligações cruzadas indesejadas [23].

Os métodos de purificação dos nanotubos podem classificar-se em químicos, físicos e numa combinação de ambos [24]. Os métodos químicos baseiam-se na oxidação, com a utilização de ácidos (normalmente  $\text{HNO}_3$ ,  $\text{H}_2\text{SO}_3$  e  $\text{HCl}$ ), uma vez que o carbono amorfo, devido à presença de maior número de ligações pendentes e defeitos estruturais, tende a ser facilmente oxidado e as impurezas metálicas dissolvidas. Contudo, a oxidação leva a modificações de natureza química, introdução de grupos funcionais (-OH, -C=O, -COOH), e de natureza estrutural, fragmentação dos nanotubos e indução de defeitos nas paredes. Porém, a introdução de grupos funcionais pode ser desejada caso se pretenda aumentar a reatividade, solubilidade e dispersão dos CNTs em solventes orgânicos e aquosos [24].

Os métodos físicos baseiam-se nas diferenças de tamanho, massa volúmica e propriedades magnéticas existentes entre os nanotubos de carbono e as impurezas. São normalmente utilizados para remover carbono amorfo, fulereno e nanotubos agregados ou para separar CNTs com diferentes características (tamanho e diâmetro). Este tipo de purificação é realizado normalmente em suspensão que requer uma boa dispersão dos CNTs, sendo usado um solvente. Uma das técnicas deste método de purificação é a filtração da suspensão, em que os nanotubos ficam retidos e as outras estruturas, de menor tamanho, passam através dos poros do filtro. A combinação de ambos os métodos, químico e físico aumenta a eficiência da purificação e a qualidade do purificado [24].

Existem ainda outros métodos de purificação que se baseiam no tratamento térmico dos CNTs: purificação a altas temperaturas ( $\sim 1800$  °C) e purificação pela oxidação por meio gasoso [25-28]. A primeira é realizada num forno de grafite em vácuo e a segunda num tubo de quartzo de paredes quentes com fluxo de ar a temperaturas inferiores à temperatura de oxidação dos CNTs. O tratamento térmico dos nanotubos de carbono a alta temperatura ( $\sim 1800$  °C) tem-se mostrado eficaz na remoção de metais residuais, mesmo aqueles contidos

no interior dos CNTs, e na redução de defeitos estruturais das paredes dos nanotubos [28]. Por outro lado, a purificação através da oxidação por ar é direcionada para a eliminação de impurezas de carbono baseando-se nas diferentes temperaturas de oxidação entre os CNTs e as outras partículas de carbono. A Figura 5 apresenta um exemplo de curvas de análise termogravimétrica (TGA, do inglês *thermogravimetric analysis*) de nanotubos de carbono e de fulereno ( $C_{60}$ ). O início de perda de peso dos nanotubos acontece a  $\sim 700$  °C observando-se que são mais resistentes à oxidação por meio gasoso do que os fulerenos que oxidam a temperaturas inferiores [4]. O controlo do tempo do tratamento térmico é crucial uma vez que à medida que as impurezas são oxidadas, os nanotubos de carbono ficam mais expostos ao oxigénio ficando assim mais suscetíveis à oxidação [25, 26].

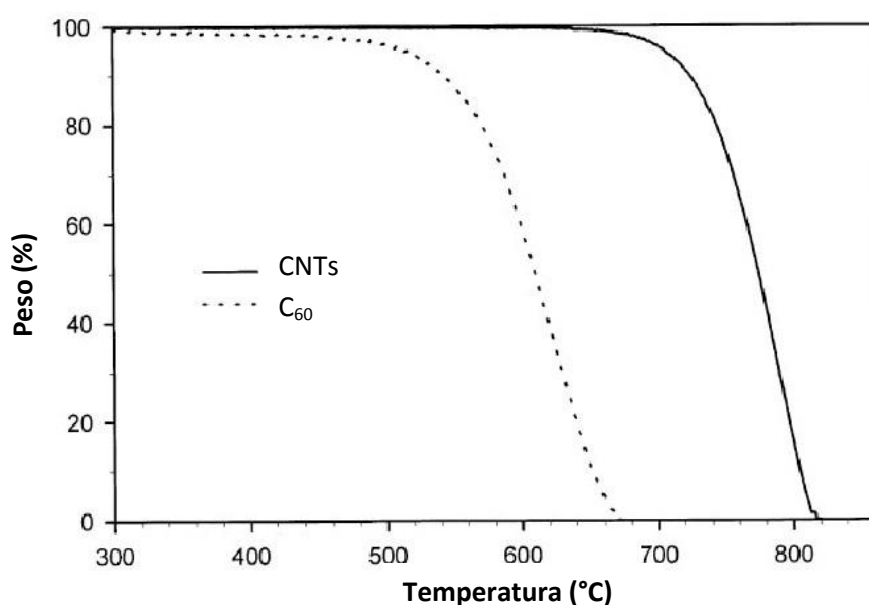


Figura 5 – TGA de MWCNTs e  $C_{60}$ . Os nanotubos são claramente mais resistentes à oxidação comparativamente com o pó de  $C_{60}$  (adaptada de [4]).

## 1.6 Funcionalização

Após a purificação, a funcionalização é o próximo tratamento que confere aos nanotubos capacidade para serem aplicados em diversas áreas. Devido às fortes interações entre CNTs vizinhos, estes tendem a agregar-se, tornando difícil a sua dispersão, o que se torna um obstáculo para a sua manipulação e aplicação. Uma boa dispersão dos CNTs a nível individual é fundamental para um melhor desempenho na maioria das suas aplicações, especialmente para a sua utilização em compósitos. A adição de grupos funcionais às paredes

dos CNTs melhora a dispersão tornando-os solúveis em soluções orgânicas e aquosas e menos prejudiciais às células do organismo, permitindo que as suas excelentes propriedades sejam uma vantagem para a utilização em ambientes biológicos [9].

Existem dois tipos de funcionalização: funcionalização covalente e não covalente. A funcionalização covalente provoca alterações na estrutura, ou seja, induz defeitos nas paredes dos nanotubos uma vez que o carbono passa de um estado de hibridização  $sp^2$  para  $sp^3$ . Os nanotubos de carbono podem ser oxidados por agentes oxidantes fortes para gerar grupos de ácido carboxílico, que podem ser quimicamente modificados através de esterificação e de adição de aminas. Na superfície de nanotubos de carbono funcionalizados com grupos carboxilos podem ser incorporados vários polímeros, metais e biomoléculas [12, 29].

A funcionalização não covalente envolve forças de van der Waals e eletrostáticas, e requiere a adsorção física de moléculas nas paredes laterais dos nanotubos de carbono. É obtida pelo invólucro de polímero, pela adsorção de surfactantes ou de pequenas moléculas aromáticas, e a interação com biomoléculas tais como DNA e peptídeos [12]. Esta funcionalização tem a vantagem da estrutura eletrónica dos nanotubos não ser alterada [12].



Propriedade	Valor	Unidade
Massa volúmica	1,11	g/ml
Constante dielétrica	2,8	adimensional
Tensão superficial	24	mN/m
Temperatura de transição vítrea	146	K
Viscosidade	3900	mPa.s
Condutividade térmica	0,18	W/m.K
Resistividade	$1,2 \times 10^{14}$	$\Omega.cm$

## 2.2 Método de produção

A produção de compósitos PDMS/CNTs envolve a mistura do polímero com os nanotubos na presença de um solvente, geralmente o tolueno. A produção compreende quatro etapas: dispersão dos CNTs e diluição do polímero no solvente, mistura da suspensão com o polímero, evaporação do solvente e cura do compósito [32, 37, 41, 42].

A eficácia da utilização dos CNTs como componentes de um compósito depende fortemente da capacidade de serem dispersos individualmente e homogeneamente na matriz. Para que as propriedades requeridas para o compósito sejam alcançadas, é fundamental que haja uma boa dispersão e estabilização dos nanotubos na matriz polimérica. Devido às fortes ligações entre eles, os CNTs tendem a aglomerar-se tornando difícil a sua dispersão, a qual é fundamental para um bom desempenho dos nanotubos na maioria das aplicações, nas quais se visa maximizar as propriedades do polímero [31, 32, 41, 43, 44]. Para tal é necessário proceder à funcionalização dos nanotubos para melhorar a sua dispersão, bem como para promover ligações interfaciais que vão permitir a transferência de propriedades dos CNTs para o polímero [45]. A funcionalização com grupos carboxilos (-COOH) leva à redução das interações de van der Waals entre os CNTs, facilitando a separação de agregados de nanotubos em tubos individuais e permitindo a dispersão dos nanotubos em soluções aquosas e solventes orgânicos, uma propriedade altamente desejável para a produção de compósitos poliméricos [45, 46].

### 2.3 Propriedades e aplicações

As propriedades dos compósitos poliméricos que contêm nanotubos de carbono dependem de vários fatores: da presença de impurezas nos nanotubos, do comprimento e da concentração e orientação dos nanotubos na matriz polimérica [32].

O alinhamento dos nanotubos na matriz polimérica tem um efeito profundo sobre a condutividade elétrica. Quando os nanotubos estão altamente alinhados nos compósitos, há menos contactos entre si, o que resulta numa redução da condutividade elétrica e um limite superior de percolação, em comparação com os compósitos com nanotubos orientados aleatoriamente [32]. O comprimento dos CNTs deve ser otimizado, enquanto os CNTs mais longos formam agregados que ajudam a reduzir o número de pontos de contacto entre os tubos ao longo do percurso de condução elétrica, os CNTs mais curtos proporcionam uma melhor dispersão e pontos de contacto suficientes para o transporte de eletrões [33]. No caso da presença de impurezas, por exemplo, os agregados metálicos quebram as cadeias poliméricas e originam reações indesejadas de ligações cruzadas [23].

A incorporação de MWCNTs numa matriz polimérica de polidimetilsiloxano melhora a condutividade elétrica do polímero e quanto maior a percentagem em peso de MWCNTs presentes na matriz, maior é a condutividade elétrica do compósito,  $2 \times 10^{-2}$  S/m para 2,5% em peso de MWCNTs e 3,6 S/m para 3,8% [37, 47, 48]. A adição de MWCNTs aumenta igualmente a condutividade térmica do polímero. Uma adição de 0,8% em peso de MWCNTs resulta num aumento de 40% da condutividade térmica [42], e de 65% para uma adição de CNTs de 3,8% em peso [48].

Tal como as propriedades térmicas e elétricas do PDMS são melhoradas com a adição de MWCNTs, também as propriedades mecânicas o são. Wu *et al.* mostraram que o módulo de Young do PDMS aumenta com a adição dos MWCNTs. O aumento destas propriedades é auxiliado pelas ligações entre os CNTs e a matriz polimérica. O compósito com 4% em peso de CNTs apresentou módulo de Young de 2,34 MPa e dureza de 2,76 MPa, traduzindo-se num aumento de 21,38% resultante da adição dos CNTs[49].

### 3 Plataforma de nanotubos de carbono para diferenciação celular

Os compósitos poliméricos incorporando nanotubos de carbono têm sido estudados para a aplicação como plataformas de diferenciação de células estaminais. São vários os tipos de células estaminais usadas nos vários estudos, como exemplo as células estaminais embrionárias, células estaminais neuronais, células mesenquimais e células estaminais pluripotentes induzidas. Neste trabalho serão abordadas plataformas para este tipo de células.

#### 3.1 Células estaminais pluripotentes induzidas

O dilema ético, no que toca à doação e destruição de embriões humanos, e os problemas de compatibilidade entre doador e recetor, relativamente à utilização de células estaminais embrionárias (ESCs, do inglês *embryonic stem cells*) em terapias, levaram à necessidade de recorrer a outros tipos de células em que tais problemas não fossem postos em causa. Essas células devem ter as mesmas potencialidades que as células estaminais embrionárias, isto é, possuírem a capacidade de originarem células das diferentes linhagens, tais como células osteoblásticas, fibroblásticas e neuronais. Houve então a necessidade de reprogramar células adultas para um estado semelhante ao das células estaminais embrionárias surgindo deste modo as células estaminais pluripotentes induzidas (iPSCs, do inglês *induced pluripotent stem cells*) como substitutas ideais, abrindo uma nova porta para a medicina regenerativa. As células somáticas são reprogramadas em iPSCs através da transdução retroviral de quatro fatores de transcrição associados à pluripotência, Klf4, Sox2, Oct4 e Myc, tendo assim potencialidade para se diferenciarem em todos os tipos de linhagens celulares (Figura 7) [50, 51].

As iPSCs são morfologicamente e fenotipicamente semelhantes às ESCs e mostram capacidade infinita de proliferação e autorrenovação. A maior vantagem das iPSCs sobre as ESCs é o facto de poderem ser produzidas a partir de células somáticas do próprio paciente, evitando assim a rejeição imune depois de transplantadas e os problemas éticos sobre as ESCs [52-54].

As células estaminais pluripotentes induzidas possuem um grande potencial para aplicações terapêuticas e regenerativas. O desenvolvimento de estudos com células estaminais faz do transplante de células uma terapia promissora para as doenças do sistema nervoso central, incluindo lesões por pancada, traumatismo cerebral e desordens



degenerativas. Como exemplo das doenças degenerativas existe a doença de Parkinson que é a melhor candidata para terapia com células estaminais uma vez que só um grupo de células neuronais são afetadas. Contudo, a terapia por substituição de células é mais complicada para as lesões e outras doenças degenerativas como o caso da doença de Alzheimer. A dificuldade reside na variedade dos tipos de células neurais afetadas, onde estão incluídos neurónios, astrócitos, oligodendrocitos e células endoteliais dos vasos sanguíneos [53].

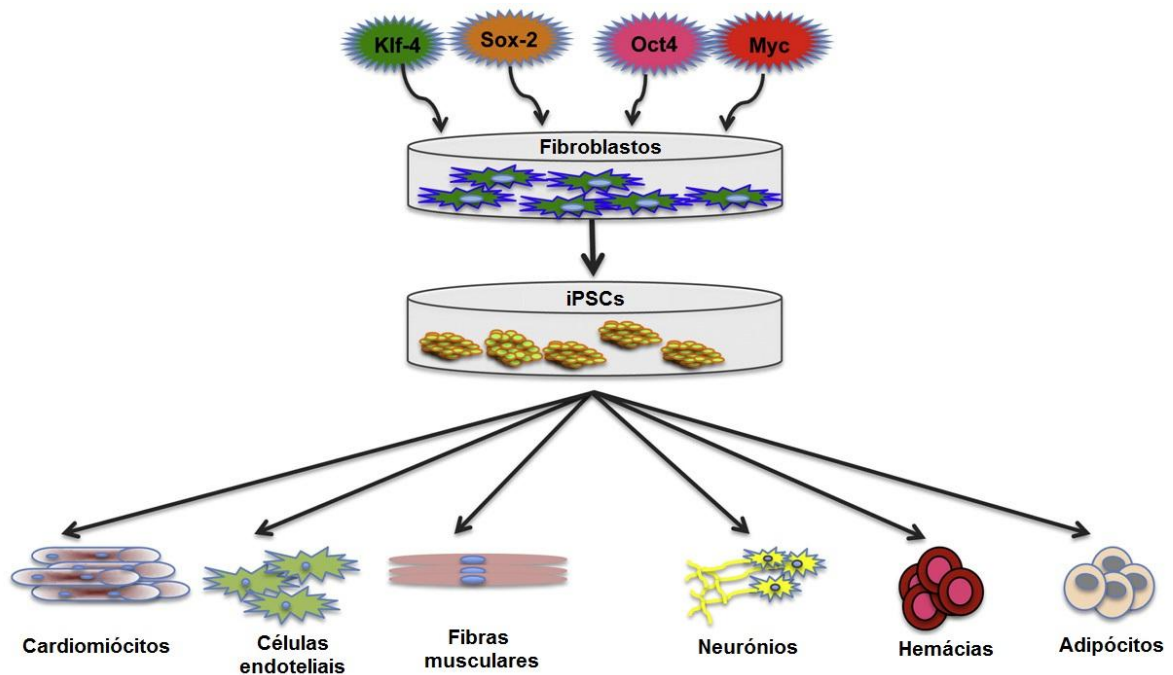


Figura 7 – As células somáticas diferenciadas podem ser reprogramadas em iPSCs através da expressão retroviral de quatro fatores, Klf4, Sox2, Oct4 e Myc, tendo assim potencialidade para se diferenciarem em todas todos os tipos linhagens celulares [52].

### 3.2 Aplicação dos CNTs na diferenciação de iPSCs

Atualmente não se conhecem estudos que evidenciem a utilização de nanotubos de carbono na diferenciação de iPSC. Contudo, existem trabalhos da sua utilização para promover a diferenciação de células estaminais embrionárias em células neuronais [55, 56] e diferenciação de células estaminais neuronais [57, 58]. O sucesso da diferenciação das células estaminais neuronais do córtex de ratos em compósitos polieletrólito/CNTs foi demonstrado pela primeira vez por Jan e Kotov [58]. A nanoestrutura do compósito polieletrólito/CNTs produzido camada a camada não mostrou efeitos adversos na diferenciação das células estaminais neurais. Foram registadas indicações que os substratos de CNTs podem induzir

diferenciação preferencial numa linhagem específica, uma vez que a avaliação quantitativa dos fenótipos celulares mostrou que houve ligeiramente mais neurónios e oligodendrócitos nos substratos que continham CNTs [58].

Tzu-I Chao *et al.* recorreram a um *scaffold* composto por ácido poliacrílico (PAA) e nanotubos de carbono para a diferenciação celular, demonstrando pela primeira vez que os filmes finos poliméricos modificados com nanotubos de carbono são capazes de promover a diferenciação seletiva de células estaminais embrionárias humanas (hESCs, do inglês *human embryonic stem cells*) em células neuronais mantendo uma excelente viabilidade celular [55]. Num outro estudo os mesmos autores recorreram a um compósito ácido polimetacrílico (PMAA)/CNTs evidenciando, pela primeira vez, que nesta plataforma as hESCs conseguem-se diferenciar em células neuronais relativamente maduras [56]. Destes dois estudos, os autores registaram que o PMAA é mais hidrofóbico e menos ácido que o PAA. Consequentemente foram localizadas maiores quantidades de proteínas no compósito com PMAA. Concluiu-se então que a plataforma produzida no segundo estudo é mais promissora para a adesão e diferenciação das células [56].

Outros autores estudaram a capacidade do compósito proteína/CNTs mediar a diferenciação e estimulação elétrica das células estaminais neuronais, concluindo que este é propício ao crescimento e proliferação de células estaminais neurais (NSCs, do inglês *neural stem cells*), à sua excitação e diferenciação [57].

Apesar da inexistência de estudos conclusivos sobre a diferenciação das iPSCs através de plataformas de nanotubos de carbono, Akasaka *et al.* [59] debruçaram-se sobre esta possibilidade tendo concluído a ineficácia dos nanotubos de carbono como plataforma para o objetivo supra referido.

Embora não relatem qualquer estudo da diferenciação de ESCs, NSCs ou iPSCs em células neuronais usando substratos à base de CNTs, outros estudos encontrados demonstram a capacidade dos CNTs como base para o crescimento de células neurais [60-64].

### 3.3 Estimulação elétrica

A engenharia de tecidos proporciona uma nova terapia médica como alternativa aos métodos convencionais de transplante, que regula o comportamento celular e da progressão do tecido, através do desenvolvimento e conceção de síntese da matriz extracelular análoga de novos biomateriais que apoiam a cultura de células e a regeneração do tecido. A

abordagem fundamental na engenharia de tecido neural envolve a produção de suportes poliméricos para cultura celular com células nervosas para produzir um tecido funcional adequado para implantação [65].

A proposta relacionada com a estimulação elétrica das células em meio de cultura baseia-se no facto de a bioeletricidade presente no corpo humano desempenhar um papel essencial na manutenção de funções biológicas, tais como a sinalização do sistema nervoso, a contração muscular e cicatrização de feridas [66]. A geração de campos elétricos por parte das células está presente durante os principais eventos celulares, como diferenciação celular, divisão e migração [66]. Também foi verificado que a presença de um campo contínuo fraco de corrente elétrica em alguns sistemas biológicos afeta positivamente as atividades celulares tais como a divisão celular, diferenciação e migração [67].

Deste modo, a ideia de utilizar compósitos poliméricos eletricamente condutores baseia-se na hipótese de tais compostos poderem ser utilizados para alojar o crescimento das células, de modo que possa ser aplicada uma estimulação elétrica direta através do composto para modular os comportamentos celulares [66]. Em comparação com a estimulação elétrica com eléctrodos, a estimulação elétrica aplicada por meio de uma plataforma feita de polímero condutor está confinada nos limites do compósito, portanto, pode ser controlada de forma mais rigorosa [66].

Os nanotubos de carbono são utilizados para incorporação em polímeros não condutores para proporcionar um reforço mecânico e elétrico e transmitir novas propriedades, como a condutividade elétrica para crescimento celular [65]. Alguns estudos têm indicado que os nanotubos de carbono são citotóxicos, enquanto outros mostraram ser excelentes substratos para o crescimento celular [68]. Estes resultados positivos ou negativos sobre a citotoxicidade deve-se à forma como os nanotubos de carbono têm sido utilizados por diferentes autores. Os nanotubos de carbono mostram ser tóxico para as células, quando utilizados em suspensão no meio de cultura celular [69]. A posição vertical e horizontal dos nanotubos no meio de cultura também influencia a citotoxicidade, quando orientados verticalmente perfuram a célula levando-a à morte, tal como acontece quando se encontram soltos numa suspensão. Isto pode ser evitado com a orientação horizontal dos CNTs. Potenciais efeitos citotóxicos associados a nanotubos de carbono podem ser mitigados pela funcionalização química da sua superfície [68]. Os CNTs quimicamente funcionalizados têm sido utilizados com sucesso como dispositivos potenciais para melhorar a transferência de sinal neural apoiando o alongamento dendrítico e adesão celular. Estes resultados sugerem fortemente que o crescimento dos circuitos neuronais sobre CNTs é acompanhado por um aumento significativo na atividade da rede neuronal. O aumento na eficácia da transmissão de

sinais neurais pode estar relacionado com as propriedades específicas dos CNTs, como a elevada condutividade elétrica, que controlam as interações moleculares neuronais extracelulares [65]

A estimulação elétrica tem mostrado influência na diferenciação de células estaminais. Yamada *et al.* [70] demonstraram que a estimulação elétrica influencia fortemente as células estaminais embrionárias a assumir um destino neuronal. Vários autores aplicam para a estimulação elétrica uma tensão de 100 mV durante 1-4h mostrando-se a aplicação de uma corrente contínua mais favorável do que a aplicação de corrente alternada [65].





## Capítulo II – Procedimiento Experimental





## 1 Produção de nanotubos de carbono

### 1.1 Preparação do substrato para o crescimento dos CNTs

Para que se dê a produção das florestas de nanotubos de carbono é necessário um substrato que sirva de apoio ao seu crescimento. Desta forma, neste trabalho foram utilizadas bolachas comerciais de silício revestidas com um filme de sílica de 200 nm de espessura, Si/SiO<sub>2</sub> (Sierget Consulting), que foram posteriormente revestidas por uma barreira de difusão (Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>) e um catalisador (Fe), Figura 8, pelo processo de pulverização catódica por magnetrão, Figura 9.

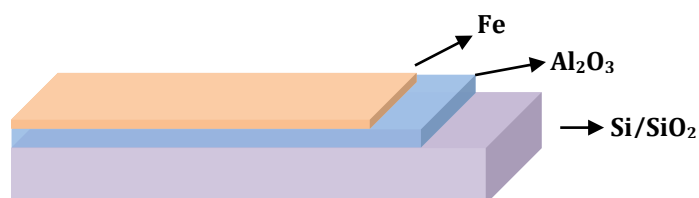


Figura 8 – Ilustração representativa da bolacha de silício revestida com a barreira de difusão (Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>) e com o catalisador (Fe).



Figura 9 – Equipamento de pulverização catódica por magnetrão utilizado na deposição dos filmes de Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> e de Fe e respectivo magnetrão com alvo de Fe (A) e porta substratos com substrato de Si/SiO<sub>2</sub> já revestido com os filmes (B).

Uma vez que se trata de um material de natureza não condutora, a deposição do filme de alumina foi realizada utilizando-se uma fonte de radiofrequência (RF). No processo o alvo de  $\text{Al}_2\text{O}_3$  sinterizado é bombardeado pelos íons da atmosfera gasosa. A deposição da barreira de difusão de  $\text{Al}_2\text{O}_3$  dá-se em vácuo e com um fluxo contínuo de argon (Ar) (pureza  $\geq 99,9999\%$ , Praxair) e oxigênio ( $\text{O}_2$ ) (pureza  $\geq 9,999\%$ , Praxair). Para a deposição do filme catalisador de Fe (pureza  $\geq 9,99\%$ , Goodfellow) recorreu-se a uma fonte de corrente contínua (DC), uma vez que o alvo é composto por um material condutor. A deposição do Fe também se dá em vácuo e com um fluxo contínuo de Ar, contudo não é utilizado  $\text{O}_2$  por provocar oxidação do ferro.

Antes de cada deposição procedeu-se à limpeza do alvo de modo a garantir que o filme posteriormente formado não apresentasse impurezas. A limpeza foi efetuada nas mesmas condições da posterior deposição, mas com duração de 30 minutos com a amostra fora do alcance do plasma. As condições de deposição da barreira de difusão e do catalisador estão apresentadas na Tabela III. Pretendendo-se um filme de  $\text{Al}_2\text{O}_3$  com espessura de 10 nm e um de Fe com 1 nm e sabendo que a velocidade de deposição para cada um é de 0,19 nm/s e de 0,04 nm/s, respetivamente, foram calculados os tempos de deposição de 9 minutos para a alumina e de 25 segundos para o ferro.

Após a deposição do catalisador, as bolachas, com 5,8 mm de diâmetro e 279  $\mu\text{m}$  de espessura, foram cortadas em pequenos quadrados para a posterior deposição das florestas de VA-CNTs.

Tabela III – Condições de deposição dos filmes de  $\text{Al}_2\text{O}_3$  e Fe.

Condições	$\text{Al}_2\text{O}_3$	Fe
Distância alvo-amostra (cm)	10	10
Pressão base (mbar)	$2,5 \times 10^{-6}$	$2,5 \times 10^{-6}$
Pressão de trabalho (mbar)	$8,8 \times 10^{-4}$	$8,8 \times 10^{-4}$
Fluxo de Ar (ml/min.)	10	10
Fluxo de $\text{O}_2$ (ml/min.)	0,3	n.a.
Potência limite (W)	100	50
Corrente limite (A)	n.a.	0,05
Tempo de deposição	9 min.	25 s

## 1.2 Deposição de florestas de VA-CNTs

A deposição das florestas de VA-CNTs foi realizada pelo método de deposição química em fase vapor num reator de paredes quentes (TCVD, do inglês *thermal chemical vapor deposition*), Figura 10, à temperatura de 750 °C e pressão atmosférica (~1000 mbar) na presença de Ar (pureza  $\geq 99,9999\%$ ,  $\leq 0,5$  ppm de H<sub>2</sub>O, Praxair), H<sub>2</sub> (pureza  $\geq 99,999\%$ ,  $\leq 2$  ppm de H<sub>2</sub>O, Praxair) e C<sub>2</sub>H<sub>2</sub> (pureza  $\geq 99,6\%$ , 300 ppm de H<sub>2</sub>O, Praxair). A deposição de VA-CNTs compreende cinco etapas. A primeira teve por objetivo verificar a existência de possíveis fugas de gás: o porta substratos de quartzo (Figura 11) com os substratos foi colocado na entrada do reator e encheu-se a câmara com Ar até à pressão atmosférica e verificou-se durante 2 minutos se existiam fugas. No fim da primeira etapa, o porta substratos foi empurrado para o centro do reator onde a temperatura era de 750 °C e deu-se início aos pré-tratamentos do catalisador de modo a prepará-lo para o crescimento dos VA-CNTs, isto é, quebrar o filme de Fe em nanopartículas para que possam ocorrer os processos de nucleação e crescimento dos VA-CNTs, correspondentes às etapas dois e três. Na segunda etapa atinge-se a temperatura de síntese com um fluxo constante de Ar. Na etapa seguinte, o H<sub>2</sub> é introduzido de forma a produzir uma atmosfera redutora, eliminando assim eventuais contaminantes, como ferro oxidado na superfície do substrato, possibilitando a quebra do filme em nanopartículas. O crescimento dos nanotubos corresponde à etapa quatro, ocorreu por pirólise do acetileno e pelo rápido movimento das espécies de carbono através do catalisador pelo processo de difusão. Terminado o crescimento, deslocou-se o porta substratos para a entrada do reator onde as florestas arrefeceram e fez-se a evacuação dos gases reativos através de fluxo de Ar durante 2 minutos, correspondendo à quinta e última etapa do processo de deposição de VA-CNTs. As condições de todas as etapas descritas estão apresentadas na Tabela IV.

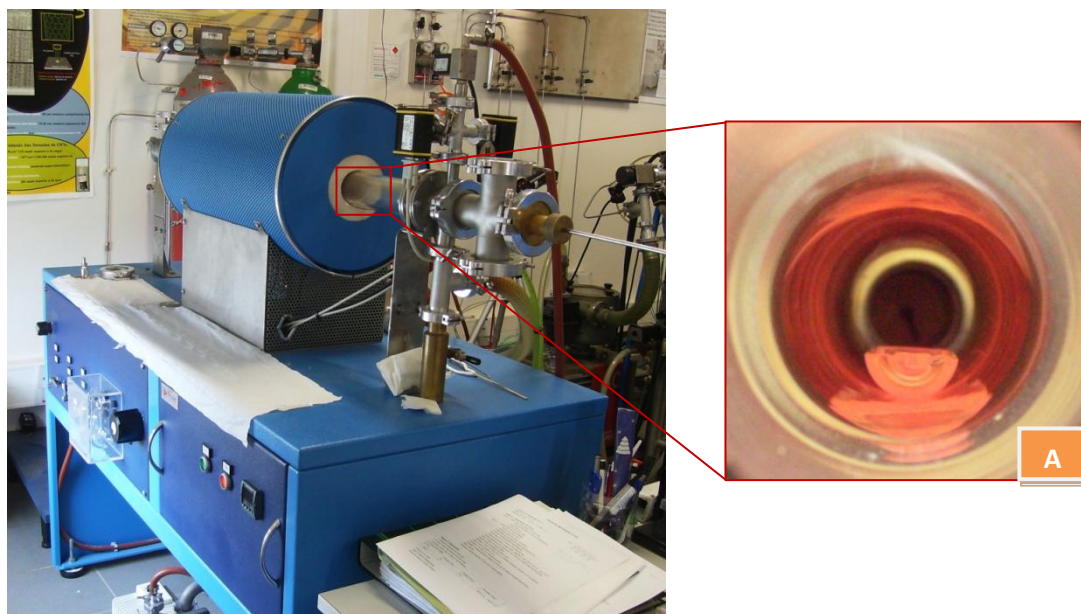


Figura 10 – Fotografia do reator TCVD utilizado para a deposição de florestas de VA-CNTs e porta substratos no interior do tubo de quartzo (A).

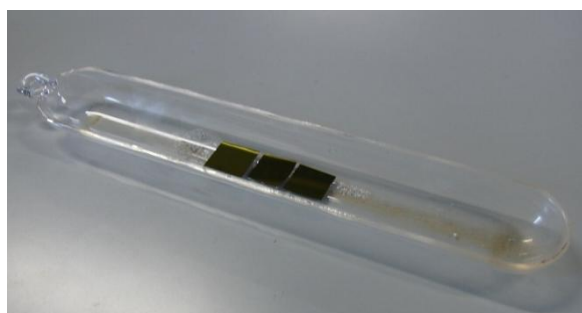


Figura 11 – Porta substratos do reator TCVD com substratos para o crescimento de VA-CNTs.

Tabela IV – Condições do pré-tratamento do catalisador e crescimento de VA-CNTs por TCVD.

Variáveis		Etapa I	Etapa II	Etapa III	Etapa IV	Etapa V
T (°C)		0-750	750	750	750	750
Pressão (mbar)		1000	1000	1000	1000	1000
Tempo (min.)		2	5	1	15	2
Fluxo de gases (ml/min.):	Ar	1400	1000	200	400	1400
	H <sub>2</sub>	n.a.	n.a.	500	100	n.a.
	C <sub>2</sub> H <sub>2</sub>	n.a.	n.a.	n.a.	10	n.a.

### 1.3 Tratamento térmico das florestas de CNTs

Após o crescimento das florestas de VA-CNTs, procedeu-se ao seu tratamento térmico com propósito de eliminar o carbono amorfo existente nas florestas. O tratamento realizou-se após o crescimento dos VA-CNTs, numa zona do reator de TCVD onde a temperatura se encontrava aproximadamente a 350 °C, Figura 12, com fluxo de ar e à pressão atmosférica. De modo a obter as florestas com os melhores resultados na eliminação das impurezas, foram realizados diferentes tratamentos, com duração de 10, 30 e 60 minutos.

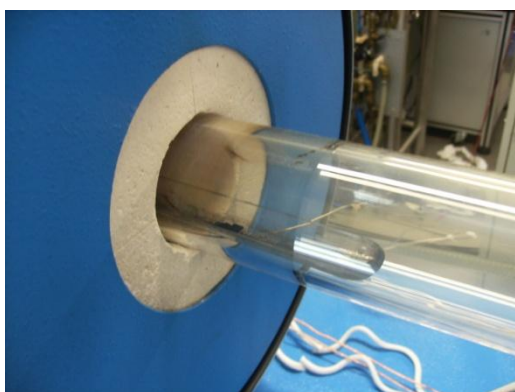


Figura 12 – Zona do TCVD onde se realiza o tratamento térmico dos VA-CNTs.

## 2 Produção das plataformas compósitas

### 2.1 Produção do substrato de PDMS

Na produção do substrato de PDMS procedeu-se à mistura manual da base de PDMS e do agente de cura (SYLGARD 184 Silicone Elastomer) numa proporção de 10:1 durante 15 minutos. A mistura foi vertida para uma caixa de petri e deixou-se em repouso durante 30 minutos para eliminação das bolhas de ar. Em seguida, procedeu-se à cura do polímero durante 45 minutos numa estufa a 100 °C. Após a cura, cortaram-se elementos de secção quadrada de 1x1 cm<sup>2</sup>, com espessura de aproximadamente 1 mm, Figura 13.

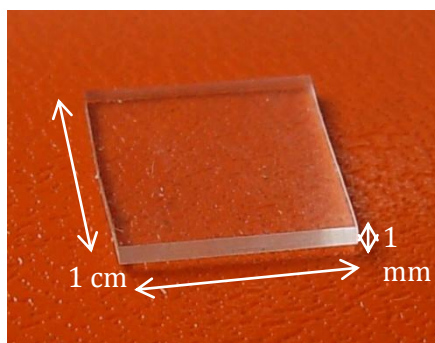


Figura 13 – Substrato de PDMS com 1 cm de largura e 1 mm de espessura.

### 2.2 Produção do compósito PDMS/CNTs

Antes de produzir o compósito e para melhorar a dispersão dos MWCNTs no PDMS, procedeu-se à purificação e funcionalização dos MWCNTs comerciais (c-MWCNTs), com dimensões de 9,5 nm de diâmetro e 1,5 µm de comprimento. Para a purificação recorreu-se a um tratamento térmico a alta temperatura e para a funcionalização recorreu-se a: (1) oxidação dos MWCNTs através de tratamento com ácido nítrico (HNO<sub>3</sub>); ou (2) com uma solução de HNO<sub>3</sub> e ácido sulfúrico (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>). A purificação e funcionalização tiveram por objetivo a eliminação de impurezas, tais como carbono amorfo e partículas de catalisador e a funcionalização dos MWCNTs com grupos carboxilos, para melhorar a dispersão na matriz polimérica.

**Purificação:**

Os MWCNTs comerciais (NANOCYL™ NC7000) foram purificados através de um tratamento térmico a alta temperatura. A purificação decorreu num forno de grafite (TermoLab) sob vácuo (70 kPa) em atmosfera de Ar a 1900 °C durante 8 h, após aquecimento a 10 °C/min. Estes MWCNTs vão ser designados no presente trabalho por p-MWCNTs.

**Funcionalização 1:**

2 g de MWCNTs comerciais com purificação foram dispersos em 80 ml de HNO<sub>3</sub> (pureza ≥ 69%, Sigma-Aldrich) e colocadas num banho de ultrassons durante 30 minutos. Após o banho de ultrassons, os nanotubos foram lavados com água destilada até obter um pH superior a 5, filtrados e secos numa estufa a 40 °C durante 2 dias. Os MWCNTs que sofreram este tratamento serão designados por pf1-MWCNTs.

**Funcionalização 2:**

A funcionalização de MWCNTs comerciais purificados realizou-se recorrendo à utilização de uma solução de HNO<sub>3</sub> (pureza ≥ 69%, Sigma-Aldrich) e H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (pureza de 99,999%, Sigma-Aldrich) numa proporção volúmica de 1:3. Uma vez que a reação entre os dois ácidos é do tipo exotérmica, a sua mistura fez-se num balão imerso numa tina com gelo por forma a minimizar a evaporação dos ácidos. Após a mistura, foram adicionados os MWCNTs purificados e montou-se um sistema de refluxo. A funcionalização realizou-se, então, num sistema de refluxo à temperatura de 70 °C durante 2 h e com agitação magnética. Terminado o tempo de funcionalização, o balão, já um pouco arrefecido, foi imerso numa tina com gelo e fez-se a diluição da suspensão em água desionizada (1:5 em volume). A suspensão foi filtrada utilizando um filtro de PTFE com tamanho de poro de 0,45 µm, e lavados com água desionizada até atingir um pH > 5. Após lavagem, os nanotubos foram secos numa estufa a 40 °C durante 2 dias. Os MWCNTs submetidos a este tratamento são designados por pf2-MWCNTs.

Os compósitos PDMS/MWCNTs foram então produzidos com diferentes tipos de MWCNTs: MWCNTs comerciais não funcionalizados e não purificados (c-MWCNTs), MWCNTs purificados (p-MWCNTs), purificados pelo tratamento térmico e funcionalizados pelo tratamento com HNO<sub>3</sub> (pf1-MWCNTs) e MWCNTs purificados pelo tratamento térmico e funcionalizados pelo tratamento com solução de HNO<sub>3</sub> e H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (pf2-MWCNTs). Compararam-se dois procedimentos para a produção do compósito:

### **Procedimento A:**

Preparou-se inicialmente uma suspensão de MWCNTs e tolueno, com agitação em banho de ultrassons durante 15 minutos. Em seguida efetuou-se uma solução de PDMS (SYLGARD 184 Silicone Elastomer) e tolueno (pureza de 99,8%, Sigma-Aldrich) e colocou-se em banho de ultrassons por 5 minutos. A suspensão de MWCNTs foi misturada com a solução de PDMS e tolueno em banho de ultrassons por 10 minutos. O agente de cura foi então adicionado manualmente seguido de agitação em banho de ultrassons durante 5 minutos. A mistura foi vertida para uma caixa de petri e deixou-se evaporar o solvente durante a noite. O compósito foi curado a 100 °C durante 45 minutos.

### **Procedimento B:**

Preparou-se uma suspensão MWCNTs em tolueno e uma solução de tolueno e PDMS, misturou-se a suspensão com a solução e agitou-se magneticamente (240 e 360 rpm) durante 2 h. A suspensão foi colocada num prato quente à temperatura de 50°C por 2h para evaporação do tolueno. Evaporado o solvente, adicionou-se o agente de cura, misturou-se manualmente por 10 minutos. O compósito ficou em repouso para evaporação do solvente excedente e extração das bolhas de ar contidas no seu interior. A cura deu-se à temperatura de 100 °C durante 45 minutos.

Após a cura os compósitos foram cortados em quadrados de 1x1 cm<sup>2</sup>, com espessura de aproximadamente 1 mm para medição da resistividade elétrica e observação da morfologia.

## **2.3 Transferência de florestas de VA-CNTs para substratos de PDMS**

Foi realizada a transferência das florestas de VA-CNTs produzidas por TCVD para um substrato de PDMS. Sobre o substrato de PDMS, produzido anteriormente, depositou-se um filme adesivo compósito de PDMS/MWCNTs através da técnica de *spin-coating*. O substrato de PDMS foi colocado no prato giratório do equipamento de *spin-coating*, colocou-se compósito na superfície do substrato e fez-se girar o prato a uma velocidade de 4000 rpm durante 30 seg. Na Figura 14 está esquematizado o processo da deposição do filme pelo método de *spin-coating*.



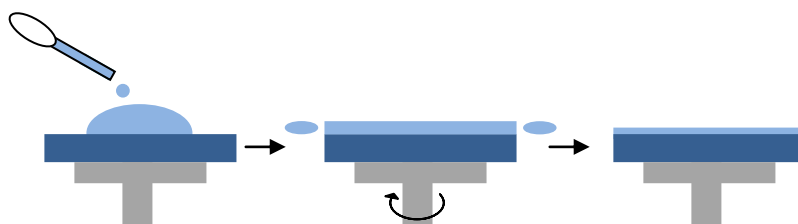


Figura 14 – Esquema representativo da deposição do filme composto PDMS/CNTs pelo método de *spin-coating*.

Seguidamente, foi invertida uma floresta de VA-CNTs e exerceu-se pressão. O filme foi curado numa placa à temperatura de 120 °C, durante 5 min. Após a cura, a bolacha de Si que servia de substrato à floresta de VA-CNTs foi removida, Figura 15.

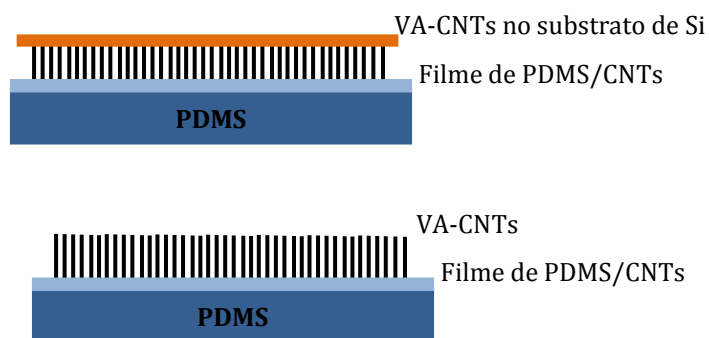


Figura 15 – Ilustração representativa da transferência das florestas de VA-CNTs para a superfície do filme adesivo de PDMS/CNTs. A primeira imagem mostra as florestas de VA-CNTs ainda com a bolacha de Si que serviu de substrato ao seu crescimento; a segunda representa a plataforma já pronta para transformar posteriormente os VA-CNTs em nanotubos horizontalmente alinhados (HA-CNTs, do inglês *horizontally aligned*

## 2.4 Transformação dos VA-CNTs em HA-CNTs

Após a transferência das florestas de VA-CNTs para os substratos de PDMS, estes foram colocados num dispositivo construído especialmente para proceder à transformação dos VA-CNTs em HA-CNTs. O equipamento, representado na Figura 16, é constituído por uma mesa com movimento sobre os eixos x e y, por um cilindro e por um sistema de braços que exerce uma força sobre esse cilindro de modo a fazê-lo rodar sobre os nanotubos. O substrato é movido no sentido contrário ao sistema de braços fazendo com que o cilindro rode em torno de um eixo, Figura 17. A força aplicada sobre o cilindro é exercida por uma mola que pode ser mais ou menos comprimida através do seu suporte que tem movimento em z.

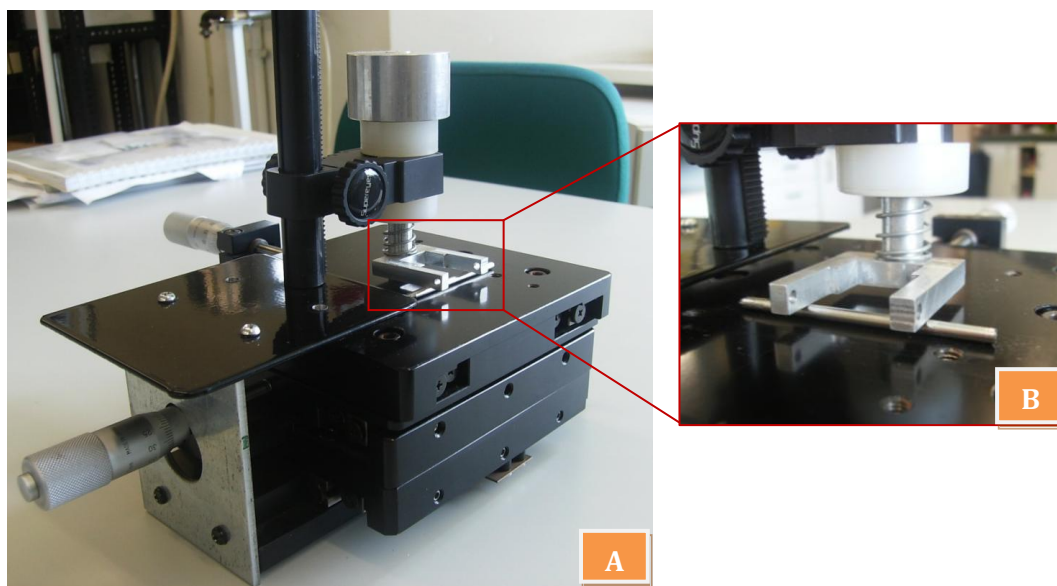


Figura 16 – Ilustração do equipamento construído para transformar os VA-CNTs em HA-CNTs. A figura A mostra o equipamento numa visão geral e a figura B mostra, a pormenor, o rolamento mecânico que permite a transformação.

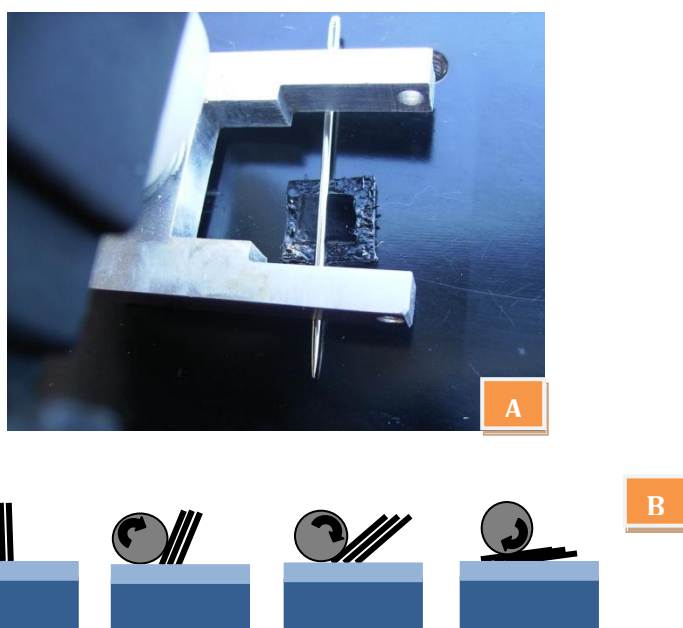


Figura 17 – Fotografia (A) e esquema representativo (B) da transformação dos VA-CNTs em HA-CNTs pelo rolamento mecânico construído.

### 3 Caracterização dos materiais

Para analisar a morfologia do catalisador para o crescimento dos CNTs, as florestas de VA-CNTs e a dispersão dos MWCNTs nos compósitos de PDMS, recorreu-se à microscopia eletrónica de varrimento (SEM, do inglês *scanning electron microscopy*) através do microscópio Hitachi SU-70 (com resolução de 1 nm a 15 kV).

A eficácia dos métodos de purificação e funcionalização, bem como as alterações estruturais dos CNTs durante estes processos, foram avaliadas através da análise termogravimétrica, espectroscopia de Raman e espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (FTIR, do inglês *Fourier transform infrared spectroscopy*).

O TGA (SETSYS Setaram) é utilizado para avaliar quantitativamente a qualidade dos CNTs, em particular, o conteúdo de impurezas. Neste método de caracterização, os CNTs foram queimados numa atmosfera reativa de O<sub>2</sub>. A elevada temperatura de oxidação, superior a 550 °C, está associada a CNTs mais puros e com menos defeitos estruturais. A homogeneidade das amostras é avaliada por desvios da temperatura de oxidação observáveis nas curvas de TGA de diferentes CNTs.

O FTIR fornece informação sobre as ligações químicas num material. Baseia-se no facto das ligações químicas possuírem frequências de vibração específicas, as quais correspondem a níveis de energia definidos. O material, ao ser atravessado por um feixe de luz infravermelha com a mesma energia de uma dessas vibrações, vai absorver essa luz e sofrer uma modificação no seu momento dipolar. A partir desta informação obtém-se o espectro de absorção ou transmissão que mostra o comprimento de onda do infravermelho a que o material absorve radiação, podendo-se então interpretar o tipo de ligações químicas presentes. Para observar a presença de grupos funcionais na superfície dos nanotubos de carbono realizou-se espectroscopia de FTIR, (Bruker modelo 27, 4cm<sup>-1</sup> e 256 *scans*) com acessório de ATR (*Attenuated total reflection*, Golden Gate).

A espectroscopia de Raman é uma técnica de análise de materiais rápida e não destrutiva. Todos os tipos de materiais grafiticos exibem uma forte banda de Raman que aparece no intervalo 2500-2800 cm<sup>-1</sup> (banda G') [71]. A espectroscopia de Raman característica dos nanotubos de carbono exhibe as bandas D (~1350 cm<sup>-1</sup>) e G (1500-1600 cm<sup>-1</sup>). A banda G corresponde à estrutura cristalina e a banda D a desordens estruturais resultantes de carbono amorfo e outros defeitos. Idêntica à banda D, a banda D' é induzida por desordens e defeitos nos CNTs. A razão entre a intensidade da banda D e G (I<sub>D</sub>/I<sub>G</sub>) pode ser usada para avaliar a densidade de defeitos estruturais nas paredes dos nanotubos de carbono [72-75]. Neste trabalho recorreu-se à espectroscopia de micro-Raman a 532 nm

(Jobin Yvon T64000), os espectros Raman foram adquiridos à temperatura ambiente com comprimentos de onda entre 1000 e 3000  $\text{cm}^{-1}$ .

A resistividade elétrica é uma importante característica dos materiais, uma vez que permite classificar um material quanto à sua natureza elétrica em condutor, semicondutor ou isolante elétrico. A medição da resistividade elétricas dos compósitos realizou-se usando duas pontas de contacto e um equipamento de aquisição de dados de alta velocidade de 16bits (DaqPad-6015) da National Instruments, Figura 18.

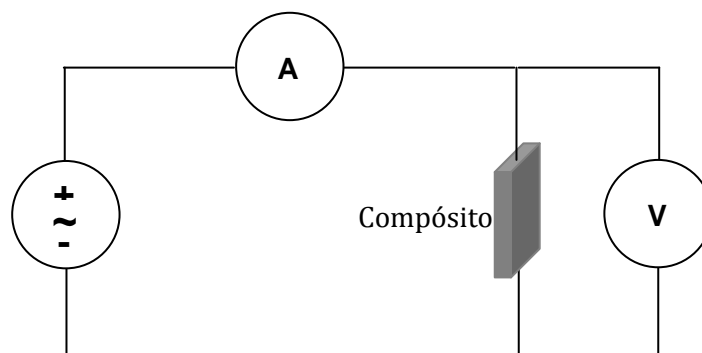


Figura 18 – Esquema representativo da medição da resistividade elétrica dos compósitos.





## Capítulo III – Resultados e Discussão





## 1 Produção de nanotubos de carbono

### 1.1 Preparação do substrato para o crescimento dos CNTs

Através da técnica de pulverização catódica foi possível revestir as bolachas de Si/SiO<sub>2</sub> com um filme de Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> e de Fe com espessuras, avaliadas por trabalhos preliminares do grupo, de 10 e 1 nm, respetivamente. A Figura 19 mostra uma bolacha de Si/SiO<sub>2</sub> antes e após ser revestida com o filme de Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> sobreposto pelo filme de Fe. O revestimento é uniforme com muito baixa rugosidade, cobrindo a totalidade da superfície.

Como já referido anteriormente, a barreira de difusão de Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> evita o contacto e difusão entre o filme de Fe e o filme de SiO<sub>2</sub> e o substrato de Si, evitando a formação de partículas estáveis de FeSi<sub>2</sub> e Fe<sub>2</sub>SiO<sub>4</sub>, preservando, assim, as partículas catalisadoras para o crescimento dos VA-CNTs. Outro contributo da barreira de difusão é a prevenção da agregação das partículas de Fe à superfície do substrato, através da fixação das nanopartículas durante os processos do TCVD.

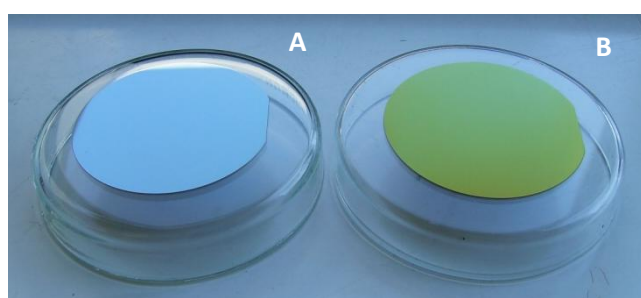


Figura 19 – Substrato de Si/SiO<sub>2</sub> antes (A) e após (B) deposição de filme de Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> e Fe.

### 1.2 Deposição de florestas de VA-CNTs

Para que possam ocorrer os processos de nucleação e crescimento dos VA-CNTs é necessário quebrar o filme de Fe em nanopartículas, Figura 20. As alterações na morfologia da superfície do catalisador, pelas etapas de pré-tratamento antes do crescimento de VA-CNTs foram avaliadas por SEM. São detetáveis alterações na morfologia da superfície do filme de Fe após o pré-tratamento, Figura 21, e verifica-se a formação de nanopartículas de Fe com tamanho médio de, aproximadamente, 20 nm. Esta formação de nanopartículas deve-se à ação da temperatura e do H<sub>2</sub> sobre o filme de Fe durante a etapa de pré-tratamento. O H<sub>2</sub> tem

um papel fundamental de reduzir as partículas de Fe oxidadas de modo a se tornarem cataliticamente ativas no crescimento de VA-CNTs. O efeito redutor deve ser fraco para preservar o oxigênio interfacial da interface  $\text{Al}_2\text{O}_3/\text{Fe}$  e evitar o crescimento excessivo das partículas de ferro, e ao mesmo tempo deve ser forte o suficiente para quebrar o filme de Fe.

Como já referido anteriormente, a formação de nanopartículas de Fe é um contributo de grande importância uma vez que servem de catalisador ao crescimento das florestas de VA-CNTs. A Figura 22 mostra uma floresta de nanotubos de carbono verticalmente alinhados, observada com diferentes ampliações, crescida de acordo com as condições referidas na Tabela IV. A floresta de VA-CNTs apresenta-se densa, homogênea e uniforme na sua espessura, de aproximadamente, 100  $\mu\text{m}$  (Figura 22B). A Figura 22A ilustra a dimensão macroscópica desta floresta.

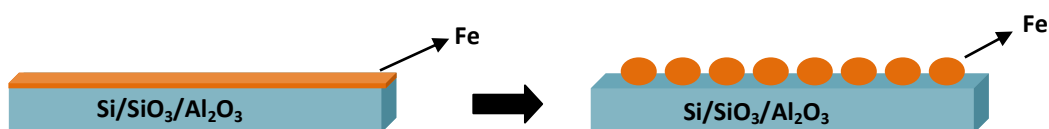


Figura 20 – Ilustração representativa do efeito do pré-tratamento do filme de Fe.

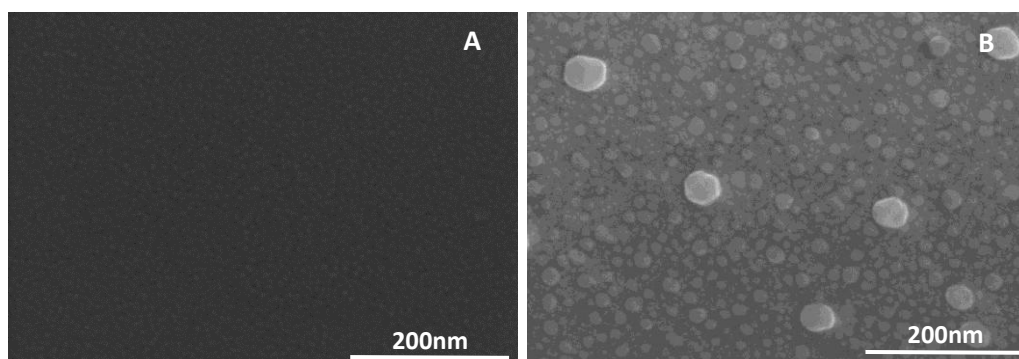


Figura 21 – Micrografia SEM da morfologia da superfície do catalisador (Fe) antes (A) e após (B) etapa de pré-tratamento.

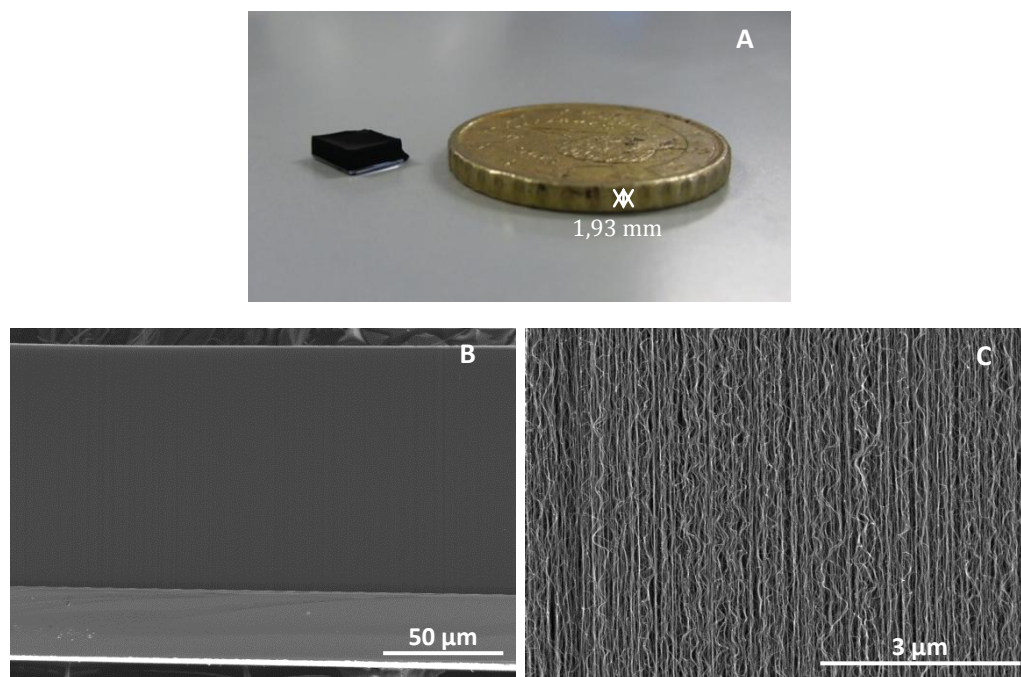


Figura 22 – Fotografia (A) e micrografias SEM (B e C) de florestas de VA-CNTs.

### 1.3 Tratamento térmico das florestas de VA-CNTs

Para avaliar qualitativamente a cristalinidade das florestas de VA-CNTs recorreu-se à análise dos seus espectros Raman, Figura 23. A Tabela V apresenta as características dos espectros Raman das diferentes florestas. Na Figura 23 os nanotubos sem tratamento térmico apresentam um espectro Raman com uma maior intensidade na banda D quando comparados com os nanotubos que sofreram tratamento térmico o que confirma a eliminação de defeitos e impurezas nestes. Comparando os VA-CNTs com tratamentos térmicos, observa-se que o espectro da floresta com tratamento térmico de 30 minutos apresenta menor intensidade da banda D, podendo-se dizer que é o que apresenta menor quantidade de defeitos e impurezas. A intensidade da banda 2D também confirma o aumento de pureza nos VA-CNTs com tratamento térmico. A principal diferença entre os espectros dos VA-CNTs com tratamento térmico reside no valor da razão entre a intensidade da banda D e G ( $I_D/I_G$ ), Tabela V, usada para medir a natureza gráfica dos CNTs. Esta razão é menor para o tratamento com duração de 30 minutos e maior para os VA-CNTs sem tratamento, com valores de 0,60 e 1,42, respetivamente. Estas evidências mostram que o tratamento térmico melhorou a pureza e cristalinidade das florestas de VA-CNTs. O tamanho de cristalite ( $L_a$ ), calculado pela Equação 1 [71] suporta essas evidências. A Tabela V apresenta o tamanho das cristalites para cada floresta de VA-CNTs mostrando que a floresta que não sofreu tratamento térmico apresenta

menor tamanho de cristalite e as florestas com tratamento térmico de 10, 30 e 60 minutos apresentam valores de aproximadamente 27, 33 e 26 nm, respectivamente.

Com estas evidências pode-se concluir que o tratamento térmico com duração de 30 minutos foi o que produziu resultados mais satisfatórios quanto à eliminação de impurezas de carbono amorfo e aumento da cristalinidade dos nanotubos de carbono.

$$L_a = (2,4 \times 10^{-10}) \lambda_{laser}^4 \left(\frac{I_D}{I_G}\right)^{-1} \quad (\text{Eq. 1})$$

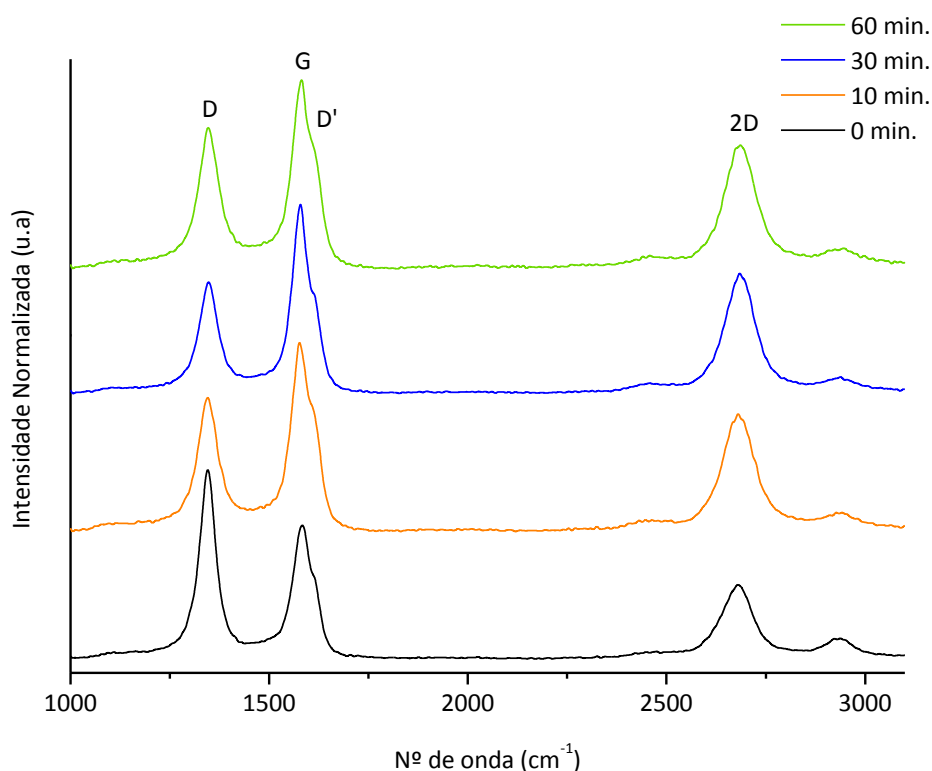


Figura 23- Espectros Raman de florestas de VA-CNTs com diferentes tempos de tratamento térmico.

Tabela V – Parâmetros dos espectros Raman das diferentes florestas de VA-CNTs.

Tratamento térmico	Posição bandas (cm <sup>-1</sup> )				I <sub>D</sub> /I <sub>G</sub>	L <sub>a</sub> (nm)
	D	G	D'	2D		
0 min.	1345	1583	1611	2679	1,42	13,59
10 min.	1345	1576	1607	2680	0,71	27,15
30 min.	1346	1578	1612	2684	0,60	32,62
60 min.	1347	1581	1613	2685	0,75	25,73

A análise termogravimétrica em atmosfera de  $O_2$  foi usada para determinar a gama de temperaturas de oxidação das florestas de VA-CNTs, Figura 24. A oxidação das florestas de VA-CNTs tem início a aproximadamente  $550\text{ }^\circ\text{C}$ , indicador que os nanotubos não foram significativamente danificados pelo processo de tratamento térmico. A floresta que não sofreu tratamento térmico apresenta início de perda de peso a cerca de  $260\text{ }^\circ\text{C}$  correspondente ao início da oxidação do carbono amorfo. A máxima perda de peso para o tratamento de 0, 10, 30 e 60 minutos ocorre a  $680, 708, 710$  e  $683\text{ }^\circ\text{C}$ , respetivamente. Os nanotubos com tratamento térmico de 30 minutos apresentam máxima perda de massa para uma temperatura maior, mostrando-se por isso termicamente mais estáveis.

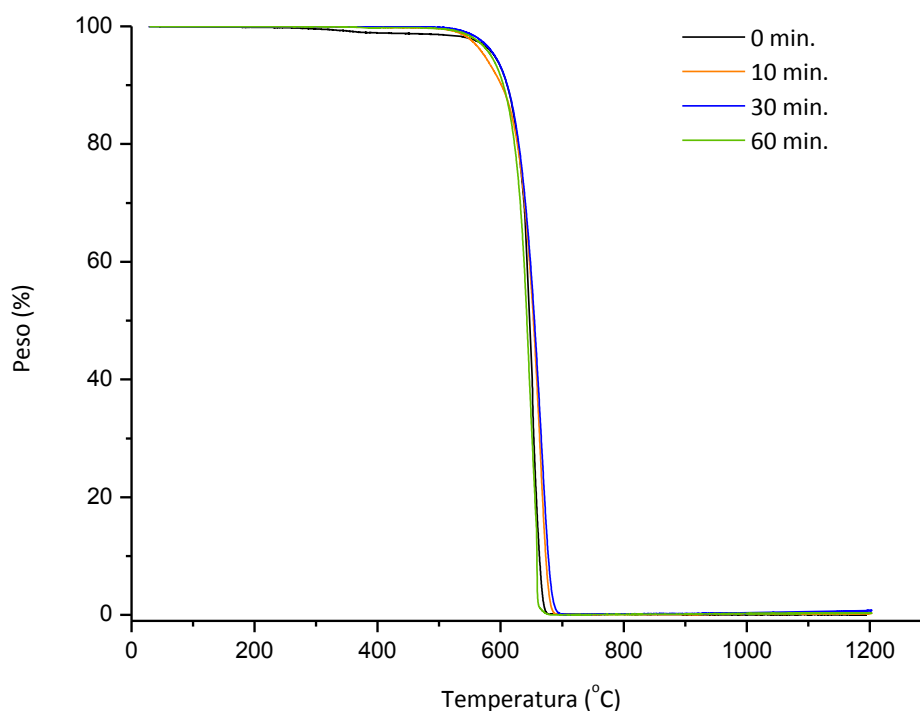


Figura 24 – Curvas de TGA de florestas de VA-CNTs submetidas a diferentes tempos de tratamentos térmicos para purificação.

## 2 Produção das plataformas compósitas

### 2.1 Purificação e Funcionalização dos MWCNTs

A Figura 25 mostra o espectro de FTIR dos MWCNTs comerciais, purificados e com dois tratamentos de funcionalização diferentes. No espectro de FTIR está presente uma banda a  $3444 - 3465 \text{ cm}^{-1}$ , que é atribuída aos grupos hidroxilo (-OH) na superfície dos nanotubos formados durante o processo de funcionalização ou pela presença de água adsorvida à superfície dos nanotubos. Observam-se também nos espectros os picos entre  $2850$  e  $2970 \text{ cm}^{-1}$  que estão relacionados com as vibrações simétricas e assimétricas das ligações C-H e o pico  $1633 \text{ cm}^{-1}$  atribuído à dupla ligação C=C dos MWCNTs [76]. Os espectros relativos a pf1-MWCNTs e pf2-MWCNTs apresentam o pico a  $1706 \text{ cm}^{-1}$  e  $1705 \text{ cm}^{-1}$ , respectivamente, correspondente às vibrações do alongamento do -C=O dos grupos carboxílicos. A presença dos grupos carboxílicos também pode ser confirmada pelo pico  $1384 \text{ cm}^{-1}$ , associados à deformação por flexão das terminações -OH do ácido carboxílico [76]. Os MWCNTs funcionalizados apresentam ainda picos a  $1554$  e  $1556 \text{ cm}^{-1}$  os quais identificam as ligações N=O provenientes do  $\text{HNO}_3$  utilizado no processo de funcionalização.

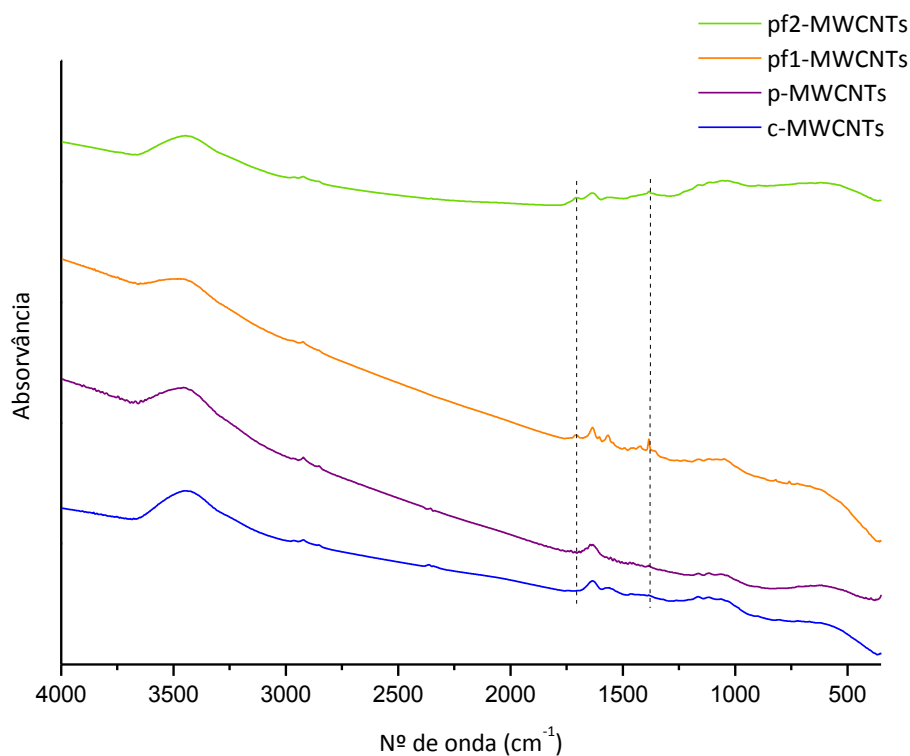


Figura 25 - Espectro de FTIR dos MWCNTs comerciais (c-MWCNTs), purificados (p-MWCNTs), funcionalizados pelo tratamento 1 (pf1-MWCNTs) e pelo tratamento 2 (pf2-MWCNTs).

Na Figura 26 estão representados os espectros Raman para os diferentes MWCNTs e a Tabela VI apresenta as características de cada espectro. Os MWCNTs exibem a banda D na ordem dos  $\sim 1350\text{ cm}^{-1}$ , banda G a  $1581$  e  $1576\text{ cm}^{-1}$  e um ligeiro pico entre  $1603$  e  $1615\text{ cm}^{-1}$  correspondente à banda D'. Os espectros apresentam também o pico 2D entre  $2687$  e  $2692\text{ cm}^{-1}$ . A principal diferença entre estes espectros reside no valor da razão entre a intensidade da banda D e G ( $I_D/I_G$ ), usada para medir a natureza gráfica dos CNTs. Para os c-MWCNTs o valor desta razão é de  $0,94$ , maior que o dos p-MWCNTs que é de  $0,48$ . Quanto aos espectros dos nanotubos funcionalizados, observa-se uma diminuição da intensidade das bandas G e um aumento da intensidade da banda D e D', do espectro dos pf2-MWCNTs relativamente ao espectro dos pf1-MWCNTs, e conseqüente aumento do valor de  $I_D/I_G$  de  $0,53$  para  $1,44$ . A diminuição da razão  $I_D/I_G$ , quando os MWCNTs são purificados, resulta da remoção de impurezas dos MWCNTs e o aumento do seu valor resulta da indução de defeitos estruturais na parede dos MWCNTs durante a funcionalização com grupos carboxilos. A banda 2D também é indicadora de defeitos e como tal pode-se observar que a intensidade da banda 2D aumenta quando os nanotubos são purificados e diminui quando os nanotubos são funcionalizados.

Conclui-se que a purificação melhorou a ordem estrutural e a pureza dos MWCNTs, facto confirmado também pelo aumento do tamanho de cristalite (Tabela VI -  $L_a$ ). Por sua vez a funcionalização dos nanotubos pelo tratamento 1 (pf1-MWCNTS) não danificou significativamente a estrutura dos nanotubos quando comparada com os pf2-MWCNTs. Infere-se então, pelas características dos espectros de Raman, que o método de funcionalização mais eficiente foi o tratamento 1 uma vez que os pf1-MWCNTs não sofreram alterações significativas na sua estrutura cristalográfica e possuem grupos funcionais carboxilos.

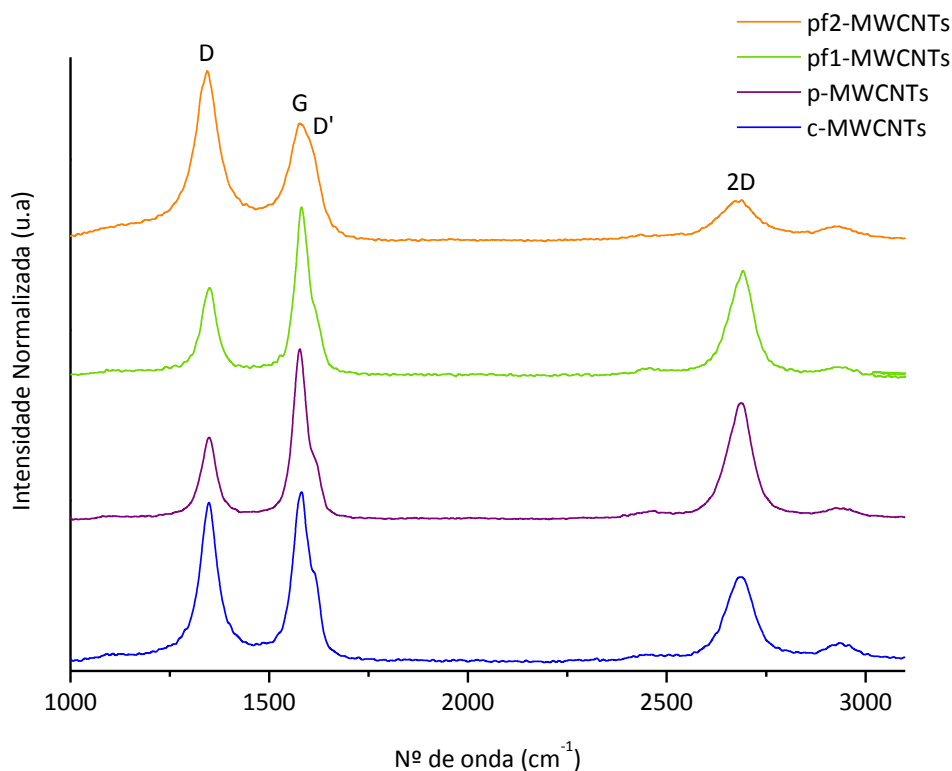


Figura 26 – Espectroscopia de Raman dos diferentes MWCNTs.

Tabela VI - Parâmetros dos espectros Raman dos diferentes MWCNTs.

MWCNTs	Posição bandas (cm <sup>-1</sup> )				I <sub>D</sub> /I <sub>G</sub>	L <sub>a</sub> (nm)
	D	G	D'	2D		
c-MWCNTs	1348	1581	1611	2687	0,94	20,49
p-MWCNTs	1348	1576	1615	2687	0,48	39,87
pf1-MWCNTs	1350	1581	1611	2692	0,53	36,53
pf2-MWCNTs	1343	1576	1603	2688	1,44	13,35

A Figura 27 apresenta o TGA dos MWCNTs comerciais e com os diferentes tratamentos. Os p-MWCNTs são mais estáveis comparativamente aos c-MWCNTs, observando-se uma temperatura inicial de oxidação de aproximadamente 560 °C para os p-MWCNTs e 400 °C para os c-MWCNTs, com perdas de peso até estas temperaturas de ~0,5% e 2%, respetivamente. Estas perdas de peso inicial correspondem à oxidação de carbono amorfo que possa estar presente na superfície dos MWCNTs. Claramente, como os p-MWCNTs foram purificados para eliminação de impurezas esta perda de peso inicial é menor que para os c-MWCNTs e, como são mais estáveis, são menos suscetíveis a oxidação a baixas temperaturas



(< 540 °C). Quanto aos nanotubos funcionalizados pelo tratamento com ácido nítrico (pf1-MWCNTs), apresentam temperatura inicial de oxidação a ~500 °C e uma perda de peso aproximada a 3% até essa temperatura. Os pf2-MWCNTs apresentam temperatura inicial de oxidação ~500 °C, mas maior perda de peso até esta temperatura ~14%. Isto deve-se ao facto do tratamento com solução de ácidos ser mais agressivo, provocando maior quantidade de defeitos estruturais nas paredes dos MWCNTs tornando-os mais suscetíveis à oxidação devido ao maior número de sítios ativos nas suas paredes, Figura 28 [77].

A estabilidade térmica dos nanotubos não foi significativamente alterada quando funcionalizados pelo tratamento 1, reforçando os resultados relativos à conservação da sua pureza e estrutura obtidos pels espectro Raman.

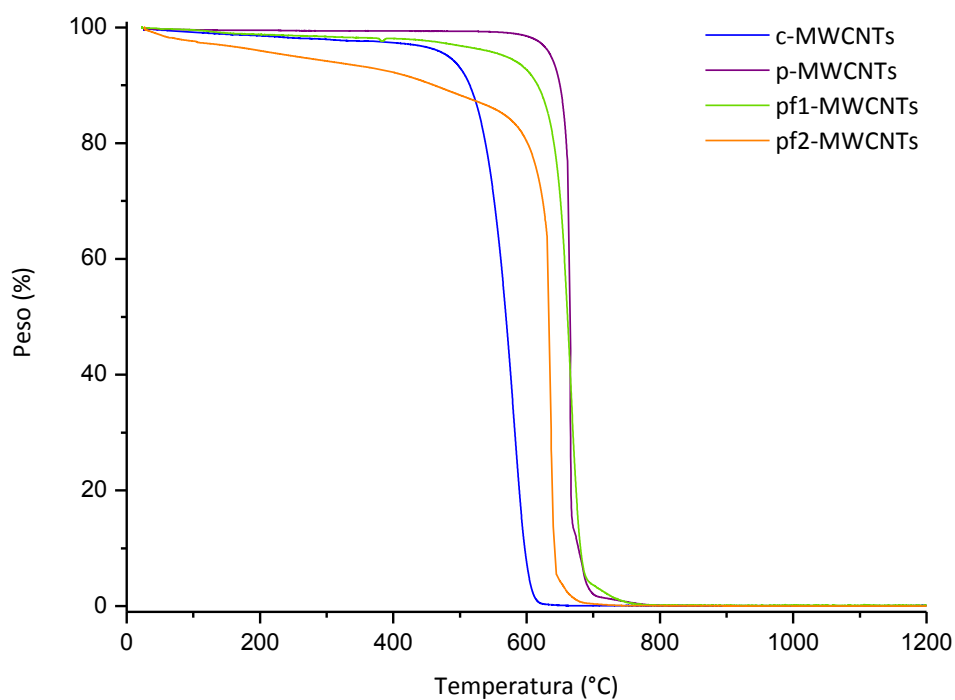


Figura 27 – Curvas TGA dos MWCNTs comerciais (c-MWCNTs), purificados (p-MWCNTs), funcionalizados pelo tratamento em  $\text{HNO}_3$  (pf1-MWCNTs) e pela solução de  $\text{HNO}_3$  e  $\text{H}_2\text{SO}_4$  (pf2-MWCNTs)

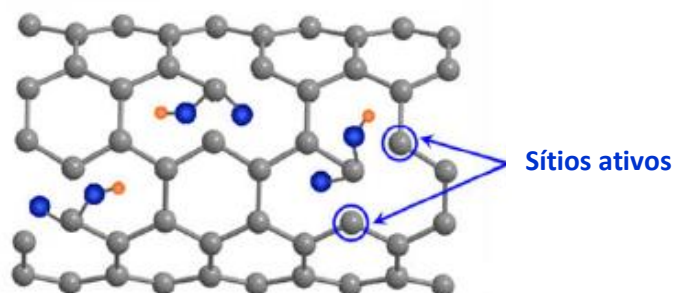


Figura 28 – A funcionalização dos nanotubos com grupos carboxilos provoca a quebra de ligações  $\pi$  e danos colaterais na estrutura dos CNTs, através da criação de sítios ativos que proporcionam pontos de ataque para posterior degradação oxidativa, levando ao encurtamento e desenredamento dos tubos (retirada de [77]).

Pelos resultados obtidos conclui-se que o melhor método de funcionalização é atribuído à funcionalização 1, mostrando-se capaz de funcionalizar os p-MWCNTs com grupos carboxilos sem alterar significativamente a sua estrutura.

## 2.2 Produção do compósito PDMS/MWCNTs

A Figura 29 apresenta macrografias dos compósitos PDMS/MWCNTs produzidos pelos diferentes procedimentos. Os compósitos foram produzidos com nanotubos comerciais (c-MWCNTs), nanotubos purificados (p-MWCNTs) e nanotubos funcionalizados através do tratamento 1 (pf1-MWCNTs) e funcionalizados através do tratamento 2 (pf2-MWCNTs).

Através das fotografias da Figura 29, observa-se que os compósitos produzidos com c-MWCNTs pelo procedimento A apresentam uma superfície mais rugosa comparativamente àqueles produzidos com p-MWCNTs, pf1-MWCNTs e pf2-MWCNTs em que não se verificaram diferenças significativas na rugosidade e aspeto (a “olho nu”) dos compósitos. Isto pode ser explicado pelo facto dos c-MWCNTs não serem purificados nem funcionalizados com grupos carboxilos. O aspeto rugoso poderá dever-se à presença de impurezas que quebram cadeias poliméricas e podem levar a reações de ligações cruzadas indesejadas [23].

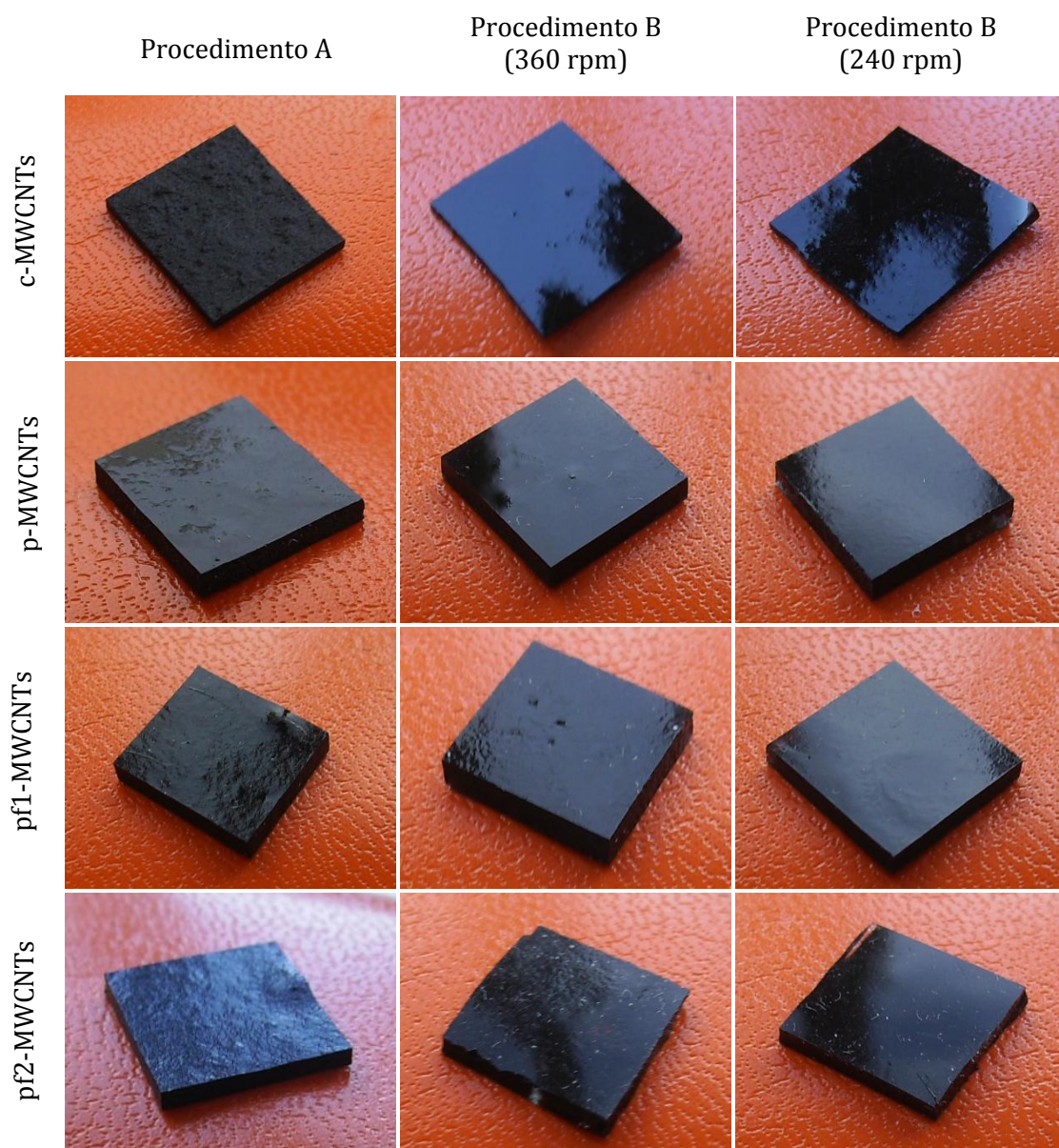


Figura 29 - Fotografia dos compósitos PDMS produzidos com 1% em peso de c-MWCNTs, p-MWCNTs, pf1-MWCNTs e pf2-MWCNTs.

As Figura 30, Figura 31 e Figura 32 mostram as micrografias de SEM do corte da seção transversal dos compósitos produzidos pelos procedimentos A e B com c-MWCNTs, p-MWCNTs, pf1-MWCNTs e pf2-MWCNTs. O procedimento A proporciona uma boa dispersão em todos os casos observados, sendo essa boa dispersão ainda mais acentuada nos PDMS/c-MWCNTs.

Observando a Figura 29 os compósitos produzidos pelo procedimento B apresentam melhor aspecto superficial que aqueles produzidos pelo procedimento A. Porém, a Figura 31

mostra que estes compósitos não apresentam uma dispersão tão uniforme, observando-se aglomerados de maiores dimensões.

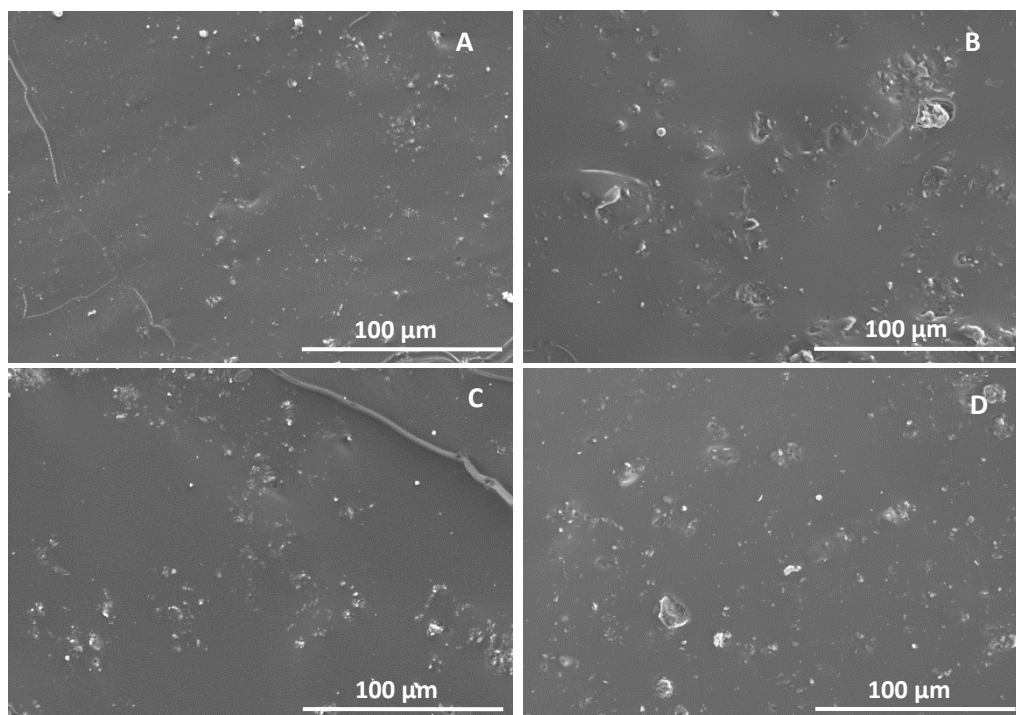


Figura 30 - Micrografias SEM do corte transversal dos compósitos produzidos pelo procedimento A com c-MWCNTs (A), p-MWCNTs (B), pf1-MWCNTs (C) e pf2-MWCNTs (D).

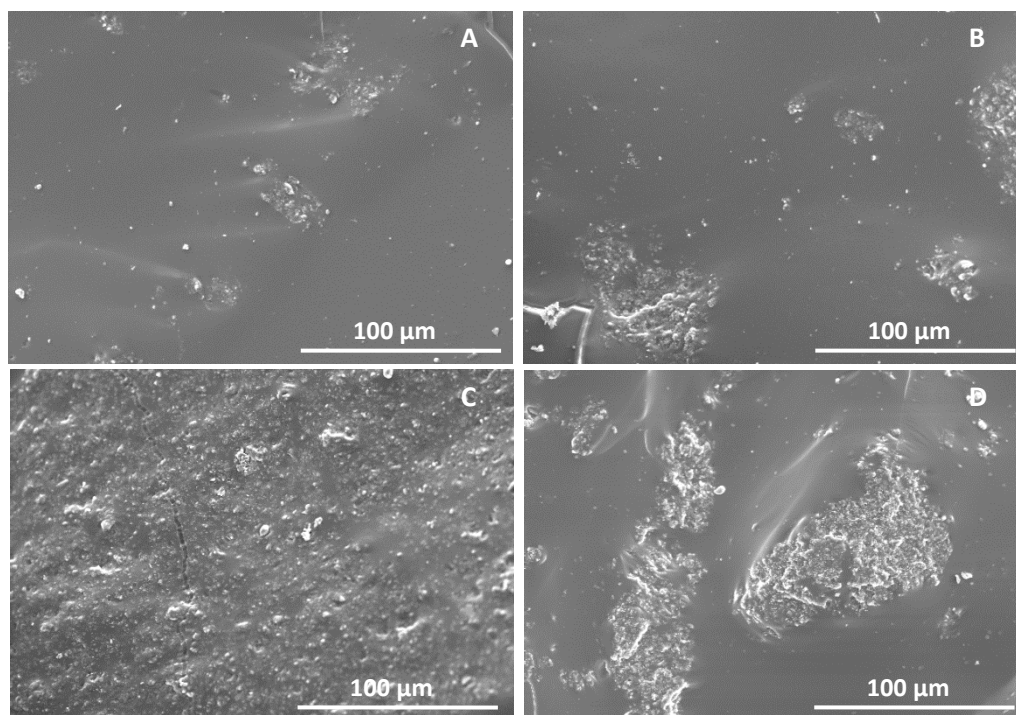


Figura 31 - Micrografias SEM do corte transversal dos compósitos produzidos pelo procedimento B com agitação magnética a 360 rpm com c-MWCNTs (A), p-MWCNTs (B) pf1-MWCNTs (C) e pf2-MWCNTs (D).

Pelo procedimento B com agitação magnética a 240 rpm, Figura 32, observa-se que os pf1 e pf2-MWCNTs aparentam estar mais distribuídos na matriz polimérica comparativamente com aqueles produzidos com maior velocidade de agitação.

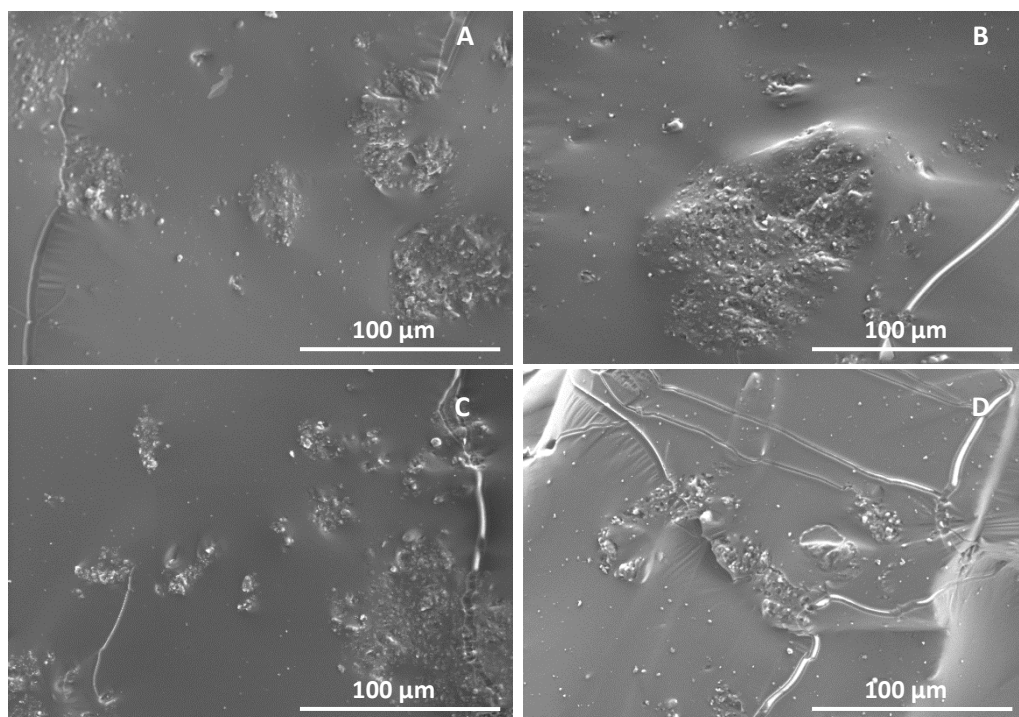


Figura 32 - Micrografias SEM do corte transversal dos compósitos produzidos pelo procedimento B com agitação magnética a 240 rpm com c-MWCNTs (A), p-MWCNTs (B) pf1-MWCNTs (C) e pf2-MWCNTs (D).

O procedimento A apresenta melhor dispersão dos MWCNTs na matriz polimérica. Ao contrário do que se esperava, os nanotubos funcionalizados tanto no procedimento A como no procedimento B não estão dispersos tão uniformemente no polímero, podendo ser explicado pela formação de aglomerados durante a secagem dos nanotubos após funcionalização. Na secagem em estufa as forças capilares compactam e mantêm os nanotubos unidos de forma quase irreversível, o que limita a sua capacidade de dispersão em matrizes poliméricas ou solventes. Estudos apontam que a técnica de liofilização é um bom método para contornar esse problema, permitindo a obtenção de um pó de CNTs sem aglomerados [78]. No processo de liofilização, os nanotubos são congelados em água, que é sublimada. Como resultado, o pó final é significativamente menos compacto e deste modo os nanotubos podem ser facilmente dispersos, sem aparentes agregados, aumentando substancialmente a sua capacidade de processamento, por exemplo, eles podem ser usados para fazer composições mais homogêneas [78].



A condutividade elétrica dos compósitos foi avaliada e os gráficos corrente *versus* tensão (I-V) dos diferentes compósitos produzidos estão representados nas Figura 33 e Figura 35, os quais permitem calcular a resistência elétrica ( $R$ ), medida em  $\Omega$ , e por sua vez, a resistividade elétrica ( $\rho$ ), medida em  $\Omega/m$ , através das seguintes equações:

$$V = R.I \Leftrightarrow R = \frac{V}{I} \quad (\text{Eq. 2})$$

$$\rho = \frac{A.R}{l} \quad (\text{Eq. 3})$$

Na Equação 2, o valor da resistência é dado pelo declive da reta I-V. Sabendo o valor da resistência do compósito, é possível calcular a respetiva resistividade elétrica ( $\rho$ ) através da Equação 3, onde  $R$  é a resistência,  $A$  a área e  $l$  a sua espessura. A condutividade elétrica é o inverso da resistividade, como tal, o seu valor para cada compósito é calculado através da Equação 4 e é medida em S/m:

$$\sigma = \frac{1}{\rho} \quad (\text{Eq. 4})$$

Pelo gráfico da Figura 33 observa-se claramente, através do declive da reta, que o valor da resistência elétrica é mais elevado para o compósito contendo pf2-MWCNTs, logo este apresenta menor condutividade elétrica. Os compósitos produzidos com a integração dos nanotubos tal e qual, isto é, sem qualquer tratamento (c-MWCNTs) apresentam claramente a maior condutividade elétrica. Os valores desta grandeza medida nos compósitos produzidos pelo procedimento A estão apresentados na Figura 34.

Nos compósitos produzidos pelo procedimento B, a resistência elétrica é maior para aqueles com p-MWCNTs que sofreram agitação magnética a 240 rpm, Figura 35. Os compósitos com nanotubos de carbono funcionalizados apresentam resistividades muito próximas, independentemente do processo de funcionalização, como se pode observar no gráfico da Figura 35.

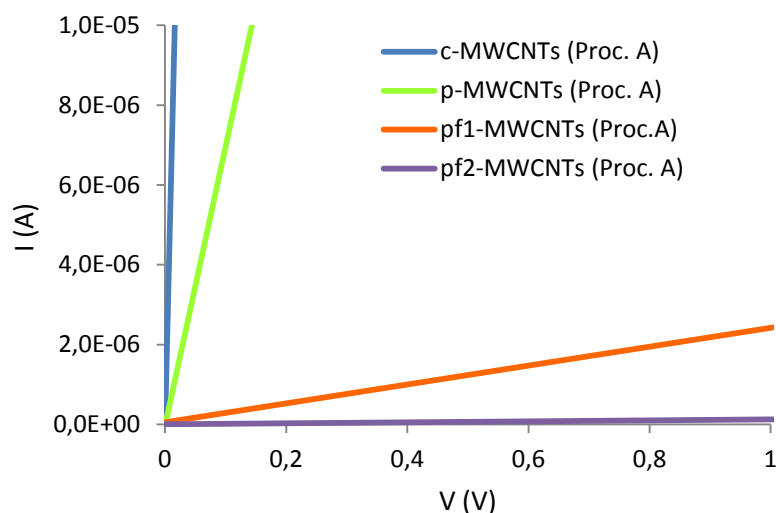


Figura 33 – Gráfico I-V dos compósitos PDMS produzidos pelo procedimento A com 1% em peso de MWCNTs comerciais (c-MWCNTs), purificados através de tratamento térmico (p-MWCNTs), funcionalizados pelo tratamento 1 (pf1-MWCNTs) e tratamento 2 (pf2-MWCNTs).

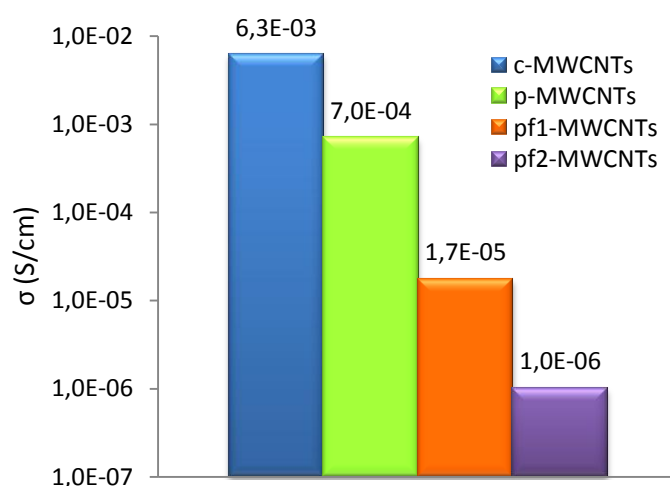


Figura 34 - Condutividade elétrica dos compósitos produzidos pelo procedimento A em função do tipo de MWCNTs.

A diminuição da condutividade de compósitos com nanotubos purificados também foi verificada por outros autores em que atribuem a purificação à diminuição da condutividade elétrica devido à eliminação de impurezas condutoras como por exemplo partículas metálicas catalisadoras do crescimento de CNTs [79]. Por outro lado a baixa condutividade dos compósitos com nanotubos funcionalizados pode ser explicada pelos defeitos estruturais induzidos pela funcionalização. Para que haja ligação do grupo carboxilo à parede dos nanotubos há necessidade de quebrar ligações C=C, alterando a estrutura dos CNTs logo, as

suas propriedades também são modificadas. Estes tratamentos também podem induzir quebras nos nanotubos de carbono. Estes como ficam com menor comprimento podem não conseguir criar pontos de contacto com os MWCNTs vizinhos não sendo possível condução elétrica [33].

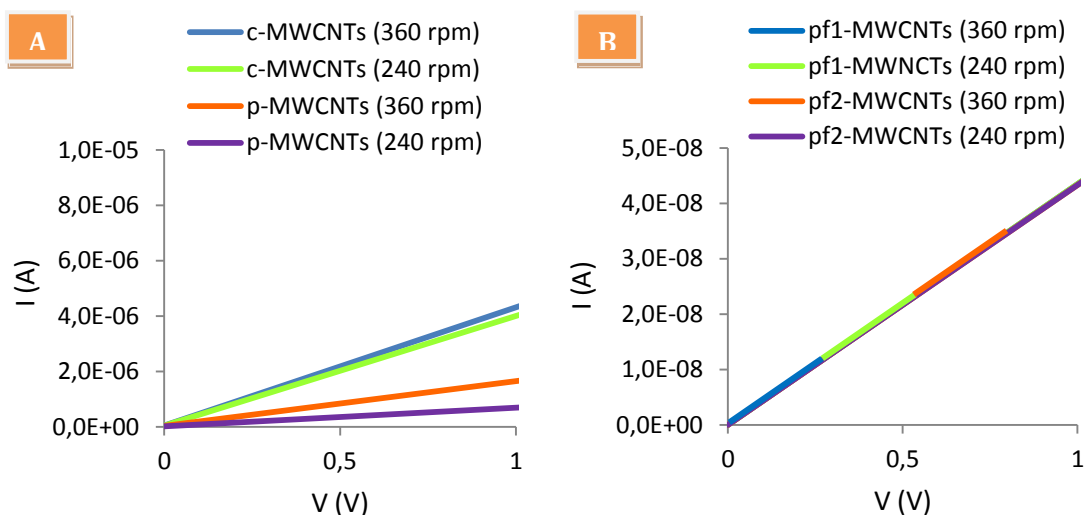


Figura 35 - Gráficos I-V dos compósitos PDMS/CNTs produzidos pelo procedimento B: (A) - MWCNTs comerciais (c-MWCNTs) e purificados (p-MWCNTs); e (B) - funcionalizados pf1-MWCNTs e pf2-MWCNTs.

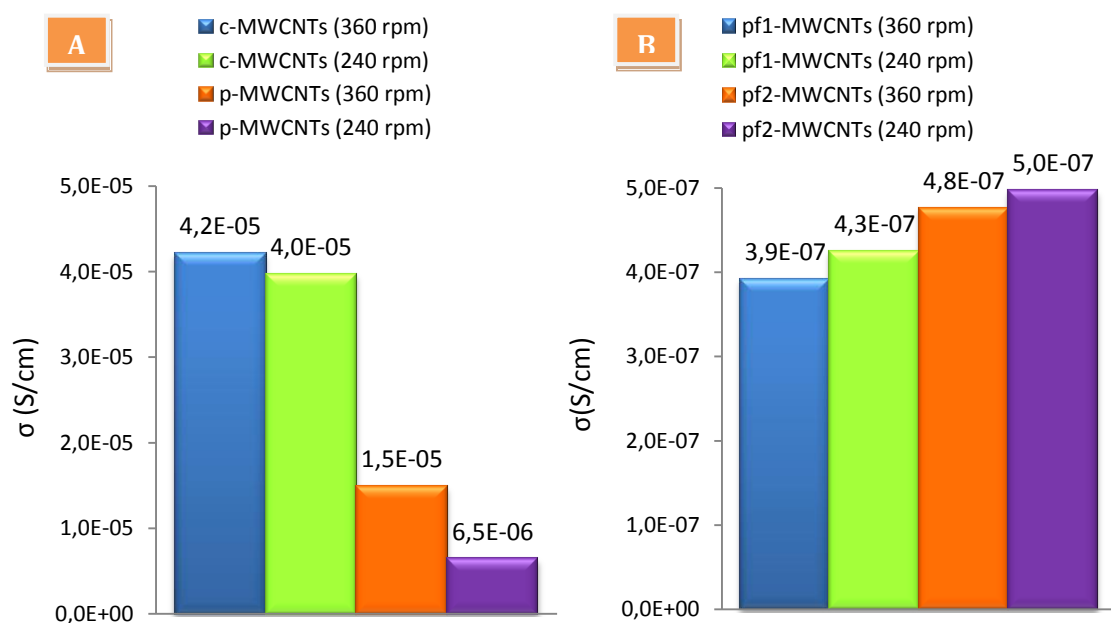


Figura 36 - Condutividade elétrica dos compósitos produzidos pelo procedimento B em função do tipo de MWCNTs (A) - MWCNTs comerciais (c-MWCNTs) e purificados (p-MWCNTs); e (B) - funcionalizados pf1-MWCNTs e pf2-MWCNTs.



Comparando os gráficos I-V dos dois procedimentos conclui-se que os compósitos produzidos pelo procedimento B são mais resistivos, isto é, oferecem mais resistência à passagem de corrente, do que os compósitos produzidos pelo procedimento A. Em suma, o procedimento A oferece a dispersão mais uniforme dos nanotubos na matriz de PDMS e conseqüentemente maior condutividade elétrica, sendo o maior valor atribuído ao compósito PDMS/c-MWCNTs.

Apesar dos compósitos PDMS/c-MWCNTs serem os melhores em termos de condutividade, não são os melhores para a aplicação pretendida devido às impurezas que provocam morte celular. Neste caso terá que existir um compromisso entre biosegurança e condutividade. Este compromisso pode ser alcançado através da purificação e funcionalização dos nanotubos de carbono. Neste sentido, o compósito mais adequado, apesar de menos condutivo para a aplicação em culturas celulares, é o PDMS/pf1-MWCNTs que contém nanotubos purificados e funcionalizados com grupos carboxilos sem ter sido alterar significativamente a sua estrutura.

### **2.3 Transformação dos VA-CNTs em HA-CNTs**

Após a escolha do compósito que reúne as melhores características (PDMS/pf1-MWCNTs) procedeu-se à transferência de VA-CNTs de acordo com o procedimento descrito na secção 2.4 do Capítulo II. Como foi referido, esta configuração não é favorável como substrato para a cultura celular, sendo necessário a sua transformação em HA-CNTs. No processo de transformação de VA-CNTs em HA-CNTs por rolamento mecânico, o cilindro roda sobre os nanotubos através do movimento do substrato e a força vertical aplicada no sistema de braços sobre o cilindro. Na Figura 37 observam-se as micrografias SEM do antes e depois da transformação dos VA-CNTs em HA-CNTs. Na Figura 37B observa-se que os HA-CNTs ficaram alinhados na horizontal, contudo apresentam uma ondulação na extremidade. Este fenómeno pode ser atribuído ao diâmetro do cilindro. Segundo Tawfick *et al.* [80], cilindros com grandes diâmetros tendem a causar corte e encurvamento dos VA-CNTs. Para minimizar este efeito e criar um filme de HA-CNTs com textura uniforme é necessário utilizar um cilindro com diâmetro inferior à altura dos VA-CNTs e o comprimento das florestas deve ser substancialmente inferior à sua altura. A Figura 38 apresenta uma fotografia da plataforma compósita PDMS/CNTs.

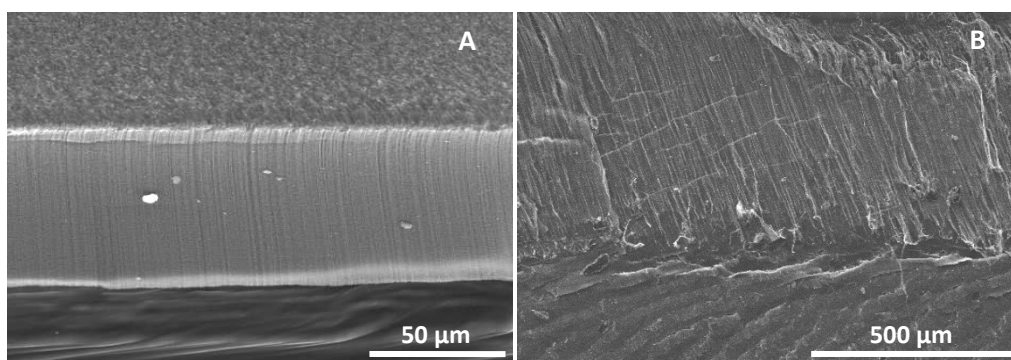


Figura 37 – Micrografias SEM de floresta de VA-CNTs transferidas para substrato de PDMS (A) e HA-CNTs após procedimento por rolamento mecânico (B).



Figura 38 – Plataforma compósita PDMS/CNTs com HA-CNTs.





# Conclusões

---



---

O presente trabalho teve como objetivo a produção de plataformas de PDMS/CNTs para a estimulação elétrica de células pluripotentes induzidas de modo a se diferenciarem em células neuronais. Estas plataformas são constituídas por três camadas: (1) base de PDMS na qual se deposita por *spin-coating* (2) um filme compósito PDMS/MWCNTs, para a qual se transferiu (3) uma floresta de VA-CNTs posteriormente deitada por rolamento mecânico para a orientação horizontal, HA-CNTs.

Para a produção de VA-CNTs utilizou-se o método de deposição química em fase vapor num reator de paredes quentes (TCVD), usando substratos de Si/SiO<sub>2</sub> revestidos por um filme de Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> sobreposto por um filme catalisador de Fe e C<sub>2</sub>H<sub>2</sub> como fonte de carbono. Após o crescimento, os VA-CNTs sofreram um tratamento de purificação para eliminação de carbono amorfo e aumento da cristalinidade dos nanotubos de carbono. A duração deste tratamento foi otimizada em 30 minutos.

Para a produção de compósitos PDMS/MWCNTs procedeu-se à purificação, através de tratamento térmico a alta temperatura, e funcionalização de MWCNTs comerciais por dois tratamentos distintos: tratamento com HNO<sub>3</sub> (pf1-MWCNTs) e tratamento com solução de HNO<sub>3</sub> e H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (pf2-CNTs). Em ambos os casos, foi possível a funcionalização dos MWCNTs com grupos carboxilos. Contudo, a funcionalização dos MWCNTs pelo tratamento 1 induziu menor quantidade de defeitos estruturais e maior estabilidade térmica.

Os compósitos PDMS/MWCNTs foram produzidos recorrendo a dois procedimentos: o procedimento A, em que a dispersão dos nanotubos foi feita em banho de ultrassons e o procedimento B, em que se utilizou agitação magnética de 360 rpm e 240 rpm. A condutividade elétrica mostrou-se mais elevada para os compósitos produzidos pelo procedimento A. Os compósitos produzidos com c-MWCNTs são os que apresentam maior condutividade elétrica,  $6,3 \times 10^{-3}$  S/cm, seguidos dos compósitos com p-MWCNTs com valor de  $7 \times 10^{-4}$  S/cm. Os compósitos com pf1-MWCNTs e pf2-MWCNTs apresentam os menores valores de condutividade,  $1,7 \times 10^{-5}$  S/cm e  $1 \times 10^{-6}$  S/cm, respetivamente. A baixa condutividade do compósito PDMS/pf1-MWCNT e PDMS/pf2-MWCNTs pode ser explicada pela aglomeração dos MWCNTs durante a secagem e pelos defeitos estruturais induzidos pela funcionalização.

A opção escolhida para a fabricação de plataformas para a estimulação elétrica de células estaminais pluripotentes induzidas foi o PDMS/pf1-MWCNTs que contém nanotubos purificados e funcionalizados com grupos carboxilos sem ter sido alterada significativamente a sua estrutura permitindo um compromisso entre biosegurança e condutividade do compósito para uso em cultura celular.

## Conclusões

---

Como trabalho futuro, estas plataformas serão testadas para se proceder à estimulação elétrica de células mediada pelos compósitos PDMS/MWCNTs e pelas florestas de HA-CNTs.







## Referências

---



1. Iijima, S., *Helical microtubules of graphitic carbon*. Nature, 1991. **354**: p. 56-58.
2. Cao, G., *Nanostructures and Nanomaterials: Synthesis, Properties and Applications* 2004: Imperial College Press.
3. Foldvari, M. and M. Bagonluri, *Carbon nanotubes as functional excipients for nanomedicines: I. Pharmaceutical properties*. Nanomedicine, 2008. **4**(3): p. 173-82.
4. Terrones, M., *Science and Technology of Twenty-First Century: Synthesis, Properties, and Applications of Carbon Nanotubes*. Annual Review of Materials Research, 2003. **33**(1): p. 419-501.
5. Mir, M., A. Hosseini, and G. Majzoobi, *A numerical study of vibrational properties of single-walled carbon nanotubes*. Computational Materials Science, 2008. **43**(3): p. 540-548.
6. Salvetat, J.P., et al., *Mechanical properties of carbon nanotubes*. Applied Physics A 1999. **69**: p. 255-260.
7. Kim, P., et al., *Thermal Transport Measurements of Individual Multiwalled Nanotubes*. Physical Review Letters, 2001. **87**(21): p. 215502-1 - 215502-4.
8. Ando, Y., et al., *Physical properties of multiwalled carbon nanotubes*. International Journal of Inorganic Materials 1999. **1**: p. 77-82.
9. Gomez-Gualdrón, D.A., et al., *Carbon nanotubes engineering biomedical applications*. Progress in molecular biology and translational science, 2011. **104**: p. 175-245.
10. Ivanov, V., et al., *The study of carbon nanotubules produced by catalytic method*. Chemical Physics Letters, 1994. **223**(4): p. 329-335.
11. Popov, V., *Carbon nanotubes: properties and application*. Materials Science and Engineering R, 2004. **43**(3): p. 61-102.
12. Guildi, D.M. and N. Martín, *Carbon Nanotubes and Related Structures: Synthesis, Characterization, Functionalization and Applications*, 2010: WILEY-VCH.
13. Ding, X., et al., *Catalytic chemical vapor deposition of vertically aligned carbon nanotubes on iron nanoislands formed from Fe-implanted SiO films*. Carbon, 2004. **42**(14): p. 3030-3033.
14. Lee, C.J., et al., *Low temperature growth of vertically aligned carbon nanotubes by thermal chemical vapor deposition*. Chemical Physics Letters, 2001. **338**: p. 113-117.
15. Jung, Y.J., et al., *Mechanism of Selective Growth of Carbon Nanotubes on SiO<sub>2</sub>/Si Patterns*. Nano Letters, 2003. **3**(4): p. 561-564.
16. Lee, B.-J., et al., *Growth optimization of double-walled carbon nanotubes yielding precisely designed structures*. Metals and Materials International, 2011. **17**(2): p. 309-314.

17. Mizuno, K., et al., *Selective Matching of Catalyst Element and Carbon Source in Single-Walled Carbon Nanotube Synthesis on Silicon Substrate*. J. Phys. Chem. B, 2005. **109**(7): p. 2632-2637.
18. Mata, D., et al., *Upscaling potential of the CVD stacking growth method to produce dimensionally-controlled and catalyst-free multi-walled carbon nanotubes*. Carbon, 2012. **50**(10): p. 3585-3606.
19. Zhu, L., et al., *The growth of carbon nanotube stacks in the kinetics-controlled regime*. Carbon, 2007. **45**(2): p. 344-348.
20. Mattox, D.M., *Handbook of Physical Vapor Deposition (PVD) Processing*. 2<sup>a</sup> ed 2010: Elsevier Inc.
21. Kunadian, I., et al., *Growth kinetics of MWCNTs synthesized by a continuous-feed CVD method*. Carbon, 2009. **47**(2): p. 384-395.
22. Sinnott, S.B., et al., *Model of carbon nanotube growth through chemical vapor deposition*. Chemical Physics Letters, 1999. **315**: p. 25-30.
23. Grady, B.P., *Carbon Nanotubes - Polymer Composites: Manufacture, Properties, and Applications*, 2011: John Wiley & Sons.
24. Hou, P., C. Liu, and H. Cheng, *Purification of carbon nanotubes*. Carbon, 2008. **46**(15): p. 2003-2025.
25. Park, Y.S., et al., *High yield purification of multiwalled carbon nanotubes by selective oxidation during thermal annealing*. Carbon, 2001. **39**: p. 655-661.
26. Li, C., et al., *Oxidation of multiwalled carbon nanotubes by air: benefits for electric double layer capacitors*. Powder Technology, 2004. **142**(2-3): p. 175-179.
27. Suri, A. and K.S. Coleman, *The superiority of air oxidation over liquid-phase oxidative treatment in the purification of carbon nanotubes*. Carbon, 2011. **49**(9): p. 3031-3038.
28. Andrews, R., et al., *Purification and structural annealing of multiwalled carbon nanotubes at graphitization temperatures*. Carbon, 2001. **39**: p. 1681-1687.
29. Zhang, Y., Y. Bai, and B. Yan, *Functionalized carbon nanotubes for potential medicinal applications*. Drug Discov Today, 2010. **15**(11-12): p. 428-35.
30. Harris, P.J.F., *Carbon nanotube composites*. International Materials Reviews, 2004. **49**(1): p. 31-43.
31. Chu, H., et al., *Carbon nanotubes combined with inorganic nanomaterials: Preparations and applications*. Coordination Chemistry Reviews, 2010. **254**(9-10): p. 1117-1134.
32. Moniruzzaman, M. and K.I. Winey, *Polymer Nanocomposites Containing Carbon Nanotubes*. Macromolecules, 2006. **39**: p. 5194-5205.

- 
33. Lee, B.-J., E.-C. Shin, and G.-H. Jeong, *Length-controlled few-walled carbon nanotubes and their effect on the electrical property of flexible transparent conductive films*. Appl Phys A, 2012. **107**: p. 843–848.
  34. O'Connor, I., et al., *Development of transparent, conducting composites by surface infiltration of nanotubes into commercial polymer films*. Carbon, 2009. **47**(8): p. 1983-1988.
  35. Colas, A. and J. Curtis, *Silicone Biomaterials - History and Chemistry & Medical Applications of Silicones*. 2nd ed: Elsevier. Disponível em: <http://www.dowcorning.com/content/publishedlit/52-1069-01.pdf>.
  36. Corporation, D.C., *Silicone Chemistry Overview*. Dow Corning Corporation, 1997. Disponível em: <http://www.dowcorning.com/content/publishedlit/51-960A-01.pdf>.
  37. Khosla, A. and B.L. Gray, *Preparation, characterization and micromolding of multi-walled carbon nanotube polydimethylsiloxane conducting nanocomposite polymer*. Materials Letters, 2009. **63**(13-14): p. 1203-1206.
  38. Labarre, D., G. Ponchel, and C. Vauthier, *Biomedical and Pharmaceutical Polymers*, 2011: Pharmaceutical Press.
  39. *Silicone building blocks and nomenclature*. Available from: Disponível em: <http://www.dowcorning.com/content/discover/discoverchem/blocks-nomenclature.aspx> (Acedido em: 21 de Janeiro de 2012).
  40. *SYLGARD® 184 Silicone Elastomer Kit*. Available from: Disponível em: <http://www.dowcorning.com/applications/search/products/default.aspx?r=131en&country=PRT>. (Acedido em: 21 de Janeiro de 2012).
  41. Spitalsky, Z., et al., *Carbon nanotube-polymer composites: Chemistry, processing, mechanical and electrical properties*. Progress in Polymer Science, 2010. **35**(3): p. 357-401.
  42. Chua, T.P., et al., *Effects of surface-functionalized multi-walled carbon nanotubes on the properties of poly(dimethyl siloxane) nanocomposites*. Composites Science and Technology, 2010. **70**(4): p. 671-677.
  43. Bokobza, L., *Multiwalled carbon nanotube elastomeric composites: A review*. Polymer, 2007. **48**(17): p. 4907-4920.
  44. Ahir, S.V., Y.Y. Huang, and E.M. Terentjev, *Polymers with aligned carbon nanotubes: Active composite materials*. Polymer, 2008. **49**(18): p. 3841-3854.
  45. Avilés, F., et al., *Evaluation of mild acid oxidation treatments for MWCNT functionalization*. Carbon, 2009. **47**(13): p. 2970-2975.
-

46. Balasubramanian, K. and M. Burghard, *Chemically functionalized carbon nanotubes*. Small, 2005. **1**(2): p. 180-92.
47. Hwang, J., et al., *Poly(3-hexylthiophene) wrapped carbon nanotube/poly(dimethylsiloxane) composites for use in finger-sensing piezoresistive pressure sensors*. Carbon, 2011. **49**(1): p. 106-110.
48. Liu, C.H., et al., *Thermal conductivity improvement of silicone elastomer with carbon nanotube loading*. Applied Physics Letters, 2004. **84**(21): p. 4248.
49. Wu, C.-L., et al., *Static and dynamic mechanical properties of polydimethylsiloxane/carbon nanotube nanocomposites*. Thin Solid Films, 2009. **517**(17): p. 4895-4901.
50. Takahashi, K. and S. Yamanaka, *Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors*. Cell, 2006. **126**(4): p. 663-76.
51. Takahashi, K., et al., *Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors*. Cell, 2007. **131**(5): p. 861-72.
52. Nsair, A. and W.R. MacLellan, *Induced pluripotent stem cells for regenerative cardiovascular therapies and biomedical discovery*. Adv Drug Deliv Rev, 2011. **63**: p. 324-30.
53. Chen, Y.-C., et al., *Induced pluripotent stem cells and regenerative medicine*. Journal of Clinical Gerontology and Geriatrics, 2011. **2**(1): p. 1-6.
54. Vaccarino, F.M., et al., *Induced pluripotent stem cells: a new tool to confront the challenge of neuropsychiatric disorders*. Neuropharmacology, 2011. **60**(7-8): p. 1355-63.
55. Chao, T.I., et al., *Carbon nanotubes promote neuron differentiation from human embryonic stem cells*. Biochemical and Biophysical Research Communication, 2009. **384**(4): p. 426-30.
56. Chao, T.I., et al., *Poly(methacrylic acid)-grafted carbon nanotube scaffolds enhance differentiation of hESCs into neuronal cells*. Advanced Materials, 2010. **22**(32): p. 3542-7.
57. Kam, N.W.S., E. Jan, and N.A. Kotov, *Electrical Stimulation of Neural Stem Cells Mediated by Humanized Carbon Nanotube Composite Made with Extracellular Matrix Protein*. Nano Letters, 2009. **9**(1): p. 273-278.
58. Jan, E. and N.A. Kotov, *Successful Differentiation of Mouse Neural Stem Cells on Layer-by-Layer Assembled Single-Walled Carbon Nanotube Composite*. Nano Letters, 2007. **7**(5): p. 1123-1128.



- 
59. Akasaka, T., et al., *Maintenance of hemiround colonies and undifferentiated state of mouse induced pluripotent stem cells on carbon nanotube-coated dishes*. Carbon, 2011. **49**(7): p. 2287-2299.
  60. Mattson, M.P., R.C. Haddon, and A.M. Rao, *Molecular Functionalization of Carbon Nanotubes and Use as Substrates for Neuronal Growth*. Journal of Molecular Neuroscience, 2000. **14**: p. 175-182.
  61. Hu, H., et al., *Chemically Functionalized Carbon Nanotubes as Substrates for Neuronal Growth*. Nano Letters, 2004. **4**(3): p. 507-511.
  62. Hu, H., et al., *Polyethyleneimine Functionalized Single-Walled Carbon Nanotubes as a Substrate for neuronal growth*. The Journal of Physical Chemistry B, 2005. **109**(10): p. 4285-4289.
  63. Matsumoto, K., et al., *Neurite outgrowths of neurons with neurotrophin-coated carbon nanotubes*. J Biosci Bioeng, 2007. **103**(3): p. 216-20.
  64. Zhang, X., et al., *Guided neurite growth on patterned carbon nanotubes*. Sensors and Actuators B: Chemical, 2005. **106**(2): p. 843-850.
  65. Ghasemi-Mobarakeh, L., et al., *Application of conductive polymers, scaffolds and electrical stimulation for nerve tissue engineering*. Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine, 2011. **5**(4): p. e17-e35.
  66. Shi, G., et al., *A novel electrically conductive and biodegradable composite made of polypyrrole nanoparticles and polylactide*. Biomaterials, 2004. **25**(13): p. 2477-2488.
  67. Forrester, M.Z.J.V. and C. D.McCaig, *A small, physiological electric field orients cell division*. Cell Biology, 1999. **96**: p. 4942-4946.
  68. Harrison, B.S. and A. Atala, *Carbon nanotube applications for tissue engineering*. Biomaterials, 2007. **28**(2): p. 344-53.
  69. Hussain, M.A., M.A. Kabir, and A.K. Sood, *On the cytotoxicity of carbon nanotubes*. Current Science, 2009. **96**(5): p. 664-673.
  70. Yamada, M., et al., *Electrical stimulation modulates fate determination of differentiating embryonic stem cells*. Stem Cells, 2007. **25**(3): p. 562-70.
  71. Pimenta, M.A., et al., *Studying disorder in graphite-based systems by Raman spectroscopy*. Phys Chem Chem Phys, 2007. **9**(11): p. 1276-91.
  72. Qian, W., *Quantitative Raman characterization of the mixed samples of the single and multi-wall carbon nanotubes*. Carbon, 2003. **41**(9): p. 1851-1854.
  73. Osswald, S., M. Havel, and Y. Gogotsi, *Monitoring oxidation of multiwalled carbon nanotubes by Raman spectroscopy*. Journal of Raman Spectroscopy, 2007. **38**(6): p. 728-736.
-

74. Rosca, I.D., et al., *Oxidation of multiwalled carbon nanotubes by nitric acid*. Carbon, 2005. **43**(15): p. 3124-3131.
75. Delhaes, P., et al., *A comparison between Raman spectroscopy and surface characterizations of multiwall carbon nanotubes*. Carbon, 2006. **44**(14): p. 3005-3013.
76. Lee, J.H., K.Y. Rhee, and S.J. Park, *The tensile and thermal properties of modified CNT-reinforced basalt/epoxy composites*. Materials Science and Engineering: A, 2010. **527**(26): p. 6838-6843.
77. Liu, X., R.H. Hurt, and A.B. Kane, *Biodurability of Single-Walled Carbon Nanotubes Depends on Surface Functionalization*. Carbon N Y, 2010. **48**(7): p. 1961-1969.
78. Maughey, M., et al., *Substantial improvement of nanotube processability by freeze-drying*. Journal of Nanoscience and Nanotechnology 2007. **7**(8): p. 2633-2639
79. Grimes, C.A., et al., *Effect of purification of the electrical conductivity and complex permittivity of multiwall carbon nanotubes*. Journal of Applied Physics, 2001. **90**(8): p. 4134.
80. Tawfick, S., K. O'Brien, and A.J. Hart, *Flexible high-conductivity carbon-nanotube interconnects made by rolling and printing*. Small, 2009. **5**(21): p. 2467-73.

