

CENTRO FEDERAL DE EDUCAÇÃO TECNOLÓGICA DE MINAS GERAIS



Dissertação de Mestrado

Marcelo Augusto Brito Madureira

Processamento e caracterização de um cimento ósseo de fosfato de cálcio com reforço de óxido de grafeno

Belo Horizonte Agosto de 2019 Marcelo Augusto Brito Madureira

Processamento e caracterização de um cimento ósseo de fosfato de cálcio com reforço de óxido de grafeno

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Materiais do Centro Federal de Educação Tecnológica de Minas Gerais, na área de concentração de Ciência e Desenvolvimento de Materiais, linha de pesquisa de Biomateriais, como parte integrante dos requisitos para obtenção do Título de Mestre em Engenharia de Materiais.

Orientador: Prof. Dr. Sidney Nicodemos da Silva

Coorientadora: Profa. Dra. Danielle Marra de Freitas Silva Azevedo

Belo Horizonte Agosto de 2019

M400-	Madureira, Marcelo Augusto Brito.
м183р	Processamento e caracterização de um cimento osseo de tostato
	Madureira - 2019
	113 f · il fotos grafs tabs
	Orientador: Sidney Nicodemos da Silva.
	Co-orientador: Danielle Marra de Freitas Silva Azevedo.
	Dissertação (mestrado) - Centro Federal de Educação
	Tecnológica de Minas Gerais, Programa de Pós-Graduação em
	Engenharia de Materiais, Belo Horizonte, 2019. Bibliografia.
	1. Fosfato de cálcio. 2. Substitutos ósseos. 3. Biomateriais –
	Propriedades mecânicas. 4. Materiais compósitos. I. Silva, Sidney
	Nicodemos. II. Azevedo, Danielle Marra de Freitas Silva. III. Título.
	CDD: 620.118
F ield	

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca - Campus I / CEFET-MG Bibliotecária: Deiler Fraga Rabelo - CRB/6-2318

Processamento e caracterização de um cimento ósseo de fosfato de cálcio com reforço de óxido de grafeno

Dissertação apresentada em 12 de Agosto de 2019 por Marcelo Augusto Brito Madureira, ao curso de Mestrado em Engenharia de Materiais do Centro Federal de Educação Tecnológica de Minas Gerais – CEFET/MG, na área de concentração de Ciência e Desenvolvimento de Materiais, linha de Pesquisa Biomateriais, aprovada pela banca examinadora constituída dos professores:

Prof. Dr. Sidney Nicodemos da Silva (Orientador) Professor do Departamento de Engenharia de Materiais do CEFET/MG Doutor em Engenharia Metalúrgica e de Minas pela UFMG (2003)

Profa. Dra. Danielle Marra de Freitas Silva Azevedo (Coorientadora) Departamento de Engenharia de Materiais do CEFET/MG Doutora em Bioquímica e Imunologia pela UFMG

Prof. Dr. Cléverson Fernando Garcia Departamento de Química – CEFET/MG Doutora em Ciências - Química Orgânica pela UFSCar

Profa. Dra. Ivete Peixoto Pinheiro Silva Departamento de Engenharia de Materiais – CEFET/MG Doutora em Engenharia Metalúrgica e de Minas pela UFMG

Profa. Dra. Katia Michele Freitas Departamento de Engenharia de Materiais – CEFET/MG Doutor em Farmacologia pela UFMG.

> Belo Horizonte Agosto de 2019

Dedico este trabalho a minha esposa Mariana e as famílias Brito, Madureira, Mattar e Sampaio por serem meus laços de afeto e referências de valores para a vida.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Getúlio e Ignêz, e aos meus irmãos Felipe e Natália pelo afeto, carinho e incentivo nos momentos de dificuldade.

À minha esposa Mariana que é parte fundamental da minha jornada no mestrado, por ser uma pessoa afetuosa, companheira e meu porto seguro.

Sinceros agradecimentos aos meus orientadores, Professor Sidney Nicodemos da Silva e a Professora Danielle Marra de Freitas Silva Azevedo, pelo aprendizado do mestrado, pela confiança, apoio, compreensão e paciência que dedicaram a mim durante toda a caminhada do mestrado.

A professora Katia Michele Freitas pela colaboração nos ensaios biológicos, pelo companheirismo no laboratório, pelo apoio, compreensão e paciência.

Aos alunos Camila, Ana Esther e Matheus pela oportunidade de participar do trabalho de vocês e também pelo auxílio na realização do meu estudo de mestrado.

Aos Professores João Batista e Rafael Lopes do CDTN, Evaldo José Corat do Instituto Nacional de Pesquisas Espaciais (INPE) e sua equipe, pelas importantes colaborações prestadas durante a pesquisa.

Ao Professor Renato Luiz Siqueira e a professora Ivete Peixoto Pinheiro Silva pelas importantes sugestões oferecidas na apresentação da qualificação.

À CAPES, pelo auxílio à pesquisa, ao CEFET/MG pela bolsa e suporte instrumental. Ao CDTN, UFMG, UFOP, INPE que possibilitaram a realização de diversos ensaios por meio de colaboração.

Agradeço, também, à Phosther Tecnologia de Aglomerações S/A e ao sr. Lupércio Tarcísio de Oliveira, pela doação de parte das matérias primas usadas na pesquisa.

A aqueles que, de alguma forma, direta ou indireta, colaboraram na realização deste trabalho e que, embora não citados aqui, não deixam de merecer meu agradecimento.

Agradeço a todos pelos momentos de alegria que tive durante o mestrado. Foi um período de muito aprendizado, dedicação, força de vontade e construção de boas e fraternas amizades. Sinto-me honrado em ter trabalhado com pessoas de tão espetaculares.

Obrigado!

"A felicidade é algo que a vida nos outorga através de pequenas porções de bem." Carlos Bernardo Gonzáles Pecotche

RESUMO

Nas últimas duas décadas vem sendo intensificados os estudos para desenvolvimento de novas terapêuticas para aplicações em doenças degenerativas do tecido ósseo, bem como formas menos invasivas de tratamentos de traumas de acidentes viários. Neste cenário tem sido recentemente desenvolvidos matrizes de biocimentos de fosfato de cálcio, injetáveis e/ou moldáveis, com reforço de materiais grafênicos que permitem o uso através de técnicas cirúrgicas minimamente invasivas na reparação ou preenchimento ósseo. Uma nova estratégia tem sido a adição de óxido de grafeno nestas matrizes, o que aparentemente tem mostrado uma forte influência sobre as propriedades mecânicas e biológicas deste novo biomaterial. Neste trabalho foi processado e caracterizado um nanocompósito constituído por fosfato de cálcio bifásico, fosfato de sódio 5%m/v, carboximetilcelulose 3,2%m/m e óxido de grafeno nas razões mássicas de 0,1; 0,2; 0,3 e 0,5%m/m, visando a provável utilização deste material em procedimentos cirúrgicos, a fim de promover reparação do tecido ósseo. As matérias primas e os compósitos foram caracterizados físico-quimicamente por difração de raios X, microscopia eletrônica de varredura acoplada com espectroscopia de energia dispersiva de raios X e espectroscopia de Raman. Após a fabricação do biocimento, suas propriedades foram avaliadas através dos seguintes ensaios: Vicat (tempo de pega), flexão (resistência mecânica à tração), microdureza Vickers, ultramicrodureza (módulo de elasticidade) e impacto Izod (tenacidade). Além disso, também foram realizados ensaios para verificação das propriedades biológicas, sendo eles: ensaios *in vitro* de degradação em Tris-HCI, ensaios de citotoxicidade através de cultura de bactérias (2 espécies) e ensaio in vivo pelo método de HET-CAM. Os resultados mostraram que o biocimento com incorporação de 0,2%m/m de OGN um apresentaram tempo de pega final da ordem de 13 minutos e resistência mecânica da ordem de 6MPa, superior a expectativa esperada para o osso esponjoso. Isso demonstra que o material tem potencial aplicação clínica em substituição ao cimento acrílico. Os ensaios biológicos confirmaram que o material não apresentou citotoxicidade e foi classificado como não irritante pelo ensaio HET-CAM, resultado que sugere boa biocompatibilidade. Durante o ensaio de degradação houve redução da perda de massa, aparentemente causada por reprecipitação de apatita na superfície das amostras. Os resultados sugerem que o material presenta potencial para aplicação biomédica.

Palavras-chave: cimento ósseo; fosfato de cálcio bifásico; óxido de grafeno, tempo de pega, resistência mecânica.

ABSTRACT

In the last two decades, studies have been intensified to develop new therapies for applications in degenerative bone tissue diseases, as well as less invasive forms of road accident trauma treatments. In this scenario, injectable and / or moldable calcium phosphate bone cement matrices have recently been developed, with reinforcement of grafenic materials that allow the use through minimally invasive surgical techniques in bone repair or filling. A new strategy has been the addition of graphene oxide in these matrices, which apparently has shown a strong influence on the mechanical and biological properties of this new biomaterial. In this work a nanocomposite consisting of biphasic calcium phosphate, 5%w/v sodium phosphate, 3.2%w/w carboxymethylcellulose and graphene oxide in the mass ratio of 0.1; 0.2; 0.3 and 0.5%%w/w aiming at the probable use of this material in surgical procedures, in order to promote bone tissue repair. The raw materials and composites were physically and chemically characterized by X-ray diffraction, scanning electron microscopy coupled with X-ray dispersive energy spectroscopy and Raman spectroscopy. After the bone cement fabrication, its properties were evaluated through the following tests: Vicat (setting time), flexion (mechanical tensile strength), Vickers microhardness, ultramicrohardness (elastic modulus) and Izod impact (toughness). In addition, assays were also performed to verify biological properties, namely: in vitro degradation assays in Tris-HCl, cytotoxicity assays through bacterial culture (2 species) and in vivo assay by the HET-CAM method. The results showed that the cement with incorporation of 0.2% w/w OGN one had a final setting time of 13 minutes and mechanical strength of 6MPa, higher than the expected expectation for cancellous bone. This demonstrates that the material has potential clinical application in place of acrylic cement. Biological assays confirmed that the material showed no cytotoxicity and was classified as nonirritant by the HET-CAM assay, which suggests good biocompatibility. During the degradation test there was a reduction in mass loss, apparently caused by apatite reprecipitation on the surface of the samples. The results suggest that the material presents potential for biomedical application.

Keywords: bone cement; biphasic calcium phosphate; graphene oxide, setting time, mechanical strength.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Estrutura típica dos ossos longos2	2
Figura 2 - Aplicações biomédicas de biomateriais de substituição óssea2	7
Figura 3 - Representação química da molécula de celulose	4
Figura 4 - Estrutura molecular da carboximetilcelulose3	5
Figura 5 - Modelo da estrutura molecular da carboximetilcelulose	6
Figura 6 - Estrutura do grafeno3	7
Figura 7 - Estrutura óxido de grafeno3	7
Figura 8 - Espectro Raman OG e OGR3	8
Figura 9 - Curva representativa de tensão-deformação para material frágil e dúctil .4	2
Figura 10 - Fluxo das etapas do estudo4	5
Figura 11 - Fluxo da incorporação do OGN na pasta cimentícia4	8
Figura 12 - Fluxo de confecção dos corpos de prova4	9
Figura 13 - Molde e corpo de prova para ensaio de tempo de pega5	2
Figura 14 - Aparelho de Vicat montado para o ensaio5	3
Figura 15 - Disposição das amostras no ensaio de disco-difusão em ágar5	6
Figura 16 - Incubadora/chocadeira para ovos5	8
Figura 17 - Ovo no ovoscópio e verificação da viabilidade do embrião5	8
Figura 18 - Imagem ilustrativa do ensaio referente ao contato direto do biomateria	al
com a membrana corioalantóide do ovo embrionado de galinha5	9
Figura 19 - Imagens do MEV do OGN6	2
Figura 20 - Imagem do espectro do EDS realizado na amostra de OGN do CEFET	e
do padrao analítico	4
Figura 21 - DRX do óxido de grafeno6	4
Figura 22 - Espectro DRX com indicação dos picos de MnO26	5
Figura 23 - Espectro Raman da amostra de OGN6	6

Figura 24 - Espectro Raman obtido da literatura com as bandas de uma amostra
contendo o MnO ₂ e imagem representativa do efeito core-shell67
Figura 25 - Mapas de varredura do biomaterial68
Figura 26 - Difratograma do biomaterial processado70
Figura 27 - Gráfico do tempo de pega do biocimento72
Figura 28 - Endentação não aceitável e aceitável do ensaio de microdureza74
Figura 29 - Gráfico de Microdureza Vickers do biocimento75
Figura 30 - Gráfico de resistência mecânica do biocimento76
Figura 31 - Gráfico de resistência a tração na flexão por 3 pontos do biocimento78
Figura 32 - Gráfico da evolução do módulo de elasticidade do biocimento80
Figura 33 - Gráfico de energia absorvida no impacto do biocimento
Figura 34 - Gráfico da energia do impacto do biocimento82
Figura 35 - Placas de petri com halo de inibição84
Figura 36 - Resultado do ensaio de citotoxicidade na presença das bactériasS.aureus (a) e E.coli (b)
Figura 37 - Ovos controle positivo, negativo e após contato com material avaliado .87
Figura 38 - Gráfico dos resultados de perda de massa do biocimento
Figura 39 - Concentração de cálcio durante ensaio de degradação do biocimento90

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Propriedades mecânicas do osso esponjoso e cortical	23
Tabela 2 - Classificação de biomateriais	24
Tabela 3 - Fosfatos de cálcio relevantes no desenvolvimento de biocimentos	29
Tabela 4 - Propriedades requeridas para fosfatos de cálcio para aplicações m	édicas 30
Tabela 5 - Grupos amostrais e %m/m de OGN	48
Tabela 6 - Tempo e escores para alterações na membrana corioalantóide	59
Tabela 7 - Escala para classificação final do biomaterial quanto ao seu potene irritabilidade no HET-CAM	cial de 60
Tabela 8 - Número de camadas do óxido de grafeno	65
Tabela 9 - Tempo inicial e final de pega do cimento de fosfato de cálcio	72
Tabela 10 - Microdureza Vickers (HV100)	74
Tabela 11 - Resistência mecânica das amostras de biocimento	76
Tabela 12 - Resistência a tração na flexão por 3 pontos	77
Tabela 13 - Módulo de elasticidade das amostras de biocimentos	80
Tabela 14 - Ensaio de impacto do biocimento	81
Tabela 15 - Escores e classificação dos biomateriais testados	88

LISTA DE SÍMBOLOS, SIGLAS e UNIDADES

- ABC Cimento ósseo acrílico
- ACP Fosfato de cálcio amorfo
- ASTM American Society for Test and Materials (Órgão americano de normalização)
- α-TCP α Fosfato Tricálcio
- BCP Fosfato de cálcio bifásico
- BET Método de B.E.T. Brunauer, Emmett, Teller
- β-TCP- Beta trifosfato de cálcio
- c Comprimento de uma trinca de tamanho crítico na superfície ou metade do comprimento de uma trinca crítica no interior do material
- CDHA Hidroxiapatita deficiente em cálcio
- CEFET-MG Centro Federal de Educação Tecnológica de Minas Gerais
- CFC Cimento de fosfato de cálcio
- CIC Compósitos cimentos
- CMC Carboximetilcelulose
- CSC Cimento de sulfato de cálcio
- d distância
- DCPA Fosfato de dicálcio anidro
- DCPD-Fosfato de dicálcio dihidratado
- DRX Difratometria de raios X
- DS Grau de substituição
- E_c(u) Limite superior do módulo de elasticidade
- Ec (I) Limite inferior do módulo de elasticidade
- EDS Espectrometria de energia dispersiva de raios X
- Em Módulo de elasticidade matriz
- Ep Módulo de elasticidade partícula
- FC Fosfato de cálcio
- FRX Fluorescência de raios X
- FTIR Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier
- HA Hidroxiapatita
- HEC Hidroxietilcelulose
- HPMC Hidroxipropilmetilcelulose
- ISO International Organization for Standardization

- Kıc Tenacidade à fratura em deformação plana
- Lc Tamanho do cristalito
- MCPA Fosfato de monocálcio anidro
- MCPM Fosfato de monocálcio monohidratado
- MC Metilcelulose
- MEV Microscopia eletrônica de varredura
- $\mu m-Micrometro$
- nm Nanômetro
- OCP Fosfato de octacálcio
- OGN Óxido de grafeno nanoplacas
- PEG Polietilenoglicol
- PMMA Polimetilmetacrilato
- PVA Álcool polivinílico
- PVAc Acetato de polivinila
- RAMAN Espectroscopia RAMAN
- RPM Rotações por minuto
- **TCP** Tricalciofosfatos
- TTCP Fosfato de tetracálcio
- σ_f Tensão aplicada
- Vm Fração volumétrica matriz
- V_p Fração volumétrica partícula
- Y Fator geométrico adimensional que depende do estado de tensão e da geometria da amostra e da trinca

SUMÁRIO

1	INTR	RODUÇÃO	17	
1.1	J	JUSTIFICATIVA E RELEVÂNCIA		
2	OBJ	ETIVOS	20	
2.1	C	Dbjetivo geral	20	
2.2	C	Objetivos específicos	20	
3	REV	ISÃO BIBLIOGRÁFICA	21	
3.1	Т	ecido ósseo	21	
3.2	E	Biomateriais para substituição óssea	23	
3.3	E	Biomateriais cerâmicos de fosfato de cálcio	29	
3.4	F	Processamento do cimento de CFC	32	
3.4.	1	O processamento da pasta cimentícia	32	
3.4.2	2	Aditivos Cerâmicos	33	
3.4.3	3	Material de reforço	36	
3.4.	4	Razão líquido/sólido	39	
3.4.	5	Tempo de pega	39	
3.5	F	Propriedades biológicas dos Compósitos de CFC	41	
3.6	F	Propriedades mecânicas dos compósitos cerâmicos de CFC	42	
4	MAT	ERIAIS E MÉTODOS	45	
4.1	Ν	/lateriais	46	
4.1.	1	Fosfato de Cálcio Bifásico	46	
4.1.	2	Carboximetilcelulose	47	
4.1.3	3	Hidrogenofosfato dissódico	47	
4.1.4	4	Óxido de grafeno	47	
4.2	Ν	létodos	48	

4.2.1 Composição do material e definição dos grupos amostrais	48
4.2.2 Preparo da solução aceleradora e incorporação do óxido de grafeno4	48
4.2.3 Formação do pó de cimento de fosfato de cálcio	19
4.2.4 Processamento da pasta de cimento ósseo e corpos de prova	19
4.2.5 Caracterizações físico-químicas	50
4.2.6 Ensaios realizados no biocompósito	52
4.2.7 Análise estatística	51
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	32
5.1 Caracterização do material de reforço	52
5.2 Caracterização do biocimento processado6	38
5.3 Ensaio de tempo de pega	71
5.4 Ensaio de Microdureza (HV)	73
5.5 Ensaio de Flexão por 3 apoios	77
5.6 Ensaio de Ultramicrodureza	79
5.7 Ensaios Impacto Izod	31
5.8 Ensaio de citotoxicidade	34
5.9 Ensaios HET-CAM	36
5.10 Degradação	39
6 CONCLUSÃO	91
7 SUGESTOES DE TRABALHOS FUTUROS	92
REFERÊNCIAS	93
ANEXO A - DATA SHEET FOSFATO DE CÁLCIO10)4
ANEXO B - DATA SHEET DA CARBOXIMETILCELULOSE	10
ANEXO C - DATA SHEET FOSFATO DE SÓDIO17	11
ANEXO D - CERTIFICADO DE ANÁLISE ÓXIDO DE GRAFENO PADRÃO DE	
REFERENCIA ANALITICA1	12

ANEXO E - CERTIFICADO DE GARANTIA DE QUALIDADE DOS OVOS PARA	
ENSAIO HET-CAM	3

1 INTRODUÇÃO

A Organização das Nações Unidas (ONU) estima que os acidentes de trânsito sejam a nona causa de morte no mundo e constituem um fator importante de incapacidade laboral ou perda da qualidade de vida para milhões de pessoas. Estima-se que atualmente no mundo, entre 40 a 50 milhões de pessoas sofram anualmente traumatismos não letais provocados por desastres de trânsito (WHO, 2018). Segundo Reichenheim *et al.* (2011) e Andrade (2016), a crescente frota de veículos de transporte terrestre tem elevado ainda mais o número de acidentes, tornando as consequências destes acontecimentos um problema de saúde pública. A fim de chamar a atenção mundial para essa lamentável estatística e no intuito de incentivar a sua redução, a ONU proclamou o período de 2011-2020 como sendo a "Década das ações para segurança no trânsito".

O Brasil acompanha a tendência mundial e tem sido durante muitos anos recordista em acidentes de trânsito (WHO, 2018). Após inúmeras campanhas de educação no trânsito e implementação do novo código de trânsito de 1998, que intensificou as normas de tráfego com multas por alcoolismo, excesso de velocidade e avanço de sinais, as taxas de mortalidade e lesões graves em acidentes automobilísticos tem apresentado redução (REICHENHEIM *et al.*, 2011).

Os tratamentos especializados das vítimas não fatais, como os procedimentos de urgência e emergência, as cirurgias reparadoras de fraturas, bem como a reabilitação pós acidente representam um importante impacto financeiro no setor da saúde. As vítimas de acidentes que não vem a óbito, em muitos casos, podem apresentar sequelas psicológicas e físicas importantes, que afetam toda a vida do envolvido, gerando até mesmo incapacidades permanentes (REICHENHEIM *et al.*, 2011; ANDRADE, 2016).

O tratamento das fraturas muitas vezes necessita de intervenção cirúrgica. Nestes casos pode ser necessários procedimentos de reconstrução óssea, com uso de materiais para enxertos e preenchimento de cavidades, uso de elementos de fixação como parafusos, placas, fios e hastes, até mesmo artroplastia para substituição articular em alguns casos (PINTO *et al.*, 2007). Assim, vem crescendo a busca por

procedimentos cirúrgicos mais eficazes e menos invasivos para tratamentos de lesões incapacitantes advindas dos acidentes de trânsito (ANDRADE, 2016).

Os biocimentos de fosfato de cálcio (CFCs) apresentam características adequadas ao uso biomédico, devido à sua semelhança química com o osso humano, fácil manipulação, elevada biocompatibilidade, além de suas razoáveis propriedades bioativas e osteocondutoras, são potencialmente reabsorvíveis promovendo uma remodelação da matriz óssea natural. Além disso, a literatura vem demonstrando o seu potencial para aplicações clínicas em procedimentos cirúrgicos minimamente invasivos de politraumatizados (FRANCZAK, 2014; PALMER *et al.*, 2016).

Nos últimos anos os materiais grafênicos vem sendo pesquisados como os reforço mecânico de matrizes de compósitos (OSÓRIO, 2018). A indústria de biomateriais, por exemplo, estuda estes materiais como agente de reforços de cimentos ósseos, seja ele polimérico ou cerâmico (GONÇALVES *et al.*, 2012; ZHI *et al.*, 2013). O óxido de grafeno (OG), que possui estrutura bidimensional e excelentes propriedades mecânicas, vem alcançado êxito como material para reforçar a matriz cerâmicas de CFCs (WANG *et al.*, 2017). As melhorias obtidas com a adição destes materiais nas propriedades mecânicas dos CFCs serão futuramente úteis para expandir sua faixa de aplicação no tratamento de lesões ósseas.

1.1 JUSTIFICATIVA E RELEVÂNCIA

A humanidade tem buscado formas de restaurar e/ou substituir parte do tecido ósseo desde os primórdios da civilização egípcia, persa, hindu, maia, dentre outras (SANAN *et al.*,1997). Hoje, essa procura tem motivado pesquisadores e cirurgiões na busca de materiais que possam acelerar a consolidação óssea e atuar na reconstrução das fraturas (SCHMITZ *et al.*, 1999). Ao redor do mundo os biocimentos de fosfato de cálcio têm ganhado atenção dos grupos de pesquisa. Eles são biomateriais que apresentam semelhança química e cristalográfica com a estrutura óssea humana, bem como bioatividade e biocompatibilidade adequadas ao uso biomédico, o que vem propiciando que esses biocimentos se tornem mais uma opção para uso em reparação de defeitos, reconstrução óssea e fixação de implantes. Suas características físico-químicas altamente promissoras se devem ao fato de apresentarem boa molhabilidade, hidratação e capacidade de endurecimento quando aplicados no meio fisiológico (FRANCZAK, 2014).

As limitações do ponto de vista das propriedades mecânicas dos biocimentos de fosfato de cálcio (alto módulo de elasticidade, baixa tenacidade à fratura com um comportamento frágil) são a principal desvantagem deste tipo de material; segundo Silva (2002), o material apresenta resistência próxima do osso trabecular e cerca de um quinto do osso cortical. Porém, reforços à matriz de fosfato de cálcio vem sendo aplicados no intuito de buscar a melhoria desta propriedade. Os materiais de carbono, na forma de nanoestruturas para serem aplicados como elemento de reforço em biocimentos, tem despertado interesse de pesquisadores, uma vez que têm demonstrado serem capazes de aprimorar as propriedades mecânicas de matrizes cimentícias (WANG *et al.*, 2017).

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Desenvolver um cimento ósseo de fosfato de cálcio (CFC) reforçado com óxido de grafeno nanoplacas (OGN) com características apropriadas de tempo de endurecimento, propriedades mecânicas e biocompatibilidade que o qualifiquem para ser utilizado como material para possíveis aplicações clínicas em reparos ósseos.

2.2 Objetivos específicos

- Caracterizar físico-quimicamente as matérias primas: fosfato de cálcio bifásico (BCP), óxido de grafeno nanoplacas (OGN), fosfato de sódio (FS) e carboximetilcelulose (CMC).
- Processar um cimento ósseo a base fosfato de cálcio bifásico (hidroxiapatita e fosfato de cálcio amorfo), fosfato de sódio 5% m/v, carboximetilcelulose 3,2%m/m e OGN nas razões mássicas de 0,1, 0,2, 0,3 e 0,5%m/m.
- Avaliar os tempos de pega (inicial e final) das amostras pelo ensaio Vicat;
- Caracterizar os biocimentos físico-quimicamente por técnicas de difração de raios X (DRX), microscopia eletrônica de varredura (MEV) acoplada com espectroscopia de energia dispersiva de raios X (EDS) e espectroscopia de Raman.
- Determinar as propriedades mecânicas por meio dos ensaios de flexão (resistência mecânica à tração), microdureza Vickers, Ultramicrodureza (módulo de elasticidade) e impacto Izod (tenacidade).
- Realizar ensaios biológicos *in vitro* de degradação em Tris-HCI, ensaio de citotoxicidade em cultura de bactérias (2 espécies) e ensaio de biocompatibilidade *in vivo* pelo método de HET-CAM.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Tecido ósseo

O sistema esquelético humano tem o osso como unidade básica. Este sistema desempenha várias funções, tal como fornecer apoio estrutural ao corpo, suportar os movimentos mecânicos, servir de proteção para órgãos vitais, hospedar células hematopoiéticas e atuar como reservatório de íons (ELIAZ *et al.*, 2017).

Os ossos são constituídos por um material compósito vivo, altamente organizado e especializado, o tecido ósseo. Este tecido é formado por células ósseas - osteoblastos, osteócitos e osteoclastos - e matriz extracelular - fibras colágenas e substância endurecida - onde as células ósseas estão instaladas. A matriz apresenta 33% de compostos orgânicos - fibras de colágeno tipo I e substância homogênea de proteoglicanos e glicoproteínas - e 67% de compostos inorgânicos, principalmente pequenos cristais de hidroxiapatita (Ca₁₀(PO₄)₆(OH)₂) (NATHER, 2005; JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2013).

Os componentes orgânicos e inorgânicos dos ossos conferem-lhe importantes propriedades. A matriz inorgânica, formada por diferentes materiais de fosfato de cálcio, é responsável pela durabilidade mecânica, dureza, rigidez e alta resistência à compressão; enquanto a matriz orgânica, onde se encontra o colágeno, fornece elasticidade, resistência à tensão e resiliência ao osso (ELIAZ *et al.,* 2017).

Dois tipos de organização estrutural compõem os ossos: o osso trabecular e o cortical. O osso cortical compõe a parte exterior do osso, o seu córtex, e possui uma estrutura densa e compacta; já o osso trabecular, ou esponjoso, ocupa a região interna do osso e é formado por placas interconectadas de osso – a trabécula (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2013). Pode ser observado na Figura 1 (p. 22) um esquema das partes do osso.



Figura 1 - Estrutura típica dos ossos longos

Fonte: Eliaz (2017).

A diferença estrutural entre ossos esponjosos e corticais implica em propriedades mecânicas distintas, o que pode ser observado na Tabela 1.

Tipo de osso	Densidade (g/cm3)	Resistencia Compressão (MPa)	Resistencia Flexão (*) (MPa)	Módulo de Young (GPa)	Tenacidade a Fratura K _{IC} (MPa.m ^{1/2})
Esponjoso (ou trabecular)		2 - 12 ^(a) 1,9 - 10 ^(b) 1 – 30 ^(c)	1,2 - 20 ^(b)	$\begin{array}{c} 0,05-0,5^{(a)} \\ 0,005-0,5^{(b)} \\ 0,01-5^{(c)} \end{array}$	Até 0,1 ^(b)
Cortical (ou compacto)	1,6 – 2,1 ^(a)	100 - 230 ^(a) 167 – 193 ^(b) 95 – 230 ^(c)	50 - 150 ^{(a) (b)}	7 - $30^{(a)}$ (b) 9 - 25 (c)	2 - 12 ^{(a)(b)}

Tabela 1 - Propriedades mecânicas do osso esponjoso e cortical.

(*) Realizada por ensaio de tração na flexão por 3 ou 4 apoios

Fonte: Adaptado de Oréfice et al. (2012)^(a), Eliaz et al. (2017)^(b) e Ajaxon et al. (2017)^(c).

Pode-se observar que há um intervalo de valores em uma mesma propriedade mecânica na Tabela 1. Esse fato ocorre, pois os diversos ossos do corpo são adaptados a diferentes esforços mecânicos e, por isso, apresentam a parte cortical e esponjosa com densidades diferentes. Dessa forma, ossos esponjosos e trabeculares de diferentes regiões podem ter características mecânicas distintas (ELIAZ *et al.*, 2017).

3.2 Biomateriais para substituição óssea

Os materiais usados para substituir sistemas biológicos, seja completamente ou em parte, são denominados Biomateriais. Estes materiais vêm melhorando a qualidade de vida dos seres humanos desde o seu surgimento (ORÉFICE *et al.*, 2012).

Os biomateriais são projetados para que, durante seu uso, gerem o menor distúrbio imunológico possível. tais como reações alérgicas ou inflamatórias. Α biocompatibilidade pode ser entendida como a capacidade de o biomaterial apresentar resposta biológica adequada a seu uso. De acordo com a interação que os biomateriais têm com os sistemas biológicos, eles podem ser classificados como tóxicos, bioinertes, bioativos e bio-reabsorvíveis (HENCH, 1993). Biomateriais inertes são aqueles que ao serem implantados apresentam características não tóxicas e não interagem com os tecidos vivos, formando-se apenas uma camada fibrosa ao redor do implante; os bioativos são capazes de formar ligação com tecidos duros e moles; já os biodegradáveis permitem que o tecido vivo substitua o implante, ou seja, o material implantado é reabsorvido localmente (PRAKASAM *et al.*, 2015; IBRAHIM *et al.*, 2017).

A fixação dos biomateriais ao tecido adjacente pode ser classificada em: fixação morfológica, biológica, bioativa ou substituição pelo tecido local (HENCH, 1993; ORÉFICE et al., 2012). A fixação é classificada como morfológica ou mecânica quando ocorre o crescimento de tecido nas irregularidades superficiais do implante, sem que aconteça interação biológica ou química; a fixação biológica se dá pelo crescimento do tecido através dos poros do material; já na fixação bioativa o material é fixado diretamente ao implante por meio da formação de uma interface tecidoimplante. No caso dos reabsorvíveis, como o próprio nome sugere, acontece uma substituição do biomaterial pelos tecidos locais (HENCH, 1993; ORÉFICE et al., 2012).

Os principais biomateriais usados para aplicação em tecido ósseo são a alumina, a zircônia, o carbono, os compósitos metálicos, os fosfatos de cálcio, os biovidros e as vitrocerâmicas (PRAKASAM *et al.*, 2015). A classificação destes biomateriais organizada conforme biocompatibilidade e biofixação pode ser visto na Tabela 2.

Fixação no tecido	Exemplo	
Morfológica	Al ₂ O ₃ , Zircônia, Carbono pirolítico.	
Biológica (material poroso)	Hidroxiapatita (HA), revestido de HA.	
Bioativa	Vidros bioativos, vitrocerâmicas bioativos, HA.	
Substituição com tecidos	Fosfato tricálcico, vidros bioativos.	
	Fixação no tecido Morfológica Biológica (material poroso) Bioativa Substituição com tecidos	

Tabela 2 - Classificação de biomateriais

Fonte: Adaptado de Hench (1993), Oréfice et al. (2012) e Prakasam et al. (2015).

Os biomateriais, além de biocompatíveis, precisam apresentar características adequadas à aplicação que se destinam, o que é chamado de biofuncionalidade. Por exemplo, os materiais de substituição óssea precisam apresentar resistência mecânica apropriada ao local onde serão implantados, uma vez que os vários ossos do corpo estão sujeitos a esforços mecânicos diferentes. Diante disso, as aplicações

dos biomateriais se diferem em: aplicações para substituição de tecidos moles, para substituição de tecidos duros e materiais para sistemas cardiovasculares. Aqueles utilizados para substituição de tecido duro podem ser do tipo metálico, cerâmico, polimérico ou compósito (ORÉFICE *et al.*, 2012).

Os biomateriais metálicos, como as próteses articulares, placas, fios e hastes, são materiais de substituição óssea bastante usados em cirurgias de substituição articular, fixação de fraturas e em processos de recuperação óssea (ORÉFICE *et al.*, 2012). Os biomateriais cerâmicos são usados nas cirurgias de fusão espinhal, reconstrução maxilofacial, em válvulas cardíacas, além de formulações especiais para tratamento de tumores. Na odontologia, por exemplo, são usados nas coroas de porcelana dourada, cimentos de ionômero recobertos de vidro, tratamentos endodônticos e dentaduras, sendo denominados nestes casos de cerâmicas dentárias (HENCH, 1993; PRAKASAM *et al.*, 2015). Os biomateriais poliméricos vem sendo usados na confecção de discos vertebrais, cartilagens, ligamentos, meniscos, dispositivos de liberação de fármacos (*Drug delivery*) e também como moldes para *scaffolds* utilizados pela engenharia de tecidos no desenvolvimento de biomateriais (OH *et al.*, 2006; NAVARRO, 2008).

Os materiais compósitos são uma classe de material que combina uma matriz (fase contínua) e uma fase de reforço ou modificadora (fase dispersa). A fase modificadora é incorporada no intuito de solucionar desvantagens da matriz, tais como aumentar ou diminuir a taxa de degradação, melhorar a biocompatibilidade e bioatividade, melhorar propriedades mecânicas, ou mesmo, controlar a forma de liberação de fármacos (WAN *et al.,* 2006; HABRAKEN *et al.,* 2007). Os biomateriais compósitos estão em crescente estudo e apresentam grande potencial de uso biomédico, uma vez que permitem o ajuste de propriedades das matrizes para uso em aplicações específicas (PIRES *et al.,* 2015).

Nos biomateriais poliméricos compósitos usados para implante ósseo a adição de cerâmicas de fosfato de cálcio tem contribuído para aumentar a biocompatibilidade e o módulo de elasticidade do material, o que contribui para a redução do fenômeno *stress-shielding* (CAO e HENCH, 1996; KATTI, 2004). O aumento da resistência mecânica de matrizes cerâmicas de fosfato de cálcio pode acontecer com a

incorporação de vários tipos de materiais, por exemplo, os biovidros e as vitrocerâmicas, fibras e partículas metálicas de titânio ou aço inoxidável, além disso, partículas de prata podem ser usadas como agente antimicrobiano (CAO e HENCH, 1996; MONTEIRO *et al.*, 2009). O biocimento de fosfato de cálcio com incorporação de óxido de grafeno podem ser classificados como material compósito, uma vez que são produzidos a partir de uma matriz e uma fase de reforço (WANG *et al.*, 2017).

Os biomateriais substitutos ósseos são empregados em situações nas quais a capacidade de recuperação do tecido ósseo está prejudicada. Isso acontece quando a velocidade e eficiência da recuperação óssea não ocorre de forma adequada. Por exemplo, após ressecções de tumores, fraturas complexas ou não consolidadas, como consequência de más-formações congênitas e problemas ósseos com morfologia complexa e/ou com dimensão que exceda o tamanho crítico (EMI, 2014; TORRES, 2016). Os diversos tipos e locais de aplicação para os biomateriais de substituição óssea são apresentados na Figura 2 (p. 27).

Os biocimentos são um importante exemplo de biomaterial de substituição óssea. Eles são compostos sintéticos reabsorvíveis ou parcialmente inertes que são amplamente usados como materiais de preenchimento de cavidades e pequenos defeitos ósseos (os enxertos), também em procedimentos de fixação de próteses (PRAKASAM *et al.*, 2015 e MORÚA *et al.*, 2017). São formados por um componente em pó e outro líquido que, depois de misturados, dão origem a uma massa viscosa que se altera ao longo do tempo e endurece (CHEN *et al.*, 2015). Dentre os tipos de biocimentos temos os poliméricos (cimentos ósseos acrílicos - ABCs), os cerâmicos (cimentos ósseos de fosfato de cálcio – CFCs ou de sulfato de cálcio – CSCs) e os compósitos cimentos (CICs) (LEWIS, 2006).



Figura 2 - Aplicações biomédicas de biomateriais de substituição óssea

Fonte: Adaptado de Hench (1993).

Os cimentos acrílicos de polimetilmetacrilato (PMMA) são biocimentos amplamente utilizados em cirurgias do quadril, coluna vertebral, artroplastias e, também, como componentes principais para fixar as próteses dentro dos ossos (MORÚA *et al.*, 2017). Isso se deve a sua baixa toxicidade, adequada resistência mecânica e facilidade de preparação e aplicação. Contudo, biocimentos de PMMA podem apresentar desvantagens, entre as quais destacam-se: a necrose térmica local devido à temperatura gerada no processo de polimerização, que em alguns casos pode exceder 80 °C; a necrose química local devido à lixiviação do polímero, que está relacionada à sua toxicidade; a destruição óssea provocada pela reação inflamatória advinda da interação entre o cimento e o tecido local (PALMER *et al.*, 2016 e PAZ, 2017). Apesar das desvantagens, próteses fixadas com cimentos acrílicos em pacientes acima de 50 anos tem probabilidade de 90% de perdurarem por 15 anos – os resultados são dependentes de outros fatores como forma de fixação da prótese, técnica de cementação e características pessoais do paciente (CHEN *et al.*, 2015).

Os biocimentos CSCs apresentam como desvantagem uma baixa resistência mecânica, característica de materiais cerâmicos, o que torna seu uso bastante restrito. Todavia, é um ótimo candidato a compor sistemas de liberação de drogas, uma vez que apresenta taxa de reabsorção rápida em relação aos outros cimentos (RAMALHO, 2010).

Os CFCs apresentam a vantagem de serem quimicamente similares à matriz óssea, apresentarem excelente biocompatibilidade, osteocondutividade, bioatividade (em alguns casos), ausência de toxicidade e taxas de degradação variáveis (ELIAZ et al., 2017). Os CFCs são utilizados como materiais injetáveis para preencher os vazios ósseos, reparação de defeitos, reconstrução óssea e melhorar a fixação de estruturas nos casos de perda e fratura óssea causadas por osteoporose (FRANCZAK, 2014; INGRID, 2018). Os usos dos CFCs vão além dos cimentos, sendo também utilizados como material para revestimentos, sistemas de liberação de medicamentos, scaffolds е pastas moldáveis em aplicações médicas e odontológicas (CANAL; GINEBRA, 2011; ELIAZ, 2017).

No entanto, os CFCs apresentam deficiência em suas propriedades mecânicas, o que limita seu uso a aplicações nas quais é necessário cimento com características

estruturais (CANAL; GINEBRA, 2011; PALMER *et al.*, 2016). A melhoria da resistência mecânica dos CFCs levaria a ampliação considerável de seu campo de aplicações, tal como no reparo de múltiplas fraturas de ossos longos, fixação de próteses cimentadas ou substituição de próteses em corpos vertebrais, dentre outros (CANAL; GINEBRA, 2011).

3.3 Biomateriais cerâmicos de fosfato de cálcio

Os compostos cerâmicos de fosfato de cálcio (FC) são estudados há cerca de um século como materiais de substituição óssea. Porém, a partir do início dos anos 80, com o desenvolvimento dos cimentos de fosfato de cálcio, o seu potencial clínico aumentou (HENCH, 1993). O crescente interesse pelos CFCs aconteceu devido à sua semelhança química com a matriz óssea dos mamíferos e se ampliou por serem materiais que podem ser moldados e apresentarem capacidade de endurecimento *in situ*, proporcionando estabilidade (O'NEILL *et al.*, 2017).

Os tipos de FC variam de acordo com a proporção molar entre cálcio e fosforo - Ca/P. Os vários tipos de FC relevantes para fabricação dos CFCs são apresentados na Tabela 3.

Razão molar Ca/P	Fosfatos de cálcio	Sigla	Fórmulas
0,5	Fosfato de monocálcio monohidratado	MCPM	Ca(H ₂ PO ₄) ₂ .H ₂ O
0,5	Fosfato de monocálcio anidro	MCPA	Ca(H ₂ PO ₄) ₂
1,0	Fosfato de dicálcio dihidratado	DCPD	Ca(HPO ₄).2H ₂ O
1,0	Fosfato de dicálcio anidro	DCPA	Ca(HPO ₄)
1,33	Fosfato de octacálcio	OCP	Ca ₈ (HPO ₄) ₂ (PO ₄) ₄ .5H ₂ O
1,2 – 2,2	Fosfato de cálcio amorfo	ACP	Ca _x H _y (PO ₄) _z .nH ₂ O, n=3-4.5
1,5 – 1,67	Hidroxiapatita deficiente em cálcio	CDHA	Ca ₉ (HPO ₄)(PO ₄) ₅ (OH)
1,5	Fosfato Tricálcio α	α-TCP	α-Ca ₃ (PO ₄) ₂
1,5	Fosfato Tricálcio β	β-ΤСΡ	β-Ca ₃ (PO ₄) ₂
1,67	Hidroxiapatita	HA	Ca ₁₀ (PO ₄) ₆ (OH) ₂
2,0	Fosfato de tetracálcio	TTCP	Ca4(PO4)2O
		10	

Tabela 3 - Fosfatos de cálcio relevantes no desenvolvimento de biocimentos

Fonte: Ramalho (2010).

Para que os CFCs tenham desempenho adequado para aplicações biomédicas, precisam apresentar as características listadas na Tabela 4.

Propriedade	Definição / Função		
Bioatividado	A capacidade do material para participar em reações biológicas específicas		
Dibalividade	ou ter um efeito sobre tecidos vivos.		
Biocompatibilidado	A capacidade de um material apresentar resposta biológica adequada ao		
Diocompatibilidade	local de sua aplicação.		
Fixação Bioativa	Superfícies reativas formam ligação química com o osso, minimizando assim		
T IAÇão Dioaliva	a formação de cápsula.		
Bioestabilidade	A capacidade de um material em manter suas propriedades in vivo.		
Estabilidade interfacial	Evite felhas masâniase esh candisãos de corres		
e boa adesão	Evita fairias mecanicas sob condições de carga.		
Osseointegração	Ancoragem direta do implante pela formação de tecido ósseo em torno dele.		
Osteocondução	Capacidade de fornecer um andaime para a formação de novo osso.		
Osteoindução	O processo pelo qual a osteogênese é induzida.		
Popheoroão	Degradação gradual ao longo do tempo para substituir o biomaterial pelo		
Reabsolção	tecido hospedeiro natural.		
Molhabilidada	A propriedade que indica a capacidade de um material de atrair / repelir		
womaniiuaue	moléculas de água.		

Tabela 4 - Propriedades requeridas para fosfatos de cálcio para aplicações médicas

Fonte: Adaptado de Eliaz (2017).

O ambiente altamente complexo do corpo requer que os CFCs apresentem taxas de degradação equilibrada, a fim de que ocorra reabsorção do material implantado e crescimento de novo tecido ósseo de forma simultânea (LU *et al.*, 2018). Bohner (2000) afirma que a taxa de degradação dos FC *in situ* segue a seguinte ordem:

ACP > MCPM > TTCP
$$\approx \alpha$$
-TCP > DCPD > OCP > β -TCP > HA

Os biocimentos de fosfato de cálcio, principalmente hidroxiapatita (HA) e tricálciofosfato (β-TCP), têm sido muito estudados devido à sua aplicação como materiais para sustentação e preenchimento de tecidos duros, revestimento e sistemas de liberação de fármacos. A HA é um material bioativo, capaz de desenvolver uma ligação química com o osso, possuindo melhor fixação quando comparada a materiais bioinertes ou biotolerantes. Ela pode ser utilizada na forma de corpos densos ou porosos. Os tricálciofosfatos (TCP) são considerados materiais reabsorvíveis, que em contato com os fluidos corpóreos tendem a se desintegrar em certas condições de pH, o que permite sua substituição por tecido ósseo (HENCH, 1993; ORÉFICE *et al.*, 2012).

O uso combinado destas duas cerâmicas tem despertado o interesse da área médica, uma vez que ambas são biocompatíveis e há vantagens em se somar a característica de um material de superfície ativa - a HA - com a capacidade de reabsorção do β-TCP. A bioatividade destes materiais implica na formação de carbonato apatita, sem levar em conta o local do implante, além de apresentar um processo de calcificação sem diferenciação celular. No material bifásico, as propriedades específicas de cada um de seus componentes fornecem uma resposta in vitro mais rápida em relação às cerâmicas monofásicas de HA ou β-TCP. Estudos têm demonstrado uma precipitação mais acentuada de íons Ca⁺² e PO4⁻³ no caso de cerâmicas bifásicas, ocasionando a formação da camada de apatita em um tempo mais curto, o que facilita a reconstrução do tecido ósseo. A mistura de HA e β-TCP apresenta a mesma evolução e adaptação para os tecidos, evitando dessa forma a formação de calosidades, o enfraquecimento da estrutura, infecções e degeneração ou formação caótica de tecido. As reações de cálcio e fósforo na interface osso/implante representam um processo dinâmico, incluindo processos físico-químicos, interações cristal/proteína, colonização de células e tecidos, remodelamento ósseo e, finalmente, contribuição para a resistência da interface (HENCH, 1993; ORÉFICE et al., 2012).

Como já mencionado, os biomateriais de FC, tal como os CFCs, apresentam excelente biocompatibilidade, osteocondutividade, bioatividade (em alguns casos), ausência de toxicidade e taxas de degradação variáveis. A similaridade entre o CFC e o tecido ósseo favorece a interação entre o biomaterial e o tecido vivo, com a formação de uma ligação entre eles (ORÉFICE *et al.*, 2012). Uma das principais características dos CFCs é a de serem capazes de endurecer in vivo, por meio de uma reação de baixa temperatura (CANAL; GINEBRA, 2011). O fato de apresentarem-se sob a forma de pasta que endurece in situ permite que defeitos com qualquer geometria sejam estabilizados. Sendo assim, os CFCs podem ser particularmente adequados para uso em técnicas cirúrgicas minimamente invasivas, desde que as suas propriedades de fluxo sejam adequadas (CURREY, 2002; LU, 2018). Dessa forma, os CFCs elencaram características as quais permitiram seu uso injetável em cirurgias percutâneas para preencher defeitos ósseos e estabilização de fraturas (O'NEILL *et al.*, 2017).

3.4 Processamento do cimento de CFC

O processamento do CFC pode ser realizado por meio da produção da matriz de FC – que é a mistura dos pós de um ou mais tipos de FC – com os aditivos adequados, seguido pela incorporação de uma parte líquida ao pó - podendo ser líquida ou uma solução aquosa, para formação da pasta cimentícia (BOHNER, 2005b; CANAL; GINEBRA, 2011).

3.4.1 O processamento da pasta cimentícia

A mistura da parte sólida, o pó de CFC, com a parte líquida, solução aceleradora de cura, forma a pasta cimentícia. Essa mistura precisa ocorrer em ambiente esterilizado, em tempo adequado e, segundo Ramalho (2010), este processo deve ser feito sem que bolhas de ar penetrem no cimento. Durante a mistura, ocorre a dissolução dos FCs até a sua precipitação em cristais menos solúveis. Estes cristais vão aumentando de tamanho por meio do seu entrecruzamento e inicia-se o endurecimento - ou pega - do material. Esse processo pode acontecer à temperatura ambiente ou à corporal (BOHNER, 2005b; CANAL; GINEBRA, 2011).

O processo pode ocorrer de várias formas: na mistura manual o pó de CFC é adicionado ao líquido em um recipiente polimérico (usualmente polipropileno); depois os materiais são misturados com auxílio de uma espátula por um período de 45 a 120s; em seguida, a pasta formada é transferida para uma seringa que será usada para aplicação do material. No processo de mistura com centrifugação, após ocorrer a mistura manual e transferência da pasta para uma seringa, essa é colocada numa centrífuga por um período de 30 a 180s, com velocidade entre 2300-4000 rpm (LEWIS, 2002). Já na mistura mecânica o processo acontece com ajuda de misturadores mecânicos, que facilitam o trabalho de ajuste da viscosidade adequada para o material ser injetado e permitem a colocação da pasta rapidamente dentro da seringa (DOROZHKIN, 2008).

3.4.2 Aditivos Cerâmicos

Os principais aditivos normalmente empregados nos processos de conformação de CFC são: meios líquidos, catalisadores, ligantes, defloculantes, plastificantes e lubrificantes. O ligante proporciona adequada resistência para o manuseio; o plastificante modifica o ligante para torná-lo mais flexível; os lubrificantes reduzem a fricção interpartículas e entre estas e as paredes do molde. Os efeitos combinados dos aditivos são: permitir que as partículas de pó cerâmico deslizem para alcançar o arranjo mais empacotado; promover pressão equivalente em todas as regiões das biocerâmicas granuladas (RIBEIRO *et al.*, 2002).

Um dos principais aditivos utilizados no processamento são os ligantes, definidos como aditivos usados para melhorar a resistência mecânica do produto conformado (resistência a verde), para permitir o manuseio antes da densificação pela queima. Outros nomes/funções: umidificante, espessante, plastificante, agente suspensor, reológico, de retenção de líquido e de consistência (REED, 1995).

Alguns exemplos de ligantes são:

- Celulósicos carboximetilcelulose (CMC), hidroxietilcelulose (HEC), metilcelulose (MC) e celulose microcristalina;
- Argilas ou argilominerais caulim, ball clay, bentonita;
- Vinílico álcool polivinílico (PVA), polimetilmetacrilato (PMMA) ou acetato de polivinila (PVAc);
- Silicatos solúveis, fosfatos solúveis ou aluminatos solúveis;
- Glicóis poli(etilenoglicol) (PEG);
- Ceras (parafinas).

Plastificantes são aditivos usados para modificar as propriedades viscoelásticas do sistema ligante-partícula, os quais têm moléculas menores que as dos ligantes, reduzindo as forças de Van der Waals, aumentando a flexibilidade, reduzindo a resistência mecânica e diminuindo a temperatura de transição vítrea (REED, 1995).

Em geral, na produção de CFCs são incorporados pelo menos dois aditivos aos fosfatos de cálcio (HA ou Ca₅(PO₄)₃OH e ACP ou Ca₃(PO₄)₂.nH₂O), sendo um deles obrigatoriamente um catalisador inorgânico, no caso o fosfato dibásico de sódio (Na₂HPO₄). Os pós de fosfatos de cálcio são misturados juntamente com a solução do Na₂HPO₄, utilizado como catalisador ou acelerador de cura dos CFCs na concentração de 2 a 5%m/v dissolvido em água destilada (FERNANDES *et al.*, 2012).

3.4.2.1 Carboximetilcelulose

A carboximetilcelulose é obtida da celulose e tem a função de atuar como ligante. Ela é produzida desde os anos de 1920 e utilizada em um grande número de aplicações, como produtos alimentícios, cosméticos e farmacêuticos, em grandes quantidades e com um custo muito baixo (BARBUCCI, 2005).

A celulose é o polímero natural mais abundante na Terra e é o principal componente estrutural da parede celular dos vegetais - um polissacarídeo linear constituído por unidades de D-glucose ligadas covalentemente por ligações β -1,4. O polímero de celulose apresenta locais disponíveis para reações, permitindo a produção de vários derivados caracterizados pela presença de novos grupos funcionais. Na Figura 3 pode-se observar a estrutura química do polímero de celulose. Cada unidade de β -1,4 D-glucose na cadeia de celulose tem três grupos hidroxila (OH), cada uma dos quais capaz de se ligar através de ligação de hidrogênio a uma molécula adjacente (HEINZE, 2005).



Figura 3 - Representação química da molécula de celulose.

Fonte: Adaptado de Araújo Júnior (2014).

A modificação química de polissacarídeos é a mais importante rota para alteração das propriedades dos polímeros naturais. A carboximetilação é uma conversão

amplamente estudada e gera produtos e derivados com uma variabilidade de propriedades promissoras. Os polímeros naturais a base de celulose como a carboximetilcelulose têm despertado enorme interesse no desenvolvimento de estratégias terapêuticas pela grande disponibilidade desta macromolécula na natureza e por suas características físico-químicas similares a polissacarídeos naturais sem degradação rápida (LEONE, 2008).

A carboximetilcelulose é um produto resultante do tratamento da celulose com solução de hidróxido de sódio (NaOH) em uma primeira etapa e em uma segunda etapa com o monocloroacetato de sódio (CICH₂-COO⁻ Na⁺). Após estas etapas, ocorre a substituição parcial de grupos hidroxilas da glicose pelos grupos carboximetil -CH₂-COOH e assim a produção do CMC (ADEL, 2010). Os grupos hidroxila substituídos por grupos carboximetil na estrutura molecular da carboximetilcelulose são apresentados na Figura 4.

Figura 4 - Estrutura molecular da carboximetilcelulose.



R=H ou R=CH₂COONa; de acordo com o grau de substituição Fonte: Heinze (2005).

As fórmulas das etapas da produção da carboximetilcelulose foram descritas abaixo:

Primeira etapa: $R-OH + NaOH \rightarrow R-O^{-}Na^{+} + H_{2}O$ (1)

Segunda etapa:
$$R-O^{-}Na^{+} + CI-CH_{2}-COONa \rightarrow R-O-CH_{2}-COO^{-}Na^{+} + NaCl$$
 (2)

O número médio dos grupos carboximetil por unidade de glicose é denominado grau de substituição (DS), o que pode variar e também determinar as propriedades deste polímero.
Pode-se observar na Figura 5 a estrutura molecular da carboximetilcelulose com os átomos representados como esferas e codificados por cores.



Figura 5 - Modelo da estrutura molecular da carboximetilcelulose.

Fonte: LibrarySciencephoto (2017).

Nesta figura o carbono está representado na cor azul, o hidrogênio na cor ouro, o oxigênio na cor vermelha e os íons de sódio na cor roxa. A presença de substituintes com grupos -CH₂-COOH na cadeia de celulose produz um afastamento das cadeias poliméricas e permite uma maior penetração de água, conferindo ao CMC capacidade de absorver e reter água (HEINZE, 2005).

3.4.3 Material de reforço

Nos últimos anos, os alótropos do carbono como o diamante e a grafita e outras sintéticas como o fulereno, grafeno (GO) e nanotubos de carbono, vem sendo pesquisados como os reforço de matrizes de compósitos. O GO, óxido de grafeno (OG) e o óxido de grafeno reduzido (OGR) têm sido considerados como materiais mais promissores para serem utilizados como reforço nos mais diversos tipos de matrizes (OSÓRIO, 2018).

De acordo com a IUPAC, o GO consiste em uma folha plana de átomos de carbono em ligação sp² densamente compactados e com espessura de apenas um átomo, reunidos em uma estrutura cristalina hexagonal, conforme Figura 6 (p.37).



Figura 6 - Estrutura do grafeno

Fonte: Adaptado de Foo e Gopinath (2017).

Já o OG possui uma estrutura derivada do GO caracterizada pela presença de grupos funcionais oxigenados, que em sua maioria são hidroxila (-OH) e epóxi (-O-) na superfície e extremidades da folha de carbono (LIU *et al.*, 2012; KU; PARK, 2013), conforme Figura 7.





Fonte: Liu et al. (2012).

A falta de homogeneidade da estrutura e presença de defeitos está diretamente relacionada ao grau de oxidação, que é determinado por sua vez pelo processo de produção. Os óxidos de grafeno apresentam vantagens em relação ao GO como melhor solubilidade e estabilidade em meio aquoso, como é o caso do cimento de fosfato de cálcio. O OGR pode ser obtido como produto da redução de OG por tratamento térmico, químico ou elétrico. A estrutura gerada apresenta ainda alguns grupos funcionais oxigenados e grande número de defeitos.

A espectroscopia Raman é utilizada para caracterizar materiais grafênicos, observando-se as bandas D e G do espectro. A banda D do OG pode ser encontrada entre 1300 e 1450 cm⁻¹ e a banda G entre 1550 e 1650 cm⁻¹ (GUERRERO-CONTRERAS, 2015). O espectro Raman do OGR é caracterizado pela presença do pico D de maior intensidade que o pico G (KOSTIUK *et al.*, 2016), conforme Figura 8.



Fonte: Adaptado de Perumbilavil et al. (2015).

Algumas das aplicações destes materiais são o uso como reforço de propriedades mecânicas, também são usados em biomateriais com memória de forma, em isolantes térmicos de alto desempenho a base de celulose. Na indústria dos biomateriais, por exemplo, estes materiais são estudos como reforços de cimentos ósseos, seja ele polimérico ou cerâmico (GONÇALVES *et al.*, 2012; ZHI *et al.*, 2013).

Segundo Li (2015), o módulo de Young efetivo do OG é em média 250 GPa, com relatos na literatura que variam entre 207 e 470 GPa, dependendo de sua organização e distribuição dos grupos funcionais. Sua resistência à tração que varia entre aproximadamente 30 e 48 GPa (SUK *et al.*, 2010; LIU *et al.*, 2012). Além das características mecânicas, o OG possui ótimas propriedades biológicas, sendo biocompatível e apresentando capacidade de acelerar a adesão, proliferação e diferenciação de células tronco mesenquimais em células osteogênicas em mioblastos (LEE *et al.*, 2011; KU; PARK, 2013).

Apesar dos CFCs terem semelhança com a fase mineral do osso, suas propriedades mecânicas - resistência mecânica, tenacidade, ductilidade e resistência à fadiga – são inferiores às apresentadas pelo osso cortical ou mesmo do esponjoso (CANAL;

GINEBRA, 2011). A incorporação do OG, por exemplo, na matriz do cimento pode aumentar consideravelmente a sua resistência à flexão e à tração (LU *et al.*, 2017), além de reforço. Estudos mostram que estes materiais possibilitaram redução de tempo de pega do biocimento de fosfato de cálcio (WANG *et al.*, 2017; BOEHM *et al.*, 2018).

3.4.4 Razão líquido/sólido

A razão líquido/pó influencia significativamente as propriedades dos CFCs. Segundo Bohner (2005a), a injetabilidade é muito influenciada por essa razão, pois quanto maior a razão líquido/pó menos viscoso o material e maior a sua injetabilidade. Alves (2008) afirma que a razão líquido/pó de 0,35 representa a menor quantidade de líquido necessário para obter trabalhabilidade dos cimentos ósseos.

A porosidade do CFC está intimamente relacionada com a relação líquido/pó da pasta cimentícia. Segundo O'Neill *et al.* (2017), uma pequena parte da água adicionada para fazer a pasta cimentícia é usada pela reação de cura; o restante ocupa espaços entre partículas do material e é responsável por dar trabalhabilidade ao cimento. Os cimentos cerâmicos diminuem exponencialmente as suas propriedades mecânicas com o aumento da porosidade. Assim, quanto mais água usada para fazer a pasta cimentícia, maior a relação líquido/pó e mais poroso e mais frágil o cimento. De forma oposta, quando a razão líquido/pó é diminuída, menos líquido está presente na mistura, ocorre uma diminuição da porosidade e tende a ser um cimento mais robusto mecanicamente (BOHNER, 2005a).

3.4.5 Tempo de pega

A pega, ou endurecimento, dos CFCs ocorre pelos mecanismos de dissolução e reprecipitação. Inicialmente, ocorre dissolução dos reagentes com liberação de íons cálcio e fosfato, levando a supersaturação da solução. Quando a concentração iônica atinge níveis críticos acontece a nucleação de cristais e em seguida seu crescimento. Durante o crescimento, os cristais se entrecruzam fazendo o CFC perder propriedades viscoelásticas, tornando-se uma massa sólida (ZHANG *et al.*, 2014).

Diferente dos cimentos de PMMA, que endurecem num processo rápido de polimerização e com relevante aumento de temperatura, os CFCs curam em um processo de hidratação com reações exotérmicas lentas, com pouco aumento de temperatura e com mínima redução de volume. Isso é benéfico para aplicações clínicas, pois o excesso de temperatura pode levar a necrose celular local e a retração fixação do material pode prejudicar а sua com 0 tecido do hospedeiro (RAMALHO, 2010).

O tempo de pega dos CFCs é um dos índices importantes para avaliar o seu desempenho. O tempo de pega apropriado não apenas ajuda a operação clínica do médico, mas também alivia a dor dos pacientes (WANG *et al.*, 2017). Esse tempo deve ser lento o suficiente para permitir que o cirurgião processe a pasta cimentícia e faça o implante, porém, rápido o bastante para evitar atrasos na operação, pois deformações durante o tempo de cura podem levar a rachaduras no cimento implantado (ELIAZ, 2017).

Vários fatores podem afetar o tempo de cura - *setting time* - do cimento ósseo. Dentre eles: o tamanho da partícula do pó (partículas de pequeno tamanho reduzem esse tempo); a relação líquido pó usada para confecção da pasta cimentícia (quantidades pequenas de água levam a redução do tempo de cura); adição de íons de cálcio e/ou de fosfato dissolvidos na fase líquida (o aumento da concentração desses íons leva a redução do tempo de cura); adição de crescimento de cristais levam a aumento do tempo de cura (BOHNER, 2005b).

Jansen *et al.* (2005) afirmam que o tempo de cura pode variar dependendo do procedimento cirúrgico realizado. Nas cirurgias ortopédicas, o tempo inicial de cura deve ficar perto dos 8 minutos e o tempo final deve ser menor que 15 minutos; já nos procedimentos odontológicos a cura inicial deve ser atingida próxima de 3 minutos e a final também deve ser inferior a 15 minutos.

3.5 Propriedades biológicas dos Compósitos de CFC

Os biocimentos de fosfato de cálcio têm atraído atenção como biomaterial adequado ao uso biomédico por apresentarem características biológicas adequadas ao desenvolvimento de biomateriais para preenchimentos e/ou implantes ósseos. Este material apresenta composição química semelhante à fase mineral dos ossos e dentes (íons fosfato e cálcio) e demonstra excelente biocompatibilidade e bioatividade, uma vez que possui capacidade de formar ligações com o tecido hospedeiro, sem gerar resposta inflamatória e nem estimular formação de tecido fibroso, permitindo um excelente contato entre o implante e o osso (FERNANDES *et al.,* 2012).

Além disso, os CFCs apresentam boa moldabilidade, conseguem se adequar a pequenas cavidades sem que o material precise ser moldado previamente, endurecem *in situ* e sua preparação pode ocorrer durante o ato cirúrgico. Tais características lhe dão vantagens sobre os cimentos de fosfato de cálcio convencionais e os cimentos acrílicos como materiais para enxerto e substituição óssea (HENCH 1993; FERNANDES *et al.*, 2012).

Segundo Hench (1993), há diversos tipos de sistemas de CFCs estudados. Aqueles baseados no fosfato tricálcico (α-TCP) são de especial interesse, pois a sua obtenção acontece durante a reação de cura de uma fase da hidroxiapatita deficiente em cálcio (CDHA), que é similar à hidroxiapatita óssea. O interesse por este composto é manifestado em diversos estudos devido à sua natureza reabsorvível e capacidade de promover regeneração da estrutura óssea envolvida no implante, o que acontece também com o fosfato de cálcio amorfo (ACP). A hidroxiapatita (HA) faz ligações com o tecido ósseo local, permitindo a proliferação das células ósseas e favorecendo o crescimento ósseo, pois as células não distinguem a HA e a superfície óssea. Este fato indica a elevada semelhança química superficial entre o material ósseo e a HA.

O CFC apresenta uma desvantagem conhecida, a sua baixa resistência mecânica. Estudos mostram que ela chega a se igualar ao osso trabecular ou mesmo a quinta parte da resistência mecânica do osso cortical. O aumento da resistência deste material pode ampliar suas aplicações biomédicas, podendo ser indicados para uso em cirurgias de fraturas múltiplas dos ossos longos, fixação de próteses cimentadas e vertebroplastias (FERNANDES *et al.*, 2012).

3.6 Propriedades mecânicas dos compósitos cerâmicos de CFC

Os CFCs idealmente precisam apresentar propriedades mecânicas semelhantes às do tecido ósseo onde o CFC será usado como material de reparação (AJAXON *et al.* 2017). Os CFCs são materiais cerâmicos e, por isso, apresentam comportamento mecânico que limitam suas aplicações. Isso acontece devido ao fato de os cerâmicos apresentarem elevado módulo de elasticidade e baixa tenacidade à fratura. O elevado módulo de elasticidade e baixa tenacidade à fratura. O elevado módulo de elasticidade e a quase inexistência de comportamento plástico é típico de materiais frágeis, ou seja, materiais que absorvem pouca energia na forma de deformação plástica e se rompem antes do regime plástico (CALLISTER, 2016).

A representação esquemática de um gráfico tensão versus deformação comparando materiais frágeis (tipicamente os cerâmicos) e materiais dúcteis (usualmente os polímeros e metais) pode ser visto na Figura 9.

Figura 9 - Curva representativa de tensão-deformação para material frágil e dúctil



Na Figura 9 as letras B e B' representam a tensão de ruptura dos materiais e C e C' deformação. A área abaixo da curva representa a energia absorvida pelo material, ou tenacidade. Pode-se observar que os materiais dúcteis absorvem mais energia que os frágeis.

Nas cerâmicas, a tenacidade à fratura representa a energia mecânica requerida para dar início e propagar uma trinca até que aconteça a ruptura do material. A tenacidade pode ser calculada através da equação (3), p.43, e é considerada uma propriedade mecânica muito importante para aplicação estrutural. A tenacidade à fratura de materiais cerâmicos, geralmente, apresenta valores mais baixos se comparados aos metais (SANTANA, 2015).

$$K_{IC} = Y. \sigma_f. \sqrt{\pi.c} \tag{3}$$

Sendo, " K_{IC} " a tenacidade à fratura em deformação plana, "Y" o fator geométrico adimensional que depende do estado de tensão e da geometria da amostra e da trinca, " σ_f " a tensão aplicada e "c" comprimento de uma trinca de tamanho crítico na superfície ou metade do comprimento de uma trinca crítica no interior do material.

Devido à presença destas características limitadoras ao uso dos materiais cerâmicos, é necessário a utilização de técnicas que possibilitem a melhoria das suas propriedades mecânicas. A tempera por processos térmicos e químicos é bastante usada para incremento de propriedades mecânica de cerâmicas, em especial os vidros. Além disso, a incorporação ao cerâmico de fase de reforço – polimérica, metálica ou mesmo cerâmica - pode levar a melhoria das propriedades mecânicas, daí estes materiais serem denominados compósitos cerâmicos (REED, 1995).

Os biomateriais cerâmicos compósitos surgiram com o objetivo de melhorar as propriedades mecânicas em relação aos cerâmicos puros. Estudos mostram que compósitos biocerâmicos apresentam melhores propriedades mecânicas em relação às cerâmicas monolíticas, pois a adição de uma fase de reforço pode levar ao aumento da resistência mecânica, diminuição do módulo de elasticidade e elevação da tenacidade à fratura (SANTANA, 2015).

Segundo Callister (2016) Nos compósitos, cada fase constituinte contribui para formação do módulo de elasticidade do material seguindo a regra da mistura, sendo que as contribuições dependem apenas da fração volumétrica de cada componente. Dessa forma, estima-se o limite superior $E_c(u)$ e o limite inferior $E_c(l)$ do módulo de elasticidade - conforme equações (4) e (5), p.44, sendo, c, m e p, compósito, matriz e partícula, respectivamente, E como módulo de elasticidade e V com fração volumétrica (%v/v). Dessa forma espera-se que o módulo de elasticidade do compósito esteja entre o da matriz e o do reforço.

$$E_c(u) = E_m \cdot V_m + E_p \cdot V_p \tag{4}$$

$$E_c(l) = \frac{E_m \cdot V_p}{V_m \cdot E_p + V_p \cdot E_m}$$
(5)

No entanto, Fermino (2015) afirma que a regra da mistura não leva em conta a presença de espaços vazios no material e nem considera outros fatores de interação. Porém, quando a fase de reforço é um nanomaterial, as características dimensionais do reforço (área superficial e razão de aspecto), sua dispersão na matriz e a compatibilidade interfacial influenciam no comportamento final do compósito.

Santana (2015) afirma que se as nanopartículas de reforço não estiverem bem dispersas, elas podem aglomerar-se formando pontos concentradores de tensão e assim prejudicarem as propriedades mecânicas do material. Por outro lado, segundo Fermino (2015), se a dispersão do material estiver adequada e a interação interfacial tiver boa qualidade, a grande área superficial, típica dos nanomateriais, levará ao aumento da área de interação interfases e melhora significativa do módulo de elasticidade do material.

A região compreendida entre a matriz e o reforço é descrita como região de interface ou interfase. Trata-se de uma região importante pois, tal como as propriedades da matriz, do material de reforço, a qualidade das interações entre as fases afeta as características e o desempenho final dos compósitos (LUZ, 2008).

Fermino (2015) afirma que quanto maiores as interações interfaciais entre as fases do compósito, maior o efeito que o reforço causa. Por outro lado, quando a adesão interfacial é fraca os efeitos esperados pela adição do reforço, como a melhoria das propriedades mecânicas, podem não acontecer.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

Para este trabalho, seguiu-se a rota de aprimoramento de um cimento ósseo de fosfato de cálcio reforçado com óxido de grafeno nanoplacas buscando um tempo de endurecimento rápido, com características apropriadas para aplicações clínicas de reparação óssea, conforme ilustrado no fluxograma da Figura 10.



Figura 10 - Fluxo das etapas do estudo

Fonte: Autor.

A primeira etapa da pesquisa consistiu na busca de doações das matérias primas junto a empresa Phosther Tecnologia de Aglomerações Ltda (Santa Luzia/MG) e ao Laboratório de Biomateriais do CEFET/MG (Campus I). Na segunda etapa ocorreu o

processamento do cimento de fosfato de cálcio. Nesta etapa misturou-se os dois pós (fosfato de cálcio bifásico e carboximetilcelulose) mais a solução aquosa de Fosfato de Sódio empregado como agente cura para formação do compósito de fosfato de cálcio. A incorporação do OGN, durante o processamento da pasta de CFC se deu em função da expectativa de elevação da resistência mecânica. Terminando esta etapa com a confecção dos corpos de prova. A terceira etapa consistiu na realização das caracterizações e ensaios propostos.

4.1 Materiais

As matérias primas utilizadas neste trabalho são de grau analítico (PA) e/ou grau farmacêutico (USP) doados pela empresa Phosther Tecnologia de Aglomerações, exceto OGN que foi sintetizado pelo grupo de pesquisa de Biomateriais do CEFET/MG. Foram utilizados neste estudo os seguintes insumos: fosfato de cálcio bifásico (BCP), a carboximetilcelulose e hidrogenofosfato dissódico heptaidratado (FS). Os demais materiais usados neste trabalho foram processados no Laboratório de biomateriais do CEFET/MG, sendo eles: OGN e água destilada.

4.1.1 Fosfato de Cálcio Bifásico

O fosfato de cálcio bifásico (BCP) fornecido pela empresa Phosther Tecnologia de Aglomerações Ltda apresenta uma composição de duas fases, uma cristalina e outra amorfa – contendo a hidroxiapatita (HA) com cerca de 69% e o Fosfato de cálcio amorfo como fase amorfa minoritária com 31%. As demais características físicoquímicas deste material (*data sheet* fornecido pelo fabricante), como a distribuição de tamanhos das nanopartículas de BCP, podem ser observadas no ANEXO A (p. 104), constatando que são formadas por cerca de 100% das nanopartículas com diâmetros abaixo de 0.25µm (250nm) e baixíssimos níveis de contaminantes, conforme estabelece a norma ISO 13779-6: 2015, que especifica os requisitos para os pós de hidroxiapatita usados como matéria prima na fabricação de implantes cirúrgicos ou no revestimento de implantes cirúrgicos.

4.1.2 Carboximetilcelulose

A carboximetilcelulose empregada foi fornecida pela empresa DENVER – Cotia/SP, para formulação do compósito na forma de pó, conforme *data sheet* apresentado no ANEXO B (p. 110). Suas características físico químicas são: grau de pureza de 99,84%, grau de substituição 0,8, teor de umidade de 6,1 (*in natura*), pH 7,0 e viscosidade de 430 cP. Estas características foram avaliadas segundo procedimentos da norma ASTM D 1439 e método de Brookfield.

4.1.3 Hidrogenofosfato dissódico

O fosfato de sódio usado no estudo foi o hidrogenofosfato dissódico heptahidratado -Na₂HPO₄.7H₂O - grau P.A., fornecido pela empresa Dinâmica Química Contemporânea LTDA, com especificações descritas no ANEXO C (página 111). Esse componente foi usado na forma de solução aquosa aceleradora de cura do cimento de fosfato de cálcio.

4.1.4 Óxido de grafeno

O óxido de grafeno foi processado pelo Laboratório de Biomateriais CEFET-MG. A rota de produção utilizada seguiu o método de Hummers modificado. Neste trabalho foi utilizado um OG parcialmente reduzido na forma de placas nanométricas, chamado de óxido de grafeno nanoplacas e denominado OGN, com rota de síntese em pedido de patente em andamento junto aos órgãos internacionais. Foi usado como padrão de referência analítica uma amostra de OG adquirida da empresa Sigma Aldrich, com cerca de 15 a 20 camadas conforme apresentado no ANEXO D.

4.2 Métodos

4.2.1 Composição do material e definição dos grupos amostrais

As proporções de OGN usados no presente estudo foram definidos com base no trabalho de Wang *et al.* (2017), sendo os grupos amostrais nomeados de acordo com a %m/m de OGN, conforme a Tabela 5.

Grupo amostras	ONG 00	ONG 01	ONG 02	ONG 03	ONG 05
%m/m OGN	0,0%	0,1%	0,2%	0,3%	0,5%
		Fonte: Autor.			

Tabela 5 - Grupos amostrais e %m/m de OGN

A razão líquido/pó de 0,8 mL/g de solução aceleradora e a proporção de 3,2%m/m CMC usados na composição do CFC foram determinados com base no estudo realizado por e Bohner (1997) e Alves (2008). A busca inicialmente pela adequação destes parâmetros ocorreu a fim de se obter uma pasta coesa, que possibilitasse a moldagem (conformação plástica) dos corpos de prova.

4.2.2 Preparo da solução aceleradora e incorporação do óxido de grafeno

O OGN foi incorporado a pasta de CFC através da sua dissolução na solução aceleradora. Esse processo começa com a dissolução do OGN em volume de solução aceleradora adequado a confecção do corpo de prova desejado, depois a solução aceleradora rica em OGN é adicionada ao pó de CFC para a formação da pasta cimentícia. As etapas da incorporação do OGN, podem ser vistas na Figura 11.





Fonte: Autor.

A solução aceleradora de cura, formulada para processamento do cimento de fosfato de cálcio, consistiu numa diluição de fosfato de sódio em água destilada a concentração de 5% (GINEBRA *et al.*, 1997).

4.2.3 Formação do pó de cimento de fosfato de cálcio

O pó do cimento de fosfato de cálcio foi preparado através da adição de CMC ao BCP na proporção de 3,2%m/m de CMC. Os pós foram misturados manualmente por 3 min em béquer de vidro com uso de um bastão de vidro, em quantidades de 10g.

4.2.4 Processamento da pasta de cimento ósseo e corpos de prova

As etapas do processamento da pasta cimentícia até a confecção dos corpos de prova podem ser vistas na Figura 12.



Figura 12 - Fluxo de confecção dos corpos de prova



O processo de preparação da pasta de cimento se iniciou com a adição do OGN a solução aceleradora, depois a solução é colocada em um recipiente contendo o pó de cimento. A incorporação da fração líquida aconteceu por meio de uma seringa, preparada antecipadamente com a quantidade total de líquido a ser usado em cada experimento.

Após a formação do pó de CFC e a incorporação da solução aceleradora, procedeuse com a homogeneização manual dessa mistura com auxílio de uma espátula de metal por 3 minutos, para formação da pasta de CFC; em seguida, a pasta foi depositada nos moldes que seguiram para a estufa a (37 ± 3) °C por 24 horas (DRIESSENS *et al.*, 2000; ALBUQUERQUE *et al.*, 2012). Depois de retirados da estufa, os corpos de prova foram desmoldados e encaminhados para os ensaios e caracterizações.

4.2.5 Caracterizações físico-químicas

Foram caracterizados físico quimicamente tanto as matérias primas quanto os corpos de provas (CPs) após o processamento de acordo as condições descritas a seguir.

4.2.5.1 Microscopia eletrônica de varredura e Espectrometria de Energia Dispersiva de raios X

A técnica de microscopia eletrônica de varredura (MEV) acoplada com a espectrometria de energia dispersiva de raios X (EDS) foi utilizada com a finalidade de visualização da topografia (microestrutura) e a realização da análise química elementar semi qualitativa (composição) do pó de OGN e do CFC. Estes procedimentos foram conduzidos no Laboratório de Caracterização do CEFET-MG, utilizando o microscópio MEV acoplado com EDS marca Shimadzu, modelo Superscan SSX – 550. No Centro de Desenvolvimento da Tecnologia Nuclear – CDTN, foi utilizado um MEV de maior resolução lateral (da ordem de 0,5nm), com emissão por efeito de campo (FEG-MEV), modelo SIGMA VP, fabricado pela Carl Zeiss Microscopy com coluna GEMINI® com EDS modelo XFlash 410-M - Bruker Nano GmbH. Em ambas microscopias as amostras foram aspergidas sobre fitas de carbono e em seguida metalizadas com ouro. As amostras foram observadas com detector de elétrons secundários (SE), operados com tensão entre 5 a 15kV.

4.2.5.2 Difratometria de raios X

A Difratometria de raios X (DRX) foi utilizada na caracterização do pó de OGN e CFC com o objetivo de se determinar as fases cristalinas presentes nas amostras e

mudanças cristalográficas ao longo do processamento. O procedimento foi realizado no Laboratório de Difração de Raios X do Centro de Desenvolvimento da Tecnologia Nuclear – CDTN, pelo difratômetro de raios X automático, marca Rigaku, modelo DMAX, com goniômetro Θ-Θ, gerador de raios X de 3kW de alta frequência e câmara de alta temperatura. O ensaio foi realizado à temperatura ambiente. As reflexões obtidas foram comparadas com a base de dados *International Center for Diffration Data (ICDD)* para identificação das fases. A equação de Scherrer (6), conforme Guerrero-Contreras (2015), foi utilizada para cálculo dos cristalitos (menor cristal dos materiais):

$$\tau = \frac{0.89.\,\lambda}{\beta.\,\cos\theta}\tag{6}$$

Onde: τ é a ordem de tamanho médio dos cristalitos (*crystallites*) que podem ser maiores ou iguais ao tamanho de grão. K é o fator de forma (adimensional) com valor típico da ordem 0,89; λ é o cumprimento de onda; β é a largura a meia altura do pico principal; e θ é o ângulo deste pico obtido pela lei de Bragg.

No intuito de comparar o número de camadas do OGN produzido no CEFET com o OGN da Sigma Aldrich (padrão comercial), foi realizado DRX de 3 amostras do lote material produzidos no CEFET, denominadas OGN A, B e C, e de três frascos diferentes das amostras de OGN da Sigma Aldrich, denominadas Sigma A, B e C. A Lei de Bragg e a Equação de Scherrer (CONTRERAS, 2015) também foram utilizadas para tratar os dados obtidos pelo DRX das amostras de OGN produzidas no CEFET e das amostras da Sigma Aldrich.

4.2.5.3 Espectroscopia Raman do OGN

A espectroscopia Raman foi utilizada na caracterização do pó de OGN, com o objetivo de se determinar as características estruturais do material. A Espectroscopia Raman é uma técnica de caracterização tradicionalmente utilizada para verificar as propriedades químicas e estruturais de nanomateriais (e.g. GOs e OGN) através da medida da energia dos modos vibracionais e de rotação da estrutura do material (PAES, 2016). O equipamento utilizado nesse trabalho foi um espectrômetro de

espalhamento Raman do fabricante HORIBA Scientific, modelo LabRAM HR Evolution, instalado no LABAS/INPE. As medidas foram feitas com os lasers de argônio (514nm) e hélio-neônio (633nm), numa faixa de varredura de 100 a 4000cm⁻¹.

4.2.6 Ensaios realizados no biocompósito

4.2.6.1 Tempo de pega

Os ensaios para determinação dos tempos de pega inicial e final da pasta de CFC foram realizados no Laboratório de Biomateriais do CEFET-MG, com o uso aparelho de Vicat e tendo como base os trabalhos de Jia *et al.* (2010), Baudín *et al.* (2019) e da norma ABNT NBR 12128. Os corpos de prova foram preparados em moldes poliméricos de dimensões Ø 15mm x 10mm, como apresentado na Figura 13, em que a pasta cimentícia foi depositada e depois levada à estufa à temperatura de 38°C.

Figura 13 - Molde e corpo de prova para ensaio de tempo de pega



a) Corpo de prova; b) Molde Fonte: Autor.

A cada 5 minutos uma amostra foi retirada da estufa e submetida ao ensaio. Neste trabalho, o tempo inicial e final de pega do CFC foi determinado com a utilização da agulha de Ø 1mm (Figura 14, p.53).



Figura 14 - Aparelho de Vicat montado para o ensaio

Fonte: Autor.

O tempo inicial correspondeu ao tempo, em minutos, decorrido desde a introdução dos corpos de prova na estufa até o momento em que a pasta cimentícia apresentou resistência evidente a penetração da agulha, de forma que a mesma apresentasse dificuldade de penetração no material; o tempo final foi determinado quando a agulha não conseguiu penetrar o material. Foram realizados em pelo menos quatro replicadas independentes e calculadas o valor médio do tempo inicial e final de pega para cada grupo amostral, os resultados serão apresentados como média amostral e desvio-padrão amostral.

4.2.6.2 Ensaio de Microdureza Vickers

No intuito de estimar a influência do reforço de OGN na resistência mecânica do biocimento, foram realizados ensaios de Microdureza Vickers (HV₁₀₀). Foi utilizado um microdurômetro da marca SHIMADZU modelo HMV do laboratório de Metalografia do CEFET-MG. A carga usada foi de 980mN (0,980N ou 100gf), com tempo de endentação de 30s e lente 40x para visualizar a impressão, procedimento realizado segundo a norma ASTM C1327 – 15 (AQUINO *et al.*, 2017). Os corpos de prova para o ensaio foram preparados em moldes poliméricos de dimensões Ø 15 x 10mm, foram realizadas 5 (cinco) leituras na superfície de cada amostra.

O equipamento utilizado permite medir a dureza Vickers (HV) através da razão entre a carga aplicada (kgf) e a área superficial da impressão (mm²). Após feita a endentação é realizada a medida das diagonais desta impressão e o equipamento calcula a dureza em HV. O ensaio de microdureza foi realizado para avaliar mudanças nas propriedades mecânicas do material à medida que o CFC recebe reforço de OGN.

A dureza Vickers foi calculada pelo equipamento conforme a equação (7).

$$HV = \frac{2 * F * sen(\frac{136^{\circ}}{2})}{d^2} \cong 1,854 \frac{F}{d^2}$$
(7)

Onde: F é a carga aplicada (gf), d média aritmética entre as diagonais (d1 e d2) medidas pelo equipamento (µm) e HV é a dureza Vickers calculada.

4.2.6.3 Ensaios de Flexão a três pontos

Os ensaios de flexão a três pontos foram realizados com o objetivo de avaliar a resistência do material a tração na flexão. Estes ensaios foram realizados no Laboratório de Polímeros do Departamento de Engenharia de Materiais do CEFET/MG. O equipamento utilizado foi uma máquina universal de ensaios SHIMADZU, modelo AG-X, com célula de carga 10kN e sistema de controle e aquisição de Trapezium Lite X. A máquina foi preparada com distância de 30mm entre os dois apoios cilíndricos utilizados, a carga foi aplicada verticalmente no centro do corpo de prova à velocidade de descida de 1mm/min (WANG, 2017). Os corpos de prova foram confeccionados com 6 x 6 x 40mm (altura x espessura x comprimento) e, antes de serem usados no ensaio, passaram por uma inspeção visual a fim de evitar o uso de corpos de prova com rachaduras aparentes.

A norma ASTM C1161 – 18, bem como os trabalhos de Bertol *et al.* (2010) e de Boehm *et al.* (2018) foram usados como referência na condução do ensaio. O cálculo da tração na flexão foi realizado através da equação (8):

$$S = \frac{3PL}{2bd^2} \tag{8}$$

Onde: S é a tração na flexão em mega pascal (MPa), P é a carga aplicada em Newtons (N), L é a distância em milímetros (mm) entre os apoios, b é altura e d é a espessura do corpo de prova, ambos em milímetros.

4.2.6.4 Ensaio de Ultramicrodureza

Os ensaios de ultra microdureza foram realizados em equipamentos dinâmicos de ensaio de dureza buscando obter o módulo de elasticidade dos CFCs modificados com OGN, além também da ultramicrodureza. Para isso, este equipamento aplica progressivamente sobre o material uma carga escolhida e faz a sua medição simultaneamente aos deslocamentos realizados pelo penetrador. Assim, o software do equipamento constrói a curva de carga e deformação e através dela se obtém quantitativamente a ultramicrodureza e o módulo de elasticidade do material ensaiado (ANTUNES, 2006).

No intuito de avaliar a influência da adição de OGN no módulo de elasticidade do material, foram realizados ensaios de Ultramicrodureza no laboratório de Metalografia do CEFET-MG. Utilizou-se um ultramicrodurômetro da marca SHIMADZU, modelo DUH-211S, com carga de 3mN, com tempo de endentação e de descarga de 15s. Os corpos de prova foram confeccionados com 6 x 6 x 20mm (altura x espessura x comprimento), foram realizadas 3 (três) leituras na superfície de cada amostra.

4.2.6.5 Ensaio de Impacto

O ensaio de impacto foi realizado pelo método Izod, com corpos de prova sem entalhe (ASTM: E23 – 18; ASTM: A327/A327M – 11) e de dimensões 6 x 6 x 30mm (altura x espessura x comprimento). Usou-se o equipamento XJ SERIES IMPACT TESTING MACHINE, marca OBJ modelo XJ-25Z, com pêndulo 1 Joule do Laboratório de Polímeros do CEFET-MG. Foram realizadas 5 (cinco) ensaios para cada grupo amostral e os valores da energia do impacto (KJ/m²) e da energia absorvida (J) no impacto foram obtidos diretamente do mostrador digital do aparelho.

4.2.6.6 Ensaio de citotoxicidade

A avaliação de citotoxicidade do biocimento foi realizada no laboratório de Biomateriais do CEFET/MG através dos ensaios de difusão em ágar e teste de macrodiluição com as espécies microbiológicas: *Escherichia coli* (*E.coli*, ATCC 11229) e *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*, ATCC 6538). A esterilização das amostras foi feita por irradiação gama no Laboratório de Irradiação Gama do Centro de Desenvolvimento de Tecnologia Nuclear/Comissão Nacional de Energia Nuclear (CDTN/CNEN) utilizando a intensidade de 25 KGy.

Para a realização do ensaio de difusão em Ágar foi utilizado discos de filtros com antibiótico tetraciclina (TTC) - CECON[®], São Paulo, Brasil - para a espécie *S. aureus* e ampicilina (AMP) - CECON[®], São Paulo, Brasil - para *E.coli.*, como controles positivos, e para controle negativo foi utilizado 10 µl de salina gotejada sobre o disco de filtro. A preparação da placa de Petri foi realizada adicionando-se 20 ml de solução de Agar Miller-Hilton (Kasvi[®], Itália). Após a solidificação do meio e avaliação quanto à ausência de microrganismos, foi aplicado 10 µL da suspensão microbiana (2x10⁷ UFC/mL - Unidade Formadora de Colônia/mL) por toda superfície da placa de Petri, com o auxílio de um "Swab" (cotonete estéril) e as amostras de 5mm de biocimentos e os controles foram colocadas sob o meio sólido, com auxílio de uma pinça estéril, conforme ilustrado na Figura 15.



Figura 15 - Disposição das amostras no ensaio de disco-difusão em ágar

#: Tetraciclina (TCC) para *S. aureus* e Ampicilina (AMP) para *E.coli.* Fonte: Autor. As placas foram levadas à estufa microbiológica, Quimis® modelo Q316M, à 37 °C durante o período de 24 horas. Após o período de incubação houve a avaliação do halo de inibição conforme norma ANVISA M2-A8, o ensaio foi realizado em triplicata.

Para avaliação da citotoxicidade no ensaio de macrodiluição, o indicador colorimétrico resazurina foi utilizado. A resazurina é um indicador colorimétrico com a propriedade redox em que a forma oxidada azul indica que a célula não é viável, já a forma reduzida rósea indica que a célula é viável (CHEN, 2018).

As massas das amostras foram mensuradas e utilizou-se 0,2 g do biocimento para cada 1mL do solvente extrator (caldo nutriente) deixado por 24h em estufa bacteriológica à 37°C. Em seguida, os tubos foram centrifugados e coletados os sobrenadantes (extrato). 1 mL dos extratos de cada amostra foi colocado em tubos com suspensão microbiana, equivalente à 5 x 10⁵ UFC/mL, obtidas do procedimento de suspensão direta de colônias em ágar. Os controles positivos também foram utilizados conforme o tipo de microrganismo testado, além do controle negativo constituído por solução salina 0,9%. As amostras e controles foram mantidos em estufa bacteriológica durante 24h à 37°C, posteriormente, 5mL da solução de resazurina (280 µg/mL) foi adicionada em cada amostra e deixada em repouso por 3h à 37°C. A absorbância foi determinada por Espectrofotômetro de Ultravioleta Visível Cary 50 Versão 3 em dois comprimentos de onda de 570 e 600nm. Ensaios de citotoxicidade foram realizados em pelo menos quatro repetições independentes e calculadas em comparação com o controle (meio e suspensão bacteriana) que foi considerado como 100% de viabilidade.

4.2.6.7 Ensaio in vivo HET-CAM

Uma parceria com o laboratório FITOTEC da Universidade Federal de Ouro Preto possibilitou a avaliação de biocompatibilidade do material pelo método HET-CAM (LUEPKE; KEMPER, 1986; CAZEDEY *et al.*, 2009). Para o procedimento, foram adquiridos ovos de galinha *White Leghorn* comercialmente férteis, sem micoplasma e provenientes da Granja Tomolei, conforme certificado contido no ANEXO E, (p. 113).

Os ovos foram colocados na incubadora, que os mantinham em rotação e sob condições controladas de temperatura $(37,8 \pm 1,0)$ °C e umidade (50-60) %. Na Figura 16, pode-se visualizar os ovos na incubadora.





Fonte: Autor.

No 9º dia de incubação, a rotação foi suspensa e os ovos foram colocados na posição vertical, com a bolsa de ar na parte superior. No 10º dia de incubação, os ovos foram retirados, colocados no ovoscópio para verificar a formação e viabilidade do embrião (Figura 17).

Figura 17 - Ovo no ovoscópio e verificação da viabilidade do embrião (a) Ovo no ovoscópio (b) Verificação da viabilidade do

embrião





Fonte: Site do fabricante do ovoscópio.

Os ovos foram abertos perto da câmera de ar com tesoura cirúrgica revelando a membrana corioalantóide altamente vascularizada (CAM). Os implantes foram

adicionados sobre a membrana, avaliados visualmente, olho nu, e fotografias foram capturadas com uma câmera fotográfica. A superfície da CAM foi avaliada quanto ao tempo do surgimento de hiperemia, hemorragia, lise e/ou coagulação, sendo que hiperemia é definida como o surgimento de capilares e/ou a dilatação dos vasos visíveis; Hemorragia é a perda de sangue dos vasos para o meio; Coagulação pode ser aferida pela aglutinação e precipitação. Essa avaliação aconteceu em 3 períodos de tempo, 30, 120 e 300s de contato entre material e a CAM. O controle irritante positivo (C⁺) foi a solução de hidróxido de sódio 0,1N e para o controle negativo (C⁻) usou-se cloreto de sódio a 0,9% (solução salina). Para cada amostra foram utilizados 3 ovos galados. O contato direto do biomaterial com a CAM do ovo embrionado de galinha é ilustrado na Figura 18.

Figura 18 - Imagem ilustrativa do ensaio referente ao contato direto do biomaterial com a membrana corioalantóide do ovo embrionado de galinha.



Fonte: Autor.

As alterações na membrana corioalantóide, conforme o tempo decorrido de contato com o biomaterial, receberam escores de acordo com a Tabela 6. A classificação final dos materiais testados, em relação ao seu potencial de irritabilidade segue a escala descrita na Tabela 7, (p. 60). A média do somatório dos escores dos ovos foram utilizadas para determinar a classificação final dos biomateriais.

Tabela 6 - Tem	po e escores pa	ara alterações na	membrana	corioalantóide.
		`		

Fenômenos	T≤ 30 s	TEMPO 30 s < T ≤ 120 s	120 s < T ≤ 300 s
Hiperemia	5	3	1
Hemorragia	7	5	3
Coagulação	9	7	5

Fonte: protocolo HET-CAM.

Média da PontuaçãoClassificação0 a 0,9Não irritante (NI)1 a 4,9Irritante leve (IL)5 a 8,9Irritante moderado (IM)10 a 21Irritante severo (IS)Fonte: protocolo HET-CAM.

Tabela 7 - Escala para classificação final do biomaterial quanto ao seu potencial de irritabilidade no HET-CAM

4.2.6.8 Ensaio acelerado de degradação

O ensaio de degradação foi realizado no Laboratório de Biomateriais e no laboratório de Química Orgânica do CEFET/MG. A degradação do material foi avaliada a partir da diferença de massa das amostras OGN00, OGN02 e OGN05 após 1, 3 e 7 dias de imersão em solução Tris-HCl, conforme ISO 10993-14 (2011) e estudos de Solonenko *et al.* (2018), Ding *et al.* (2015) e Wang *et al.* (2011). Além disso, foi monitorado a mudança de pH e dosagem colorimétrica do cálcio da solução após a imersão.

Inicialmente foi preparada uma solução de Tris-HCI, em que 13,25g de tris-HCI foi diluído em 500 mL de água deionizada e foi realizado o ajuste de pH para 7,4 \pm 0,1, usando pHmetro digital Checker® (Hanna Instruments, Woonsocket, EUA). Os corpos de prova foram pesados, alocados em tubos de ensaio com a solução Tris-HCI, tampados e colocados em estufa a 37 °C. Após cada período estabelecido de ensaio, foram retiradas da estufa 3 amostras de cada grupo e secas em estufa a 68 °C por 48 h. Posteriormente as amostras foram novamente pesadas e a perda de massa foi calculada através da equação (9) na página 60.

$$W = \left[\frac{Wi - Wf}{Wi}\right] x \ 100 \tag{9}$$

Sendo: W = diferença percentual de massa (%); Wi = massa inicial em gramas (g) e Wf = massa final em gramas (g) Através da equação (9), p.60, é possível verificar a diferença percentual entra a massa inicial e final do material ensaiado.

Para determinação da concentração de cálcio, foram coletados os 10mL de sobrenadantes do ensaio de degradação nos tempos de 24, 72 e 168horas. O kit Cálcio Liquiform foi usado para a determinação da concentração de cálcio (Ref.90-2/60, Lagoa Santa, Brasil). As diluições e preparo das soluções para análise de concentração de cálcio foram realizadas conforme manual do fabricante do kit Cálcio Liquiform, Labtest Diagnóstica S.A. O ensaio consistiu em método direto através da reação do cálcio (presente no sobrenadante) com o composto cresolftaleína complexona em meio alcalino formando um complexo de cor violeta que foi quantificado espectrofotometricamente em 570nm (Espectrofotômetro de Ultravioleta Visível Cary® 50 UV-Vis – Agilent, Santa Clara, EUA).

Além disso, foi avaliado o pH dos sobrenadantes coletados em diferentes tempos do ensaio de degradação (24, 72 e 168horas) através do uso de pHmetro digital Checker® (Hanna Instruments, Woonsocket, EUA).

4.2.7 Análise estatística

Para análise estatística, foi utilizado o software Minitab[®] versão 18. Os resultados foram apresentados como a média amostral e desvio-padrão amostral. Utilizou-se as ferramentas ANOVA com um fator para comparação entre os grupos. O pós teste *Tukey* foi usado para comparação aos pares. Os resultados foram apresentados em gráficos e/ou tabelas. Foi adotado o nível de significância de 5% (p < 0,05). Utilizando os dados experimentais foram construídas as curvas de tendência e indicação do coeficiente de determinação (R²). Para o ensaio de viabilidade celular pelo método de macrodiluição, os resultados foram apresentados como média amostral e desvio-padrão ao controle. Os valores foram apresentados como média amostral e desvio-padrão amostral de cada grupo (p > 0,05, ANOVA, pós teste Bonferroni).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Antes do processamento (mistura das matérias primas: pós e líquidos) do cimento de fosfato foram realizadas caracterizações do OGN buscando verificar a morfologia e aspecto estrutural do material de reforço, estes resultados são apresentados no item 5.1.

Serão apresentados neste tópico as características físico-químicas, mecânicas e biológicas do biocompósito contendo OGN na matriz do CFC. Como resultado do processamento foi avaliado preliminarmente proporções de matérias primas buscando um tempo de endurecimento rápido. São apresentadas a seguir as avaliações *in vitro* e *in vivo* das formulações obtidas juntamente com os resultados mecânicos e de degradação do biocimento. Nos ensaios *in vitro* e *in vivo* buscou-se verificar a resposta biológica dos CFCs.

5.1 Caracterização do material de reforço

Os resultados da microscopia eletrônica de varredura do OGN encontra-se apresentados na Figura 19.



Figura 19 - Imagens do MEV do OGN

Fonte: Autor.

Nas imagens é possível observar que este material particulado parece estar levemente agregado em *cluster*, formados por pilhas de nanoplacas do OGN com ampla razão de aspecto (espessura da ordem de nanômetros versus comprimento da ordem de micrômetros).

Segundo Lotya *et al.* (2009), o material pode se agregar devido à inadequada estabilidade elétrica (potencial zeta) de uma dispersão e está relacionada com a força de repulsão entre as partículas. Em sistemas onde forças atrativas dominam, o sistema se torna instável e as partículas sedimentam, aumentando a viscosidade. Em casos onde as forças repulsivas são fortes, uma suspensão relativamente estável e defloculada é obtida. Portanto, o potencial zeta da dispersão usada (no pH do meio), promoveu uma agregação do mesmo em placas ou *clusters* de flocos. A variação do pH é um dos métodos aplicados na defloculação de sistemas de óxidos, mas existem algumas inconveniências: alguns óxidos necessitam de pH extremamente baixo ou alto para atingir um ponto ideal de dispersão, ou seja, potencial zeta de aproximadamente 30 mV. Nestas condições a continuação do processo de fabricação do CFC pode se tornar inviável. Outro inconveniente é a grande influência da força iônica do meio, no caso o BCP e os demais aditivos (CMC e FS) utilizados no processamento do CFC.

A partir da técnica de Espectrometria de Energia Dispersiva de raios X (EDS) realizada no OGN foi possível perceber a presença de Manganês (Mn) e Potássio (K), além do Oxigênio (O) e do Carbono, conforme apresentado na Figura 20 a e b, (p. 64).



Como pode ser observado no gráfico da Figura 20a, a presença de Mn e K pode estar relacionada ao reagente permanganato de potássio (KMnO₄) utilizado na rota de esfoliação química para produção do OGN usado neste estudo, conforme comparado ao EDS realizado no padrão analítico Sigma Aldrich (Figura 20b).

Na Figura 21 é apresentado o difratograma do OGN na região de 5 a 45 graus, onde pode-se observar a intensidade dos picos (número de contagens por segundo – CPS) e os planos cristalinos identificados.



Figura 21 - DRX do óxido de grafeno

Fonte: Parceria entre colaboradores do CDTN, INPE e Autor.

Pode ser observado na Figura 21 (p.64) o pico principal (I₁₀₀) de materiais grafênicos em torno 26º (JOHRA *et al.* 2014) e de MnO₂ (birnessita) em 12,5º e 36,5º (YAN *et al.*,2009). Na Figura 22 é apresentado um DRX obtido da literatura com as reflexões de amostras contendo o MnO₂ (birnessita) e GO, bem como seus planos cristalinos.



Figura 22 - Espectro DRX com indicação dos picos de MnO2

Fonte: Adaptado de Liu et al. (2013).

Através da comparação entre as difratometrias apresentadas nas Figura 21 (p. 64) e Figura 22, foram identificadas características da fase majoritária OG com pico em torno de 26º e da fase minoritária de MnO₂ (birnessita) com pico em torno de 36,5º, bem como traços de permanganato de potássio, um dos insumos usados na esfoliação química.

O resultado do tratamento dos dados do DRX, para comparar o número de camadas do OGN produzido no CEFET com o Sigma Aldrich (padrão comercial), pode ser visto na Tabela 8.

Amostra	LC(002)	d (002)	Nº de camadas	$\bar{X} \pm S$
OGN - A	123,3	3,4	36	
OGN - B	53,6	2,4	22	29 ± 7
OGN - C	14,7	3,5	4(**)	
Sigma - A	100,2	3,4	30	24 + 5
Sigma - B	133,1	3,4	39	54 ± 5
Sigma - C				15 a 20*
(*) Cortificado Sigmo Aldrich (**) outlior excluído do cálculo				

Tabela 8 - Número de camadas do óxido de grafeno

(*) Certificado Sigma Aldrich, (**) *outlier*, excluído do cálculo Fonte: Dados do DRX avaliados no INPE. Após análises dos resultados foi constatado que o material produzido no CEFET apresentou em média 29 camadas, quantidade similar ao do material adquirido da Sigma Aldrich.

Os resultados da análise Espectroscópica Raman do OGN realizado em parceria com INPE está apresentado na Figura 23.



A área destacada na Figura 23 mostra traços das bandas D e G na amostra de OGN. Segundo Guerrero-Contreras (2015), as bandas D e G, que indicam a presença de óxido de grafeno, podem ser encontradas entre 1300 e 1450cm⁻¹ e 1550 e 1650cm⁻¹, respectivamente. Na região próxima do deslocamento de 600cm⁻¹ as bandas indicam a presença de MnO₂, conforme relatado por Freitas *et al.*(2013) e representado na Figura 24 (p.67). Esta presença está relacionada ao uso do KMnO₄ como reagente do processo de fabricação do OGN.

Figura 24 - Espectro Raman obtido da literatura com as bandas de uma amostra contendo o MnO₂ e imagem representativa do efeito core-shell.



Fonte: Freitas et al. (2013).

Na técnica de espectroscopia o efeito Raman ressonante tem peso ponderado na superfície/volume é muito maior do que na DRX, por isto no espectro da Figura 23 (p.66) o MnO₂ aparenta ser o constituinte majoritário, aparentemente em função das características core-shell (núcleo-casca) das nanopartículas de OGN. Atualmente, classe de materiais nanoestruturados (core-shell) tem recebido maior atenção devido às suas propriedades interessantes e ampla gama de aplicações em catálise, biomateriais e biossensores. Nos ensaios Raman, o poder de penetração dos fótons nas interações elástica (Rayleigh) e inelásticas (Stokes e anti Stokes) na região do espectro eletromagnético do comprimento de onda utilizado (verde), em geral, não ultrapassa algumas dezenas de nanômetros (KOSTIUK et al, 2016 e LI, 2015). A profundidade de penetração (dp) é dada pela intensidade da radiação incidente que é chamada onda evanescente. Se a amostra absorve em certo comprimento de onda evanescente, há uma atenuação do feixe a comprimentos de onda correspondentes às bandas de absorção, originando o espectro acima analisando, portanto, a rigor apenas o recobrimento ou casca (MnO₂) existente na superfície das nanoplacas de OG (núcleo).

5.2 Caracterização do biocimento processado

A dispersão do OGN na matriz do CFC foi verificada através do MEV juntamente com um mapa de varredura da imagem buscando encontrar o carbono no material. Na Figura 25 são apresentados os mapas de varredura realizados nas amostras, o os pontos coloridos representam carbono presente na varredura.

Figura 25 - Mapas de varredura do biomaterial



Imagem do local onde foi realizado o mapa de

Amostra: OGN00



Amostra: OGN01

Resultado da varredura realizada na figura



Amostra: OGN01

Resultado da varredura realizada na figura



Amostra: OGN05



Fonte: Autor.

Imagem do local onde foi realizado o mapa de varredura na amostras

O mapa de varredura da amostra OGN00 há presença de pontos no mapa, indicativo da presença do carbono referente à carboximetilcelulose usada no processamento do biocimento. Nas amostras OGN01, 02 e 03 pode-se notar aumento do número de pontos no mapa de varredura, o que indica presença da fase de reforço, OGN, dispersa na matriz. Já nas amostras OGN05 nota-se menor presença de pontos relação as amostras com OGN incorporado. Isso pode estar relacionado com a agregação do material de reforço que provoca sua baixa dispersão na matriz. A baixa dispersão do reforço pode levar a redução das propriedades mecânicas do compósito, como foi sugerido pelos estudos de Wang et al. (2017) e Paz et al. (2017).

Após processado do biocimento, os corpos de prova foram caracterizados por DRX para verificar se houve alteração das matérias-primas em relação à matriz cimentícia do biomaterial, e também comparados os espectros do CFC para verificar possíveis alterações nas proporções de fases ao longo do processamento. O Difratograma das amostras sem e com diferentes proporções do material de reforço estão apresentados na Figura 26.



Figura 26 - Difratograma do biomaterial processado

Fonte: Dados coletados em parceria com CDTN.

As difratogramas apresentados na Figura 26, p.70, foram comparadas com os seguintes cartões de referência da base de dados PDF2 do ICDD:

- 090432 para Hidroxiapatita
- 090169 para Whitlockita (Fosfato de cálcio)
- 090080 para Monetita (Fosfato de cálcio)

Os resultados dos difratogramas apresentam perfil de picos para hidroxiapatita (WANG et al., 2007; LOPEZ-HEREDIA et al., 2011), indicando que não houve formação de outra fase de fosfato de cálcio durante o processamento do material. Além disso, como o DRX identifica fases com presença volumétrica acima de 3%, a ausência de picos referentes a outras fases sugere que não houve formação de novas fases ou mesmo que elas estão presentes em traços abaixo de 3%, ficando ruídos (WANG al., 2007; mascaradas por de background et LOPEZ - HEREDIA et al., 2011).

Foi realizada uma varredura com espectrometria de energia dispersiva de raios X no cimento ósseo para verificação da proporção de cálcio e fosforo no material processado. Os resultados demostraram que a razão estequiométrica cálcio e fósforo das amostras variou entre 1,6 e 1,7. Isso confirma a presença de hidroxiapatita, uma vez que a razão estequiométrica cálcio e fósforo do material majoritário está próxima 1,67 (DRIESSENS *et al.*, 1997; RAMALHO, 2010).

5.3 Ensaio de tempo de pega

Durante os ensaios de tempo de pega, notou-se que o material apresentou três comportamentos evidentes, sendo eles: ausência total de resistência a penetração da agulha de Vicat, resistência parcial à penetração da agulha (a agulha penetrou o material, porém com menos vigor), ou resistência total à penetração da agulha. Devido a esse comportamento, o tempo inicial foi definido como o tempo em que a pasta cimentícia apresentou resistência evidente à penetração da agulha e o tempo final foi marcado quando a agulha não conseguiu mais penetrar o material.

Os valores do tempo inicial e final de pega obtidos nos ensaios são apresentados na Tabela 9, (p.72). No gráfico da Figura 27 (p.72) pode-se observar a representação
gráfica do comportamento de pega do material à medida que o reforço de OGN é adicionado ao material, e também as curvas de tendência dos valores.

	Inic	Inicial		nal
OGN	\overline{X}	S	\overline{X}	S
0	12,7 ^a	2,6	22,1 ^a	2,6
0,1	12,5 ^a	2,7	18,8 ^b	2,3
0,2	11,0 ^a	2,2	13,6 °	2,4
0,3	10,6 ^a	1,8	12,9 °	2,6
0,5	12,0 ^a	2,7	18,3 ^b	2,5

Tabela 9 - Tempo inicial e final de pega do cimento de fosfato de cálcio

ANOVA, pós teste Tukey, p<0,05 Medidas que não compartilham a mesma letra são estatisticamente diferentes Fonte: Autor.



Figura 27 - Gráfico do tempo de pega do biocimento

Observando a Figura 27 pode-se perceber que o tempo inicial de pega, das amostras de biocimento, apresentou uma variação menor diante das proporções de OGN incorporadas se comparado com o tempo final de pega.

O tempo inicial de pega teve uma queda de 16,5% entre o CFC puro (12,7 minutos) e o CFC com 0,3%m/m de OGN (10,6 min). Uma queda mais expressiva foi observada no tempo final de pega, que apresentou de redução de 41,5%, sendo 22,08 minutos para o CFC puro e 12,9 para o CFC com 0,3%m/m de OGN. Pode-se observar, também, que os valores de pega final para OGN02 e 03 são similares e, a partir de

0,3%m/m até 0,5% houve, um aumento do tempo final de pega para 18,3 minutos. Esse valor ainda é 17% menor que o do cimento sem OGN.

A redução no tempo de pega de cimentos de fosfato de cálcio reforçados com nanomateriais de carbono é relatado na literatura. No trabalho de Wang *et al.* (2017) à medida que foi incorporado óxido de grafeno reduzido ao CFC, houve redução do tempo inicial de 18 para próximo de 10 minutos e dos tempos finais de cura partindo de 65 minutos caindo até 35 minutos. Nos estudos de Boehm *et al.* (2018) a adição de fibras de carbono funcionalizadas permitiram a redução do tempo inicial de pega de 25 para 18 minutos e do tempo final de 105 para 50 minutos.

O tempo de 7 minutos é o tempo médio relatado pela literatura médica para implantação de um cimento ósseo (DRIESSENS *et al.*, 1997). Jansen *et al.* (2005) detalham que um tempo inicial de cura entre 3 e 8 minutos e final de até 15 são adequados para diversos procedimentos cirúrgicos. Neste estudo, o tempo inicial de pega ficou acima do adequado para a aplicação clínica, porém o tempo final médio de pega das amostras OGN02 e 03 mostrou-se adequado.

A avaliação estatística dos resultados mostra que não existe diferença significativa entre as médias dos tempos iniciais de pega. Porém, as médias dos tempos finais de pega foram estatisticamente diferentes entre si, exceto entre os grupos OGN01 e 05, também entre OGN02 e OGN03, como pode ser observado na Tabela 9, p.72.

5.4 Ensaio de Microdureza (HV)

A dureza ou a resistência à penetração de um material pode ser usada para avaliar a sua resistência mecânica e está também correlacionada com a resistência ao desgaste ou ao corte (no caso de usinagem). Pode ainda ser utilizada para avaliar a resistência à deformação plástica (tensão no limite de resistência ou tensão máxima), segundo Souza (1974). A dureza Vickers (normal de 5-100Kgf e/ou pequena carga de 200gf a 5Kgf) e microdureza Vickers se diferenciam pela carga aplicada, sendo considerado microdureza quando a carga aplicada é inferior a 200gf até 1gf (ASTM E384 – 17). O ensaio de microdureza Vickers, é usualmente utilizado para

determinação de dureza de materiais frágeis, tais com os materiais cerâmicos (CALLISTER, 2016).

Os ensaios de microdureza Vickers com carga de 100gf (HV₁₀₀) foram realizados para avaliar o comportamento mecânico do material diante da incorporação de OGN à sua matriz.

Durante os ensaios de microdureza foi necessário realizar diversas endentações até que se conseguisse pelo menos 5 impressões sem imperfeições, pois algumas endentações realizadas apresentaram aspectos defeituosos, tais como fratura do material em suas extremidades, aderência e ou afundamento ou mesmo diagonais com diferença no comprimento maiores do que 10% (ASTM C1327-15).

Na Figura 28 é apresentado endentações realizadas neste estudo, exemplificando o que foi considerado uma endentação aceitável e não aceitável.

Figura 28 - Endentação não aceitável e aceitável do ensaio de microdureza



(a) Setas indicando fratura próxima às bordas da endentação



(b) Exemplo de endentação aceitável

Os valores de microdureza são apresentados na Tabela 10 e na Figura 29, p.75, as curvas de tendência dos valores.

OGN	\overline{X} (HV)	S (HV)
0	4,96 ^a	0,33
0,1	5,60 ^b	0,13
0,2	6,17 ^c	0,61
0,3	5,54 ^b	0,17
0,5	4,52 ^a	0,24

Tabela 10 -	Microdureza	Vickers	(HV ₁₀₀)
-------------	-------------	---------	----------------------

ANOVA, pós teste Tukey, p<0,05 Medidas que não compartilham a mesma letra são estatisticamente diferentes Fonte: Autor.



Figura 29 - Gráfico de Microdureza Vickers do biocimento

Os resultados dos ensaios de microdureza demonstraram que essa propriedade é

incrementada em 24,2% de 0 a 0,2%m/m de OGN, atingindo pico de 6,17 HV. A partir de 0,2 até 0,5%m/m de OGN a microdureza decresce até que chegar a 4,52 HV, valores 9% menor que o inicial.

Na avaliação estatística dos resultados de microdureza foi verificado que existe diferença estatisticamente significativa entre os resultados, conforme pode ser observado através dos índices representados na Tabela 10, p.74.

Segundo Callister (2016) pode-se estimar a resistência mecânica de um material através da sua dureza Brinnel (HB), sendo o limite resistência mecânica tração (LR) 3,45 vezes maior que o HB do material. Segundo Souza (1974) as durezas Vickers e Brinnel são próximas em uma grande faixa de dureza, Garcia *et al.* (2015) apresentam dados que reiteram essa similaridade. Assim, a relação entre dureza e resistência mecânica pode ser estimada através da equação (10).

$$LR = 3,45 x HB$$
 (10)

A equação (10) foi utilizada para converter os dados obtidos para microdureza Vickers em limite de resistência mecânica. Na Tabela 11 são apresentados os resultados dos cálculos para estimar a resistência mecânica e na Figura 30 é apresentado um gráfico dos dados coletados e sua curva de tendência.

	OGN	X (MPa)	S (MPa)
	0	17,16 ^a	1,12
	0,1	19,33 ^{b,c}	0,46
	0,2	20,72 ^b	1,63
	0,3	19,10 °	0,58
	0,5	15,59 ^d	0,83
-	ANOVA,	pós teste Tuk	ey, p<0,05
Medidas que não co	mpartilham	a mesma letra	a são estatist

Tabela 11 - Resistência mecânica das amostras de biocimento



Fonte: Autor.





Fonte: Autor.

Pode-se observar que o acréscimo de 0,2%m/m de OGN no material provoca um aumento de 20,8% na sua resistência mecânica, saindo de 17,16MPa para 20,72MPa. Porém, adições maiores que 0,2% fazem a resistência decrescer, chegando a 15,59MPa, 9% mais baixa que a do CFC sem OGN.

Os valores encontrados de resistência mecânica calculados para os grupos amostrais apresentaram diferença estatisticamente significativa, exceto entre os grupos OGN01 e 02, também entre OGN01 e OGN03, como representado através dos índices da Tabela 11 (p.76).

O ensaio de microdureza Vickers foi o primeiro ensaio mecânico realizado com o material de estudo, pois através dele é possível avaliar a influência do reforço na matriz e estimar se a resistência mecânica do material estaria adequada ao uso biomédico. Conforme os resultados apresentados, o material com e sem a incorporação do OGN apresentou resistência mecânica que variou de 15,59 a 20,72MPa. Os valores médios alcançados estão dentro da faixa de resistência a flexão do osso esponjoso, entre 1,2 a 20MPa (ORÉFICE *et al.*, 2012; ELIAZ *et al.*, 2017) e isso indicou, preliminarmente, que o material tem potencial biofuncionalidade. Partindo dessa indicação positiva, procede-se com a realização do ensaio de flexão por 3 pontos, a fim de determinar os valores de resistência mais próximos do real.

5.5 Ensaio de Flexão por 3 apoios

Os resultados dos ensaios de resistência a tração na flexão estão mostrados na Tabela 12 e na Figura 31, p.78, como a média amostral e o desvio-padrão amostral dos resultados encontrados para cada grupo amostral.

OGN (%p)	$\bar{X}(MPa)$	S(MPa)
0,0	3,89 ^a	0,42
0,1	4,82 ^{a,b}	0,51
0,2	6,33 °	0,62
0,3	5,19 ^{b,c}	0,62
0,5	4,59 ^{a,b}	0,44

Tabela 12 - Resistência a tração na flexão por 3 pontos

ANOVA, pós teste Tukey, p<0,05 Medidas que não compartilham a mesma letra são estatisticamente diferentes Fonte: Autor.



Figura 31 - Gráfico de resistência a tração na flexão por 3 pontos do biocimento

Fonte: Autor.

O valor encontrado para a resistência a tração na flexão do cimento ósseo sem adição de OGN foi de 3,89MPa. À medida que o OGN foi incorporado, o valor da resistência aumentou até a adição de 0,2% de OGN, atingindo 6,33MPa, que demonstra ganho de 62,5% de resistência. Quando incorporado mais que 0,2%m/m de OGN a resistência mecânica decai até 4,59MPa para o cimento com 0,5% de OGN, o que corresponde a uma queda de 27,43% em relação ao OGN02. Porém, o cimento com 0,5% de OGN ainda é 17,9% mais resistente que o cimento sem OGN.

Está representado na Tabela 12 (p.77) os índices referentes a avaliação estatística dos resultados. Pode-se observar que houve diferença estatísticas significativa entre os grupos amostrais.

Comparando os resultados do ensaio de microdureza com o de flexão, percebeu-se que o perfil dos resultados do ensaio de flexão corroboraram com o que foi estimado pelo ensaio de microdureza. O grupo amostral OGN02 se fez presente entre os resultados como o grupo de maior resistência mecânica, sendo que essa propriedade cresce de OGN00 até OGN02 e decresce até OGN05.

Uma das estratégias para aumentar a resistência mecânica dos cimentos ósseos é a adição de reforço à matriz do material, dentre eles os materiais nanoestruturados de

carbono. O material de reforço utilizado neste estudo o OGN que apresenta estrutura bidimensional e grande área de contato com a matriz, permitindo que o reforço receba mais carga da matriz (WANG *et al.*, 2017). Os resultados aqui apresentados indicam que a adição de até 0,2%m/m OGN melhora as propriedades do CFC. Isso pode ser relacionado à força de adesão entre matriz e o reforço, fator que tem influência significativa nas propriedades mecânicas do compósito (CANAL; GINEBRA, 2011).

Wang *et al.* (2017) avaliaram a influência da incorporação de óxido de grafeno reduzido (RGO) à matriz de CFC, obtendo aumento de resistência a tração até a adição de 0,2%m/m de RGO, com queda da resistência mecânica em adições acima deste valor. Esse comportamento é similar aos resultados encontrados neste trabalho. No estudo de Paz *et al.* (2017) o OGN foi incorporado ao cimento ósseo de PMMA como material de reforço e foi observado que em adições superiores a 0,2%m/m de OGN as propriedades mecânicas decresciam. Ambos autores indicam que a queda nas propriedades do cimento ósseo pode ter ocorrido devido à baixa dispersão do material de reforço e como consequência agregação do mesmo, gerando pontos de amplificação de tensão. Isso sugere que o mesmo pode ter acontecido no presente estudo.

Segundo Eliaz et al. (2017) a resistência mecânica à tração do osso cortical pode variar de 50 a 150MPa, já o osso esponjoso apresenta valores menores, entre 1,2 e 20MPa (ver Tabela 2, p.24). Neste estudo, todos os resultados dos ensaios de resistência a flexão apresentaram valores dentro da faixa de resistência do osso esponjoso, sendo que a mostra OGN02 obteve melhor resultado dentre os grupos amostrais.

5.6 Ensaio de Ultramicrodureza

Na Tabela 13, p.80, são representados os valores encontrados para os módulos de elasticidade de cada grupo amostral e na Figura 32, p.80, é apresentada a evolução dos valores do módulo de elasticidade.

OGN	X (GPa)	S (GPa)
0,0	7,3 ^a	1,2
0,1	6,5 ^{a,b}	0,5
0,2	6,1 ^{a,b,c}	0,4
0,3	5,6 ^{b,c}	0,6
0,5	4,7 ^c	0,5

Tabela 13 - Módulo de elasticidade das amostras de biocimentos

ANOVA, pós teste Tukey, p<0,05 Medidas que não compartilham a mesma letra são estatisticamente diferentes Fonte: Autor.

Figura 32 - Gráfico da evolução do módulo de elasticidade do biocimento



Fonte: Autor.

De acordo com os resultados, pode-se afirmar que o módulo de elasticidade (E) decresce à medida que se aumentou o OGN incorporado no material. A redução total foi de 47,2% no módulo de elasticidade. De acordo com a análise estatística, somente existe diferença estatisticamente significante entre as amostras OGN00 e OGN05, conforme apresentado na Tabela 13 (p.80).

Segundo Pruitt e Chakravartula (2011, apud AJAXON *et al.*, 2017), a rigidez do tecido ósseo pode ter valores diferentes para os diferentes ossos do corpo e em diferentes regiões do mesmo osso. Isso é percebido ao se verificar os valores de módulo de elasticidade dos ossos apresentado na Tabela 1 (p.23). O osso cortical apresenta módulo de elasticidade entre 7 e 30GPa; já o osso esponjoso de 0,01 a 5 GPa. Relacionando estes valores com os resultados encontrados, o material sem reforço, com E=7,3GPa, se posiciona no limite inferior da faixa estabelecida para o módulo de

elasticidade do osso cortical, já para amostras OGN01 a 03, com valores médios de E entre 6,5 e 4,7GPa, estão um pouco acima do limite superior do osso esponjoso.

Garcia et al. (2015) afirmam que quanto maior o E do material, menor será a deformação elástica resultante da aplicação de uma tensão. Os resultados mostram que o E do material em estudo reduziu à medida que houve incorporação de OGN, o que pode ser indicativo de que o material aumentou sua capacidade de deformação sem se romper, então pode absorver mais energia antes de se romper.

5.7 **Ensaios Impacto Izod**

A energia absorvida pelos corpos de prova no ensaio de impacto e a razão entre a energia do impacto (método adaptado Izod) e a área da seção transversal dos corpos de prova são apresentados na Tabela 14, nas Figura 33 e Figura 34 (p. 81) são apresentados os gráficos e as curvas de tendência dos resultados.

Tabela 14 - Ensaio de impacto do biocimento					
	Absorvida		Imp	Impacto	
UGN	$\overline{X}(mJ)$	S (mJ)	\overline{X} (J/m ²)	$S(J/m^2)$	
0	12,4 ^a	2,5	306,1 ^a	71,8	
0,1	14,3 ^{a,b}	1,5	378,4 ^a	54,1	
0,2	13,0 ^a	1,7	366,3 ^a	47,5	
0,3	20,7 ^{b,c}	4,0	600,1 ^b	94,3	
0,5	27,3 °	2,5	755,3 ^b	95,1	
	4 1 1 0 1 / 4		T 1 0 0	-	

ANOVA, pós teste Tukey, p<0,05

Medidas que não compartilham a mesma letra são estatisticamente diferentes Fonte: Autor.



Figura 33 - Gráfico de energia absorvida no impacto do biocimento

Fonte: Autor.



Figura 34 - Gráfico da energia do impacto do biocimento

Fonte: Autor.

Verifica-se que a energia absorvida no impacto aumenta com a incorporação de OGN ao biomaterial. O material sem OGN absorveu 12,4mJ de energia e a energia absorvida chegou a 27,3mJ para as amostras com 0,5%m/m ocorreu um aumento de 2,2 vezes na energia absorvida. Porém, entre as amostras OGN01 e OGN02 ocorre uma queda de 8,8%, para em seguida a energia continuar a subir à medida que o OGN foi incorporado.

Ainda, os resultados mostram que a adição de até 0,1%m/m de reforço fez com que a energia do impacto tivesse um incremento de 23,6%, partindo de 306,1 e chegando a 378,4J/m². Já com a adição de até 0,2%m/m a energia do impacto cai para 366,3J/m², redução de 3,2% em relação a OGN01. De 0,2 até 0,5%m/m de incorporação de OGN ocorreu aumento de 2 vezes na energia do impacto, chegando a 755,3J/m² que é uma energia 2,5 vezes maior que da amostra sem OGN.

A análise estatística dos dados de energia absorvida no impacto e da energia do impacto foi representada na Tabela 14 (p.81), onde os índices apresentam os grupos estatisticamente diferentes. De acordo com os índices, detectou-se que não houve diferença estatisticamente significativa entre os resultados dos grupos OGN00, 01 e 02, também entre OGN03 e 05.

As cerâmicas por natureza apresentam comportamento inelástico e seu processo de fratura se inicia por microfissuras oriundas das cargas aplicadas. Nos ensaios de

impacto a carga é aplicada em alta velocidade, fazendo com que as microfissuras se abram e se expandam rapidamente (devido às ondas de liberação dos limites livres de tensões). Isso provoca a ruptura do material e até mesmo a sua pulverização completa (RAJENDRAN *et al.*, 1989).

A resistência ao impacto (RI) e a Tenacidade à fratura (K1c) são as duas propriedades de fratura mais importantes. Os custos associados a obtenção do K1c é relativamente caro se comparado com RI, mas pode-se estimar a tenacidade à fratura de um cimento a partir de sua resistência ao impacto. Esta correlação pode ser usada como controle de qualidade, a fim de comparar formulações de cimento, ou mesmo para realizar estudos paramétricos em uma formulação (LEWIS; MLADSI, 2000).

Diante disso, mesmo não sendo possível quantificar os valores de tenacidade à fratura, é possível estimar que a fase de reforço (OGN) levará ao aumento da tenacidade à fratura do biocimento analisado.

Os biocimentos cerâmicos, quando comparados a outros biocimentos, como o PMMA, tem limitada aplicação clínica devido à sua relativa fragilidade, baixa resistência mecânica e baixa resistência ao impacto (AMBARD, 2006). Os resultados deste estudo sugerem que a incorporação de OGN poderia ampliar o uso dos CFC.

De acordo com os resultados dos ensaios mecânicos, os grupos amostrais OGN02 e 03 estiveram presentes como os grupos de mais melhores resultados. Isso sugere que proporções entre 0,2 e 0,3%m/m de OGN sejam proporção adequada como reforço estrutural. Tendo em vista o uso da menor quantidade possível de óxido de grafeno no biocimento, pois o OG ainda é um material de considerável valor agregado, considerou-se o grupo amostral OGN02 como o de melhor desempenho mecânico.

A fim de avaliar a citotoxicidade, biocompatibilidade e degradação optou-se por comparar o cimento padrão (OGN00) com a amostra de melhor desempenho (OGN02) e a amostra com maior concentração de reforço (OGN05).

5.8 Ensaio de citotoxicidade

A toxicidade celular foi investigada com o uso de duas espécies de bactérias *Escherichia coli* (ATCC 11229) e *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538), utilizadas como modelos para bactérias Gram-negativas e Gram-positivas, respectivamente.

O ensaio de disco-difusão foi realizado para avaliar a citotoxicidade do material em contato direto com as cepas. a partir da avaliação do halo de inibição gerado pelo material. Os resultados são apresentados na Figura 35.



Figura 35 - Placas de petri com halo de inibição



Fonte: Autor.

Os halos de inibição formados mostram a efetividade, no entanto, as amostras de OGN testadas não foram capazes de inibir o crescimento microbiano em ambas espécies testadas.

De fato, o teste de difusão em ágar não reproduz, completamente, a interação do material frente às bactérias ou diferença nos níveis inibitórios do crescimento microbiano, uma vez que o ensaio depende da solubilidade e difusão das substâncias no ágar (SEYEDMAJIDI *et al.*, 2018). Por isso, foi realizada a investigação da citotoxicidade através da avaliação da viabilidade celular de bactérias através do método de macrodiluição na presença das bactérias *E.coli* e *S. aureus*.

Escherichia coli

Os resultados do ensaio de viabilidade celular pelo método de macrodiluição são apresentados na Figura 36.



Figura 36 - Resultado do ensaio de citotoxicidade na presença das bactérias *S. aureus* (a) e *E.coli* (b).



Na Figura 36 a é possível notar a observar a viabilidade celular de *S.aureus* após 24h em exposição com o extrato do biocimento OGN00 (99,18 \pm 5,8%), também, a manutenção da viabilidade celular em relação ao controle (100,0 \pm 22,94, p< 0,05). Em adição, as amostras reforçadas com OGN, tanto OGN02 (104,0 \pm 5,13) e OGN05 (101,0 \pm 4,66), também não alteraram a viabilidade celular. Esses dados corroboram com os estudos conduzidos por Shieh *et al.* (2017) que mostraram a inefetividade do cimento de fosfato de cálcio sobre cultura de *S. aureus*. Em adição, Mokkapati *et al.* (2018) relatam o comportamento inerte do OG sobre as cepas *Pseudomonas aeruginosa e Bacillus subtilis*.

A viabilidade celular da bactéria *E.coli* após 24 h em exposição com o extrato dos biocimentos é apresentada na Figura 36 b. As amostras de biomateriais OGN00 (119,6 ± 4,35%, p < 0,01), OGN02 (127,2 ± 6,81%, p < 0,001) e OGN05 (134,7 ± 8,04%, p < 0,001) apresentaram um aumento, significativo, da viabilidade celular comparado com o controle que recebeu apenas salina (100,0 ± 3,95%).

Diversos estudos apontam que nanomateriais a base de carbono são citotóxicos para bactérias (FANG *et al.*, 2010; KANG *et al.*, 2009; KANG *et al.*, 2007). Esse efeito tóxico dos materiais grafênicos dependem de fatores como o tempo de exposição do material frente ao organismo testado, a dose usada no experimento, o tipo de células usada

no teste e o método usado para estabelecer a viabilidade celular (SEABRA *et al.*, 2014; CHNG *et al.*, 2014; GURUNATHAN *et al.*, 2013a).

Porém, outros estudos mostram que houve afinidade da bactéria *E. coli* com OG. Akhavan e Ghaderi (2012) estudaram a interação da *E. coli* e o OG e sugeriram que as folhas de OG podem atuar com locais biocompatíveis para proliferação de bactérias. Chong *et al.* (2014) e Jin *et al.* (2014) sugerem que a presença dos grupos carboxila, epóxi, hidroxila e o elevado teor de oxigênio no OG, aumentam sua biocompatibilidade em relação aos outros compostos de carbono. Gurunathan *et al.* (2013b) realizaram um estudo onde o OG foi reduzido a GO utilizando a bactéria *E. coli* como agente da redução, o que sugere afinidade do microrganismo com o material.

Diante disso, pode-se sugerir que o aumento da viabilidade celular detectado no ensaio com a *E. coli* pode estar relacionado a biocompatibilidade do OGN frente ao microrganismo e que os radicas presentes no OGN podem ser sítios que favorecem a proliferação do mesmo.

Os resultados do ensaio de citotoxicidade indicam que as amostras OGN00 OGN02 e OGN05 não interferiram significativamente na viabilidade celular das bactérias testadas; isso sugere que o material não seja citotóxico.

5.9 Ensaios HET-CAM

Neste trabalho foi empregado o ensaio *in vivo* de contato direto do biocimento com a membrana córion-alantoide (HET-CAM) para avaliar a biocompatibilidade. O ensaio é baseado na análise do aparecimento de reações irritativas na membrana corioalantóide de ovos de galinha fertilizados em resposta à exposição do biomaterial. Este método tem como vantagem evitar experimentações com animais para testar a biocompatibilidade de materiais, (LUEPKE; KEMPER, 1986; CAZEDEY *et al.*, 2009).

Um compilado das imagens dos resultados do ensaio de HET-CAM está representado Figura 37 (p.87).



Figura 37 - Ovos controle positivo, negativo e após contato com material avaliado

Fonte: Autor.

Como apresentado na Figura 37 (p.87), os ovos referentes aos controles negativos que receberam solução fisiológica a 0,9% não apresentaram alterações macroscópicas (hiperemia, vasodilatação e/ou hemorragia), como resultado a solução possui 0 de score, ou seja, não irritante. Em contraste, os ovos que receberam a solução NaOH 1M, considerada controle positivo, apresentaram hemorragia grave e progressiva sobre a membrana córion-alantóide em todos os tempos analisados, portanto, pontuação 18 no score, ou seja, classificada como irritante grave.

Após o contato das amostras OGN00 e OGN02 com as membranas dos ovos, não foram visualizadas reações ou alterações durante o tempo analisado (300s). Para as amostras contendo 0,5%m/m de OGN foi observada uma leve hiperemia no tempo de 120s de contato à membrana. Considerando os tempos e scores estabelecidos na Tabela 6 (p. 59) os corpos de prova foram classificados quanto ao seu potencial irritante e os resultados dos scores estão apresentados na Tabela 15.

Amostra	Escore	Classificação
(C+) Solução salina	0	Não irritante (NI)
(C -) Solução de hidróxido de sódio 0,1 N	18	Irritante severo (IS)
OGN00	0	Não irritante (NI)
OGN02	0	Não irritante (NI)
OGN05	2	Irritante leve (IL)
Fonte: /	Vutor	

Tabela 15 - Escores e classificação dos biomateriais testados

Fonte: Autor.

Semelhante ao controle negativo, OGN00 e OGN02 não receberam pontuações e foram classificados como materiais não irritante (NI), já a amostra OGN05 recebeu um score de 2 pontos e foi classifico Irritante leve (IL), como apresentado na Tabela 15. Todos os corpos de provas obtiveram resultados satisfatórios sugerindo uma boa tolerância e, portanto, biocompatibilidade.

5.10 Degradação



Os resultados do ensaio de degradação estão representados na Figura 38.

Figura 38 - Gráfico dos resultados de perda de massa do biocimento

Os CPCs podem ser degradados por reabsorção ativa ou passiva. A reabsorção ativa é um processo celular mediado por osteoclastos, enquanto a reabsorção passiva é baseada na solubilidade química do material CPC (LANAO *et al.*, 2011). Neste estudo foi avaliada perda de massa devido à solubilidade química do material.

A perda de massa após 1 dia de ensaio foi mais representativa no OGN00 (0,5%), já as amostras OGN02 e 05 tiveram perda de massa menor, similares entre si e sem diferença estatisticamente significativa. Após três dias de imersão no Tris-HCI, as três amostras apresentam redução no percentual de perda de massa e seus valores não apresentaram diferença estatisticamente significativa. Após sete dias de imersão ocorre novamente uma redução da perda de massa e as amostras não apresentaram diferença estatisticamente significativa entre si.

Solonenko *et al.* (2018), em seu estudo, afirmaram que pode acontecer um processo secundário de precipitação de apatitas durante imersão de composto de hidroxiapatita em Tris-HCL. Ao analisar todo o período de ensaio pode-se perceber que à medida que as amostras ficam mais tempo imersas a perda de massa reduz, isso pode ser indicativo de um reprecipitação de material.

O pH da solução tris-HCl permaneceu sem modificações durante ensaio. No entanto a concentração de cálcio variou, o resultado das medições está representado na Figura 39.



Figura 39 - Concentração de cálcio durante ensaio de degradação do biocimento

De acordo com o apresentado na Figura 39, a concentração de cálcio apresenta tendência de subir à medida que as amostras ficam imersas em Tris-HCl, para as amostras OGN00 e OGN05. Porém, a amostra OGN02,0 após o terceiro dia de imersão, apresenta um crescimento menor na concentração de cálcio se comparado aos outros grupos amostrais. Solonenko *et al.* (2018) relataram comportamento semelhante na concentração de cálcio de amostras de HA imersas em Tris-HCl, também devido a reprecipitação de apatitas no material testado. Entretanto, em seu estudo, o autor avaliou a concentração de cálcio num período de mais de 80 dias, sendo que em até 5 dias de imersão a concentração de cálcio no meio aumentou e em seguida, até o 10 dia de experimento, houve ume redução e sua estabilização até o final do período avaliado.

Fonte: Autor.

6 CONCLUSÃO

Baseado nos resultados obtidos neste trabalho foi possível concluir que:

- Através da metodologia proposta neste estudo permitiu o desenvolvimento de um cimento ósseo com reforço de óxido de grafeno que obteve curto tempo de endurecimento e com perspectiva de uso em aplicações biomédicas de reparação do tecido ósseo;
- As caracterizações físico-químicas e os resultados dos ensaios mecânicos, indicaram que a dispersão da faze de reforço e possível agregação do reforço foram fatores influenciadores da resistência mecânica do biocimento;
- Os resultados dos ensaios mecânicos demonstraram que o material estudado apresentou comportamento mecânico dentro da faixa de resistência do osso esponjoso, sugerindo que possua potencial aplicação clínica;
- O OGN contribuiu não apenas como reforço, mas também encurtou o tempo de ajuste do CFC;
- O citotoxicidade indicou que o material não teve característica citotóxica;
- O material foi classificados como não irritante pelo ensaio HET-CAM, indicando biocompatibilidade;
- Quanto a degradação houve redução da perda de massa, aparentemente causada pelo processo de reprecipitação de apatitas;
- Adição de 0,2%m/m de OGN mostrou-se a proporção adequada por apresentar redução adequada do tempo de pega, melhores características de reforço e biocompatibilidade.

7 SUGESTOES DE TRABALHOS FUTUROS

- Avaliação do tempo de pega do CFC com OGN com razões líquido/pó menores que 0,8mL/g, a fim de reduzir o tempo de pega inicial;
- Quantificar da tenacidade à fratura (K1c) diante da variação de OGN incorporado no CFC por meio de ensaio;
- Aprimorar rota de fabricação do OGN a fim de reduzir impurezas presentes no material;
- Avaliar a melhor forma de dispersão do OGN para uso em biocimentos de fosfato de cálcio;
- Avaliar a interface de interação entre CFC e o OGN;
- Avaliação da biofuncionalidade de CFC com reforço de OGN injetável, em proporções de líquido/pó superiores a 0,8;
- Realizar estudo estatístico de Weibull para avaliar a probabilidade de ruptura;
- Realizar ensaio de citotoxicidade com células ósseas;
- Avaliar degradação do material em períodos superiores a 10 dias.

REFERÊNCIAS

ADEL, A. M.; ABOU-YOUSSEF, H.; EL-GENDY A. A.; NADA, A.M. Carboxymethylated cellulose hydrogel: sorption behavior and characterization. **Nature and Science**, v.8, n.8, p.244-256, 2010.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **ANVISA M2-A8**, NCCLS/CLSI -Padronização dos testes de sensibilidade a antimicrobianos por disco—difusão: Norma Aprovada – 8 ed. Documento M2-A8, v.23, n.1. Substitui a Norma M2-A7. v.20, n. 1.

AJAXON, I.; ACCIAIOLI, A.; LIONELLO, G.; GINEBRA, M. P.; CAROLINE Ö.M.; BALEANI, M.; PERSSON, C. Elastic properties and strain-to-crack-initiation of calcium phosphate bone cements: revelations of a high-resolution measurement technique. **Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials,** v.74, p.428-437, Oct. 2017.

AMBARD, A. J., & MUENINGHOFF, L. Calcium phosphate cement: review of mechanical and biological properties. **Journal of Prosthodontics**, v. 15, n. 5, p. 321–328, Sep-Oct. 2006.

AKHAVAN, O.; GHADERI, E. Escherichia coli bacteria reduce graphene oxide to bactericidal graphene in a self-limiting manner. **Carbon,** v. 50, issue 5, p. 1853-1860, Apr. 2012.

ALVES, H. L. R.; DOS SANTOS, L. A.; BERGMANN, C. P. Injectability evaluation of tricalcium phosphate bone cement. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, v.19, Issue 5, p. 2241–2246, May. 2008.

ALBUQUERQUE, J. S. V.; ALVES, E. R.; NOGUEIRA, R. E. F. Q. Análise Estatística do tempo de Pega de Biocimentos de Fosfato de Cálcio. In: CONGRESSO LATINO AMERICANO DE ORGÃOS ARTIFICIAIS E BIOMATERIAIS, 2012, Natal. **Anais do COLAOB**, 2012.

American Society for Testing and Materials Standard, **ASTM A327/A327M – 11:** Standard Test Methods for Impact Testing of Cast Irons.

_____. ASTM C1327 – 15: Standard test method for Vickers indentation hardness of advanced ceramics.

_____. ASTM C1161 – 18: Test method for 65 flexural strength of advanced ceramics at ambient temperature.

_____. **ASTM E23 – 18:** Test methods for notched bar impact testing of metallic materials.

_____. **ASTM E384 – 17**: Standard test method for microindentation hardness of materials.

ANDRADE, S. S. C. A.; JORGE, M. H. P. M. Estimativa de sequelas físicas em vítimas de acidentes de transporte terrestre internadas em hospitais do Sistema Único de Saúde. **Revista brasileira de epidemiologia**, São Paulo, v.9, n.1, p.100-111, Mar. 2016.

ANTUNES, J. M. A. A indentação de materiais maciços e filmes finos: Modelação e análise inversa. 2006. 197f. Tese (Doutorado) - Engenharia Mecânica, Universidade de Coimbra

Faculdade de Ciências e Tecnologia, Coimbra, 2006.

AQUINO, L.R.C.; MACÊDO, A.A.M.; GRAÇA, M.P.F.; VALENTE, M.A.; SILVA, C.C. Preparation and characterization of cement-based hydroxyapatite and galactomannan extracted from adenanthera pavonina L. **Revista Latinoamericana de Metalurgia y Materiales**, n.37, v.1, p. 102-110. 2017.

ARAÚJO JÚNIOR, C. P. **Painéis de fibras elaborados a partir da casca do coco verde sem adição de resinas aglutinantes.** 2014. 84f. Dissertação (MESTRADO) - Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2014.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS, **NBR 12128**: Gesso para construção civil — Determinação das propriedades físicas da pasta de gesso. Rio de Janeiro, 2017.

BAUDÍN, C.; BENET, T.; PENA, P. Effect of graphene on setting and mechanical behavior of tricalcium phosphate bioactive cements. **Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials**, v. 89, p. 33-47, Jan. 2019.

BARBUCCI, R.; LEONE, G.; MONICI, M.; PANTALONE, D.; FINI, M.; GIARDINOD, R. The effect of amidic moieties on polysaccharides: evaluation of the physicochemical and biological properties of amidic carboxymethylcellulose (cmca) in the form of linear polymer and hydrogel. **Journal of Materials Chemistry**, v.15, p.2234-2241, 2005.

BERTOL, L. S.; ESCOBAR, C. F.; KINDLEIN JÚNIOR, W.; SANTOS, L. A.; MEDEIROS, E. B.; TORRIANI, M. A.; BERGMANN, C. P. Projeto, fabricação e avaliação de implantes craniofaciais personalizados: proposta de utilização de materiais combinados. **Rev. Bras. Eng. Biom**., v. 26, n. 2, p. 79-89, ago. 2010.

BOEHM, A. V.; MEININGER, S.; TESCH, A.; GBURECK, U.; MÜLLER, F. A. The Mechanical Properties of Biocompatible Apatite Bone Cement Reinforced with Chemically **Activated Carbon Fibers**, v. 11, issue 2, n. 192, p. 1-12, Feb, 2018.

BOHNER, M.; BAROUD, G. Injectability of calcium phosphate pastes. **Biomaterials**, v.26, issue 13, p. 1553-1563, May, 2005 a.

_____. GBURECK, U., AND BARRALET, J. E. Technological issues for the development of more efficient calcium phosphate bone cements: a critical assessment. **Biomaterials,** v.26, Issue 33, p. 6423-6429, Nov. 2005 b.

_____. Calcium orthophosphates in medicine: from ceramics to calcium phosphate cements. **Injury**, v.31, supplement 4, p. D37–D47, Dec. 2000.

_____. LEMAÎTRE, J.; VAN LANDUYT, P.; ZAMBELLI, P. Y.; MERKLE, H. P.; GANDER, B., Gentamicin-loaded hydraulic calcium phosphate bone cement as antibiotic delivery system. **J. Pharm. Sci, v.**86, issue 5, p.565-572, May 1997.

CALLISTER JR, W. D.; RETHWISCH, D. G. Ciência e Engenharia de Materiais: Uma Introdução. 9.ed, Rio de Janeiro: LTC, 2016. 912p.

CAO, W.; HENCH, L. L. Bioactive materials. **Ceramics International**, v.22, Issue 6, p.493-507, 1996.

CANAL, C.; GINEBRA, M.P. Fiber-reinforced calcium phosphate cements: A review, **Journal of the mechanical behavior of biomedical materials**, v. 4, p. 1658–1671, 2011.

CAZEDEY, E.C.L.; CARVALHO, F.C.; FIORENTINO, F.A.M.; GREMIÃO, MA.P.D.; SALGADO, H.R.N. Corrositex®, BCOP and HET-CAM as alternative methods to animal experimentation. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences** v. 45, n. 4, p. 759-766, Oct./Dec. 2009

CHEN, L.; ZHAI, D.; HUAN, Z.; MA, N.; ZHU, H.; WU, C.; CHANG, J. Silicate bioceramic/PMMA composite bone cement with distinctive physicochemical and bioactive properties. **The Royal Society of Chemistry Advances**, v.5, issue 47, p. 37314–37322, Apr. 2015.

CHEN, J. L.; STEELE, T. W. J.; STUCKEY, D. C. Metabolic reduction of resazurin; location within the cell for cytotoxicity assays. **Biotechnology and Bioengineering**, v.115, issue 2, p.351–358, Fab. 2018.

CHNG, E. L. K.; SOFER, Z.; PUMERA, M. Cytotoxicity profile of highly hydrogenated graphene. **Chemistry A European Journal**, v. 20, n. 21, p. 6366–6373, Apr. 2014.

CHONG,Y. ;MA, Y.; SHEN, H.; TU,X.; ZHOU, X.; XU, J.; DAI, J.; FAN, S.; ZHANG, S. The in vitro and in vivo toxicity of graphene quantum dots. **Biomaterials, v.**35, issue 19, p. 5041-5048, Jun. 2014.

CURREY, J.D. Bones: Structure and Mechanics, New Jersey: Princeton University Press, 2002, 456p.

DING, Y.; TANG, S.; YU, B.; YAN, Y.; LI, H.; WEI, J.; SU. J.; *In vitro* degradability, bioactivity and primary cell responses to bone cements containing mesoporous magnesium–calcium silicate and calcium sulfate for bone regeneration. **J. R. Soc. Interface**, v.12, issue 111, Oct. 2015.

DRIESSENS, F. C. M.; FERNÁNDEZ, E.; GINEBRA, M. P.; BOLTONG, M. G.; PLANELL, J. A. Calcium phosphates and ceramic bone cements vs. acrylic cements. **Anal. Quim. Int. Ed.**, v. 93, p. S38 - S43, 1997.

_____. BOLTONG, M. G.; DE MAEYER, E. A. P. ; VERBEECK, R.M. H.Effect of temperature and immersion on the setting of some calcium phosphate cements. **Journal of materials science: materials in medicine,** Ghent, Belgium, v.11, issue 7, p.453-457, Jul. 2000.

DOROZHKIN, S.V. Calcium orthophosphate cements for biomedical application. *Journal of Materials Science*, v.43, issue, 9, p.3028-3057, May 2008.

ELIAZ, N.; Metoki N. Calcium Phosphate Bioceramics: A Review of Their History, Structure, Properties, Coating Technologies and Biomedical Applications. **Materials**, vol.10, iss.4, Mar. 2017.

EMI, E. T. P. Caracterização das propriedades mecânicas de osso irradiado, utilizando ensaios destrutivos e não destrutivos. 2014. 52f. Dissertação (MESTRADO) - Faculdade de Odontologia, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2014.

FANG, M.; ZHANG, Z.; LI, J.; ZHANG, H.; LU, H.; YANG, Y. Constructing hierarchically structured interphases for strong and tough epoxy nanocomposites by amine-rich graphene surfaces. **J. Mater. Chem, v.**20, issue 43, p. 9635–9643, 2010.

FERMINO, D. M. **Propriedades mecânicas e térmicas de nanocompósito híbrido de polipropileno com adição de argila e celulose proveniente de papel descartado**. 2015. 114f. Tese (Doutorado) - Engenharia Metalúrgica e de Materiais, Escola Politécnica da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015.

FERNANDES, J. M.; TRAJANO, W. T.; ESCOBAR, C. F; SANTOS, L. A. Propriedades do cimento de fosfato de cálcio com adição de polímeros. In. Congresso Brasileiro de Cerâmica, 56.; Congresso Latino-Americano De Cerâmica, 1.; Brazilian Symposium on Glass and Related Materials, IX., 2012, Curitiba. **Anais of Brazilian Symposium on Glass and Related Materials.** Curitiba. 2012, p.1838-1846.

FOO, M. E.; GOPINATHA, S. C. B. Feasibility of graphene in biomedical applications, **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v.94, p. 354–361, 2017.

FRANCZAK, P. F. Síntese e caracterização de biocimentos de fosfatos de cálcio para uso na reparação do tecido ósseo. 120f. Dissertação (MESTRADO) – Ciência e Engenharia de Materiais, Universidade do Estado de Santa Catarina, Joinville, Set. 2014.

FREITAS, R. M.; PERILLI, T. A. G.; LADEIRA, A. C. Q. Oxidative Precipitation of Manganese from Acid Mine Drainage by Potassium Permanganate. **Journal of Chemistry.** v., article ID 287257, 2013.

GARCIA, A.; SPIM, J. A.; SANTOS C. A. Ensaio de dureza. In: **Ensaio de materiais.** 2. Ed, Rio de Janeiro: LTC, 2015. cap. 14, p. 115-157.

GINEBRA, M.P.; FERNANDEZ, E.; De MAEYERL, E,A,P; VERBEECK, R.M.H.; BOLTONG, M.G.; GINEBRA, J.; DRIESSENS, F.C.M.; PLANELL, J.A. Setting

Reaction and Hardening of an Apatitic Calcium Phosphate Cement. **Journal of Dental Research**, v. 76, issue 4, p. 905–912, Apr. 1997.

GONÇALVES, G.; CRUZ, S. M. A.; RAMALHO, A.; GRÁCIO, J.; MARQUES, P. A. A. P. Graphene oxide versus functionalized carbon nanotubes as a reinforcing agent in a PMMA/HA bone cement. **Nanoscale**, v. 4, n. 9, p. 2937–2945, Apr. 2012.

GUERRERO-CONTRERAS, J.; CABALLERO-BRIONES, F. Graphene oxide powders with different oxidation degree, prepared by synthesis variations of the Hummers method. **Materials Chemistry and Physics**, v.153, n. 1, p. 209-220, Mar. 2015.

GURUNATHAN, S.; HAN, J. W.; EPPAKAYALA, V.; KIM, J.-H. Green synthesis of graphene and its cytotoxic effects in human breast cancer cells. **International Journal of Nanomedicine**, v. 8, issue 1, p. 1015–1027, Mar. 2013 a.

_____. Microbial reduction of graphene oxide by Escherichia coli: A green chemistry approach. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, v.**102, p.772-777, Feb. 2013 b.

HABRAKEN, W.J.E.M.; WOLKE,J.G.C.; JANSEN,J.A. Ceramic composites as matrices and scaffolds for drug delivery in tissue engineering. **Adv. Drug Delivery**, v. 59, Issues 4–5, p. 234-248, May 2007.

HEINZE, T.; KOSCHELLA, A. Carboxymethyl ethers of cellulose and starch: a review. **Macromol. Symp.**, v.223, p.13-39, 2005.

HENCH, L. L.; WILSON, J. **An introduction to Bioceramics**. 2. ed., Singapore; River Edge, New Jersey, Estados Unidos da América: World Scientific Publishing Co., 1993, 386p.

IBRAHIM, M. Z.; SARHAN, A. A.D.; YUSUF, F.; HAMDI, M. Biomedical materials and techniques to improve the tribological, mechanical and biomedical properties of orthopedic implants – A review article. **Journal of Alloys and Compounds**, v.714, p.636-667, Aug. 2017.

INGRID, A.; ANDERS, H.; CAROLINE, Ö.; CECILIA, P.; Fatigue performance of a high-strength, degradable calcium phosphate bone cement, **Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials**, v. 79, p. 46-52, 2018.

INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION. **ISO 10993-14.** Biological evaluation of medical devices — Part 14: Identification and quantification of degradation products from ceramics, 2011. 21p.

JANSEN, J.; OOMS, E.; VERDONSCHOT, N.; WOLKE, J. Injectable calcium phosphate cement for bone repair and implant fixation. **The Orthopedic Clinics of North America**, v.36, issue 1, p. 89-95 Jan. 2005.

JIA, J.; ZHOU, H.; WEI, J.; JIANG, X.; HUA, H.; CHEN, F.; WEI, S.; SHIN, J.-W.; LIU, C. Development of magnesium calcium phosphate biocement for bone regeneration. **Journal of the Royal Society Interface**, v. 7, n. 49, p. 1171–1180, Apr. 2010.

JIN, C.; WANG, F.; TANG, Y.; ZHANG, X.; WANG, J.; YANG, Y. Distribution of graphene oxide and TiO2-graphene oxide composite in A549 cells. **Biological Trace Element Research**, v. 159, n. 1–3, p. 393–398, Jun. 2014.

JOHRA, F. T.; LEE, J; JUNG W. Facile and safe graphene preparation on solution based platform. **Journal of Industrial and Engineering Chemistry**, v.20, Issue 5, p. 2883-2887, Sep. 2014.

JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. **Histologia básica.** 12.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2013, 558p.

KANG, S.; PINAULT, M.; PFEFFERLE, L.D.; ELIMELECH, M. Single-Walled Carbon Nanotubes Exhibit Strong Antimicrobial Activity. **Langmuir, v.**23, issue 17, p. 8670–8673, 2007.

KANG, X.; WANG, J.; WU, H.; AKSAY, I.; LIU, J.; LIN, Y. Glucose Oxidase–graphene– chitosan modified electrode for direct electrochemistry and glucose sensing. **Biosensors and Bioelectronics**, v.25, issue 4, p.901-905, Dec. 2009.

KATTI, K.S. Biomaterials in total joint replacement. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, v.** 39, Issue 3, p. 133-142, Dec. 2004.

KOSTIUK, D.; BODIK, M.; SIFFALOVIC, P.; JERGEL, M.; HALAHOVETS, Y.; HODAS, M.; PELLETTA, M.; PELACH, M.; HULMAN, M.; SPITALSKY, Z.; OMASTOVA, M.; MAJKOVA, E. Reliable determination of the few-layer graphene oxide thickness using Raman spectroscopy. **Journal of Raman spectroscopy**. Slovakia, v. 47, p. 391-394, 2016.

KU, S. H.; PARK, C. B. Myoblast differentiation on graphene oxide. **Biomaterials**, v. 34, n. 8, p. 2017–2023, Mar. 2013.

LANAO, R. P. F.; LEEUWENBURGH, S. C. G.; WOLKE, J. G. C.; JANSEN, J.A. In vitro degradation rate of apatitic calcium phosphate cement with incorporated PLGA microspheres. **Acta Biomaterialia**, v.7, issue 9, p.3459-3468, Sep. 2011.

LEE, W. C.; LIM, C. H. Y. X.; SHI, H.; Tang, L. A. L.; Wang, Y.; Lim, C. T.; Loh, K. P. Origin of Enhanced Stem Cell Growth and Differentiation on Graphene and Graphene Oxide. **ACS Nano**, v. 5, n. 9, p. 7334–7341, 2011.

LEONE, G.; FINI, M.; TORRICELLI, P.; GIARDINO, R.; BARBUCCI, R. An amidated carboxymethylcellulose hydrogel for cartilage regeneration. **J. Mater. Sci.: Mater. Med.**, v.19, n. 8, p.2873-2880, Aug. 2008.

LEWIS, G.; MLADSI, S. Correlation between impact strength and fracture toughness of PMMA-based bone cements. **Biomaterials**, v. 21, n. 8, p. 775–781, 2000.

_____. Properties of acrylic bone cement: state of the art review. J Biomed Mater Res, v.38, Issue 2, p.155-182, July, 2002.

_____. Injectable bone cements for use in vertebroplasty and kyphoplasty: State-of-the-art review. Journal of Biomedical Materials Research Part B-Applied Biomaterials, v.76B, issue 2, p.456-468, Feb. 2006.

LI, Z. Raman Spectroscopic Studies of the Mechanics of Graphene-based Nanocomposites. 194p. thesis (DOCTOR OF PHILOSOPHY) - Engineering and Physical Sciences, The University of Manchester, United Kingdom, 2015.

LIBRARYSCIENCEPHOTO. Disponível em: http://www.sciencephoto.com/images. Acesso em: jan. 2017.

LIU, L.; ZHANG, J.; ZHAO, J.; LIU, F. Mechanical properties of graphene oxides. **Nanoscale**, v. 4, n. 19, p. 5910–5916, Jul. 2012.

LIU, Y.; YAN, D.; ZHUO, R.; LI, S.; WU, Z.; WANG, J.; REN, P.; YAN, P.; GENG, Z. Design, hydrothermal synthesis and electrochemical properties of porous birnessite-type manganese dioxide nanosheets on graphene as a hybrid material for supercapacitors, **Journal of Power Sources**, v.242, p.78-85, Nov. 2013.

LOPEZ-HEREDIA, M. A.; KAMPHUIS, G. J. B.; THÜNE, P. C.; ÖNER, F. C.; JANSEN, J. A.; WALBOOMERS, X. F. An injectable calcium phosphate cement for the local delivery of paclitaxel to bone. **Biomaterials**, v.32, issue 23, p.5411-5416, Aug. 2011.

LOTYA, M.; HERNANDEZ, Y.; KING, P. J.; SMITH, R. J.; NICOLOSI, V.; KARLSSON, L. S.; BLIGHE, F.M.; DE, S.; WANG, Z.; MCGOVERN, I. Liquid phase production of graphene by exfoliation of graphite in surfactant/water solutions. **Journal of the American Chemical Society**, v.131, issue 10, p. 3611-3620, Feb. 2009.

LU, J.; YU, H.; CHEN, C. Biological properties of calcium phosphate biomaterials for bone repair: a review. **RSC Advances**, v.8, iss.4, 2018.

LU, Z.; LI, X.; HANIF, A.; CHEN, B.; PARTHASARATHY, P.; YU, J.; LI, ZONGJIN. Early-age interaction mechanism between the graphene oxide and cement hydrates. **Construction and Building Materials**, v.152, p. 232–239, Out. 2017.

LUEPKE, N. P.; KEMPER, F. H. The HET-CAM test: an alternative to the Draize eye test. **Fd Chem. Toxic**, v. 24, n. 6/7, p. 495-496, Great Britain, 1986.

LUZ, S. M. Estudo das propriedades mecânicas, interface e morfologia de compósitos de polipropileno reforçados com fibras de bagaço e palha de cana. 2008. 153f. Tese (Doutorado) - Biotecnologia Industrial, Escola de Engenharia de Lorena da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

MOKKAPATI, V.; PANDIT, S.; KIM, J.; MARTENSSON, A.; LOVMAR, M.; WESTERLUND, F.; MIJAKOVIC, I. Bacterial response to graphene oxide and reduced graphene oxide integrated in agar plates. **Royal Society open science**, v.5, issue 11, id.181083, Nov. 2018

MONTEIRO, D. G.; GORUP, L. F.; TAKAMIYA, A. S.; RUVOLLO-FILHO, A. C.;CAMARGO, E. R.; BARBOSA, D. B. The growing importance of materials that

prevent microbial adhesion: antimicrobial effect of medical devices containing silver. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 34, Issue 2, p. 103-110, Aug. 2009.

MORÚA, O. C.; CARDOSO, M. J. B.; FARIAS, K. A. S.; BARBERO, M. A. R.; CARRODEGUAS, R. G.; FOOK, M. V. L. Síntese e Avaliação de Cimento Ósseo com Diferentes Concentrações de Brushita. **Revista Eletrônica de Materiais e Processos**, v. 12, n. 1, p. 58–63, 2017.

NATHER, A. Bone grafts and bone substitutes: basic science and clinical applications. 1. ed. New Jersey: World Scientific Publishing Company, 2005, 592p.

NAVARRO, M.; MICHIARDI, A.; CASTANÕ, O.; PLANELL, J. A. Biomaterials in orthopaedics. Journal of the Royal Society Interface, v. 5, p. 1137-1158, 2008.

OH, S.; OH, NAMSIK.; APPLEFORD, M.; ONG, J. Bioceramics for tissue engineering applications – A review. **American Journal of Biochemistry & Biotechnology**, v.2, n.2, p.49-56, 2006.

O'NEILL, R.; MCCARTHY, H.O.; MONTUFAR, E.B.; GINEBRA, M.-P.; WILSON, D.I.; LENNON, A.; DUNNE, N. Critical review: Injectability of calcium phosphate pastes and cements. **Acta Biomaterialia**, v.50, issue 1, p.1–19, Mar. 2017.

ORÉFICE, R. L.; PEREIRA. M. M.; MANSUR, H. S. **Biomateriais: Fundamentos & Aplicações**. 1.ed., 1.reimpr., Rio de Janeiro: Cultura Médica: Guanabara Koogan, 2012, 538p.

OSÓRIO, S. L. F. **Avaliação do desempenho mecânico e térmico da resina epóxi reforçada com nanotubos de carbono e grafeno para uso aeronáutico.** 2019. 60f. Dissertação (MESTRADO) - Engenharia de Materiais, Centro Federal de Educação Tecnológica de Minas Gerais (CEFET/MG), Belo horizonte, Minas Gerais, 2018.

PAES, T. F. **Silício poroso: estudo de estruturas e fotoluminescência para possíveis**. 2016. 169f. Tese (DOUTORADO) - Engenharia e Tecnologia Espaciais/Ciência e Tecnologia de Materiais e Sensores, Instituto Nacional de Pesquisas Espaciais (INPE), São José dos Campos, São Paulo, 2016

PALMER, I.; NELSON, J.; SCHATTON, W.; DUNNE, N. J.; BUCHANAN, F. J.; CLARKE, S. A. Biocompatibility of calcium phosphate bone cement with optimized mechanical properties. Journal of biomedical materials research b: applied biomaterials, v. 104B, ISSUE 2, p.308-315, feb. 2016.

PAZ, E.; FORRIOL, F.; del REAL, J.; DUNNE, N. Graphene oxide versus graphene for optimization of PMMA bone cement for orthopedic applications. **Materials Science and Engineering**, c. 77 p.1003–1011, 2017.

PERUMBILAVIL, S.; SANKAR, P.; ROSE, T. P.; PHILIP, R. White light Z-scan measurements of ultrafast optical nonlinearity in reduced graphene oxide nanosheets in the 400–700 nm region. **Applied physics letters**, v. 107, Issue 5, 051104, 2015.

PINTO, J. G. S.; CIPRANDI, M. T. O.; AGUIAR, R. C.; LIMA, P. V. P.; HERNANDEZ, P. A. G.; SILVA JÚNIOR, A. N. Enxerto autógeno x biomateriais no tratamento de fraturas e deformidades faciais – uma revisão de conceitos atuais. **RFO**, v. 12, n. 3, p. 79-84, set./dez. 2007.

PIRES, A. L. R.; BIERHALZ, A. C. K.; MORAES, A. M. BIOMATERIAIS: TIPOS, APLICAÇÕES E MERCADO. **Quim. Nova,** v. 38, n. 7, p. 957-971, 2015.

PRAKASAM, M.; LOCS, J.; SALMA-ANCANE, K.; LOCA, D.; LARGETEAU, A.; BERZINA-CIMDINA, L. Fabrication, Properties and Applications of Dense Hydroxyapatite: A Review. **Journal of Functional Biomaterials**, v.6, p.1099-1140, Dec. 2015.

RAJENDRAN, A. M.; KROUPA, J. L. Impact damage model for ceramic materials. **Journal of Applied Physics**, v.66, n. 8, p. 3560–3565, Oct. 1989.

RAMALHO, A. C. A. **Desenvolvimento e caracterização de cimentos ósseos inovadores**, 2010. 101f. Dissertação (Mestrado) - Ciências Biomédicas, Faculdade das Ciências da Saúde, Universidade da Beira Interior, 2010.

REED, J. S. **Principles of ceramic processing**. 2. ed. New York: John Wiley & Sons, 1995., 688p.

REICHENHEIM, M. E., SOUZA, E. R.; MORAES, C. L.; MELLO, J. M. H. P; DA SILVA, C. M. F. P; MINAYO, M. C. S. Violence and injuries in Brazil: the effect, progress made, and challenges ahead. **The Lancet**, v.377, p.1962-75, Jun. 2011.

RIBEIRO, C.; SEPULVEDA, P.; BRESSIANI, J. C.; BRESSIANI, A. H. A. Processamento De Cerâmicas Bifásicas de Fosfatos de Cálcio. In. Congresso Brasileiro de Cerâmica, 46., 2002, São Paulo. **Proceedings of the 46th Annual Meeting of the Brazilian Ceramic Society,** São Paulo, 2002, p.842-853.

SANAN, A.; HAINES, S. J. Repairing holes in the head: a history of cranioplasty. **Neurosurgery**, vol 40, n.3, p 588-603, Mar. 1997.

SANTANA, M. Estudo e Caracterização de Compósitos Cerâmicos Submicrométricos de Alumina-Zircônia para Aplicações em Pilares Cerâmicos. 2015. 106f. Dissertação (Mestrado) - Engenharia Mecânica, Faculdade de Engenharia Mecânica da Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2015.

SCHEID, A. **Propriedades Mecânicas dos Aços**. Disponível em: <<u>http://ftp.demec.ufpr.br/disciplinas/TM049/Aula%203.pdf</u>>. Acesso em: 01 março 2018.

SCHMITZ, J. P.; HOLLINGER, J.O.; MILAN, S. B. Reconstruction of bone using calcium phosphate bone cement: a critical review. **Journal of Oral Maxillofacial Surgery**, vol. 57, n.9, p1122-1126, Set. 1999.

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

SEYEDMAJIDI, S.; RAJABNIA, R.; SEYEDMAJIDI, M. Evaluation of antibacterial properties of hydroxyapatite/bioactive glass and fluorapatite/bioactive glass nanocomposite foams as a cellular scaffold of bone tissue. **Journal of Laboratory Physicians**. v. 10, issue 3, Jul-Sep. 2018.

SHIEH, T.M., HSU, S.H., CHANG, K.C., CHEN, W.C., LIN, D.J., "Calcium Phosphate Cement with Antimicrobial Properties and Radiopacity as an Endodontic Material", **Materials**, v.10, issue 11, p. 1256-1272, Out. 2017.

SILVA, L. A. **Desenvolvimento de cimento de fosfato de cálcio reforçado com fibras para uso na área médico-odontológica.** 274f. Tese (DOUTORADO) – Engenharia Mecânica, Universidade de Campinas, Campinas, 2002.

SOLONENKO, A. P. ; BLESMAN, A. I.; POLONYANKIN, D. A. Preparation and *in vitro* apatite-forming ability of hydroxyapatite and β -wollastonite composite materials. **Ceramics International** v.44, issue 15, p.17824-17834, Oct. 2018,

SOUZA, S. A. **Ensaios mecânicos de materiais metálicos.** 4.ed, São Paulo: Edgar Blucher, 1974. 239p.

SUK, J. W.; PINER, R. D.; AN, J.; RUOFF, R. S. Mechanical Properties of Monolayer Graphene Oxide. **ACS Nano**, v. 4, n. 11, p. 6557–6564, 2010.

TORRES, P. M. C. **Cimentos injetáveis à base de fosfatos de cálcio para vertebroplastia.** 2016. 261f. Tese (DOUTORADO) - Departamento de Eng^a de Materiais e Cerâmica, Universidade de Aveiro, 2016.

WAN, D.C.; NACAMULI, R.P.; LONGAKER, M.T. Craniofacial bone tissue engineering. **Dental Clinics of North American**, v.50, n.2, p.175-190, 2006.

WANG, Q.; WANG, Q, WAN, V. The effect of porosity on the structure and properties of calcium polyphosphate bioceramics. **Ceramics – Silikáty**, v.55, issue 1, p.43-48, 2011.

WANG, S.; ZHANG, S.; WANG, Y.; SUN, X.; SUNA, K. Reduced graphene oxide/carbon nanotubes reinforced calcium phosphate cement. **Ceramics International**, vol.43, n.16, p.13083–13088, Nov. 2017.

WANG, X.; YE, J.; WANG, Y.; WU, XIANPEI; BAI, B. Control of crystallinity of hydrated products in a calcium phosphate bone cement. **Journal of Biomedical Materials Research Part A**, v.81, issue 4, p.781-790, Jun. 2007.

WHO (WORLD HEALTH ORGANIZATION). United Nations Road Safety Collaboration. **Global plan for the Decade of Action for Road Safety 2011-2020**. Geneva: World Health Organization; Disponível em:< <u>https://nacoesunidas.org/campanha/seguranca-transito/</u> >. Acesso 20 jan. 2018.

YAN, D.; YAN, P.X.; CHENG, S.; CHEN, J.T.; ZHOU, R.F.; FENG, J.; ZHANG, G.A. Fabrication, In-Depth Characterization, and Formation Mechanism of Crystalline Porous Birnessite MnO2 Film with Amorphous Bottom Layers by Hydrothermal Method. **Crystal Growth & Design**, v..9, n.1, p.2018-222, Des. 2009.

ZHANG, J.; LIU, W.; SCHNITZLER, V.; TANCRET, F.; BOULER, J. Calcium phosphate cements for bone substitution: Chemistry, handling and mechanical properties. **Acta Biomaterialia**, v.10, Issue 3, p. 1035-1049, Março, 2014.

ZHI, X.; FANG, H.; BAO, C.; SHEN, G.; ZHANG, J.; WANG, K.; GUO, S.; WAN, T.; CUI, D. The immunotoxicity of graphene oxides and the effect of PVP-coating. **Biomaterials**, v. 34, n. 21, p. 5254–5261, Jul. 2013.

ANEXO A - DATA SHEET FOSFATO DE CÁLCIO

Código: CP 29

Dados do produto

CAS No.	1306-06-5 (HA)
	7790-76-3 (ACP)
Name químico	Hidroxiapatita (HA), Hidroxifosfato de cálcio, Fosfato de cálcio tribásico, HAp, Hidroxilapatita, Fosfato de cálcio tribásico,
	Hidroxiortofosfato Pentacálcio
	 Fosfato de cálcio amorfo (ACP), hidrogeno fosfato de cálcio
Fórmula Molecular	HA - Ca ₁₀ (PO ₄) ₆ (OH) ₂ e ACP - (Ca ₃ (PO ₄) ₂ . <i>n</i> H ₂ O)
Descrição	Pó branco fino

ESPECIFICAÇÃO QUIMICA

Ca (%)	40,180
P (%)	19,12
Si (%)	< 0,02
Outros: Fe, Al, Hg, Pb, Cd, Co, Cr, As, Ni, Cu, Zn, Mn, Al, Na, Mg (%)	0,222
Balanço de massa: O e H	40,46
Ca/P razão molar	1,62
Tamanho das partículas sub-micrometricas (cristalitos)	12nm
Perda de ignição (1000°C/1h) (%)	3,175
Tamanho Mediano de Partículas Cilas (µm)	8,800
Tamanho de Aglomerado de Partículas Cilas, D10 (µm)	1,610
Tamanho de Aglomerado de Partículas Cilas, D50 (µm)	5,450
Tamanho de Aglomerado de Partículas Cilas, D90 (µm)	18,840
Tamanho de Aglomerado de Partículas Cilas, D _{médio} (µm)	8,010
Área de superfície – BET (m^2/g)	60,520
рН	6,40

Empacotamento padrão (kg)	10
Sacolas (kg)	25, 50, 250 e/ou 500
Armazenamento	Armazene em um armazém limpo e seco nos recipientes originais
	fechados. Nestas condições, o prazo de validade é de 5 anos.
Usos	 Abrasivos na pasta de dentes
	 Polimerização aditiva,
	 Estabilizador para polimerização em suspensão de
	estireno (EPS),
	 Índices de cor,
	 Indústria de pintura,
	 Papel e como estabilizador em vários processos
	químicos,
	 Farmacêutica,
	 Suplemento Dietético (Nutriente).

EMPACOTAMENTO

1) Análise do Tamanho do Aglomerado de Partículas – CILAS (método lazer)



Figura 1: Análise granulométrica do CP 29

Fonte: Phoster Tecnologia de aglomerações LTDA (2018).

2) Análise por Difração de raios X

A DRX mostrada na Figure 2 confirmou que o produto é cristalino e amorfo. Conforme o JCPDS 9.432, o padrão DRX mostra as fases Hidroxiapatita (fase majoritariamente cristalina - 69,20%) e ACP (fase amorfa minoritária - 30,80%).



Fonte: Phoster Tecnologia de aglomerações LTDA (2018).

- Cristallinidade (método DRX)
 69.20%
- 4) Espectrofotômetria Infravermelho com Transformada de Fourier FTIR



Fonte: Phoster Tecnologia de aglomerações LTDA (2018).

Tabela 1: Análise elementar do CP 29		
Elemento	Conteúdo medido (%)	
Са	40,18	
Р	19,12	
Si	<0,02	
Ni	<0,0010	
Na	0,0121	
Mg	0,1612	
Cu	<0,0010	
Fe	0,0170	
Zn	<0,0010	
Pb	<0,0010	
Cd	<0,0001	
Mn	0,0052	
AI	<0,0200	
As	<0,0001	
Cr	<0.0010	
Со	<0.0010	
Hg	<0,0001	
Outros(O e H) – Balanço de massa	40,46	

5) Análise para Espectrometria de Absorção Atômica - AAS
6) Microscópio Eletrônico de Varredura (MEV)



Figure 4: MEV do CP 29

7) Distribuição de nanopartículas



✓ Todas as partículas apresentam diâmetro abaixo de 1 µm.

- ✓ 40% das partículas apresentam diâmetro abaixo de 0,1 µm (100nm).
- ✓ 73% das partículas apresentam diâmetro abaixo de 0,15 µm (150nm).
- ✓ 95% das partículas apresentam diâmetro abaixo de 0,2 µm (200nm).
- $\checkmark~$ 100% das partículas apresentam diâmetro abaixo de 0,25 μm (250nm).
- 8) Área superficial BET

A análise indica que o CP 29 apresentou área superficial de 60,520 m^2/g .

ANEXO B - DATA SHEET DA CARBOXIMETILCELULOSE

	Cotia				
		CERTIFIC	ADO DE ANALISES		
Cliente	002036 · UO COMER ELO HORIZONTE CARBOXIMETILCELUI DENVERCEL PH-40A M-0990/07 25.00 KG	CIAL LTDA MG OSE			
ETERMINACOES		UNID. MED	LOTE: M-0990/07	ESPECI	FICACAD
		******	QUANT.: 25.00	VLR.MINIMO	VLR. MAXIM
PETA CHATE STOAL	ACT# 0 1419		40 AM	99.50	
REZA (BASE SEGA/	18 1300 51		6.1	0.0	8.0
Let be service	5010040 28 260	-	7.0	6.5	8.5
CONTRACT REPORT FEED ALVE	501 21(R5)25C	CP.	430		800
BSERVACOES: VISCOSI	DADE BROOKFIELD I	LVF A 30 RI	PH, PINO 2 · SOLUCAO AQUOSA 22	400 CICORRECAD DE UMIDADE	
BSERVACOES: VISCOSI	DADE BROOKFIELD (LVF A 30 RI	PH, PINO 2 · SOLUCAO AQUOSA 22	400 CICORRECAO DE UMIDADE	
BSERVACOES: VISCOSI	DADE BROOKFIELD I	LVF A 30 RI	PH, PINO 2 - SOLUCAO AQUOSA 22	400	
BSERVACOES: VISCOSI	DADE BROOKFIELD I	LVF A 30 RI Děl	PH. PINO 2 - SOLUCAO AQUOSA 22 Valuer Valuer Contrais de Qualidade NVER - COTIA IND E COM LITDA. CRQ IV - 04438450	400	
Cotia.	DADE BROOKFIELD (LVF A 30 RJ	PH. PINO 2 - SOLUCAO AQUOSA 22 Mater S. Souza Controle de Qualidade NVER - COTIA IND E COM LTDA. CRO IV - DA4331450	400 CICORRECAO DE UMIDADE	3
ESERVACOES: VISCOSI	DADE BROOKFIELD	LVF A 30 RI	PM. PINO 2 - SOLUCAO AQUOSA 22 Mater S. Souza Control de Qualidade NVER - COTIA IND E COM LITDA. CRQ IV - D44319450	OU CICORRECAO DE UMIDADE	2
BSERVACOES: VISCOSI	DADE BROOKFIELD	LVF A 30 R	PM. PINO 2 · SOLUCAO AQUOSA 22 Mater S. Souza Controle de Qualidade NVER COTLA IND. E COM LIDA. CRO IV - 04439450	LICORRECAD DE UMIDADE	2

ANEXO C - DATA SHEET FOSFATO DE SÓDIO

Dinâmica.	FGQ 050- CERTIFICADO DE ANÁLISE	CNPJ: 68.210.657/0001-17 Rua Crisolita nº 145; Recreio Campestre Jóia Indaiatuba - SP; CEP: 13347-060 Fone. 55 (19) 3114-9250			
DOCUMENTO CONTROLADO					

Nome	FOSFATO DE SÓDIO BIBÁSICO P.A - ACS	CAS	7782-85-6
Formula	Na ₂ HPO ₄ .7H ₂ O	Código	1654
Molecular		Lote	97613
PM	268,07	Fabricação	Julho de 2018
Conteúdo	500g	Validade	Julho de 2022

Especificação	Resultado	Método
Min. 99%	99,3%	
8,5 – 9,5	9,19	
Máx. 0,005%	< 0,005%	
Máx. 0,001%	< 0,001%	
Máx. 0,001%	< 0,001%	
Máx. 0,005%	< 0,005%	
Máx. 5 ppm	< 5 ppm	
Máx. 0,001%	< 0,001%	
Máx. 0,001%	< 0,001%	
Contempor	ânea Lte	la.
	Especificação Min. 99% 8,5 - 9,5 Máx. 0,005% Máx. 0,001% Máx. 0,005% Máx. 0,005% Máx. 0,001% Máx. 0,001% Máx. 0,001% Máx. 0,001% Máx. 0,001% Máx. 0,001%	Especificação Resultado Min. 99% 99,3% 8,5 - 9,5 9,19 Máx. 0,005% < 0,005% Máx. 0,001% < 0,001% Máx. 0,001% < 0,001% Máx. 0,005% < 0,005% Máx. 0,001% < 0,001% Máx. 0,001% < 0,001% Máx. 0,001% < 0,001% Máx. 0,001% < 0,001%

P/ USO EXCLUSIVO EM LABORATÓRIO E FINS INDUSTRIAIS

Observações Ge	erais:
Data: 12/12/2018 08:37	

Nélio Rubens de Almeida Químico Responsável CRQ: 04414139 – 4º Região

09/11/2012 Rev00 Elaborado: Douglas Aprovado: Rubens Dinâmica www.dinamicaquimica.com.br



Fonte: Dinâmica (2018).

ANEXO D - CERTIFICADO DE ANÁLISE ÓXIDO DE GRAFENO PADRÃO DE REFERÊNCIA ANALÍTICA

SIGMA-ALDRICH®

sigma-aldrich.com

3050 Spruce Street, Saint Louis, MO 63103, USA Website: www.sigmaaldrich.com Email USA: techserv@sial.com Outside USA: eurtechserv@sial.com

Product Name:

Certificate of Analysis

Graphene oxide - powder, 15-20 sheets, 4-10% edge-oxidized

Product Number: Batch Number: Brand: Formula Weight: Quality Release Date: 796034 MKCF2488 ALDRICH 4,239.48 g/mol 26 OCT 2017

115	x		Y	X	r	1.
1	H	9	1		7	16
	Ś.		X		Ż	1
HOT	à	X	ľ	X	Y) ⁶⁴
	à	X	X		Y	L.
H	de.		HD-	h.,		Cars.

Test	Specification	Result	
Appearance (Color)	Brown to Very Dark Brown and Black	Black	
Appearance (Form)	Powder or Solid or Flakes	Powder	
X-Ray Diffraction	Conforms to Structure	Conforms	
Carbon (anhydrous) anhydrous basis	<u>></u> 50.0 %	94.9 %	
Water (by Karl Fischer) Report Results	<u><</u> 5.0 %	3.6 %	
Oxygen (O) anhydrous basis	<u><</u> 11.0	4.7	
Product of Supplier Garmor Inc.	Confirmed	Confirmed	

Mill Joney

Michael Grady, Manager Quality Control Milwaukee, WI US

Sigma-Aldrich warrants, that at the time of the quality release or subsequent retest date this product conformed to the information contained in this publication. The current Specification sheet may be available at Sigma-Aldrich.com. For further inquiries, please contact Technical Service. Purchaser must determine the suitability of the product for its particular use. See reverse side of invoice or packing slip for additional terms and conditions of sale.

Version Number: 1

Page 1 of 1

Fonte: Sygma-Aldrich (2019).

ANEXO E - CERTIFICADO DE GARANTIA DE QUALIDADE DOS OVOS PARA ENSAIO HET-CAM



ranja tolomei EDUARDO JANONI TOLOMEI - PRODUTOR RURAL

Inscrição Estadual 72.250.389 CIC 003.434.427-60 Ertrada do Mato Alto. nº 2.995 - Rua Eng. Pellegrino Tolomei. 107 Guaratiba - Rio de Janeiro - RJ Cep: 23.030-575 Tel.:/Fax: (21) 2413-4969 / 9 9647-0238 / 9 9647-2746 E-mail: granjatolomei@gmail.com

CERTIFICADO DE GARANTIA DE QUALIDADE

Pela presente, declaramos que os ovos enviados ao CEFET-MG / Laboratório de Biomateriais são destinados a pesquisa e/ou uso Laboratorial, não são destinados ao consumo humano, são provenientes de galinhas de raça Leghorn, de cor branca e casca rígida, tamanho grande, isentos de sujidades, fungos e substâncias tóxicas, com no máximo dois dias de postura, com no mínimo 04 (quatro) centímetros em seu maior diâmetro, que as aves não receberam nenhum tratamento à base de antibióticos ou qualquer outro antimicrobiano, bem como hormônios de qualquer espécie e promotores de crescimento. Que os mesmos são colhidos, selecionados, classificados e higienizados unitariamente utilizando-se solução específica de higienização.

Monitoramos, semestralmemte, a da Qualidade da Água fornecida às aves nos Parâmetros de Análises Físico-Químicas e Microbiológicas, de acordo com Portaria nº 2914 / MS de 12/12/2011 -Anexo I - tabela de padrão microbiológico da água para consumo humano e DZ 351- R2 de 24/04/1997 amostra essa que revelou-se PRÓPRIA.Laudo No. 16771/18-7

Lote: 190203 FF

Quantidade de ovos solicitados : =20 = Quantidade de ovos enviados: _= Q 6= Quantidade de ovos gratuitos: = 0.6 =

DIONISIO A TOLOMEI

Rio de Janeiro, 04 de fectorino de 8019

Fonte: Granja Tolomei (2019).