

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
ESCOLA DE ENGENHARIA DE SÃO CARLOS**

NÍCOLAS LARA

**Síntese de filmes nanocompósitos de hidroxiapatita e óxido de grafeno
reduzido em titânio**

**São Carlos
2023**

NÍCOLAS LARA

**Síntese de filmes nanocompósitos de hidroxiapatita e óxido de grafeno
reduzido em titânio**

Versão Corrigida

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em Ciência e Engenharia de Materiais da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Área de concentração: Desenvolvimento, Caracterização e Aplicação de Materiais.

Orientadora: Maria Inês Basso Bernardi

**São Carlos
2023**

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTES TRABALHOS, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Ficha catalográfica preparada pela Biblioteca Prof. Dr. Sérgio Rodrigues Fontes da EESC/USP com os dados inseridos pelo autor.

LARA, Nicolas.
L318s Síntese de filmes nanocompósitos de hidroxiapatita e óxido de grafeno reduzido em titânio. / Nicolas Lara ; orientadora Maria Inês Basso Bernardi, 2023.

Dissertação (Mestrado - Programa de Pós-Graduação em Ciência e Engenharia de Materiais e Área de Concentração em Desenvolvimento, Caracterização e Aplicação de Materiais)-- Escola de Engenharia de São Carlos da Universidade de São Paulo, 2023.

1. Fosfatos de cálcio. 2. Nanomateriais de carbono. 3. Revestimentos antibactericidas. 4. Implantes metálicos não cimentados. 5. Filmes finos. I. Título.

FOLHA DE JULGAMENTO

Candidato: Engenheiro **NÍCOLAS LARA**.

Título da dissertação: "Síntese de filmes nanocompósitos de hidroxiapatita e óxido de grafeno reduzido em titânio".

Data da defesa: 16/01/2023.

Comissão Julgadora

Resultado

Dra. **Maria Ines Basso Bernardi**
(Orientadora)
(Instituto de Física de São Carlos/IFSC-USP)

APROVADO

Prof. Dr. **Hernane da Silva Barud**
(Universidade de Araraquara/UNIARA)

APROVADO

Profa. Dra. **Ana Paula Ramos**
(Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto/FFCLRP-USP)

APROVADO

Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Materiais:

Prof. Associado **Rafael Salomão**

Presidente da Comissão de Pós-Graduação:

Prof. Titular **Murilo Araujo Romero**

*À minha família,
por tudo.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente aos meus pais, César e Rosaní, e meu irmão Rodolfo, pelo apoio incondicional e por sempre colocarem minha educação como prioridade.

À minha orientadora, prof.^a Inês Bernardi, por me aceitar como discípulo. Pela confiança depositada em mim para a realização deste projeto, pelo tempo e trabalho despendidos na minha orientação e por toda a motivação, incentivo e ensinamentos.

Aos meus orientadores da graduação e especializações: Bruno Kawano, Carlos Picone, Caroline Rabelo e Márcio Bazani, que embora não estejam diretamente envolvidos neste trabalho, foram fundamentais para minha formação acadêmica.

Aos professores da USP: Eduardo Bellini, Eliana Rigo, Gregório Faria, Marcelo Falcão, Rafael Salomão, Ricardo Tarpani, Sérgio Yoshioka e Valmor Mastelaro, pelo compartilhamento de conhecimentos, seja nas disciplinas ou em discussões de ideias, experimentos e resultados.

Aos servidores técnico-administrativos da USP, em especial a Elderson Domenicucci, Érica Signini, Geraldo Frigo, Luís Caraschi e Victor Barioto, por todo o suporte técnico e apoio.

Aos colegas do Grupo de Pesquisa em Nanomateriais e Cerâmicas Avançadas (NaCA): Amanda Komorizono, Andressa Corrêa, Bruno Lima, Higor Centurión, Jessenia Brillit, Julia Tagliaferro, Niqab Khan, Ramon Leite e Weverton Alison, pela amizade e compartilhamento de experiências e conhecimentos.

Aos cientistas do Grupo de Química Medicinal e Biológica (NequiMed), em especial ao prof. Andrei Leitão e suas alunas Natália Wolf e Sabrina Botelho, pelo auxílio na realização dos ensaios de viabilidade celular.

Aos pesquisadores do Núcleo de Estudos da Cárie Dentária e da Doença Periodontal (FOAr-Unesp), em especial à prof.^a Fernanda Brighenti e Analú Barros, pela ajuda na realização dos testes de atividade antimicrobiana.

Ao Grupo de Eletroquímica do IQSC-USP, na figura do prof. Germano Tremiliosi e seu

aluno Diego David, pelo auxílio nas análises de corrosão.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo apoio financeiro concedido através dos processos nº 2013/07296-2 e nº 2018/07517-2.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pelo apoio financeiro (processo nº 405033/2018).

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

A todos que, direta ou indiretamente, tornaram este trabalho bem sucedido.

“Em algum lugar, algo incrível está esperando para ser descoberto.”

Carl Sagan

RESUMO

LARA, N. **Síntese de filmes nanocompósitos de hidroxiapatita e óxido de grafeno reduzido em titânio**. 100p. Dissertação (Mestrado) – Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2023.

Infecções pós-cirúrgicas decorrentes de implantes ortopédicos recém-implantados são muito frequentes, podendo causar dor intensa, perda de tecido ósseo e a necessidade de cirurgias de revisão. Uma possível solução para esse problema é o revestimento de implantes metálicos com hidroxiapatita (HA) dopada com nanomateriais de carbono com propriedades antimicrobianas. Neste sentido, amostras de titânio comercialmente puro foram revestidas com HA dopada com até 5% de óxido de grafeno reduzido (rGO) pelo processo *spin coating*. Os filmes foram caracterizados por Difração de raios X (DRX), Microscopia eletrônica de varredura (MEV) e Microscopia de força atômica (AFM). A resistência à corrosão foi avaliada pela técnica de Polarização potenciostática em fluido corporal simulado (SBF) a 37 °C. O comportamento biológico das superfícies foi analisado por ensaio colorimétrico de citotoxicidade MTT, ensaio Kirby-Bauer de disco-difusão em ágar e teste de adesão bacteriana contra *Staphylococcus Aureus*. O grau de cristalinidade dos revestimentos aumentou com a temperatura de sinterização para todas as composições, chegando a até 97% a 900 °C. A dureza Vickers foi crescente com o teor de rGO, apresentando um aumento de até 15% em relação à HA pura. As superfícies são extremamente lisas, com rugosidade média inferior a 150 nm e decrescente com o teor de rGO. Os recobrimentos diminuíram a corrente de corrosão do Ti em pelo menos uma ordem de grandeza, desacelerando muito o processo corrosivo em fluido corporal simulado. A biocompatibilidade do titânio aumentou após o revestimento, apresentando viabilidade a fibroblastos de camundongo (linhagem Balb/3T3 clone A31) acima de 80%. Não houve liberação do rGO como agente bactericida em meio aquoso, porém as superfícies apresentaram forte efeito antibacteriano por contato.

Palavras-chave: Fosfatos de cálcio. Nanomateriais de carbono. Implantes metálicos não cimentados. Revestimentos antibacterianos. Filmes finos.

ABSTRACT

LARA, N. **Synthesis of hydroxyapatite-reduced graphene oxide nanocomposite coatings on titanium.** 2023. 100f. Dissertação (Mestrado) - Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2023.

Post-surgical infections from newly implanted orthopedic implants are very common, causing intense pain, loss of bone tissue and eventually the need of revision surgeries. A possible solution for this problem is the coating of metallic implants with hydroxyapatite (HA) doped with carbon nanomaterials with antimicrobial properties. Samples of commercially pure titanium were coated with HA doped with up to 5% reduced graphene oxide (rGO) by the spin coating process. The films were characterized by X-Ray Diffraction (XRD), Scanning Electron Microscopy (SEM) and Atomic Force Microscopy (AFM). Corrosion resistance was evaluated using the Potentiodynamic Polarization technique in simulated body fluid (SBF) at 37 °C. The biological behavior of the surfaces was analyzed by colorimetric MTT cytotoxicity assay, Kirby-Bauer antibacterial test and bacterial adhesion test against *Staphylococcus Aureus*. The degree of crystallinity of the coatings increased with the sintering temperature for all compositions, reaching up to 97% at 900 °C. The Vickers hardness increased with the rGO content, showing an increase of up to 15%. The surfaces are extremely smooth, with an average roughness of less than 150 nm and decreasing with the rGO content. The coatings decreased the Ti corrosion current by at least an order of magnitude, greatly slowing down the corrosive process in simulated body fluid. The biocompatibility of titanium increased after coating, showing viability to mouse fibroblasts (Balb/3T3 clone A31 strain) above 80%. There was no release of rGO as an antimicrobial agent in aqueous media, but the surfaces showed a strong antibacterial effect by contact.

Keywords: Calcium phosphates. Carbon nanomaterials. Cementless implants. Antibacterial coatings. Thin films.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Classificação dos implantes ortopédicos.....	25
Figura 2 – Artroplastias totais do cotovelo, ombro, falange, disco vertebral, quadril, joelho e tornozelo	26
Figura 3 – Principais biomateriais para ortopedia.....	27
Figura 4 – Estruturas cristalinas do a) titânio α e b) titânio β . c) Tipos de diagramas de fase formados para diferentes elementos de liga.	28
Figura 5 – Reação do organismo a materiais implantados.	29
Figura 6 – Célula unitária da hidroxiapatita	30
Figura 7 – Difratoograma típico da hidroxiapatita estequiométrica.....	32
Figura 8 – Estruturas do a) grafite e b) grafeno.....	36
Figura 9 – Estrutura do GO segundo os modelos de: a) Hofmann-Holst; b) Ruess; c) Scholz-Boehm; d) Nakajima-Matsuo; e) Lerf-Klinowski e; f) Dekany.....	37
Figura 10 – Espectros de XPS típicos do C 1s do a) GO e b) rGO.....	39
Figura 11 – Deposição eletroforética de filmes HA-GO.....	42
Figura 12 – Sistema de aspersão térmica à frio de filmes nanocompósitos de HA.....	43
Figura 13 – Montagem experimental da síntese e redução química de GO.....	45
Figura 14 – Processo de deposição por <i>spin coating</i>	47
Figura 15 – Programa de velocidades do processo <i>spin coating</i>	47
Figura 16 – Diagrama esquemático do analisador de adsorção física.....	49
Figura 17 – a) Indentador esférico Rockwell; b) Posicionamento das indentações em cada amostra (em milímetros)	52
Figura 18 – Célula eletroquímica utilizada nos ensaios de corrosão	53
Figura 19 – Extrapolação linear das curvas de polarização para determinação de E_{corr} e I_{corr}	54
Figura 20 – Teste Kirby-Bauer de disco-difusão em ágar.....	56
Figura 21 – Exposição dos revestimentos aos inóculos de <i>S. Aureus</i>	57
Figura 22 – Difratoogramas da HA comercial e da ficha ICSD 26205.....	58
Figura 23 – a) Espectro BET e b) distribuição de diâmetros dos poros da HA em pó.....	59
Figura 24 – Difratoogramas do grafite, GO e rGO	61
Figura 25 – Micrografias do óxido de grafeno	63
Figura 26 – Micrografias do óxido de grafeno reduzido	62
Figura 27 – Espectros survey de XPS do GO e rGO.....	63

Figura 28 – Espectros XPS em alta resolução do C 1s do GO e rGO	64
Figura 29 – Espectros Raman do GO e rGO.....	65
Figura 30 – Difratomogramas dos filmes de HA pura.....	66
Figura 31 – Difratomogramas dos filmes HA + 1% rGO	66
Figura 32 – Difratomogramas dos filmes HA + 2% rGO	67
Figura 33 – Difratomogramas dos filmes HA + 3% rGO	67
Figura 34 – Difratomogramas dos filmes HA + 4% rGO	68
Figura 35 – Difratomogramas dos filmes HA + 5% rGO	68
Figura 36 – Tamanho médio de cristalito em função do teor de rGO e temperatura de sinterização.....	70
Figura 37 – Grau de cristalinidade em função do teor de rGO e temperatura de sinterização.....	71
Figura 38 – Micrografias dos filmes de HA pura	72
Figura 39 – Micrografias dos filmes HA + 1% rGO	73
Figura 40 – Micrografias dos filmes HA + 2% rGO	74
Figura 41 – Micrografias dos filmes HA + 3% rGO	75
Figura 42 – Micrografias dos filmes HA + 4% rGO	76
Figura 43 – Micrografias dos filmes HA + 5% rGO	77
Figura 44 – Porosidade dos recobrimentos em função do teor de rGO e temperatura de sinterização.....	78
Figura 45 – Imagens topográficas dos filmes HA-rGO.....	79
Figura 46 – Rugosidade média dos filmes HA-rGO.....	80
Figura 47 – Dureza Vickers dos revestimentos sinterizados a 900 °C.....	81
Figura 48 – Curvas de polarização anódica das amostras com e sem revestimento.....	82
Figura 49 – Viabilidade celular de Balb/3T3 clone A31 nos filmes HA-rGO	83
Figura 50 – Ensaio Kirby-Bauer de disco-difusão em ágar contra <i>S. Aureus</i>	84
Figura 51 – Resultados do teste de adesão de <i>S. Aureus</i>	85
Figura 52 – Bactérias aderidas às superfícies dos filmes HA-rGO	86

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Propriedades mecânicas dos ossos e da HA	33
Tabela 2 – Ensaios realizados em cada material	48
Tabela 3 – Concentração iônica do SBF utilizado como eletrólito	53
Tabela 4 – Composição molar e percentual de ligações químicas do GO e rGO.....	64
Tabela 5 – Quantitativo de fases dos filmes HA-rGO	69
Tabela 6 – Potencial (E_{corr}) e corrente de corrosão (I_{corr}) do titânio com e sem revestimento.....	82

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AFM	<i>Atomic Force Microscopy</i> (Microscopia de Força Atômica)
BET	Brunauer-Emmett-Teller
BHI	<i>Brain Heart Infusion</i> (Agar Infusão Cérebro e Coração)
CCC	Estrutura cúbica de corpo centrado
CFU	<i>Colony forming unit</i> (Unidade formadora de colônias)
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i> (Meio Eagle modificado por Dulbecco)
DRX	Difração de raios X
EA	Eletrodo auxiliar
ER	Eletrodo de referência
GO	<i>Graphene oxide</i> (Óxido de Grafeno)
HA	Hidroxiapatita
HC	Estrutura hexagonal compacta
MEV	Microscopia eletrônica de varredura
MTT	Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio
PBS	<i>Phosphate-buffered saline</i> (Tampão fosfato-salino)
PMMA	Polimetilmetacrilato
rGO	<i>Reduced graphene oxide</i> (Óxido de grafeno reduzido)
SBF	<i>Simulated body fluid</i> (Fluido corporal simulado)
SSNMR	<i>Solid state C¹³ nuclear magnetic resonance</i> (Ressonância magnética nuclear de C ¹³ no estado sólido)
TJA	<i>Total joint arthroplasty</i> (Artroplastia total da articulação)
UHMWPE	<i>Ultra high molecular weight polyethylene</i> (Polietileno de peso molecular ultra alto)
XPS	<i>X-ray photoelectron spectroscopy</i> (Espectroscopia de fotoelétrons excitados por raios X)

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	24
2.	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	25
2.1.	Implantes ortopédicos.....	25
2.2.	O titânio como biomaterial	27
2.3.	Hidroxiapatita	30
2.4.	Grafeno	36
2.5.	Revestimentos nanocompósitos de hidroxiapatita e grafeno	40
3.	OBJETIVOS	44
3.1.	Objetivo geral	44
3.2.	Objetivos específicos	44
4.	MATERIAIS E MÉTODOS	45
4.1.	Síntese do óxido de grafeno.....	45
4.2.	Redução do óxido de grafeno	46
4.3.	Deposição dos recobrimentos	46
4.4.	Caracterização dos materiais	48
5.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	58
5.1.	Caracterização do pó de HA	58
5.2.	Caracterização do GO e rGO.....	59
5.3.	Caracterização dos revestimentos HA-rGO.....	65
6.	CONCLUSÃO	87
7.	PERSPECTIVAS FUTURAS	88
	REFERÊNCIAS	89
	APÊNDICE A – TRABALHOS DECORRENTES	100

1. INTRODUÇÃO

A formação de biofilme bacteriano é a principal causa de falha em implantes e dispositivos biomédicos¹. As taxas de incidência de infecções dependem muito da aplicação considerada: entre 0,5 e 5% em próteses vasculares²; de 0,2 a 0,7% em endopróteses aórticas³; entre 1 e 2% em telas da parede abdominal⁴ e; de 1% em substituições primárias a 5% em cirurgias de revisão em artroplastias totais do quadril e joelho⁵.

Infecções associadas a biomateriais são difíceis de tratar com antibióticos, uma vez que as bactérias são protegidas por seu modo de crescimento em biofilme e pelo não direcionamento efetivo de um sistema imunológico no local implantado⁶. Muitas vezes, é necessária a substituição cirúrgica do implante, geralmente acompanhada de grande desconforto, perda de qualidade de vida e altos custos do tratamento⁷. Não raro, as dificuldades associadas ao diagnóstico adequado levam a morbidade grave e até à morte⁸.

Como as medidas terapêuticas geralmente falham e têm consequências graves para o paciente, a ênfase das pesquisas na área tem sido na prevenção da infecção por meio de novos biomateriais ou revestimentos antimicrobianos⁹.

O titânio e suas ligas são amplamente utilizados em implantes médicos e dentários, tais como: articulações artificiais, fixadores de ossos, fixadores de coluna, implantes dentários, etc. Seu uso é justificado porque apresentam excelente resistência mecânica e à corrosão e boa compatibilidade com tecidos vivos¹⁰. A superfície do titânio também pode suportar o crescimento e a diferenciação celular. Entretanto, nos ossos, esse metal tem dificuldades de promover a osteointegração, visto que sua superfície não é biofuncional¹⁰. A fim de tornar o titânio biologicamente ligado aos ossos, vários métodos de modificação superficial têm sido propostos para aumentar sua osteocondutividade e bioatividade: usinagem^{11,12}, jateamento de areia¹³, tratamento com ácidos¹⁴ e álcalis¹⁵, oxidação anódica¹⁶, modificação bioquímica¹⁷, aspersão térmica¹⁸, sol-gel¹⁹ e deposição química²⁰ e física²¹ de vapor.

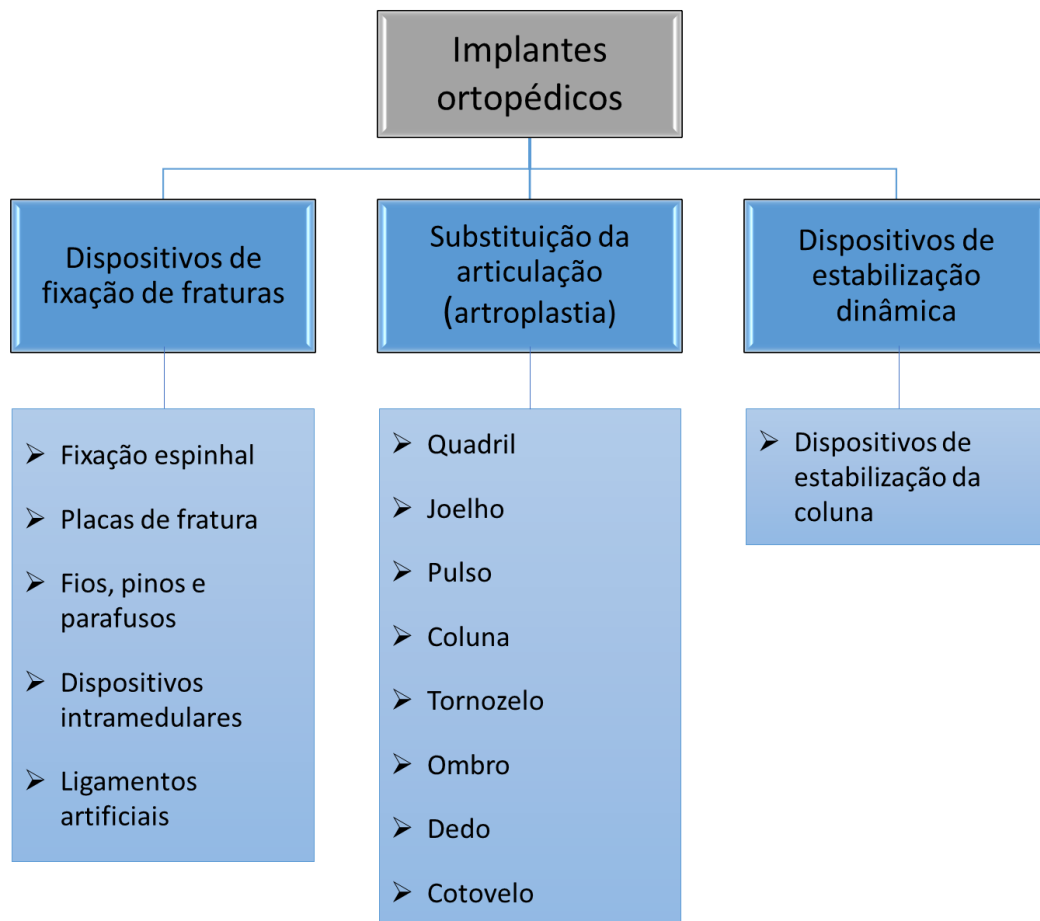
Um material que pode revestir ligas de titânio e torná-las mais bioativas é a hidroxiapatita (HA), porém ela é uma cerâmica muito frágil, com baixa resistência e atividade antimicrobiana. Surge então a necessidade de adicionar fases de reforço a fim de melhorar suas propriedades mecânicas e biológicas²². O óxido de grafeno reduzido (rGO) é uma boa opção de material de reforço, dada sua grande resistência mecânica e forte efeito antimicrobiano. A incorporação de rGO em biomateriais possui grande potencial de inibição do crescimento de biofilme bacteriano, podendo prevenir infecções e suas graves consequências²³⁻²⁵.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Implantes ortopédicos

Utilizados na restauração da mobilidade e melhoria da qualidade de vida de milhões de pessoas todos os anos, os dispositivos utilizados em ortopedia (Fig. 1) incluem fixadores de fraturas, substituição articular, artroscopia, estimulação elétrica e estabilização dinâmica²⁶.

Figura 1 – Classificação dos implantes ortopédicos.

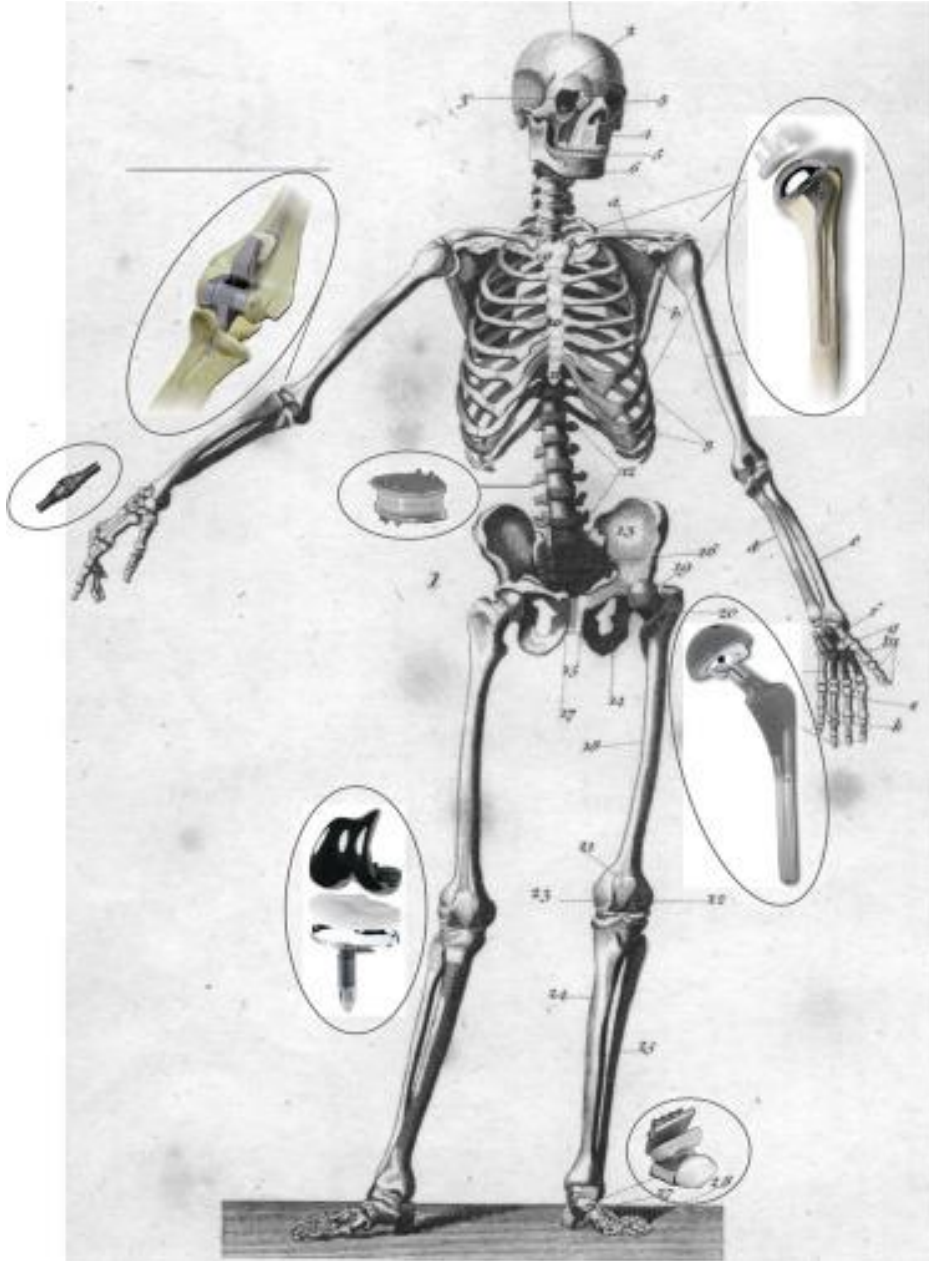


Fonte: elaborada pelo autor com base em Ratner et al. (2020)²⁶.

Os biomateriais para ortopedia são geralmente limitados àqueles que resistem a aplicações de cargas cíclicas. Embora todas as classes de materiais sejam empregadas, os metais se destacam por possuírem ótimas combinações de propriedades para a maioria das aplicações em fixação de fraturas e artroplastias totais de articulações (*Total joint arthroplasty* - TJA) (Fig. 2), como alta resistência mecânica, ductilidade, tenacidade à fratura, dureza, resistência à

corrosão, conformabilidade e biocompatibilidade²⁶.

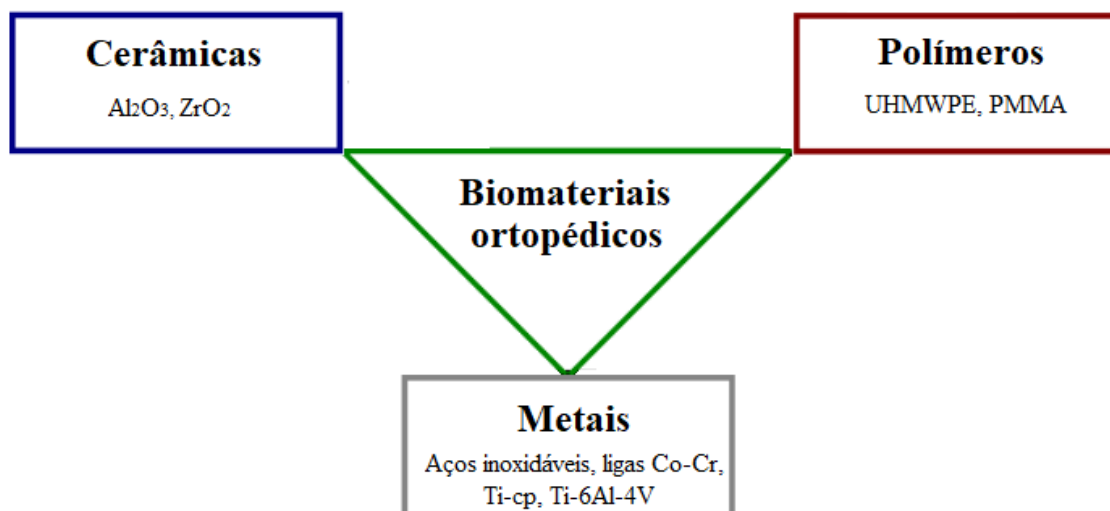
Figura 2 – Artroplastias totais do cotovelo, ombro, falange, disco vertebral, quadril, joelho e tornozelo.



Fonte: reproduzida com permissão de Hallab e Jacobs (2020)²⁷. Copyright © 2020 Elsevier Inc.

O uso de biomateriais em ortopedia geralmente se enquadra em uma das três categorias de especialidades cirúrgicas: extremidade superior; coluna; ou extremidade inferior; e cada especialidade é normalmente dividida em três categorias gerais: pediátrica; trauma; e reconstrução. Apesar das várias especialidades e as inúmeras aplicações, existem apenas alguns metais, cerâmicas e polímeros que dominam quase a totalidade dos dispositivos no mercado (Fig. 3)²⁷:

Figura 3 – Principais biomateriais para ortopedia.



Legenda: UHMWPE – *Ultra high molecular weight polyethylene* (Polietileno de peso molecular ultra alto).
PMMA – Polimetilmetacrilato. Ti-cp – Titânio comercialmente puro.

Fonte: elaborada pelo autor com base em Ratner et al. (2020)²⁷.

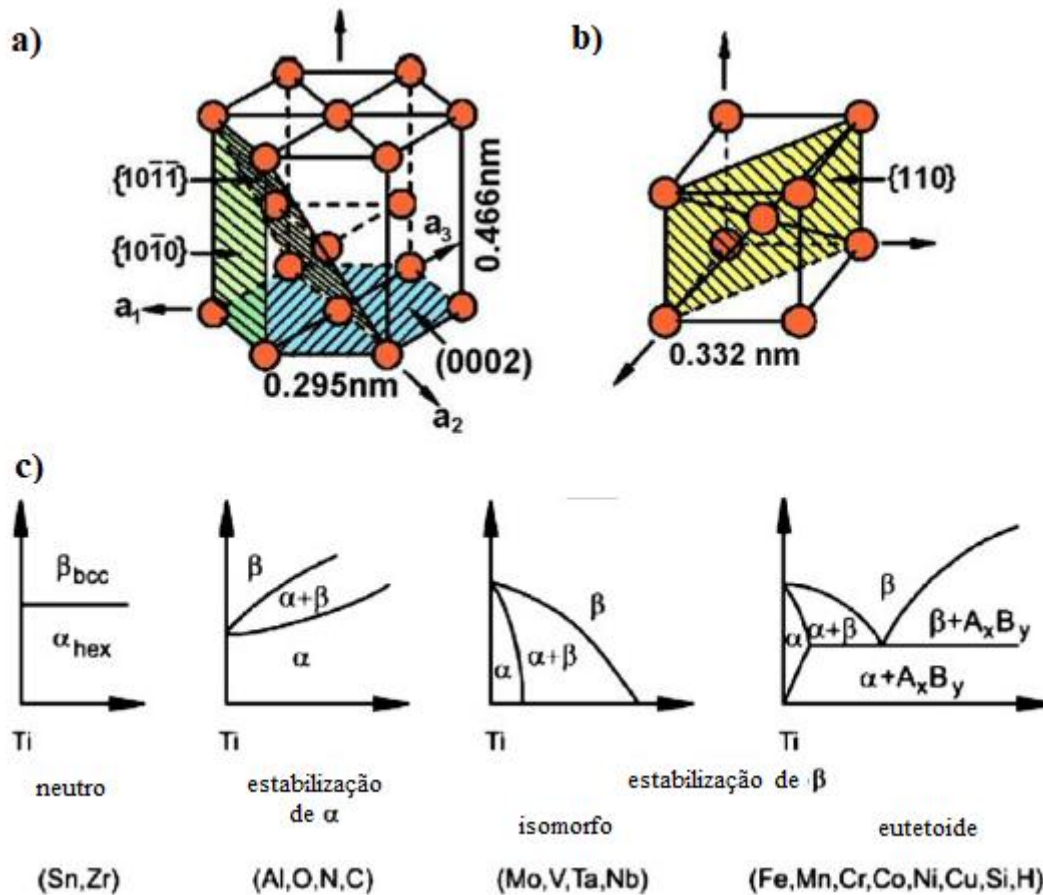
2.2. O titânio como biomaterial

O titânio é o nono elemento mais abundante no planeta. Sua metalurgia foi desenvolvida na década de 1950 para aplicações aeroespaciais, mas na década de 1960 começou a ser usado em implantes cirúrgicos. Atualmente, 2% do titânio minerado é usado em aplicações médicas, se tornando muito popular devido à sua excelente combinação de resistência, módulo de elasticidade e biocompatibilidade²⁸.

À temperatura ambiente, existe em estrutura hexagonal compacta (HC), sendo chamado de fase α (Fig. 4a). À 883°C, sofre uma transformação alotrópica para a estrutura cúbica de corpo centrado (CCC), chamada de fase β (Fig. 4b). A capacidade de manipular as propriedades do Ti depende dos elementos de liga e dos comportamentos físico e mecânico dessas duas fases, tanto individualmente quanto em uma variedade de permutações e combinações microestruturais. Assim, as ligas α monofásicas são amplamente utilizadas em aplicações que não requerem alta resistência mecânica, mas necessitam de alta resistência à corrosão. Alternativamente, as ligas $\alpha + \beta$ bifásicas oferecem uma variedade de combinações de resistência, tenacidade e propriedades de alta temperatura. A metalurgia de ligas β permite o desenvolvimento de composições e rotas de processamento que podem satisfazer os requisitos

de alta resistência mecânica, baixo módulo de elasticidade e biocompatibilidade para uso em aplicações médicas²⁹.

Figura 4 – Estruturas cristalinas do a) titânio α e b) titânio β . c) Tipos de diagramas de fase formados para diferentes elementos de liga.



Fonte: adaptada com permissão de Banerjee e Williams (2013)²⁹. Copyright © 2012 Acta Materialia Inc.

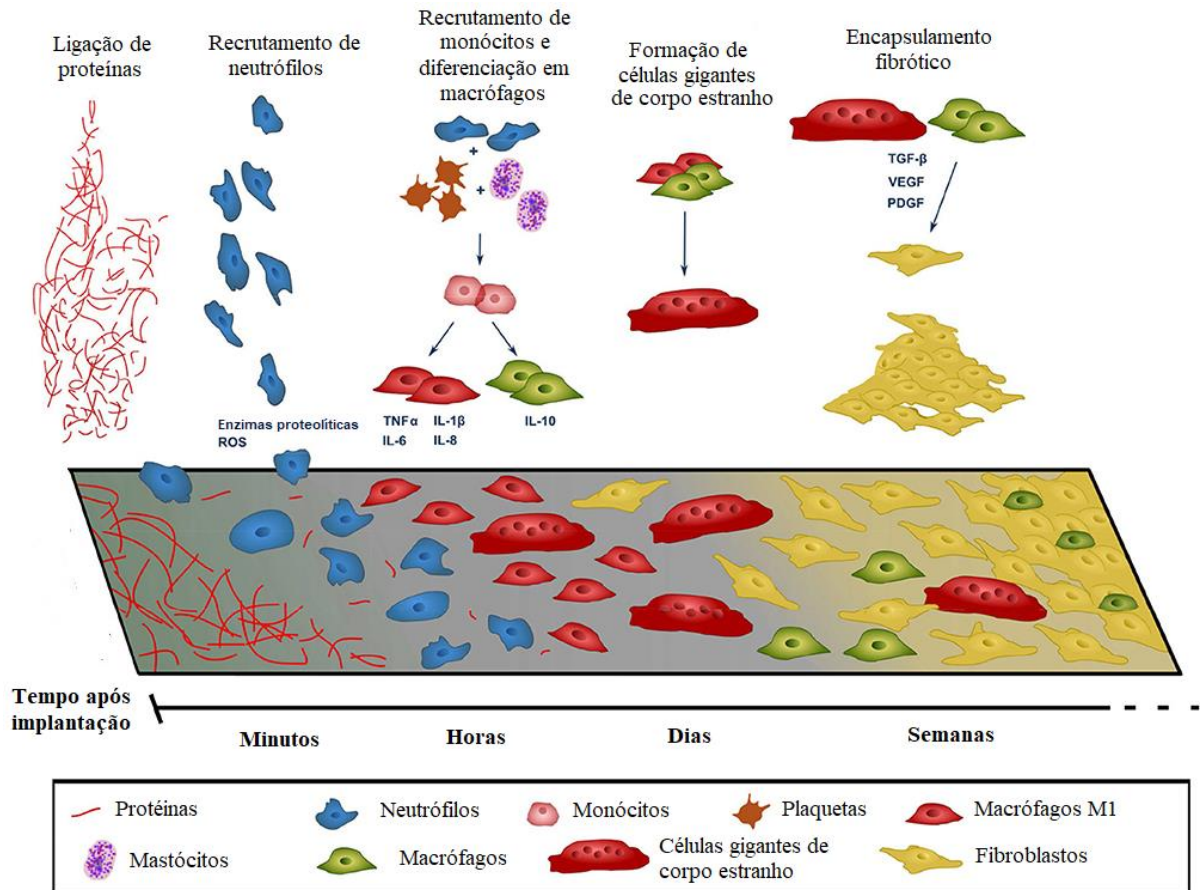
A forma comercialmente pura (Ti-cp) e a liga Ti-6Al-4V são as mais comumente usadas na área médica, principalmente em ortopedia, como reparo de fraturas e artroplastias.

2.2.1 Biocompatibilidade

A biocompatibilidade é relacionada à estabilidade química, resistência à corrosão, não-carcinogenicidade e não-toxicidade quando um material é implantado no corpo humano³⁰. A reação do organismo à implantação de um biomaterial é um processo complexo, governado por reações contínuas, com uma hierarquia temporal e espacial bem definida: adsorção de moléculas e proteínas, adesão celular e bacteriana, ativação de macrófagos, formação de

tecidos, inflamação, etc. (Fig. 5). O processo de implantação lesa o tecido ao redor do corpo estranho, o que desencadeia um processo inflamatório. Durante um período de semanas a meses, esse processo se desenvolve em uma resposta fibrótica, que envolve e isola o material³¹.

Figura 5 – Reação do organismo a materiais implantados.



Fonte: adaptado com permissão de Carnicer-Lombarte et al. (2021)³¹. Copyright © 2021 Carnicer-Lombarte, Chen, Malliaras e Barone.

Entre os fatores mais importantes que governam a compatibilidade com tecidos duros, destacam-se a adesão e proliferação de células osteogênicas, que por sua vez dependem de características superficiais do material, como a rugosidade e molhabilidade³²⁻³⁴.

Extensas pesquisas sobre a biocompatibilidade do titânio com tecidos duros já foram relatadas³⁵. Seu excelente desempenho foi confirmado por estudos sobre: a capacidade de formação de fosfato de cálcio em fluidos corporais simulados; a atividade osteoblástica e calcificação; avaliação histológica e molecular-biológica em animais, como formação óssea, taxa de contato e força de união óssea e; resultados clínicos. Os resultados revelam que, quando o titânio é implantado no osso, o tecido circundante entra em contato com o metal com uma

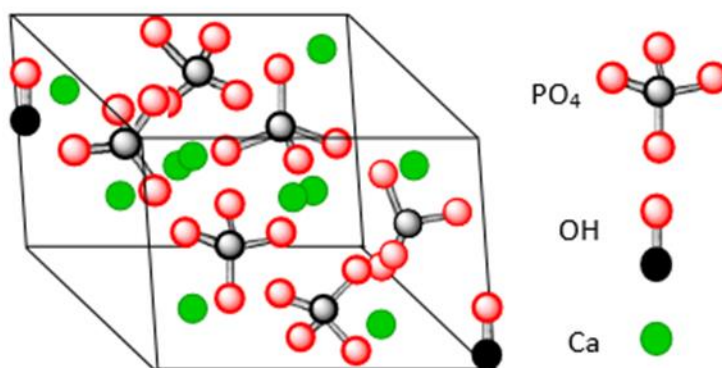
grande força de união³⁵. Para evitar o encapsulamento fibroso e garantir uma forte ligação entre o osso e o metal, a natureza sintética do implante deve ser capaz de imitar os constituintes naturais do corpo. Várias técnicas de modificação de superfície têm sido utilizadas para esse fim, como tratamentos alcalinos³⁶, modificações superficiais com magnésio³⁷⁻³⁹, revestimentos de vidro bioativo⁴⁰ ou de hidroxiapatita (HA)⁴¹.

2.3. Hidroxiapatita

A hidroxiapatita (HA, $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$) é o biomaterial à base de fosfato de cálcio mais promissor para aplicações ortopédicas, devido à sua composição e estrutura semelhante à fase mineral dos ossos⁴²⁻⁴⁴. Suas aplicações incluem revestimentos de implantes metálicos⁴⁵, biocerâmicas de restauração⁴⁶ e *scaffolds* para engenharia tecidual⁴⁷. Além da área médica, a HA já encontra aplicação em compósitos de óxidos metálicos, como catalisador de alta eficiência^{48,49}, membranas de absorção de metais pesados⁵⁰ e sensores de gases tóxicos⁵¹.

Sua estrutura cristalina (Fig. 6) pertence ao sistema hexagonal, grupo espacial $\text{P6}_3/\text{m}$, com parâmetros de rede $a = 9,423$ e $c = 6,875$ Å. Sua célula unitária possui seis grupos PO_4 e dois grupos OH^{52} .

Figura 6 – Célula unitária da hidroxiapatita.



Fonte: Rujitanapanich et al. (2014)⁵³. Disponível sob licença CC BY-NC-ND 3.0.

A HA compreende a maior parte do tecido ósseo natural, estando presente na forma de nanopartículas semicristalinas ligadas a fibras de colágeno. Mostra-se bem bioativa e tem excelente biocompatibilidade com tecidos humanos⁵⁴, boa osteocondutividade e biodegradabilidade⁵⁵. O cálcio e fósforo são seus elementos fundamentais, com uma razão estequiométrica Ca/P de 1,67, sendo a forma mais estável dos sais de fosfato, tanto em meios

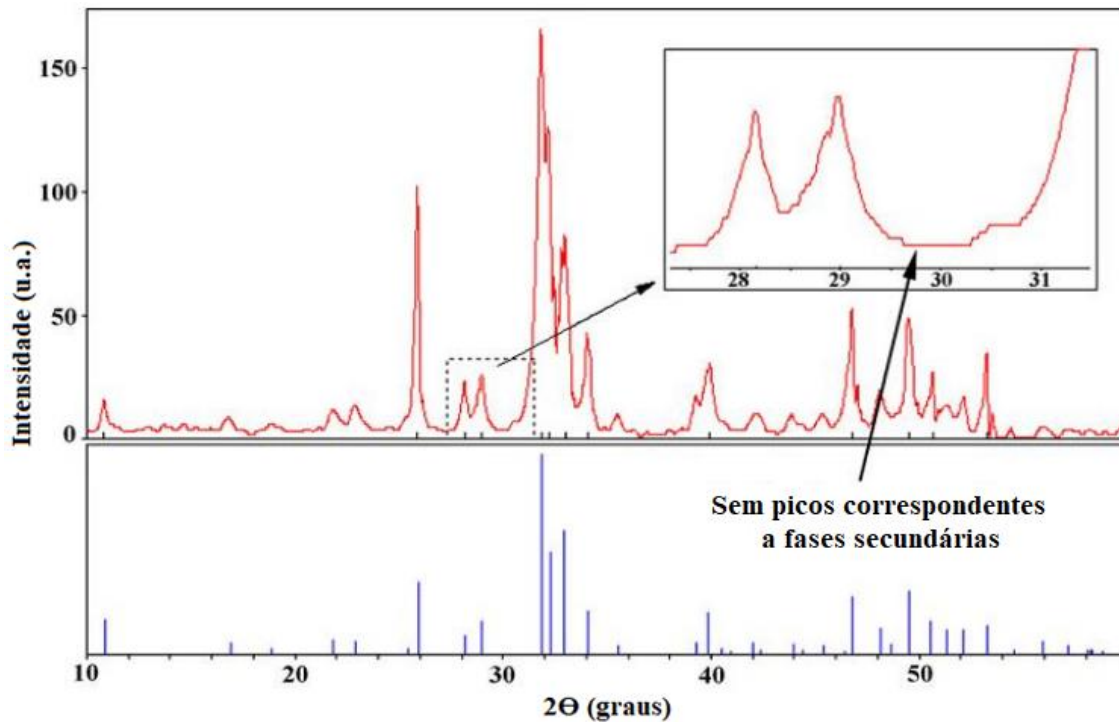
ácidos quanto alcalinos⁵⁶.

2.3.1 Estabilidade térmica

A HA sofre transformações de fase em altas temperaturas de calcinação e sinterização. Vários estudos foram realizados para investigar a decomposição da HA⁵⁷⁻⁶⁰. A instabilidade térmica ocorre em um processo de 4 etapas, envolvendo desidroxilação e decomposição. A desidroxilação envolve a perda de água que ocorre através da formação de oxi-hidroxiapatita ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_{2-2x}\text{O}_x$) e depois oxiapatita ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6\text{O}$). A decomposição da oxiapatita prossegue para as fases secundárias, como fosfato tricálcico ($\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$), fosfato tetracálcico ($\text{Ca}_4(\text{PO}_4)_2\text{O}$) e óxido de cálcio (CaO)⁶¹.

Há uma série de fatores que influenciam sua decomposição: temperatura e tempo de sinterização, método de síntese do pó, atmosfera de sinterização, pureza de fase e razão Ca/P⁵⁷⁻⁶⁰. Estas transformações têm consequências importantes no comportamento de *scaffolds* teciduais e revestimentos para implantes, uma vez que o fosfato tricálcico é reabsorvível e, embora aumente a reabsorção dos implantes, reduz suas propriedades mecânicas⁶². Para verificar se houve decomposição do material, normalmente são usadas as técnicas de difração de raios X (DRX) e espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (*Fourier transform infrared spectroscopy* - FTIR). O DRX permite a determinação da pureza de fases (Fig. 7), enquanto o FTIR permite a observação dos grupos hidroxila para avaliar a desidroxilação.

Figura 7 – Difratoograma típico da hidroxiapatita estequiométrica.



Fonte: adaptada com permissão de Ramesh et al. (2008)⁶². Copyright © 2007 Elsevier B.V.

2.3.2 Propriedades mecânicas

A HA é tipicamente sinterizada para melhorar suas propriedades mecânicas (Tab. 1). Embora as propriedades melhoradas sejam desejadas, estas não devem exceder as do osso natural, mas sim replicá-las o mais próximo possível, visto que, onde há um grande gradiente no módulo de elasticidade entre o implante e o tecido, pode ocorrer o fenômeno de *stress shielding*, onde a carga suportada durante o movimento não é transmitida pelo osso, mas absorvida pelo implante, levando à perda atrofica do osso cortical. Os ossos requerem movimentos regulares e cargas de tração para serem saudáveis e a falta disso retarda seu processo de regeneração⁶³.

Tabela 1 – Propriedades mecânicas dos ossos e da HA.

Propriedades mecânicas	Osso cortical	Osso trabecular	Dentina	Esmalte dentário	HA sinterizada
Resistência à compressão (MPa)	100-230	2-12	295	384	350-450
Resistência à flexão (MPa)	50-150	10-20	52	10	100-120
Módulo de elasticidade (GPa)	18-22		18-21	74-82	7-13

Fonte: Bronzino (2000)⁶⁴; Khon (2003)⁶⁵; Dorozhkin (2010)⁶⁶; White et al. (2007)⁶⁷.

Uma das principais desvantagens da HA é sua baixa tenacidade à fratura em comparação com o osso cortical. Suas propriedades mecânicas também diminuem muito com o aumento da porosidade. Devido à esta fragilidade, seu uso em implantes é restrito a aplicações sem carga, como cirurgias do ouvido médio, preenchimento de defeitos ósseos e revestimentos de implantes dentários e ortopédicos⁶⁸.

A temperatura de sinterização, porosidade, razão Ca/P, pureza de fase e tamanho de grão influenciam muito sua resistência mecânica. A dureza Vickers normalmente aumenta com a temperatura de sinterização até um valor crítico, além do qual grande perda de dureza é observada, devido ao crescimento excessivo das partículas e decomposição térmica⁵⁸.

2.3.3 Propriedades biológicas

As biocerâmicas de HA têm sido amplamente utilizadas como substitutos ósseos artificiais devido às suas propriedades biológicas favoráveis. Ela contém apenas íons cálcio e fosfato e, portanto, nenhuma toxicidade local ou sistêmica adversa já foi relatada^{69,70}. Quando implantada, o osso recém-formado liga-se diretamente à HA através de uma camada de apatita carbonatada deficiente em cálcio na interface osso/implante^{68,71}. Um método *in vitro* foi desenvolvido para determinar o crescimento dessa camada, que é um indicativo da bioatividade do material, usando fluido corporal simulado (*Simulated body fluid* - SBF). O SBF convencional, que foi desenvolvido por Kokubo em 1990⁷², é uma solução contendo uma composição iônica e pH semelhantes ao plasma sanguíneo⁷³. Uma cerâmica bioativa desenvolve uma camada amorfa de fosfato de cálcio ou hidroxicarbonato em sua superfície quando tratada em SBF *in vitro*. O mecanismo de formação dessa camada em superfícies de HA é devido à sua dissolução parcial e troca iônica com o SBF. A camada de apatita permite

uma forte ligação química entre o implante e o tecido vivo⁷⁴.

Em *scaffolds* teciduais de HA porosa, a osteocondução e osteoindução são altíssimas. As superfícies suportam a adesão, o crescimento e a diferenciação de células osteoblásticas e o novo osso é depositado por substituição do osso vivo adjacente. Os *scaffolds* de HA também podem servir como carreadores de citocinas, com capacidade de se ligar e concentrar proteínas morfogenéticas ósseas *in vivo*⁷⁵. A osteogênese ocorre semeando os *scaffolds* antes da implantação com células que estabelecerão novos centros de formação óssea, como osteoblastos e células mesenquimais, que têm o potencial de se comprometer com uma linhagem osteoblástica⁷⁶.

A osteoindução ocorre devido à estimulação das células-tronco mesenquimais nos tecidos circundantes. Essas células-tronco se diferenciam em osteoblastos formadores de tecido ósseo. Esta osteoindução foi observada em diversos estudos e em vários animais hospedeiros⁷⁷⁻⁷⁹. HA porosa semeada com células-tronco estromais indiferenciadas foi capaz de promover diferenciação em células formadoras de osso maduro e lamelar em locais ectópicos⁷⁵. Este processo foi destacado pelo aumento da expressão de fosfatase alcalina⁸⁰. Em análise histológica e imuno-histoquímica da interface osso-HA, os osteoblastos aparecem na superfície do biomaterial e o osso parcialmente mineralizado é formado diretamente nesta superfície⁸¹. Os implantes de HA também mostram regulação positiva de certos perfis de expressão gênica de osteoblastos, que são observados em até 24 horas após a implantação, regulando positivamente a expressão de osteoblastos de pelo menos dez genes e 15 genes negativamente em mais de duas vezes em comparação com superfícies poliméricas⁸².

A expressão de genes estimulada pela HA difere de uma espécie animal para outra, com níveis mais altos relatados em primatas em comparação com outros animais, como coelho e cão⁸³. Yuan et al. (1999)⁷⁸ implantaram hidroxiapatitas porosas no músculo dorsal de cães e observaram que o osso era formado preferencialmente nos implantes com paredes dos poros rugosas. No entanto, não observaram formação óssea quando foram utilizados implantes com superfície macroporosa densa. Um implante de fosfato de cálcio impresso em 3D com geometria controlada foi implantado em cabras por Habibovic et al. (2008)⁷⁹. Os resultados mostraram que os implantes de bruxita e monetita foram capazes de induzir a formação óssea ectópica. Ripamonti et al. (2008)⁷⁷ conduziram um extenso trabalho sobre o uso a longo prazo de implantes de HA no primata *Papio ursinus*. Seus estudos indicam a formação óssea espontânea em locais não-ósseos. Eles usaram carbonato de cálcio derivado de corais que foi convertido em HA por uma reação hidrotérmica. Construções de HA e carbonato de cálcio exibindo diferentes morfologias (hastes e discos) foram implantados no reto abdominal

heterotópico ou em defeitos ortotópicos da calvária, respectivamente. Diferentes pontos de tempo foram avaliados durante 1 ano e, em todos os casos, foi detectada indução de osso nas concavidades das matrizes. Após um ano, a reabsorção do carbonato de cálcio/HA era visível, bem como depósitos de osso neoformado⁷⁷.

2.3.4 Recobrimentos de HA

O recobrimento de superfícies utilizando HA foi introduzido em meados dos anos 80 para promover a fixação entre o osso e o implante e tem sido bem sucedido devido ao seu favorável comportamento *in vivo*⁸⁴. Porém, suas propriedades mecânicas fracas, como baixa resistência a flexão e tenacidade, continuam sendo um obstáculo. A fim de melhorar essas propriedades, pesquisadores têm adicionado fases de reforço em sua microestrutura, como alumina (Al_2O_3), rutilo (TiO_2), zircônia (ZrO_2) e nanotubos de carbono^{18,22,85,86}.

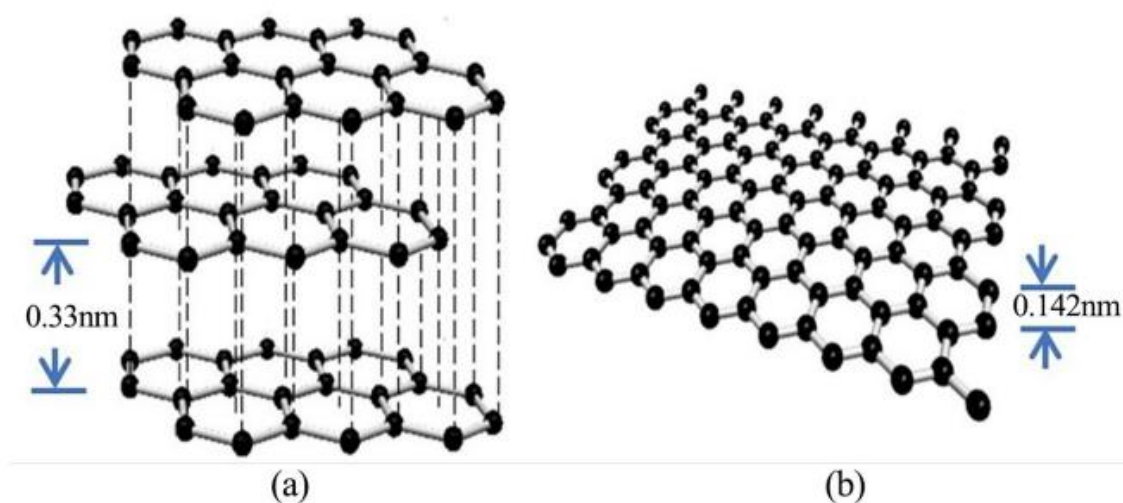
Um grande aumento no conteúdo cristalino dos revestimentos em próteses dentárias e ortopédicas por tratamento térmico não é totalmente favorável⁸⁷. A bioatividade *in vitro* é reduzida com a maior cristalinidade do revestimento, o que está relacionado à alta força motriz para a formação de uma nova fase⁸⁸. No entanto, no que diz respeito à longevidade e segurança dos materiais, o revestimento com alta cristalinidade deve ser adotado. Embora o nível de liberação de íons metálicos ainda seja aceito pelas agências reguladoras, existem riscos potenciais. O Ti é liberado dos implantes mesmo na ausência de desgaste, devido a fatores bioquímicos e, soluções e partículas finas de Ti abaixo de 10 μm de diâmetro, que induzem citotoxicidade tanto *in vivo* quanto *in vitro*⁸⁹. Tanto a corrosão por evolução de hidrogênio quanto por difusão de oxigênio podem ocorrer na superfície do Ti na cavidade oral na presença de ácidos orgânicos, afinando a camada de TiO_2 . Um revestimento denso e de alta cristalinidade protegerá melhor a liberação de íons metálicos a longo prazo⁹⁰.

A química da superfície e a topografia de revestimentos de baixa cristalinidade podem ser favoráveis para a fixação celular, mas o pH médio elevado pode produzir um efeito citotóxico que inibe a proliferação de células aderidas na superfície do revestimento. Assim, recobrimentos de HA com maior cristalinidade produzem taxas mais altas de proliferação celular⁹¹.

2.4. Grafeno

O grafeno é um nanomaterial bidimensional com átomos de carbono hibridizados em sp^2 , ligados hexagonalmente em uma estrutura de rede em favo de mel, onde cada átomo de carbono está ligado a três átomos vizinhos (Fig. 8). O grafite, forma alotrópica mais estável do carbono, é formado pelo empilhamento de camadas de grafeno⁹².

Figura 8 – Estruturas do a) grafite e b) grafeno.



Fonte: Adetayo e Runsewe (2004)⁹³. Disponível sob licença CC BY 4.0.

O grafeno tem sido extensivamente pesquisado devido às suas propriedades físicas peculiares, como grande área de superfície específica teórica ($2630 \text{ m}^2/\text{g}$)⁹⁴, alta mobilidade intrínseca ($200.000 \text{ cm}^2/\text{V.s}$)^{95,96} e altíssimos módulo de elasticidade ($\sim 1,0 \text{ TPa}$)⁹⁷ e condutividade térmica ($\sim 5000 \text{ W/m.K}$)⁹⁸. Também possui boa transmitância óptica ($\sim 97,7\%$), condutividade elétrica e capacidade de suportar densidades de corrente de até 10^8 A/cm^2 ⁹⁹.

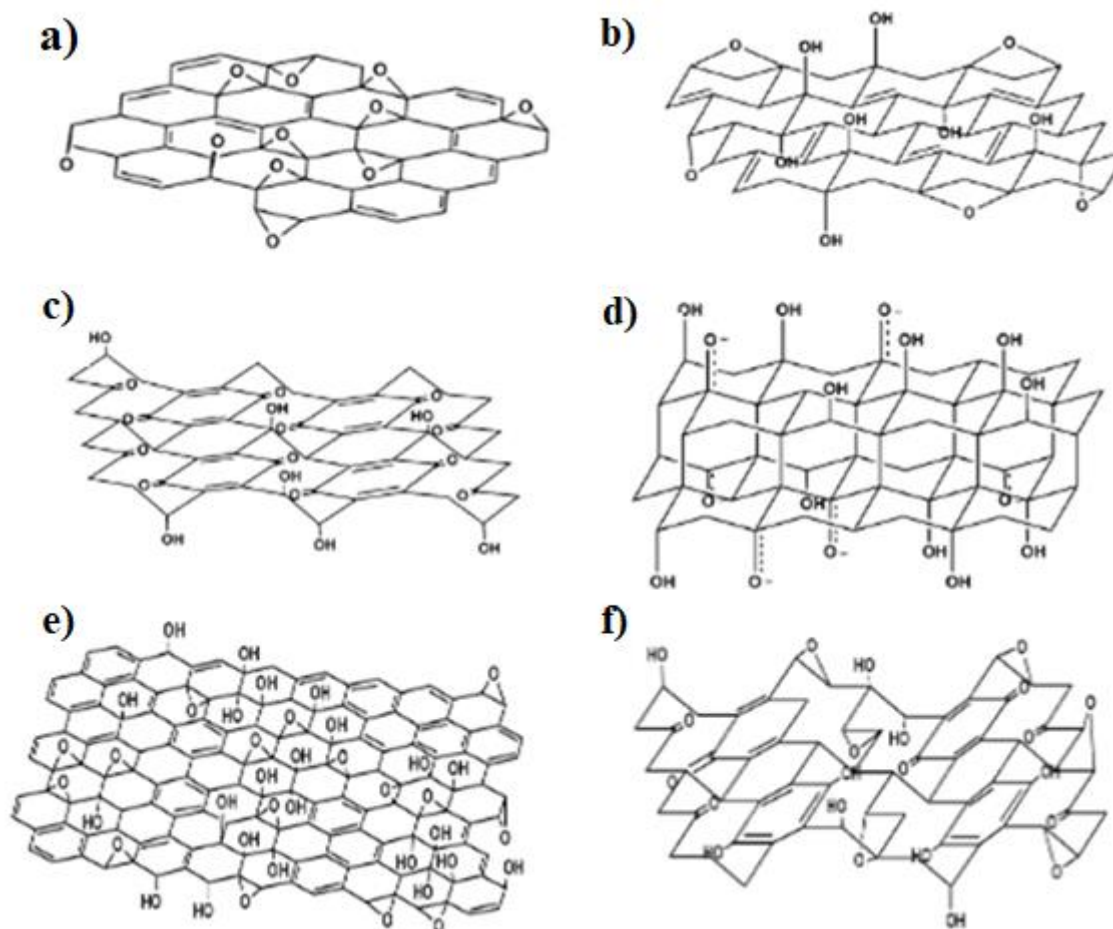
2.4.1 Óxido de grafeno (GO)

O GO foi relatado pela primeira vez em 1840 por Schafhaeutl. Atualmente, é preparado principalmente com base no método proposto por Hummers e Offeman¹⁰⁰, onde a oxidação do grafite é feita pelo tratamento com uma mistura de ácido sulfúrico (H_2SO_4) concentrado, nitrato de sódio (NaNO_3) e permanganato de potássio (KMnO_4). Com o tempo, algumas variantes deste processo foram propostas e bem recebidas pela comunidade científica.

O GO tem uma estrutura semelhante ao grafeno: ambos têm uma estrutura de carbono

hexagonal, mas a folha de GO é distorcida onde está ligada aos grupos oxigenados. Diversos pesquisadores propuseram modelos teóricos para o GO (Fig. 9), mas a estrutura química precisa ainda é controversa. As principais razões incluem a variabilidade de amostra para amostra, devido aos diferentes métodos de síntese, o grau de oxidação, a quantidade de amorfização, sua natureza não-estequiométrica e a resolução limitada das técnicas de caracterização¹⁰¹.

Figura 9 – Estrutura do GO segundo os modelos de: a) Hofmann-Holst; b) Ruess; c) Scholz-Boehm; d) Nakajima-Matsuo; e) Lerf-Klinowski e; f) Dekany.



Fonte: adaptada com permissão de Szabó et al. (2006)¹⁰¹. Copyright © 2006 American Chemical Society.

O primeiro modelo, de Hofmann-Holst, data de 1939 e descreve uma folha plana de carbono ligada aleatoriamente com grupos epóxi, com uma razão C/O de 2. Em 1946, o grupo de Ruess introduziu os grupos hidroxila e 1,3-éter na rede, que é composta por anéis de ciclohexano, diferentes do plano de carbono semelhante ao benzeno de Hofmann-Holst¹⁰². O modelo de Scholz-Boehm¹⁰³ substituiu completamente os grupos epóxi por grupos hidroxila. O plano basal contém anéis de ciclohexano corrugados regulares ligados a uma estrutura quinoide.

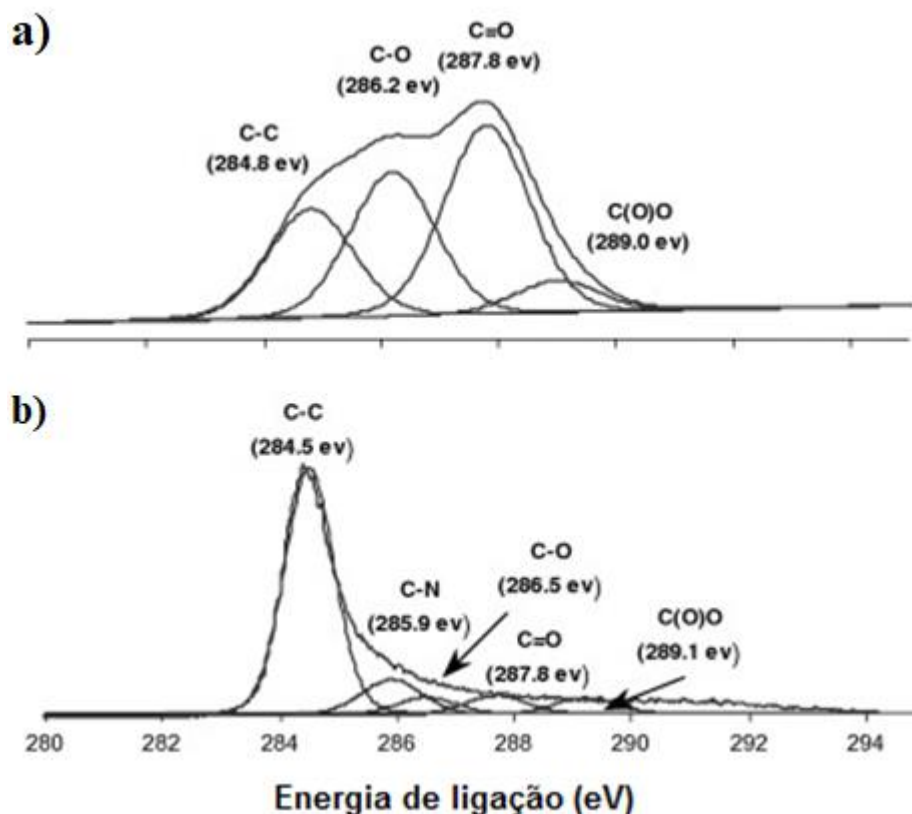
Nakajima e Matsuo¹⁰⁴ construíram uma estrutura de rede semelhante a poli(C₂F)_n que forma um composto de intercalação de grafite. Os dois últimos modelos, propostos por Lerf-Klinowski¹⁰⁵ e Dekany¹⁰⁶, se tornaram mais populares devido à introdução da análise por Ressonância magnética nuclear de C¹³ no estado sólido (*Solid state C¹³ nuclear magnetic resonance* - SSNMR) na caracterização da estrutura. Esta nova técnica melhorou a precisão na detecção de grupos funcionais. No modelo de Lerf-Klinowski, álcoois terciários e 1,2-éteres são grupos dominantes na superfície e a estrutura cristalina periódica é substituída por grupos de oxigênio distribuídos aleatoriamente¹⁰⁵. Finalmente, Dekany propôs um modelo seguindo a lógica básica do modelo Scholz-Boehm, mas adicionando 1,3-éteres nos anéis de ciclohexano¹⁰¹.

2.4.2 Óxido de grafeno reduzido (rGO)

Dependendo do método de preparação, GO com composições que variam de C₈O₂H₃ a C₈O₄H₅ costumam ser obtidas, correspondendo a uma razão C/O de 4:1 a 2:1, respectivamente^{101,107}. Após a redução, a relação C/O pode ser aumentada para aproximadamente 12:1 na maioria dos casos¹⁰⁸, mas valores tão grandes quanto 246:1 já foram relatados¹⁰⁹.

A relação C/O é geralmente obtida por meio de medidas de análise elementar por combustão e de espectrometria de fotoelétrons de raios X (*X-ray photoelectron spectroscopy* - XPS). Ambas as técnicas fornecem resultados consistentes uma com a outra, considerando o fato de que a combustão fornece a composição em massa, enquanto o XPS é uma técnica de análise de superfície¹⁰⁸. Além disso, os espectros XPS podem fornecer mais informações sobre as estruturas químicas do GO e rGO. Uma vez que são os elétrons-p do carbono sp² que determinam amplamente as propriedades ópticas e elétricas dos materiais à base de carbono¹¹⁰, a fração de ligações sp² pode fornecer uma visão mais profunda sobre as relações estrutura-propriedade.

Figura 10 – Espectros de XPS típicos do C 1s do a) GO e b) rGO.



Fonte: reproduzida com permissão de Stankovich et al. (2007)¹¹¹. Copyright © 2007 Elsevier Ltd.

O espectro de XPS C1s do GO (Fig. 10a) indica um grau considerável de oxidação, com quatro componentes que correspondem a átomos de carbono em diferentes grupos funcionais: o anel de carbonos não-oxigenados (284,6 eV), o C em ligações C–O (286,0 eV), o carbonil (287,8 eV) e o carboxilato (O–C=O, 289,0 eV). Embora o espectro do rGO também exiba esses grupos funcionais, suas intensidades de pico são muito mais fracas¹¹².

2.4.3 Mecanismo bactericida

A atividade antibacteriana dos óxidos de grafeno foi avaliada por Akhavan e Ghaderi¹¹³. Com base na medição do efluxo de materiais citoplasmáticos de uma bactéria, verificaram que o dano na membrana celular causado pelo contato direto das bordas extremamente afiadas do grafeno foi o mecanismo efetivo na inativação bacteriana. As bactérias Gram-negativas *Escherichia coli*, com membrana externa, foram mais resistentes ao dano do que as Gram-positivas *Staphylococcus aureus*, sem membrana. Além disso, as nanoparedes de rGO reduzidas por hidrazina (N₂H₄) foram mais tóxicas para as bactérias do que as de GO não-reduzidas. A

melhor atividade antibacteriana do rGO foi atribuída à melhor transferência de carga para as bactérias e às bordas mais afiadas das paredes reduzidas durante o contato.

2.5. Revestimentos nanocompósitos de hidroxiapatita e grafeno

Recentemente, cientistas têm buscado aplicar nanotecnologias para melhorar as propriedades mecânicas e biológicas de biomateriais. As possibilidades de preparar compósitos de HA e grafeno para aplicações ortopédicas com maior bioatividade e propriedades mecânicas têm sido exploradas com sucesso. Esses nanocompósitos podem ser preparados na forma de pós, *bulks*, revestimentos e *scaffolds*. Os pós ou compósitos a granel podem ser usados para reparar os defeitos ósseos ou pequenas desuniões. Este novo material também pode ser revestido em implantes metálicos para aumentar suas habilidades de ligação óssea. Quanto aos grandes defeitos ou perda óssea, os compósitos tridimensionais porosos de HA à base de grafeno podem ser incorporados aos tecidos duros danificados para acelerar sua regeneração¹¹⁴.

2.5.1 Propriedades mecânicas

Materiais compósitos tendem a exibir propriedades mecânicas melhores do que seus componentes individuais. A adição de GO pode aumentar eficientemente a força de adesão dos revestimentos. A resistência da ligação entre filmes HA-GO e substratos de Ti foi avaliada por Li et al. (2013)¹¹⁵ e comparada com o revestimento de HA pura. A força de adesão do revestimento aumentou de $1,55 \pm 0,39$ MPa para $3,3 \pm 0,25$ MPa com a adição de 5% em peso de GO. Baradaran et al. (2014) preparou compósitos HA-rGO por via hidrotermal e os sinterizou por prensagem isostática a quente¹¹⁶. Mesmo a baixa adição teve um grande efeito nas propriedades mecânicas do sólido: o compósito contendo 1,5% em peso de rGO apresentou tenacidade à fratura e módulo elástico em torno de 86% e 40% superiores à HA pura, respectivamente.

Os mecanismos de reforço para os compósitos de hidroxiapatita e grafeno são, principalmente, a ramificação, deflexão e ponteamto de trincas¹¹⁶⁻¹¹⁸. A adição de cargas 2D pode resultar na formação de HA com tamanhos menores e o GO/rGO funciona como agente nucleante de cristais¹¹⁵, que por sua vez pode conter o crescimento dos grãos, deixando a microestrutura mais refinada e resistente¹¹⁹.

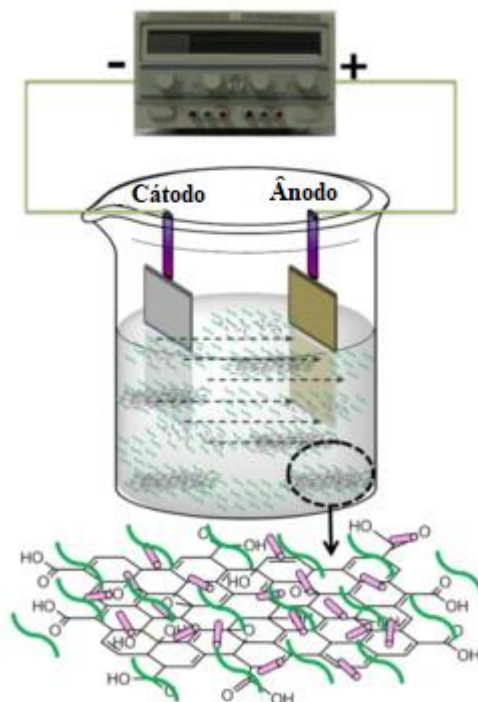
2.5.2 Métodos de deposição

Várias técnicas de deposição podem ser exploradas para revestir metais com esses nanocompósitos. Na maioria dos casos, os materiais são sintetizados separadamente e depois misturados por dispersão ultrassônica e moagem de bolas. O compósito preparado sob alta temperatura e pressão tem alta cristalinidade e boas propriedades mecânicas. As técnicas de aspersão térmica são as mais amplamente empregadas, porém tendem a diminuir a cristalinidade do revestimento devido ao grande aporte térmico e resfriamento rápido¹¹⁴.

2.5.2.1 Deposição eletroforética (*Electrophoretic deposition - EPD*)

A EPD é um processo coloidal de base aquosa bem desenvolvido para depositar nano e micropartículas carregadas em substratos condutores sob campo elétrico. Tem sido amplamente utilizado para preparar revestimentos bioativos funcionais com nanoestruturas avançadas para aplicações biomédicas, como HA, biovidro e outras biocerâmicas¹²⁰. A EPD também permite a fabricação de revestimentos compósitos avançados à base de grafeno¹²¹. Durante o processo (Fig. 11), o GO pode ser considerado como macromoléculas anfifílicas, com uma distribuição de domínios hidrofílicos (regiões oxigenadas e bordas da folha) e hidrofóbicos (plano de carbono hibridizado sp^2)¹²². A nanoestrutura 2D do GO aumenta o intertravamento das nanopartículas de HA e diminui o trincamento e a delaminação dos revestimentos¹²³. A EPD de HA é geralmente seguida de pós-aquecimento para aumentar a resistência coesiva entre o revestimento e substrato. A microestrutura do nanocompósito HÁ-GO é proposta como sendo a combinação de uma camada interna compacta e uma camada externa relativamente porosa e não selada¹²³.

Figura 11 – Deposição eletroforética de filmes HA-GO.



Fonte: adaptada com permissão de Li et al. (2013)¹²⁴. Copyright © 2013 Elsevier B.V.

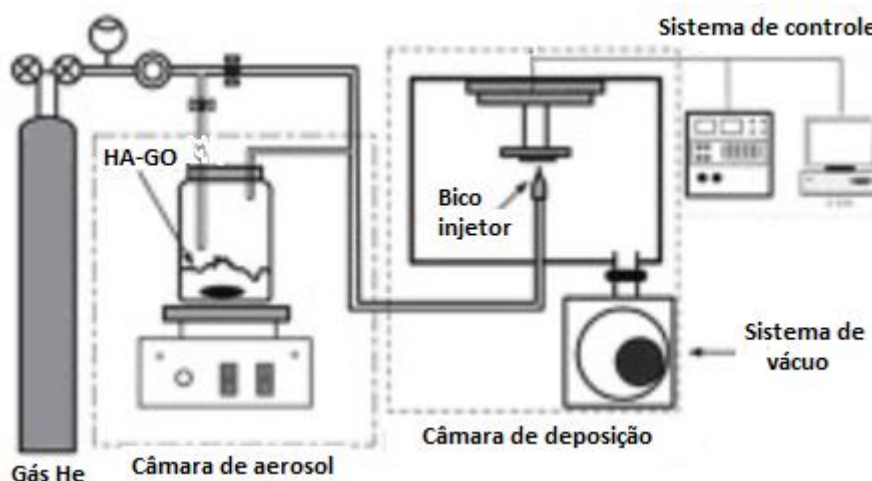
2.5.2.2 Deposição eletroquímica

A deposição eletroquímica de hidroxiapatita envolve a dissolução de íons de cálcio e fosfato em uma solução tampão, com valores de pH e temperatura controlados, sob corrente elétrica variável¹²⁵. Quando a voltagem é aplicada, o Ca^{2+} migra para a superfície do cátodo (substrato) devido à atração eletrostática e reage com o OH^- ali produzido pela eletrólise da água, resultando na nucleação e crescimento *in situ* de HA na superfície do cátodo¹²⁶. Zeng et al. (2016)¹²⁷ recobriram Ti com HA-GO usando esta técnica: O GO foi disperso e misturado em um eletrólito com nitrato de cálcio ($\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$), dihidrogenofosfato de amônio ($\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$), nitrato de sódio (NaNO_3) e peróxido de hidrogênio (H_2O_2). O revestimento de HA pura exibiu morfologia áspera, com grãos em forma de concha e o revestimento de HA-GO apresentou topografia uniforme e porosa.

2.5.2.3 *Aspersão térmica*

Revestimentos compósitos à base de HA produzidos por *aspersão térmica* já são usados comercialmente em implantes ortopédicos de Ti. Os processos têm alta taxa de deposição, boa resistência coesiva e espessura controlável¹²⁸. As técnicas envolvem o aquecimento dos pós até o estado semifundido, o que pode causar a decomposição da HA e exibir efeitos prejudiciais na sua biocompatibilidade. Para contornar esse problema, Liu et al. (2014) testaram a pulverização a frio sob vácuo para preparar revestimentos nanoestruturados à temperatura ambiente (Fig. 12)¹²⁹. O pó, composto de grafeno e hidroxiapatita, foi preparado por via úmida e os revestimentos pulverizados têm espessura controlável, boa adesão e resistência à fratura, com o grafeno incorporado uniformemente na matriz de HA¹²⁹.

Figura 12 – Sistema de *aspersão térmica* à frio de filmes nanocompósitos de HA.



Fonte: adaptada com permissão de Liu et al. (2014)¹²⁹. Copyright © 2013 Elsevier Ltd.

2.5.2.4 *Spin coating*

Peng et al. (2020)¹³⁰ sintetizaram compósitos HA-GO por método hidrotermal e os depositaram em folhas de liga de magnésio AZ31 pelo processo *spin coating* a 4000 rpm por 25 segundos. Os recobrimentos apresentaram estrutura em bicamada, com o GO ocupando a camada externa e a HA a interna. Os filmes foram biocompatíveis com fibroblastos MC3T3-E1, exibindo maior área de proliferação nas primeiras 4 h de incubação do que a liga não-revestida. A adição de GO aumentou a resistência à corrosão do material e diminuiu a nucleação e crescimento de trincas na HA.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral

Avaliar a biocompatibilidade e propriedades mecânicas e microestruturais de filmes nanocompósitos de hidroxiapatita e óxido de grafeno reduzido, depositados pelo processo *spin coating* em substrato de titânio comercialmente puro.

3.2. Objetivos específicos

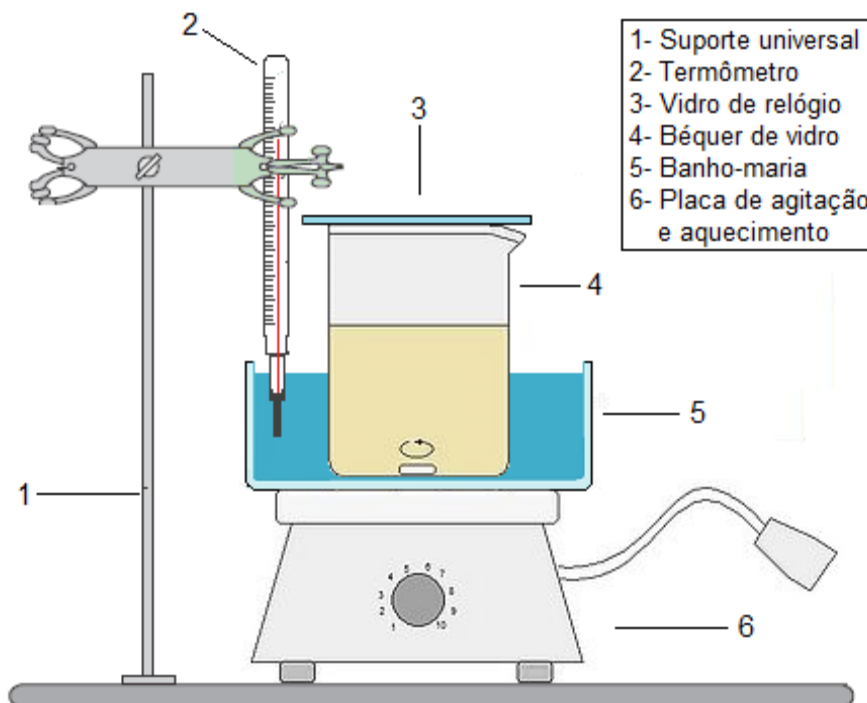
- Sintetizar GO pela oxidação do grafite e promover sua redução química, de forma a obter um material com elevada razão atômica C/O, próxima ao grafeno teórico;
- Depositar filmes finos nanocompósitos de HA com diferentes teores de rGO pelo processo *spin coating* em substrato de titânio comercialmente puro;
- Avaliar o efeito da temperatura de sinterização nas características estruturais e microestruturais dos recobrimentos;
- Realizar ensaios eletroquímicos de varredura linear de potencial em fluido corporal simulado;
- Avaliar a citotoxicidade dos revestimentos a células de mamíferos;
- Avaliar a atividade antibacteriana dos filmes contra *S. aureus*.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Síntese do óxido de grafeno

GO foi sintetizado por um método de Hummers modificado¹⁰⁰. Resumidamente, 1,5 g de pó de grafite e 0,75 g de nitrato de sódio (NaNO_3) foram misturados com 35 ml de ácido sulfúrico (H_2SO_4) em um béquer de vidro e agitados por 2 horas em um banho de gelo (Fig. 13). Em seguida, 4,5 g de permanganato de potássio (KMnO_4) foram adicionados lentamente em três alíquotas (1,5 g cada), uma a cada 1 hora, sob agitação vigorosa. A mistura foi removida do banho de gelo, aquecida a $35\text{ }^\circ\text{C}$ e agitada por 30 minutos. Foram adicionados 69 ml de água, aquecidos a $95\text{ }^\circ\text{C}$ e agitados durante 10 minutos. Em seguida, 210 ml de água e 5 ml de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) foram vertidos sob agitação. A mistura foi transferida para tubos Falcon e centrifugada por 10 minutos a 6000 rpm com ácido clorídrico (HCl) e então, três vezes com água. O sólido precipitado foi congelado com nitrogênio líquido e liofilizado por 3 dias.

Figura 13 – Montagem experimental da síntese e redução química de GO.



Fonte: elaborada pelo autor.

4.2. Redução do óxido de grafeno

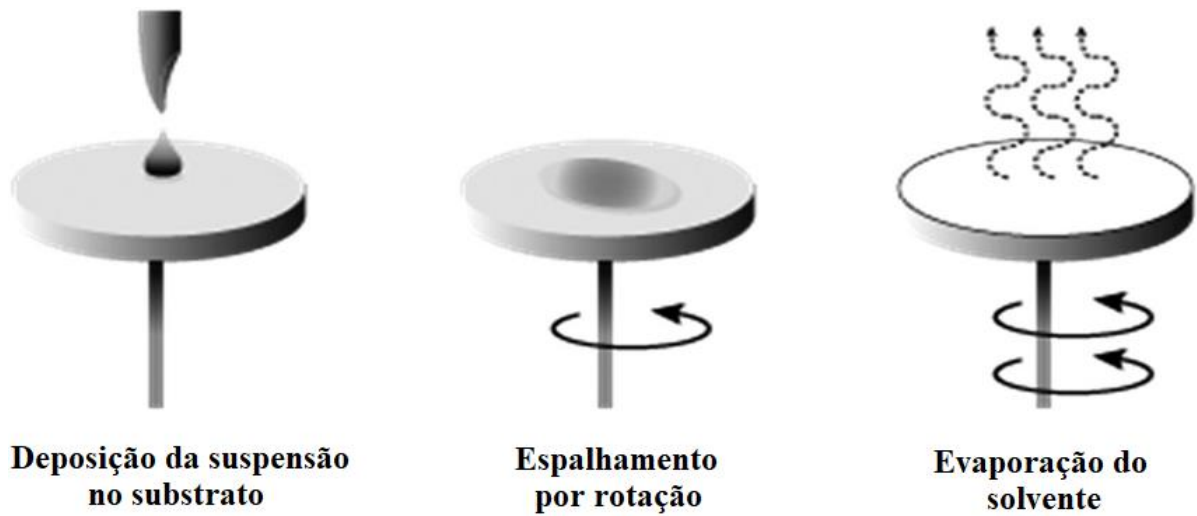
Para reduzir quimicamente o GO em rGO, um método semelhante ao descrito por Alizadeh e Soltani¹³¹ foi aplicado, mas usando água destilada ao invés de metanol como solvente. Primeiro, 30 mg de óxido de grafeno foram dispersos em 20 ml de água em banho ultrassônico. O pH foi ajustado para 9 por adição de solução 5% de carbonato de sódio (Na_2CO_3). Em seguida, 330 mg de borohidreto de sódio (NaBH_4) foram adicionados à dispersão. A mistura foi agitada durante 5 horas a 60 °C e centrifugada com metanol e água até ser obtido um pH neutro. Por fim, as amostras foram secas em estufa a 60 °C por 24 horas, obtendo rGO na forma de pós nanométricos.

4.3. Deposição dos recobrimentos

Chapas de titânio comercialmente puro (Ti-cp) foram cortadas em dois tamanhos diferentes: amostras quadradas de 2 x 7 x 7 mm para ensaios biológicos, e chapas de 2 x 15 x 15 mm para as demais análises. Os substratos foram polidos com lixa metalográfica de granulometria 400 mesh, limpos em banho ultrassônico com acetona, álcool isopropílico e água destilada e secos em temperatura ambiente. As chapas foram ativadas por tratamento em solução ácida 70% de ácido nítrico (HNO_3) por 3 minutos, para melhorar a adesividade do filme.

Hidroxiapatita pura em pó (Alfa Aesar, EUA) foi suspensa em etilenoglicol, na proporção de 1 g de HA para cada 1,55 ml de etilenoglicol. O rGO foi adicionado nas proporções de 0, 1, 2, 3, 4 e 5% em massa. A suspensão foi aquecida por 30 min à 100 °C, resfriada até a temperatura ambiente, homogeneizada por ultrassom e depositada na superfície ativada das amostras pelo processo *spin coating* (Fig. 14).

Figura 14 – Processo de deposição por *spin coating*.



Fonte: adaptado com permissão de Amokrane et al. (2018)¹³². Copyright © 2018 AGBM.

A Figura 15 mostra o programa de velocidades do processo. O primeiro patamar (500 rpm) tem a finalidade de espalhar a suspensão na superfície do titânio. O segundo (2000 rpm) ejeta o excesso de material das bordas do substrato e afina o filme. Finalmente, no último (400 rpm) ocorre a estabilização do recobrimento e o início da evaporação do etilenoglicol, que é terminada ao aquecer a amostra por 15 minutos a 100 °C.

Figura 15 – Programa de velocidades do processo *spin coating*.



Fonte: elaborada pelo autor.

Após a deposição, as amostras foram sinterizadas em forno mufla, com atmosfera ambiente por 1 hora, com velocidade de aquecimento de 3 °C/min, em quatro temperaturas de patamar diferentes: 600, 700, 800 e 900 °C.

4.4. Caracterização dos materiais

Os ensaios empregados nas caracterizações dos pós e filmes são descritos nas seções a seguir. A Tabela 2 mostra quais ensaios foram empregados para os pós de HA, GO, rGO e para os filmes HA-rGO. Os filmes foram analisados por MEV e DRX para as quatro temperaturas de patamar, de forma a observar a evolução da microestrutura durante o processo de sinterização. Todas as outras análises foram feitas somente para a temperatura de 900 °C.

Tabela 2 – Ensaios realizados em cada material.

Ensaio	Pó HA	GO e rGO	Filmes HA-rGO (600 a 800 °C)	Filmes HA-rGO (900 °C)
Área superficial BET	X			
DRX	X	X	X	X
MEV		X	X	X
Raman		X		
XPS		X		
AFM				X
Dureza				X
Corrosão				X
Viabilidade celular				X
Atividade antimicrobiana				X

Fonte: elaborada pelo autor.

4.4.1 Difração de Raios X (DRX)

A caracterização estrutural por difração de raios X (DRX) foi feita utilizando um difratômetro Ultima IV (Rigaku, Japão) com radiação Cu-K α ($\lambda = 1,5418 \text{ \AA}$) e monocromador LiF (100) na configuração convencional θ - 2θ . A identificação das fases e sua análise quantitativa foram feitas com o software Match! 3.

A partir dos difratogramas, as distâncias interplanares (d_{hkl}) foram calculadas pela Lei de Bragg¹³³:

$$d_{hkl} = \frac{n\lambda}{2\sin\theta} \quad (1)$$

onde n é a ordem de reflexão, hkl são os índices de Miller e θ é o ângulo de Bragg.

O grau de cristalinidade (X_c) dos materiais foi calculado pela comparação entre as áreas cristalinas (A_c) e amorfas (A_a) nos difratogramas:

$$X_c = \frac{A_c}{A_c + A_a} \times 100\% \quad (2)$$

e o tamanho médio dos cristalitos foi estimado pela equação de Scherrer¹³⁴:

$$D_{hkl} = \frac{K\lambda}{B_{hkl}\cos\theta} \quad (3)$$

onde D_{hkl} é o tamanho do cristalito na direção perpendicular aos planos da rede, K é um fator de forma¹³³ e B_{hkl} é a largura à meia altura do pico de difração.

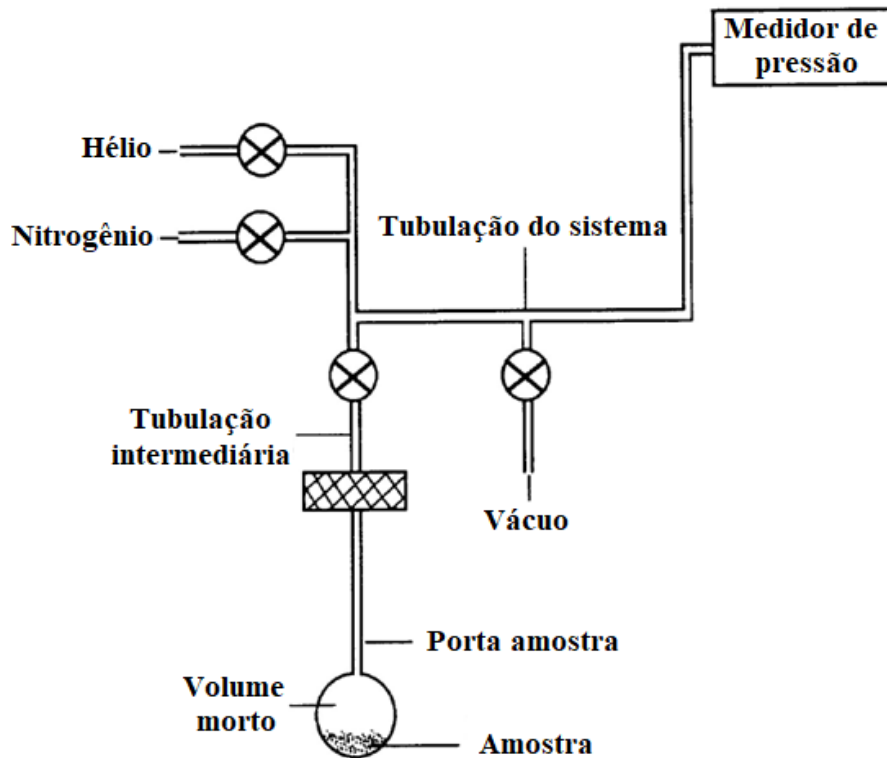
Para os nanomateriais de carbono, o número de folhas (N) de GO e rGO empilhadas em um cristalito foi estimado ao dividir o seu tamanho pela distância entre planos (001)^{135,136}:

$$N = \frac{D_{(001)}}{d_{(001)}} \quad (4)$$

4.4.2 Análise de área superficial

As análises de área superficial e volume de poros foram feitas através da determinação das isotermas de Brunauer–Emmett–Teller (BET) do gás nitrogênio a 77 K, utilizando um analisador de adsorção física ASAP 2020 (Micromeritics, EUA) (Fig. 16). As amostras de HA na forma de pó foram acondicionadas em um tubo sob vácuo, resfriadas à 77 K e expostas a nitrogênio sob uma série de pressões controladas. O número de moléculas de N_2 adsorvidas na superfície dos pós aumenta à cada aumento de pressão. Qualquer microporo na superfície é rapidamente preenchido, fazendo com que a superfície livre se torne completamente coberta, preenchendo também os poros grandes. O processo continuou até o ponto de condensação volumétrica do N_2 . Em seguida, foi feito o processo de dessorção, onde as moléculas adsorvidas são liberadas sob pressão controlada. Assim como no processo de adsorção, a variação na quantidade de gás na superfície do sólido é quantificada¹³⁷.

Figura 16 – Diagrama esquemático do analisador de adsorção física.



Fonte: adaptado com permissão de Webb (1997)¹³⁷.

As áreas superficiais foram determinadas pelo modelo de BET¹³⁸:

$$\frac{P}{V_a(P_0 - P)} = \frac{1}{V_m C} + \frac{(C-1) P}{V_m C P_0} \quad (5)$$

onde P é a pressão medida, P_0 é a pressão de saturação do N_2 adsorvido, V_a é a velocidade de adsorção, V_m é o volume da monocamada e C é uma constante dada por:

$$C = e^{\frac{(E_1 - E_2)}{RT}} \quad (6)$$

onde E_1 é o calor de adsorção da primeira camada adsorvida, E_2 é o calor de liquefação do N_2 , R é a constante dos gases perfeitos e T é a temperatura. A área superficial específica BET é estimada através da área média ocupada por uma única molécula de gás adsorvido (σ):

$$S_{BET} = V_n \sigma N_A \quad (7)$$

onde N_A é o número de Avogadro.

4.4.3 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

As microestruturas foram visualizadas em um microscópio eletrônico de varredura modelo DSM 960 (Zeiss, Alemanha) com magnificações de até 100.000 vezes. Para quantificar a porosidade (φ) dos revestimentos, foi utilizado o software ImageJ, convertendo as micrografias para o formato binário, determinando o limite de contraste em que apenas os poros sejam destacados e comparando as áreas dos poros (A_p) com a área total da micrografia (A_T)¹³⁹:

$$\varphi = \frac{A_p}{A_T} \times 100\% \quad (8)$$

4.4.4 Espectroscopia Raman

Os espectros Raman foram obtidos com um microscópio Alpha-300R (Witec, Alemanha) equipado com um estágio altamente linear e lente objetiva Nikon (100 x NA = 0,9). Os sinais Raman foram excitados com um laser Nd:YAG (532 nm; 10 mW).

4.4.5 Microscopia de Força Atômica (AFM)

Um microscópio de força atômica modelo Dimension Icon (Bruker, Alemanha) foi utilizado para a visualização topográfica dos filmes. A rugosidade média (R_a) das superfícies foi medida usando o software Gwyddion 2.61, sendo calculada pelo desvio médio de todas as alturas (r_j) dos N pontos do perfil de rugosidade das linhas de avaliação traçadas nas micrografias:

$$R_a = \frac{1}{N} \sum_{j=1}^N |r_j| \quad (9)$$

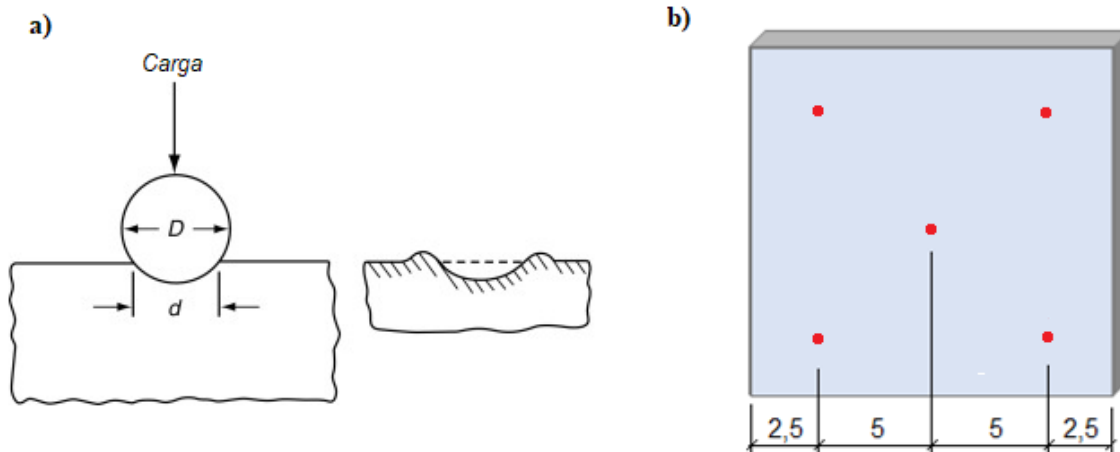
4.4.6 Espectroscopia de Fotoelétrons Excitados por Raios-X (XPS)

Medidas de XPS foram realizadas em um espectrômetro ESCA+ (Scienta Omicron, Alemanha) com radiação Al-K α monocromatizada de 1486,7 eV, potência incidente de 280 W e um neutralizador de cargas. Os dados foram ajustados usando o software CasaXPS e calibrados pela energia do carbono adventício (284,8 eV). A deconvolução dos sinais em alta resolução do C 1s foi feita aplicando o método de Fourier¹⁴⁰ através do software PeakFIT.

4.4.7 Dureza

As medidas de dureza têm por objetivo avaliar o efeito de reforço compósito do rGO no aumento da resistência à deformação plástica da HA. Foram feitas por ensaio Rockwell superficial na escala HR45T, com indentador esférico de diamante de diâmetro $D = 1/16''$, pré-carga de 3 Kgf e carga principal de 15 Kgf (Fig. 17a). Os valores medidos foram convertidos para a escala Vickers. Foram feitas 5 indentações em cada amostra (Fig. 17b), em triplicatas, para cada composição.

Figura 17 – a) Indentador esférico Rockwell; b) Posicionamento das indentações em cada amostra (em milímetros).

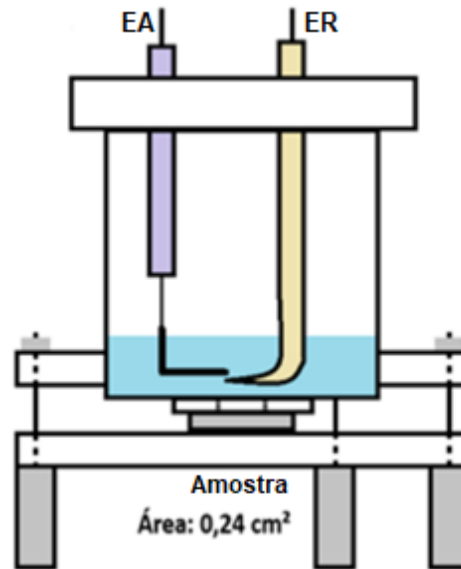


Fonte: a) adaptada de Wright (2016)¹⁴¹; b) elaborada pelo autor.

4.4.8 Corrosão

A análise de corrosão foi feita pela técnica de polarização potenciodinâmica. A célula consistiu em um eletrodo de referência (ER) de Ag/AgCl e um eletrodo auxiliar (EA) de platina:

Figura 18 – Célula eletroquímica utilizada nos ensaios de corrosão.



Fonte: adaptada de Silva (2018)¹⁴².

O eletrólito utilizado foi fluido corporal simulado (*Simulated Body Fluid* – SBF) a 37 °C, uma solução cuja concentração iônica (Tab. 3) busca mimetizar o plasma sanguíneo:

Tabela 3 – Concentração iônica do SBF utilizado como eletrólito.

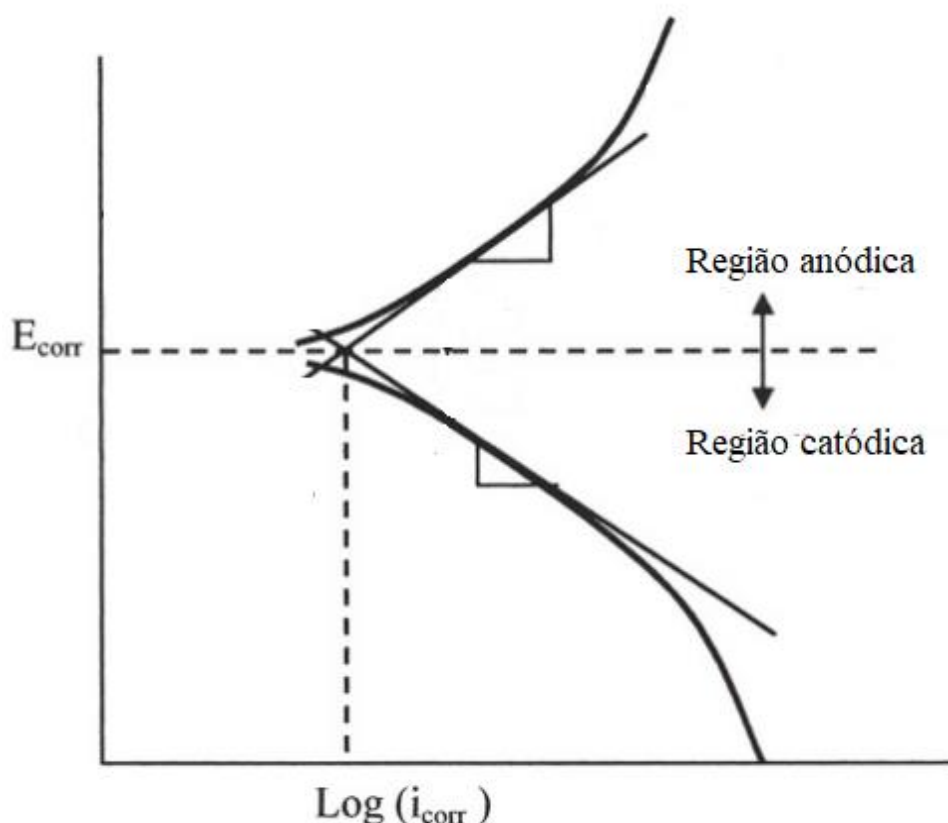
Íon	Concentração iônica (mM)
Na ⁺	142,0
K ⁺	5,0
Mg ²⁺	1,5
Ca ²⁺	2,5
Cl ⁻	147,8
HCO ₃ ⁻	4,2
HPO ₄ ²⁻	1,0
SO ₄ ²⁻	0,5
pH	7,4

Fonte: Kokubo e Takadama (2006)¹⁴³.

Os testes de polarização foram realizados após a imersão das diferentes amostras na solução por 1 h, para garantir a estabilização do potencial de circuito aberto. A velocidade de varredura empregada foi de 1,0 mV/s¹⁴⁴. Foi utilizada a varredura no sentido anódico, ou seja, a varredura inicia-se em potenciais menores até atingir potenciais mais positivos. O

monitoramento da corrente e potencial foram feitos com um potenciostato Autolab-VGSTAT-302 (Metrohm, Suíça), interfaceado a um microcomputador gerenciado pelo programa Nova 2.1.4. Obtidas as curvas de polarização, foram determinadas as correntes (I_{corr}) e potenciais (E_{corr}) de corrosão no intercruzamento das curvas anódica e catódica, extrapoladas linearmente na região do potencial de corrosão (Fig. 19)¹⁴⁵:

Figura 19 – Extrapolação linear das curvas de polarização para determinação de E_{corr} e I_{corr} .



Fonte: elaborada pelo autor com base em Perez (2004)¹⁴⁶.

4.4.9 Viabilidade celular

O ensaio MTT é usado para medir a atividade metabólica celular, como um indicador de viabilidade celular, proliferação e citotoxicidade. Este ensaio colorimétrico é baseado na redução de um sal de tetrazólio amarelo (brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio ou MTT) a cristais de formazan roxo por células metabolicamente ativas ¹⁴⁷.

As amostras foram esterilizadas em uma placa de 24 poços com álcool etílico 70% (1 mL/poço) e incubadas a 37 °C em atmosfera umidificada (5% de CO₂) *overnight*. O álcool foi retirado e as amostras lavados com 1 mL de meio de cultura DMEM (*Dulbecco's Modified*

Eagle Medium). A troca de meio foi realizada 10 vezes.

Foram cultivados fibroblastos de camundongo da linhagem Balb/3T3 clone A31. Estas células são amplamente utilizadas em testes de citotoxicidade de compostos bioativos e de biocompatibilidade de materiais¹⁴⁸. As células foram suspensas no meio de cultura em uma concentração de 2×10^5 células/mL e, então, transferidas para uma placa de 24 poços (1 ml/poço), que foi incubada por 24h a 37 °C em atmosfera umidificada (5% de CO₂). Após esse período, o meio de cultura foi trocado e as amostras foram transferidos para a placa, que foi novamente incubada por 72h. As amostras e o meio de cultura foram retirados e os poços preenchidos com 1 mL de solução de MTT em DMEM (1 mg/mL) e a placa foi novamente incubada. Após esse período, o líquido foi retirado e os poços preenchidos com 1 mL de dimetilsulfóxido. Foi realizada a leitura da absorbância a 570 nm. Um pedaço de látex, com tamanho similar às amostras, foi utilizado como controle positivo para viabilidade celular^{147,149}. Para análise estatística, foi realizada análise de variância a um fator (ANOVA *one way*).

4.4.10 Atividade antimicrobiana

Foi avaliada a atividade antimicrobiana dos revestimentos contra *S. Aureus* pelo método Kirby-Bauer de difusão em ágar¹⁵⁰ e por teste de adesão bacteriana. Foi utilizada a cepa de referência ATCC® 25923, obtida do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (INCQS-FIOCRUZ, Brasil).

Antes do uso, as cepas foram semeadas individualmente em placas de Petri (Techno Plastic Products AG, Suíça) contendo meio de cultura Agar Infusão Cérebro e Coração (*Brain Heart Infusion* - BHI). As placas foram incubadas a 37 °C por 48 horas em estufa bacteriológica.

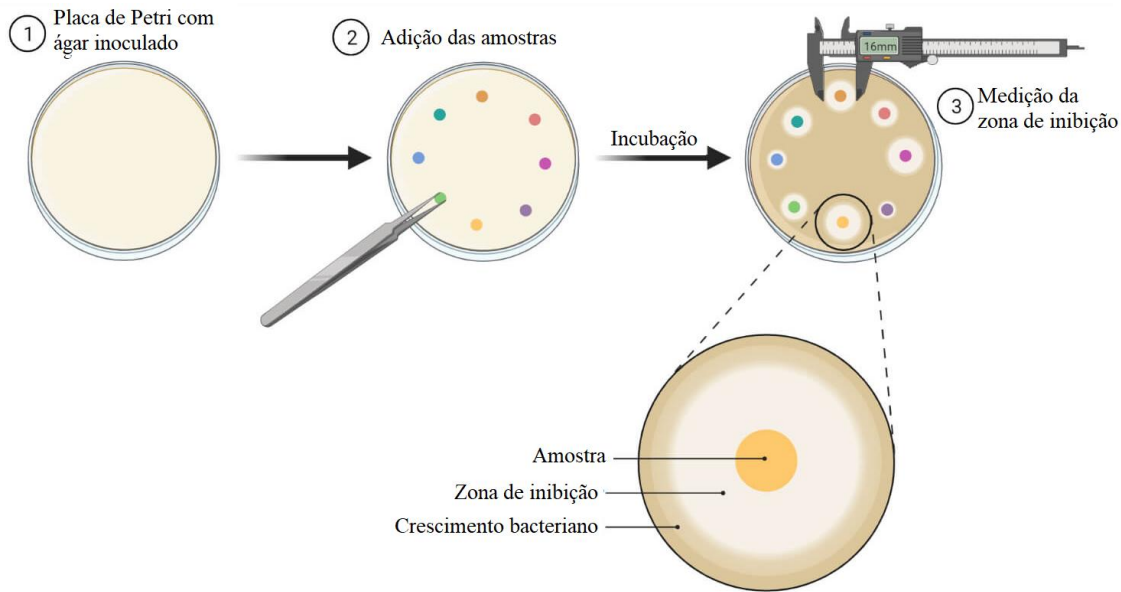
Para obtenção do pré-inóculo de *S. aureus*, sete colônias recém-cultivadas foram transferidas para 10 mL de meio de cultura *Tryptic Soy Broth* (Acumedia, EUA) e incubadas em estufa a 37 °C durante 18 horas. A diluição do inóculo foi realizada na razão de 1:20. A suspensão de *S. aureus* foi padronizada por meio de espectrofotômetro a uma densidade ótica de 600 nm de $0,7 \pm 0,01$, que corresponde ao meio da fase exponencial e representa uma concentração microbiana de 10^7 CFU/mL.

4.4.10.1 Teste Kirby-Bauer de disco-difusão em ágar

O teste Kirby-Bauer foi feito semeando as bactérias nas superfícies dos revestimentos em placas de Petri e incubando-as por 48 horas em solução de SBF (Fig. 20). Posteriormente,

o fluido corporal líquido foi substituído pelo sólido, composto de fluido duas vezes concentrado e ágar com vermelho neutro. As amostras foram colocadas sobre esse meio e novamente incubadas por 24 horas. Analisou-se então o Índice de Zona, que é a área não-corada pelo corante vital¹⁵⁰.

Figura 20 – Teste Kirby-Bauer de disco-difusão em ágar.

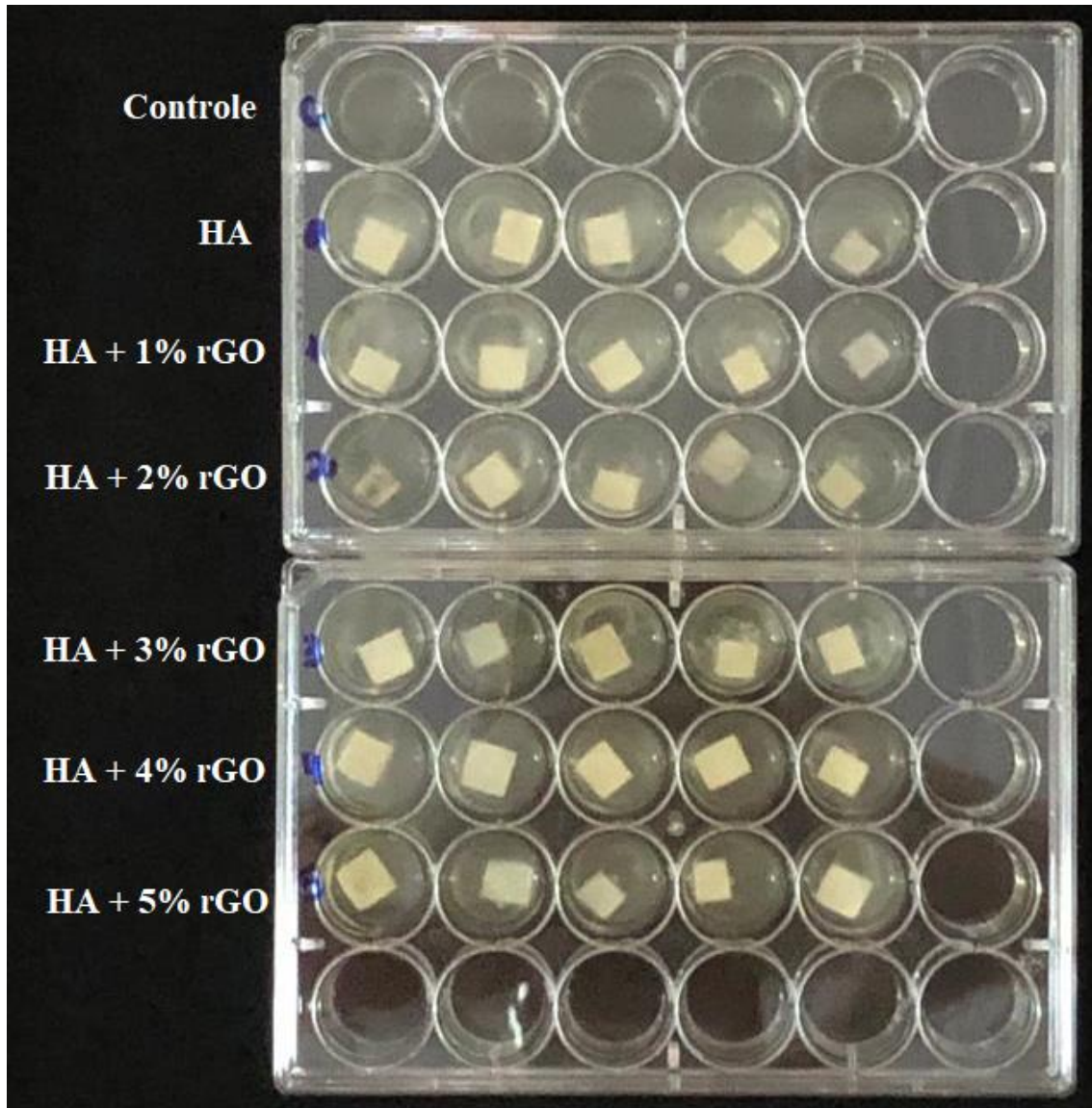


Fonte: adaptada com permissão de Sharma (2022)¹⁵¹.

4.4.10.2 Teste de adesão bacteriana

Cada amostra do material em estudo (5 replicatas por composição) foi exposta sob condições estáticas a 50 μL de inóculo ajustado (Fig. 21). O controle é apenas o inóculo sem a amostra de Ti. Após 2 horas em temperatura ambiente, as bactérias não-aderentes foram removidas, lavando duas vezes com solução de cloreto de sódio (NaCl) a 0,9%. As amostras foram inseridas em tubos de vidro esterilizados contendo 3 mL de solução salina e ultrassonicadas por 1 minuto. A suspensão foi diluída em séries decimais de 10^{-1} a 10^{-4} em solução de PBS (*Phosphate-buffered saline*) e inoculada em triplicatas em ágar BHI. As placas foram incubadas em estufa a 37 °C por 48 h. As colônias foram contadas e o número de bactérias viáveis foi determinada, correspondente aos micro-organismos aderidos às superfícies após 2 horas de exposição a *S. aureus*.

Figura 21 – Exposição dos revestimentos aos inóculos de *S. Aureus*.



Fonte: elaborada pelo autor.

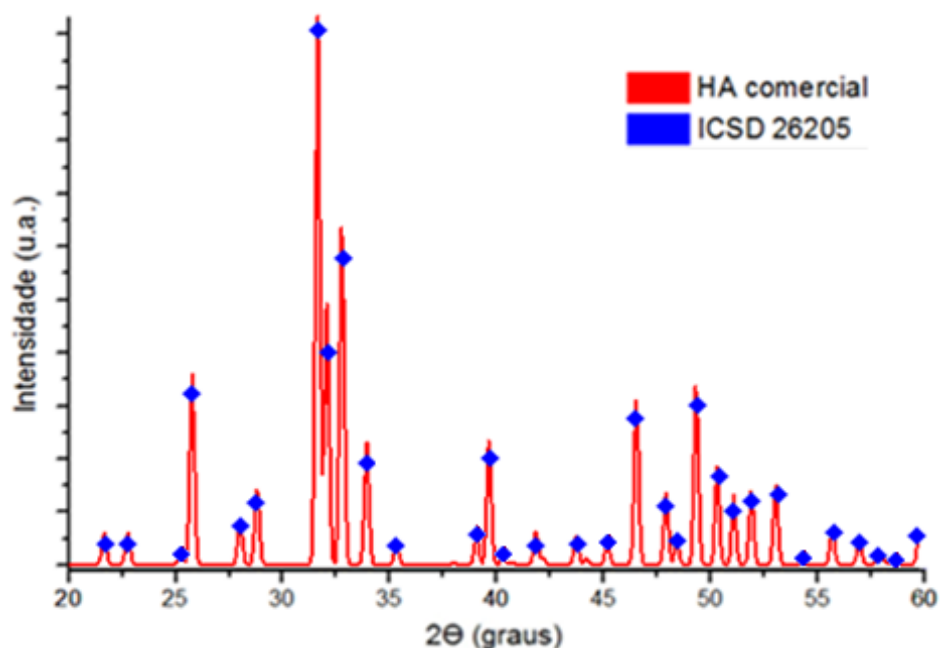
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Caracterização do pó de HA

5.1.1 Difração de raios X

A Figura 22 compara o padrão de difração medido para a HA comercial com a ficha cristalográfica ICSD 26205¹⁵². Ambos são praticamente idênticos, sem nenhuma adição ou falta de picos. A quantificação de fases mostrou que a pureza dos pós é próxima de 100%, não detectando fases alotrópicas, produtos de decomposição térmica ou impurezas.

Figura 22 – Difrátogramas da HA comercial e da ficha ICSD 26205.

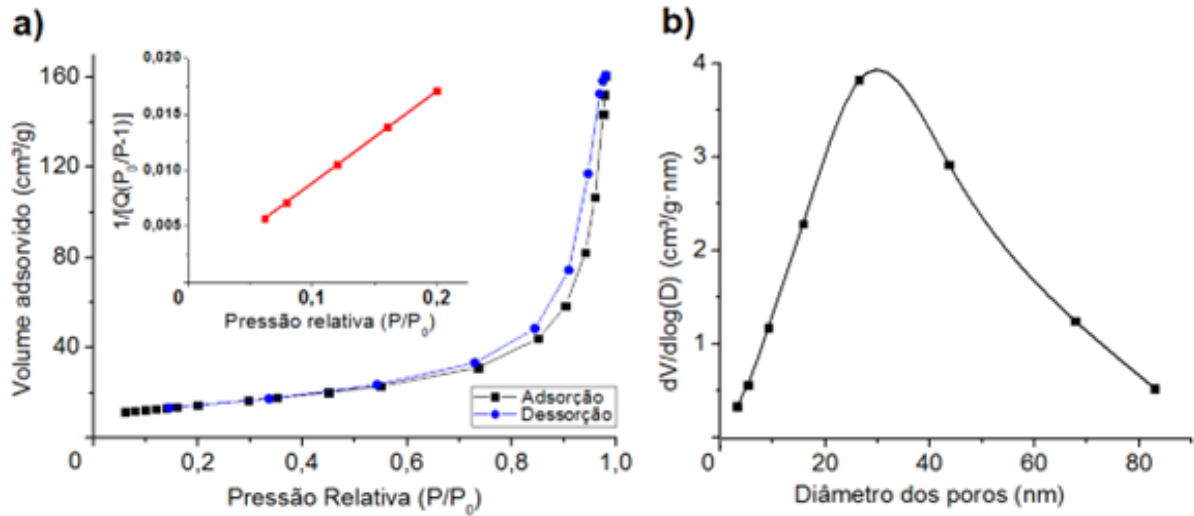


Fonte: resultados originais da pesquisa e Levin (2018)¹⁵².

5.1.2 Análise de área superficial

O espectro BET (Fig. 23a) apresenta curva de histerese bastante próxima à curva de adsorção na região em torno da pressão de saturação. Isto significa que o pó contém mesoporos de tamanho bem restrito, o que é confirmado na Fig. 23b, que mostra que a maioria dos poros possui diâmetro na faixa de 15 a 80 nm, com uma média de 30 nm¹⁵³. O ensaio ainda revelou que o diâmetro médio das partículas é de 110 nm.

Figura 23 – a) Isotermas BET e b) distribuição de diâmetros dos poros da HA em pó.

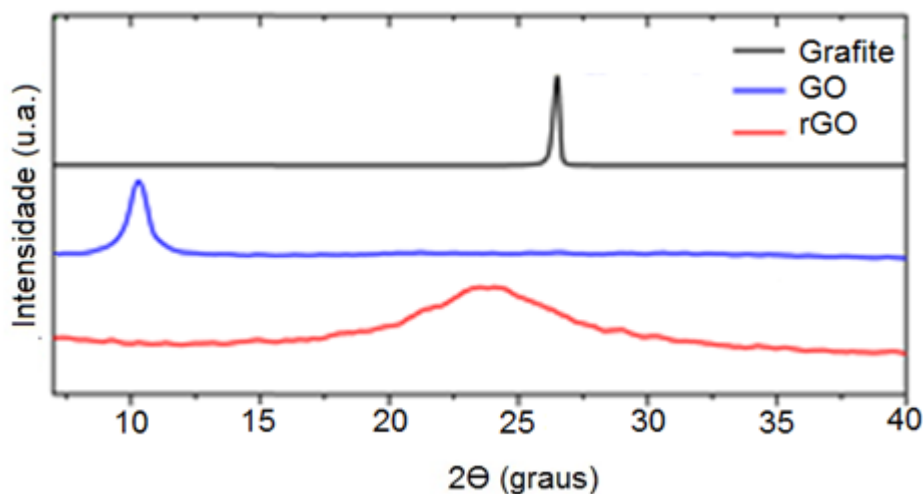


Fonte: resultados originais da pesquisa.

5.2. Caracterização do GO e rGO

5.2.1 Difração de raios X

Os padrões de DRX do grafite, GO e rGO são mostrados na Figura 24. Inicialmente, o grafite possui uma distância interplanar (d_{hkl}) de 0,337 nm ($2\theta = 26,4^\circ$), que aumenta para 0,858 nm ($2\theta = 10,3^\circ$) após a oxidação para formar GO, devido à formação de grupos epóxi, hidroxila e carboxila¹⁵⁴. Com a redução química, a distância entre os planos atômicos volta a diminuir para 0,374 nm ($2\theta = 23,7^\circ$) devido à remoção dos grupos funcionais, retornando a um padrão próximo à posição do grafite, mas com uma ampla banda amorfa. Este resultado está condizente com o obtido por Shin et al. (2009)¹⁵⁵ em procedimento semelhante.

Figura 24 – Difratomogramas do grafite, GO e rGO.

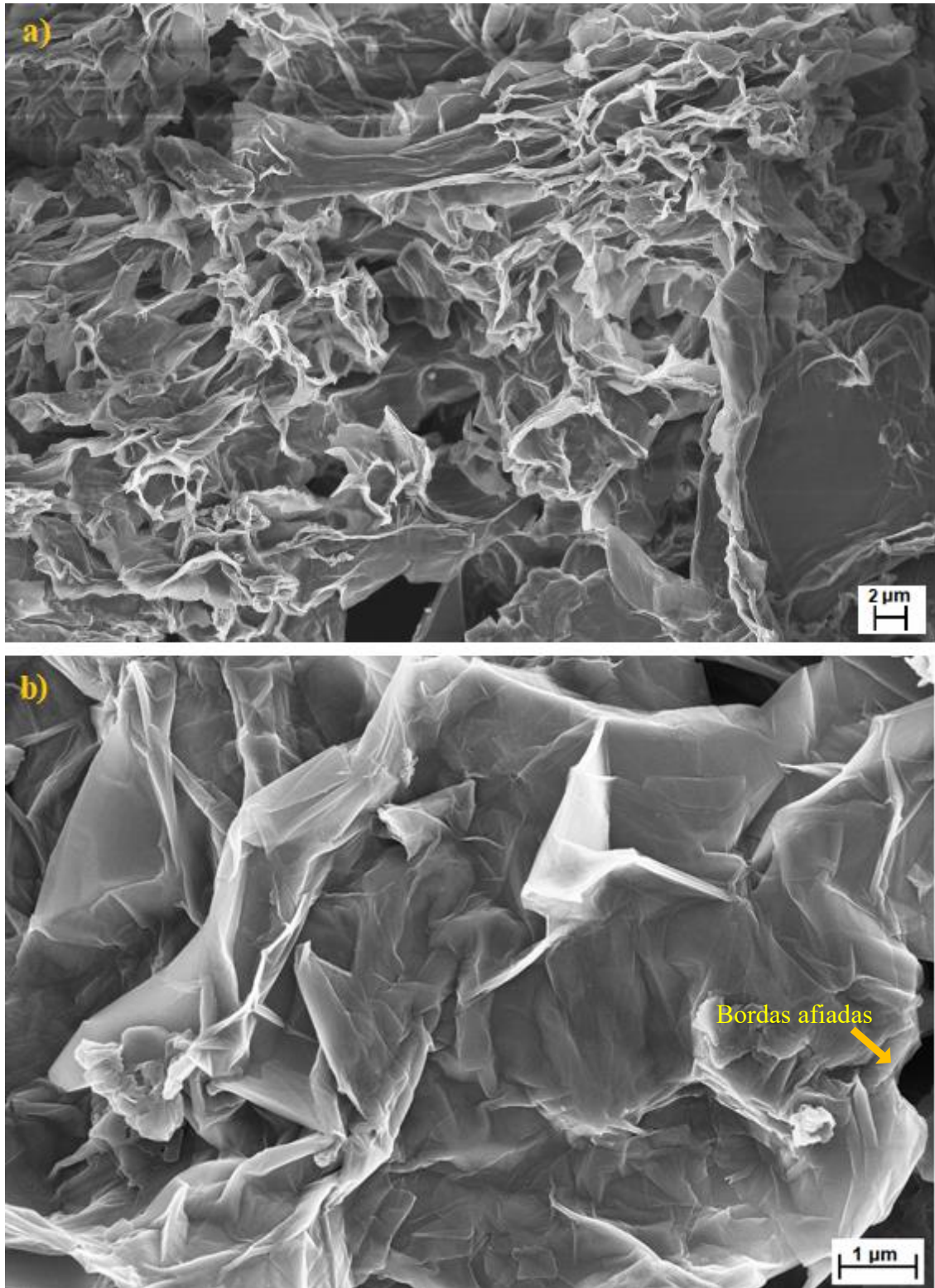
Fonte: resultados originais da pesquisa.

Os tamanhos médios de cristalito do GO e rGO, calculados pelo difratograma e com a equação de Scherrer (Eq. 3), foram de 14,9 e 2,5 nm, respectivamente. Logo, aplicando a Eq. 4, estima-se que cada cristalito de GO é composto em média de 17 folhas de carbono empilhadas e o de rGO de 7 folhas. Estes números são um pouco superiores aos obtidos por Komorizono (2021)¹⁵⁶ em processo de redução à laser, onde ambos o GO e o rGO apresentaram entre 6 e 7 folhas.

5.2.2 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

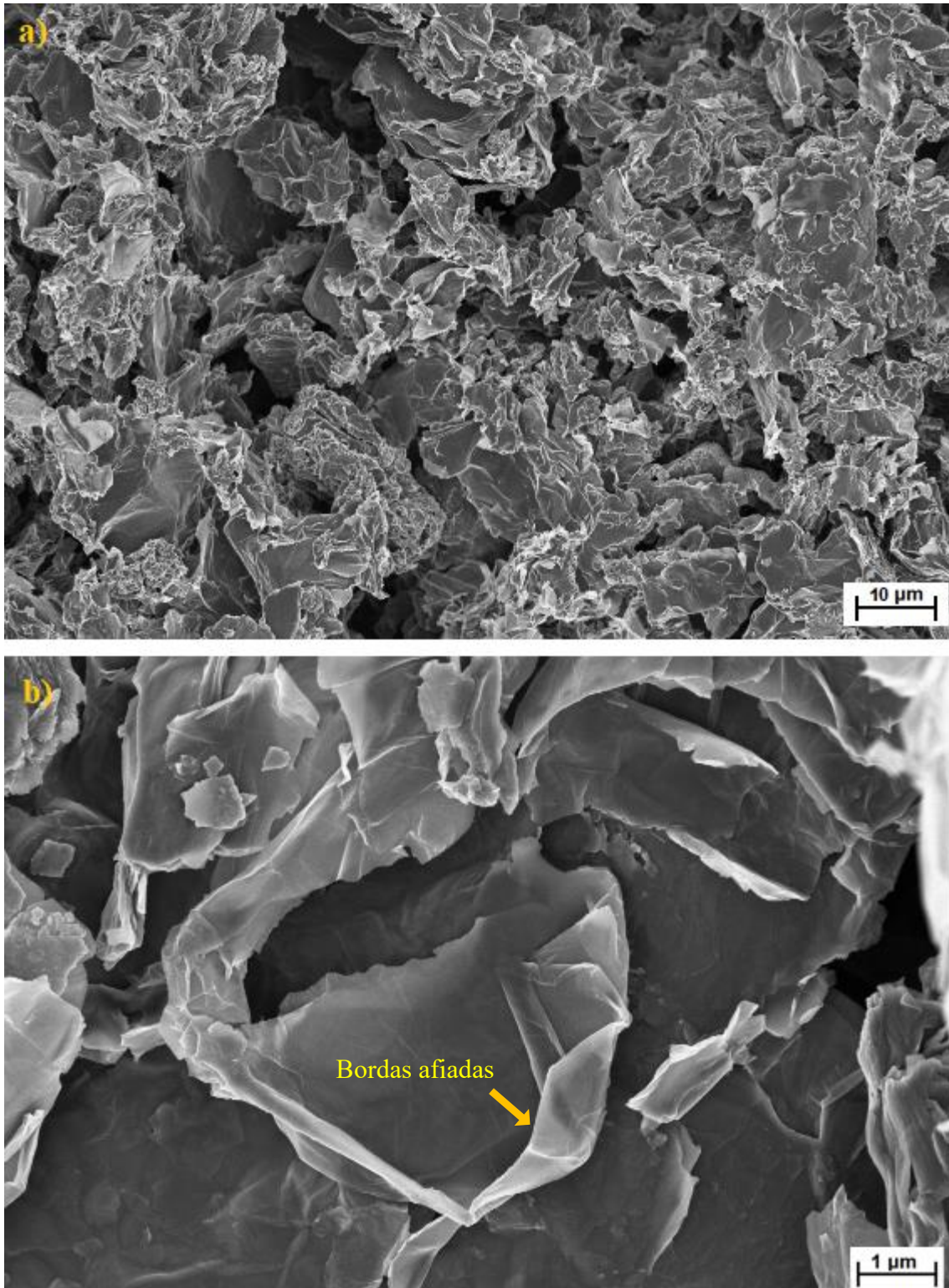
A morfologia do GO e rGO são vistas nas Fig. 25 e 26, respectivamente. O GO se apresenta em folhas finas, homogêneas e contínuas. Em contrapartida, as folhas de rGO são danificadas, amassadas e descontínuas. Em magnificações maiores, é possível ver regiões em que as folhas quase transparentes do GO se dobrassem entre si. As bordas nanométricas do rGO, responsáveis por sua forte atividade antibacteriana, também podem ser vistas na Fig. 26b.

Figura 25 – Micrografias do óxido de grafeno.



Fonte: resultados originais da pesquisa.

Figura 26 – Micrografias do óxido de grafeno reduzido.

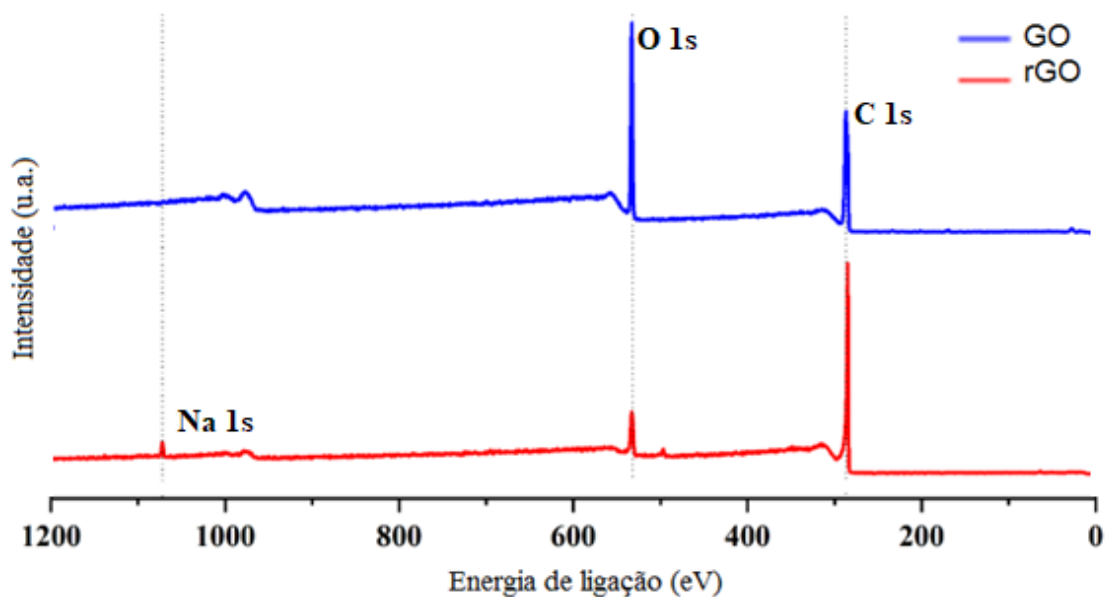


Fonte: resultados originais pesquisa.

5.2.3 Espectroscopia de fotoelétrons excitados por raios X (XPS)

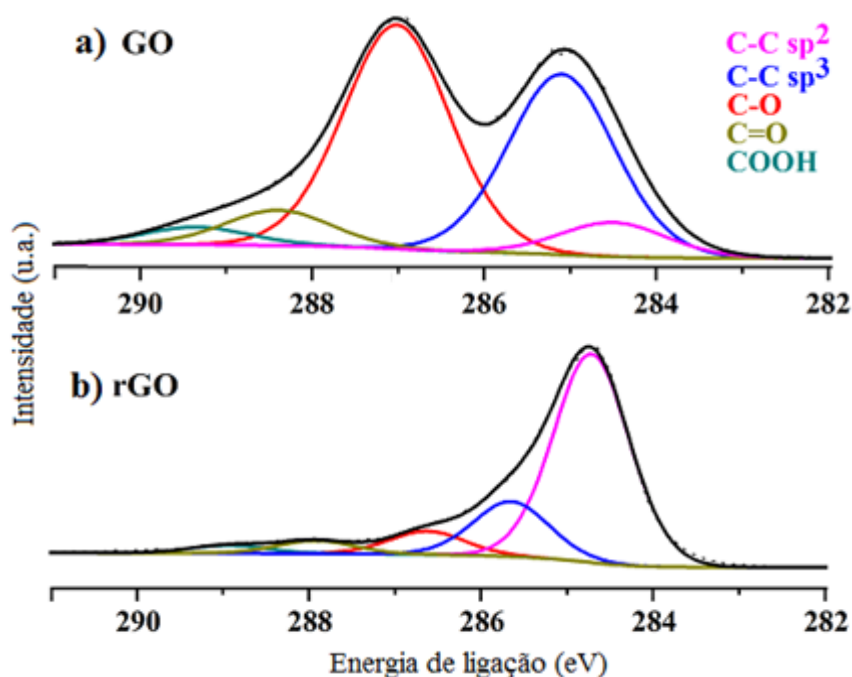
Os espectros *survey* de XPS dos nanomateriais são apresentados na Figura 27. Três elementos são identificados: C, O e Na, sendo este último uma impureza resultante do NaBH_4 utilizado no processo de redução. O pico do O 1s é mais intenso que o pico do C 1s para o GO, porém, após a redução, sua intensidade é muito pequena. A partir deste espectro, pôde ser feita a quantificação da composição molar antes e após a redução (Tab. 4).

Figura 27 – Espectros *survey* de XPS do GO e rGO.



Fonte: resultados originais da pesquisa.

Na Figura 28 é apresentado o espectro em alta resolução do C 1s. Após a sua deconvolução, cinco picos são detectados para o GO, posicionados em 284,5 (C-C sp^2), 285,2 (C-C sp^3), 287,0 (C-O), 288,3 (C-OH) e 289,5 eV (COOH). A maioria desses picos desaparece para o rGO, mostrando que a redução química foi bem sucedida, diminuindo a maioria dos grupos funcionais oxigenados. Por estas curvas, é feita a quantificação do percentual de ligações químicas presentes nas nanopartículas (Tab. 4).

Figura 28 – Espectros XPS em alta resolução do C 1s do GO e rGO.

Fonte: resultados originais da pesquisa.

A Tabela 4 mostra que a composição final do rGO apresentou uma razão C/O de 11,2, superior à razão de 8,6 obtida por Gao et al. (2009)¹⁵⁷ em um procedimento semelhante. Além disso, o material sintetizado possui baixíssimo teor de impurezas: apenas 0,3% de sódio.

Tabela 4 – Composição molar e percentual de ligações químicas do GO e rGO.

	Composição (%m)		Ligações químicas (%)		
	GO	rGO	GO	rGO	
C	74.5	91.5	C-C sp²	7.0	67.8
O	25.5	8.2	C-C sp³	36.8	17.9
Na	0.0	0.3	C-O	45.6	7.6
			C=O	7.2	4.2

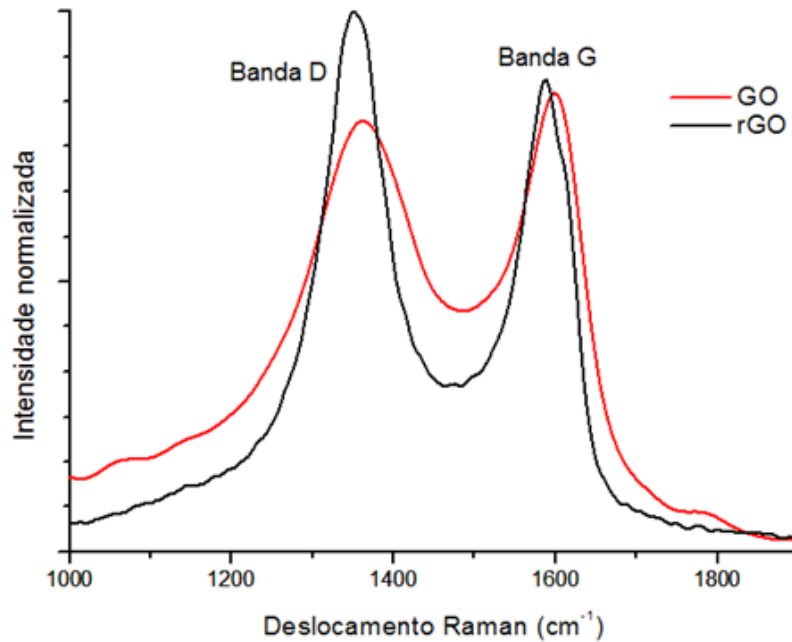
Fonte: resultados originais da pesquisa.

5.2.4 Espectroscopia Raman

Os espectros Raman antes e depois da redução são apresentados na Figura 29. As duas principais bandas de primeira ordem são visíveis: a banda D ($\sim 1350\text{ cm}^{-1}$), relacionada ao

número de defeitos, vacâncias e contornos de grão, aumentou consideravelmente após a redução e; a banda G ($\sim 1580\text{ cm}^{-1}$), relacionada às ligações C-C sp^2 , que aumentou sensivelmente, indicando uma restauração dos domínios sp^2 no plano do grafeno. Estes espectros estão condizentes com a literatura, sendo semelhantes aos obtidos por Shin et al. (2009)¹⁵⁵.

Figura 29 – Espectros Raman do GO e rGO.



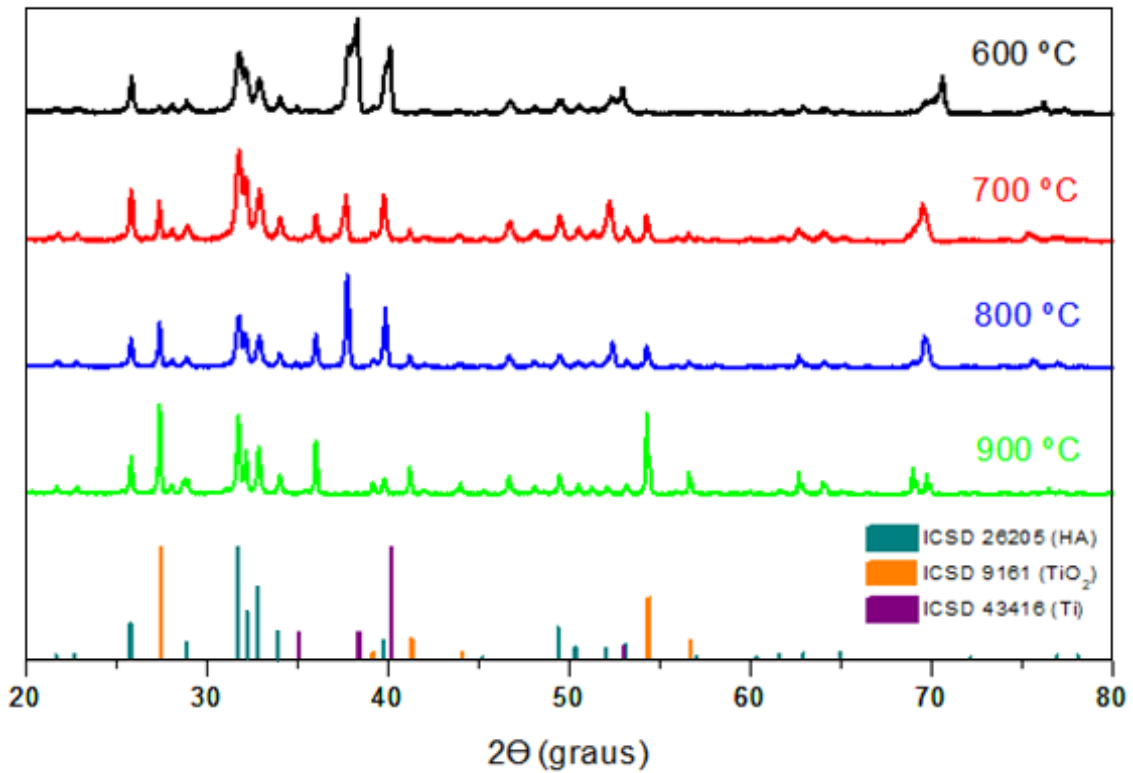
Fonte: resultados originais da pesquisa.

5.3. Caracterização dos revestimentos HA-rGO

5.3.1 Difração de raios X

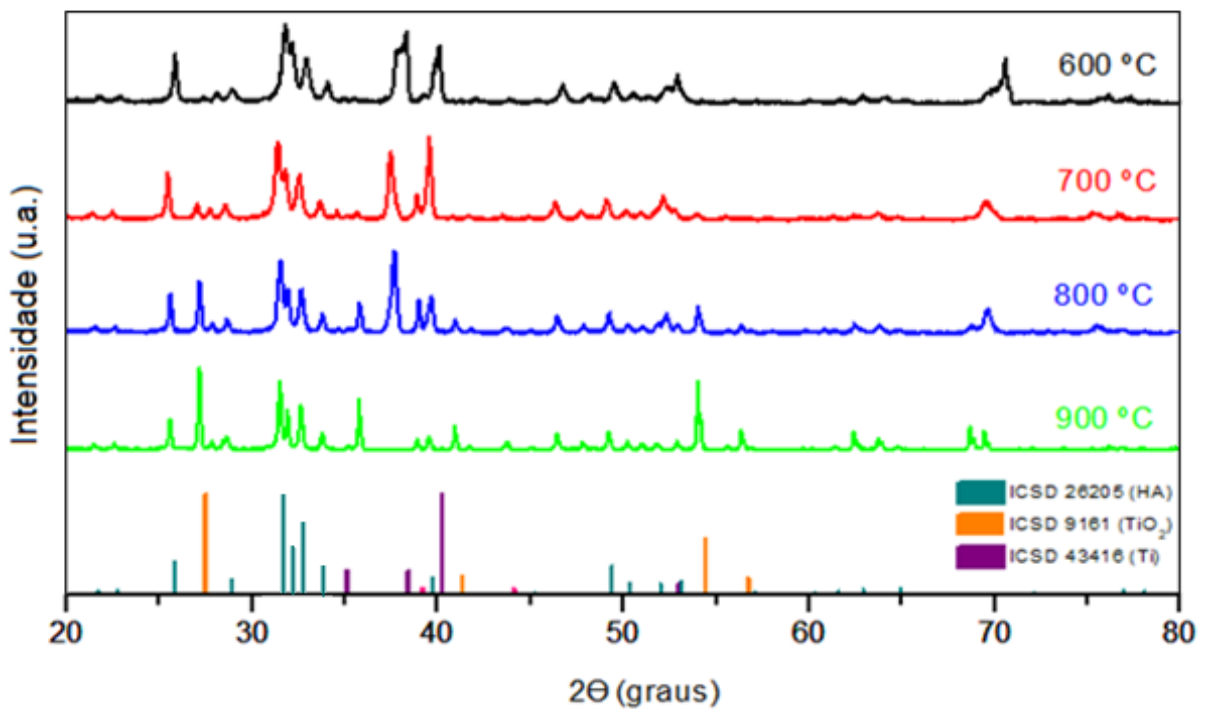
Nas Figuras de 30 a 35 são apresentados os difratogramas de todos os filmes, para todas as composições e temperaturas de sinterização.

Figura 30 – Difratomogramas dos filmes de HA pura.

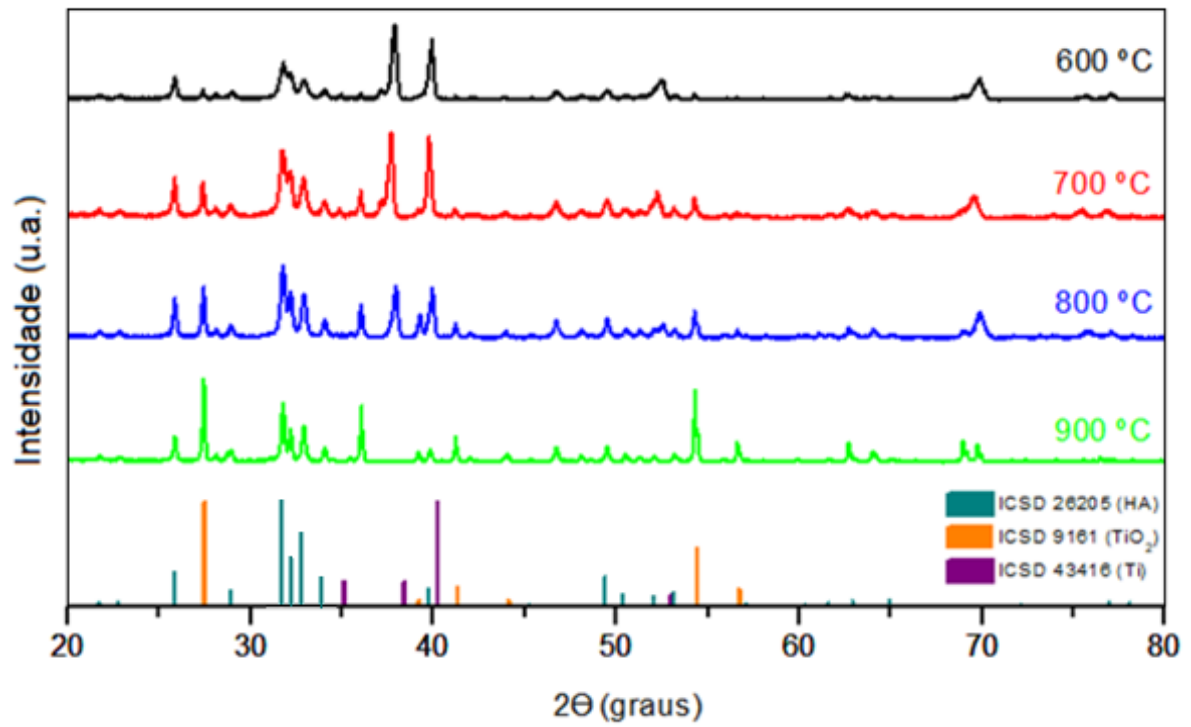


Fonte: resultados originais da pesquisa.

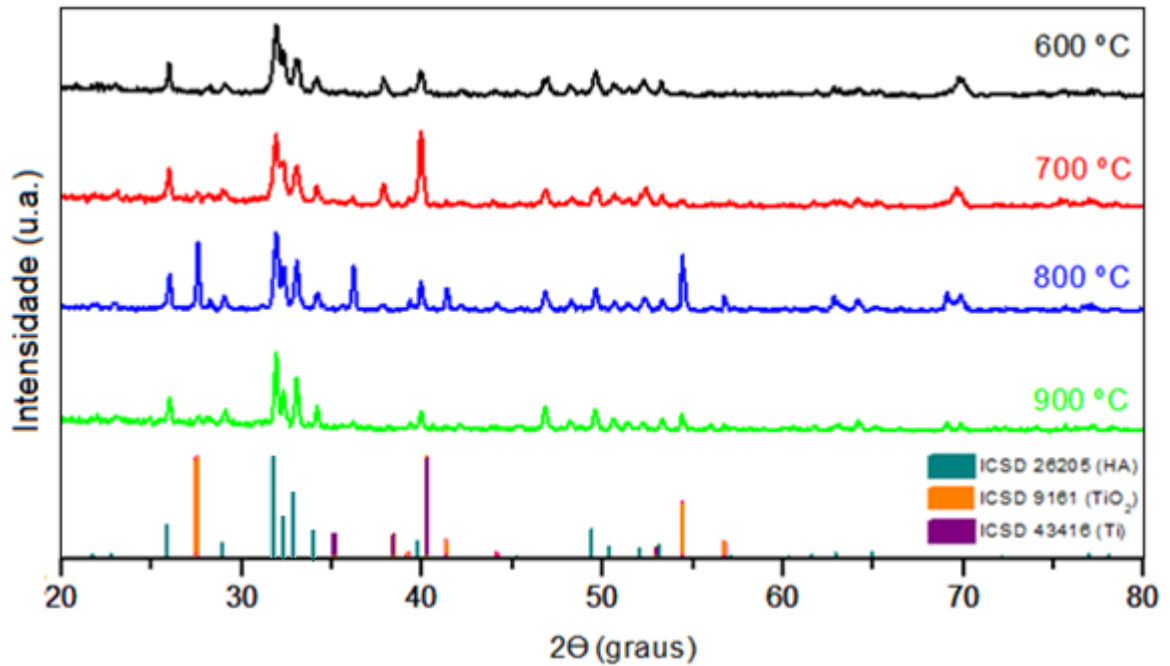
Figura 31– Difratomogramas dos filmes HA + 1% rGO.



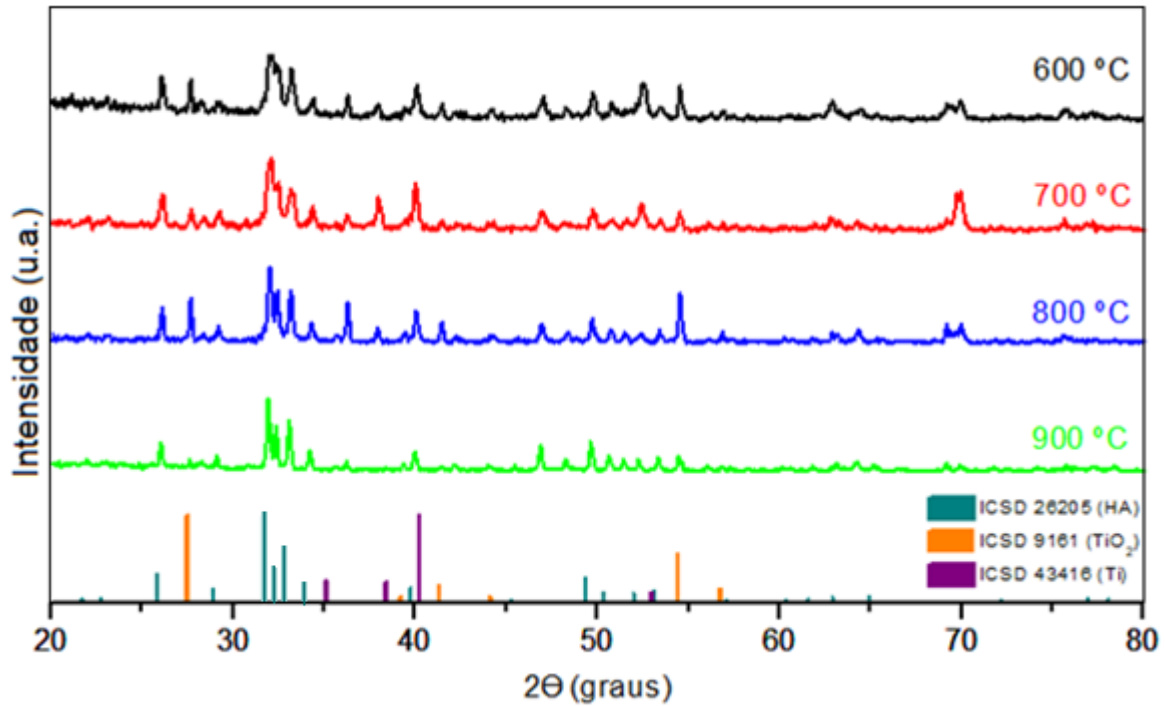
Fonte: resultados originais da pesquisa.

Figura 32 – Difratomogramas dos filmes HA + 2% rGO.

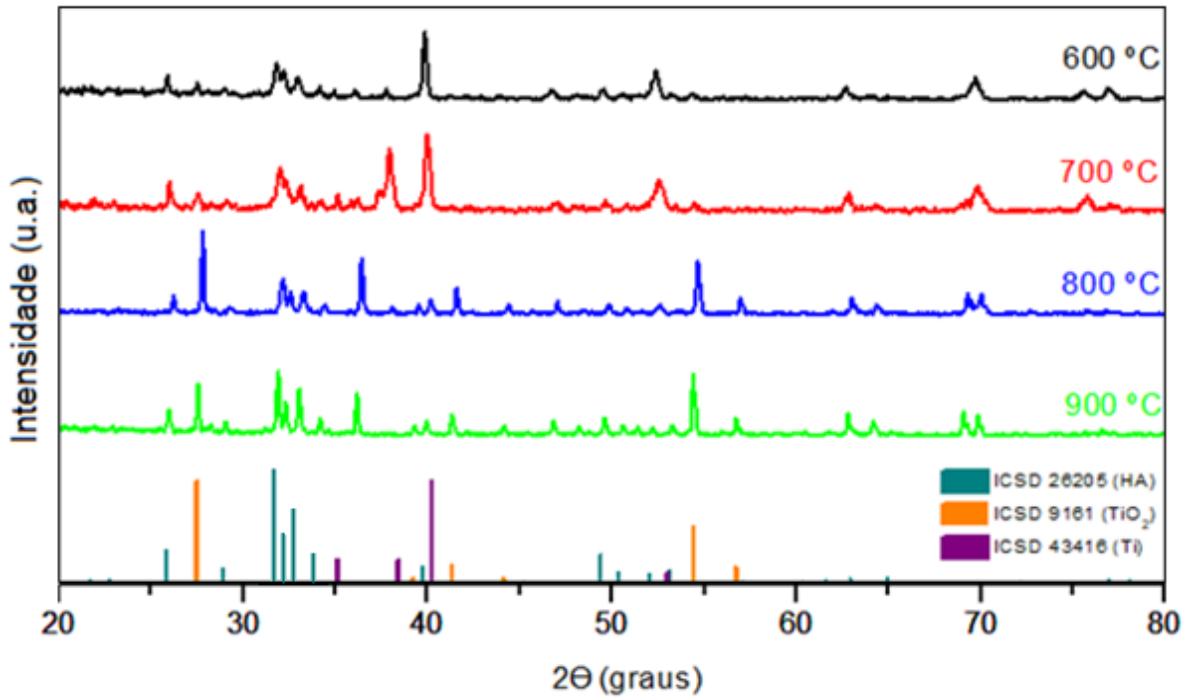
Fonte: resultados originais da pesquisa.

Figura 33 – Difratomogramas dos filmes HA + 3% rGO.

Fonte: resultados originais da pesquisa.

Figura 34 – Difratomogramas os filmes HA + 4% rGO.

Fonte: resultados originais da pesquisa.

Figura 35 – Difratomogramas dos filmes HA + 5% rGO.

Fonte: resultados originais da pesquisa.

A Tabela 5 mostra a quantificação de fases. Como os filmes são muito finos, o feixe de raios X penetrou o suficiente para detectar o Ti do substrato em algumas amostras. Nas temperaturas mais altas, ocorreu a difusão de Ti para o filme e a formação de até 28% de TiO₂ na interface com o metal, por reação com os oxigênios da HA. O único *outlier* foi o recobrimento com 4% de rGO sinterizado à 800 °C, que apresentou 50% de TiO₂. O rGO não foi detectado na análise de fases, visto que seu teor é muito baixo e seu padrão de DRX é uma banda amorfa entre 20 e 30°, com intensidade muito inferior às fases cristalinas, não sendo possível se diferenciar do *background* dos espectros.

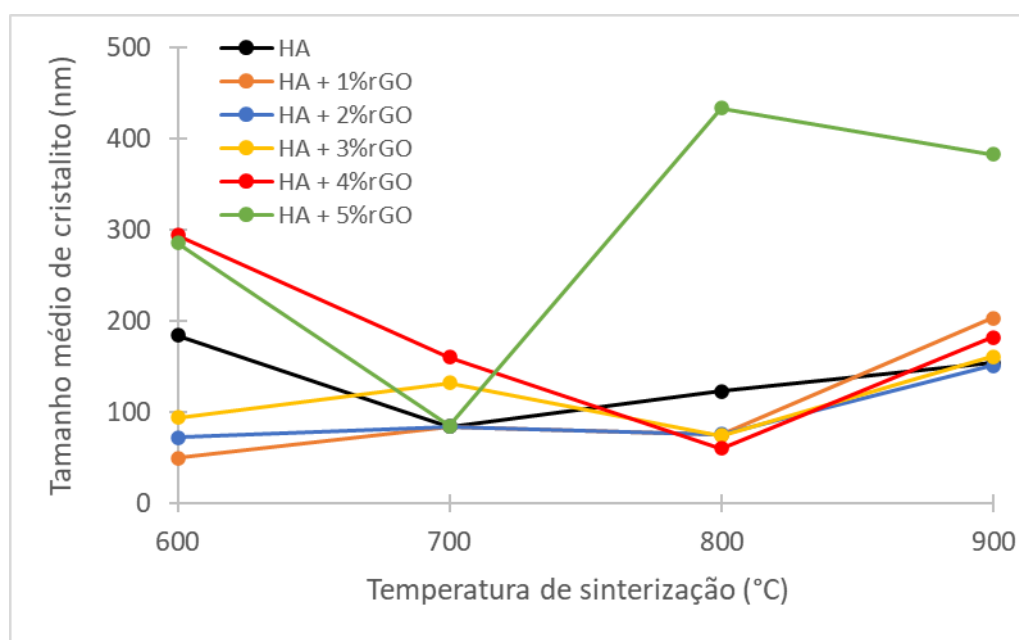
Tabela 5 – Quantitativo de fases dos filmes HA-rGO.

Teor de rGO (%p)	Temperatura de sinterização (°C)	Fases (%)		
		HA	Ti	TiO ₂
0	600	91	9	-
	700	97	-	3
	800	85	-	15
	900	80	-	20
1	600	92	6	3
	700	88	8	4
	800	89	-	11
	900	81	-	19
2	600	100	-	-
	700	94	-	6
	800	90	-	10
	900	76	-	23
3	600	100	-	-
	700	100	-	-
	800	72	-	28
	900	100	-	-
4	600	92	-	8
	700	100	-	-
	800	83	-	17
	900	100	-	-
5	600	87	13	-
	700	85	12	3
	800	50	-	50
	900	86	-	14

Fonte: resultados originais da pesquisa.

O teor de grafeno e a temperatura de sinterização não apresentaram correlação forte com o tamanho de cristalito (Fig. 36), que variou de 50 a 430 nm.

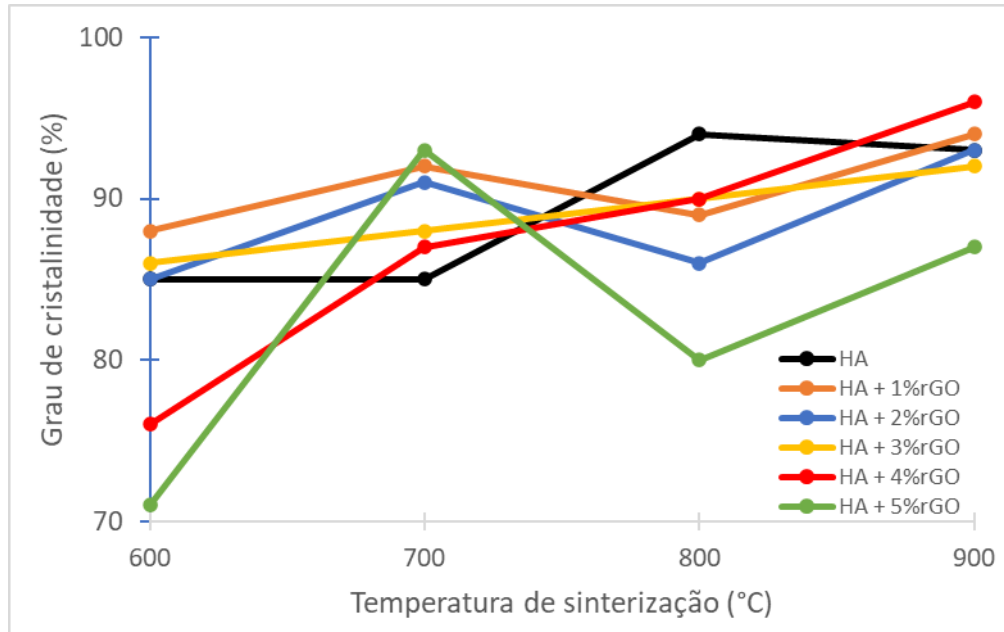
Figura 36 – Tamanho médio de cristalito em função do teor de rGO e temperatura de sinterização.



Fonte: resultados originais da pesquisa.

Em geral, o grau de cristalinidade dos recobrimentos (Fig. 37) cresceu com a temperatura de sinterização, variando de 72% (600°C) a até 96% (900°C). Como revestimentos de alta cristalinidade são melhores em evitar a liberação de íons metálicos a longo prazo⁹⁰ e produzem taxas mais altas de proliferação celular⁹¹, os filmes sinterizados a 900 °C foram os escolhidos para a realização dos testes biológicos, mecânicos e eletroquímicos.

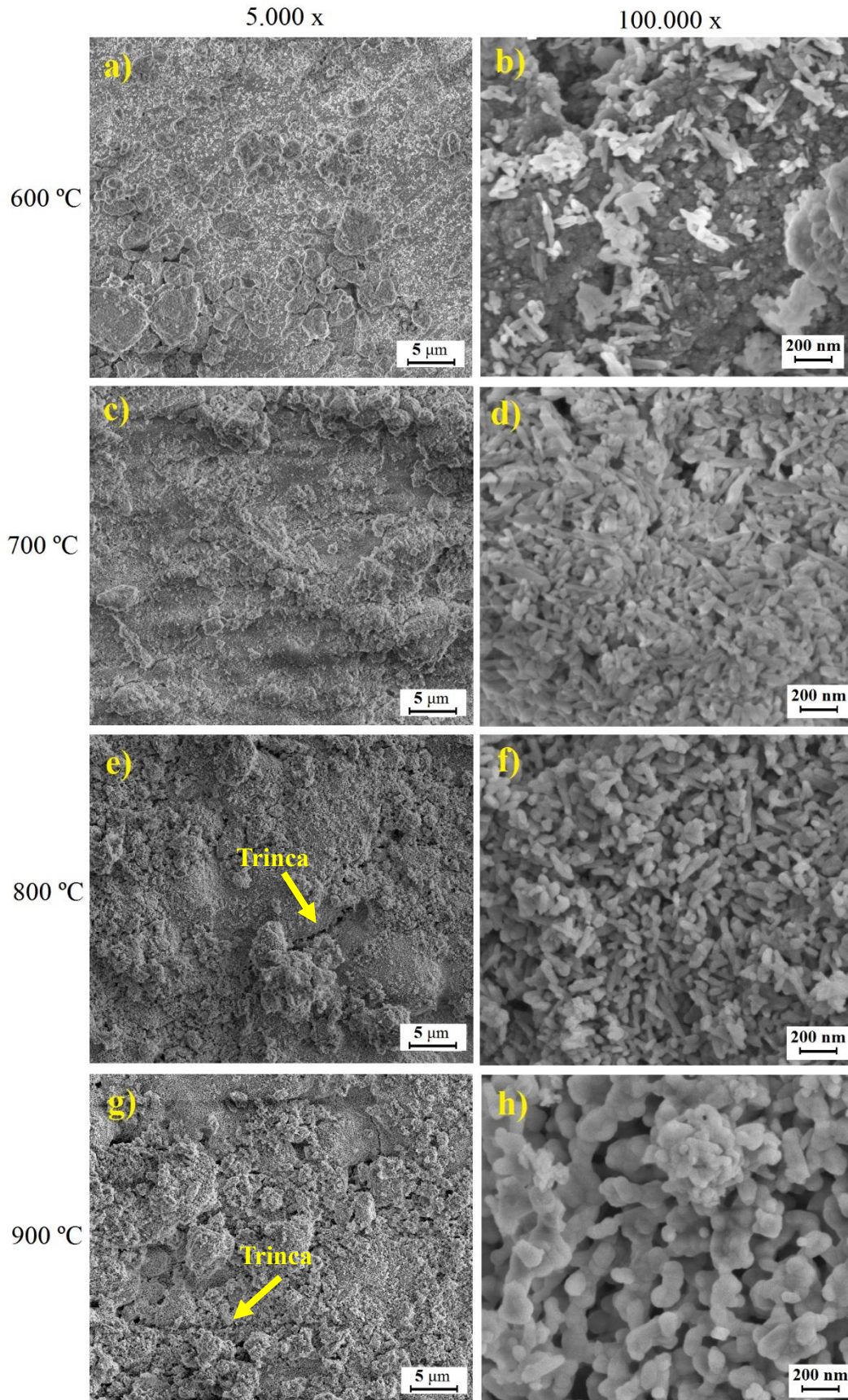
Figura 37 – Grau de cristalinidade em função do teor de rGO e temperatura de sinterização.



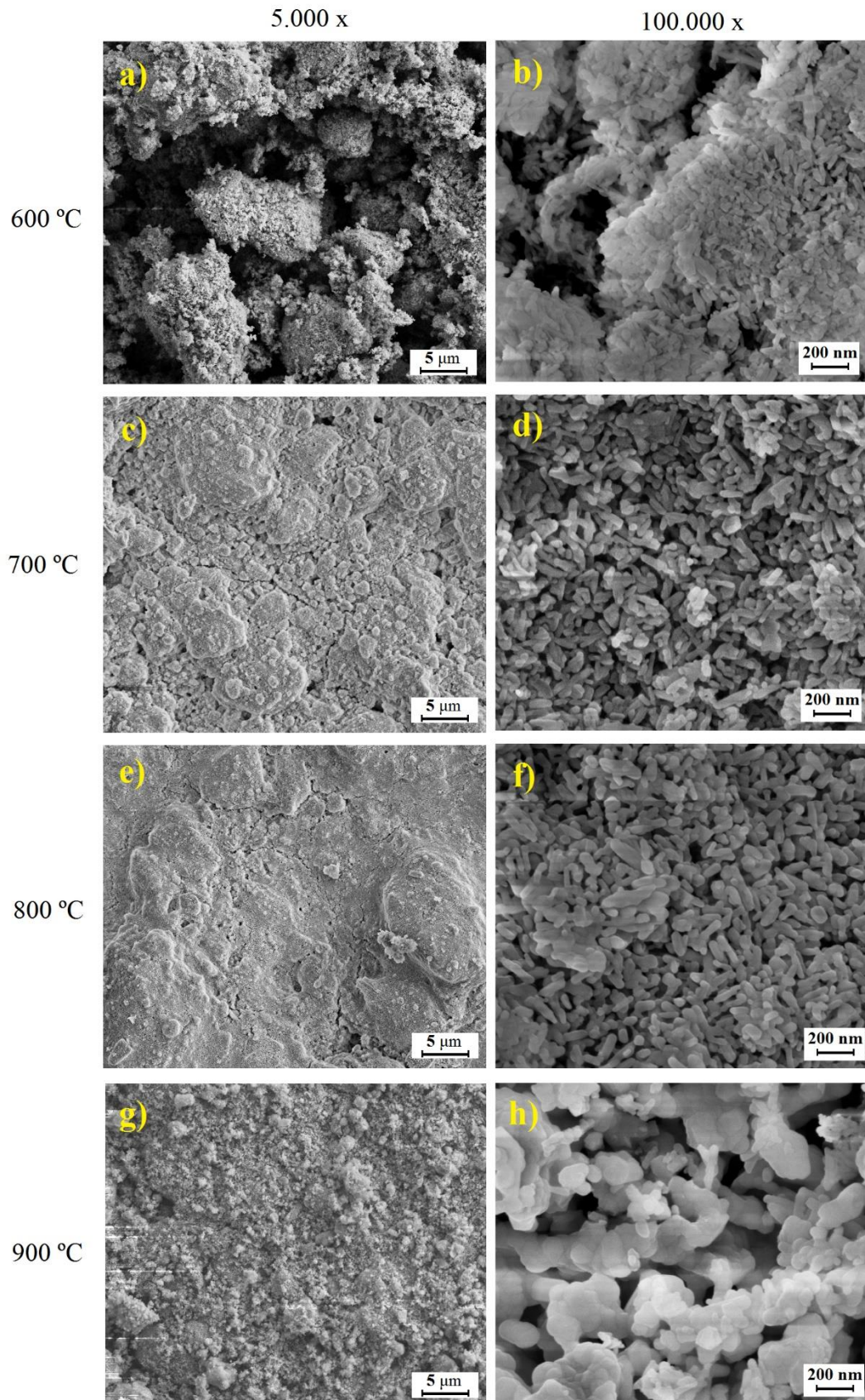
Fonte: resultados originais da pesquisa.

5.3.2 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

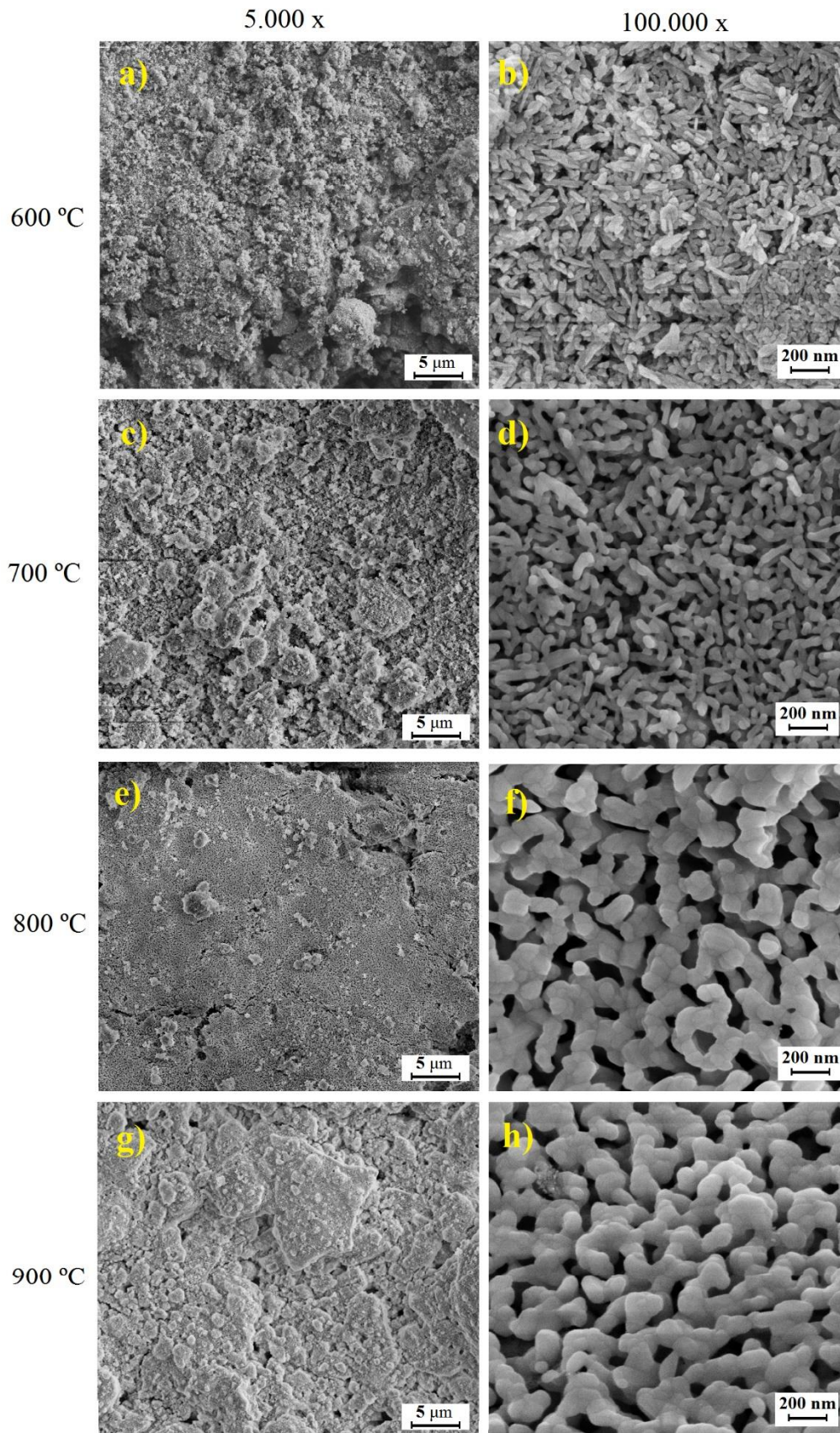
As micrografias dos filmes, para todas as composições e temperaturas de sinterização, são apresentadas nas Figuras de 38 a 43. Foram obtidas imagens com ampliações nominais de 5.000 e 100.000 vezes.

Figura 38 – Micrografias dos filmes de HA pura.

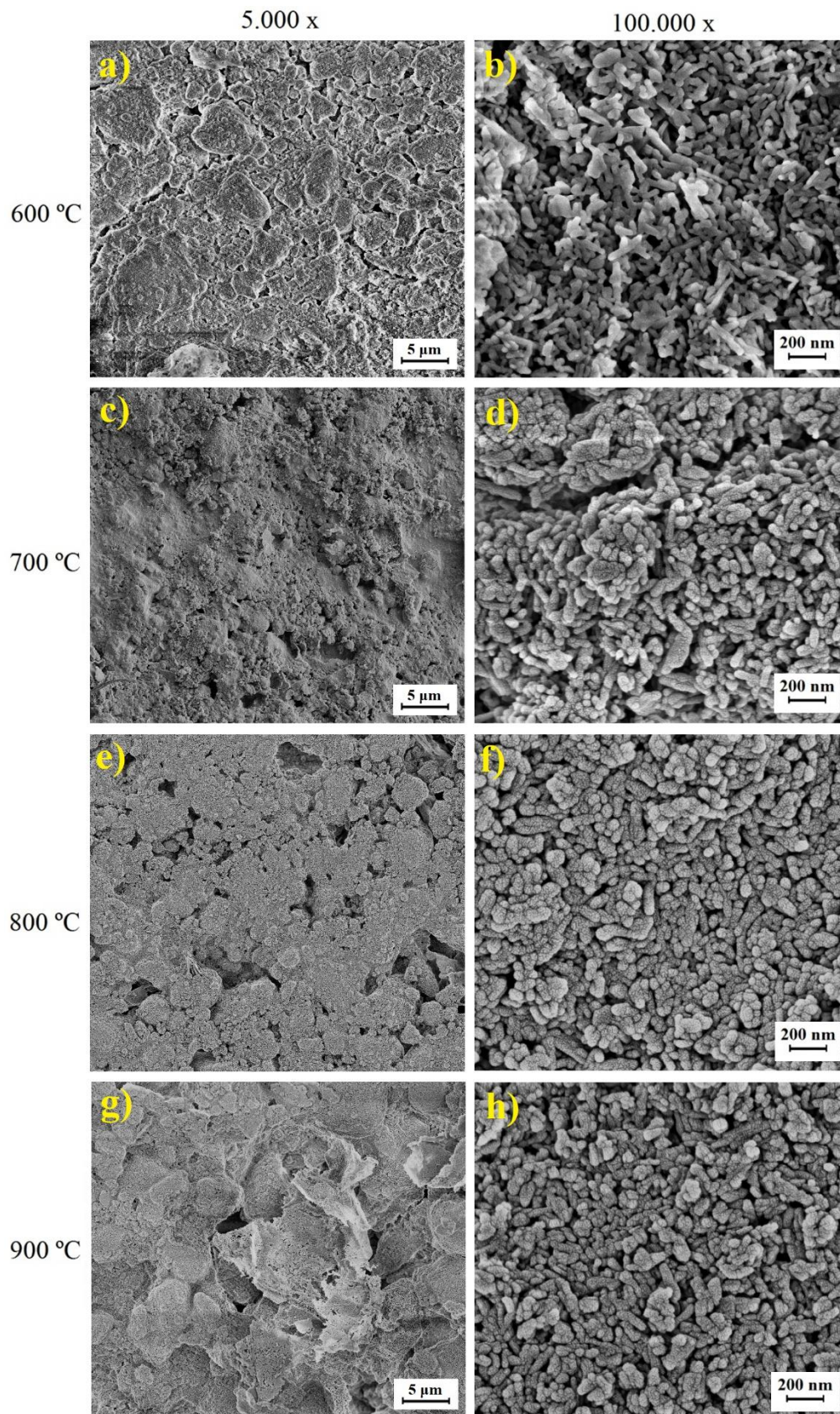
Fonte: resultados originais da pesquisa

Figura 39 – Micrografias dos filmes HA + 1% rGO.

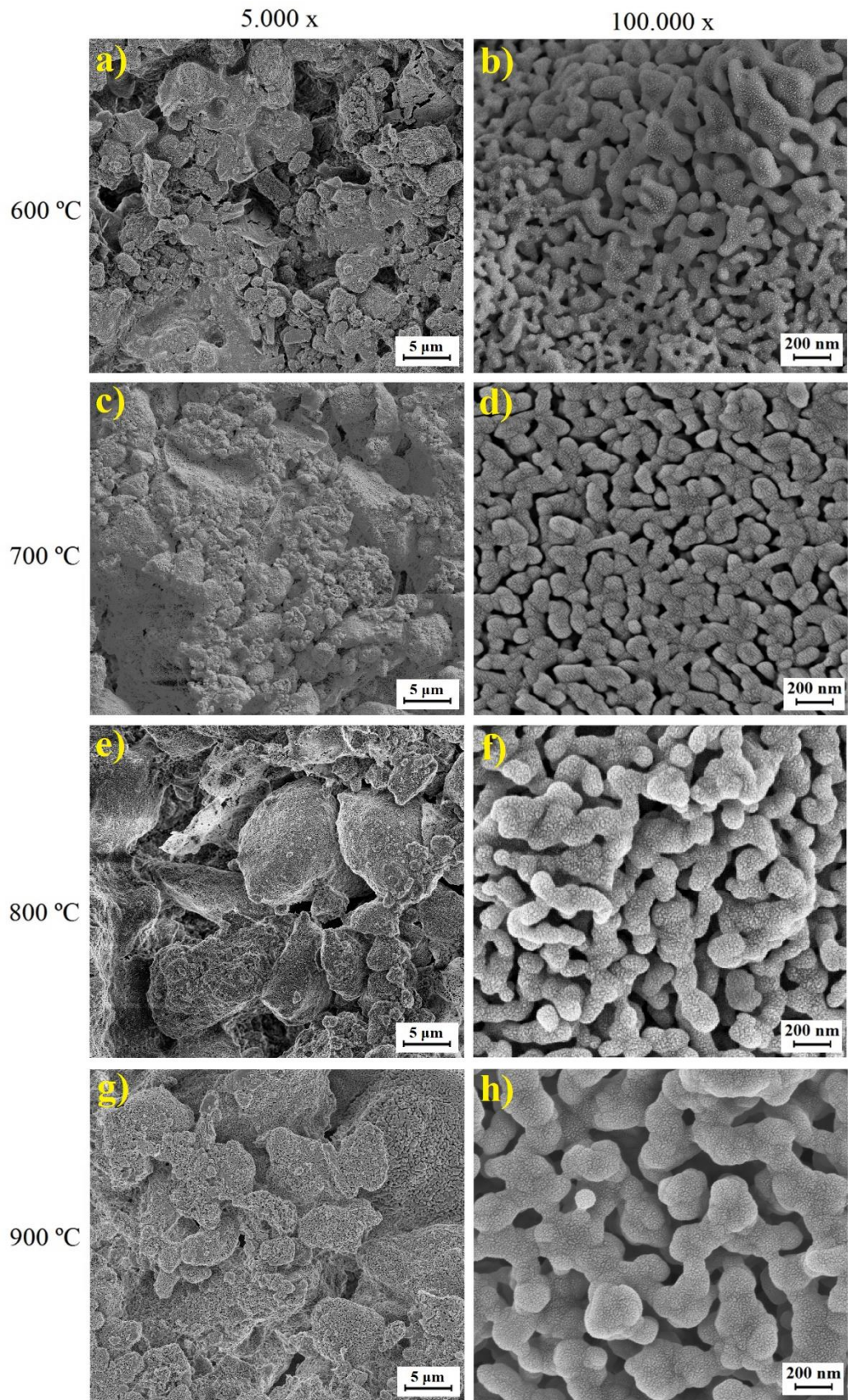
Fonte: resultados originais da pesquisa

Figura 40 – Micrografias dos filmes HA + 2% rGO.

Fonte: resultados originais da pesquisa

Figura 42 – Micrografias dos filmes HA + 4% rGO.

Fonte: resultados originais da pesquisa.

Figura 43 – Micrografias dos filmes HA + 5% rGO.

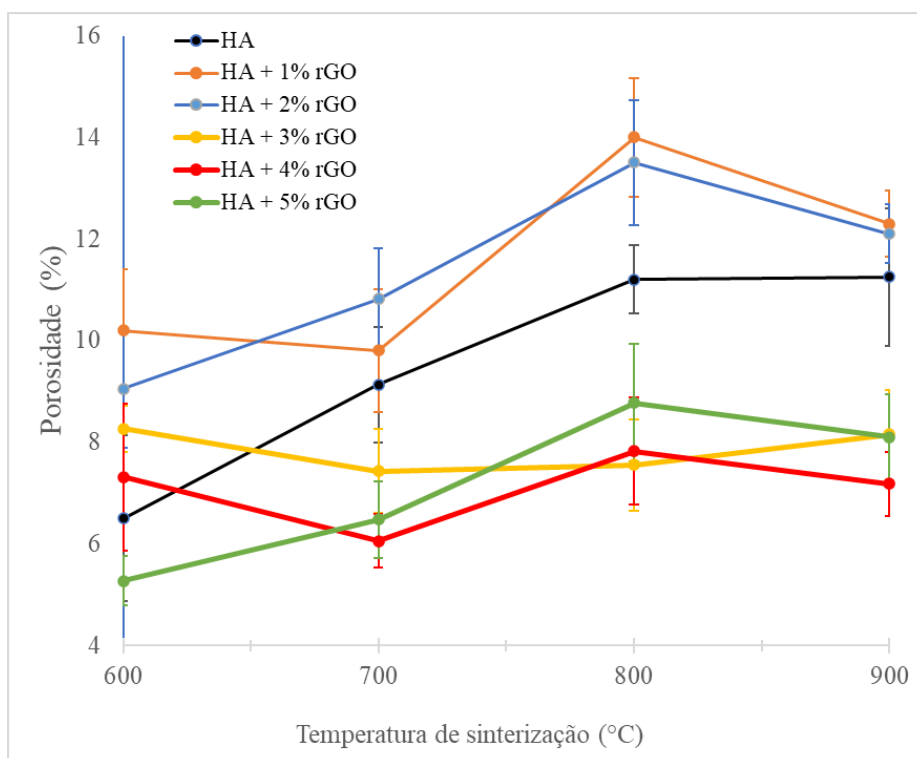
Fonte: resultados originais da pesquisa.

As folhas de rGO não puderam ser distinguidas nas imagens de MEV por estarem cobertas pelos cristais de HA¹⁵⁵. A adição de grafeno provocou uma ligeira diminuição no tamanho das partículas e a formação de um revestimento mais compacto. Em contrapartida, o tamanho das partículas aumentou substancialmente com a temperatura de sinterização.

A quantidade de trincas visíveis é inferior para os filmes com rGO. Esse resultado é condizente com o obtido por Li et al. (2014)¹²³ para recobrimentos HA-GO depositados por EPD e é devido ao aumento da força coesiva entre as nanopartículas e a ramificação e deflexão de trincas pela fase de reforço¹¹⁶⁻¹¹⁸.

Para as temperaturas de 800 e 900 °C, é possível observar nitidamente a coalescência entre os grãos, típica do processo de sinterização, que não foi completo para nenhuma amostra, fazendo com que os filmes sejam porosos (Fig. 44), característica fundamental para a adesão, crescimento e diferenciação de células osteoblásticas⁷⁵.

Figura 44 – Porosidade dos recobrimentos em função do teor de rGO e temperatura de sinterização.



Fonte: resultados originais da pesquisa.

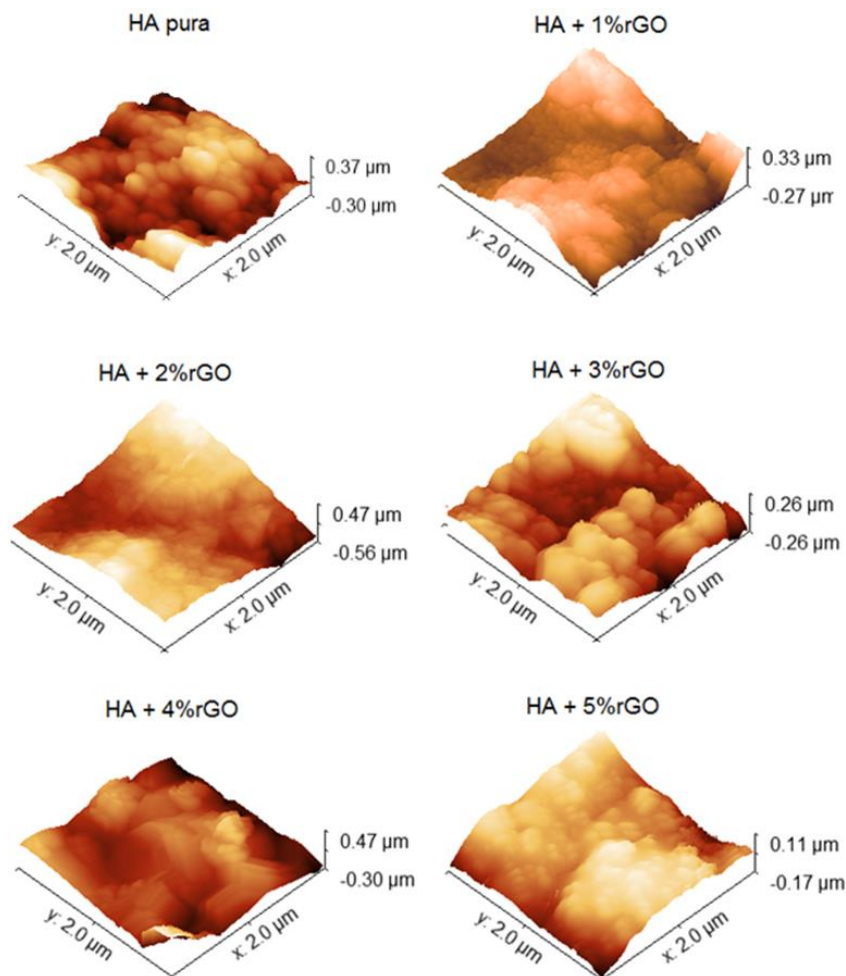
Como mostra a Figura 44, a porosidade dos revestimentos foi, em geral, crescente com

a temperatura de patamar. Isto pode ser explicado pelo mecanismo de sinterização de materiais cerâmicos, que ocorre por dois processos: 1) difusão atômica, que leva à densificação do corpo pelo transporte de matéria de dentro dos grãos para os poros, ou 2) formação de microestrutura grosseira, pelo rearranjo da matéria nas superfícies dos poros, sem realmente levar a uma diminuição da porosidade. Estes processos são competitivos entre si. Pelas micrografias e quantificação da rugosidade, é evidente que os processos difusionais não são dominantes para os filmes HA-rGO nas temperaturas estudadas e o material mantém a alta porosidade mesmo sinterizado à 900 °C¹⁵⁸.

5.3.3 Microscopia de Força Atômica (AFM)

A Figura 45 mostra a topografia superficial dos filmes sinterizados a 900 °C. É possível observar a morfologia esférica dos grãos para todas as composições.

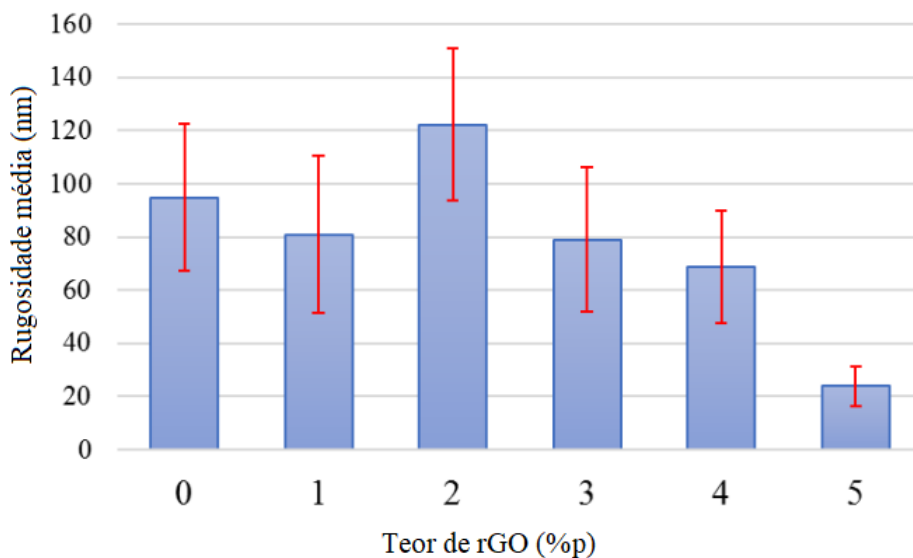
Figura 45 – Imagens topográficas dos filmes HA-rGO.



Fonte: resultados originais da pesquisa.

As imagens de AFM permitiram a quantificação da rugosidade média (R_a) das superfícies (Fig. 46), que são relativamente lisas, com R_a na casa dos nanômetros. Para os teores de 4 e 5% de rGO, os grãos apresentam um melhor empacotamento, devido ao aumento da força coesiva entre as nanopartículas de HA e rGO¹²³, fazendo com que a rugosidade seja substancialmente menor.

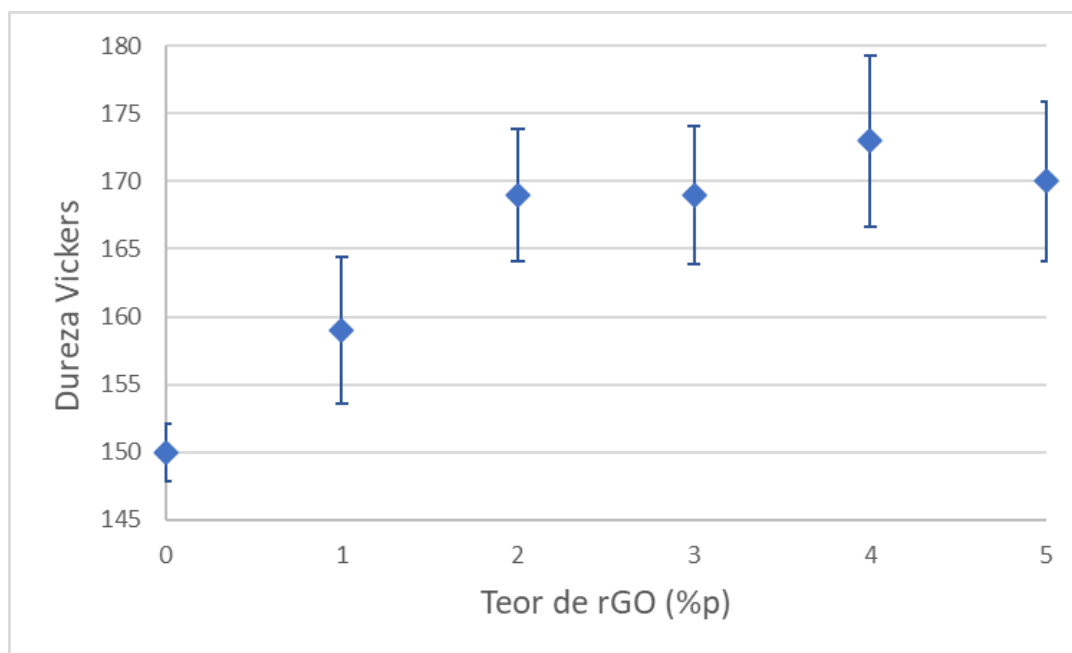
Figura 46 – Rugosidade média dos filmes HA-rGO.



Fonte: resultados originais da pesquisa.

5.3.4 Dureza

Os resultados dos ensaios de dureza (Fig. 47) mostram que o rGO apresentou grande efeito de reforço compósito na HA, dificultando sua deformação plástica. A dureza na escala Vickers aumentou de 150 HV para até 173 HV com adição de 4% de rGO, um aumento muito significativo de 15%. Isto mostra que a adição de rGO pode contribuir com uma melhor resistência ao desgaste entre o implante e os ossos, diminuindo a perda de material de revestimento e a consequente liberação de íons metálicos no tecido vivo.

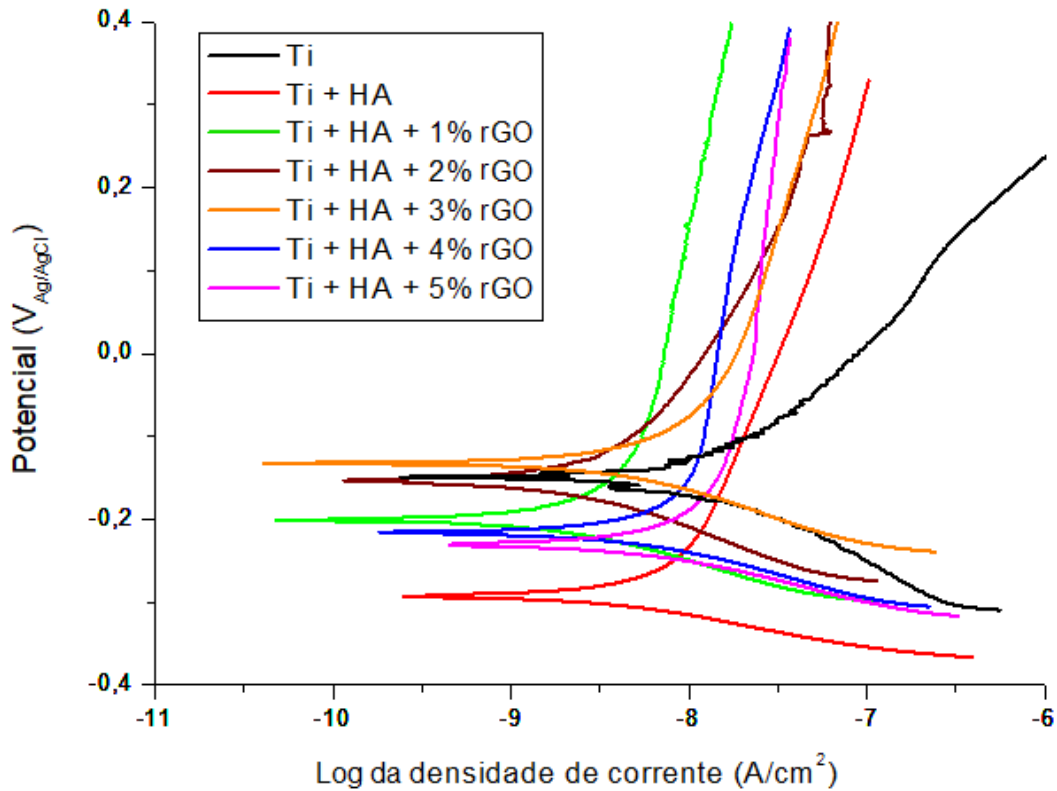
Figura 47 – Dureza Vickers dos revestimentos sinterizados a 900 °C.

Fonte: resultados originais da pesquisa.

5.3.5 Corrosão

Os testes de polarização potenciodinâmica foram realizados após estabilização na solução por 1 h, para garantir que o potencial de circuito aberto fosse estático. O único revestimento que deslocou o potencial para a direção nobre (Fig. 48 e Tab. 6) foi aquele com 3% de rGO (-0,132 V). Os revestimentos HA-rGO são altamente porosos, facilitando a difusão da solução SBF no revestimento e tornando o substrato de Ti vulnerável à corrosão. Entretanto, todas as amostras revestidas apresentaram corrente de corrosão pelo menos uma ordem de grandeza menor do que a do Ti. Especificamente, o filme com 2% de rGO apresentou I_{corr} 30 vezes menor que o Ti puro. Isto significa que a velocidade do processo corrosivo é muito mais lenta no metal revestido, sugerindo que os filmes agem como uma barreira isolante entre o substrato e o eletrólito^{146,159}. Esta grande diminuição em I_{corr} também foi relatada por Li et al. (2013)¹²³ para filmes HA-GO depositados por EPD, onde os recobrimentos com adição de 5% de GO apresentaram I_{corr} por volta de 120 vezes menor do que o Ti desprotegido.

Figura 48 – Curvas de polarização anódica das amostras com e sem revestimento.



Fonte: resultados originais da pesquisa.

Tabela 6 – Potencial (E_{corr}) e corrente de corrosão (I_{corr}) do titânio com e sem revestimento.

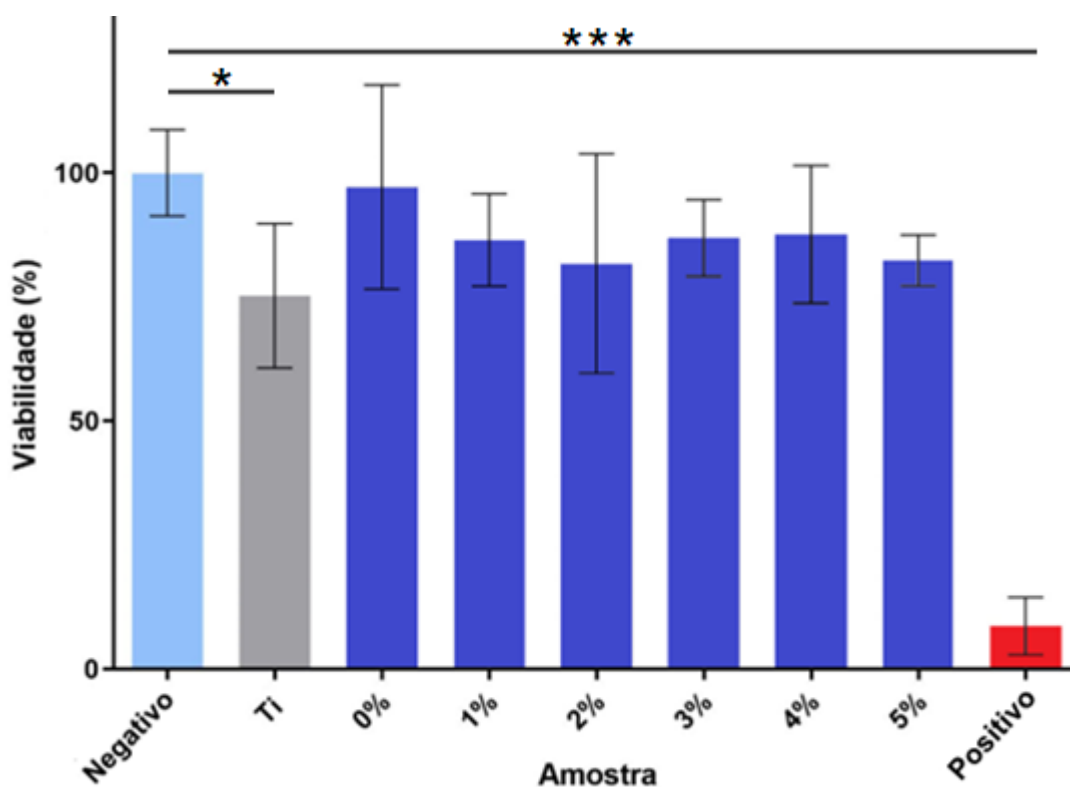
Material	E_{corr} (V)	I_{corr} (A/cm^2)
Ti	-0,149	$1,7 \times 10^{-8}$
Ti + HA	-0,293	$8,5 \times 10^{-9}$
Ti + HA + 1% rGO	-0,201	$7,1 \times 10^{-10}$
Ti + HA + 2% rGO	-0,153	$5,6 \times 10^{-10}$
Ti + HA + 3% rGO	-0,132	$8,4 \times 10^{-9}$
Ti + HA + 4% rGO	-0,215	$1,1 \times 10^{-9}$
Ti + HA + 5% rGO	-0,231	$1,3 \times 10^{-9}$

Fonte: resultados originais da pesquisa.

5.3.6 Viabilidade celular

O resultado do ensaio MTT é apresentado na Figura 49. Inicialmente, o Ti tem viabilidade em torno de 75%, mas um grande aumento é observado após o recobrimento com HA pura, chegando próxima de 95%. Uma aparente queda ocorre com a adição de rGO, porém esta se encontra dentro do intervalo estatístico medido para a HA. Portanto, não é possível afirmar que o rGO diminua a viabilidade celular dos revestimentos, embora o mesmo efeito tenha sido observado por Li et al. (2013)¹²³ após a adição de GO não-reduzido em filmes de HA.

Figura 49 - Viabilidade celular de Balb/3T3 clone A31 nos filmes HA-rGO.



Legenda: * $p < 0,01$; *** $p < 0,0001$.

Fonte: resultados originais da pesquisa.

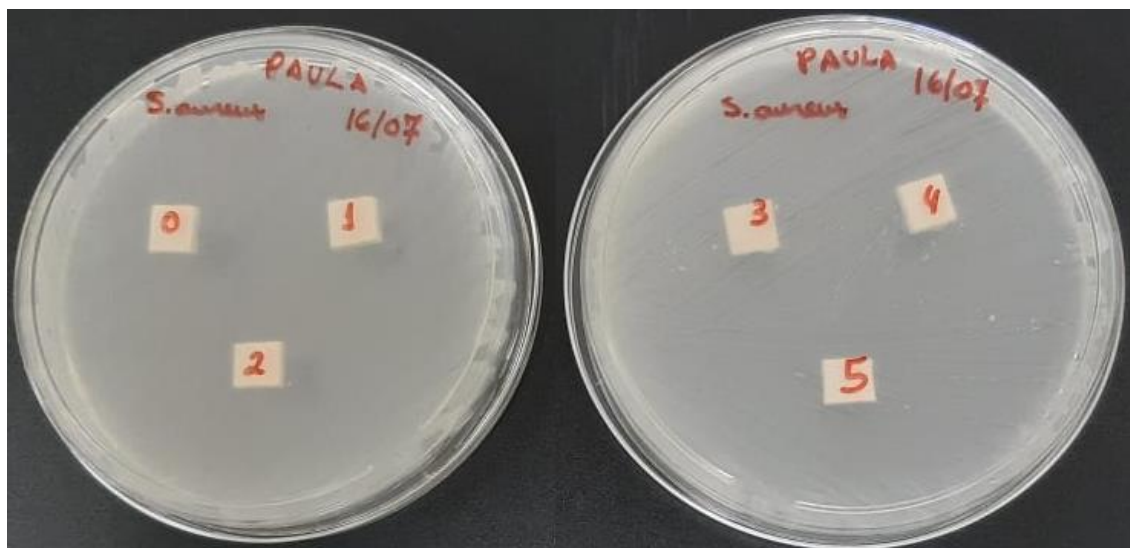
Como controle positivo, foi observado que o látex leva a uma elevada morte celular, tendo somente 10% de células vivas ao final do período de incubação, o que está de acordo com outros ensaios realizados no Grupo de Química Medicinal e Biológica (NequiMed-IQSC-USP)¹⁶⁰.

5.3.7 Atividade antimicrobiana

5.3.7.1 Teste de disco-difusão em ágar

A Figura 50 mostra o resultado do ensaio de atividade antimicrobiana por difusão em ágar contra *S. aureus*. Não se observa halo de inibição, evidenciando que os recobrimentos não exibem liberação do rGO como agente antimicrobiano no meio circundante¹⁶¹. Entretanto, ao retirar as amostras, foi visto que houve a inibição de crescimento bacteriano no local onde estavam alojadas, mostrando que as superfícies possuem atividade antimicrobiana por contato, que pode ser quantificado pelo teste de adesão¹⁶¹.

Figura 50 – Ensaio Kirby-Bauer de disco-difusão em ágar contra *S. Aureus*.



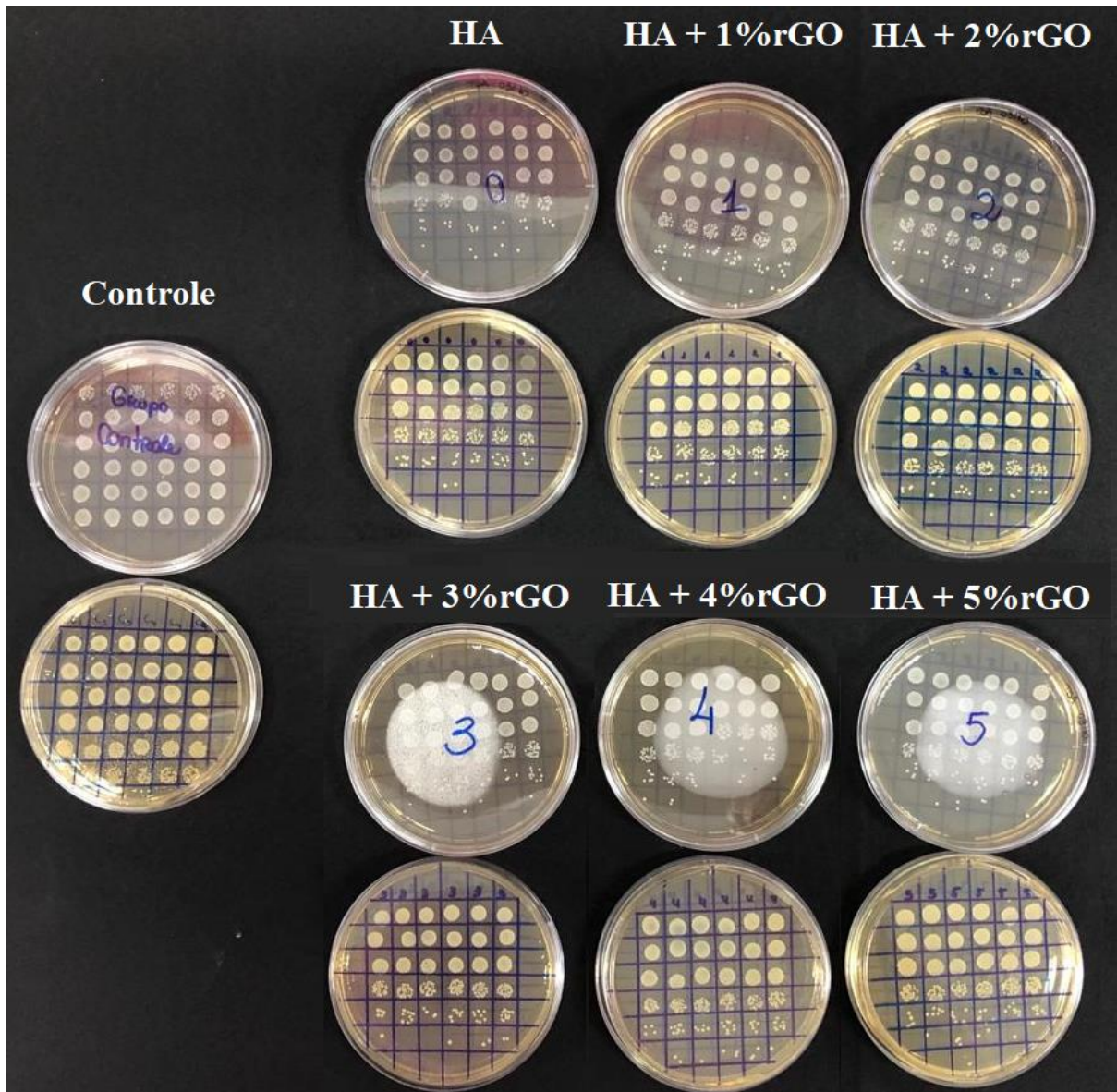
Nota: os números das amostras correspondem ao teor de rGO nos filmes (de 0 a 5%).

Fonte: resultados originais da pesquisa.

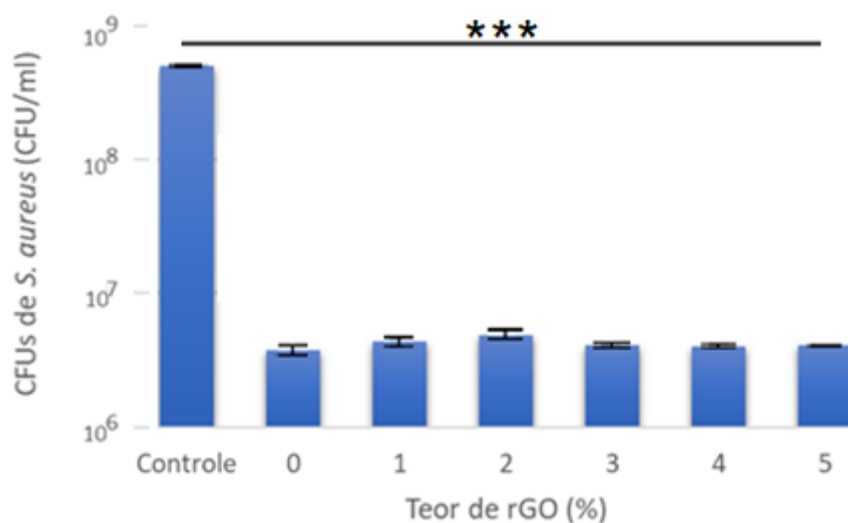
5.3.7.2 Teste de adesão bacteriana

A Figura 51 mostra o resultado do teste de adesão de *S. aureus*. Todas as superfícies apresentaram baixa adesão de *S. aureus*. Ao quantificar os resultados (Fig. 52), nota-se que a diferença na quantidade de bactérias aderidas nas superfícies é quase três ordens de grandeza menor que no controle, mostrando que os recobrimentos podem prevenir a formação de biofilme no material e consequentemente prevenir infecções no local implantado. Entretanto, não há diferença significativa entre os recobrimentos com e sem rGO.

Figura 51 – Resultados do teste de adesão de *S. Aureus*.



Fonte: resultados originais da pesquisa.

Figura 52 – Bactérias aderidas às superfícies dos filmes HA-rGO.

Legenda: *** $p < 0,0001$.

Fonte: resultados originais da pesquisa.

Em comparação com outros estudos, Jankovic et al. (2015)¹⁶² não observaram atividade antibacteriana contra *S. aureus* e *E. coli* em filmes de HA com nanoflocos de grafeno depositados por EPD. Os autores acreditam que isto se deve à baixa quantidade de grafeno no material (1 %p). Em contrapartida, Shi et al. (2016)¹⁶³ observaram que a adesão de *S. aureus* foi muito menor após a adição de 1,7 %p de GO em filmes de HA e quitosana. Surendran et al. (2017)¹⁶⁴ também detectaram efeito bactericida em compósitos HA-GO, observando halos de inibição em ágar de até 12 mm de diâmetro contra *Enterococcus faecalis* e de até 8 mm contra *Pseudomonas aeruginosa*. Essa discrepância de resultados pode ser devida a diversos fatores que afetam a bioatividade do grafeno, tais como: técnicas de preparação, tamanho, distribuição na fase matriz, tipos de grupos oxigenados presentes, teor de oxigênio e processo de deposição¹¹⁴.

6. CONCLUSÃO

A caracterização dos pós da HA comercial foi fundamental para confirmar sua pureza e conhecer as características do material empregado no estudo. Os pós são mesoporosos, com diâmetro médio de 110 nm e não possuem fases secundárias ou produtos de decomposição térmica da HA.

As análises do GO e rGO por DRX, MEV, XPS e Raman mostraram que a oxidação do grafite e posterior redução química foram muito eficientes, resultando em um material de elevada razão C/O e alta pureza.

As caracterizações dos filmes em quatro temperaturas de sinterização permitiram determinar que 900 °C é a temperatura que apresenta as melhores propriedades estruturais para esse tipo de revestimento, com alta cristalinidade.

Os filmes HA-rGO apresentaram morfologia porosa, em grãos esféricos, coalescentes entre si e com sinterização incompleta. O nível de porosidade é adequado para a adesão de células osteoblásticas e crescimento de tecido ósseo. A presença de rGO provocou um aumento da força coesiva entre as partículas, aumentando a dureza em até 15% e diminuindo a rugosidade superficial.

O recobrimento do titânio não afetou consideravelmente seu potencial de corrosão em SBF a 37°C, porém a corrente foi até 30 vezes menor. Isso significa que os filmes diminuem muito a velocidade do processo corrosivo, aumentando a vida útil do implante e protegendo o tecido vivo da liberação de íons metálicos por mais tempo.

Os testes MTT asseguraram a biocompatibilidade dos materiais. O revestimento de HA pura aumentou a viabilidade celular de 75% para 95% em relação ao titânio. Há uma tendência em ligeira diminuição da biocompatibilidade com a adição de rGO, porém ainda é bem superior ao titânio sem recobrimento.

Os filmes não liberaram rGO como agente antibacteriano em meio aquoso, porém suas superfícies apresentaram forte atividade antibacteriana por contato contra *S. aureus*, atestando o potencial desses recobrimentos em impedir a formação de biofilme e prevenir infecções no local implantado.

7. PERSPECTIVAS FUTURAS

Confirmada a biocompatibilidade e atividade antibacteriana dos filmes HA-rGO, novos estudos podem ser feitos para atestar ainda mais sua qualidade e potencial de emprego em implantes, como testar sua viabilidade celular a osteoblastos humanos e atividade antibacteriana a outros micro-organismos causadores de infecções em biomateriais implantados, como *Escherichia coli* e *Candida albicans*. Medir sua habilidade de mineralização e formação de apatita por imersão em SBF é um método útil para prever o efeito osteogênico *in vivo*. A avaliação do reconhecimento e adesão celular também é um estudo biológico interessante, que pode ajudar a elucidar o comportamento pós-implantação do material. Ensaio mecânicos de desgaste abrasivo podem avaliar se o rGO é efetivo em melhorar as propriedades tribológicas da HA.

Outros metais de interesse biomédico também podem ser revestidos e avaliados, como Ti-6Al-4V, ligas Co-Cr e as novas ligas multicomponentes de alta entropia, assim como outros processos de deposição, como *dip coating*, sol-gel, aspersão térmica e *sputtering*. Diferentes pré-tratamentos superficiais do substrato podem ser empregados para buscar uma melhor adesão dos filmes, como tratamentos com ácidos, álcalis e anodizações.

A adição de uma terceira fase aos filmes HA-rGO pode melhorar suas propriedades antibacterianas. Podem ser testadas adições de nanopartículas metálicas (Cu, Ag, Au), cerâmicas (ZnO, CuO, SiO₂), micelas poliméricas e outros nanomateriais de carbono, como o próprio GO não-reduzido.

Finalmente, implantações *in vivo* podem dar a resposta definitiva sobre a qualidade desses revestimentos e viabilizar seu licenciamento junto aos órgãos competentes para uma eventual introdução no mercado.

REFERÊNCIAS

1. Costerton, W. *et al.* The application of biofilm science to the study and control of chronic bacterial infections. *Journal of Clinical Investigation* **112**, 1466–1477 (2003).
2. Hernández-Richter, T. *et al.* Rifampin and triclosan but not silver is effective in preventing bacterial infection of vascular dacron graft material. *European Journal of Vascular and Endovascular Surgery* **26**, 550–557 (2003).
3. Laser, A. *et al.* Graft infection after endovascular abdominal aortic aneurysm repair. *J Vasc Surg* **54**, 58–63 (2011).
4. Engelsman, A. F., van der Mei, H. C., Ploeg, R. J. & Busscher, H. J. The phenomenon of infection with abdominal wall reconstruction. *Biomaterials* **28**, 2314–2327 (2007).
5. Geurts, J. A. P., Janssen, D. M. C., Kessels, A. G. H. & Walenkamp, G. H. I. M. Good results in postoperative and hematogenous deep infections of 89 stable total hip and knee replacements with retention of prosthesis and local antibiotics. *Acta Orthop* **84**, 509–516 (2013).
6. Zimmerli, W. & Sendi, P. Pathogenesis of implant-associated infection: The role of the host. *Semin Immunopathol* **33**, 295–306 (2011).
7. Engelsman, A. F. *et al.* The risk of biomaterial-associated infection after revision surgery due to an experimental primary implant infection. *Biofouling* **26**, 761–767 (2010).
8. Bruggink, J. L. M. *et al.* Accuracy of FDG-PETeCT in the diagnostic work-up of vascular prosthetic graft infection. *European Journal of Vascular and Endovascular Surgery* **40**, 348–354 (2010).
9. Busscher, H. J. *et al.* Biomaterial-Associated Infection: Locating the Finish Line in the Race for the Surface. *Sci Transl Med* **4**, (2012).
10. Hanawa, T. Titanium–Tissue Interface Reaction and Its Control With Surface Treatment. *Front Bioeng Biotechnol* **7**, (2019).
11. Thomsen, P., Larsson, C. & Ericson, L. E. Structure of the interface between rabbit cortical bone and implants of gold, zirconium and titanium. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine* **8**, 653–665 (1997).
12. Lucchini, J. P., Aurelle, J. L., Therin, M., Donath, K. & Becker, W. A pilot study comparing screw-shaped implants. Surface analysis and histologic evaluation of bone healing. *Clin Oral Implants Res* **7**, 397–404 (1996).
13. Buser, D. *et al.* Interface shear strength of titanium implants with a sandblasted and acid-etched surface: A biomechanical study in the maxilla of miniature pigs. *J Biomed Mater Res* **45**, 75–83 (1999).
14. Nanci, A. *et al.* Chemical modification of titanium surfaces for covalent attachment of biological molecules. *J Biomed Mater Res* **40**, 324–335 (1998).

15. Kim, H.-M., Miyaji, F., Kokubo, T. & Nakamura, T. Preparation of bioactive Ti and its alloys via simple chemical surface treatment. *J Biomed Mater Res* **32**, 409–417 (1996).
16. Yang, B., Uchida, M., Kim, H. M., Zhang, X. & Kokubo, T. Preparation of bioactive titanium metal via anodic oxidation treatment. *Biomaterials* **25**, 1003–1010 (2004).
17. Xiao, S.-J., Kenausis, G. & Textor, M. Biochemical Modification of Titanium Surfaces. In: *Titanium in Medicine*, 417–455 (Springer, Berlin, Heidelberg, 2001).
18. Kweh, S. W. K., Khor, K. A. & Cheang, P. An in vitro investigation of plasma sprayed hydroxyapatite (HA) coatings produced with flame-spheroidized feedstock. *Biomaterials* **23**, 775–785 (2002).
19. Weng, W. & Baptista, J. L. Preparation and Characterization of Hydroxyapatite Coatings on Ti6Al4V Alloy by a Sol-Gel Method. *Journal of the American Ceramic Society* **82**, 27–32 (1999).
20. Baek, S. H., Mihec, D. F. & Metson, J. B. The Deposition of Diamond Films by Combustion Assisted CVD on Ti and Ti-6Al-4V. *Chemical Vapor Deposition* **8**, 29–34 (2002).
21. Leclair, P., Berera, G. P. & Moodera, J. S. Titanium nitride thin films obtained by a modified physical vapor deposition process. *Thin Solid Films* **376**, 9–15 (2000).
22. Wang, H. *et al.* Early bone apposition in vivo on plasma-sprayed and electrochemically deposited hydroxyapatite coatings on titanium alloy. *Biomaterials* **27**, 4192–4203 (2006).
23. Valappil, S. P. *et al.* Antimicrobial gallium-doped phosphate-based glasses. *Adv Funct Mater* **18**, 732–741 (2008).
24. Best, M. G. *et al.* Antimicrobial Properties of Gallium(III)- And Iron(III)-Loaded Polysaccharides Affecting the Growth of Escherichia coli, Staphylococcus aureus, and Pseudomonas aeruginosa, in Vitro. *ACS Appl Bio Mater* **3**, 7589–7597 (2020).
25. Kurtjak, M., Vukomanović, M. & Suvorov, D. Antibacterial nanocomposite of functionalized nanogold and gallium-doped hydroxyapatite. *Mater Lett* **193**, 126–129 (2017).
26. Ratner, B. D., Hoffman, A. S., Schoen, F. J. & Lemons, J. E. *Biomaterials Science. Biomaterials Science: An Introduction to Materials in Medicine*. 3 ed. (Elsevier, 2013).
27. Hallab, N. J. & Jacobs, J. J. Orthopedic Applications. *Biomater Sci* 1079–1118 (2020).
28. Planell, J. A. & Pawelec, K. M. *Bone repair biomaterials: regeneration and clinical applications*. 2 ed. (Woodhead Publishing, 2019).
29. Banerjee, D. & Williams, J. C. Perspectives on Titanium Science and Technology. *Acta Mater* **61**, 844–879 (2013).
30. Smith, W. F. & Hashemi, J. Foundations of materials science and engineering, Chapter 3: Crystal Structures and Crystal Geometry. 67–115 (2009).

31. Carnicer-Lombarte, A., Chen, S. T., Malliaras, G. G. & Barone, D. G. Foreign Body Reaction to Implanted Biomaterials and Its Impact in Nerve Neuroprosthetics. *Front Bioeng Biotechnol* **9**, 271 (2021).
32. Rupp, F., Liang, L., Geis-Gerstorfer, J., Scheideler, L. & Hüttig, F. Surface characteristics of dental implants: A review. *Dental Materials* **34**, 40–57 (2018).
33. Shah, F. A., Thomsen, P. & Palmquist, A. A Review of the Impact of Implant Biomaterials on Osteocytes. *J Dent Res* **97**, 977–986 (2018).
34. Shah, F. A., Thomsen, P. & Palmquist, A. Osseointegration and current interpretations of the bone-implant interface. *Acta Biomater* **84**, 1–15 (2019).
35. Brunette, D., Tengvall, P., Textor, M. & Thomsen, P. *Titanium in medicine: material science, surface science, engineering, biological responses and medical applications*. (Springer Berlin, Heidelberg, 2001).
36. Camargo, W. A. *et al.* Effect of surface alkali-based treatment of titanium implants on ability to promote in vitro mineralization and in vivo bone formation. *Acta Biomater* **57**, 511–523 (2017).
37. Revell, P. A., Damien, E., Zhang, X. S., Evans, P. & Howlett, C. R. The Effect of Magnesium Ions on Bone Bonding to Hydroxyapatite Coating on Titanium Alloy Implants. *Key Eng Mater* **254–256**, 447–450 (2003).
38. Mroz, W. *et al.* In vivo implantation of porous titanium alloy implants coated with magnesium-doped octacalcium phosphate and hydroxyapatite thin films using pulsed laser deposition. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* **103**, 151–158 (2015).
39. Park, J. W., Kim, Y. J., Jang, J. H. & Song, H. Osteoblast response to magnesium ion-incorporated nanoporous titanium oxide surfaces. *Clin Oral Implants Res* **21**, 1278–1287 (2010).
40. Schrooten, J. & Helsen, J. A. Adhesion of bioactive glass coating to Ti6Al4V oral implant. *Biomaterials* **21**, 1461–1469 (2000).
41. Kim, H.-W., Koh, Y.-H., Li, L.-H., Lee, S. & Kim, H.-E. Hydroxyapatite coating on titanium substrate with titania buffer layer processed by sol–gel method. *Biomaterials* **25**, 2533–2538 (2004).
42. Hench, L. L. Bioceramics. *Journal of the American Ceramic Society* **81**, 1705–1728 (1998).
43. Verret, D. J., Ducic, Y., Oxford, L. & Smith, J. Hydroxyapatite cement in craniofacial reconstruction. *Otolaryngol Head Neck Surg* **133**, 897–899 (2005).
44. Zakharov, N. A. *et al.* Calcium Hydroxyapatite for Medical Applications. *Inorganic Materials* **2004 40:6** **40**, 641–648 (2004).
45. Pai, S., M Kini, S., Selvaraj, R. & Pugazhendhi, A. A review on the synthesis of hydroxyapatite, its composites and adsorptive removal of pollutants from wastewater. *Journal of Water Process Engineering* **38**, 101574 (2020).

46. Zubieta-Otero, L. F., Londoño-Restrepo, S. M., Lopez-Chavez, G., Hernandez-Becerra, E. & Rodriguez-Garcia, M. E. Comparative study of physicochemical properties of bio-hydroxyapatite with commercial samples. *Mater Chem Phys* **259**, 124201 (2021).
47. Mondal, S. & Pal, U. 3D hydroxyapatite scaffold for bone regeneration and local drug delivery applications. *J Drug Deliv Sci Technol* **53**, 101131 (2019).
48. Velázquez-Herrera, F. D., González-Rodal, D., Fetter, G. & Pérez-Mayoral, E. Towards highly efficient hydroxycalcite/hydroxyapatite composites as novel catalysts involved in eco-synthesis of chromene derivatives. *Appl Clay Sci* **198**, 105833 (2020).
49. Beh, C. Y. *et al.* Morphological and optical properties of porous hydroxyapatite/cornstarch (HAp/Cs) composites. *Journal of Materials Research and Technology* **9**, 14267–14282 (2020).
50. Oulguidoum, A. *et al.* Mesoporous nanocrystalline sulfonated hydroxyapatites enhance heavy metal removal and antimicrobial activity. *Sep Purif Technol* **255**, 117777 (2021).
51. Narwade, V. N. *et al.* Nanostructured hydroxyapatite biomaterial as gas sensor. In: *Nanoscale Processing*, 439–466 (Elsevier, 2021).
52. Corrêa Barreto Siqueira, L. Formulação e caracterização de biomateriais compósitos com hidroxiapatita. Dissertação (Mestrado). Universidade Estadual do Norte Fluminense (2009).
53. Rujitanapanich, S., Kumpapan, P. & Wanjanoi, P. Synthesis of Hydroxyapatite from Oyster Shell via Precipitation. *Energy Procedia* **56**, 112–117 (2014).
54. Raucci, M. G. *et al.* Comparative facile methods for preparing graphene oxide-hydroxyapatite for bone tissue engineering. *J Tissue Eng Regen Med* **11**, 2204–2216 (2017).
55. Farrokhi-Rad, M., Shahrabi, T., Mahmoodi, S. & Khanmohammadi, S. Electrophoretic deposition of hydroxyapatite-chitosan-CNTs nanocomposite coatings. *Ceram Int* **43**, 4663–4669 (2017).
56. Yao, C. *et al.* Graphene oxide and creatine phosphate disodium dual template-directed synthesis of GO/hydroxyapatite and its application in drug delivery. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl* **73**, 709–715 (2017).
57. Mostafa, N. Y. Characterization, thermal stability and sintering of hydroxyapatite powders prepared by different routes. *Mater Chem Phys* **94**, 333–341 (2005).
58. Muralithran, G. & Ramesh, S. The Effects of sintering temperature on the properties of hydroxyapatite. *Ceram Int* **26**, 221–230 (2000).
59. Nilen, R. W. N. & Richter, P. W. The thermal stability of hydroxyapatite in biphasic calcium phosphate ceramics. *J Mater Sci Mater Med* **19**, 1693–1702 (2008).
60. Pattanayak, D. K., Dash, R., Prasad, R. C., Rao, B. T. & Rama Mohan, T. R. Synthesis and sintered properties evaluation of calcium phosphate ceramics. *Materials Science and Engineering: C* **27**, 684–690 (2007).

61. Heimann, R. Materials Science of Crystalline Bioceramics: A Review of Basic Properties and Applications. *Chiang Mai University Journal of Natural Sciences* **1**, 23–46 (2002).
62. Ramesh, S., Tan, C. Y., Bhaduri, S. B., Teng, W. D. & Sopyan, I. Densification behaviour of nanocrystalline hydroxyapatite bioceramics. *J Mater Process Technol* **206**, 221–230 (2008).
63. Lahiri, D., Singh, V., Keshri, A. K., Seal, S. & Agarwal, A. Carbon nanotube toughened hydroxyapatite by spark plasma sintering: Microstructural evolution and multiscale tribological properties. *Carbon N Y* **48**, 3103–3120 (2010).
64. Bronzino, J. D. *The biomedical engineering handbook*. 2 ed. (CRC Press, 2000).
65. Khon, D. H. *Standard Handbook of Biomedical Engineering & Design*. Library (McGraw-Hill Education, 2003).
66. Dorozhkin, S. v. Bioceramics of calcium orthophosphates. *Biomaterials* **31**, 1465–1485 (2010).
67. White, A. A., Best, S. M. & Kinloch, I. A. Hydroxyapatite–Carbon Nanotube Composites for Biomedical Applications: A Review. *Int J Appl Ceram Technol* **4**, 1–13 (2007).
68. Dorozhkin, S. v. Bioceramics of calcium orthophosphates. *Biomaterials* **31**, 1465–1485 (2010).
69. Weiner, S. & Wagner, H. D. THE MATERIAL BONE: Structure-Mechanical Function Relations. <https://doi.org/10.1146/annurev.matsci.28.1.271> **28**, 271–298 (2003).
70. Hench, L. L. & Thompson, I. Twenty-first century challenges for biomaterials. *J R Soc Interface* **7**, (2010).
71. LeGeros, R. Z. Calcium phosphate-based osteoinductive materials. *Chem Rev* **108**, 4742–4753 (2008).
72. Kokubo, T., Kushitani, H., Sakka, S., Kitsugi, T. & Yamamuro, T. Solutions able to reproduce in vivo surface-structure changes in bioactive glass-ceramic A-W3. *J Biomed Mater Res* **24**, 721–734 (1990).
73. Kim, H. M., Miyazaki, T., Kokubo, T. & Nakamura, T. Revised Simulated Body Fluid. *Key Eng Mater* **192–195**, 47–50 (2001).
74. Chetty, A. *et al.* Hydroxyapatite-coated polyurethane for auricular cartilage replacement: an in vitro study. *J Biomed Mater Res A* **84**, 475–482 (2008).
75. Ohgushi, H., Dohi, Y., Tamai, S. & Tabata, S. Osteogenic differentiation of marrow stromal stem cells in porous hydroxyapatite ceramics. *J Biomed Mater Res* **27**, 1401–1407 (1993).
76. Groeneveld, E. H. J. *et al.* Histomorphometrical analysis of bone formed in human maxillary sinus floor elevations grafted with OP-1 device, demineralized bone matrix or autogenous bone: Comparison with non-grafted sites in a series of case reports. *Clin Oral*

Implants Res **10**, 499–509 (1999).

77. Ripamonti, U., Richter, P. W., Nilen, R. W. N. & Renton, L. The induction of bone formation by smart biphasic hydroxyapatite tricalcium phosphate biomimetic matrices in the non-human primate *Papio ursinus*. *J Cell Mol Med* **12**, 2609–2621 (2008).
78. Yuan, H. *et al.* A preliminary study on osteoinduction of two kinds of calcium phosphate ceramics. *Biomaterials* **20**, 1799–1806 (1999).
79. Habibovic, P. *et al.* Osteoconduction and osteoinduction of low-temperature 3D printed bioceramic implants. *Biomaterials* **29**, 944–953 (2008).
80. Sodek, J. *et al.* Non-Collagenous Bone Proteins and Their Role in Substrate-Induced Bioactivity. in *Bone-Bio Material Interface* 97–110 (University of Toronto Press, 1991).
81. Okumura, M. *et al.* Osteoblastic phenotype expression on the surface of hydroxyapatite ceramics. *J Biomed Mater Res* **37**, 122–129 (1997).
82. Xie, J., Baumann, M. J. & McCabe, L. R. Osteoblasts respond to hydroxyapatite surfaces with immediate changes in gene expression. *J Biomed Mater Res A* **71**, 108–117 (2004).
83. Ripamonti, U. Osteoinduction in porous hydroxyapatite implanted in heterotopic sites of different animal models. *Biomaterials* **17**, 31–35 (1996).
84. Meah, F., Basit, A., Emanuele, N. & Emanuele, M. A. Hypophosphatasia: Review of Bone Mineral Metabolism, Pathophysiology, Clinical Presentation, Diagnosis, and Treatment. *Clin Rev Bone Miner Metab* **15**, 24–36 (2017).
85. Epure, L. M., Dimitrievska, S., Merhi, Y. & Yahia, L. The effect of varying Al₂O₃ percentage in hydroxyapatite/Al₂O₃ composite materials: morphological, chemical and cytotoxic evaluation. *J Biomed Mater Res A* **83**, 1009–1023 (2007).
86. Lobo, A. O. *et al.* Fast preparation of hydroxyapatite/superhydrophilic vertically aligned multiwalled carbon nanotube composites for bioactive application. *Langmuir* **26**, 18308–18314 (2010).
87. Gross, K. A., Gross, V. & Berndt, C. C. Thermal Analysis of Amorphous Phases in Hydroxyapatite Coatings. *Journal of the American Ceramic Society* **81**, 106–112 (1998).
88. Shi, D., Jiang, G. & Bauer, J. The effect of structural characteristics on the in vitro bioactivity of hydroxyapatite. *J Biomed Mater Res* **63**, 71–78 (2002).
89. Kumazawa, R. *et al.* Effects of Ti ions and particles on neutrophil function and morphology. *Biomaterials* **23**, 3757–3764 (2002).
90. Koike, M. & Fujii, H. The corrosion resistance of pure titanium in organic acids. *Biomaterials* **22**, 2931–2936 (2001).
91. Chou, L., Marek, B. & Wagner, W. R. Effects of hydroxylapatite coating crystallinity on biosolubility, cell attachment efficiency and proliferation in vitro. *Biomaterials* **20**, 977–985 (1999).

92. Pinto, A. M., Pereira, A. T. & Gonçalves, I. C. Carbon Biomaterials. In: *Biomaterials Science*. 4 ed, 327–360 (Elsevier, 2020).
93. Adetayo, A. & Runsewe, D. Synthesis and Fabrication of Graphene and Graphene Oxide: A Review. *Open Journal of Composite Materials* **9**, 207–229 (2004).
94. Zhu, Y. *et al.* Graphene and Graphene Oxide: Synthesis, Properties, and Applications. *Advanced Materials* **22**, 3906–3924 (2010).
95. Bolotin, K. I. *et al.* Ultrahigh electron mobility in suspended graphene. *Solid State Commun* **146**, 351–355 (2008).
96. Morozov, S. v. *et al.* Giant intrinsic carrier mobilities in graphene and its bilayer. *Phys Rev Lett* **100**, 016602 (2008).
97. Lee, C., Wei, X., Kysar, J. W. & Hone, J. Measurement of the elastic properties and intrinsic strength of monolayer graphene. *Science (1979)* **321**, 385–388 (2008).
98. Balandin, A. A. *et al.* Superior thermal conductivity of single-layer graphene. *Nano Lett* **8**, 902–907 (2008).
99. Moser, J., Barreiro, A. & Bachtold, A. Current-induced cleaning of graphene. *Appl Phys Lett* **91**, 163513 (2007).
100. Hummers, W. S. & Offeman, R. E. Preparation of Graphitic Oxide. *J Am Chem Soc* **80**, 1339–1339 (1958).
101. Szabó, T. *et al.* Evolution of Surface Functional Groups in a Series of Progressively Oxidized Graphite Oxides. *Chem. Mater.* **18**, 2740–2749 (2006).
102. Dreyer, D. R., Todd, A. D. & Bielawski, C. W. Harnessing the chemistry of graphene oxide. *Chem Soc Rev* **43**, 5288–5301 (2014).
103. W. Scholz & H. P. Boehm. Structure of Graphite Oxide. *Z Anorg Allg Chem* **369**, 327–340 (1969).
104. Nakajima, T. & Matsuo, Y. Formation process and structure of graphite oxide. *Carbon N Y* **32**, 469–475 (1994).
105. Lorf, A., He, H., Forster, M. & Klinowski, J. Structure of Graphite Oxide Revisited. *J Phys Chem B* **102**, 4477–4482 (1998).
106. Szabó, T., Berkesi, O. & Dékány, I. DRIFT study of deuterium-exchanged graphite oxide. *Carbon N Y* **43**, 3186–3189 (2005).
107. Jeong, H.-K. *et al.* Evidence of Graphitic AB Stacking Order of Graphite Oxides. *J Am Chem Soc* **130**, 1362–1366 (2008).
108. Schniepp, H. C. *et al.* Functionalized Single Graphene Sheets Derived from Splitting Graphite Oxide. *J Phys Chem B* **110**, 8535–8539 (2006).
109. Gao, W., Alemany, L. B., Ci, L. & Ajayan, P. M. New insights into the structure and

- reduction of graphite oxide. *Nat Chem* **1**, 403–408 (2009).
110. Robertson, J. & O'Reilly, E. P. Electronic and atomic structure of amorphous carbon. *Phys Rev B* **35**, 2946–2957 (1987).
 111. Stankovich, S. *et al.* Synthesis of graphene-based nanosheets via chemical reduction of exfoliated graphite oxide. *Carbon N Y* **45**, 1558–1565 (2007).
 112. Beamson, G. & Briggs, D. High Resolution XPS of Organic Polymers: The Scienta ESCA300 Database. *J Chem Educ* **70**, A25 (1993).
 113. Akhavan, O. & Ghaderi, E. Toxicity of graphene and graphene oxide nanowalls against bacteria. *ACS Nano* **4**, 5731–5736 (2010).
 114. Li, M. *et al.* An overview of graphene-based hydroxyapatite composites for orthopedic applications. *Bioact Mater* **3**, 1–18 (2018).
 115. Li, M. *et al.* In situ synthesis and biocompatibility of nano hydroxyapatite on pristine and chitosan functionalized graphene oxide. *J. Mater. Chem. B* **1**, 475–484 (2013).
 116. Baradaran, S. *et al.* Mechanical properties and biomedical applications of a nanotube hydroxyapatite-reduced graphene oxide composite. *Carbon N Y* **69**, 32–45 (2014).
 117. Zhang, L. *et al.* A tough graphene nanosheet/hydroxyapatite composite with improved in vitro biocompatibility. *Carbon N Y* **61**, 105–115 (2013).
 118. Zhao, Y. *et al.* Microstructure and anisotropic mechanical properties of graphene nanoplatelet toughened biphasic calcium phosphate composite. *Ceram Int* **39**, 7627–7634 (2013).
 119. Liu, Y., Huang, J. & Li, H. Synthesis of hydroxyapatite–reduced graphite oxide nanocomposites for biomedical applications: oriented nucleation and epitaxial growth of hydroxyapatite. *J Mater Chem B* **1**, 1826 (2013).
 120. Boccaccini, A. R., Keim, S., Ma, R., Li, Y. & Zhitomirsky, I. Electrophoretic deposition of biomaterials. *J R Soc Interface* **7**, (2010).
 121. Chavez-Valdez, A., Shaffer, M. S. P. & Boccaccini, A. R. Applications of graphene electrophoretic deposition. A review. *Journal of Physical Chemistry B* **117**, 1502–1515 (2013).
 122. Cote, L. J. *et al.* Graphene oxide as surfactant sheets. *Pure and Applied Chemistry* **83**, 95–110 (2011).
 123. Li, M. *et al.* Graphene oxide/hydroxyapatite composite coatings fabricated by electrophoretic nanotechnology for biological applications. *Carbon N Y* **67**, 185–197 (2014).
 124. Li, M. *et al.* Electrophoretic deposition and electrochemical behavior of novel graphene oxide-hyaluronic acid-hydroxyapatite nanocomposite coatings. *Appl Surf Sci* **284**, 804–810 (2013).

125. Zhao, H. *et al.* The structural and biological properties of hydroxyapatite-modified titanate nanowire scaffolds. *Biomaterials* **32**, 5837–5846 (2011).
126. Fu, C. *et al.* Electrochemical growth of composite hydroxyapatite coatings for controlled release. *Surf Coat Technol* **276**, 618–625 (2015).
127. Zeng, Y. *et al.* Graphene oxide/hydroxyapatite composite coatings fabricated by electrochemical deposition. *Surf Coat Technol* **286**, 72–79 (2016).
128. Berndt, C. C., Hasan, F., Tietz, U. & Schmitz, K.-P. A Review of Hydroxyapatite Coatings Manufactured by Thermal Spray. in 267–329 (2014).
129. Liu, Y., Dang, Z., Wang, Y., Huang, J. & Li, H. Hydroxyapatite/graphene-nanosheet composite coatings deposited by vacuum cold spraying for biomedical applications: Inherited nanostructures and enhanced properties. *Carbon N Y* **67**, 250–259 (2014).
130. Peng, F. *et al.* Enhanced corrosion resistance and biocompatibility of magnesium alloy by hydroxyapatite/graphene oxide bilayer coating. *Mater Lett* **264**, 127322 (2020).
131. Alizadeh, T. & Soltani, L. H. Reduced graphene oxide-based gas sensor array for pattern recognition of DMMP vapor. *Sens Actuators B Chem* **234**, 361–370 (2016).
132. Amokrane, G., Falentin-Daudré, C., Ramtani, S. & Migonney, V. A Simple Method to Functionalize PCL Surface by Grafting Bioactive Polymers Using UV Irradiation. *IRBM* **39**, 268–278 (2018).
133. Klug, H. P. & Alexander, L. E. *X-Ray Diffraction Procedures: For Polycrystalline and Amorphous Materials*. 2 ed. (Wiley, 1974).
134. Scherrer, P. Bestimmung der Größe und der inneren Struktur von Kolloidteilchen mittels Röntgenstrahlen. *Math. Phys.* **2**, 98–100 (1918).
135. Longo, A. *et al.* Graphene oxide prepared by graphene nanoplatelets and reduced by laser treatment. *Nanotechnology* **28**, 224002 (2017).
136. Bhaumik, A. & Narayan, J. Conversion of p to n-type reduced graphene oxide by laser annealing at room temperature and pressure. *J Appl Phys* **121**, 125303 (2017).
137. Webb, P. A. *Analytical Methods in Fine Particle Technology*. (Micromeritics Instrument, 1997).
138. Brunauer, S., Emmett, P. H. & Teller, E. Adsorption of Gases in Multimolecular Layers. *J Am Chem Soc* **60**, 309–319 (1938).
139. Astuti, N. H., Wibowo, N. A. & Ayub, M. R. S. S. N. The Porosity Calculation of Various Types of Paper Using Image Analysis. *Jurnal Pendidikan Fisika Indonesia* **14**, 46–51 (2018).
140. Smith, S. W. *The Scientist and Engineer's Guide to Digital Signal Processing*. (California Technical Pub, 1997).
141. Wright, R. N. *Wire Technology: Process Engineering and Metallurgy*. 2 ed. (Elsevier,

- 2016).
142. David da Silva, D. *Avaliação morfológica, microestrutural e eletroquímica da liga Ti-6Al-4V soldada por fricção linear*. Dissertação (Mestrado). Universidade Federal de São Carlos (2018).
 143. Kokubo, T. & Takadama, H. How useful is SBF in predicting in vivo bone bioactivity? *Biomaterials* **27**, 2907–2915 (2006).
 144. ASTM International. *ASTM G59-97 Standard Test Method for Conducting Potentiodynamic Polarization Resistance Measurements*. (1998).
 145. ASM International. *Corrosion: Fundamentals, Testing, and Protection*. vol. 13 (2003).
 146. Perez, N. *Electrochemistry and corrosion science*. 2 ed. (Kluwer Academic Publishers, 2004).
 147. Vistica, D. T. *et al.* Tetrazolium-based Assays for Cellular Viability: A Critical Examination of Selected Parameters Affecting Formazan Production. *Cancer Res* **51**, 2515–2520 (1991).
 148. Silva, D. S. *et al.* N-(2-hydroxy)-propyl-3-trimethylammonium, O-palmitoyl chitosan: Synthesis, physicochemical and biological properties. *Int J Biol Macromol* **178**, 558–568 (2021).
 149. Mosmann, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods* **65**, 55–63 (1983).
 150. Hudzicki, J. *Kirby-Bauer Disk Diffusion Susceptibility Test Protocol*. (American Society for Microbiology, 2009).
 151. Sharma, R. *Kirby Bauer Disc Diffusion Method For Antibiotic Susceptibility Testing*. <https://microbenotes.com/kirby-bauer-disc-diffusion/> (Acesso em: 13-12-2022).
 152. Levin, I. NIST Inorganic Crystal Structure Database (ICSD). *National Institute of Standards and Technology* (2018).
 153. Klobes, P., Meyer, K. & Munro, R. G. *Porosity and Specific Surface Area Measurements for Solid Materials*. (2006).
 154. Bhaumik, A. & Narayan, J. Conversion of p to n-type reduced graphene oxide by laser annealing at room temperature and pressure. *J Appl Phys* **121**, 125303 (2017).
 155. Shin, H. J. *et al.* Efficient reduction of graphite oxide by sodium borohydride and its effect on electrical conductance. *Adv Funct Mater* **19**, 1987–1992 (2009).
 156. Komorizono, A. A. *Síntese e caracterização de óxido de grafeno reduzido (rGO) e nanocompósito de rGO/ZnO para aplicação em sensores de gás ozônio*. Dissertação (Mestrado). Universidade de São Paulo (2021).
 157. Gao, W., Alemany, L. B., Ci, L. & Ajayan, P. M. New insights into the structure and reduction of graphite oxide. *Nat Chem* **1**, 403–408 (2009).

158. Rahaman, M. N. *Ceramic processing and sintering*. 1 ed. (Marcel Dekker Inc, 2006).
159. Li, M. *et al.* Graphene oxide/hydroxyapatite composite coatings fabricated by electrophoretic nanotechnology for biological applications. *Carbon N Y* **67**, 185–197 (2014).
160. Barbosa, H. F. G., Attjioui, M., Leitão, A., Moerschbacher, B. M. & Cavalheiro, É. T. G. Characterization, solubility and biological activity of amphiphilic biopolymeric Schiff bases synthesized using chitosans. *Carbohydr Polym* **220**, 1–11 (2019).
161. Martí, M., Frígols, B. & Serrano-Aroca, A. Antimicrobial Characterization of Advanced Materials for Bioengineering Applications. *Journal of Visualized Experiments* **138**, e57710 (2018).
162. Janković, A. *et al.* Bioactive hydroxyapatite/graphene composite coating and its corrosion stability in simulated body fluid. *J Alloys Compd* **624**, 148–157 (2015).
163. Shi, Y. Y. *et al.* Electrophoretic deposition of graphene oxide reinforced chitosan–hydroxyapatite nanocomposite coatings on Ti substrate. *J Mater Sci Mater Med* **27**, 1–13 (2016).
164. Surendran, D. *et al.* Synthesis and Characterization of Hydroxyapatite / Graphene Oxide for Biomedical Applications. *International Research Journal of Engineering and Technology* (IRJET) **4**, 298–301 (2017).

APÊNDICE A – TRABALHOS DECORRENTES

A seguir são listados os trabalhos decorrentes desta dissertação já publicados. Todos foram apresentados em congressos nacionais ou internacionais e publicados nos anais dos eventos nas formas de resumo simples ou expandido.

Resumos simples

1. Lara, N.; Komorizono, A. A.; Silva, D. D.; Tremiliosi Filho, G.; Bernardi, M. I. B. Corrosion behavior of hydroxyapatite-reduced graphene oxide nanocomposite coatings in simulated body fluid. In: Congresso de Ciência e Tecnologia dos Biomateriais, 2022. *Anais do Congresso de Ciência e Tecnologia dos Biomateriais, 2022.*
2. Lara, N.; Komorizono, A. A.; Bernardi, M. I. B. Morphological evolution of hydroxyapatite and reduced graphene oxide nanocomposite coatings during sintering. In: XX Brazil MRS Meeting, 2022, Foz do Iguaçu. *Proceedings of the XX Brazil MRS Meeting, 2022.*
3. Lara, N.; Komorizono, A. A.; Bernardi, M. I. B. Effect of sintering temperature on the crystallinity and crystallite size of hydroxyapatite-reduced graphene oxide bioactive coatings. In: XXIV CBECiMat - Congresso Brasileiro de Engenharia e Ciência dos Materiais, 2022, Águas de Lindóia. *Anais do XXIV CBECiMat, 2022.*

Resumos expandidos

1. Lara, N.; Komorizono, A. A.; Bernardi, M. I. B. Surface roughness of hydroxyapatite-reduced graphene oxide nanocomposite coatings. In: III Congresso Brasileiro Interdisciplinar em Ciência e Tecnologia, 2022. *Anais do III Congresso Brasileiro Interdisciplinar em Ciência e Tecnologia, 2022.*
2. Lara, N.; Komorizono, A. A.; Bernardi, M. I. B. Chemical reduction of graphene oxide with sodium borohydride in aqueous media. In: XXIII Simpósio em Ciência e Engenharia de Materiais, 2021, São Carlos. *Anais do XXIII Simpósio em Ciência e Engenharia de Materiais, 2021.*