AUTARQUIA ASSOCIADA À UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Utilização do nanocompósito à base de óxido de grafeno no pericárdio bovino empregado em dispositivos cardiovasculares

JAQUELINE JAMARA SOUZA SOARES

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do Grau de Mestre em Ciências na Área de Tecnologia Nuclear - Aplicações

Orientadora:
Profa. Dra. Solange Kazumi Sakata
Coorientadora:
Profa. Dra. Mônica Beatriz Mathor

São Paulo
2019

INSTITUTO DE PESQUISAS ENERGÉTICAS E NUCLEARES
Autarquia associada à Universidade de São Paulo

Utilização do nanocompósito à base de óxido de grafeno no pericárdio bovino empregado em dispositivos cardiovasculares

JAQUELINE JAMARA SOUZA SOARES

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do Grau de Mestre em Ciências na Área de Tecnologia Nuclear - Aplicações

Orientadora:
Profa. Dra. Solange Kazumi Sakata
Coorientadora:
Profa. Dra. Mônica Beatriz Mathor

Versão Original
Versão Original disponível no IPEN

São Paulo
2019

Fonte de Financiamento: CNPq

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho,
para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte

Como citar:

SOARES, J. J. S. . ***Utilização do nanocompósito à base de óxido de grafeno no peric rdio bovino empregado em dispositivos cardiovasculares***. 2019. 118 p. Dissertação (Mestrado em Tecnologia Nuclear), Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, IPEN-CNEN/SP, São Paulo. Disponível em: <www.teses.usp.br> (data de consulta no formato: dd/mm/aaaa)

Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de geração automática da Biblioteca IPEN/USP,
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

Soares, Jaqueline Jamara Souza
Utilização do nanocompósito à base de óxido de grafeno no pericárdio bovino empregado em dispositivos cardiovasculares / Jaqueline Jamara Souza Soares; orientadora Dra Solange Kazumi Sakata; co-orientadora Dra Mônica Beatriz Mathor. -- São Paulo, 2019.
118 p.

Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Tecnologia Nuclear (Aplicações) -- Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, São Paulo, 2019.

1. válvulas cardíacas. 2. óxido de grafeno. 3. pericárdio bovino. 4. amino-polietilenoglicol. 5. radiação ionizante. I. Sakata, Dra Solange Kazumi, orient. II. Mathor, Dra Mônica Beatriz, co-orient. III. Título.

Folha de aprovação

Autor: Jaqueline Jamara Souza Soares

Título: Utilização do nanocompósito à base de óxido de grafeno no pericárdio bovino empregado em dispositivos cardiovasculares

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Tecnologia Nuclear da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Data: _____/_____/_____

Banca Examinadora

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Aos meus pais Nelson e Maria Olga (*in memoriam*), por todo o apoio e dedicação.

Aos meus irmãos Nelson e Juliana.

Ao Júnior, meu fiel escudeiro, sempre me apoiando e incentivando para buscar sempre o melhor.

Muitíssimo obrigada por fazerem parte da minha vida.

AGRADECIMENTOS

À Deus, pela chance de recomeçar a cada amanhecer e fazer um novo fim.

À Dra. Solange pela orientação, por acreditar e apoiar o meu desenvolvimento profissional. Sou muito grata pela oportunidade que recebi.

À Dra. Mônica pelo apoio, sugestões e contribuições ao longo do trabalho.

Ao Paulo do irradiador pelas esterilizações e esclarecimentos sobre o processo de irradiação.

Ao professor Dr. Márcio Henrique Zaim pelos conhecimentos transmitidos.

Aos companheiros de grupo Luíza, Raynara, Flávio, Tiago, Fernando, Gabriel, Thainá, John, Camila, Otávio e Marcelo pela paciência e amizade.

Aos alunos da sala 17, Amanda, Regiane, Camila, Bruna, Ana Paula pelo incentivo e as conversas regradas a café.

Ao professor Dr. Leonardo Gondim pela oportunidade de aprendizado no Programa de Aperfeiçoamento de Ensino (PAE).

Aos profissionais Rafael (Teo), Flávia Oliveira, Dalva Lúcia, Daniel Perez, Marina Junko, Soraia Kátia, Rodrigo Silveira pelas colaborações.

À Kleicy, Érica e Rosmary pelo apoio e atenção nos ensaios de citotoxicidade, calcificação e liofilização, respectivamente.

Aos profissionais Elisabeth, Luci Diva, Áurea, Anna Lúcia pela atenção e conhecimentos transmitidos. Ao técnico Glauson pela atenção e disponibilidade para realização das micrografias por microscopia eletrônica de varredura.

Aos secretários Marcos e Cláudia sempre prestativos.

Ao Otávio e Dr. Cláudio pela ajuda nas análises de Raman e Infravermelho.

Aos Srs. Araújo e Jaime sempre atentos na portaria.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo auxílio financeiro.

Obrigada a todos que de alguma forma me auxiliaram nessa jornada.

“Há três caminhos para o fracasso: não ensinar o que se sabe, não praticar o que se ensina, não perguntar o que se ignora”.

São Beda

RESUMO

SOARES, Jaqueline Jamara Souza. **Utilização do nanocompósito à base de óxido de grafeno no pericárdio bovino empregado em dispositivos cardiovasculares.** 2019 118 p. Dissertação (Mestrado em Tecnologia Nuclear) – Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares – IPEN-CNEN/SP. São Paulo.

A doença cardíaca valvar é um problema clínico que está presente em todos os países independente do nível de desenvolvimento econômico. Anualmente são realizadas mais de 275.000 cirurgias para substituição da válvula aórtica em todo o mundo e a estimativa é que esse número triplique até 2050. Dentre as próteses utilizadas destaca-se a bioprótese, que apesar de apresentar uma rejeição menor que a prótese mecânica, a sua durabilidade é reduzida em virtude de sua calcificação e posterior deterioração. A fim de aumentar a durabilidade da prótese confeccionada a partir do pericárdio bovino, neste estudo, foi incorporado o óxido de grafeno funcionalizado com amino-polietilenoglicol 4.000 M_n (OG-PEG-NH_2 4.000 M_n) e 6.000 M_n (OG-PEG-NH_2 6.000 M_n) ao biomaterial. A incorporação do óxido de grafeno funcionalizado ao pericárdio bovino foi realizada, após sua esterilização com radiação gama, de duas formas distintas: por adsorção física e por reação química. Os resultados demonstraram que houve a incorporação do OG-PEG-NH_2 4.000 M_n, verificado pelo aumento dos parâmetros de ensaio de resistência analisados, como por exemplo, a resistência à deformação plástica permanente e também a carga máxima suportada. Em relação ao OG-PEG-NH_2 6.000 M_n houve uma melhora na biocompatibilidade do nanomaterial, diminuindo a sua citotoxicidade. Sendo assim, pode-se concluir que o OG-PEG-NH_2 4.000 M_n possui o potencial para melhorar a resistência mecânica e consequentemente aumentar a durabilidade do biomaterial.

Palavras-chave: válvulas cardíacas, óxido de grafeno, pericárdio bovino, amino-polietilenoglicol.

ABSTRACT

SOARES, Jaqueline Jamara Souza. **Use of graphene oxide based nanocomposite on bovine pericardium used in cardiovascular devices.** 2019 , 118 p. Dissertação (Mestrado em Tecnologia Nuclear) – Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares – IPEN-CNEN/SP. São Paulo.

Valvular heart disease is a clinical problem that is present in all countries regardless of the level of economic development. More than 275000 surgeries are performed annually for aortic valve replacement worldwide, and it is estimated that this number will triple by 2050. Among the prostheses used, the bioprosthesis stands out, which, although presenting a smaller rejection than the mechanical prosthesis, its durability is reduced by cause of its calcification and subsequent deterioration. In order to increase the durability of the prosthesis made from the bovine pericardium, the functionalized graphene oxide with amino-polyethylene glycol 4000 M_n (OG-PEG-NH_2 4000 M_n) and 6000 M_n (OG-PEG-NH_2 6000 M_n) to the biomaterial. The incorporation of functionalized graphene oxide to the bovine pericardium was performed, after its sterilization with gamma radiation, in two different ways: physical adsorption and chemical reaction. The results showed that the OG-PEG-NH_2 4000 M_n was incorporated, verified by the increase of the resistance test parameters analysed, for example, the resistance to permanent plastic deformation and also the maximum supported load. In relation to OG-PEG-NH_2 6000 M_n there was an improvement in the biocompatibility of the nanomaterial, reducing its cytotoxicity. Thus, it can be concluded that the OG-PEG-NH_2 4000 M_n has the potential to improve mechanical strength and consequently increase the durability of the biomaterial.

Key words: cardiac valves, graphene oxide, bovine pericardium, amino-polyethylene glycol.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Principais métodos usados na preparação do OG **27**

Tabela 2 - Composição do SBF **49**

Tabela 3 - Reagentes utilizados na síntese do OG..... **50**

Tabela 4 - Ângulos de Bragg, os espaçamentos entre as camadas e os números de camadas cristalinas das amostras de grafite, OG e OG 25 kGy por DRX..... **55**

Tabela 5 - Bandas presentes no OG. **57**

Tabela 6 - Perdas de massa do OG 25 kGy em diferentes temperaturas **61**

Tabela 7 - Quantificação dos elementos químicos presentes na grafite e no OG 25 kGy.. **62**

Tabela 8 - Resultados das análises das amostras de OG-PEG-NH_2 e OG-PEG-NH_2 25 kGy por DRX..... **72**

Tabela 9 - Bandas presentes no OG-PEG-NH_2 ..... **73**

Tabela 10 - Perdas de massa do OG-PEG-NH_2 25 kGy em diferentes temperaturas.....**76**

Tabela 11 - Quantificação dos elementos químicos presentes no OG-PEG-NH_2 25 kGy...**77**

Tabela 12 - Quantificação dos elementos químicos presentes no OG-PEG-NH_2 25 kGy...**88**

Tabela 13 - Relação Ca/P obtidos por EDS.....**103**

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Estrutura do coração **18**
Figura 2 - Tipos de próteses cardíacas **19**
Figura 3 - Pericárdio bovino constituído de colágeno. **21**
Figura 4 - Fórmula estrutural do glutaraldeído **21**
Figura 5 - Reticulação do pericárdio bovino com glutaraldeído **22**
Figura 6 - Próteses valvulares cardíacas. **22**
Figura 7 - Nanomedicina cardiovascular **25**
Figura 8 - Método Hummers **27**
Figura 9 - Óxido de grafeno **28**
Figura 10 - OG-PEG-NH_2 ..... **29**
Figura 11 - Fluxograma dos experimentos e ensaios realizados no trabalho **35**
Figura 12 - Corpo de prova; medidas em mm. **44**
Figura 13 - Obtenção do $KMnO_4$ na síntese do OG. **51**
Figura 14 - OG após a síntese **52**
Figura 15 - OG em solução e pó. **52**
Figura 16 - Difratogramas do OG, OG 25 kGy e grafite. **54**
Figura 17 - Introdução de grupos oxigenados ao grafite. **55**
Figura 18 - Espectros de infravermelho com transformada de Fourier do OG E OG 25 kGy **56**
Figura 19 - Deconvolução do espectro raman da grafite. **58**
Figura 20 - Deconvoluções dos espectros raman do OG e OG 25 kGy **58**
Figura 21 - Espectro ultravioleta-visível do OG 25 kGy. **59**
Figura 22 - Curvas termogravimétricas da grafite e do OG 25 kGy. **60**
Figura 23 - Espectros de XPS da grafite e do OG 25 kGy. **61**
Figura 24 - Deconvolução do espectro C (1s) do OG 25 kGy. **62**
Figura 25 - Potencial Zeta do OG 25 kGy. **63**
Figura 26 – Imagem de Microscopia eletrônica de transmissão do OG **64**
Figura 27 - Imagem de microscopia de força atômica do OG 25 kGy. **65**
Figura 28 - Perfis de alturas de diferentes camadas do OG 25 kGy. **65**
Figura 29 - Esquema da síntese do amino-polietilenoglicol pela síntese de Gabriel **66**
Figura 30 - Mecanismo da síntese do amino-polietilenoglicol **67**

Figura 31 - Teste com ácido nitroso **68**

Figura 32 - Análises realizadas por MALDI-TOF/MS para as amostras de PEG e PEG-NH_2 ..... **68**

Figura 33 - Espectros de infravermelho com transformada de Fourier do PEG e PEG-NH_2 ..... **69**

Figura 34 - Funcionalização do OG com amino-polietilenoglicol **70**

Figura 35 - Mecanismo de reação entre o OG e o PEG-NH_2..... **70**

Figura 36 - Difratogramas do PEG-NH_2, OG, OG-PEG-NH_2 e OG-PEG-NH_2 25 kGy..... **71**

Figura 37 - Espectros de infravermelho com transformada de Fourier do OG, PEG-NH_2, OG-PEG-NH_2 e OG-PEG-NH_2 25 kGy..... **73**

Figura 38 - Deconvolução do espectro raman do OG-PEG-NH_2 e OG-PEG-NH_2 25 kGy..... **74**

Figura 39 - Espectro ultravioleta-visível do OG-PEG-NH_2 25 kGy..... **75**

Figura 40 - Curva termogravimétrica do OG-PEG-NH_2 25 kGy..... **76**

Figura 41 - Espectro de XPS do OG-PEG-NH_2 25 kGy..... **77**

Figura 42 - Deconvolução do espectro C(1s) do OG-PEG-NH_2 25 kGy..... **77**

Figura 43 - Potencial zeta do OG-PEG-NH_2 25 kGy..... **78**

Figura 44 - Micrografia do OG-PEG-NH_2 25 kGy..... **79**

Figura 45 - Imagem de AFM do OG-PEG-NH_2 25 kGy..... **79**

Figura 46 - Perfil da altura da camada do OG-PEG-NH_2 25 kGy..... **80**

Figura 47 - Incorporação do OG-PEG-NH_2 no PB adsorção..... **80**

Figura 48 - Incorporação do OG-PEG-NH_2 no PB por reação química..... **81**

Figura 49 - Difratogramas do PB, PB-OG-PEG-NH_2 AD e PB-OG-PEG-NH_2 RQ..... **82**

Figura 50 - Espectros de infravermelho com transformada de Fourier do PB, PB-OG-PEG-NH_2 AD e PB-OG-PEG-NH_2 RQ..... **83**

Figura 51 - Imagem de AFM do OG-PEG-NH_2 25 kGy incorporado ao PB do lado rugoso..... **84**

Figura 52 - Imagem de AFM do OG-PEG-NH_2 25 kGy incorporado ao PB do lado liso **85**

Figura 53 - Espectros de FT-IR do OG-PEG-NH_2 25 kGy..... **86**

Figura 54 - Deconvolução do espectro raman do OG-PEG-NH_2 25 kGy..... **87**

Figura 55 - Espectro de XPS do OG-PEG-NH_2 25 kGy..... **87**

Figura 56 - Deconvolução do espectro C (1s) do OG-PEG-NH_2 25 kGy..... **88**

Figura 57 - Espectros Raman das principais estruturas do PB e do PB-OG-PEG-

NH_2.....**89**

Figura 58 - Gráfico de citotoxicidade do OG 25 kGy.....**90**

Figura 59 - Gráfico de citotoxicidade do OG-PEG-NH_2 25 kGy **90**

Figura 60 - Gráfico de comparação entre o OG 25 kGy e o OG-PEG-NH_2 25 kGy.....**91**

Figura 61 - Gráfico de citotoxicidade do eluído do PB.....**91**

Figura 62 - Gráfico de citotoxicidade do eluído do PB-OG-PEG-NH_2 RQ.....**91**

Figura 63 - Gráfico de comparação entre o eluído do PB e PB-OG-PEG-NH_2 RQ.....**92**

Figura 64 - Átrio direito isolado de camundongo.....**93**

Figura 65 - Curvas concentração-resposta para OG 25 kGy e OG-PEG-NH_2 25 kGy realizadas em átrio direito isolado de camundongos C57BI/6.....**94**

Figura 66 - Curvas concentração-resposta para norepinefrina realizadas em átrio direito isolado de camundongos C57BI/6 previamente incubados com OG 25 kGy ou OG-PEG-NH_2 25 kGy.....**94**

Figura 67 - Curvas concentração-resposta para carbacol realizadas em átrio direito isolado de camundongos C57BI/6 previamente incubados com OG 25 kGy ou OG-PEG-NH_2 25 kGy.....**95**

Figura 68 - Corpos de prova, após o teste de resistência.....**96**

Figura 69 - Ensaio de resistência mecânica realizado em PB (controle) e PB incorporado com 3% (m/m) de OG-PEG-NH_2 4.000 M_n por dois métodos diferentes (Adsorção e Química).....**97**

Figura 70 - Ensaio de resistência mecânica realizado em PB (controle) e PB incorporado com 3% e 6% de OG-PEG-NH_2 RQ 6.000 M_n.....**99**

Figura 71 - Micrografias de amostras de PB testadas em ensaio de calcificação.....**100**

Figura 72 - Ensaio de calcificação realizado em PB (controle) e PB incorporado com 10% de OG-PEG-NH_2 por reação química.....**102**

LISTA DE NOMENCLATURAS E SIGLAS

^{137}Ce	Césio-137
^{59}CO	Cobalto-59
^{60}CO	Cobalto-60
AD	Átrio direito
AT	Ácido de tanino
CNTs	Nanotubos de carbono
CSMA/PECA/OG	Óxido de grafeno incorporado ao Condroitim sulfatetracriloílo, polietilenoglicol metil Éter-Ɛ-caprolactona-cloreto de acrílico
DNA	Ácido desoxirribonucleico
ECM	Matriz extracelular
EDC	1-etil-3-(3 dimetilamonopropil) carbodiimida
GA	Glutaraldeído
GelMA	Hidrogel híbrido de metacriloíla
GP	Genipino
Gy	Gray
$Gy.s^{-1}$	Gray por segundo
HAp	Hidroxiapatita
HCT-116	Células de câncer de cólon
hMSCs	Células-tronco mesenquimais humanas
hNSCs	Células-tronco neurais humanas
Hyl	Hidroxilisina
ISO	Organização Internacional de Normalização
J/kg	joule/quilograma
kGy	kilogray
$kGy.h^{-1}$	kilogray por hora
Lys	Lisina
MeTro	Metacriloil tropoelastina
MTS	3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carboximetofenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazolim
NMs	Nanomateriais
NNI	Iniciativa Nacional de Nanotecnologia dos EUA
NPs	Nanopartículas

OG	Óxido de grafeno
OG-$CaCO_3$	Óxido de grafeno incorporado ao carbonato de cálcio
OG-PEG-NH_2	Óxido de grafeno funcionalizado com amino-polietilenoglicol
OVCAR-3	Células carcinoma ovariano humano
PB	Pericárdio Bovino
PB-OG-PEG-NH_2AD	Óxido de grafeno funcionalizado com amino-polietilenoglicol incorporado ao pericárdio bovino por adsorção
PB-OG-PEG-NH_2RQ	Óxido de grafeno funcionalizado com amino-polietilenoglicol incorporado ao pericárdio bovino por reação química
PMS	Metassulfato de fenazina
RAJI	Células linfoblásticas
SAL	Nível de garantia de esterilidade
SBF	Fluido corporal simulado
TRI	Trissulfato de neomicina e glicose pentagaloil

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO……..**16**

1.1 Objetivo.....17

1.1.1 Objetivo Geral…….……**17**

1.1.2 Objetivos Específicos.....**17**

2 REVISÃO DA LITERATURA.....**18**

2.1 Válvulas Cardíacas.....**18**

2.2 Aplicação do pericárdio bovino na confecção de bioprótese.....**20**

2.3 Estudos realizados no tratamento do pericárdio bovino.....**23**

2.4 Nanomedicina……**25**

2.5 Óxido de grafeno e óxido de grafeno funcionalizado com Amino-PEG.....**26**

2.6 Utilização do OG na engenharia de tecidos.....**30**

2.7 Radiação Ionizante……**31**

2.8 Aplicação da radiação gama (γ) na esterilização de materiais.....**32**

3 MATERIAIS E MÉTODOS……..**34**

3.1 Reagentes químicos……...……**34**

3.2 Equipamentos.....**34**

3.3 Vidrarias.....**35**

3.4 Sínteses dos materiais.....**35**

3.4.1 Síntese do óxido de grafeno (OG).....**36**

3.4.2 Síntese do amino-polietilenoglicol (PEG-NH_2).....**36**

3.4.3 Funcionalização do óxido de grafeno.....**37**

3.5 Método de secagem do OG-PEG-NH_2.....**37**

3.6 Irradiação do óxido de grafeno e óxido de grafeno funcionalizado.....**38**

3.7 Obtenção das membranas de pericárdio bovino.....**38**

3.8 Lavagens das membranas de pericárdio bovino.....**38**

3.9 Incorporação do óxido de grafeno funcionalizado no pericárdio bovino.....**39**

3.9.1 Incorporação por adsorção……..…**39**

3.9.2 Incorporação por reação química.....**39**

3.10 Método de secagem das membranas de pericárdio bovino.....**40**

3.11 Técnicas de caracterização.....**41**

3.11.1 Espectroscopia vibracional e eletrônica.....**41**

3.11.2 Estrutura cristalina……**42**

3.11.3 Estabilidade térmica……..…..**42**
3.11.4 Potencial Zeta……...…**42**
3.11.5 Morfologia……...…**42**
3.12 Análise qualitativa…….…….....…..**43**
3.13 Ensaios mecânicos.....**43**
3.14 Ensaios *in vitro*.....**44**
3.14.1 Citotoxicidade.....**44**
3.14.2 Reatividade atrial.....**47**
3.14.3 Calcificação.....**48**
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....**50**
4.1 Síntese do óxido de grafeno…….....…**50**
4.2 Esterilização do óxido de grafeno.....**53**
4.3 Caracterização do óxido de grafeno.....**53**
4.3.1 Difração de raios-X (DRX).....**53**
4.3.2 Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FT-IR).....**56**
4.3.3 Espectroscopia Raman.....…….…**57**
4.3.4 Caracterização do OG irradiado……...**59**
4.3.5 Espectroscopia ultravioleta-visível (UV-VIS).....**59**
4.3.6 Termogravimetria (TGA)…….……**60**
4.3.7 Espectroscopia de fotoelétrons excitados por raios-X (XPS).....**61**
4.3.8 Potencial Zeta……...…**63**
4.3.9 Microscopia eletrônica de transmissão (MET) e microscopia de força atômica (AFM).....**64**
4.4 Síntese do Amino-polietilenoglicol 4.000 M_n.....**66**
4.4.1 Caracterização do Amino-polietilenoglicol 4.000 M_n.....**67**
4.5 Funcionalização do óxido de grafeno com Amino-polietilenoglicol 4.000 M_n..**70**
4.5.1 Secagem do OG-PEG-NH_2.....**71**
4.5.2 Caracterização do óxido de grafeno funcionalizado com Amino-polietileno glicol 4.000 M_n.....**71**
4.5.3 Difração de raios-X (DRX).....**71**
4.5.4 Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FT-IR).....**72**
4.5.5 Espectroscopia Raman…….……**74**
4.6 Estudo da influência da radiação gama na esterilização do óxido de grafeno funcionalizado com Amino-polietilenoglicol 4.000 M_n.....**74**

4.6.1 Espectroscopia ultravioleta-visível (UV-VIS).....**75**
4.6.2 Termogravimetria (TGA)……**75**
4.6.3 Espectroscopia de fotoelétrons excitados por raios-X (XPS).....**76**
4.6.4 Potencial Zeta…….……..**78**
4.6.5 Microscopia eletrônica de transmissão (MET) e microscopia de força atômica (AFM).....**78**
4.7 Incorporação do óxido de grafeno funcionalizado com PEG-NH_2 4.000 M_n no pericárdio bovino.....**80**
4.8 Caracterização do pericárdio bovino após a incorporação com OG-PEG-NH_2 4.000 M_n.....**81**
4.8.1 Difração de raios-X (DRX).....**82**
4.8.2 Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FT-IR).....**83**
4.8.3 Microscopia de força atômica (AFM).....**84**
4.9 Caracterização do OG funcionalizado com PEG-NH_2 6.000 M_n comercial.....**85**
4.9.1 Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FT-IR).....**85**
4.9.2 Espectroscopia Raman…….……**86**
4.9.3 Espectroscopia de fotoelétrons excitados por raios-X (XPS).....**87**
4.10 Incorporação do OG-PEG-NH_2 6.000 M_n ao PB por reação química.....**88**
4.10.1 Caracterização do PB-OG-PEG-NH_2 por espectroscopia Raman.....**89**
4.11 Ensaio Citotóxico……**89**
4.12 Ensaio da Reatividade atrial...……..**93**
4.13 Ensaio de resistência.....…….……**95**
4.14 Ensaio de calcificação…….. **100**
5 CONCLUSÃO……..**104**
6 TRABALHOS FUTUROS……...**105**
REFERÊNCIAS…….……..**106**
ANEXOS……...**118**

1 INTRODUÇÃO

As válvulas cardíacas podem ter o funcionamento comprometido em decorrência de algumas patologias, como a doença cardíaca valvar congênita ou adquirida, e por problemas de calcificação da válvula, dessa forma pode ser necessária uma intervenção cirúrgica para a sua reparação ou substituição (CONTESSOTTO et al., 2017).

Estima-se que o número de cirurgias para a substituição da válvula cardíaca deverá triplicar até 2050, atualmente são realizados mais de 275.000 procedimentos anuais em todo o mundo (VEN et al., 2017).

Nos casos de substituição, as válvulas biológicas como a válvula suína ou confeccionada a partir de membranas de pericárdio bovino (PB), apresentam vantagens em relação às válvulas mecânicas por não demandarem terapia anticoagulante e apresentarem o funcionamento semelhante ao das válvulas naturais (LODHIA; EVANS, 2018).

Para a confecção de válvulas biológicas de PB, trata-se a membrana com agentes de reticulação, como por exemplo, o glutaraldeído. Esse tratamento tem como objetivo reduzir as propriedades antigênicas e melhorar as propriedades mecânicas do biomaterial (MAO et al., 2017). No entanto, aproximadamente doze anos pós-implante ocorre um processo químico e imunológico de calcificação degenerativa em decorrência desse tratamento, originando fissuras que comprometem a abertura e fechamento dessas válvulas. Essas falhas estruturais reduzem a sua durabilidade sendo necessária a sua substituição (TAM et al., 2017).

Para minimizar o problema apresentado e aumentar a durabilidade da bioprótese estão sendo desenvolvidos novos tratamentos envolvendo a modificação da superfície do biomaterial. Com o avanço da nanotecnologia, uma alternativa promissora para aumentar a resistência de biomateriais é a utilização de nanomateriais (NISHIDA et al., 2014).

O óxido de grafeno (OG) é um nanomaterial derivado do grafeno que possui em sua superfície grupos epóxi, hidroxilas, carbonilas e carboxilas que o torna mais hidrofílico. Esses grupos também promovem interações biológicas ao nanomaterial permitindo a sua utilização como revestimento na Engenharia de Tecidos (REDDY et al., 2018).

Porém, existem algumas preocupações da comunidade científica sobre o potencial de toxicidade do OG, o qual está associado à funcionalização da sua superfície. Quando esses nanomateriais são combinados com outras moléculas por adsorção ou modificados quimicamente, observa-se a melhora da sua compatibilidade com o ambiente fisiológico e diminuição da sua toxicidade (TABISH, 2018).

Tendo em vista a necessidade de novos materiais biocompatíveis com o PB, o óxido de grafeno funcionalizado com amino-polietilenoglicol (OG-PEG-NH_2), após sua esterilização com radiação gama, pode ser uma alternativa viável para atuar no aumento da resistência mecânica do tecido.

Aumentando a resistência da bioprótese da válvula cardíaca o paciente terá uma melhora na qualidade de vida, pois não haverá necessidade de uma nova cirurgia para substituição, ocasionando também uma redução de gastos na área da saúde em decorrência da diminuição desses procedimentos cirúrgicos.

1.1 Objetivo

1.1.1 Objetivo Geral

O objetivo geral deste trabalho é o estudo *in vitro* da influência do nanocompósito OG-PEG-NH_2 na superfície do pericárdio bovino.

1.1.2 Objetivos Específicos

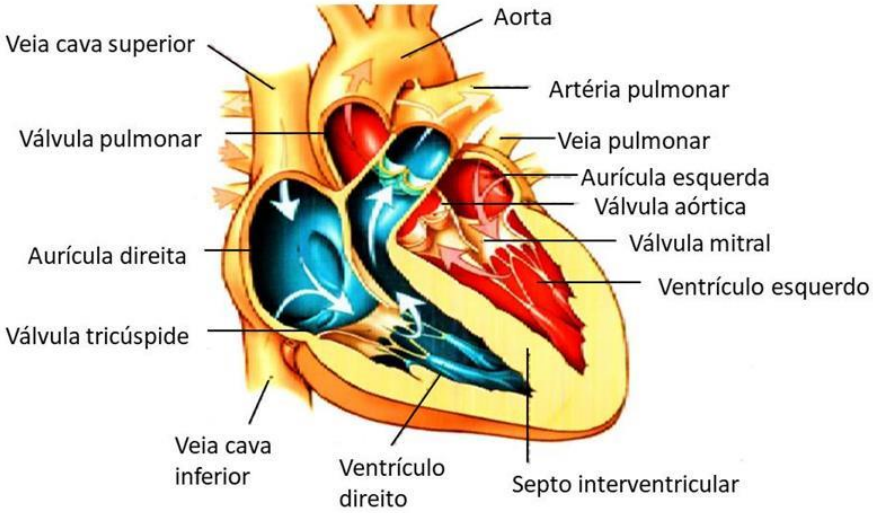
- Sintetizar e caracterizar o óxido de grafeno.
- Funcionalizar por ligação química e caracterizar o óxido de grafeno com Amino-polietilenoglicol.
- Incorporar, por adsorção e por reação química, o óxido de grafeno funcionalizado ao pericárdio bovino.
- Avaliar a citotoxicidade do óxido de grafeno, óxido de grafeno funcionalizado, o extrato do pericárdio bovino sem a incorporação e o extrato do pericárdio bovino após a incorporação, por reação química, do óxido de grafeno funcionalizado.
- Avaliar a resistência mecânica e a adsorção de cálcio do pericárdio bovino após a incorporação, por via química, do óxido de grafeno funcionalizado.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Válvulas Cardíacas

O coração, responsável por bombear o sangue para todo o organismo, é constituído de quatro câmaras – dois átrios e dois ventrículos e um sistema de válvulas que conectam os átrios, o tronco pulmonar e a artéria aorta aos ventrículos (NETO, 2016). A Figura 1 apresenta um corte esquemático do coração.

Figura 1- Estrutura do coração



Fonte: SOBOTTA, 2009.

As válvulas são responsáveis por evitar que o sangue retorne ao compartimento anterior. No lado esquerdo do coração, a válvula mitral é responsável por evitar o refluxo sanguíneo, enquanto que do lado direito, a válvula responsável é a tricúspide. No começo do arco aórtico a válvula semilunar aórtica evita o refluxo sanguíneo para o ventrículo esquerdo e no tronco pulmonar encontra-se a válvula semilunar pulmonar que evita o refluxo para o ventrículo direito. O ventrículo direito bombeia o sangue para os pulmões para ser oxigenado, ao passo que o ventrículo esquerdo lança o sangue para a circulação sistêmica (KLABUNDE, 2012).

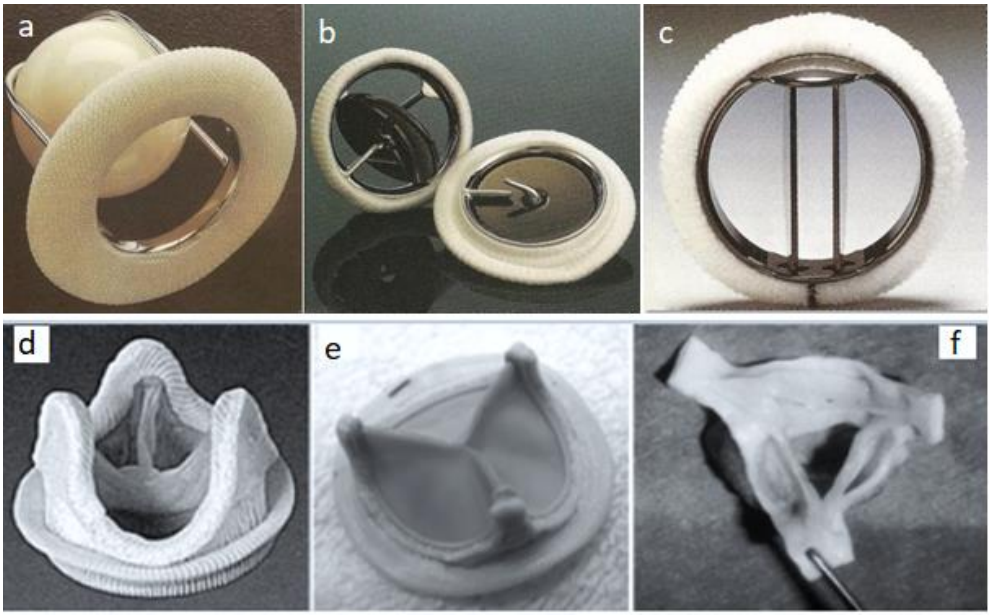
Durante o ciclo cardíaco as válvulas são responsáveis por assegurar o fluxo

sanguíneo unidirecional. Elas abrem e fecham 100.000 vezes todos os dias o que equivale a aproximadamente 3 bilhões de ciclos ao longo da vida de um adulto (CONTESSOTO et al., 2017).

Algumas cardiopatias valvares específicas são responsáveis pelo mau funcionamento das válvulas, sendo necessário um tratamento que envolva técnicas de reparo ou substituição, seja cirúrgica ou via transcateter. As duas principais categorias de doença valvular são classificadas como doenças congênitas e adquiridas. A doença valvular congênita está associada às anormalidades ou defeitos congênitos que possam surgir durante os estágios iniciais de desenvolvimento. Como por exemplo, defeitos do septo atrial e ventricular, e fusão do folheto aórtico bicúspide. Em contraste, a doença valvular adquirida surge após o desenvolvimento de processos degenerativos que afetam as válvulas, como exemplos têm-se a regurgitação e a estenose (SANCHEZ; BATEMAN; LAIZZO, 2019).

Em casos de substituição, as próteses cardíacas podem ser mecânicas ou biológicas (Figura 2).

Figura 2 - Tipos de próteses cardíacas- Válvulas cardíacas mecânicas: (a) válvula de esfera enjaulada ou caged-ball; (b) válvula de disco inclinado ou tilting-disk; (c) válvula de dois folhetos semicirculares ou bileaflet. Válvulas cardíacas biológicas: (d) Válvula de suíno; (e) Válvula pericárdica de bovino; (f) Aloenxerto/homoenxerto.



Fonte: BRAUNWALD, 1998; VESELY, 2005.

As próteses mecânicas são produzidas de material sintético podendo ser utilizados polímeros, metais, carbono pirolítico entre outros. As mecânicas possuem

elevada durabilidade, entretanto podem provocar respostas trombogênicas obrigando os pacientes ao uso contínuo de anticoagulantes que deverão ser administrados durante toda a vida. As próteses biológicas podem ser confeccionadas com material proveniente de doadores humanos (homólogas) podendo ser de indivíduos geneticamente diferentes, mas de uma mesma espécie (homoenxertos ou aloenxertos), com tecidos animais (heterólogas) como o pericárdio bovino (PB), ou no caso dos suínos, utilizar a própria válvula. As biopróteses apresentam o funcionamento muito semelhante com as válvulas nativas, no entanto são menos duráveis porque são incapazes de se auto repararem e por sofrerem danos em sua superfície, devido às forças repetitivas no ambiente valvular por um longo período de tempo. Além disso, as válvulas mecânicas e biológicas não se remodelam a medida que os pacientes pediátricos crescem, submetendo-os a múltiplas cirurgias de substituição valvar ao longo de sua vida (ZHU; GRANDE-ALLEN, 2018).

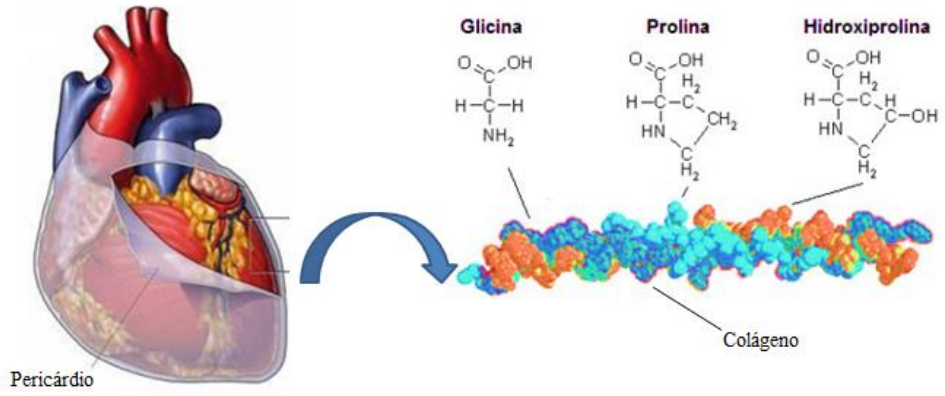
No Brasil, a válvula biológica homóloga foi utilizada pela primeira vez em posição aórtica, em 1967 pelo Prof. Dr. Hugo João Felipozzi da Faculdade de Medicina da Santa Casa de São Paulo (BRAILE et al., 1994). No início da década de 70, os Profs. Dr Luiz Boro Puig, Dr. Geraldo Verginelli e o Dr. Euryclides de Jesus Zerbini da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (FMUSP) desenvolveram no Instituto do Coração (InCor) uma válvula cardíaca confeccionada com dura-máter humana, tratada com glicerol e implantada pela primeira vez em 21 de Janeiro de 1971 em posição mitral (PUIG et al., 1997; LIMA et al., 2001).

2.2 Aplicação do pericárdio bovino na confecção de bioprótese

As primeiras válvulas cardíacas biológicas confeccionadas com pericárdio bovino (PB) e reticuladas com glutaraldeído (GA) foram desenvolvidas e utilizadas pela primeira vez em março de 1971 pelo Dr. Marian Ionescu da Universidade de Leeds, na Inglaterra (CIUBOTARU et al., 2013; MAO et al., 2017). Desde então este material tornou-se um dos mais utilizados na confecção de biopróteses (CABALLERO et al., 2017).

O pericárdio bovino é uma membrana que envolve o coração, formada de uma espessa camada de feixes de fibras de colágeno, principalmente tipo I, e elastina, Figura 3, (SANTOS et al., 2013; TAM et al., 2017; WHELAN et al., 2018).

Figura 3- Pericárdio bovino constituído de Colágeno

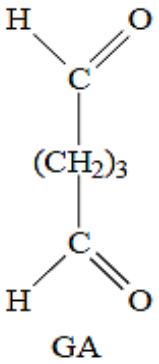


Fonte: Adaptado de SILVA; PENNA, 2012; PERUZZO 2013.

O PB possui diversos benefícios que incluem maior biocompatibilidade, diminuição do sangramento da linha de sutura após o implante, facilidade de moldagem, redução das taxas de infecção e disponibilidade imediata (RALLAPALLI; LIMAN; GUHATHAKURTA, 2016).

Atualmente, todas as bioprótese disponíveis comercialmente são reticuladas com GA (TAM et al., 2017). O GA é um dialdeído, alifático de peso molecular 100 g/mol, líquido, miscível em água, álcool e solventes orgânicos, ácido (pH 3 a 4) como mostra a Figura 4.

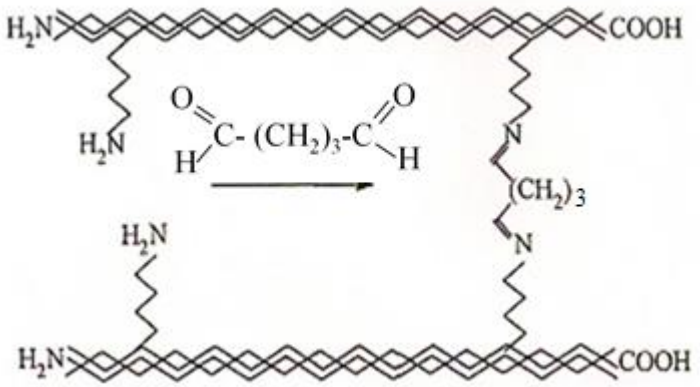
Figura 4- Fórmula Estrutural do glutaraldeído



Fonte: GOISSIS; BRAILE; GIGLIOTI, 1999.

Os grupos amino dos aminoácidos lisina (Lys) e hidroxilisina (Hyl) constituintes do colágeno I do PB reagem com o GA formando as ligações cruzadas (reticulações) do tipo base de Schiff (-CH=N-) (Piza, M. A., 1997) conforme mostra a Figura 5.

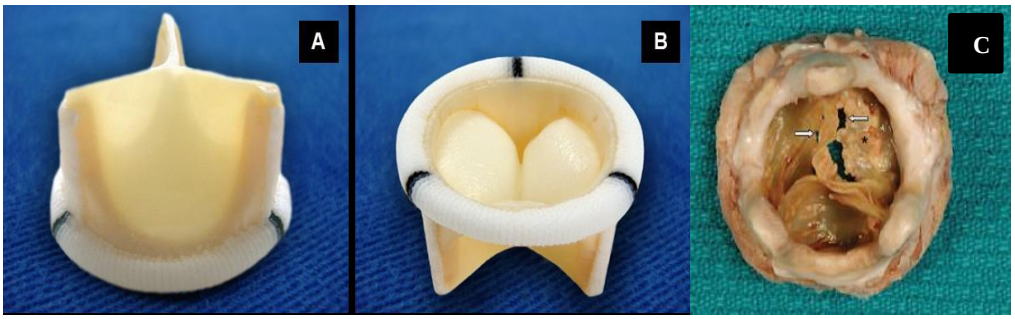
Figura 5- Reticulação do pericárdio bovino com glutaraldeído



Fonte: Adaptado de PIZA, 1997.

A reticulação com GA apresenta algumas vantagens como a redução da antigenicidade, aumento da resistência tecidual do PB, dentre outras. No entanto, essas biopróteses apresentam falhas estruturais associadas a esse tratamento. A impermeabilização do PB é um processo rápido resultando em regiões não reticuladas ou parcialmente reticuladas. Após a exposição dessas regiões no sistema biológico há a formação de trincas que funcionam como sítios primários de calcificação, ocasionando falhas ou rupturas na superfície do material (MA et al., 2014) como mostra a Figura 6.

Figura 6 - Próteses valvulares cardíacas. Válvulas cardíacas (A, B) de PB tratadas com GA e prótese valvular cardíaca que se encontrava em posição mitral por 8 anos. *Calcificação nodular e rompimentos ao redor de nódulos calcificados (setas largas).



Fonte: Adaptado de SIDDIQUI, R. F.; ABRAHAM, J. R.; BUTANY, J, 2009.

Além disso, após o implante as ligações cruzadas poliméricas tendem a liberar no sistema vascular o glutaraldeído na sua forma livre, pela degradação hidrolítica parcial ou reversibilidade de algumas ligações cruzadas. Esse composto induz a inibição da endotelização e lise de células em torno da bioprótese causando a liberação de restos celulares e fosfolipídios. Durante a fixação do GA as células do PB perdem suas propriedades metabólicas e atividades de efluxo de cálcio resultando em influxo passivo de

cálcio nas células. Dessa forma, o cálcio reage com o fósforo encontrado nos detritos celulares, como os fragmentos de membrana fosfolipídica, resultando na formação de cristais de apatita de fosfato de cálcio dentro das células desvitalizadas (MEURIS et al., 2018).

Fatores externos específicos do paciente como a hiperlipidemia, doença renal crônica, idade, dentre outros também contribuem para a calcificação das biopróteses (PADALA, 2018).

Portanto, apesar da boa aceitação das biopróteses confeccionadas com PB, a calcificação dos folhetos reduz a sua durabilidade, em torno de 12 anos de uso, sendo menor em pacientes mais jovens (TAM et al., 2017). Essa degeneração precoce das biopróteses entre os pacientes mais jovens está relacionada ao aumento da contratilidade e estresse valvar em indivíduos com maior atividade (MANKAD et al.,2018).

Anualmente mais de 275.000 pacientes são submetidos à cirurgia para substituição da válvula aórtica em todo mundo e a estimativa é que esse número triplique até 2050 (VEN et al., 2017). No Brasil, são realizados aproximadamente 100.000 procedimentos cirúrgicos cardíacos anuais, dentre eles o maior percentual é representado pela cirurgia de revascularização do miocárdio seguida pela cirurgia valvar (ROCHA; ALMEIDA, 2018).

2.3 Estudos realizados no tratamento do pericárdio bovino

Vários tratamentos estão sendo estudados para melhorar o desempenho mecânico e inibir a calcificação de biomateriais. Um tratamento ideal deve ter baixo custo e não apresentar efeitos citotóxicos (MA et al. 2014).

Agentes de reticulação naturais como o genipino (GP) e o ácido de tanino (AT) obtidos a partir de plantas, foram utilizados na reticulação de biomateriais. O GP é extraído do fruto *Gardenia jasminoides* Ellis, não apresenta efeito tóxico no corpo humano e é muito utilizado na medicina tradicional chinesa. O GP possui grupos ativos como hidroxila e carboxila que reagem espontaneamente com os grupos amino livres de lisina presentes nos biomateriais, formando as reticulações. O GP forma ligações cruzadas mais estáveis que o tratamento com GA e apresenta menor resposta inflamatória. Porém, o processo de extração é complexo, gerando um produto com valor agregado alto, limitando sua aplicação (CHANG; TSAI; LIANG, 2002). O AT é encontrado em frutas, sementes de leguminosas, grãos, dentre outros, podendo interagir com carboidratos, proteínas e

macromoléculas biológicas. O AT interage com o colágeno principalmente por forças intermoleculares do tipo ligação de hidrogênio, melhorando sua estabilidade e resistência à degradação enzimática (ISENBURG; SIMIONESCU; VYAVAHARE, 2005).

FERREIRA et al. (2007) verificaram a eficácia na prevenção da calcificação do PB previamente fixado com glutaraldeído e tratado com ácido L-glutâmico. Em concentrações de 0,8% e 8% e em pH 3,5 observou-se a retenção de respectivamente 0,07 e 0,06 mg de cálcio/mg de tecido ao passo que na ausência deste aminoácido a retenção de cálcio foi de 1,03 mg de cálcio/mg de tecido.

Em outro estudo, amostras de pericárdio bovino quando revestidas com fibroína de seda não sofreram calcificação em testes *in vitro*. A fibroína modifica a superfície do PB preenchendo as irregularidades presentes na membrana, deixando-a menos propensa a calcificação. Com esse tratamento, obteve-se uma membrana para confecção de uma válvula mais resistente à calcificação, a falha por fadiga e consequentemente com melhor resistência mecânica (NOGUEIRA et al. 2010).

GALLYAMOV et al. (2014) estudaram a estabilidade de revestimentos de quitosana quando aplicados em PB estabilizados com glutaraldeído. A quitosana foi depositada no PB a partir de soluções de ácido carbônico, H_2O saturada com CO_2 em alta pressão. Os macroporos na matriz de colágeno colapsam sob a influência da alta pressão e a quitosana dissolvida, penetra nas paredes dos poros que permanecem em colapso após a descompressão. O estudo revelou que o tratamento melhorou a estabilidade das membranas pericárdicas suprimindo a calcificação do tecido. Houve um aumento da resistência à tração de aproximadamente 14% em relação às membranas não tratadas, devido ao reforço as matrizes de colágeno pela quitosana adsorvida. Além disso, a deposição de quitosana no PB tornou o tecido mais flexível e com menor rigidez.

TAM et al. (2017) apresentaram uma nova técnica de reticulação química utilizando carbodiimida, trissulfato de neomicina e glicose pentagaloil (TRI) em substituição da fixação do PB com glutaraldeído. O tratamento com TRI mostrou maior eficácia na estabilização da matriz extracelular do PB, produzindo um tecido mais resistente a degradação enzimática e a deformações permanentes sob tensão estática. Nos testes de calcificação o tratamento do PB com TRI reduziu de 4 a 6 vezes a mineralização em relação aos resultados obtidos do tratamento com glutaraldeído. Essa melhora nos resultados foram semelhantes aos tratamentos de anti-calcificação já utilizados clinicamente como a utilização do ácido 2-amino oleico (AOA), álcool/etanol dentre outros.

Os desafios continuam e os pesquisadores trabalham arduamente no desenvolvimento de novas metodologias para a obtenção de um tecido com características ideais a ser implantado, isento de calcificação, respostas imunológicas insatisfatórias e tromboembolismo.

2.4 Nanomedicina

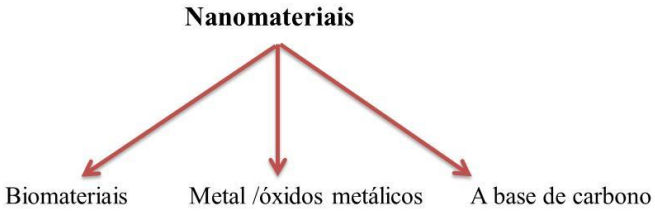
A revolução nanotecnológica teve início aproximadamente em 2000 com o estabelecimento da Iniciativa Nacional de Nanotecnologia dos EUA (NNI), que recebeu inicialmente um financiamento de US$ 475 milhões (WOODSON, 2016). Estimativas indicam que a nanotecnologia terá um impacto de US$ 3 trilhões na economia global até 2020, exigindo no mínimo 6 milhões de trabalhadores nessa área (KARGOZAR; MOZAFARI, 2018).

A definição de nanotecnologia ainda não foi formalmente aprovada, no entanto a norma ISO TC2229 JWG1 adotou um consenso de que a nanotecnologia é a aplicação do conhecimento científico para controlar e utilizar matéria em nanoescala, em que propriedades e fenômenos relacionados ao tamanho possam existir (DEVASAHAYAM, 2019). A faixa de tamanho definida pela NNI para nanomateriais (NMs) está entre 1-100 nm. Nessa escala, os materiais possuem propriedades físico-químicas e biológicas únicas, diferentes do material *bulk* (OLAWOYIN, 2018).

No campo da nanotecnologia, a nanomedicina aplica-se a produtos medicinais que utilizam nanomateriais ou a nanotecnologia para o seu desenvolvimento ou produção (MUHLEBACH, 2018). Trata-se de uma área interdisciplinar que une a biologia, a química, a engenharia e a medicina para fornecer soluções mais eficientes na prevenção e tratamento de doenças (KARGOZAR; MOZAFARI, 2018).

Na nanomedicina cardiovascular os NMs utilizados podem ser organizados em três grupos de acordo com suas principais áreas de aplicação como mostra a Figura 7.

Figura 7 - Nanomedicina Cardiovascular



Fonte: Adaptado de LOZANO, 2018.

O primeiro grupo é composto de biomateriais, como exemplos, lipossomas, micelas, nanopartículas (NPs) de fosfato de cálcio (CaP), aplicados principalmente em terapia. O segundo são os NMs baseados em carbono, especificamente os nanotubos de carbono (CNTs) e óxido de grafeno utilizados na engenharia de tecidos como componentes estruturais em *scaffolds*. Fazem parte do terceiro grupo os metais e óxidos metálicos como as NPs de ouro (Au), dióxido de cério (CeO_2) e dióxido de silício (SiO_2) aplicados em imagem, terapia e também na engenharia de tecidos (LOZANO; TORRES; GARCIA, 2018).

2.5 Óxido de grafeno e óxido de grafeno funcionalizado com Amino-PEG

Em 1940, uma série de estudos sugeriu o potencial da única camada do óxido de grafite em exibir características eletrônicas. Somente em 2004, Konstantin Novoselov e Andre Geim da Universidade de Manchester na Inglaterra, obtiveram uma única camada de grafeno através do processo de micro-esfoliação mecânica da grafite utilizando uma fita adesiva (*Scott Tape*), levando o mundo para a "idade do grafeno" (HU et al., 2015).

Em 2010, Novoselov e Geim receberam o prêmio Nobel de Física (MATSON, 2010) pela descrição de filmes grafíticos monocristalinos, com a espessura de poucos átomos, porém estáveis sob condições ambientais e de qualidade extraordinariamente alta (NOVOSELOV et al., 2004). Desde então as propriedades, a fabricação e as aplicações do grafeno vem sendo investigadas.

O grafeno e seus derivados têm atraído a atenção na comunidade científica devido as suas propriedades específicas como grande área superficial de 2.620 $m^2.g^{-1}$ por monocamada, excelente condutividade térmica 5.103 $W.m^{-1}.K^{-1}$ e elétrica 64 $mS.cm^{-1}$, estabilidade química e alta resistência mecânica (YE et al., 2018).

O OG é um dos derivados do grafeno que vem obtendo destaque na área médica. Existem diferentes metodologias para a produção do OG a partir da grafite (Tabela 1), como os métodos Brodie, Staudenmaier, Hummers, Tour, Sun e Peng (DREYER; TODD; BIELAWSKI, 2014).

Tabela 1 - Principais métodos usados na preparação do OG

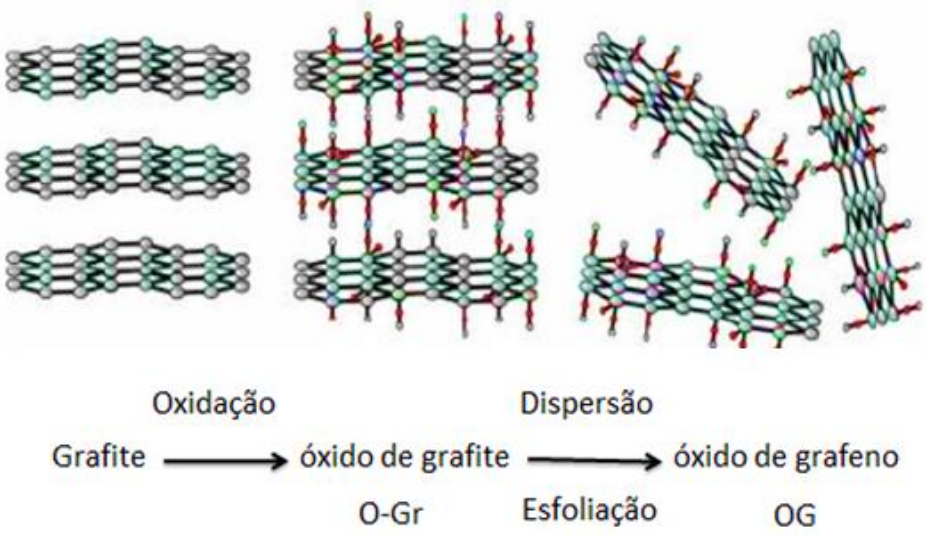
Método	Oxidante	Solvente	Aditivo	Razão entre carbono/oxigênio	Resistividade 10^5 Ω.m
Brodie	$KClO_3$	HNO_3	-	2,4-2,9	0,150-60,00
Staudenmaier	$KClO_3$	HNO_3 Fumegante	-	2,2	120,00
Hummers	$KMnO_4$	H_2SO_4	$NaNO_3$	1,8-2,5	0,005-0,01
Tour	$KMnO_4$	H_2SO_4	H_3PO_4	0,7-1,3	0,200-1000,00
Sun	$KMnO_4$	H_2SO_4	-	2,5	0,18
Peng	K_2FeMO_4	H_2SO_4	-	2,2	2,70

Fonte: Adaptado de PENDOLINO; ARMATA, 2017.

O método Hummers é o mais utilizado pelos pesquisadores porque é mais rápido em relação aos outros descritos na literatura, eficiente e seguro. Durante a síntese por Hummers pode ocorrer à contaminação do OG pelo excesso de permanganato, no entanto esse contaminante pode ser eliminado pelo tratamento com H_2O_2 seguido de diversas lavagens com água deionizada (TIWARI; SYVAJARVI, 2015).

O método Hummers (Figura 8) é baseado na oxidação da grafite a partir da mistura de $KMnO_4$, H_2SO_4 e $NaNO_3$ que após a oxidação, tem seu óxido esfoliado em suspensão via ondas ultrassônicas, produzindo as nanofolhas de OG (MEHNATI; TAHERI; BORDBAR, 2018).

Figura 8 - Método Hummers

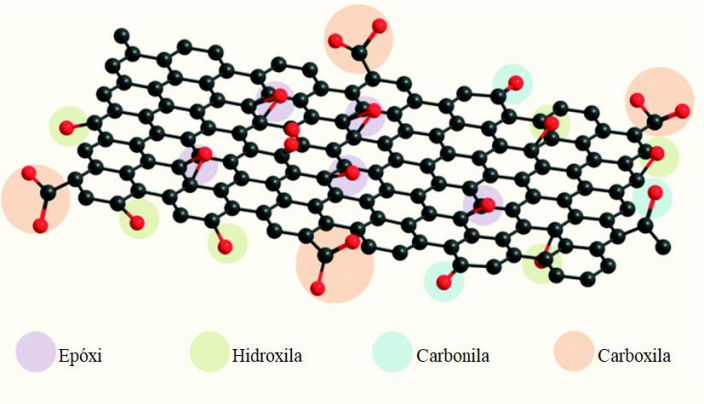


Fonte: RAMALINGAM et al., 2013.

O nitrato de sódio ($NaNO_3$) permite o aumento da distância entre as camadas da grafite, facilitando a oxidação dos planos basais (CHOWDHURY; SINGH; PAUL, 2014). Essa oxidação ocorre principalmente pela presença do heptóxido de dimanganês (Mn_2O_7) formado pelo permanganato de potássio ($KMnO_4$) em ácido sulfúrico concentrado (H_2SO_4). Oxidantes à base de permanganato são importantes nessa síntese, pois introduzem uma maior quantidade de oxigênio funcional resultando em uma maior proporção de carbonilas e carboxilas (DREYER, et al., 2014).

O óxido de grafeno apresenta em sua superfície grupos funcionais tais como epóxi, hidroxilas, carbonilas e carboxilas (Figura 9), cuja presença fornece hidrofilicidade ao material (REDDY et al., 2018).

Figura 9 - Óxido de grafeno



Fonte: SADYRALIEV, 2018.

Os grupos de ácidos carboxílicos, epóxis e as hidroxilas presentes no plano basal do OG também conferem ao nanomaterial à capacidade de interagir com outras moléculas permitindo a sua utilização como revestimento na Engenharia de Tecidos (REDDY et al.,2018).

A funcionalização do OG tem como objetivo melhorar as propriedades do material gerando nanocompósitos com uma ampla gama de aplicações (SHIN et al., 2016).

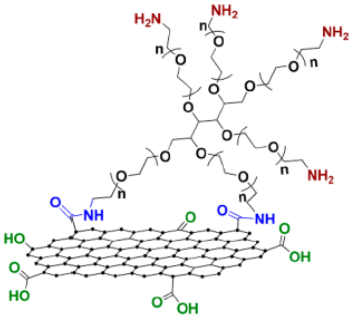
Existem dois processos para a funcionalização da superfície do OG, por adsorção realizada por interações de hidrogênio, Van der Waals e eletrostáticas; e por reação química em que os grupos funcionais de oxigênio são utilizados para alterar a funcionalidade superficial do nanomaterial. Geralmente, os grupos de ácidos carboxílicos são usados para ancorar outras moléculas e para isso esses grupos são ativados por agentes de condensação como o cloreto de tionila ($SOCl_2$), 1-etil-3-(3dimetilaminopropil) carbodiimida (EDC), N,N diciclohexilcarbodiimida (DCC) ou 2-hexafluorofosfato de 2-(7-

aza-1H-benzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametilurio (HATU). A subsequente adição de espécies nucleofílicas, como aminas ou álcoois, produz o óxido de grafeno covalente com a formação de amidas ou ésteres (GEORGAKILAS, 2014).

Embora estudos recentes tenham demonstrado a aplicabilidade *in vitro* e *in vivo* do óxido de grafeno na nanomedicina, existem ainda algumas preocupações dos pesquisadores sobre o seu potencial de toxicidade. A toxicidade do OG está relacionada com diversos fatores como, por exemplo, a superfície do material (estrutura química ou natureza dos revestimentos funcionalizados), métodos de síntese, tamanho, impurezas como o manganês dentre outros (SEABRA et al., 2014).

A *PEGuilação*, óxido de grafeno funcionalizado com Amino-PEG (OG-PEG-NH_2) como mostra a Figura 10, tem sido utilizada na redução da toxicidade e dos efeitos colaterais do OG em culturas celulares *in vitro* e em estudos *in vivo* (TABISH, 2018).

Figura 10 - OG-PEG-NH_2



Fonte: XU et al., 2014.

Experimentos *in vitro* realizados com a incubação de várias culturas celulares como as células linfoblásticas (RAJI), células de câncer de cólon (HCT-116), carcinoma ovariano humano (OVCAR-3) dentre outras, com o OG-PEG-NH_2 não apresentaram citotoxicidade até 100 µg/mL (SEABRA et al., 2014).

Em estudos *in vivo*, uma dose de 20 mg/kg de OG-PEG-NH_2 foi injetada em camundongos por um período de três meses. Após 1, 7 e 30 dias de experimento foram realizadas análises hematológicas, exames histológicos e bioquímicos do sangue, os quais, não foram observados nenhum efeito tóxico decorrente do tratamento (HU et al., 2015).

Sendo assim, a funcionalização do OG com amino-PEG parece ser uma rota segura na redução da toxicidade.

2.6 Utilização do OG na engenharia de tecidos

Existem diversas possibilidades de aplicações de materiais à base de grafeno na medicina regenerativa e Engenharia de Tecidos como neural, ósseo, cartilaginoso, cardíaco entre outros (SHIN et al., 2016).

SOLANKI et al. (2013) demonstraram que uma monocamada de nanopartículas de sílica revestida com OG aumentou a diferenciação neuronal de Células-tronco neurais humanas (hNSCs) induzindo excelente alinhamento axonal.

Biominerais como o carbonato de cálcio ($CaCO_3$) incorporado com grafeno e OG aumentou a biomineralização e a diferenciação osteogênica celular. Folhas de OG foram utilizadas para a síntese de um filme híbrido de OG-$CaCO_3$ condutivo e biocompatível que, quando incubado em fluido corporal simulado (SBF) foi transformado em cristais de hidroxiapatita carbonatada (HAp) de osso (SHIN et al., 2016).

Uma estrutura de cartilagem híbrida composta por condroitim sulfatetracriloílo, polietilenoglicol metil éter-ε-caprolactona-cloreto de acrílico e OG (CSMA/ PECA/ OG) foi utilizada para mimetizar um ambiente 3D onde células de cartilagem foram crescidas. Houve proliferação dessas células com alta viabilidade *in vitro* indicando biocompatibilidade do *scaffold* (LIAO et al., 2015).

Construções 3D de múltiplas camadas foram desenvolvidas utilizando camadas intercaladas de células, separadas com filmes finos de OG para a construção de um tecido cardíaco, a partir de cardiomiócitos e células endoteliais. A presença do filme de OG atuou como uma camada adesiva entre as diferentes camadas de células, melhorando a produção, o acoplamento e a organização de células cardíacas (SHIN et al., 2014).

A maioria dos hidrogéis usados na Engenharia de Tecidos cardíacos como a matriz extracelular (ECM), mimetizando microambientes celulares são mecanicamente mais fracos que o tecido natural. A incorporação do OG em *scaffolds* de hidrogel híbrido de metacriloíla (GelMA) melhorou as propriedades mecânicas e aumentou a condutividade elétrica desse material, inerentemente isolante. Consequentemente, o aumento da condutividade elétrica melhora a sinalização célula-célula ampliando a propagação do sinal, que são características importantes na Engenharia de Tecidos cardíacos (CHA et al., 2014).

Em 2014, estudos demonstraram que a adsorção do OG em *scaffold* de colágeno aumentou o crescimento celular e a resistência do material à compressão (NISHIDA et al., 2014).

KANG et al. (2015) comprovaram em seu trabalho que nanofolhas de OG

incorporados por ligação química em scaffolds de colágeno promoveram a diferenciação osteogênica de células-tronco mesenquimais humanas (hMSCs) cultivadas nos *scaffolds* além de melhorar as propriedades mecânicas desses suportes.

Em outro estudo, o OG foi adicionado ao metacriloil tropoelastina recombinante humana (MeTro) para desenvolvimento de um biomaterial elástico e eletricamente condutivo para Engenharia de Tecidos cardíacos. A adição de OG à matriz MeTro aumentou sua condutividade elétrica, melhorou seu módulo de elasticidade em 53% e a tensão de ruptura em 45% (ANNABI et al., 2016).

Dessa forma, as extraordinárias propriedades mecânicas, elétricas e a capacidade do OG em ser combinado com uma variedade de materiais bioativos, vêm motivando os pesquisadores a utilizá-lo na engenharia de tecidos para projetar materiais com características desejadas.

2.7 Radiação Ionizante

O processo de radiação tem como finalidade alterar as características químicas, físicas ou biológicas de materiais e produtos aumentando sua utilidade, valor ou reduzindo seu impacto no meio ambiente (CLELAND, 2006).

Radiação ionizante é a radiação com energia suficiente para deslocar elétrons de átomos ou moléculas fortemente ligados, essa energia é aplicada nas moléculas induzindo excitação, ionização e cisão das ligações químicas (SANTOS, 2017).

A radiação ionizante pode ser classificada em dois grupos, eletromagnética como, por exemplo, os raios-gama, raios X, ultravioleta e luz visível; e particulada as partículas Alfa, Beta, nêutrons, elétrons e prótons. As radiações particuladas possuem menor poder de penetração que a eletromagnética, como os raios-gama e raios X (MOREIRA, 2006).

Os raios-gama são emitidos por isótopos radioativos de ^{60}Co, e ^{137}Ce. O ^{60}Co é um isótopo radioativo sintético produzido a partir do isótopo ^{59}Co pela absorção de nêutrons em reatores nucleares. O ^{60}Co possui uma meia-vida de 1925,28 dias (cerca de 5,25 anos), o que equivale a uma perda de atividade de 50% a cada 5,3 anos. Os raios-gama emitidos pelo ^{60}Co é de 1,17 e 1,33 MeV com grande poder de penetração, sendo ideal para processar produtos diversificados, materiais espessos e de alta densidade que necessitam uniformidade de dose (WU, 2019).

Uma definição importante para qualquer processo de irradiação é a dose

absorvida, pois os efeitos do processo estão relacionados a este valor. A dose absorvida é a energia ionizante fornecida pela radiação por unidade de massa do material. A unidade internacional de dose é o gray (Gy), que equivale a absorção de um joule por quilograma (J/kg). Na maioria das aplicações de processamento de radiação, a unidade mais utilizada é o kilogray (kGy). Além da dose absorvida, a taxa de dose também é considerada no processo de irradiação, trata-se da quantidade de dose depositada por unidade de tempo e é expressa em $Gy.s^{-1}$ ou $kGy.h^{-1}$ (SANTOS, 2017).

2.8 Aplicação da radiação gama (γ) na esterilização de materiais

Esterilização é um procedimento importante na fabricação de dispositivos biomédicos estéreis destinados ao uso clínico, como o implante. A definição de esterilidade aceita mundialmente é definida como a probabilidade de encontrar não mais que um micro-organismo viável em um milhão de materiais esterilizados (RALLAPALLI; LIMAN; GUHATHAKURTA, 2016).

A esterilização por radiação pode ser classificada de dois tipos, a esterilização por radiação gama, que utiliza raios gama de alta energia e a esterilização por feixe de elétrons que emprega um fluxo constante de elétrons (TIPNIS; BURGESS, 2017).

A radiação gama emitida por ^{60}Co é comumente utilizada na esterilização de materiais médicos e no processamento de alimentos com o objetivo de desinfectar e aumentar a vida de prateleira.

Com fins de esterilização, a radiação gama produz modificações no DNA das células dos micro-organismos, provocando lesões estruturais que acarretam alterações funcionais graves por difusão de radicais livres na célula (AQUINO, 2012). Além disso, comparado com outros métodos de esterilização, como vapor, calor seco e óxido de etileno, a radiação de raios-gama é segura, limpa e fácil de manusear (WU, 2019).

A dose mínima necessária para atingir o nível de garantia de esterilidade depende da carga biológica inicial, da radiosensibilidade dos micro-organismos e do nível de garantia de esterilidade necessária para o produto. O nível de garantia de esterilidade ou *sterility assurance level* (SAL) é estabelecido em 10^{-6} micro-organismos/mL e define a probabilidade de um micro-organismo viável ser encontrado em um produto após a esterilização (AQUINO, 2012). Em conformidade com a norma ISO 11137-2:2006, a dose de radiação aplicada para fins de esterilização é de 25 kGy para alcançar o nível de garantia de esterilidade de 10^{-6} (ISO 11137-2:2206).

Portanto, devido às vantagens apresentadas quanto à esterilização por radiação, nesse estudo adotou-se a esterilização por raios-gama dos nanocompósitos.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Reagentes químicos

Pó de grafite com pureza de 99,99%, permanganato de potássio ($KMnO_4$), nitrato de sódio ($NaNO_3$), peróxido de hidrogênio (H_2O_2), éter etílico ($(C_2H_5)_2O$) foram adquiridos da Merck, cloridrato de N- (3-dimetilaminopropil-N'-etilcarbodiimida) (EDC) , ftalimida de potássio ($C_8H_4KNO_2$), piridina (C_5H_5N), cloreto de tosilo (TsCl), polietilenoglicol diamina (PEG-diamina 6.000), sulfato de hidrazina ($H_6N_2O_4S$) da Aldrich Chemistry, ácido sulfúrico concentrado (H_2SO_4) e N, N-dimetilformamida (DMF) da Vetec Química Fina, ácido clorídrico (HCl), hidróxido de sódio (NaOH) e diclorometano (CH_2Cl_2) da CAAL, polietilenoglicol (PEG 4.000), etanol (C_2H_5OH), carbonato de potássio anidro (K_2CO_3) e sulfato de sódio anidro (Na_2SO_4) da Labsynth, dispositivo de filtro centrífugo Amicon, 15 mL, 10 kDa MWCO (Millipore).

3.2 Equipamentos

Para a síntese do nanocompósito (OG), do amino polietilenoglicol e funcionalização do óxido de grafeno foram utilizadas uma ultracentrífuga da marca Hitachi modelo CR 20B, centrífuga de bancada Excelsa da marca Fanem modelo 206 BL, desruptor de célula ultrassônico Unique 19 kHz 500 W, ultra sonicador da Sanderultrasonic modelo Soniclean 2PS, manta com agitação magnética e agitador com aquecimento da marca Fisatom, bomba a vácuo Biomec modelo B740/Q, balança analítica da Shimadzu modelo AUY220, evaporador rotativo modelo 802 da marca Fisatom.

O equipamento utilizado na irradiação dos nanocompósitos foi o Irradiador Multipropósito de Cobalto-60 do CTR/IPEN/CNEN-SP. Segundo a *International Atomic Energy Agency* (IAEA) essa instalação pertence à categoria IV e de acordo com a Comissão Nacional de Energia Nuclear (CNEN) está inclusa no Grupo 1 (SANTOS, 2017)[1]. A atividade atual da instalação, medida em Fevereiro de 2018, é de 14,8 PBq (400,00 kCi).

---

[1] Categoria IV: Irradiadores que mantém suas fontes radioativas armazenadas em uma piscina de água, quando não estão em uso. Grupo 1: Instalação de grande porte que utilizam fontes radioativas seladas em processos industriais induzidos por radiação.

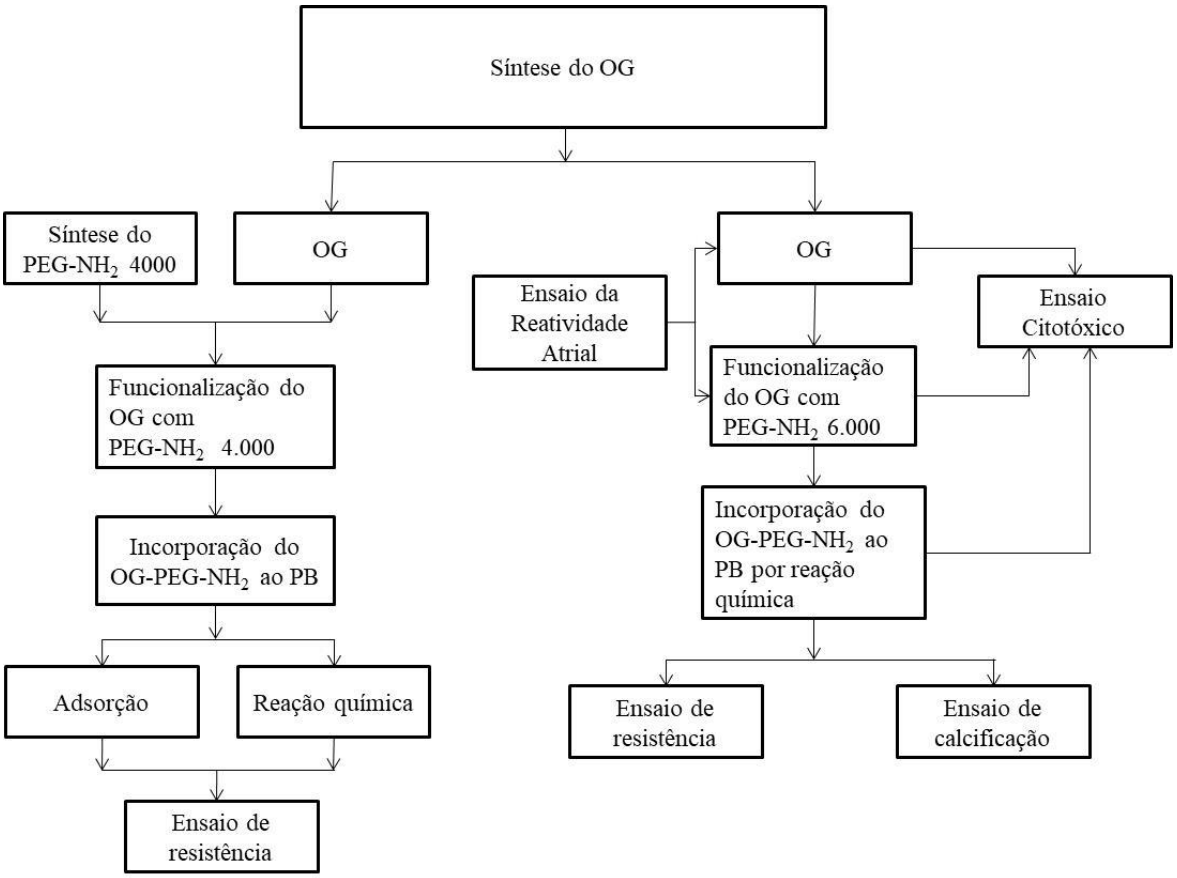
3.3 Vidrarias

Balões de fundo redondo com 3 bocas esmerilhadas de 1 L e 250 mL, balão volumétrico de 250 e 100 mL, balão de fundo redondo de 50 mL, Béqueres de 1000, 100 e 600 mL, proveta de 50 e 100 mL, condensadores de refluxo Allihn, funil de decantação de 250 e 125 mL, funil de Buchner, funil de vidro, kitassato, Erlenmeyer, termômetros, baguetas de vidro, pipetas de Pasteur, pipetas graduadas, vidro de relógio e placas de Petri.

3.4 Sínteses dos materiais

Os experimentos e ensaios realizados nesse trabalho estão estruturados nas etapas a seguir (Figura 11) e foram feitos, ao menos, em triplicata.

Figura 11 – Fluxograma dos experimentos e ensaios realizados no trabalho



Fonte: autora da dissertação

3.4.1 Síntese do óxido de grafeno (OG)

O óxido de grafeno foi sintetizado utilizando o método de Hummers modificado (HUMMERS; OFFEMAN, 1958). Em um balão de 3 bocas de 1000 mL foram adicionados 3 g de grafite, 3 g de $NaNO_3$ e 140 mL de H_2SO_4, essa mistura foi agitada num banho de gelo durante 1 h. Em seguida, 18 g de $KMnO_4$ foram adicionados lentamente mantendo a temperatura em 10 °C. Ao término da adição do permanganato de potássio, a solução foi agitada por 2 h em temperatura ambiente. Após esse período, a temperatura foi ajustada para 35 °C mantendo a agitação por mais 1 h. Ao término dessa etapa a temperatura da mistura foi elevada entre 90 até 100 °C e mantida constante por 1 h enquanto 240 mL de água deionizada foram adicionadas continuamente. Foram adicionadas mais 300 mL de água deionizada e a solução foi reservada. Em temperatura ambiente, foi adicionado à solução, 10 mL de H_2O_2 sob constante agitação. O produto da reação foi lavado sucessivamente com soluções de NaOH [1,0 M] e HCl [1,0 M] , água deionizada e centrifugado a 12.000 rpm até atingir o pH 7. A fase líquida foi extraída e ao óxido de grafite foi adicionado etanol. Essa solução foi dispersa no desruptor de célula ultrassônico e o óxido de grafeno obtido foi seco a temperatura ambiente.

3.4.2 Síntese do amino-polietilenoglicol (PEG-NH_2)

A síntese do amino-polietilenoglicol foi realizada por amidação do polietilenoglicol conforme o método adaptado descrito por MUTTER (1978). Em um balão de 250 mL foram adicionados 0,5 g de TsCl, 45 mL de diclorometano, 1 g de polietilenoglicol (PEG 4.000) e 1 mL de piridina para a obtenção do derivado de álcool tosilado. A solução foi mantida sob agitação por 12 h em temperatura ambiente. Após esse período, foi adicionado 20 mL de HCl [1M] para separação das fases. A fase orgânica foi lavada com 20 mL de água destilada e na sequência foi adicionado sulfato de sódio anidro para sua secagem. O material obtido foi filtrado e evaporado. Ao produto obtido foram adicionados 1,5 g de K-ftalimida, 30 mL de DMF e a mistura foi agitada sob N_2 a 120 °C durante 4 h e 30 min. Após esse período a solução foi resfriada e foram adicionados 200 mL de éter etílico para a precipitação do produto. O precipitado obtido foi filtrado e na sequência foram adicionados 0,5 g de sulfato de hidrazina, 0,53 g de carbonato de potássio (anidro), 20 mL de etanol. A mistura foi aquecida, agitada por 30 min. e mantida sob refluxo por 4 h, após esse tempo foi resfriada. Finalmente, foram adicionados 25 mL de

éter etílico para precipitação do produto final, o qual foi obtido por filtração. Como o PEG-NH_2 é hidrofílico, o composto foi mantido em um dessecador sob vácuo até a sua utilização.

3.4.3 Funcionalização do óxido de grafeno

A funcionalização do óxido de grafeno foi realizada por amidação empregando o amino-PEG (PEG-NH_2) como descrito por YANG et al. (2013). Em um balão de 50 mL foram adicionados 100 mg de OG, 1,8 g de NaOH e 10 mL de água deionizada e a mistura foi aquecida a 55 °C durante 4 h. Após esse período, 6 mL de HCl foram adicionados. O produto obtido foi lavado com água deionizada e recolhido após centrifugação de 10.000 rpm. O OG foi disperso em 100 mL de água deionizada, seguido pela adição de 250 mg de PEG-NH_2 4.000 M_n ou PEG-NH_2 6.000 M_n e levado para banho ultrassônico por 15 min. Na sequência, foram adicionados 50 mg de EDC e a dispersão resultante foi levada novamente para o banho ultrassônico por mais 30 min., esse processo foi repetido novamente. A solução foi mantida em agitação vigorosa à temperatura ambiente por cerca de 12 h.

O produto obtido foi centrifugado a 14.000 rpm durante 30 min. para remoção de agregados. O sobrenadante foi recolhido, lavado e centrifugado a 3.600 rpm em um filtro Amicon de 15 mL (MWCO = 10 kDa) para remoção do excesso de PEG e EDC. O produto final obtido foi uma solução de OG-PEG-NH_2 4.000 Mn ou OG-PEG-NH_2 6.000 M_n.

A escolha por trabalhar com PEG-NH_2 de diferentes tamanhos teve como objetivo diminuir a calcificação da membrana visto que na literatura é descrito que PEG-NH_2 com tamanhos a partir de 4.000 M_n inibi a absorção de cálcio (VASUDEV, CHANDY, 1999).

3.5 Método de secagem do OG-PEG-NH_2

Moléculas de água irradiadas sofrem radiólise, formando hidroxilas e hidrogênios radicais como é mostrado na equação 1.

$$H_2O \rightarrow OH^{\cdot} + H^{\cdot} \qquad (1)$$

Esses radicais são altamente reativos em decorrência da presença de átomos cuja última camada não apresenta o número de elétrons suficientes para manter a estabilidade da estrutura. Sendo assim, os radicais livres interagem quimicamente entre si ou com moléculas próximas a eles danificando-as (NOUAILHETAS, 2015).

Para evitar possíveis interações indesejáveis o OG-PEG-NH_2, inicialmente em solução, foi seco e posteriormente submetido à irradiação.

A secagem foi realizada em um liofilizador da marca Thermo Fisher disponível no Laboratório de Química Orgânica Marinha do Instituto Oceanográfico da Universidade de São Paulo (IO-USP) em colaboração com a Dra. Satie Taniguchi.

3.6 Irradiação do óxido de grafeno e óxido de grafeno funcionalizado

O OG-PEG-NH_2 foi esterilizado por radiação gama com a dose de 25 kGy e taxa de dose de 7,99 kGy/h utilizando o irradiador Multipropósito de ^{60}Co do Centro de Tecnologia das Radiações (CTR-IPEN/CNEN-SP).

As amostras de OG-PEG-NH_2 foram colocadas em recipientes de vidro com tampa de polietileno, na presença de ar, fechadas e depositadas em uma caixa de papelão. Esse material foi irradiado de forma estacionária, ou seja, alocado na câmara de irradiação em uma posição com taxa de dose conhecida. No irradiador utilizado o sistema de fontes radioativas foi deslocado do fundo da piscina de água e as fontes foram mantidas expostas na câmara de irradiação por 3 horas para que o processo seja finalizado. Para a irradiação do OG foi utilizado o mesmo procedimento.

3.7 Obtenção das membranas de pericárdio bovino

As membranas de pericárdio bovino utilizadas neste trabalho são comercializadas pela empresa Biocardio e Braile Biomédica. As membranas adquiridas são mantidas imersas em formaldeído 4% até a utilização e possuem as medidas de 12 cm x 8 cm e 11 cm x 9 cm, respectivamente.

3.8 Lavagens das membranas de pericárdio bovino

A remoção do formaldeído da membrana de pericárdio bovino foi realizada

mecanicamente por lavagens sucessivas com solução fisiológica 0,9% de cloreto de sódio (NaCl), conforme protocolo estabelecido pelo Instituto do Coração (InCor) HC-FMUSP (BORGOGNONI et al., 2010; NOGUEIRA et al., 2010).

3.9 Incorporação do óxido de grafeno funcionalizado no pericárdio bovino

O óxido de grafeno funcionalizado foi incorporado ao PB por duas vias distintas, adsorção e por reação química.

Nos ensaios de resistência utilizou-se o OG-PEG-NH_2 4.000 M_n (adsorção e reação química) e foram adicionados 4,3 mg (3% m/m) do nanomaterial ao PB de 141,7 mg.

Nos ensaios de resistência no qual foram utilizados o OG-PEG-NH_2 6.000 M_n (reação química) foram adicionados 11,5 mg (3% m/m) e 23,0 mg (6% m/m) do nanomaterial a 384,0 mg do PB.

Para o ensaio de calcificação foi utilizado o OG-PEG-NH_2 6.000 M_n (reação química) na proporção de 10% (m/m) do nanomaterial ao PB que corresponde a 7 mg e 70 mg, respectivamente.

3.9.1 Incorporação por adsorção

Foram adicionados ao pericárdio bovino uma mistura contendo 10 mL de solução salina 0,9% NaCl e 3% (m/m) de OG-PEG-NH_2 de 4.000 M_n. Para isso, a mistura foi preparada da seguinte forma: em um Béquer de 20 mL foram adicionados a solução salina e o OG-PEG-NH_2 previamente esterilizado. A mistura foi colocada em um equipamento de ondas ultrassônicas de 85 W por 40 min. em banho de gelo e temperatura ambiente para a dispersão do OG-PEG-NH_2. Na sequência, a mistura foi transferida para uma placa de Petri e o PB foi imerso. A mistura foi mantida em um equipamento de ondas ultrassônicas por 40 min. em banho de gelo e temperatura ambiente. Após essa etapa, o pericárdio foi lavado diversas vezes com solução salina para remoção do OG-PEG-NH_2 que não foi incorporado.

3.9.2 Incorporação por reação química

Na incorporação por reação química foi adicionado ao PB 8 mL de solução

salina (0,9% de NaCl) e para os materiais OG-PEG-NH_2 4.000 M_n e OG-PEG-NH_2 6.000 M_n foram incorporadas as mesmas proporções de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida (EDC).

A incorporação por reação química foi realizada de acordo com o método adaptado descrito por KANG et al. (2015). A mistura foi preparada da seguinte forma: em um béquer de 20 mL foram adicionados a solução salina e o OG-PEG-NH_2 previamente esterilizado. Na sequência, essa mistura foi colocada em equipamento de ondas ultrassônicas de 85 W por 40 min. em banho de gelo e temperatura ambiente para a dispersão do OG-PEG-NH_2. Para ativar os grupos carboxilícos do OG-PEG-NH_2 foi adicionado o 1-Etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida (EDC) e a solução foi mantida sob agitação por 15 min. Após essa etapa, a mistura foi transferida para um tubo Falcon de 10 mL e o pericárdio bovino foi imerso. A mistura foi mantida em um agitador orbital marca SP Labor com velocidade 9 sob temperatura ambiente por 6 h. No final desta etapa, a solução foi acidulada com ácido clorídrico (HCl) 0,1 M até pH em torno de 5. Finalmente, o pericárdio bovino foi lavado diversas vezes com solução salina para remoção do excesso de EDC e do OG-PEG-NH_2 que não foi incorporado.

3.10 Método de secagem das membranas de pericárdio bovino

Para as caracterizações das amostras de PB, as membranas foram liofilizadas utilizando o tratamento térmico *annealing* (BORGOGNONI et al., 2010).

Para a realização do tratamento térmico *(annealing)* as membranas de PB foram congeladas até -50 °C a 2 ºC/min. Atingida a temperatura de -50 °C, as amostras foram aquecidas até a temperatura de -20 °C e essa temperatura foi mantida fixa por 1 h. Finalmente, as amostras são congeladas até a temperatura de -50°C antes de iniciar o processo de liofilização. A secagem primária foi conduzida com temperatura de -5 ºC a uma pressão na câmara de 0,16 torr ou 1,5 bar. A secagem secundária foi conduzida com temperatura de 25 ºC sob a mesma pressão e as amostras foram mantidas nessa temperatura por 3 h antes de serem retiradas. Após a liofilização o material foi mantido em um dessecador sob vácuo para não ocorrer a absorção da umidade. A liofilização foi realizada em um liofilizador da marca Labconco no Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo (ICB-USP) em colaboração com o Dr. José Gregório Cabrera Gomez.

3.11 Técnicas de caracterização

Seguem as técnicas analíticas empregadas nas caracterizações das amostras.

3.11.1 Espectroscopia vibracional e eletrônica

Os espectros de Infravermelho com transformada de Fourier (FT-IR) foram adquiridos utilizando um espectrômetro da marca Bruker FTIR, modelo Alpha com o acessório de reflexão total atenuada (ATR). Foram realizadas 32 varreduras e os espectros foram obtidos de 4.000 a 450 cm^{-1}. Os espectros Raman foram obtidos por meio de um microscópio Renishaw inVia Reflex, equipado com câmera CCD (Renishaw, 600x400 pixels); utilizando a linha laser em 633 nm (laser de HeNe, Renishaw). As deconvoluções dos espectros Raman foram realizadas utilizando o programa GRAMS/AI^{TM} Spectroscopy Software-Thermo Fisher Scientific. Os equipamentos de FT-IR e Raman pertencem ao Laboratório de Espectroscopia Molecular do Instituto de Química da Universidade de São Paulo (IQ-USP) e os experimentos foram realizados em colaboração com a Dra. Dalva Lúcia Araújo de Faria.

Os espectros eletrônicos (UV-VIS) foram obtidos em um espectrofotômetro Lambda 25 da marca Perkin Elmer que pertence ao Laboratório de Gestão Ambiental e Resíduos do Instituto de Química da Universidade de São Paulo (IQ-USP).

Para a efetivação das espectrometrias de massas (EM), foi utilizado o equipamento MALDI TOF/TOF, modelo Ultraflextreme da marca Bruker. A matriz empregada nas análises foi de DHB- ácido 2,5 dihidroxibenzóico e os espectros foram obtidos no modo de aquisição de reflexão. O equipamento pertence a Central Analítica do Instituto de Química da Universidade de São Paulo (IQ-USP).

Para a realização das espectroscopias de fotoelétrons excitados por raios-X (XPS) foi utilizado o equipamento da marca Thermo Scientific modelo K-Alpha que possui uma fonte de raios-X-Monocromador micro focalizado, Al Kα com tamanho de ponto variável (30-400 μm em passos de 5 μm). Os espectrômetros pertencem ao Laboratório Nacional de Nanotecnologia (LNNano) situado no Centro Nacional de Pesquisas em Materiais (CNPEM), Campinas e a Universidade Federal do ABC (UFABC).

3.11.2 Estrutura cristalina

As análises por difração de raios X (DRX) foram realizadas no Centro de Combustível Nuclear (CCN-IPEN/CNEN-SP) utilizando o equipamento DRX Bruker, modelo D8ADVICE equipado com tubo de cobre (Cu), de 2º até 80ºθ, 40 KV e 30 mA, monocromator de grafite e detector de cintilação.

3.11.3 Estabilidade Térmica

As análises termogravimétricas foram realizadas sob atmosfera dinâmica de ar de 100 mL min^{-1} utilizando um analisador térmico diferencial simultâneo (STDA), que coleta dados de fluxo de calor e de variação de massa, modelo SDT Q 600 (TA Instruments – Waters L. L. C., New Castle, DE, EUA), disponível no Centro de Tecnologia das Radiações (CTR-IPEN/CNEN-SP). Amostras de aproximadamente 3,0 mg foram depositadas em cadinhos de alumina e aquecidas à razão de 10 ºC min^{-1} partindo da temperatura ambiente até 800 ºC.

3.11.4 Potencial Zeta

Os potenciais zeta foram determinados medindo a dispersão de luz eletroforética (ELS) utilizando o equipamento LitesizerTM 500 da empresa Anton-Paar.

3.11.5 Morfologia

As caracterizações morfológicas das amostras foram avaliadas por microscopia de Força Atômica (AFM) marca Park Systems, modelo MX10, constante de força de 2,8 Nm^{-1} e frequência de ressonância de 75 kHz. As imagens foram obtidas utilizando o contato intermitente e ponteira de silício revestida com Pt/Ir para as análises do OG e o OG-PEG-NH_2 e de silício para as amostras de pericárdio. As amostras de OG e OG-PEG-NH_2 foram dispersas em água deionizada (0,05 $mg.ml^{-1}$) e sonicadas por 40 min. Após esse período, as dispersões foram gotejadas sobre um porta amostra recoberto com mica e mantidas em um dessecador para secagem. O equipamento utilizado pertence ao Laboratório Nacional de Nanotecnologia (LNNano) situado no Centro Nacional de Pesquisas em Materiais (CNPEM). Além das caracterizações por AFM, foram realizadas

imagens das nanopartículas por microscopia eletrônica de transmissão (MET). Para isso, foi utilizado o procedimento de preparação das amostras descrito anteriormente, para as aquisições das imagens por AFM. O equipamento utilizado foi JEOL-JEM disponível no Centro de Ciência e Tecnologia dos Materiais (CCTM-IPEN/CNEN-SP).

3.12 Análise qualitativa

Para a caracterização do amino polietilenoglicol foi realizado o teste qualitativo com ácido nitroso conforme descrito por SHRINER (2004) *The systematic identification of organic compounds*.

Em um tubo de ensaio, adicionou-se uma pequena porção da amostra a ser analisada, nesse caso o amino-polietilenoglicol, em 2 mL de ácido clorídrico 2M. Em seguida a solução foi resfriada e mantida em banho de gelo. Em outro tubo de ensaio, preparou-se uma solução de nitrito de sódio e água destilada na concentração 0,2 g/mL. Na sequência adicionou-se 5 gotas de solução de nitrito de sódio a solução preparada anteriormente e esta foi aquecida a temperatura ambiente. A liberação imediata de gás incolor, nitrogênio, identificou a amina como primária.

3.13 Ensaios mecânicos

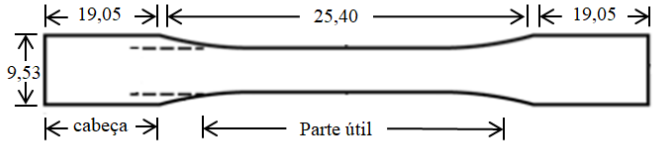
Os ensaios de caracterização mecânica das membranas de PB incorporadas com o nanocompósito OG-PEG-NH_2 e não incorporadas (controle) foram avaliadas em um equipamento de ensaio universal INSTRON, modelo 3365, utilizando o acessório BioPlus que permite que os ensaios sejam realizados com os corpos de provas imersos em uma solução fisiológica de NaCl a 0,9% a uma temperatura de 36 °C simulando o ambiente de aplicação do material.

Nos ensaios, foi verificada a deformação estática na direção uniaxial dos corpos de prova tamanho V, segundo a norma *American Society For Testing and Materials, ASTM STANDARDS–Standard Test Method for Tensile Properties of Plastics* de 2010 (ASTM D638-10) utilizando para isso, o software de análise *Bluehill 3* do INSTRON.

Para o PEG-NH_2 4.000 M_n foram avaliados 3 grupos de amostras, sendo elas, as membranas de PB incorporadas com o nanocompósito OG-PEG-NH_2 por adsorção; por

reação química e membranas que não foram incorporadas (controle). Enquanto, para o PEG-NH_2 6.000 M_n foram avaliados 3 grupos de amostras, as membranas de PB incorporadas com o nanocompósito OG-PEG-NH_2 por reação química em duas concentrações diferentes de nanomaterial e membranas que não foram incorporadas (controle). Para cada grupo, foram realizados 10 testes (n=10), sendo 5 corpos de provas (Figura 12) cortados na direção longitudinal e 5 na direção transversal das membranas. A espessura de cada amostra foi medida em 3 locais diferentes utilizando um micrômetro digital da marca Starrett.

Figura 12- Corpo de prova; medidas em mm



Fonte: Adaptado de POLAK, 2010.

As análises estatísticas dos dados obtidos nos ensaios foram realizadas através do programa GraphPad Prism 7.0 utilizando ANOVA de uma via seguida de pós testes de Kruskal-wallis onde $P < 0,05$ vs. pericárdio bovino.

Os ensaios mecânicos foram realizados no Laboratório de Bioengenharia do Instituto do coração (InCor) HC-FMUSP em colaboração com a Dra. Marina Junko Shiotsu Maizato.

3.14 Ensaios *in vitro*

3.14.1 Citotoxicidade

A determinação da citotoxicidade do OG e OG-PEG-NH_2 6.000 M_n foi realizada segundo a norma *International Organization for Standardization, Biological Evaluation of Medical Devices – Part 5: Tests for In vitro Cytotoxicity* de 2009 (ISO 10993-5) com modificações. O método empregado foi o *CellTiter96 Aqueous Non-Radioactive Cell Proliferation Assay* (Promega Corporation).

Nesses ensaios citotóxicos foi utilizado o corante 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfofenil)- 2H-tetrazolium (MTS) em associação com um agente acoplador de elétrons metassulfato de fenazina (PMS).

A leitura da absorbância do formazan pode ser medida diretamente em placas de 96 poços a 490 nm. Dessa forma, o número de células viáveis pode ser determinado pela intensidade da coloração púrpura formada.

As amostras de OG e OG-PEG-NH_2 6.000 M_n utilizadas nos ensaios foram esterilizadas por radiação gama com a dose de 25 kGy.

- Preparação das soluções de OG e OG-PEG-NH_2 6.000 M_n

Foi preparada uma solução padrão de OG e OG-PEG-NH_2 6.000 M_n com meio de cultura RPMI-1640 na concentração de 200 µg/mL, e diluições seriadas nas concentrações de 100, 70, 50, 20, e 10 µg/mL.

- Preparação dos eluídos das amostras de pericárdio

A determinação da citotoxicidade do extrato preparado a partir do PB (controle) e PB (OG-PEG-NH_2 6.000 M_n) incorporado por reação química,foi realizada segundo a norma *International Organization for Standardization* (ISO 10993-12) com modificações.

As amostras de pericárdio bovino foram cortadas nas medidas de 1 cm x 1 cm e na sequência foram preparados dois grupos de amostras, os pericárdios bovinos não tratados e após a incorporação, por reação química, do óxido de grafeno funcionalizado. Essas membranas foram mantidas em uma solução tampão fosfato com formol até a realização dos ensaios. As amostras foram lavadas com solução fisiológica, sob agitação, utilizando 100 mL de solução em cada lavagem. Foram realizadas 5 lavagens, totalizando 500 mL de solução fisiológica. Na sequência, as amostras foram transferidas para tubos cônicos de 15 mL e foi adicionado 5 mL de meio de cultura RPMI-1640 sem soro, sendo a razão entre a área de superfície das amostras e o líquido extrator de 0,2 cm^2/mL. Os eluídos foram incubados em banho-maria Dubnoff da marca Quimis a 37 °C, sob agitação na velocidade 5, pelo período de 48 horas. As diluições dos eluídos foram 100,0; 50,0; 25,0; 12,5; 6,2; 3,1 e 1,6%.

- Preparação da referência positiva:

Em um tubo cônico de 15 mL, foram adicionados 0,5 g de látex em 5 mL de meio de cultura (RPMI-1640) e mantido na estufa por 24 h. Após esse período o material foi filtrado com filtro descartável de 0,22 µm.

- Preparação da referência negativa

A solução de NaCl foi preparado com água deionizada, filtrado com filtro descartável de 0,22 µm e utilizado como controle negativo, enquanto as células cultivadas em meio de cultura (RPMI-1640) como Controle Celular (CC).

- Manutenção dos cultivos celulares

As células utilizadas nos ensaios foram de ovário de hamster chinês (CHO-KI; ATCC CCL-61), mantidas pelo Laboratório Biosintesis Ltda, aceitas e recomendadas pela Organização de Cooperação e de Desenvolvimento Econômico (OCDE, 2010). As células CHO-KI foram mantidas em meio de cultura RPMI-1640, em incubadoras com temperatura constante de 37 °C e atmosfera controlada constituída de 95% de gás oxigênio (O_2) e 5% de gás carbônico (CO_2). As culturas foram desenvolvidas de forma aderente em garrafas plásticas estéreis com 25 cm^2 de área útil. Após o crescimento de uma camada celular confluente, o meio de cultura foi descartado e as células lavadas com solução salina tamponada de fosfato (PBS) com etilenodiaminotetracetato (EDTA). Para desprender as células da garrafa foi utilizada uma solução de tripsina, essa suspensão foi transferida para um tubo cônico de 15 mL e centrifugada a 1500 rpm por 5 min. Após a centrifugação, a solução de tripsina foi descartada e as células foram ressuspensas em RPMI-1640 para obtenção de uma suspensão de aproximadamente 5.430.000 células/mL.

- Preparação das placas de cultura

Em uma placa de cultura de 96 poços foram colocados 100 µL de suspensão de células CHO, equivalente a concentração de 5.000 células viáveis por poço. Em seguida, as placas ficaram em incubação pelo período de 24 h em incubadoras com temperatura constante de 37 °C e atmosfera controlada com 5% de gás carbônico (CO_2). Após esse período, o meio de cultura foi aspirado e adicionou-se 100 µL de PBS sem EDTA para lavagens dos poços. E novamente os poços foram aspirados para retirada do PBS. Na sequência, foram adicionados 100 µL de meio de cultura com e sem as soluções testes ou eluídos diluídos, conforme descrito anteriormente, e de acordo com a designação dos

poços. As placas foram incubadas por mais 24 h. Após o período de incubação, o meio foi aspirado e foi adicionada 120 µL de solução na proporção (1:6) de MTS e PMS em meio de cultura. As placas foram novamente incubadas por 2 h e foram realizadas as leituras de absorbância.

Mediu-se a absorbância com um filtro de 490 nm no leitor de microplacas Multiskan EX da marca Thermo Electron Corporation e a viabilidade celular foi determinada pela equação 2.

$$VC\% = \left(\frac{DOamostra}{DOcontrole}\right) x\ 100 \qquad (2)$$

Adotar *VC* para viabilidade celular (%); *DO*amostra para densidade óptica da amostra e *DO*controle para densidade óptica do controle.

Os ensaios dos nanomaterias foram realizados em quadruplicatas, enquanto do material biológico em sextuplicatas, ambos de poços.

Os dados obtidos após a medição da absorbância, foram convertidos em porcentagens de viabilidade celular e analisados através do programa GraphPad Prism 7.0 utilizando ANOVA e pós testes de Bonferroni.

Os ensaios foram realizados no Centro de Biotecnologia (CEB-IPEN/CNEN-SP) em colaboração com o Dr Daniel Perez Vieira.

3.14.2 Reatividade atrial

Neste ensaio foram utilizados camundongos, de 4 a 5 semanas, os quais foram anestesiados com gás Isoflurano (5% + 95% O_2) e submetidos à eutanásia via deslocamento cervical. O coração foi cuidadosamente removido e mantido em solução Krebs-Henseleit, a 4 °C, onde o átrio direito foi cuidadosamente isolado, preservando a orientação das fibras musculares. Com o auxílio de fio de tungstênio (40 µm), as extremidades foram fixadas em cuba do miógrafo (DMT620), preenchida com a solução de Krebs-Henseleit (5 ml; 37 °C), constantemente aerada (5% de CO_2 e 95% O_2). Os tecidos cardíacos foram submetidos ao processo de lavagem em intervalos de 15 minutos durante o período de 60 minutos, ou até atingir um sinal estável de contrações.

Inicialmente, concentrações crescentes de OG ou OG funcionalizado com PEG-NH_2 6.000 M_n (1 a 600 µg/mL) foram adicionadas a cuba com período de 2 min. de

incubação a cada aplicação.

Em outro grupo de experimentos, concentrações crescentes de Norepinefrina (NE) (10^{-9}M a 10^{-4}M) e Carbacol (CCh) (10^{-11}M a 10^{-5}M) foram realizadas na presença de 100 mg de OG ou OG funcionalizado, adicionado 30 min. antes da realização das curvas concentração resposta.

Os resultados foram expressos em batimentos por minuto (BPM), como ΔBPM ou como percentagem de batimento (% BPM) quando apropriado, e a concentração do agonista que induz metade da resposta máxima EC_{50}, foi expressa como pD2, sendo esta calculada a partir das curvas concentração-resposta. Para cada curva concentração resposta, a resposta máxima e pD2 foram calculadas utilizando-se a análise de regressão não-linear (GraphPad-Prism, versão 5 Software).

Os experimentos de reatividade atrial foram realizados no Laboratório de Farmacologia dos Radicais Livres, Inflamação e Dor, do Departamento de Farmacologia do Instituto de Ciências Biomédicas, USP. O protocolo experimental seguiu as orientações descritas no protocolo CEUA-USP número 48/2016, em nome da Professora colaboradora Soraia Katia Pereira Costa.

3.14.3 Calcificação

As lavagens e incorporações das amostras de PB foram realizadas conforme metodologia descrita nas seções 3.7 e 3.8, respectivamente. Nesse ensaio, para a incorporação do biomaterial foram adicionados 10% (m/m) do nanomaterial ao PB que corresponde a 7 mg e 70 mg, respectivamente.

As amostras de PB de 1 cm^2 foram liofilizadas e transferidas para tubos cônicos (15 ml) que continham 10 mL de fluído corpóreo simulado (SBF) e mantidas em banho termostatizado a 37 °C, sob agitação, em tempos experimentais de 7, 15, 30, 60 dias, realizadas em quadruplicata. As amostras foram mantidas completamente imersas e os volumes de SBF utilizados no ensaio foram calculados por meio da equação 3, conforme KOKUBO; TAKADAMA, (2006).

$$Vs = \frac{Sa}{10} \tag{3}$$

Adotar *Vs* como volume de SBF (mL) e *Sa* como área superficial da amostra (mm^2).

A solução de SBF foi preparada conforme a metodologia desenvolvida por BOHNER e LEMAITRE (2009), na qual descreve um modo alternativo de preparação de solução de SBF que reduz o risco de precipitação prematura da hidroxiapatita, consistindo do preparo de duas soluções A e B, conforme tabela 2.

Tabela 2 - Composição do SBF

	Massa (g)	
Reagentes	**Solução A**	**Solução B**
NaCl	6,21	6,21
$NaHCO_3$	5,94	
KCl	0,45	
$K_2HPO_4.3H_2O$	0,46	
$MgCl_2.6H_2O$	0,62	
$CaCl_2$		0,58
Na_2SO_4	0,14	
	Volumes de HCl (mL)	
HCl	0,85	0,85

Fonte: Adaptado de BOHNER; LEMAITRE, 2009.

Após o teste de calcificação as amostras foram liofilizadas, colocadas em "*stubs*", cobertas com uma fina camada de carbono e encaminhadas ao microscópio eletrônico de varredura JEOL-JSM 6710F, com tensão de 15 Kv.

As análises estatísticas dos dados obtidos nos ensaios foram realizadas através do programa GraphPad Prism 7.0 utilizando ANOVA de duas via seguida de pós testes de Bonferroni.

Os biomateriais incorporados com o nanocompósito foram preparados para o ensaio de calcificação na Universidade Federal do Ceará em colaboração com o Dr. Rodrigo Silveira Vieira. As análises das amostras foram realizadas por Microscopia Eletrônica de Varredura acoplada com Espectroscopia por Dispersão de Energia de Raios disponível no Centro de Ciência e Tecnologia dos Materiais (CCTM-IPEN/CNEN-SP).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Síntese do óxido de grafeno

Na síntese do OG pelo método Hummers modificado (HUMMERS; OFFEMAN, 1958), foram utilizados os reagentes apresentados na Tabela 3 com as suas devidas funções.

Tabela 3 - Reagentes utilizados na síntese do OG

Reagentes	Função
Grafite	Precursor do OG
Nitrato de sódio	Aumentar a taxa de oxidação
Ácido sulfúrico	Auxilia no aumento do espaçamento entre as camadas da grafite
Permanganato de potássio	Agente oxidante
Peróxido de hidrogênio	Remoção de impurezas relacionadas ao $KMnO_4$ e ao MnO4
Hidróxido de sódio	Solubilizar e remover partículas aderidas
Ácido clorídrico	Remover SO_4^{2-}

Fonte: Adaptado de PENDOLINO; ARMATA, 2017.

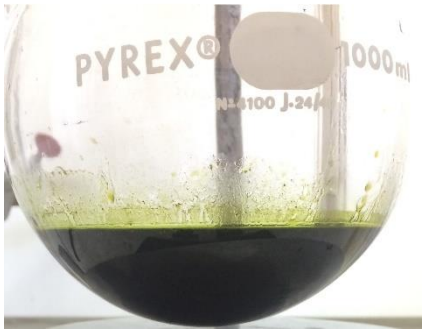
A grafite foi oxidada em ácido sulfúrico concentrado com permanganato de potássio. Embora o permanganato seja um agente oxidante forte, a espécie ativa é o heptóxido de di-manganês (Mn_2O_7), formado a partir da ativação do ânion permanganato (MnO^-_4) pelo ácido, conforme representado pelas equações 3 e 4 (GAO, 2015).

$$KMnO_4 + 3H_2SO_4 \rightarrow K^+ + MnO_3^+ + H_2O^+ + 3HSO_4^- \quad (3)$$

$$MnO_3^+ + MnO_4^- \rightarrow Mn_2O_7 \quad (4)$$

A presença do Mn_2O_7 pode ser confirmada pela coloração verde-petróleo da solução após a adição do $KMnO_4$ no meio reacional contendo ácido, conforme é mostrado na Figura 13.

Figura 13- Obtenção do $KMnO_4$ na síntese do OG



Fonte: autora da dissertação

O Mn_2O_7 em meio ácido e a quente (condições para uma oxidação energética) se decompõe, resultando como um dos produtos o oxigênio. Além disso, a oxidação dos alcenos presentes na estrutura da grafite também é mais energética pois as duas ligações da dupla ligação são rompidas e os átomos de oxigênio se ligam ao carbono podendo gerar produtos como cetonas, ácidos carboxílicos dentre outros (SKAKALOVÁ; KAISER, 2014).

Compostos à base de óxido de manganês são importantes nessa síntese, pois levam a oxidação de álcoois a carbonilas e carboxilas (DREYER, et al., 2014).

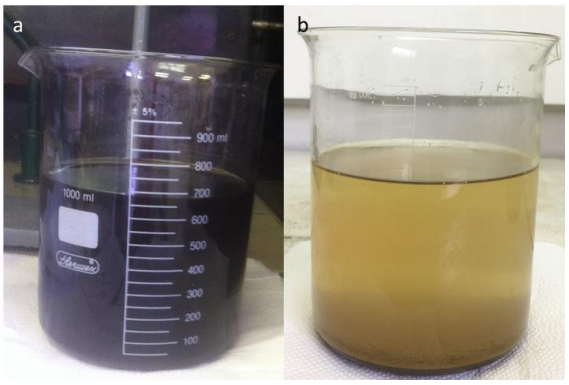
Outro oxidante adicionado ao processo foi o NO^-_3, que permitiu o aumento da distância entre as camadas da grafite, facilitando a oxidação dos planos basais (CHOWDHURY; SINGH; PAUL, 2014).

Para a remoção do $KMnO_4$ excedente foi adicionado o H_2O_2. O peróxido de hidrogênio atua como agente redutor em processos de oxi-redução como é apresentado na equação 4.

$$KMnO_4 + H_2SO_4 + H_2O_2 \rightarrow K_2SO_4 + H_2O + O_2 + MnSO_4 \quad (4)$$

Pode-se observar nessa fase da síntese uma mudança de cor da solução do preto para o amarelo (Figura 14).

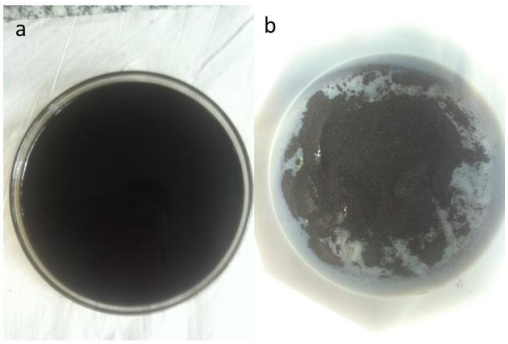
Figura 14 – OG após a síntese. OG logo após a síntese (a) e 12 horas após (b).



Fonte: autora da dissertação

As lavagens com NaOH contribuíram no aumento do espaçamento entre as camadas do OG, pois as hidroxilas (OH^-) aumentaram a repulsão entre as camadas do nanomaterial (KABEL et al., 2015). Além disso, a lavagem com a base foi utilizada para neutralizar o resíduo ácido da síntese. Na sequência, a lavagem foi realizada com HCl para remover partículas aderidas. Finalmente, para o processo de esfoliação o OG foi submetido ao tratamento com ondas ultrassônicas, seco a temperatura ambiente e macerado (Figura 15).

Figura 15 – OG em solução e pó. OG secando (a) e OG macerado (b).



Fonte: autora da dissertação

Em conjunto, os resultados sugerem a obtenção do OG devido às mudanças de colorações das soluções após a adição do H_2O_2 que estão respectivamente, de acordo com a literatura (DIMIEV; TOUR, 2014; CHOWDHURY; SINGH; PAUL, 2014).

4.2 Esterilização do óxido de grafeno

Como o óxido de grafeno será incorporado em dispositivos biológicos, viu-se necessária a sua esterilização.

A esterilização utilizando o processo de radiação gama é segura, limpa e fácil de manusear quando comparada com outros métodos como vapor, calor seco e óxido de etileno (WU, 2019). A dose mínima absorvida considerada adequada para fins de esterilização de produtos na área farmacêutica e biomédica e que não requer qualquer validação biológica é de 25 kGy (DORATI et al., 2005). Portanto, devido às vantagens apresentadas adotou-se, neste estudo a esterilização por raios-gama dos nanocompósitos.

4.3 Caracterização do óxido de grafeno

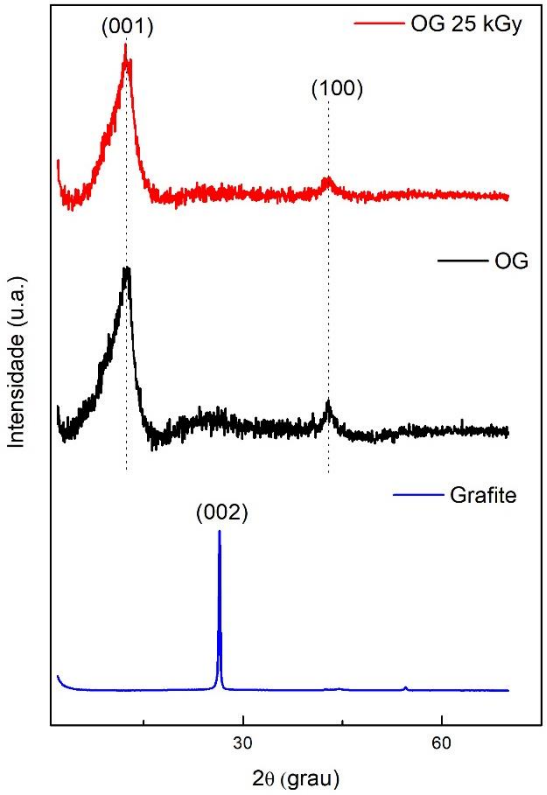
Após a esterilização com radiação gama, as caracterizações do OG e OG irradiado a 25 kGy (OG 25 kGy) foram realizadas por DRX, FT-IR e Raman.

4.3.1 Difração de raios-X (DRX)

As análises por difração de raios X (DRX) foram empregadas na determinação do cálculo das distâncias interplanares e na estimativa do número de planos empilhados.

No difratograma a grafite apresentou o pico de reflexão do plano basal (002) intenso a $2\theta = 26,5°$ (ângulo de Bragg). Nos difratogramas tanto do OG como do OG 25 kGy, esse pico foi deslocado para 11,9°e é atribuído ao conjunto de planos (001) que está relacionado à expansão das camadas da grafite devido à inserção de grupos funcionais oxigenados (LI et al., 2014; JAURIS et al., 2016). Observou-se também o pico $2\theta = 42,8°$ característico ao plano de reflexão (100) (Figura 16). Esses deslocamentos podem ser influenciados pelo grau de oxidação do OG (GAO, 2015).

Figura 16- Difratogramas do OG, OG 25 kGy e grafite



Fonte: autora da dissertação

Quanto menor o valor de 2θ, maior é a distância entre um plano cristalino e outro, o que corresponde a distância entre as camadas no OG (GEORGAKILAS, 2014). Os cálculos dos espaçamentos entre as camadas e o número de camadas da grafite, OG e OG 25 kGy podem ser calculados usando a lei de Bragg (equação 5) e a equação de Scherrer (equação 6).

$$n\lambda = 2d sen\theta \qquad (5)$$

onde,

λ = comprimento de onda da radiação incidente;

d = distância interplanar para o conjunto de planos *hkl* (índices de Miller) da estrutura cristalina e,

θ = ângulo de Bragg.

$$D = K\lambda/\beta cos\theta \qquad (6)$$

Onde,

D = tamanho dos cristalitos;

k = fator de forma, adota-se 0,9;

λ = o comprimento de onda dos raios X incidentes;

β = a largura a meia altura do pico obtido e,

θ = o ângulo de Bragg.

Um número estimado de camadas da grafite e do OG é obtido por $n\lambda/D$.

Os ângulos de Bragg, os espaçamentos entre as camadas e os números de camadas cristalinas das amostras analisadas estão apresentados na Tabela 4.

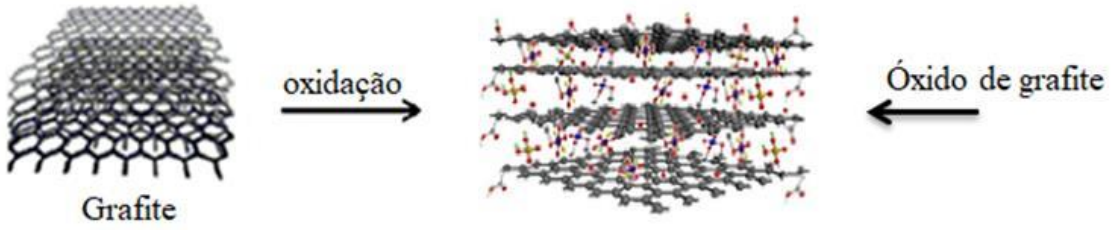
Tabela 4 - Ângulos de Bragg, os espaçamentos entre as camadas e os números de camadas cristalinas das amostras de grafite, OG e OG 25 kGy por DRX

Amostras	2θ	Espaçamento entre as camadas (nm)	Camadas cristalinas
Grafite	26,5°	0,336	108
OG	11,9°	0,755	6
OG 25 kGy	11,9°	0,717	6

Fonte: autora da dissertação

O valor encontrado do espaçamento entre as camadas é maior no OG e OG 25 kGy em relação ao grafite devido à introdução de grupos oxigenados, como epóxi, hidroxilas, carbonila e carboxila (CHEN et al., 2018), conforme observado na Figura 17.

Figura17- Introdução de grupos oxigenados ao grafite



Fonte: Adaptado de YU, 2016.

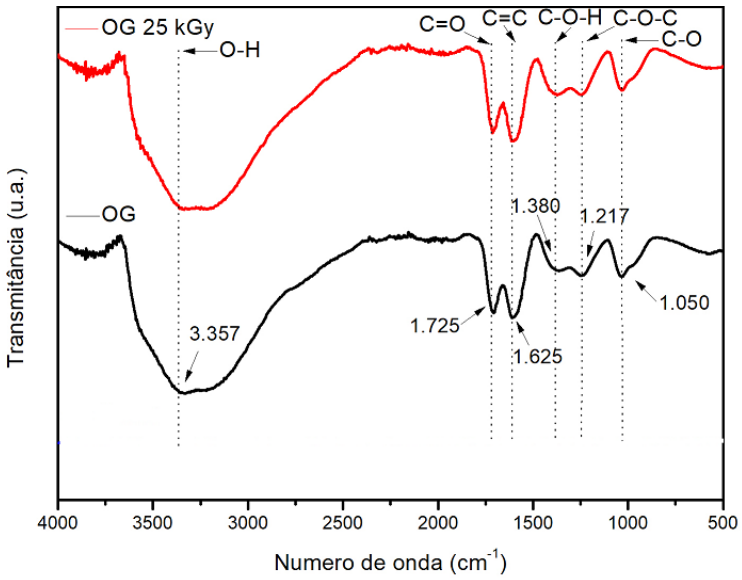
Observou-se também que a radiação gama utilizada na esterilização do OG não alterou o número de camadas e a estrutura cristalina deste nanomaterial.

4.3.2 Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FT-IR)

A espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FT-IR) estuda a vibração das ligações dos átomos de uma molécula de um grupo funcional, que absorvem energia em frequências específicas, quando expostos a região do infra vermelho (ZHAO; LIU; LI, 2015).

Segundo ZHAO et al. (2015) o OG possui no seu espectro quatro bandas principais que correspondem aos grupos das hidroxilas, carbonilas, carboxilas e epóxi conforme é mostrado na Figura 18.

Figura 18- Espectros de infravermelho com transformada de Fourier do OG e OG 25 kGy



Fonte: autora da dissertação

Esses grupos funcionais com seus respectivos modos de vibração são apresentados na Tabela 5.

Tabela 5- Bandas presentes no OG

Banda (cm^{-1})	Grupo funcional e tipo de vibração
2.800 à 4.000	C-OH, H_2O, O-H; bandas sobrepostas. Alongamento do OH.
1.725	C=O; vibração de estiramento de carbonila de grupos carboxílicos.
1.615	C=C; vibrações de regiões não oxidadas.
1.380	C-O-H; vibração de estiramento.
1.217	C-O-C; dublete relacionado ao grupo epóxido.
1.050	C-O; vibração de estiramento.

Fonte: autora da dissertação

As bandas atribuídas aos grupos oxigenados confirmam a oxidação da grafite. Observou-se também que não houve diferença nos deslocamentos das bandas quando o OG foi esterilizado a 25 kGy.

4.3.3 Espectroscopia Raman

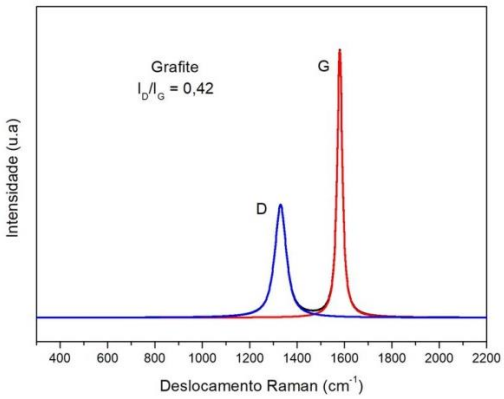
A técnica Raman mede o espalhamento inelástico da luz, quando essa interage com a matéria, sendo possível confirmar a presença de defeitos na rede cristalina do material nas amostras analisadas (ZHENG; KIM, 2015).

O espectro da grafite apresenta a banda D fraca em 1.328 cm^{-1} que indica o grau de desordem do nanomaterial, a banda G proeminente em 1.581 cm^{-1} corresponde aos carbonos aromáticos com hibridização sp^2. Nos espectros encontrados para o OG e OG 25 kGy podemos identificar a banda D em 1.337 cm^{-1} e a banda G em 1.595 cm^{-1}. Durante a oxidação da grafite a banda G em 1.581 cm^{-1} é deslocada para 1.595 cm^{-1} e a banda D possui maior intensidade no OG e OG 25 kGy em relação a grafite. Esse aumento na intensidade pode ser atribuído à formação de defeitos e desordem como a presença de heteroátomos no plano, neste caso o oxigênio (ZHAO; LIU; LI, 2015).

A relação I_D/I_G reflete a desordem gerada pela imperfeição estrutural do material (ZHENG; KIM, 2015). Após a deconvolução das bandas D e G, foram calculadas

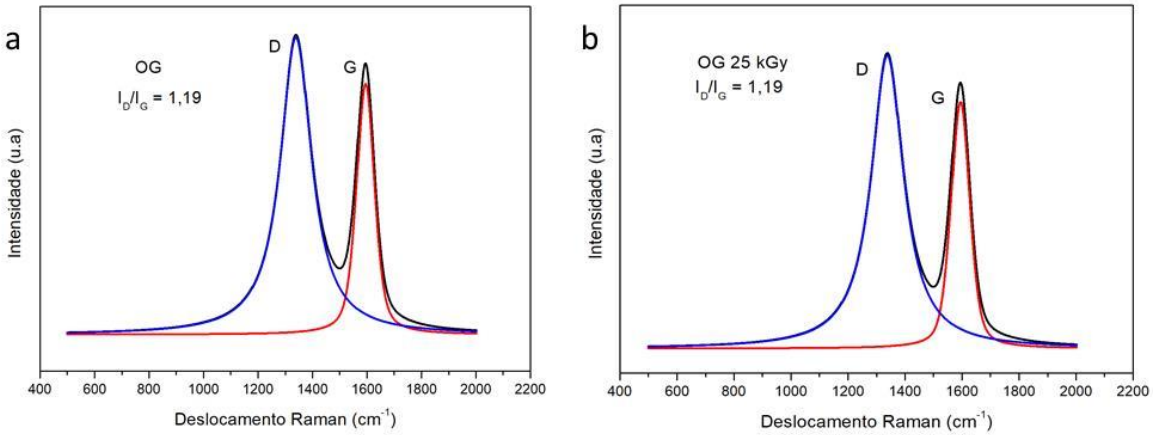
as relações I_D/I_G para a grafite, OG e OG 25 kGy e os valores encontrados foram respectivamente 0,42, 1,19 e 1,19, como mostram as Figura 19 e 20.

Figura 19- Deconvolução do espectro raman da grafite



Fonte: autora da dissertação

Figura 20- Deconvoluções dos espectros raman do OG e OG 25 kGy



Fonte: autora da dissertação

O aumento nos valores encontrados nos resultados para I_D/I_G do OG e OG 25 kGy em relação a grafite, indica maior grau de oxidação e a formação de defeitos na malha da grafite, que de acordo com YU et al., 2016 corresponde aos contornos de grãos, que trata-se de um desalinhamento entre cristais sólidos vizinhos na mesma fase, entre outros defeitos. Neste caso, o valor de I_D/I_G calculados para o OG e OG 25 kGy indicaram o mesmo grau de oxidação e formação de defeitos.

4.3.4 Caracterizações do OG irradiado

As análises realizadas por DRX, FT-IR e Raman indicaram que a dose de radiação de 25 kGy utilizada para a esterilização do OG não alterou sua estrutura cristalina, não modificou os grupos funcionais oxigenados presentes na superfície do nanomaterial e não gerou mais defeitos.

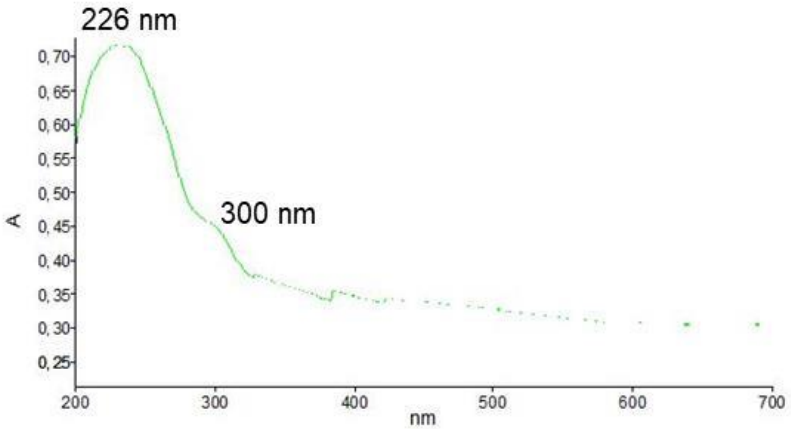
Confirmado a viabilidade do processo de irradiação dos nanomateriais, as caracterizações, UV-VIS, TGA, XPS, potencial zeta, tamanho de partícula, MET e AFM serão realizadas apenas para o OG 25 kGy.

4.3.5 Espectroscopia ultravioleta-visível (UV-VIS)

A espectroscopia no ultravioleta-visível consiste em um dos métodos analíticos mais utilizados para medidas diretas de espécies que absorvem radiação em determinado comprimento de onda. O espectro de UV-VIS foi empregado na identificação, através dos seus picos característicos de absorção, das ligações químicas presentes no OG 25 kGy (YANG et al., 2013).

No espectro realizado por UV-VIS verificou-se para o OG 25 kGy a presença de duas bandas. Uma banda em 226 nm relacionada à transição π-π * de ligações C-C dos anéis aromáticos e outra em aproximadamente 300 nm associada a transição n-π* de ligações C=O (MEHL et al., 2014). A Figura 21 apresenta o espectro de ultravioleta-visível do OG 25 kGy.

Figura 21- Espectro ultravioleta-visível do OG 25 kGy



Fonte: autora da dissertação

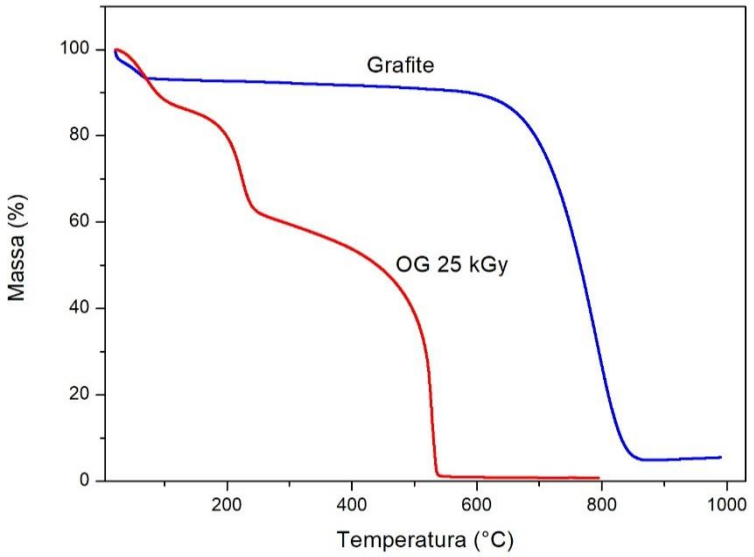
De acordo com estudos realizados por YANG et al. (2013) os picos característicos de absorção para o OG estão em aproximadamente 230 e 300 nm e que estão de acordo com os valores encontrados.

4.3.6 Termogravimetria (TGA)

A análise realizada por termogravimetria avaliou as estabilidades térmicas da grafite e do OG 25 kGy.

A combustão da grafite ocorre em apenas uma fase, enquanto para o OG 25 kGy observam-se três estágios de perda de massa em função do aumento da temperatura, com taxa de aquecimento constante, como mostra a Figura 22.

Figura 22- Curvas termogravimétricas da grafite e do OG 25 kGy



Fonte: autora da dissertação

No primeiro estágio na temperatura de 100 °C houve uma variação de massa devido à perda de moléculas de água (SONG; WANG; CHANG, 2014). Segundo SONG et al. (2014) a decomposição térmica de grupos funcionais oxigenados do OG ocorre a uma temperatura de 150°C a 225°C que, corresponde ao segundo estágio. Finalmente, no último estágio, ocorre a combustão do esqueleto de carbono a 550 °C. As perdas de massa do OG 25 kGy para cada estágio, são apresentadas na Tabela 6.

Tabela 6 – Perda de massa do OG 25 kGy em diferentes temperaturas

Temperaturas	100°C	150°C a 225°C	550°C
Perdas de massa	11,17 %	25,69 %	62,06 %

Fonte: autora da dissertação

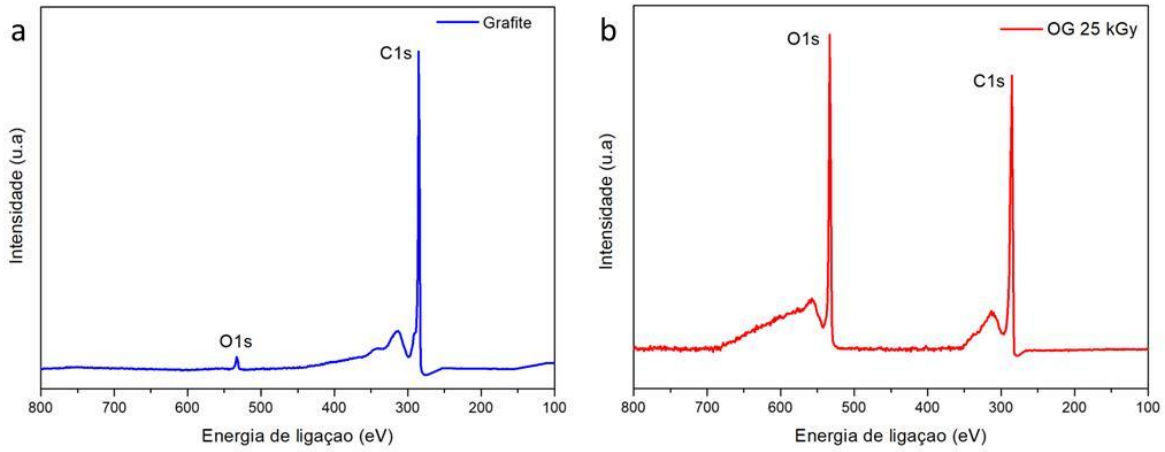
A combustão da grafite inicia-se em 650 °C enquanto o OG 25 kGy é decomposto totalmente em aproximadamente a 550 °C. A temperatura de combustão inferior do OG 25 kGy demonstra estabilidade menor desse material em comparação com a grafite. Além disso, a temperatura de combustão do OG também é influenciada pelo processo de esfoliação, que permite melhor acesso do ar às camadas do nanomaterial, o que não ocorre com a grafite onde o número de camadas é superior e a distância interplanar é menor que do OG (GEORGAKILAS, 2014).

4.3.7 Espectroscopia de fotoelétrons excitados por raios-X (XPS)

A espectroscopia de fotoelétrons excitados por raios X é uma técnica que fornece informações como a composição elementar, fórmula empírica de materiais puros, estados de ligação química do elemento dentre outros (ZHAO; LIU; LI, 2015).

No caso, os espectros de XPS foram obtidos das amostras de grafite e OG 25 kGy para identificação dos elementos químicos carbono (C) e oxigênio (O) nos picos de foto emissão, respectivamente em 286,08 eV e 533,08 eV (Figura 23).

Figura 23- Espectros de XPS da Grafite e do OG 25 kGy



Fonte: autora da dissertação

Nas duas amostras analisadas observa-se um pico de foto emissão em 284,5 eV

que está associado a ligações entre carbonos hibridizados em sp^2 de sistemas π altamente conjugados. Traços de oxigênio foram encontrados no espectro da grafite, indicando impureza do material, enquanto o pico do oxigênio para o OG 25 kGy é intenso comprovando a oxidação da grafite. Cada elemento químico identificado foi quantificado em porcentagem (%) como é apresentado na Tabela 7.

Tabela 7- Quantificação dos elementos químicos presentes na grafite e no OG 25kGy

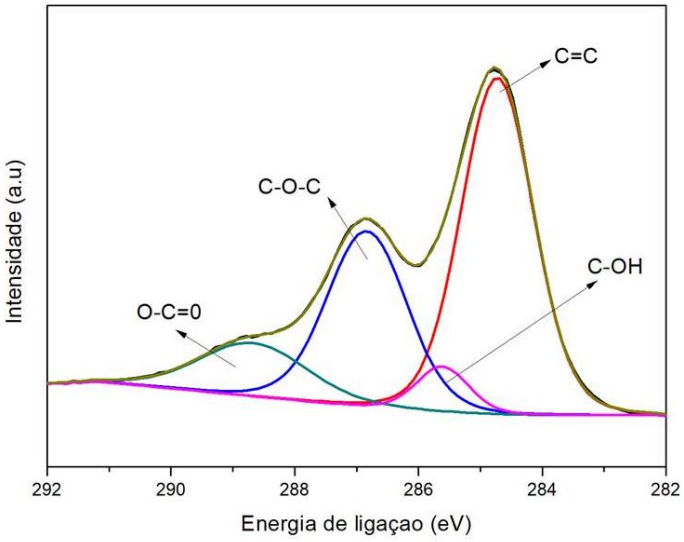
Amostras	Carbono (%)	Oxigênio (%)
Grafite	97,79	2,21
OG 25 kGy	72,33	27,67

Fonte: autora da dissertação

Após o processo de oxidação houve uma redução de carbono e aumento de oxigênio de 25,46%. Com os valores obtidos foi calculada a razão entre C/O igual a 2,6. De acordo com a literatura, a razão C/O para o óxido de grafeno varia de 2,1-2,6 (STOBINSKI et al., 2014).

O espectro de foto elétrons excitados por raios X do C(1s) foi deconvoluído em quatro picos de energia de ligação (Figura 24), centralizados em 284,7 eV, 285,6 eV, 286,8 eV, e 288,7 eV que correspondem respectivamente as ligações C=C, C-OH, C-O-C e O-C=O (CHEN et al., 2018).

Figura 24- Deconvolução do espectro C(1s) do OG 25 kGy



Fonte: autora da dissertação

A ligação C=C é atribuída à hibridização do carbono do tipo sp^2, enquanto as

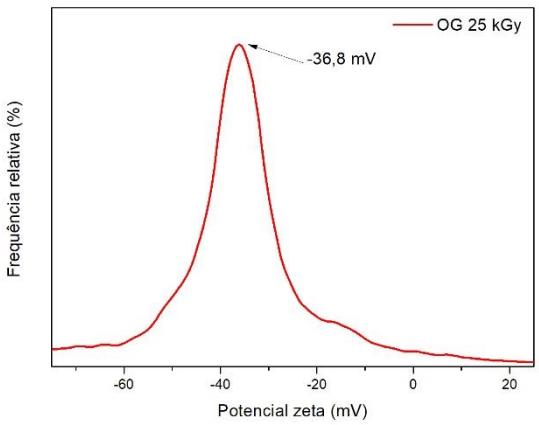
ligações C-OH, C-O-C e O-C=O referem-se aos grupos hidroxila, epóxido e carboxila respectivamente (BASCORO et al., 2018).

4.3.8 Potencial Zeta

O potencial zeta é um parâmetro importante na caracterização da estabilidade de dispersões coloidais. É uma técnica que fornece a medida de magnitude e sinal da carga superficial associada à partícula coloidal. Uma partícula coloidal apresenta uma camada elétrica fortemente ligada à superfície da partícula e uma camada externa difusa, formando o que se chama de potencial de dupla camada. O potencial zeta é o potencial no plano de deslizamento de uma partícula coloidal movendo-se sob o campo elétrico, reflete a diferença de potencial entre a dupla camada de partículas móveis eletroforeticamente e a camada dispersante ao redor deles no plano de escorregamento (KONKENA; VASUDEVAN, 2012).

O valor do potencial zeta medido da superfície do OG 25 kGy foi -36,75 mV como demonstrado na Figura 25.

Figura 25- Potencial zeta do OG 25 kGy



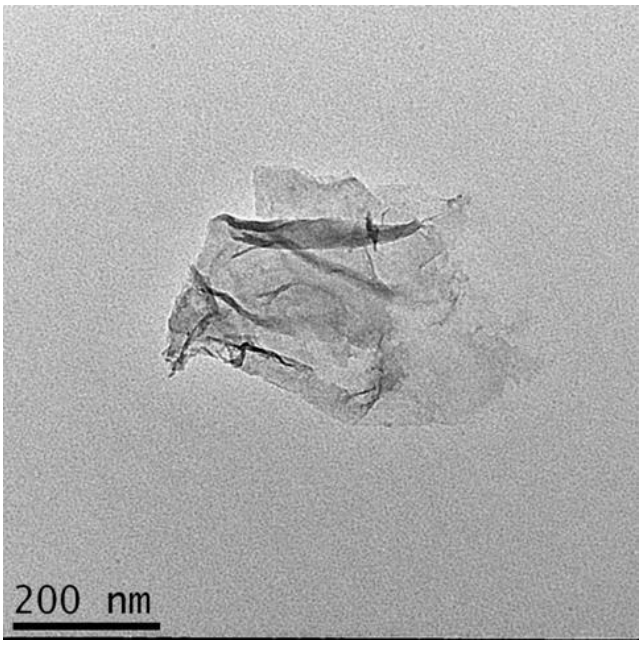
Fonte: autora da dissertação

Após a medição do potencial zeta foi medido o pH da dispersão e o valor encontrado foi 6, demonstrando sua estabilidade, pois de acordo com a literatura o OG é mais estável em soluções aquosas com valores de pH acima de 4, e isso ocorre devido à presença de carboxilatos nas bordas do nanomaterial que em suspensão aquosa é carregado negativamente (ZHUANG et al., 2016).

4.3.9 Microscopia eletrônica de transmissão (MET) e microscopia de força atômica (AFM)

A microscopia eletrônica de transmissão (MET) é uma técnica comum utilizada na visualização da superfície do OG. Na imagem de transmissão conforme mostra a Figura 26, podemos observar áreas de maior transparência indicando filmes mais finos ou com poucas camadas e áreas escuras com várias camadas empilhadas.

Figura 26- Imagem de microscopia eletrônica de transmissão do OG.



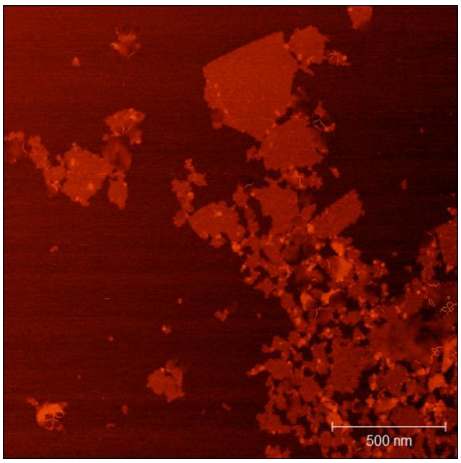
Fonte: autora da dissertação

Quanto maior o nível de oxidação, mais facilmente as amostras de OG são esfoliadas após o tratamento ultrassônico tornando-as mais transparentes (ZHAO; LIU; LI, 2015).

A microscopia de força atômica (AFM) foi a primeira técnica de imagem a identificar opticamente que o grafeno é uma monocamada de um átomo de espessura (GEORGAKILAS, 2014).

Na imagem realizada do OG 25 kGy por AFM observamos a presença do nanomaterial com distintas formas, tamanhos e alturas. A diferença no contraste das cores revelou as camadas do OG 25 kGy (Figura 27).

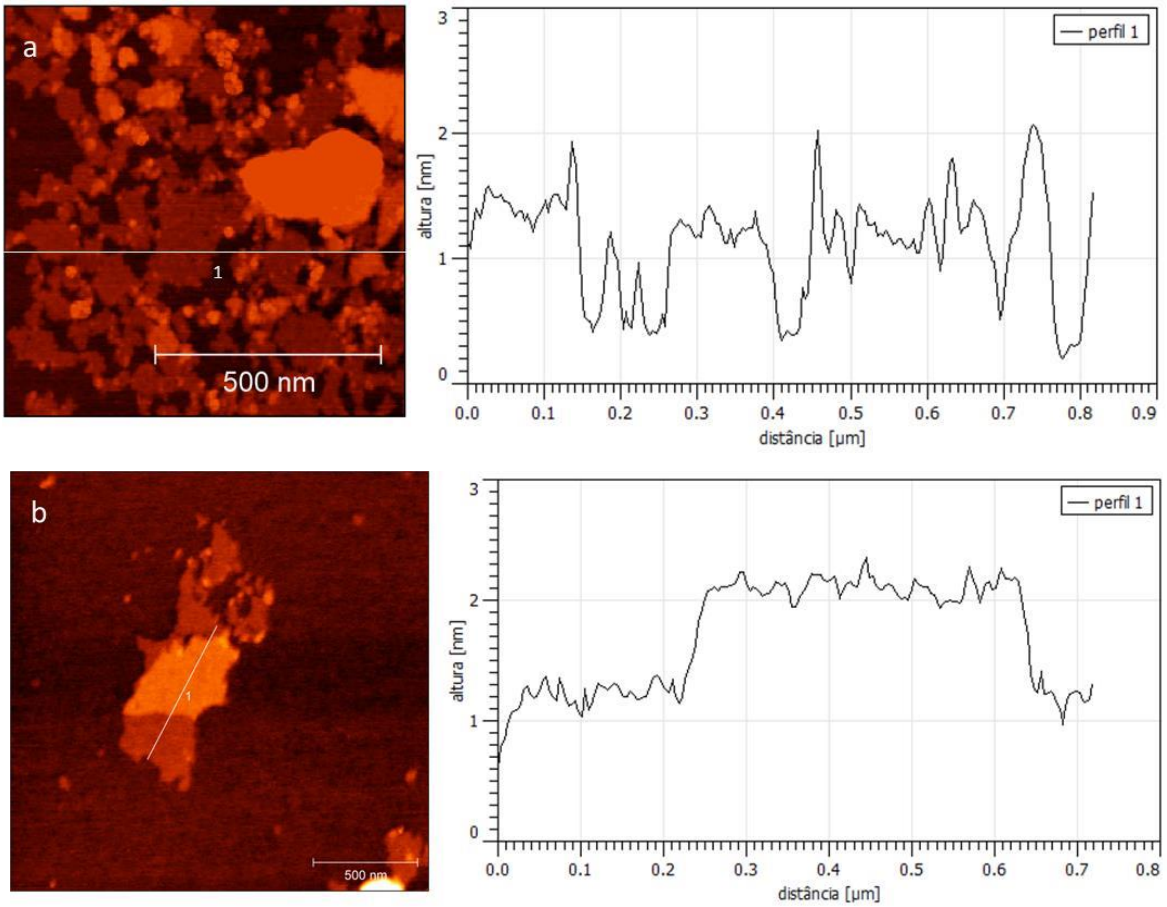
Figura 27- Imagem de microscopia de força atômica do OG 25 kGy



Fonte: autora da dissertação

Nas imagens do OG 25 kGy realizadas a partir da mesma amostra apresentada na Figura 28 foram realizados perfis das altura das camadas, em destaque, indicado pelo número 1.

Figura 28- Perfis de alturas de diferentes camadas do OG 25 kGy (a; b)



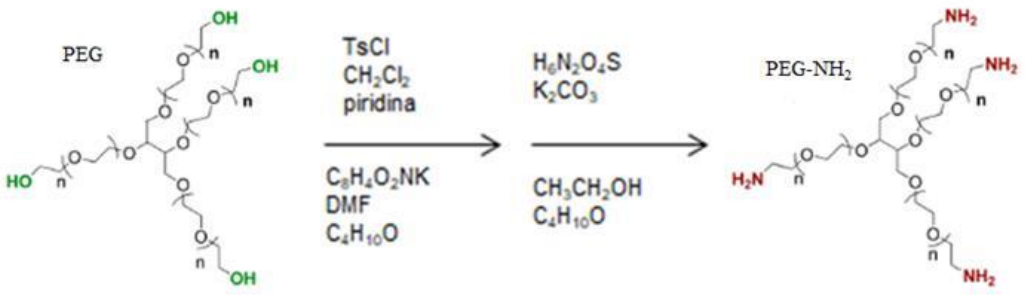
Fonte: autora da dissertação

Nos perfis traçados para as amostras de OG 25 kGy observamos que os alturas das camadas variam entre 1,5 a 2 nm. De acordo com a literatura, as alturas de uma monocamada, bicamada e tricamada do OG medem respectivamente 1,6; 2,6 e 3,6 nm (FROST et al., 2012).

4.4 Síntese do amino-polietilenoglicol 4.000 M_n

Para aumentar a biocompatibilidade do OG foi realizada a funcionalização com o amino-polietilenoglicol (XU et al., 2014). Como a esterificação direta do OG com ácido forte como o sulfúrico (H_2SO_4) e polietilenoglicol (PEG) é extremamente exotérmica, e poderia levar a degradação do nanomaterial, decidiu-se realizar a amidação do OG com PEG-NH_2, pois essa reação ocorre em condições mais brandas (XU et al., 2014) (Figura 29). Sendo assim, foi necessário sintetizar o amino-polietilenoglicol pela síntese de Gabriel ((SHRINER et al., 1999).

Figura 29- Esquema da síntese do amino-polietilenoglicol pela síntese de Gabriel

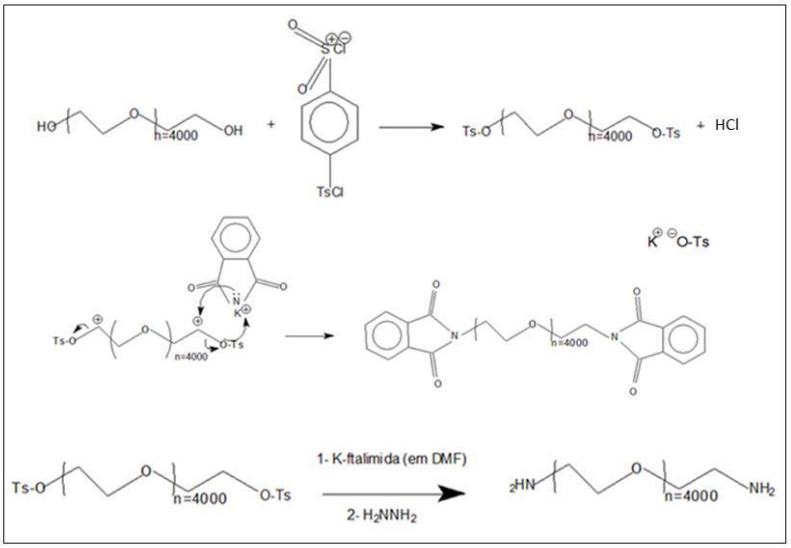


Fonte: Adaptado de XU et al., 2014.

Quanto ao mecanismo, a reação ocorre por substituição nucleofílica bimolecular (SN_2). Na primeira etapa utiliza-se o tosilo (Ts) que é um ótimo grupo de saída, uma base fraca de Lewis, o qual possui uma carga negativa deslocada que é estabilizada por ressonância e pode ser atacado por nucleófilos. A reação ocorre na presença de diclorometano (CH_2Cl_2), um bom solvente para compostos polares e a piridina que funciona como um contra-íon no meio. Na segunda fase, a reação ocorre em solvente polar aprótico dimetilformamida (DMF), que solubiliza os reagentes e não interfere no caráter nucleófilo da ftalimida, que fica livre para reagir com o oxigênio do polietilenoglicol. É formado um composto diimídico na presença da hidrazina que sofre

uma clivagem em grupos mais estáveis (VOLLHARDT; SCHORE, 2013). A Figura 30 mostra o mecanismo da síntese do PEG-NH_2.

Figura 30- Mecanismo da síntese do amino-polietilenoglicol



Fonte: Adaptado de XU et al., 2014.

4.4.1 Caracterização do amino-polietilenoglicol 4.000 M_n

Na caracterização do PEG-NH_2 foi realizado um teste qualitativo com ácido nitroso. Esse teste permite a distinção de aminas primárias, secundárias, terciárias, alifática e aromática.

Ao entrarem em contato com o ácido nitroso as aminas primárias formam íons diazônicos, que são instáveis, se decompõem e liberam gás nitrogênio incolor (N_2) como mostra a equação 7 (SHRINER et al., 1999).

$$R - NH_2 + NaNO_2 + 2HCl \rightarrow [R - N \equiv NCl] + NaCl + 2H_2O \qquad (7)$$

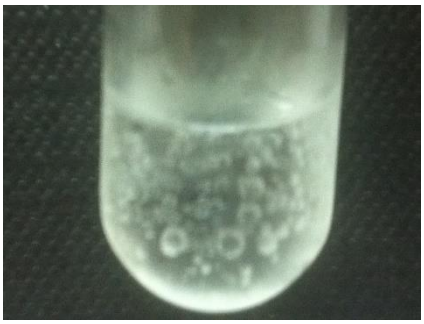
Sal de diazônio alifático
(Instável)

$$\downarrow -N_2 \nearrow$$

$$R^+Cl^- \longrightarrow$$ Alceno, álcool, Haleto de alquila

Na análise da amostra houve desprendimento de N_2 caracterizando-a como uma amina primária como mostra a Figura 31.

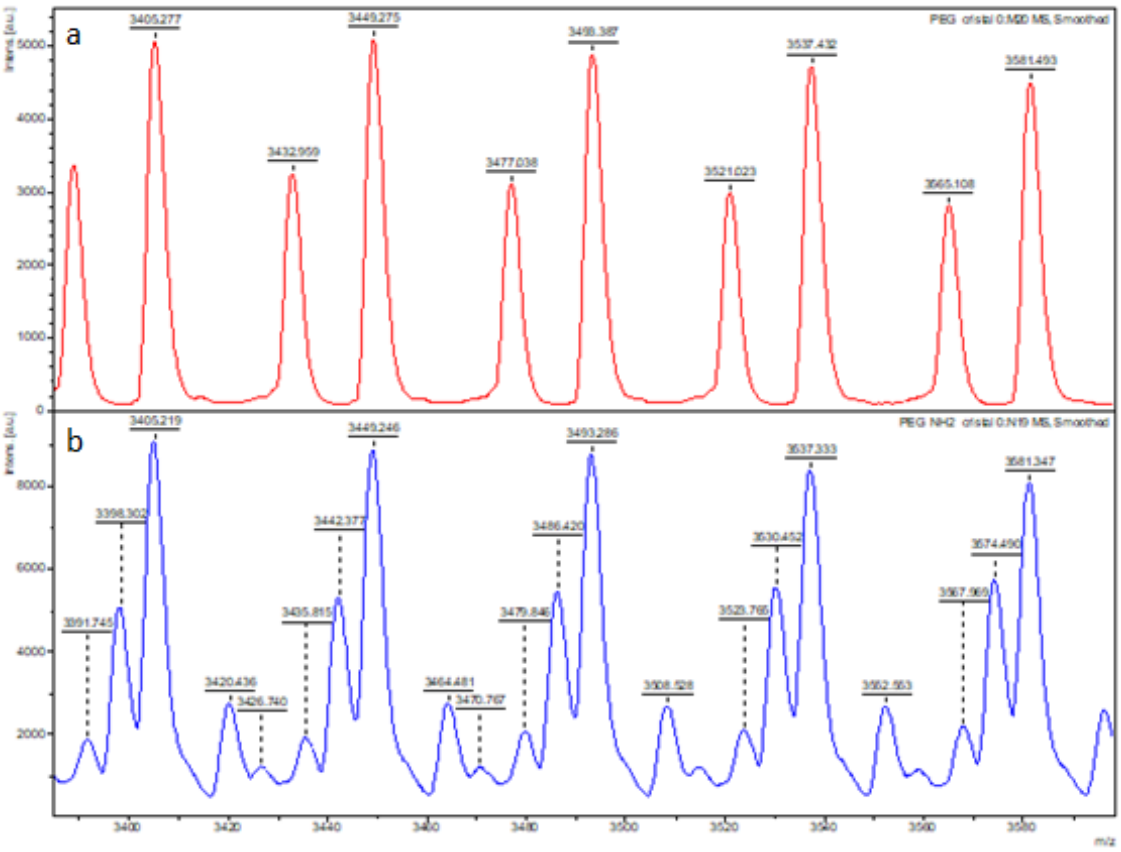
Figura 31- Teste com ácido nitroso



Fonte: autora da dissertação

As análises realizadas por MALDI-TOF/MS confirmou a presença de grupos aminos. Os cromatogramas das amostras de PEG e PEG-NH_2 estão apresentados na Figura 32.

Figura 32 – Análises realizadas por MALDI-TOF/MS para as amostras de (a) PEG e (b) PEG-NH_2



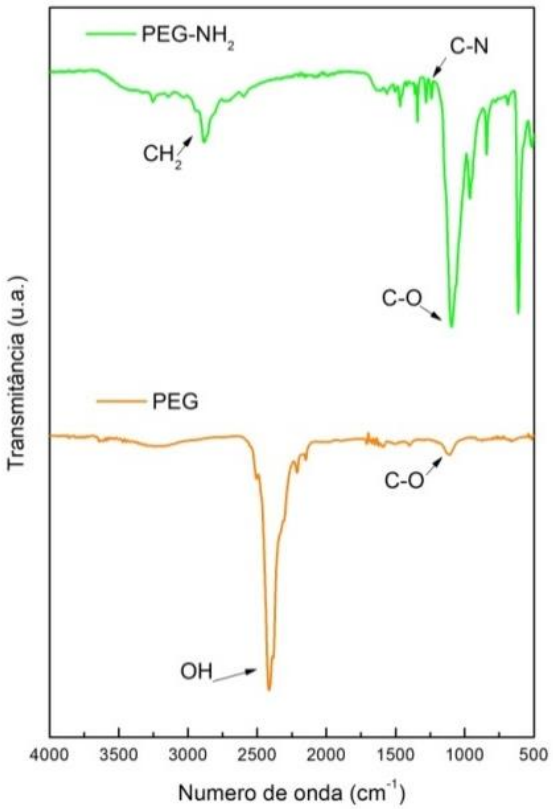
Fonte: autora da dissertação

Como pode ser observado no espectro do PEG há uma variação de unidade de massa de 44 m/z (massa/carga) enquanto no espectro do PEG-NH_2 esse valor é 43 m/z. A

diferença de uma unidade de massa corresponde à substituição da hidroxila que possui massa 17 pelo grupo amina que possui massa 16. Além disso, no espectro do PEG-NH_2 há uma fragmentação com massa 16 que corresponde à saída de um grupo amino (KISSLER, 1999). A partir dos resultados obtidos podemos inferir que houve a substituição do grupo OH pelo NH_2.

Nas espectroscopias de infravermelho (FT-IR) foram analisados os grupos funcionais presentes nas amostras do PEG e PEG-NH_2. Enquanto que no PEG as bandas principais estão em 2.410 cm^{-1} (OH) e 1.110 cm^{-1} (C-O) no PEG-NH_2 pode-se observar a presença de três novas bandas em aproximadamente 2.900 cm^{-1} (CH_2), 1.251 cm^{-1} (C- N) e a 1.102 cm^{-1} (-C-O-) características da cadeia de amino-polietilenoglicol como mostra a Figura 33.

Figura 33- Espectros de infravermelho com transformada de Fourier do PEG e PEG-NH_2

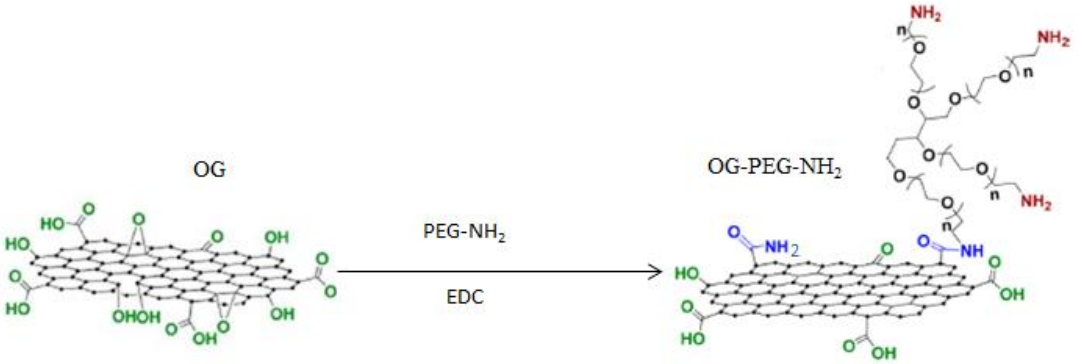


Fonte: autora da dissertação

4.5 Funcionalização do óxido de grafeno com Amino-polietilenoglicol 4.000 M_n

A funcionalização da superfície do OG ocorreu via amidação pela reação dos ácidos carboxílicos do nanomaterial e dos grupos aminos altamente reativos do PEG-NH_2. Nessa reação utilizou-se o agente de condensação N, N'-dimetilamino propil-3-etilcarbodiimida (EDC) para ativar os grupos carboxílicos e facilitar a adição de espécies nucleófilas como as aminas (TIWARI; SYVAJARVI, 2015). A Figura 34 apresenta o esquema da funcionalização do OG com PEG-NH_2.

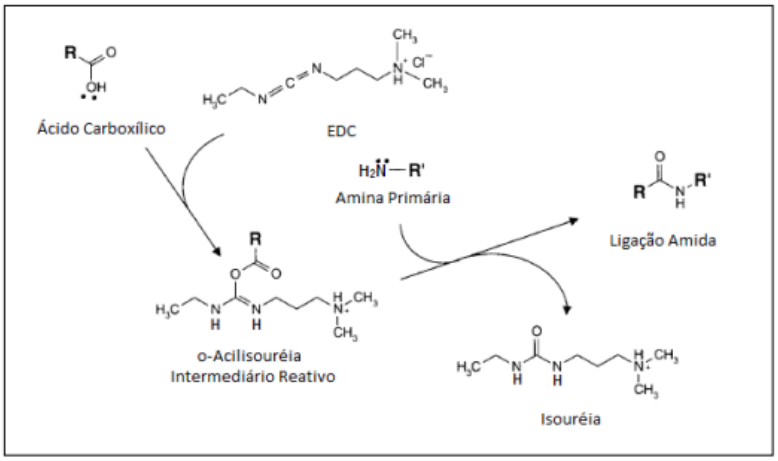
Figura 34- Funcionalização do OG com amino-polietilenoglicol



Fonte: Adaptado de Xu et al., 2014

Quanto ao mecanismo (Figura 35), o EDC ativa os grupos carboxílicos formando um intermediário ativo, o O-acilisourea, que é facilmente deslocado por ataque nucleofílico. Após a formação de uma ligação amida o EDC é liberado como um derivado de uréia solúvel.

Figura 35- Mecanismo de reação entre o OG e o PEG-NH_2



Fonte: JÚNIOR, 2010.

A facilidade de ligação entre o amino-polietilenoglicol e o OG é justificada

pela formação de carboxilatos, após a adição da base (NaOH) que reage com os ácidos carboxílicos, no processo anterior a funcionalização (ver seção 3.4.3) (LIU et al., 2008).

4.5.1 Secagem do OG-PEG-NH_2

Para evitar possíveis interações indesejáveis, em consequência da radiólise da água, o OG-PEG-NH_2 foi seco antes do processo de radiação.

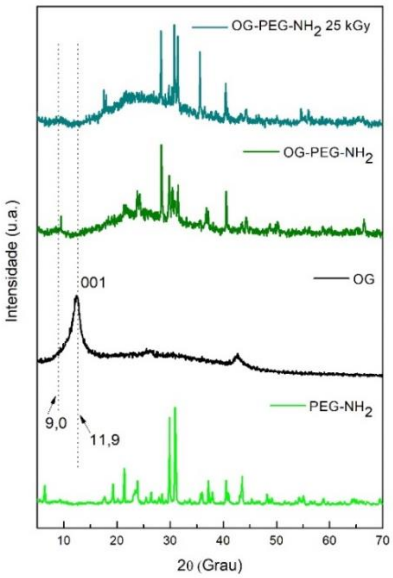
4.5.2 Caracterização do óxido de grafeno funcionalizado com amino-polietilenoglicol 4.000 M_n

Para a esterilização do nanomaterial OG-PEG-NH_2 foi utilizada a radiação gama. As caracterizações do OG-PEG-NH_2 e OG-PEG-NH_2 irradiado a 25 kGy (OG-PEG-NH_2 25 kGy) foram realizadas por DRX, FT-IR e Raman.

4.5.3 Difração de raios-X (DRX)

Nos difratogramas do OG-PEG-NH_2 e do OG-PEG-NH_2 25 kGy, o pico característico do nanomaterial foi deslocado para aproximadamente $2\theta = 9{,}0°$ em relação ao OG, conforme mostra a Figura 36.

Figura 36- Difratogramas do PEG-NH_2, OG, OG-PEG-NH_2 e OG-PEG-NH_2 25kGy



Fonte: autora da dissertação

Utilizando a lei de Bragg e a equação de Scherrer foram calculados os espaçamentos entre as camadas do OG-PEG-NH_2 e OG-PEG-NH_2 25 kGy conforme apresentado na Tabela 8.

Tabela 8- Resultados das análises das amostras de OG-PEG-NH_2 e OG-PEG-NH_2 25 kGy por DRX

Amostras	2θ	Espaçamento entre as camadas (nm)
OG-PEG-NH_2	9,0	0,958
OG-PEG-NH_2 25 kGy	9,0	0,965

Fonte: autora da dissertação

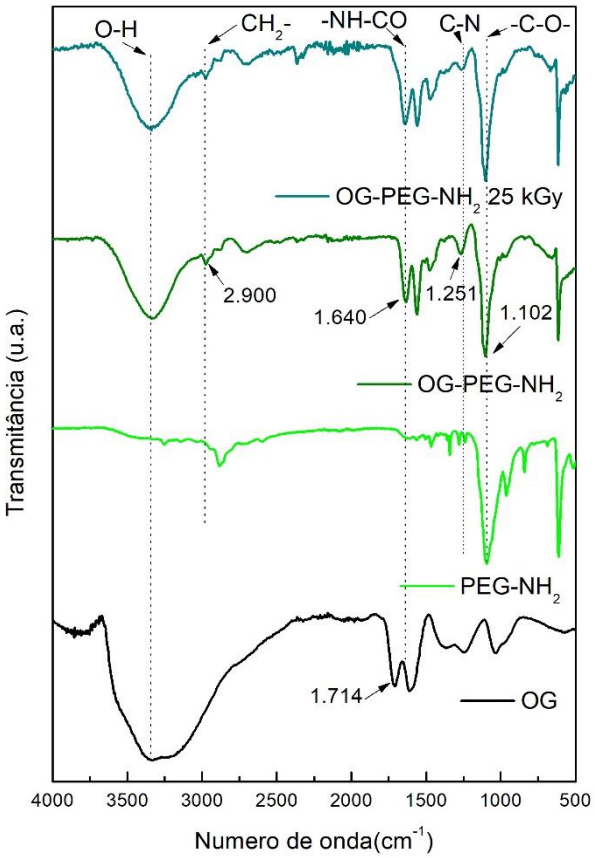
Houve um aumento médio do espaçamento entre as camadas do OG-PEG-NH_2 em relação ao valor encontrado para o OG de 0,2255 nm o que corresponde a 30,64 %. Esse acréscimo no espaçamento das amostras de OG-PEG-NH_2 é justificado pela incorporação do PEG-NH_2 ao material (CHEN et al., 2018).

Mais uma vez, pode-se observar que a radiação utilizada para a esterilização do OG-PEG-NH_2 não alterou a estrutura cristalina do nanomaterial.

4.5.4 Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FT-IR)

Após a funcionalização do OG com PEG-NH_2 pode-se observar, por espectroscopia de FT-IR, a substituição da banda de absorção da carbonila de ácido carboxílico do OG em 1.714 cm^{-1} pela banda em 1.640 cm^{-1} característica de carbonila de amida. Outra evidência da funcionalização foi a presença de três novas bandas em aproximadamente 2.900 cm^{-1} (CH_2), 1.251 cm^{-1} (C- N) e a 1.102 cm^{-1} (-C-O-) características da cadeia de amino-polietilenoglicol (ZHANG et al., 2016). Os espectros estão apresentados na Figura 37.

Figura 37- Espectros de infravermelho com transformada de Fourier do OG, PEG-NH_2, OG-PEG-NH_2 e OG-PEG-NH_2 25 kGy



Fonte: autora da dissertação

As bandas estão apresentadas na Tabela 9 com seus respectivos modos de vibração.

Tabela 9 - Bandas presentes no OG-PEG-NH_2

Banda (cm^{-1})	Grupo funcional e tipo de vibração
2.900	CH2; vibração de CH
1.640	C=O; vibração de estiramento de carbonila de amida
1.251	C-N; vibração de alongamento
1.102	C-O; vibração de estiramento

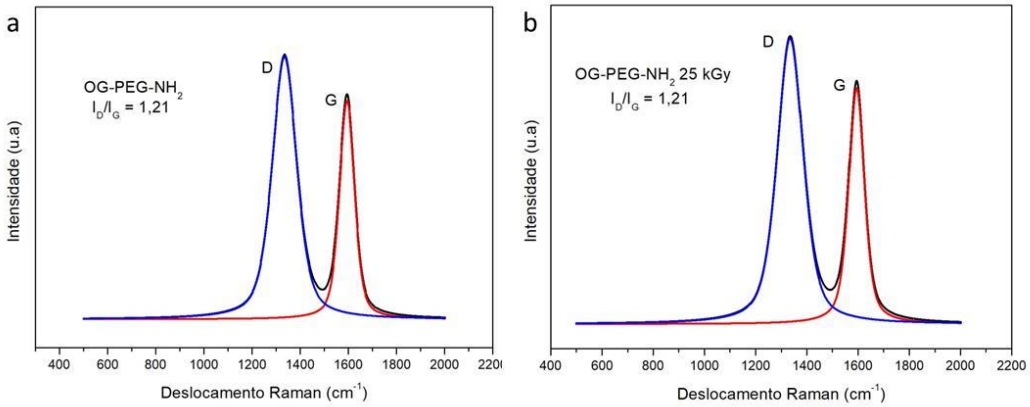
Fonte: autora da dissertação

As bandas atribuídas aos grupos funcionais que contém nitrogênio confirmam a funcionalização do OG. Observou-se também que não houve alterações nas bandas na amostra irradiada.

4.5.5 Espectroscopia Raman

Nos espectros de Raman encontrados para o OG-PEG-NH_2 e OG-PEG-NH_2 25 kGy pode-se identificar as bandas D e G respectivamente em 1.337 cm^{-1} e 1.595 cm^{-1} que são semelhantes às bandas D e G do OG. Após a deconvolução dessas bandas foram calculadas para o OG-PEG-NH_2 e OG-PEG-NH_2 25 kGy as relações I_D/I_G e o valor encontrado foi de 1,21 como mostra a Figura 38.

Figura 38- Deconvolução do espectro raman do OG-PEG-NH_2 e OG-PEG-NH_2 25 kGy.



Fonte: autora da dissertação

Para as amostras de OG os valores de I_D/I_G obtido foi de 1,19, essa variação indicou um aumento dos defeitos após a funcionalização, o que significa mais átomos de carbono hibridizados sp^3 na estrutura do OG-PEG-NH_2 (ZHANG et al., 2016).

No entanto, não houve alterações em decorrência da irradiação da amostra.

4.6 Estudo da influência da radiação gama na esterilização do óxido de grafeno funcionalizado com amino-polietilenoglicol 4.000 M_n

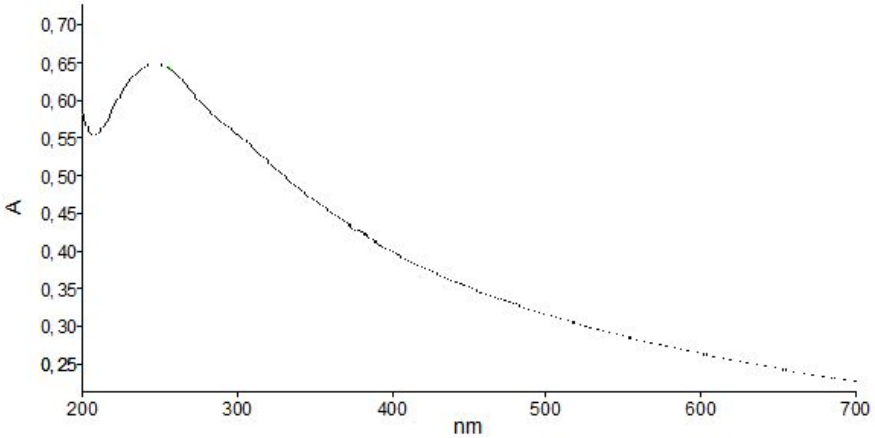
As análises realizadas por DRX, FT-IR e Raman indicaram que a dose de radiação de 25 kGy utilizada para a esterilização do OG-PEG-NH_2 não alterou sua estrutura cristalina, não modificou os grupos funcionais presentes na superfície do nanomaterial e não gerou mais defeitos.

Confirmado a viabilidade da esterilização pelo processo de radiação dos nanomateriais, as caracterizações a seguir serão realizadas apenas para o OG-PEG-NH_2 irradiado.

4.6.1 Espectroscopia ultravioleta-visível (UV-VIS)

No espectro realizado por UV-VIS verificou-se para o OG-PEG-NH_2 25 kGy a presença de uma banda em 230 nm relacionada à transição π-π * de ligações C-C dos anéis aromáticos do OG conforme é mostrado na Figura 39.

Figura 39- Espectro ultravioleta-visível do OG-PEG-NH_2 25 kGy



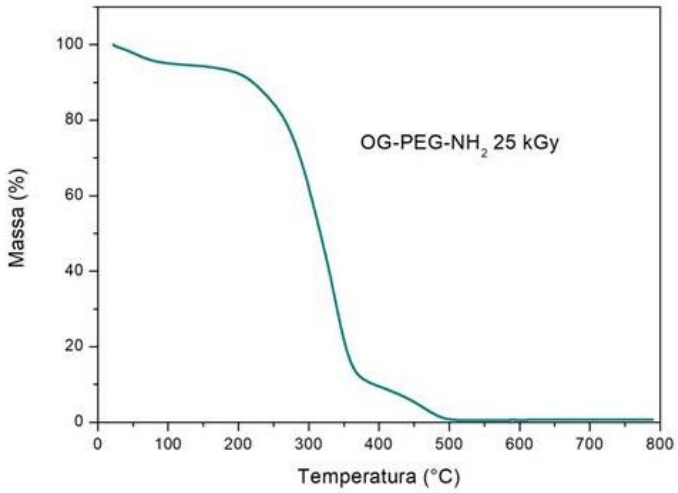
Fonte: autora da dissertação

Este resultado está de acordo com os estudos realizados por YANG et al. (2013) indicando que houve a funcionalização do óxido de grafeno.

4.6.2 Termogravimetria (TGA)

O perfil termogravimétrico do OG-PEG-NH_2 25 kGy mostra três estágios de perda de massa, em função do aumento da temperatura e com taxa de aquecimento constante como mostra a Figura 40.

Figura 40- Curva termogravimétrica do OG-PEG-NH_2 25 kGy



Fonte: autora da dissertação

As perdas de massa do OG-PEG-NH_2 para cada estágio são apresentadas na Tabela 10.

Tabela 10 – Perdas de massa do OG-PEG-NH_2 25 kGy em diferentes temperaturas

Temperaturas	100°C	150°C a 350°C	500°C
Perdas de massas	5,14%	84,86%	8,79%

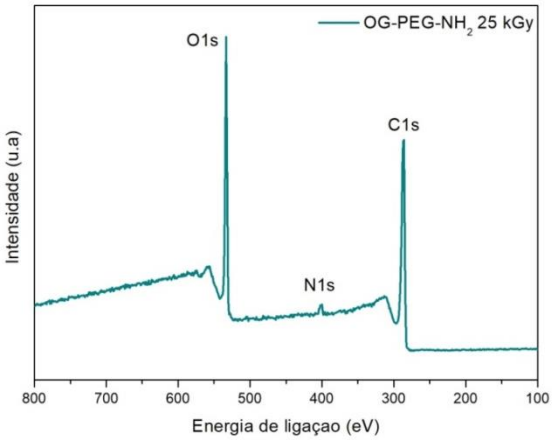
Fonte: autora da dissertação

A decomposição térmica dos grupos funcionais oxigenados e nitrogenados ocorre a uma temperatura entre 150 a 350 °C demonstrando maior estabilidade do OG-PEG-NH_2 em relação ao OG que, para a decomposição dos grupos oxigenados apresenta uma variação de temperatura entre 150 °C a 225 °C.

4.6.3 Espectroscopia de fotoelétrons excitados por raios-X (XPS)

A análise de espectroscopia de XPS foi realizada para identificação do carbono (C), oxigênio (O) e nitrogênio (N), por meio de seus picos específicos de foto emissão, em 286,08 eV; 533,08 eV e 400,08 eV respectivamente (Figura 41).

Figura 41- Espectro de XPS do OG-PEG-NH_2 25 kGy



Fonte: autora da dissertação

Cada elemento químico foi quantificado em porcentagem (%) como é apresentado na Tabela 11.

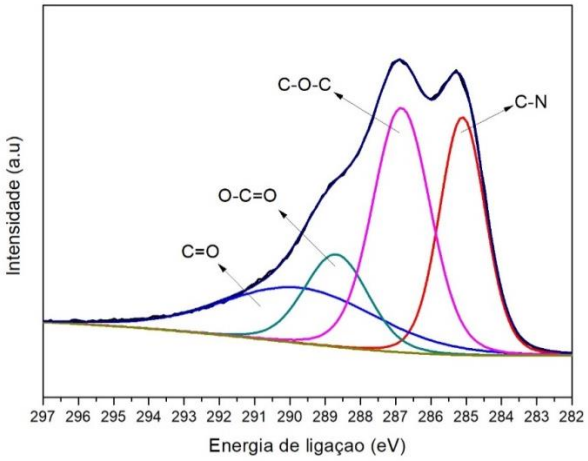
Tabela 11- Quantificação dos elementos químicos presentes no OG-PEG-NH_2 25kGy

Elementos	Carbono (%)	Oxigênio (%)	Nitrogênio (%)
Quantificação	68,08	30,12	1,8

Fonte: autora da dissertação

O espectro de fotoelétrons excitados por raios-X do C(1s) foi deconvoluído em quatro picos de energia de ligação conforme mostra a Figura 42, centralizados em 285,1 eV, 286,8 eV, 288,2 eV e 288,7 eV que correspondem respectivamente as ligações C-N, C-O-C, N-C=O e O-C=O (CHEN et al., 2018).

Figura 42- Deconvolução do espectro C (1s) do OG-PEG-NH_2 25 kGy



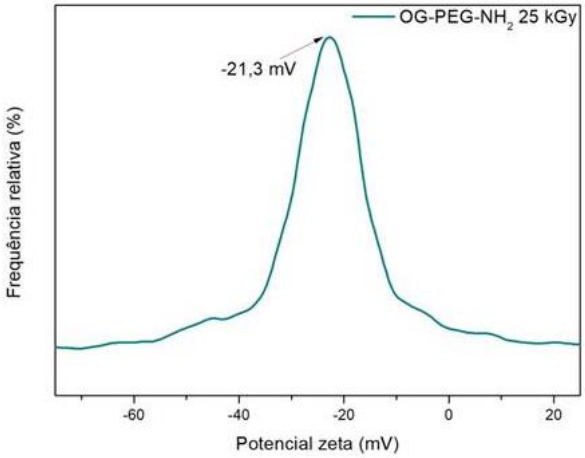
Fonte: autora da dissertação

Comparando a deconvolução do OG da Figura 24 com a deconvolução do OG-PEG-NH_2 da Figura 42, observou-se a modificação da superfície do nanomaterial pela produção de novos picos de energia em 285,1 eV (C-N) e 288,2 eV (N-C=O), consequência da reação de amidação para a funcionalização com o PEG-NH_2.

4.6.4 Potencial Zeta

O valor encontrado do potencial zeta para o OG-PEG-NH_2 25 kGy foi de -21,3 mV em pH 9,4, conforme apresentado na Figura 43. Enquanto, o potencial zeta para o OG foi de - 36,8 mV como mostrado na Figura 25.

Figura 43- Potencial Zeta do OG-PEG-NH_2 25 kGy



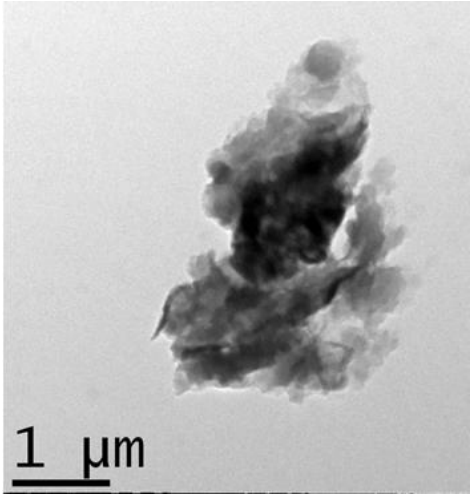
Fonte: autora da dissertação

Segundo LUO et al., (2016) que mediu o potencial zeta para esse mesmo composto, o valor encontrado foi de -20,2 mV o qual, é justificado pela substituição do oxigênio pelo nitrogênio.

4.6.5 Microscopia eletrônica de transmissão (MET) e microscopia de força atômica (AFM)

A morfologia do nanocompósito foi investigada por MET. A Figura 44 mostra a superfície do nanomaterial após a funcionalização com o PEG-NH_2 pela reação de amidação.

Figura 44- Micrografia do OG-PEG-NH_2 25 kGy

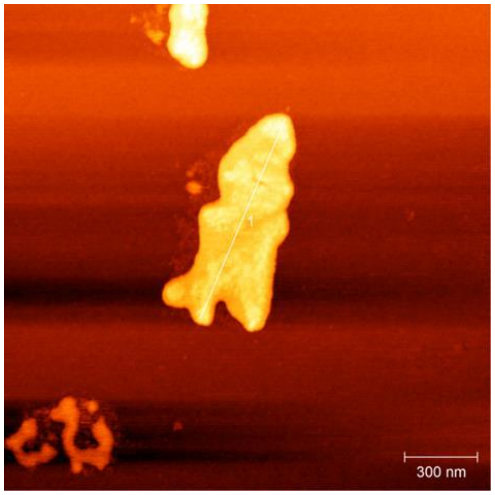


Fonte: autora da dissertação

Pode-se observar modificações na superfície do OG, o que sugere que a funcionalização foi bem sucedida (CHEN et al., 2018).

Na imagem adquirida por AFM da amostra, foi possível visualizar o material recoberto com PEG-NH_2 (Figuras 45).

Figura 45- Imagem de AFM do OG-PEG-NH_2 25 kGy

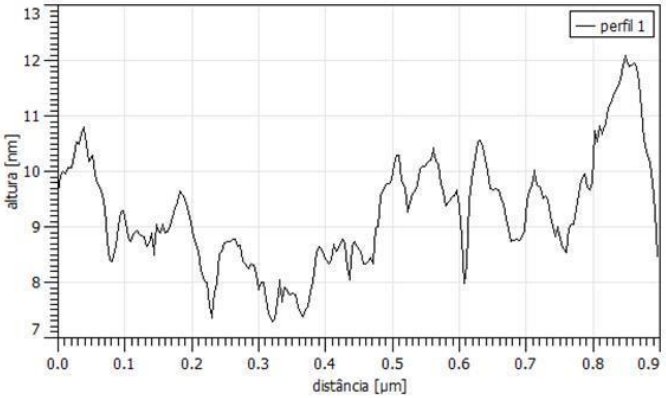


Fonte: autora da dissertação

No perfil da altura do nanocompósito (Figura 46), indicado pelo número 1 na Figura 45, observou-se que a altura da camada varia entre, aproximadamente, 8 a 12 nm que para o OG 25 kGy foi de 1,5 a 2 nm. A altura medida para o mesmo nanocompósito por WU et al., (2014) foi de 11,80 nm. Essa variação no tamanho é justificada pela incorporação do PEG-NH_2 ao OG 25 kGy que é refletida também nas diferentes

tonalidades de cores presentes na superfície do material.

Figura 46- Perfil da altura da camada do OG-PEG-NH_2 25 kGy



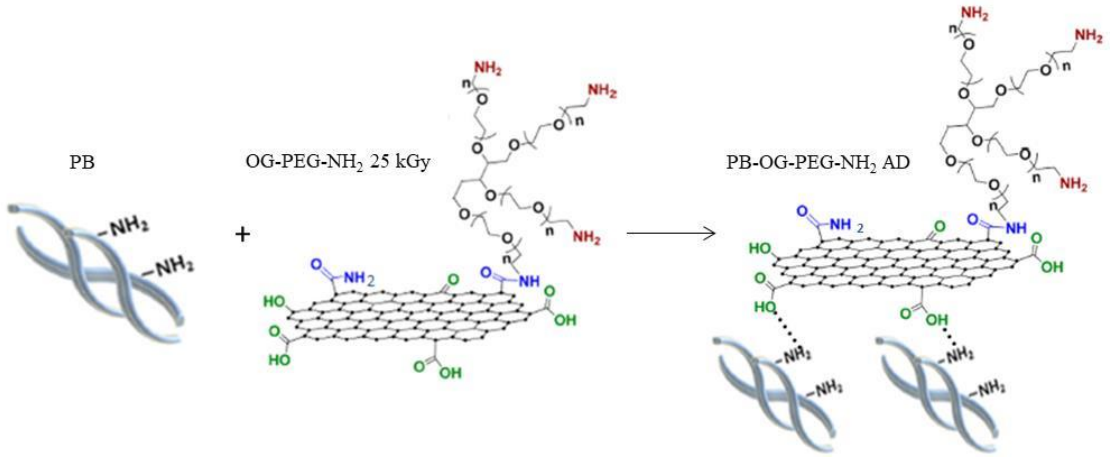
Fonte: autora da dissertação

4.7 Incorporação do óxido de grafeno funcionalizado com PEG-NH_2 4.000 M_n no pericárdio bovino

A incorporação do OG-PEG-NH_2 25 kGy ao PB foi realizada por duas vias distintas: adsorção e por reação química.

O processo de incorporação do OG-PEG-NH_2 ao PB por adsorção (Figura 47) ocorre por interações intermoleculares do tipo ligação de hidrogênio, dipolo-dipolo entre os grupos funcionais presentes tanto no PB quanto no OG-PEG-NH_2 (GEORGAKILAS, 2014).

Figura 47- Incorporação do OG-PEG-NH_2 no PB por adsorção

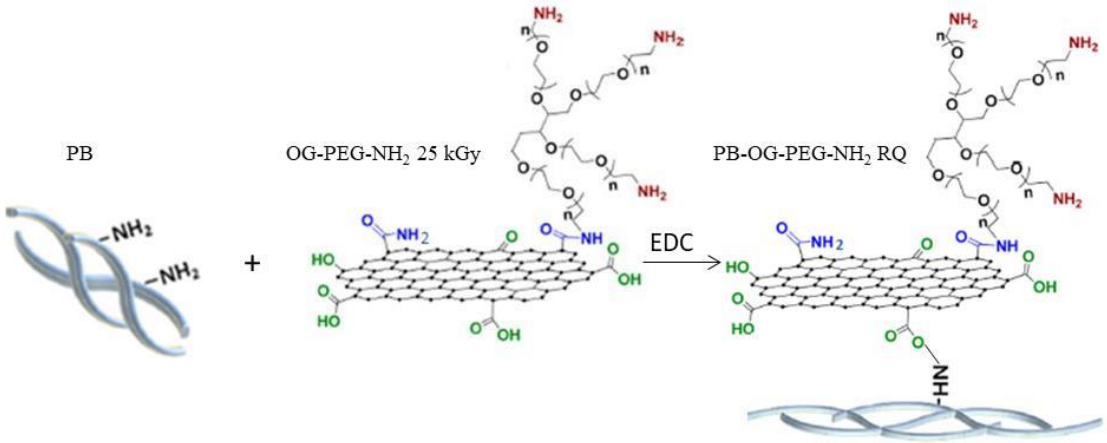


Fonte: Adaptado de KANG et al.; Xu et al., (2014).

Interações não covalentes ocorrem principalmente em domínios de carbono oxidado ou sp^2 do OG. As interações π-π são fracas e dependem, entre outros fatores, dos números de anéis aromáticos no sistema de elétrons π das moléculas de adsorção (GAO; 2015).

No processo por reação via química (Figura 48), ocorre a reação da carbonila do carboxílico (-COOH) do OG ou do nanocompósito e as aminas ($-NH_2$) do colágeno tipo I do PB, em uma reação de amidação utilizando o agente de condensação N, N'-dimetilamino propil-3-etilcarbodiimida (EDC) (CAI et al., 2015).

Figura 48- Incorporação do OG-PEG-NH_2 no PB por reação química



Fonte: Adaptado de KANG et al., e XU et al., (2014).

Vale ressaltar que nas interações não covalentes há a possibilidade das moléculas adsorverem reversivelmente na superfície do grafeno sem alterar a rede eletrônica o que não é possível nas interações covalentes (GEORGAKILAS, 2014). As interações covalentes são caracterizadas pelo compartilhamento de um ou mais pares de elétrons entre átomos, causando uma atração mútua entre eles que mantém o complexo resultante unido fortemente. (SHRIVER, 1998).

4.8 Caracterizações do pericárdio bovino, após a incorporação com OG-PEG-NH_2 4.000 M_n

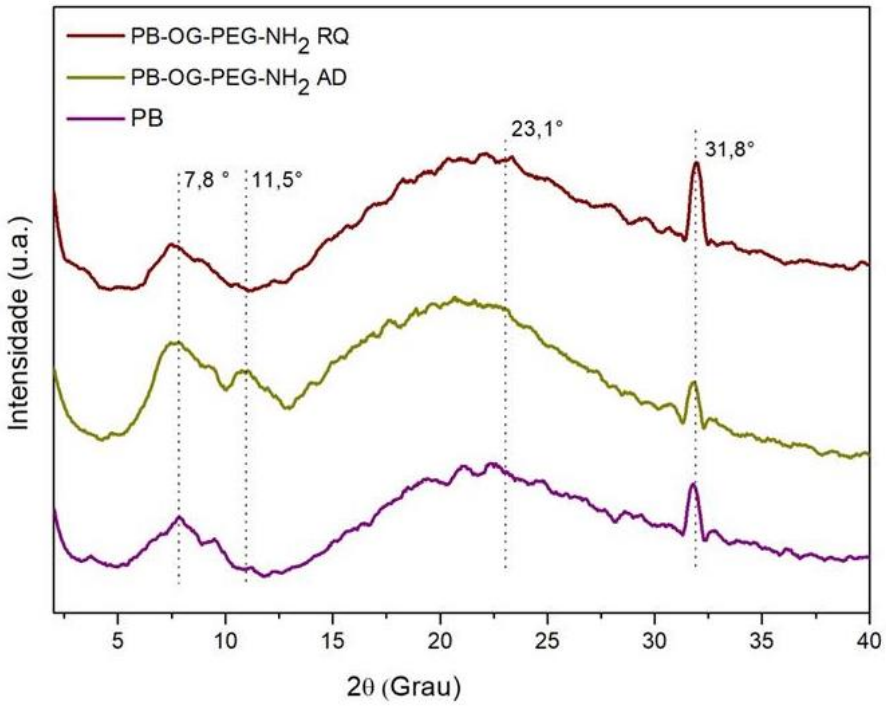
As caracterizações do pericárdio bovino foram realizadas por DRX, FT-IR e AFM.

4.8.1 Difração de raios-X (DRX)

A Difração de raios-X foi utilizada para avaliar alterações na cristalinidade do PB causadas pela incorporação do OG-PEG-NH_2 25 kGy.

No difratograma do PB pode-se observar 3 picos aproximadamente em (2θ =7,8°; 23,1° e 31,8°) os quais, são característicos de colágeno reticulado com glutaraldeído. Nos difratogramas do OG-PEG-NH_2 25 kGy incorporado ao PB por adsorção (PB-OG-PEG-NH_2 AD) e do OG-PEG-NH_2 25 kGy incorporado ao PB por reação química (PB-OG-PEG-NH_2 RQ), pode-se observar os 3 picos característicos do PB. No difratograma do PB-OG-PEG-NH_2 AD, além desses picos foi observado um pico em aproximadamente 11,5° característico do OG (Figura 49).

Figura 49- Difratogramas do PB, PB-OG-PEG-NH_2 AD e PB-OG-PEG-NH_2 RQ



Fonte: autora da dissertação

A presença do nanocompósito no tecido biológico foi confirmada quando o material foi incorporado por adsorção, o que não ocorreu na incorporação por reação química provavelmente devido à presença de outros compostos durante o processo de incorporação, como o EDC, dificultando o acesso ao OG. Na adsorção, a interação do OG com o PB é muito fraca, deixando o nanomaterial mais disponível e mais fácil de detectá-lo quando ocorre a difração. Por outro lado na via química, o OG está ligado ao PB mais

fortemente, o que faz com que a intensidade do pico do nanomaterial seja suprimida pelo PB.

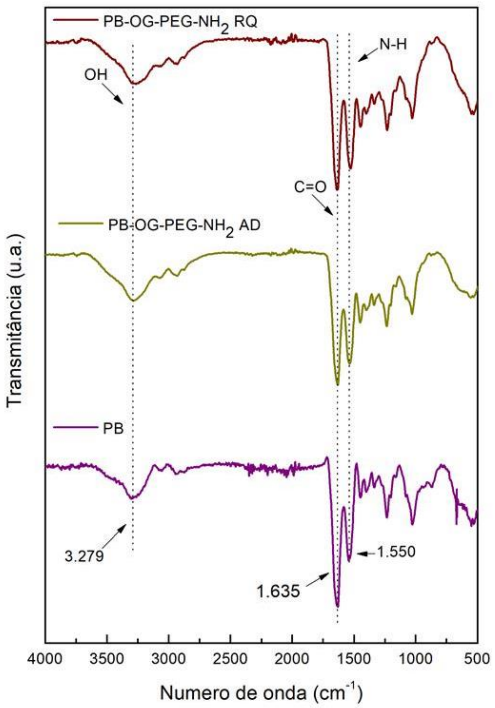
Além disso, pode-se inferir que a incorporação do OG-PEG-NH_2 tanto por adsorção ou reação química não provocou alterações na cristalinidade da membrana.

4.8.2 Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FT-IR)

A Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier foi utilizada para avaliar alterações dos grupos funcionais do PB causadas pela incorporação do OG-PEG-NH_2 25 kGy.

Nos espectros de FT-IR adquiridos para o PB, (PB-OG-PEG-NH_2 AD e PB-OG-PEG-NH_2 RQ não foram observadas diferenças significativas nas bandas de absorção a 3.279, 1635 e 1.550 cm^{-1} atribuídas aos estiramentos do OH, das carbonilas (C=O) de amida I e das aminas N-H de amida II respectivamente, como mostra a Figura 50 (CABRAL, 2016).

Figura 50 – Espectros de infravermelho com transformada de Fourier do PB, PB-OG-PEG-NH_2 AD e PB-OG-PEG-NH_2 RQ



Fonte: autora da dissertação

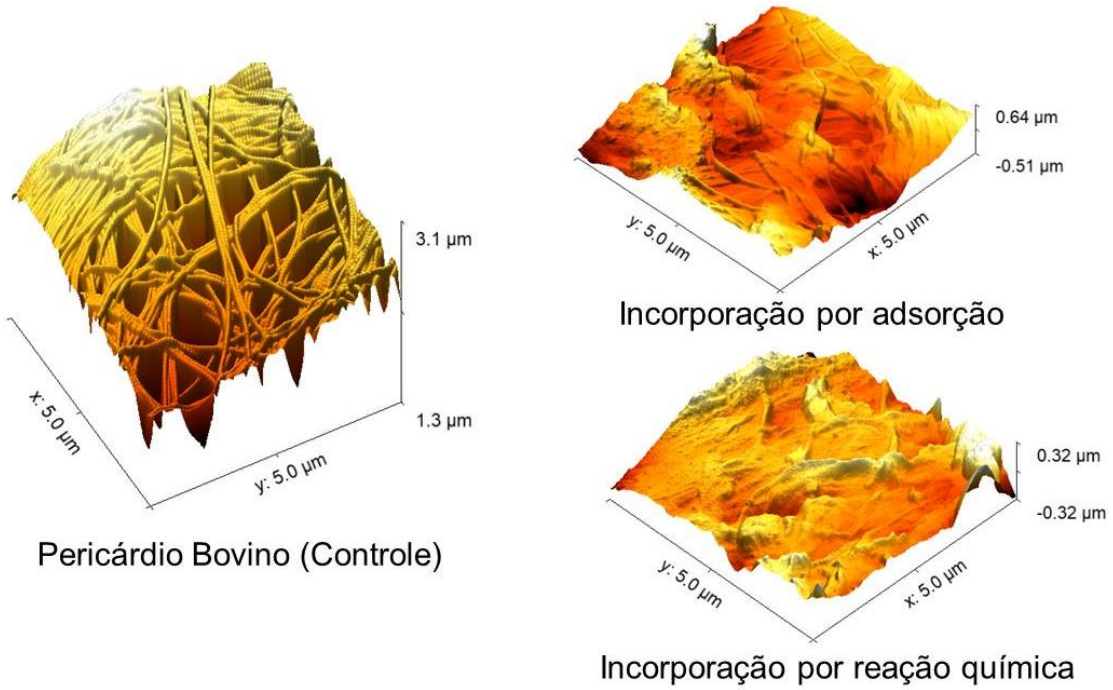
As análises realizadas por FT-IR indicaram que não houve modificações dos grupos funcionais presentes na superfície do PB, o que podemos especular que

possivelmente a incorporação do OG-PEG-NH_2 tanto por adsorção ou reação química não alterou os grupos funcionais do biomaterial ou a quantidade do nanocompósito incorporado foi muito pequena.

4.8.3 Microscopia de Força Atômica (AFM)

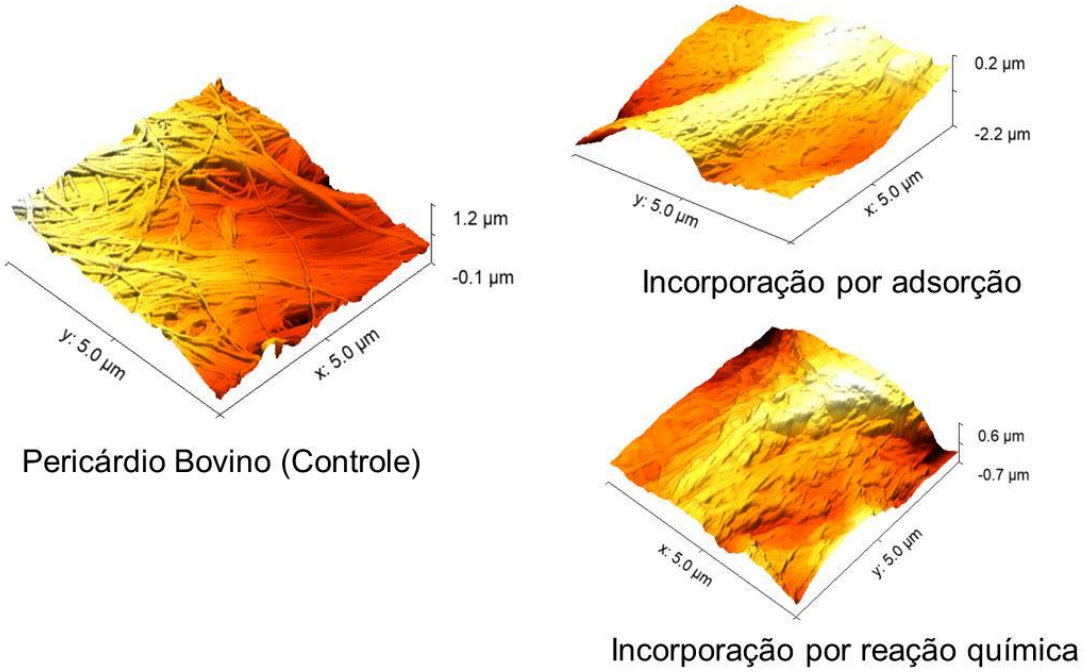
Após a incorporação por adsorção e por reação química do biomaterial pelo OG-PEG-NH_2 25 kGy, foram realizadas imagens do PB lado rugoso (Figura 51) e lado liso (Figura 52).

Figura 51- Imagem de AFM do OG-PEGNH_2 25 kGy incorporado ao PB do lado rugoso



Fonte: autora da dissertação

Figura 52- Imagem de AFM do OG-PEGNH_2 25 kGy incorporado ao PB do lado liso



Fonte: autora da dissertação

As imagens confirmaram modificações na superfície do tecido biológico como o recobrimento das lacunas quando o nanomaterial foi incorporado ao lado rugoso do PB e o recobrimento de toda a superfície da membrana do lado liso.

Pode-se observar também, que do lado rugoso, algumas fibras continuam visíveis após a incorporação devido às diferenças entre suas alturas. Desse lado da membrana o OG-PEG-NH_2 tende a ocupar os espaços disponíveis entre as fibras o que não ocorre do lado liso do PB onde as fibras são mais organizadas.

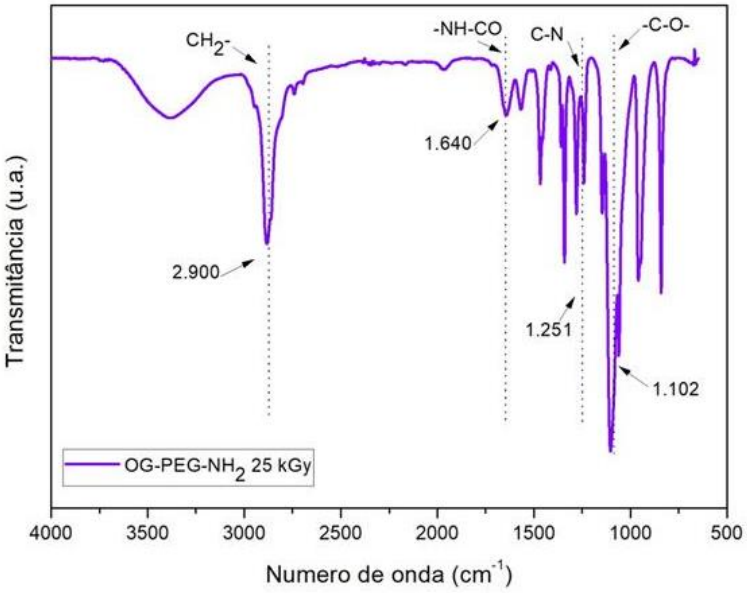
4.9 Caracterização do OG funcionalizado com PEG-NH_2 6.000 M_n comercial

As caracterizações do OG-PEG-NH_2 25 kGy foram realizadas por FT-IR, Raman e XPS.

4.9.1 Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FT-IR)

O espectro de FT-IR após a funcionalização do OG com PEG-NH_2 comercial está apresentado na Figura 53.

Figura 53-Espectro de FT-IR do OG-PEG-NH_2 25 kGy



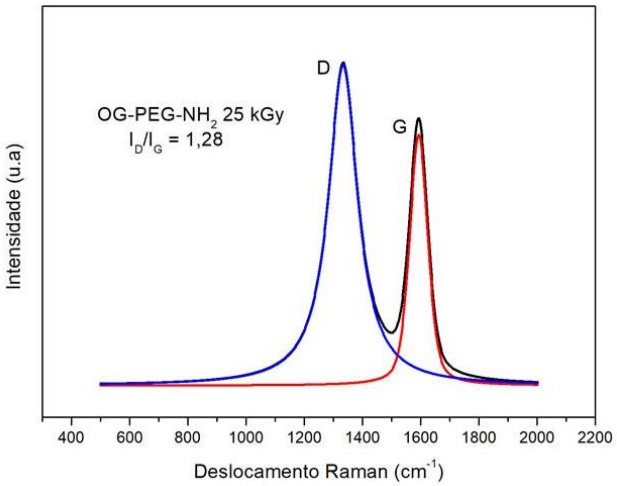
Fonte: autora da dissertação

Pode-se observar a banda de absorção em 1.640 cm^{-1} característica de carbonila de amida. Outra evidência da funcionalização foi a presença de três bandas em aproximadamente 2.900 cm^{-1} (CH_2), 1.251 cm^{-1} (C- N) e a 1.102 cm^{-1} (-C-O-) características da cadeia de amino-polietilenoglicol (ZHANG et al., 2016). As bandas atribuídas aos grupos funcionais que contém nitrogênio confirmam a funcionalização do OG.

4.9.2 Espectroscopia Raman

No espectro Raman foi identificado as bandas D e G respectivamente em 1.337 cm^{-1} e 1.595 cm^{-1}, semelhantes às bandas D e G do OG. Após a deconvolução foram calculadas para o OG-PEG-NH_2 25 kGy as relações I_D/I_G e o valor obtido foi de 1,28 como mostra a Figura 54.

Figura 54- Deconvolução do espectro raman do OG-PEG-NH_2 25 kGy.



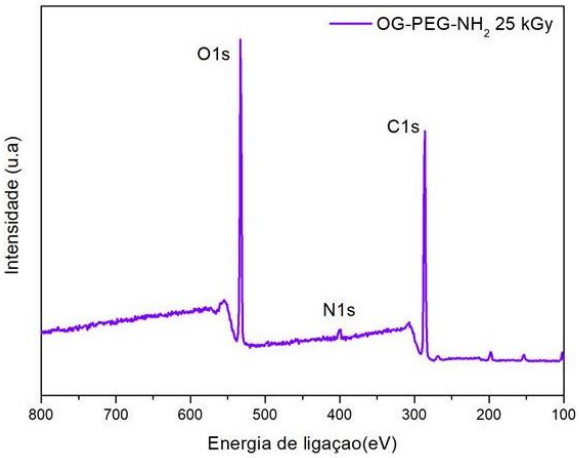
Fonte: autora da dissertação

Nesse caso, o valor de I_D/I_G igual a 1,28 para OG-PEG-NH_2 6.000 M_n 25 kGy foi maior que I_D/I_G igual a 1,21 obtido para o OG-PEG-NH_2 4.000 M_n 25kGy. Esse aumento nos valores de I_D/I_G provavelmente está relacionado com a diferença de tamanho dos PEG-NH_2.

4.9.3 Espectroscopia de fotoelétrons excitados por raios-X (XPS)

O espectro de XPS foi obtido para identificação dos elementos químicos carbono (C), oxigênio (O) e nitrogênio (N) respectivamente em 286,08 eV; 533,08 eV e 400,08 eV (Figura 55).

Figura 55- Espectro de XPS do OG-PEG-NH_2 25 kGy



Fonte: autora da dissertação

Cada elemento químico identificado foi quantificado em porcentagem (%) como apresentado na Tabela 12.

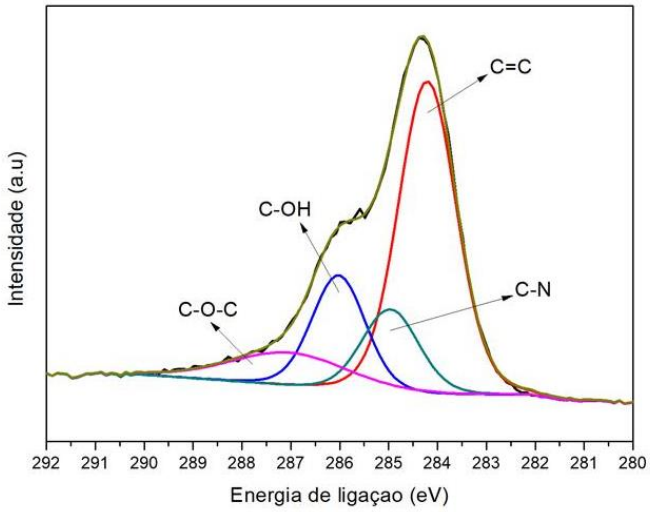
Tabela 12- Quantificação dos elementos químicos presentes no OG-PEG-NH_2 25kGy

Elementos	Carbono (%)	Oxigênio (%)	Nitrogênio(%)
Quantificação	61,6	36,5	1,9

Fonte: autora da dissertação

No espectro de XPS o C(1s) foi deconvoluído em quatro picos de energia de ligação centralizados em 284,9 eV, 287,0 eV, 286,0 eV e 284,2 eV que correspondem respectivamente as ligações C-N, C-O-C, C-OH e C=C (CHEN et al., 2018) conforme apresentado na Figura 56.

Figura 56- Deconvolução do espectro C (1s) do OG-PEG-NH_2 25 kGy



Fonte: autora da dissertação

A modificação da superfície do OG pela reação de amidação produziu um novo pico de energia como o 284,9 eV (C-N).

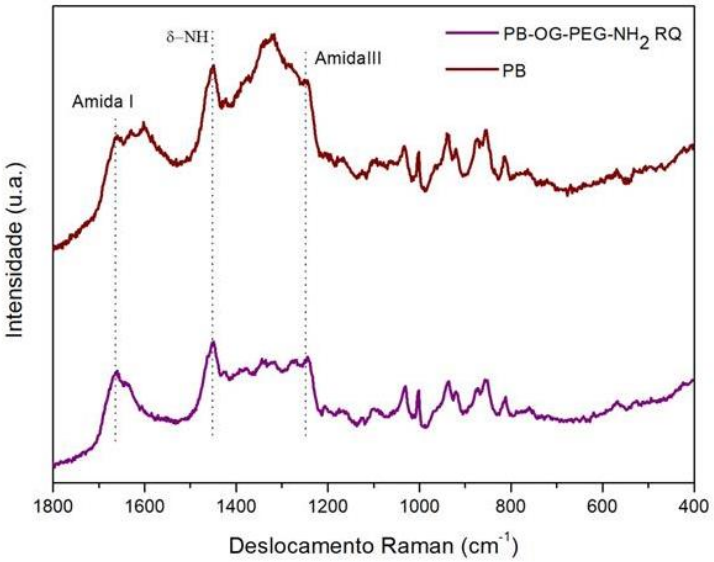
4.10 Incorporação do OG-PEG-NH_2 6.000 M_n ao PB por reação química

Tendo em vista, que o biomaterial será utilizado na área médica e para assegurar a eficácia dessa incorporação conforme descrito na seção 4.7, nos ensaios citotóxicos, calcificação e reatividade atrial foi utilizada somente a incorporação por reação química.

4.10.1 Caracterização do PB-OG-PEG-NH_2 por espectroscopia Raman

A espectroscopia Raman foi utilizada para avaliar os efeitos do OG-PEG-NH_2 25 kGy na estrutura secundária do PB. Nos espectros do PB e do PB-OG-PEG-NH_2 RQ foram observadas bandas de amida III, $^{\delta}$-NH e amida I, respectivamente em 1.242, 1.450 e 1.665 cm^{-1} características da estrutura do colágeno I, (Figura 57).

Figura 57- Espectros Raman das principais estruturas do PB e do PB-OG-PEG-NH_2 RQ



Fonte: autora da dissertação

De acordo com os resultados obtidos foi possível verificar que a incorporação do OG-PEG-NH_2 ao PB por reação química não modificou a estrutura do biomaterial.

4.11 Ensaio Citotóxico

Para a aplicação do OG em áreas da Engenharia de Tecidos e Nanomedicina é necessário o estudo da viabilidade em diversas células, além de novas rotas para redução da toxicidade do nanometrial (BATIUSKAIKE; GRINCEVICIUTE; SNITKA, 2015).

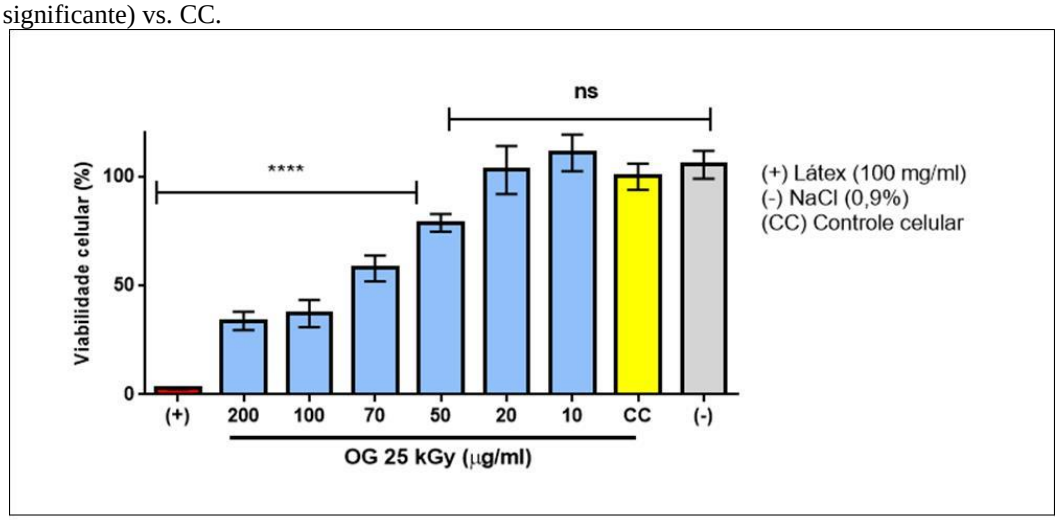
Sendo assim, o objetivo desse ensaio foi de avaliar a citotoxicidade do OG, OG-PEG-NH_2 e dos elu de PB obtidos antes e após a incorporação do OG-PEG-NH_2 por reação química.

O método empregado no ensaio citotóxico foi o *CellTiter* 96 que avalia a quantidade de células viáveis após a exposição ao agente tóxico. O *CellTiter* 96 é um teste

colorimétrico preparado com soluções de um composto tetrazólico, o qual o MTS é reduzido pela atividade da enzima *desidrogenase* mitocondrial com formação de cristais solúveis aquosos de sal formazan de cor púrpura (NOZAKI et al., 2012).

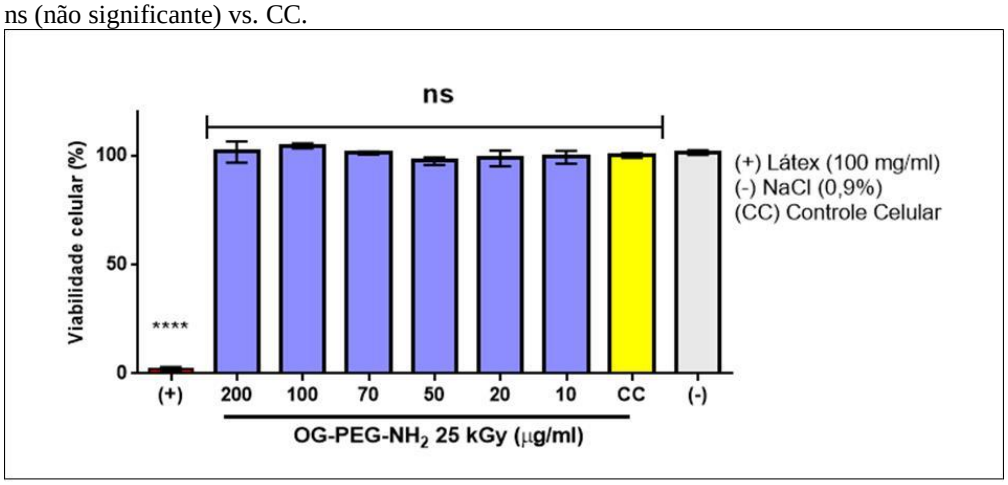
Os gráficos a seguir (Figuras 58-63) mostram respectivamente os resultados obtidos a partir dos ensaios de citotoxicidade das amostras de OG, OG-PEG-NH_2, Gráfico de comparação entre o OG 25 kGy e OG-PEG-NH_2 25 kGy, os eluídos obtidos do PB antes e após a incorporação do OG-PEG-NH_2 por reação química e um gráfico comparativo entre essas amostras de PB.

Figura 58- Gráfico de citotoxicidade do OG 25 kGy. Os valores foram expressos como média ± EPM. ANOVA de uma via seguida de pós teste de Bonferroni, onde ****P <0,05 vs. CC e ns (não significante) vs. CC.



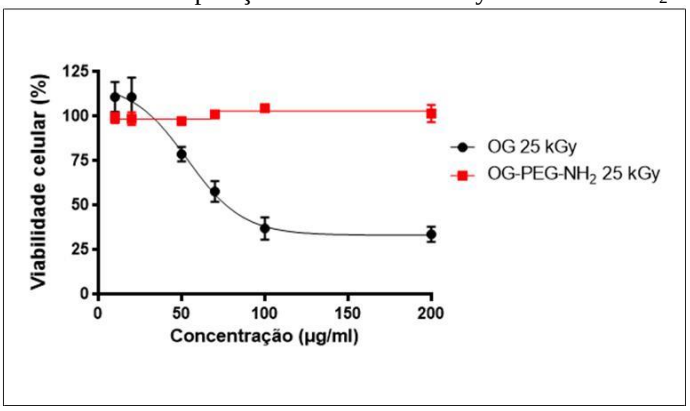
Fonte: autora da dissertação.

Figura 59- Gráfico de citotoxicidade do OG-PEG-NH_2 25 kGy. Os valores foram expressos como média ± EPM. ANOVA de uma via seguida de pós teste de Bonferroni, onde ****P <0,05 vs. CC e ns (não significante) vs. CC.



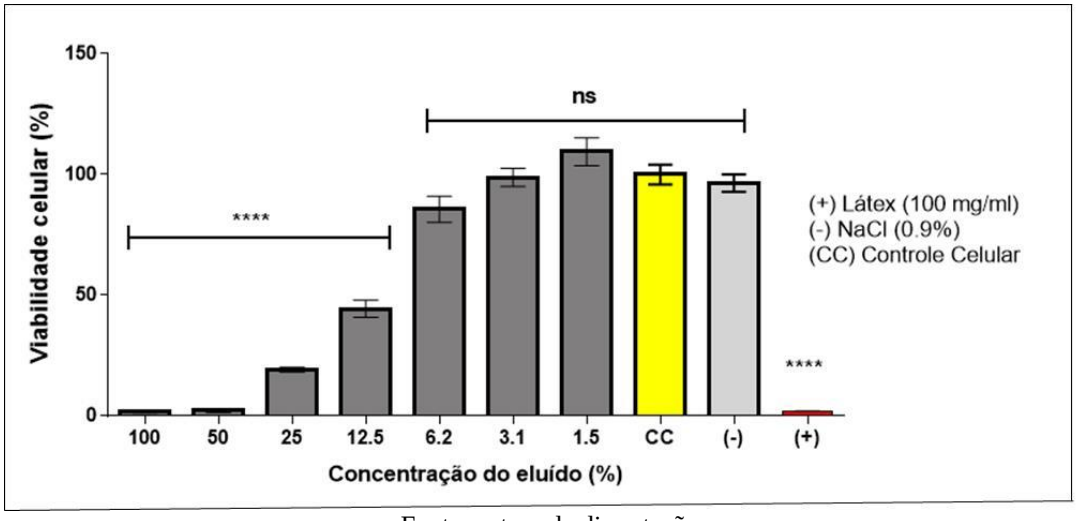
Fonte: autora da dissertação.

Figura 60- Gráfico de comparação entre o OG 25 kGy e OG-PEG-NH_2 25 kGy



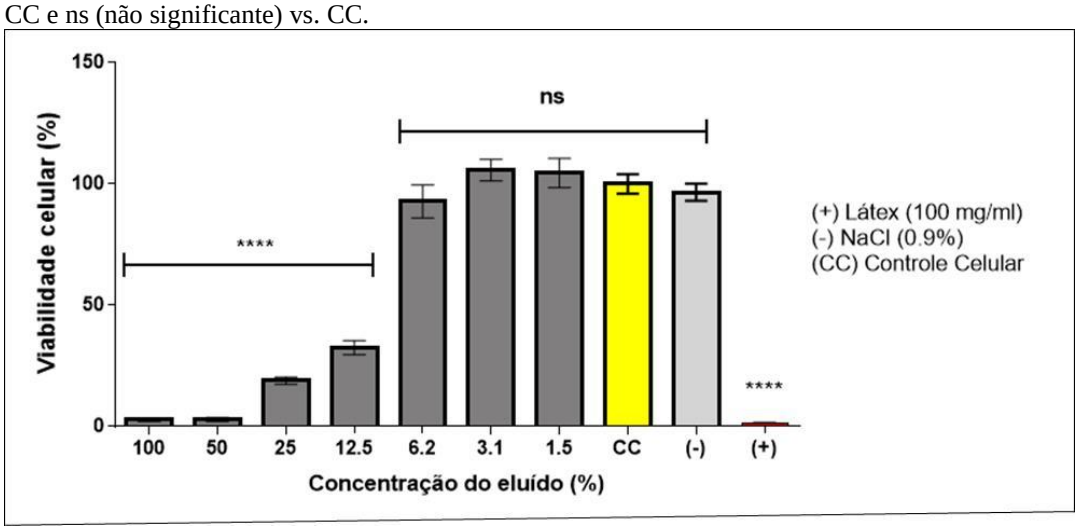
Fonte: autora da dissertação.

Figura 61- Gráfico de citotoxicidade do eluído do PB. Os valores foram expressos como média ± EPM. ANOVA de uma via seguida de pós teste de Bonferroni, onde ****P <0,05 vs. CC e ns (não significante) vs. CC.



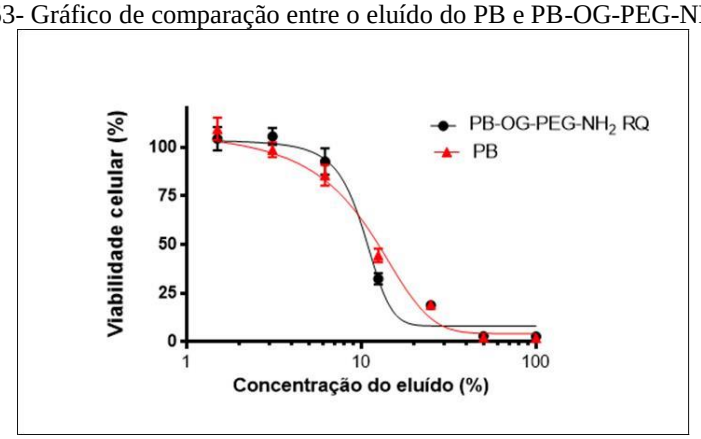
Fonte: autora da dissertação.

Figura 62- Gráfico de citotoxicidade do eluído do PB-OG-PEG-NH_2 RQ. Os valores foram expressos como média ± EPM. ANOVA de uma via seguida de pós teste de Bonferroni, onde ****P <0,05 vs. CC e ns (não significante) vs. CC.



Fonte: autora da dissertação.

Figura 63- Gráfico de comparação entre o eluído do PB e PB-OG-PEG-NH_2 RQ



Fonte: autora da dissertação.

Nos ensaios de citotoxicidade foram utilizadas e avaliadas as quantidades de células de ovário de hamster chinês (CHO) viáveis após a exposição ao agente tóxico. A partir dos resultados obtidos para o OG 25 kGy pode-se observar que em concentrações iguais ou inferiores a 20 µg/ml não houve redução da viabilidade celular comparado ao controle. No entanto, foi observado que concentrações iguais ou superiores a 50 µg/ml reduziram a viabilidade celular. A concentração inibitória (IC_{50}) que indica a concentração do OG, no meio de cultura, que reduz para 50 % o número de células viáveis foi calculada e o valor encontrado foi de 53,5 µg/mL com desvio médio de (+/-) 8,0.

A síntese do OG através do método Hummers (ver seção 3.4.1) forma hidrocarbonetos poliaromáticos fortemente oxidados que podem causar reações biológicas adversas (KUMAR; PATTAMMATTEL, 2017).

Uma rota muito utilizada para a redução da toxicidade do OG é a sua funcionalização com PEG-NH_2. O PEG é um polímero biocompatível e altamente hidrofílico, uma vez funcionalizado ao OG aumenta a dispersibilidade e estabilidade desse nanomaterial em solução aquosa e em soluções fisiológicas como soro e meio celular. Além disso, o PEG aumenta a meia-vida de circulação de nanomateriais no sangue evitando a opsonização (GEORGAKILAS, 2014). Os resultados obtidos no ensaio de citotoxicidade para o OG-PEG-NH_2 25 kGy demonstraram que não houve redução da viabilidade celular em concentrações de 10 a 200 µg/ml (Figura 59).

Nos resultados obtidos dos eluídos observou-se que em concentrações iguais ou inferiores a 6,3% não houve a redução da viabilidade celular comparado ao controle. No entanto, em concentrações iguais e superiores a 12,5% a viabilidade celular foi reduzida. Foram calculados os IC_{50} para ao eluídos do PB e do PB-OG-PEG-NH_2 e os valores

encontrados foram 9,4 % com desvio padrão de (+/-) 1,8 % e 10,3 % com desvio de (+/-) 0,6 % de eluído, respectivamente. Possivelmente não houve à remoção completa do formaldeído, agente de conservação das membranas, durante as lavagens (ver seção 3.12.1).

4.12 Ensaio da Reatividade Atrial

O ensaio de reatividade atrial foi realizado em colaboração com o grupo de pesquisa da Profa. Dra. Soraia Costa do Departamento de Farmacologia do ICB-USP.

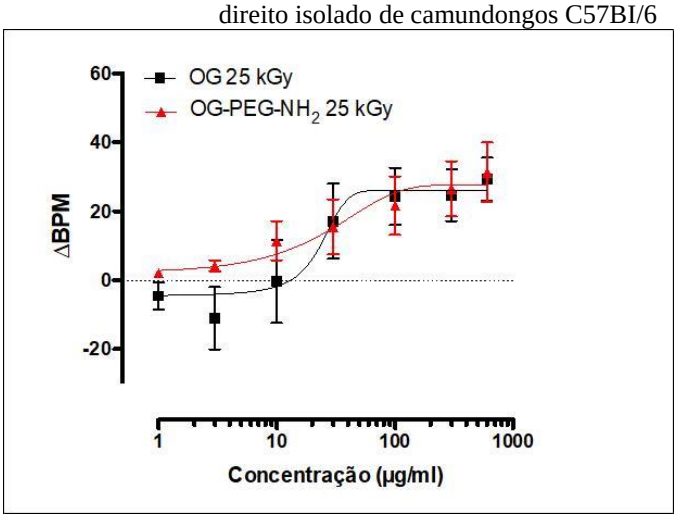
O método consiste em avaliar o efeito do OG e OG-PEG-NH_2 25 kGy na função cardíaca. Nesse ensaio, utilizou-se o átrio direito (AD) isolado de camundongos que possui as células que controlam a ritmicidade (células do nó sino-atrial) cardíaca. Ainda que o AD seja isolado (Figura 64) e mantido em solução nutriente e aerado constantemente com uma mistura de O_2 e CO_2, o mesmo continua a manter os batimentos constantes.

Figura 64- Átrio direito isolado de camundongo

Fonte: autora da dissertação

Pode-se observar na Figura 65, que em concentrações crescentes dos nanomateriais, a capacidade de batimento per se do AD aumenta.

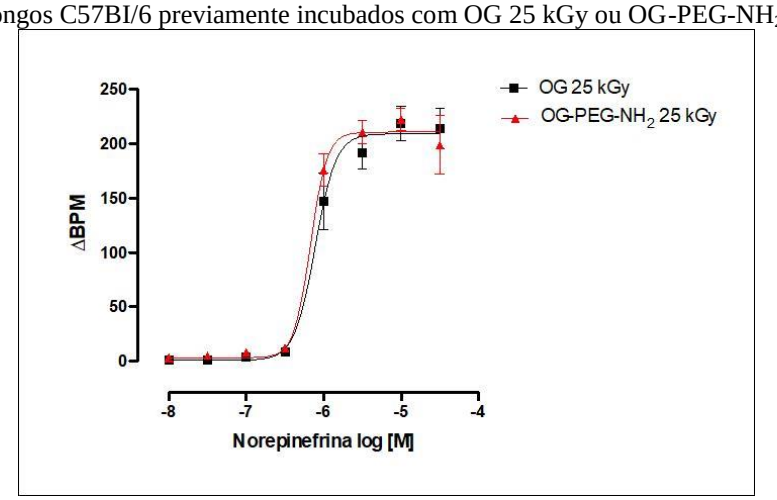
Figura 65- Curvas concentração-resposta para o OG 25 kGy e OG-PEG-NH_2 25 kGy realizadas em átrio direito isolado de camundongos C57BI/6



Fonte: autora da dissertação.

No tecido cardíaco pré-incubado (30 min) com os nanomateriais não foi observado alteração na resposta ao agonista adrenérgico norepinefrina (Figura 66). Esse agonista promove o aumento da frequência de batimentos do átrio direito. Se houvesse interação do OG ou OG-PEG-NH_2 com os receptores adrenérgicos as curvas apresentariam outro perfil.

Figura 66- Curvas concentração-resposta para norepinefrina realizadas em átrio direito isolado de camundongos C57BI/6 previamente incubados com OG 25 kGy ou OG-PEG-NH_2 25 kGy

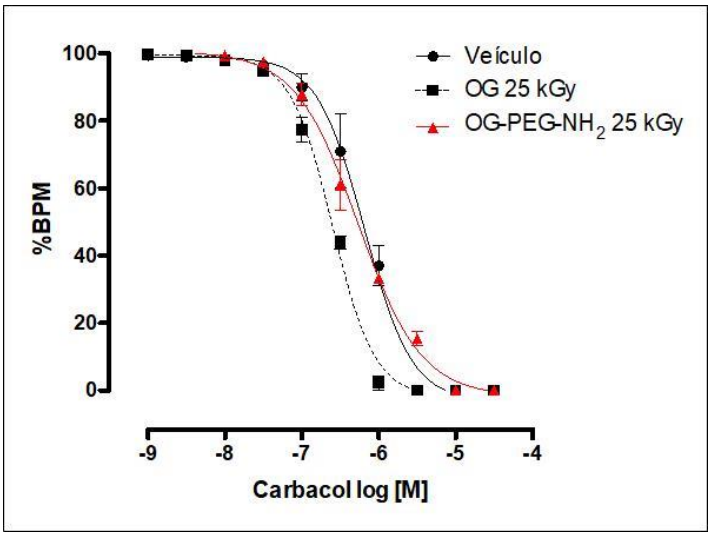


Fonte: autora da dissertação

A pré-incubação com OG 25 kGy reduziu a sensibilidade ao agonista carbacol como mostra a Figura 67. Esse agonista em concentrações crescentes promove a redução da freqüência de batimentos cardíacos, por outro lado, a pré-incubação com OG-PEG-NH_2

25 kGy não apresentou alterações na resposta ao agonista carbacol.

Figura 67- Curvas concentração-resposta para carbacol realizadas em átrio direito isolado de camundongos C57BI/6 previamente incubados com OG 25 kGy ou OG-PEG-NH_2 25 kGy



Fonte: autora da dissertação

No ensaio de reatividade atrial, concentrações iguais ou superiores a 50 μg/ml de OG podem alterar a funcionalidade do AD de camundongos. Esses resultados corroboram com os obtidos nos ensaios de viabilidade celular do OG apresentados na Figura 58.

Para o OG-PEG-NH_2 concentrações inferiores a 100 mg/ml não apresentaram efeitos tóxicos na viabilidade celular e na reatividade atrial. Possivelmente alterações na estrutura do OG estariam interagindo com os receptores colinérgicos, provocando uma redução na sensibilidade como observada na Figura 67.

Entretanto, o OG-PEG-NH_2 25 kGy reduziu a toxicidade em ensaios celulares e não afetou a reatividade atrial, demonstrando dessa maneira que a alteração de estrutura do OG com a funcionalização foi eficiente em reduzir a toxicidade.

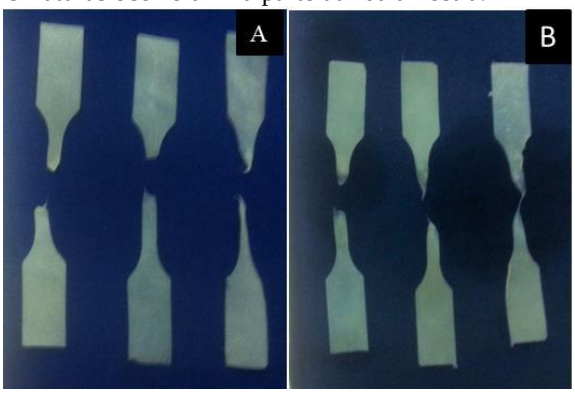
4.13 Ensaio de Resistência

O ensaio de resistência é fundamental para estudar as características mecânicas dos materiais. Por esse método pode-se selecionar quais materiais são os mais indicados para uma dada aplicação, pode prever como irá reagir quando submetido a maiores esforços físicos além de fazer um controle de qualidade. Para uma análise adequada, as

amostras devem ter área e forma definidas, apresentar as extremidades mais largas para garantir maior aderência às pinças, evitando deslizes ao realizar o ensaio. No centro da amostra, também conhecido com parte útil, são realizadas as medidas das propriedades mecânicas do material. Essa região possui uma área menor para garantir que a deformação ou ruptura ocorram no local pretendido (LOPES, 2017).

O PB é um material anisotrópico, ou seja, suas propriedades mecânicas dependem da direção. Por esse motivo, a norma (ASTM D638-10) determina que sejam realizados cinco testes com as amostras cortadas em sentido longitudinal e cinco na transversal. Na figura 68 são mostradas as rupturas realizadas nos corpos de prova do PB após o ensaio de resistência.

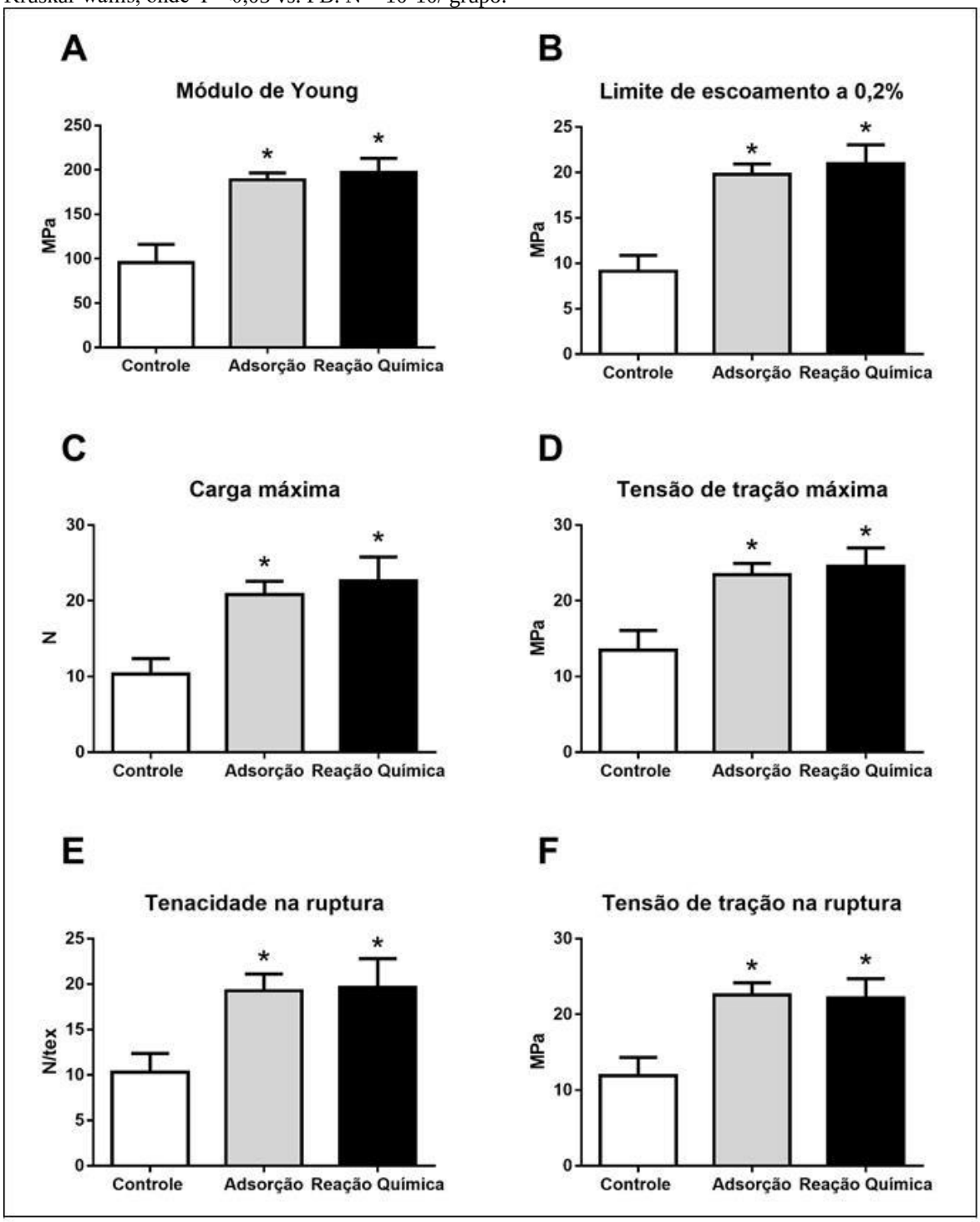
Figura 68 - Corpos de prova, após o teste de resistência. PB-OG-PEG-NH_2 AD (A) e PB-OG-PEG-NH_2 RQ (B). As fraturas ocorreram na parte útil da amostra.



Fonte: autora da dissertação

Os parâmetros avaliados nesse ensaio foram o módulo de Young, limite de escoamento (LE), carga máxima, tensão de tração máxima, tenacidade na ruptura e tensão de tração na ruptura conforme Figura 69.

Figura 69- Ensaio de resistência mecânica realizado em PB (Controle) e PB incorporado com 3 % (m/m) de OG-PEG-NH_2 4.000 M_n por dois métodos diferentes (Adsorção e Química). (A) Módulo de Young, (B) LE a 0,2%, (C) Carga Máxima, (D) Tensão de tração máxima, (E) Tenacidade na ruptura, e (F) Tensão de tração na ruptura. Os valores foram expressos como média ± EPM. ANOVA de uma via seguida de pós teste de Kruskal-wallis, onde*P <0,05 vs. PB. N = 10-10/ grupo.



Fonte: autora da dissertação

Os resultados obtidos demonstraram que houve uma melhora na resistência mecânica aumentando:

-O módulo de Young, que fornece uma indicação da rigidez do material;

-Limite de escoamento a 0,2%, que indica a resistência do material à deformação plástica permanente;

-Carga máxima, relacionada à carga máxima suportada pelo material;

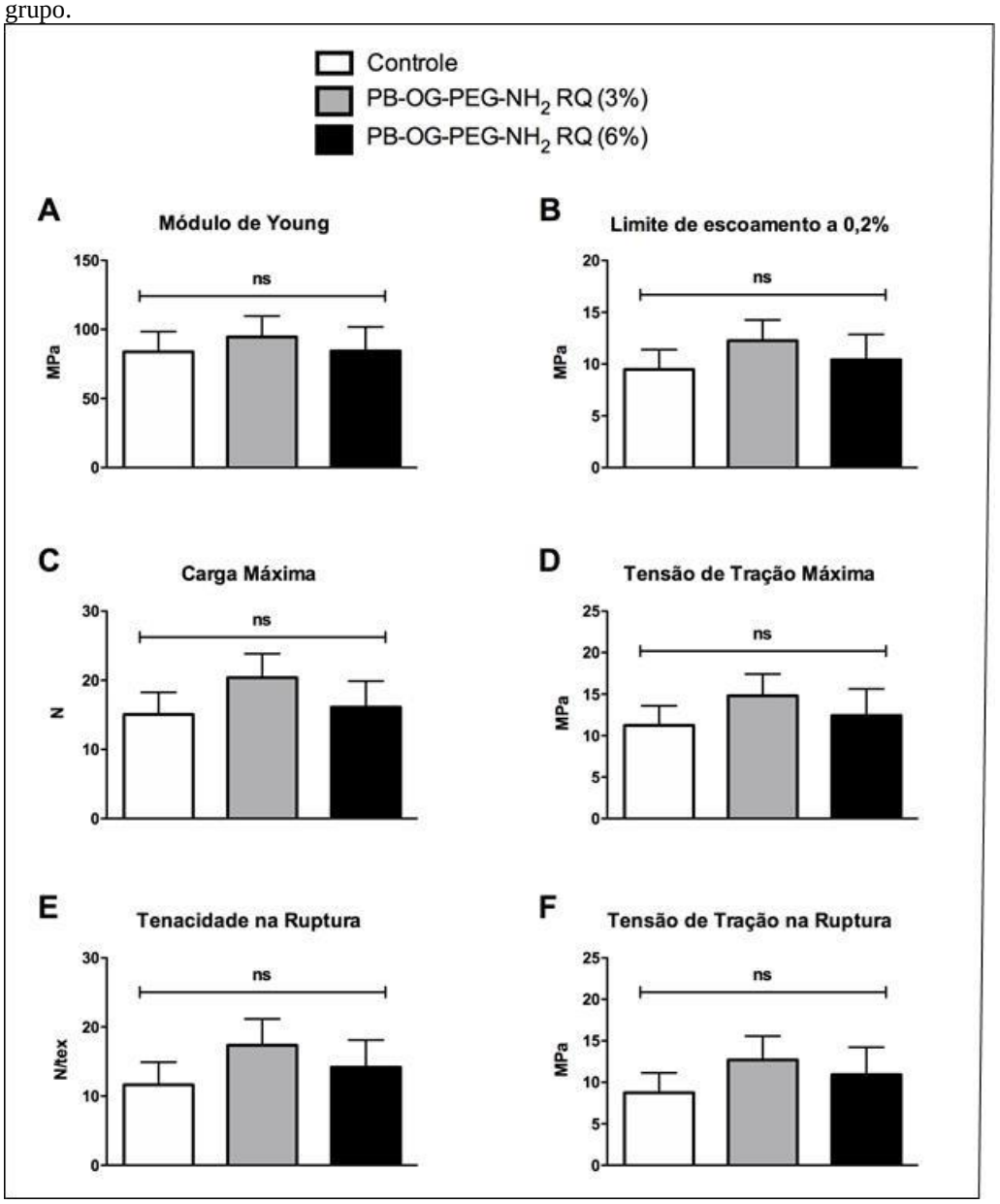
-Tensão de tração máxima, que corresponde ao valor máximo de tensão que o material suporta antes de se deformar ou romper;

-Tenacidade na ruptura, que está relacionada à energia ou impacto que o material pode absorver antes de fraturar e;

-Tensão de tração na ruptura, que indica a tensão de tração na ruptura do material.

Os resultados obtidos para PB (controle) e PB incorporado com 3 % e 6% de OG-PEG-NH_2 RQ 6.000 M_n com os mesmos parâmetros de resistência mecânica descritos anteriormente estão apresentados na Figura 70.

Figura 70 - Ensaio de resistência mecânica realizado em PB (Controle) e PB incorporado com 3 % e 6% de OG-PEG-NH_2 RQ 6.000 M_n. (A) Módulo de Young, (B) LE a 0,2%, (C) Carga Máxima, (D) Tensão de tração máxima, (E) Tenacidade na ruptura, e (F) Tensão de tração na ruptura. Os valores foram expressos como média ± EPM. ANOVA de uma via seguida de pós teste de Kruskal-wallis, onde*P <0,05 vs. PB. N = 10-10/ grupo.



Fonte: autora da dissertação

Observou-se que não houve diferenças significativas quanto às propriedades mecânicas do PB (controle) e as amostras testadas.

Neste caso, os resultados demonstraram a influência do tamanho do polímero na incorporação do PB. O impedimento estérico do PEG-NH_2 6.000 Mn dificultou a ligação do OG ao biomaterial e consequentemente a sua incorporação. A amidação, nesse caso, ocorreu entre o grupo –NH_2 do PEG e o grupo – COOH do PB.

4.14 Ensaio de Calcificação

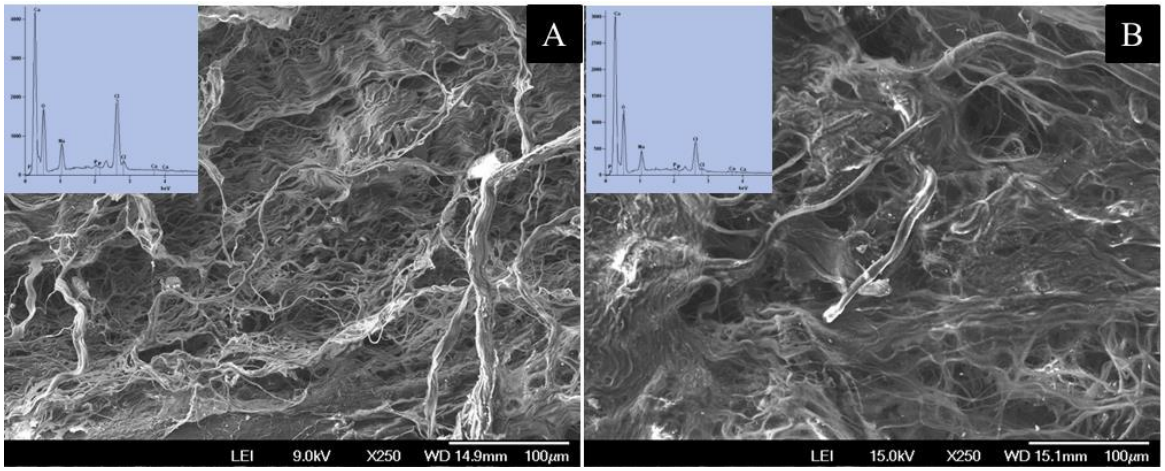
O ensaio de calcificação foi realizado a fim de determinar o potencial de interação das amostras de pericárdio bovino com o meio SBF, induzindo uma deposição de íons cálcio em sua superfície.

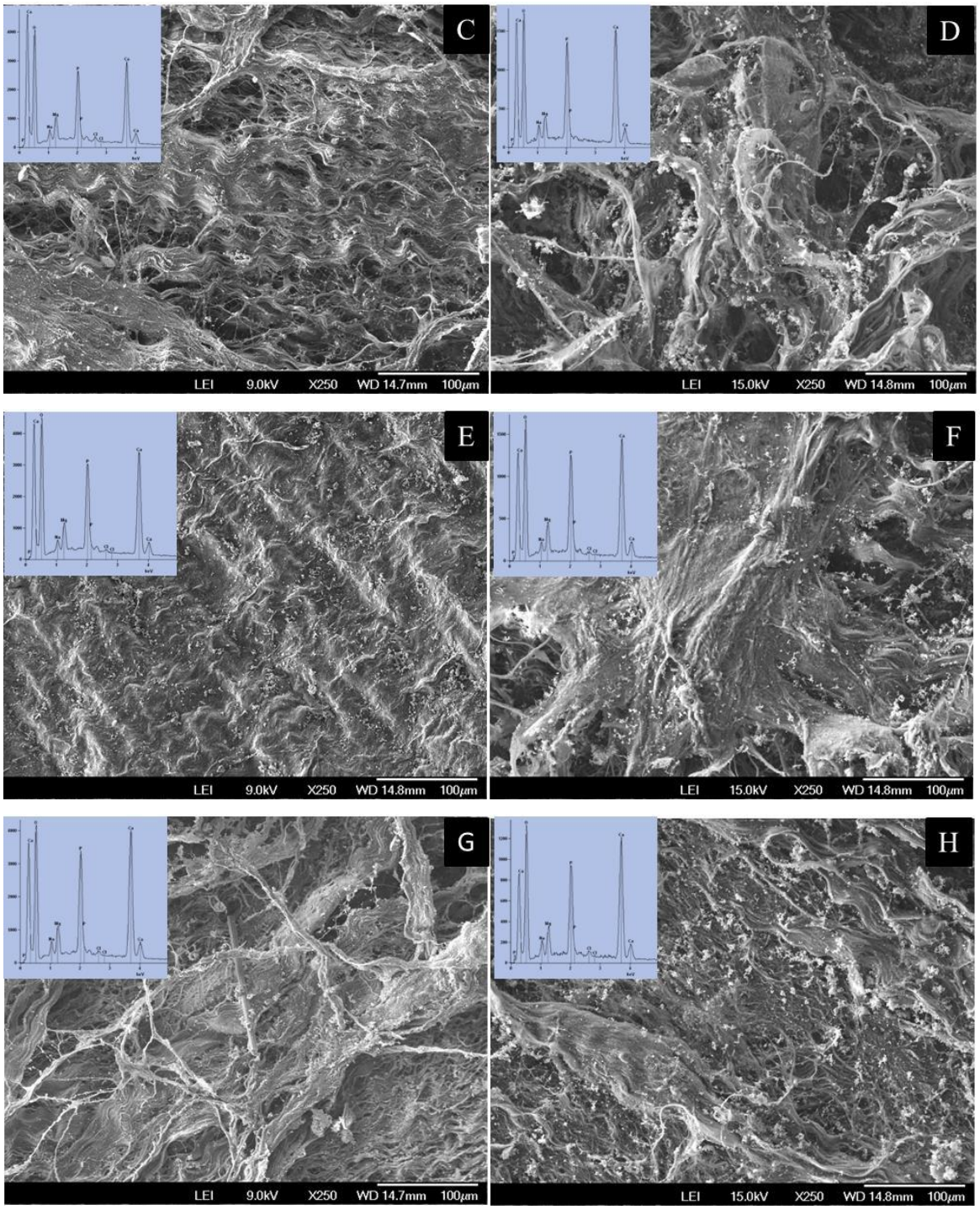
As amostras de pericárdio foram avaliadas analisando as imagens do MEV e por composição superficial mensurada pelo EDS. A partir de um aumento de 250X foi realizado o mapeamento dos elementos na superfície das amostras.

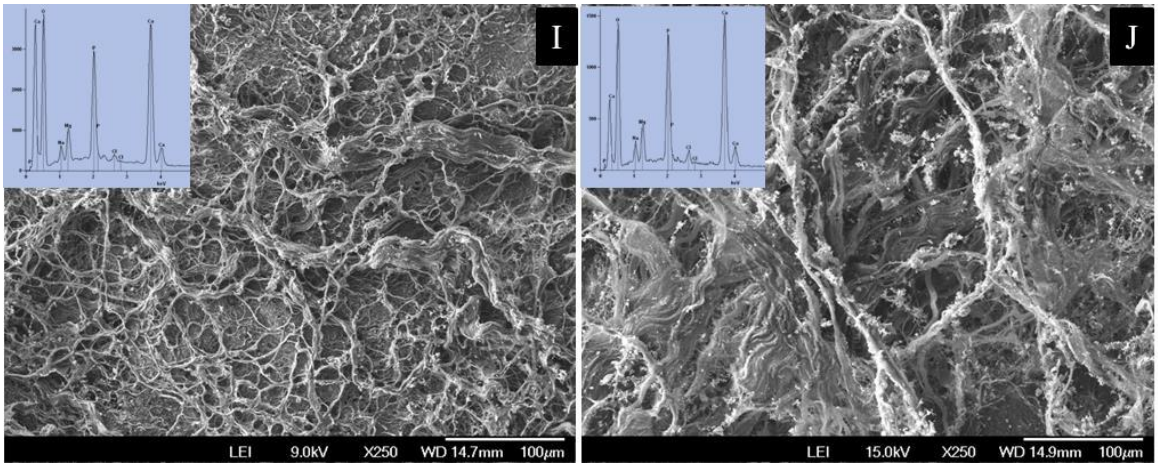
Nesse ensaio, foram utilizadas 3 amostras de PB incorporados, por reação química, do OG-PEG-NH_2 de tamanho 6.000 M_n e 3 amostras de PB em formaldeído (FA, 4%) como controle.

As Figuras 71A e 71B correspondem às amostras iniciais de PB e PB-OG-PEG-NH_2 RQ, respectivamente, antes da imersão em SBF. Nas Figuras 71C, 71D, 71E, 71F, 71G, 71H, 71I e 71J são mostradas as amostras PB e PB-OG-PEG-NH_2 RQ com 7 dias, 15 dias, 30 dias e 60 dias de incubação em SBF.

Figura 71- Micrografias de amostras de PB testadas em ensaio de calcificação: PB antes da imersão em SBF (A), PB-OG-PEG-NH_2 RQ antes da imersão em SBF (B), PB com 7 dias (C), PB-OG-PEG-NH_2 RQ com 7 dias (D), PB com 15 dias (E), PB-OG-PEG-NH_2 RQ com 15 dias (F), PB com 30 dias (G), PB-OG-PEG-NH_2 RQ com 30 dias (H), PB com 60 dias (I) e PB-OG-PEG-NH_2 RQ com 60 dias (J).



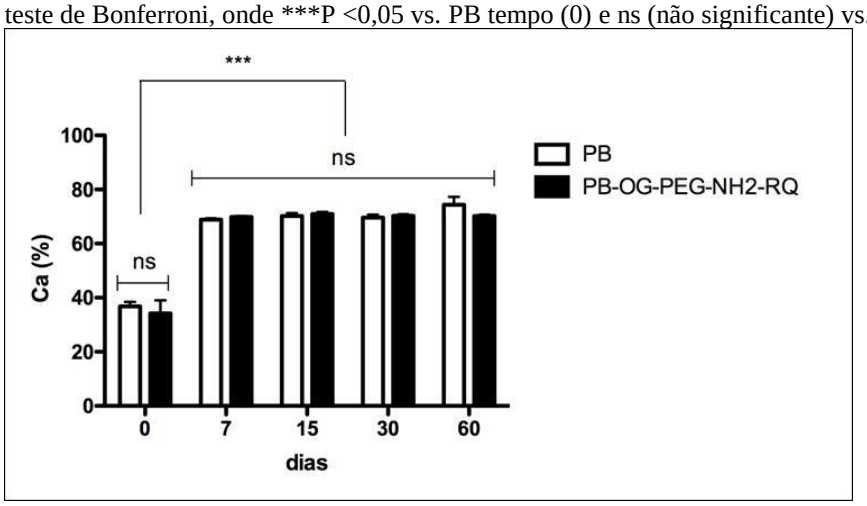

C
LEI 9.0kV X250 WD 14.7mm 100μm
D
LEI 15.0kV X250 WD 14.8mm 100μm
E
LEI 9.0kV X250 WD 14.8mm 100μm
F
LEI 15.0kV X250 WD 14.8mm 100μm
G
LEI 9.0kV X250 WD 14.7mm 100μm
H
LEI 15.0kV X250 WD 14.8mm 100μm



Fonte: autora da dissertação

Nas micrografias foi possível visualizar depósitos arredondados sobre as fibras de colágeno do pericárdio bovino similar a depósitos de cálcio (Ca), sendo confirmados pelo EDS. A análise estatística demonstrou que não houve diferenças significativas entre as amostras de PB-OG-PEG-NH_2 RQ e o controle. Porém houve diferenças em ambos os casos no tempo inicial, em que as amostras não estavam em contato com a solução SBF, e os tempos em que as amostras estavam nesta solução (Figura 72).

Figura 72- Ensaio de calcificação realizado em PB (Controle) e PB incorporado com 10 % de OG-PEG-NH_2 por reação química. Os valores foram expressos como média ± EPM. ANOVA de uma via seguida de pós teste de Bonferroni, onde ***P <0,05 vs. PB tempo (0) e ns (não significante) vs. PB tempo(7,15, 30 e 60).



Fonte: autora da dissertação

Apesar de a literatura descrever que o PEG-NH_2 6.000 M_n inibi a adsorção de cálcio (VASUDEV; CHANDY,; 1999) sua presença nas amostras analisadas pode ser justificada pela pequena quantidade de nanomaterial incorporado, não sendo possível o recobrimento da superfície da membrana. De acordo com SCHOEN e LEVY (2005) o

processo de calcificação também pode ser desencadeado pela utilização de glutaraldeído nos processos de reticulação do pericárdio bovino. Porém, a relação Ca/P permite investigar o tipo de depósito formado nas amostras. O principal tipo de formação averiguada é a da hidroxiapatita (HA) de fórmula molecular $Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$.

A presença de P (fósforo) também foi confirmada pelo EDS possibilitando o cálculo da relação Ca/P para todas as amostras (Figura 67) como é mostrado na Tabela 13.

Tabela 13- Relação Ca/P obtidos por EDS. * Média de três valores (n=3)

Tempo (dias)	Média* Ca/P para as amostras de PB	Média* Ca/P para as amostras de PB-OG-PEG-NH_2 RQ
0	0,59 ± 0,04	0,56 ± 0,20
7	2,21 ± 0,08	2,22 ± 0,22
15	2,36 ± 0,20	2,45 ± 0,14
30	2,37 ± 0,19	2,46 ± 0,11
60	2,50 ± 0,13	2,48 ± 0,08

Fonte: autora da dissertação

A razão Ca/P 1,67 é característica da hidroxiapatita (COSTA et al., 2009) porém, as amostras analisadas apresentaram valores de relação Ca/P maiores que 1,67, indicando que pode ter ocorrido a formação da HA-carbonatada.

5 CONCLUSÃO

As caracterizações realizadas confirmaram a síntese do amino-polietilenoglicol, OG e OG-PEG-NH_2.

A utilização da radiação gama, para a esterilização não causou nenhuma degradação estrutural ou morfológica nos materiais.

Os métodos para a incorporação do pericárdio bovino com OG-PEG-NH_2 4.000 M_n, tanto por adsorção quanto por reação química melhoraram o desempenho mecânico do biomaterial.

É digno de nota, que ao realizar o mesmo ensaio para o OG-PEG-NH_2 6.000 M_n o resultado obtido foi diferente ao anterior. O PEG-NH_2 de massa molecular maior deve ter impedido, por efeitos estéricos a incorporação do óxido de grafeno ao biomaterial.

Nos ensaios de citotoxicidade houve redução da viabilidade celular para o OG, para o extrato do PB controle e após a incorporação do OG-PEG-NH_2 6.000 M_n. No entanto, as amostras testadas de OG-PEG-NH_2 6.000 Mn foram biocompatíveis, visto que não foi observada a redução da viabilidade celular.

Observou-se também que o OG-PEG-NH_2 6.000 M_n não apresentou toxicidade em ensaios celulares, como também não afetou a reatividade atrial em camundongos.

A incorporação de 10% do nanocompósito OG-PEG-NH_2 6.000 M_n, não foi suficiente para inibir a adsorção do cálcio no PB.

Pode-se concluir que o PEG-NH_2 4.000 M_n possui o potencial para melhorar a resistência mecânica de biomateriais que possuem colágeno I, ao passo que o PEG-NH_2 6.000 $M_{n,}$ por não apresentar citotoxicidade pode ser um candidato em potencial como carreador de fármacos e em especial para os cardíacos por não afetar a reatividade atrial.

6 TRABALHOS FUTUROS

-Avaliar a citotoxicidade do OG-PEG-NH_2 4.000 M_n, do extrato do pericárdio bovino anterior e após a incorporação, por reação química, desse nanocompósito.

- Avaliar a adsorção de cálcio do pericárdio bovino após a incorporação, por reação química, do PEG-NH_2 4.000 M_n.

-Realizar ensaios de reatividade atrial para o OG-PEG-NH_2 4.000 M_n.

- Analisar a calcificação em PB com maiores quantidades de nanomaterial incorporado.

- Avançar para estudos *in vivo* em um modelo animal.

- Pesquisar sobre a interação do tecido modificado com OG-PEG-NH_2 4.000 M_n com células e componentes do sangue.

REFERÊNCIAS

American Society for Testing and Materials. ***ASTM Standards.*** Part 10: Standard test method for tensile properties of plastics. West Conshohocken, PA, 2010. (ASTM D638-10).

ANNABI, N.; SHIN, S. R.; TAMAYOL, A.; MISCUGLIO, M.; BAKOOSHLI, M. A.; ASSMANN, A.; MOSTAFALU, P.; YUN-JEONG, S.; MITHIEUX, S.; CHEUNG, X.; TANG, S. X.; WEISS, A. S.; KHADEMHOSSEINI, A. Highly elastic and conductive human-based protein hybrid hydrogels. ***Advanced Materials***, v. 28, p.40-49, 2016.

AQUINO, K. A. S. ***Gamma Radiation***, IntechOpen (Ed.), 2012, Cap.9 Sterilization By Gamma Irradiation, p.173-177.

BASKORO, F.; WONG, C. B.; KUMAR, R.; CHANG, C. W.; CHEN, C. H.; CHEN, D. W.; SHINGJIANG, J. L. Graphene oxide-cation interaction: Inter-layer spacing and zeta potential changes in response to various salt solutions. ***Journal of Membrane Science***, v. 554, p. 253-263, 2018.

BATIUSKAIKE, D.; GRINCEVICIUTE, N.; SNITKA, V. Impact of graphene oxide on viability of Chinese hamster ovary and mouse hepatoma MH-22A cells. ***Toxicology in Vitro***, v. 29, p. 1195-1200, 2015.

BOHNER, M.; LEMAITRE, J. Can bioactivity be tested in vitro with SBF solution. ***Biomaterials***, v.30, n.12, p.2175-2179, 2009.

BORGOGNONI, C. F.; MAIZATO, M. J. S.; LEIRNER, A. A.; POLAKIEWICZ, B.; BEPPU, M. M.; HIGA, O. Z.; PITOMBO, R. N. M. Effect of freeze-drying on the mechanical, physical and morphological properties of glutaraldehyde-treated bovine pericardium: evaluation of freeze-dried treated bovine pericardium properties. ***Journal of applied biomaterials e biomechanics***, v.8, p. 186-190, 2010.

BRAILE, D. M.; VOLPE, M. A.; RAMIN, S. L.; SOUZA, D. R. S. Tratamento cirúrgico das valvopatias. ***Revista Brasileira de Cirurgia Cardiovasular,*** v.9, p. 113-122, 1994.

CABALLERO, A.; SULEJMANI, F.; MARTIN, C.; PHAM, T.; SUN, W. Evaluation of transcatheter heart valve biomaterials: Biomechanical characterization of bovine and porcine pericardium. ***Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials***, v.75, p.486-494, 2017.

CABRAL, G. L. C. ***Síntese e caracterização de membranas/compósito de colágeno e hidroxiapatita para reconstituição óssea guiada***. 2016. 60 p. Dissertação (Mestrado em Materiais para Engenharia) - Universidade Federal de Itajubá, Itajubá.

CAI, B.; HU, K.; LI, C.; JIN, J.; HU, Y. Bovine sérum albumin bioconjugated graphene oxide: Red blood cell adhesion and hemolysis studied by QCM-D. ***Applied Surface Science***, v. 356, p. 844-851, 2015.

CHA, C.; SHIN, S. R.; GAO, X.; ANNABI, N.; DOKMECI, M. R.; TANG, X. S.; KHADEMHOSSEINI. Controlling mechanical properties of cell-laden hydrogels by covalent incorporation of graphene oxide. ***Small***, v.10, p.514-523, 2014.

CHANG, Y.; TSAI, C. C.; LIANG, H. C.; SUNG, H.W. In vivo evaluation of cellular and acellular bovine pericardia fixed with a naturally occurring crosslinking agent (genipin). ***Biomaterials***, v.12, p.2447-2457, 2002.

CHEN, J. J.; LI, Y.; ZHENG, X. M.; HE, F. A.; LAM, K. H. Enhancement in electroactive crystalline phase and dielectric performance of novel PEG-graphene/PVDF composites. ***Applied Surface Science***, v.448, p. 320-330, 2018.

CHOWDHURY, D. R.; SINGH, C.; PAUL, A. Role of graphite precursor and sodium nitrate in graphite oxide synthesis. ***Royal Society of Chemistry Advances***, v.4, p. 15138-15145, 2014.

CIUBOTARU, A.; CEBOTARI, S.; TUDORACHE, I.; BECKMANN, E.; HILFIKER, A.; HAVERICH, A. Biological heart valves. ***Biomed Tech***, v.58, p.389-397, 2013.

CLELAND, M. R. Industrial applications of electron accelerators. CAS Proc. Yellow reports CERN 2006-012, p. 383-416, 2006..

CONTESSOTO, P.; BROWNE, S.; BRODY, S.; PANDIT, A**.** ***Comprehensive Biomaterials II.*** Elsevier (Ed.), cap.7.27, Cardiac valves: Biologic and Synthetic. p. 524-547, 2017.

COSTA, A.C. F.M.; LIMA, M. G.; LIMA, L. H. M. A.; CORDEIRO, V. V.; VIANA,

K.M. S.; SOUZA, C. V. LIRA, H. L. Hidroxiapatita: Obtenção, caracterização e aplicações. ***Revista Eletrônica de Materiais e Processos***. v.43, p.29-38, 2009.

DEVASAHAYAM, S. ***Characterization and Biology of Nanomaterials for Drug Delivery***, Chapter 17-Nanotechnology and Nanomedicine in market: A global perspective onregulatory issues, p.477-522, 2019

DIMIEV, A. M.; TOUR, J. M. Mechanism of graphene oxide formation. ***ACS Nano***, v. 8, p.3060-3068, 2014.

DORATI, R.; GENTA, I.; MONTANARI, L.; CILURZO, F.; BUTTAFAVA, A.; FAUCITANO, A.; CONTI, B. The effect of γ-irradiation on PLGA/PEG microspheres containing ovalbumin. ***Journal of Controlled Release***, v.107, p.78-90, 2005.

DREYER, D. R.; TODD, A. D.; BIELAWSKI, C. W. Harnessing the chemistry of graphene oxide. ***Royal Society of Chemistry***, v.43, p. 5288-5301, 2014.

FERREIRA, A. D. A.; COSTA, F. D. A.; SANTOS, E. A. A.; SARDETO, E. A.; GOMES, C. H. G.; COLLATUSSO, C.; LOPES, S. A. V.; PERRUZO, A.; COSTA, I. S. E. A. L-glutamic acid in the prevention of the calcification of bovine pericardial fixed in glutaraldehyde: study in rats. ***Brazilian journal of cardiovascular***, v.22, p. 303-309, 2007.

FROST, R.; JONSSON, G. E.; CHAKAROV, D.; SVEDHEM, S.; KASEMO, B. Graphene oxide and lipid membranes: Interactions and nanocomposite structures. ***Nano Letters***, v.12, p. 3356-3362, 2012.

GAHETE, J. A.; BENITEZ, A.; OTERO, R.; ESQUIVEL, D.; SANCHIDRIAN, C. J.; MORALES, J.; CABALLERO, A.; SALGUERO, F. J. R. A comparative study of particle size distribution of graphene nanosheets synthesized by ultrasound-assisted method. ***Nanomaterials***, v.9, p.2-16, 2019.

GALLYAMOV, M. O.; CHASCHIN, I. S.; KHOKHLOVA, M. A.; GRIGOREV, T. E.; BAKULEVA, N. P.; LYUTOVA, I. G.; KONDRATENKO, J. E.; BADUN, G. A.; CHERNYSHEVA, M. G.; KHOKHLOV, A. R. Collagen tissue treated with chitosan solutions in carbonic acid for improved biological prosthetic heart valves. ***Materials Science and Engineering C***, v.37, p.127-140, 2014.

GAO, W. ***Graphene oxide - Reduction recipes, spectroscopy, and Applications*****.** Springer (Ed.). p.154, 2015

GEORGAKILAS, V. ***Functionalization of graphene***. Wiley-VCH (Ed.), p. 426, 2014,

GOISSIS, G.; BRAILE, D. M.; GIGLIOTI, A. F. Desenvolvimento de processo automático para a reticulação progressiva de matrizes de colágeno com glutaraldeído. ***Polímeros: Ciência e Tecnologia***, Out/Dez - 1999.

HU, Y.; LI, F.; DONGXUE, H.; NIU, L. ***Biocompatible graphene for Bioanalytical Applications***. Springer (Ed.), p.1-5, 2015.

HUMMERS,W. S.; OFFEMAN, R. E. Preparation of graphitic oxide. ***Journal of the American Chemical Society***, v.80, p.1339–1339,1958.

INTERNACIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION. ***Sterilization of health care products***. Part 2: Establishing the sterilization dose, 2006. (ISO 11137-2).

INTERNACIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION/TECHNICAL COMMITTEE. ***Terminology and nomenclature***, 2009. (ISO/TC 229 JWG1).

INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION. ***BIOLOGICAL EVALUATION OF MEDICAL DEVICES*** *– PART 5: TESTS FOR IN VITRO CYTOTOXICITY* de 2009 (ISO 10993-5).

ISENBURG, J. C.; SIMIONESCU, D. T.; VYAVAHARE, N. R. Tannic acid treatment enhances biostability and reduces calcification of glutaraldehyde fixed aortic wall. ***Biomaterials***, v.11, p.1237-1245, 2005.

JAURIS, I.M.; MATOS, C.F.; SAUCIER, C.; Adsorption of sodium diclofenac on graphene: a combined experimental and theoretical study. ***Physical Chemistry Chemical Physics***, v.18, p.1526-1536, 2016.

KABEL, K. H.; FARAG, AH. A.; ELNAGGAR, E. M.; GAMAL, A. G. Improvement of graphene oxide characteristics depending on base washing. Journal of Superhard Materials, v. 37, n. 5, p. 327-334, 2015.

KANG, S.; PARK, J. B.; LEE, T. J.; RYU. S.; BHANG, S. H.; LA, W. G.; NOH, M. K.; HONG, B. H.; KIM, B. S.; Covalent conjugation of mechanically stiff graphene oxide flakes to three-dimensional collagen scaffold for osteogenic differentiation oh human mesenchymal stem cells, ***Carbon***, v. 83, p. 162-172, 2015.

KARGOZAR, S.; MOZAFARI, M. Nanotechnology and nanomedicine: Star small, think big. ***Materials Today: Proceedings***, v.5, p. 15492-15500, 2018.

KISSLER, K. Improved separation of polyethylene glycols widely differing in molecular weigh range by reversed-phase high performance liquid chromatography and evaporative light scattering detection. ***Chromatographia***, v.49, p. 615-620, 1999.

KLABUNDE, R. Cardiovascular Physiology Concepts. In: KLABUNDE, R. ***Introduction to the Cardiovascular System***. Lippincott Williams e Wilkins (Ed.). Baltimore, v.2, p.1-5, 2012.

KOKUBO, T.; TAKADAMA, H. How useful is SBF in predicting in vivo bone bioactivity. ***Biomaterials***, v.27, n.15, p.2907-2915, 2006.

KONKENA, B.; SUKUMARAN, V. Understanding aqueous dispersibility of graphene oxide and reduced graphene oxide through pka measurements. ***Journal of Physical Chemistry Letters***, v.3, p. 867-872, 2012.

KUMAR, C. V.; PATTAMMATTEL, A. ***Nanotoxicity of graphene.*** Capítulo 9, Introduction to graphene, Elsevier (Ed.), p. 187-206, 2017.

LEIRNER, A. A; TATTINI JR, V; PITOMBO, R.M.N. Prospects in Lyophilization of bovine pericardium. ***Artificial Organs***, v.33, n.3, p.221-229, 2009.

LI, W.; YANG, Y. J. J. The reduction of graphene oxide by elemental copper and its application in the fabrication of graphene supercapacitor. ***Journal of Solid State Electrochemistry***, v.18, p.1621-1626, 2014.

LIAO, J.; QU, Y.; CHU, B.; ZHANG, X.; QIAN, Z. Graphene porous hybrid scaffold for cartilage tissue engineering. ***Nature scientific reports***, v. 5, p.1-16, 2015.

LIMA, R.; LUCCHESE, F. A.; BRAILE, D. M.; SALERMO, T.A. A Tribute to Euryclides de Jesus Zerbini, MD. ***Annals of Thoracic Surgery***, v.72, p.1789-1792, 2001.

LIU, Z.; ROBINSON, J. T.; SUN, X.; DAI, H. PEGylated nanographene oxide for delivery of water-insoluble cancer drugs. ***Journal American Chemical Society***, v.130, p.10876-10877, 2008.

LODHIA, J. V.; EVANS, B. J. Surgery. ***Heart valve surgery***, Elsevier (Ed.), 2018, v.36, p.75-82.

LOPES, S. M. P. Desenho e construção de uma máquina de carga dedicada a materiais biológicos com pequenas tensões de ruptura. 2017, 75 p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Física) - Universidade de Coimbra, Coimbra.

LOZANO, O.; TORRES, Q. T.; GARCIA, R. G. Nanomedicine for the cardiac myocyte: Where are we? ***Journal of Controlled Release***, v.271, p.149-165, 2018.

LU, X.; WEI, A.; FAN, Q.; WANG, L.; CHEN, P.; DONG, X.; HUANG, W. Macroporous foam of reduced graphene oxides prepared by lyophilisation. ***Materials Research Bulletin***, v.47, p. 4335-4339, 2012.

LUO, Y.; YANG, X.; TAN, X.; XU, L.; LIU, Z.; XIAO, J.; PENG, R. Functionalized graphene oxide in microbial engineering: An effective stimulator for bacterial growth. ***Carbon***, v.103, p.172-180, 2016.

MA, B.; WANG, X.; WU, C.; CHANG, J. Crosslinking strategies for preparation of extracellular matrix-derived cardiovascular scaffolds. ***Regenerative Biomaterials***, v.1, p.81-89, 2014.

MANKAD, S. V.; ALDEA, G. S.; HO, N. M.; MANKAD, R.; PISLARU, S.; RODRIGUEZ, L. L.; WHISENANT, B.; ZIMMERMAN, K. Transcatheter mitral valve implantation in degenerated bioprosthetic valves. ***Journal of American Society of Echocardiography,*** v.8, p.845-859, 2018.

MAO, J.; WANG, Y.; PHILIPPE, E.; CIANCIULLI, T.; VESELY, I.; HOW, D.; BOURGET, J. M.; GERMAIN, L.; ZHANG, Z.; GUIDOIN, R. Microstructural alterations owing to handling of bovine pericardium to manufacture bioprosthetic heart valves: A potential risk for cusp dehiscence. ***Morphologie***, v.101, p.77-87, 2017.

MATSON, J. Graphene researches Geim and Novoselov win Nobel Prize in physics. ***Scientific American***, 2010. Disponível em: <http://www.scientificamerican.com/article/geim-novoselov-physics-novel >. Acesso em: 8 jan. 2019.

MEHL, H.; MATOS, C. F.; NEIVA, E. G. C.; DOMINGUES, S. H.; ZARBIN, A. J. G. Efeito da variação de parâmetros reacionais na preparação de grafeno via oxidação e redução do grafite. ***Química Nova,*** v.37, n°10, p. 1639-1645, 2014.

MEHNATI, N. V.; TAHERI, K.; BORDBAR, A. K. Xylanase immobilization on modified superparamagnetic graphene oxide nanocomposite: Effect of PEGylation on activity and stability. ***International Journal of Biological Macromolecules***, v.107, p.418-425, 2018.

MEURIS, B.; PRAETERE, H.; STRASLY, M.; TRABUCCO, P.; LAI, J. C.; VERBRUGGHE, P.; HERIJGERS P. A novel tissue treatment to reduce mineralization of bovine pericardial heart valves. ***Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery***, v.1, p.197-206, 2018.

MOREIRA, A. J. **Estudo e desenvolvimento de sistemas de esterilização por plasma.** 2006. 114 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade de São Paulo- USP, São Paulo.

MUHLEBACH, S. Regulatory challenges of nanomedicines and their follow-on versions: A generic or similar approach? ***Advanced Drug Delivery Reviews***, v.131, p.122-131, 2018.

MUTTER, M. Solube polymers in organic synthesis: I. Preparation of polymer reagents using polyethylene glycol with terminal amino groups as polymeric component. ***Tetrahedron Letters,*** n. 31, p.2839-2842, 1978.

NETO, A. R. ***Fisiologia Cardiovascular***. Disponível em: <http://www.uff.br/fisiovet1/cardio_TT.pdf>. Acesso em: 11 abr. 2016.

NISHIDA, E.; MIYAJI.; TAKITA, H.; KANAYAMA, I.; TSUJI, M.; AKASAKA, T.; SUGAYA, T.; SAKAGAMI, R.; KAWANAMI, M. Graphene oxide coating facilitates the bioactivity of scaffold material for tissue engineering. ***Japanese Journal of Applied Physics***, v.53, 2014.

NOGUEIRA, G. M.; RODAS, A. C. D.; WESKA, R. F.; AIMOLI, C. G.; HIGA, O.Z.; MAIZATO, M.; LEINER, A. A.; PITOMBO, R. N. M.; POLAKIEWICZ, B.; BEPPU, M. M. Bovine pericardium coated with biopolymeric films as na alternative to prevent calcification: *In vitro* calcification and cytotoxicity results**.** ***Materials Science and Engineering***, v.30, p. 575-582, 2010.

NOUAILHETAS, Y. ***Radiações ionizantes e a vida***. Comissão Nacional de Energia Nuclear. Rio de Janeiro. Apostila. p.42, 2015. Disponível em: <http://www.cnen.gov.br.> Acesso em: 20 fev. 2019.

NOVOSELOV, K. S.; GEIM, A. K.; MOROZOV, S. V.; JIANG, D.; ZHANG, Y.; DUBONOS, S. V.; GRIGORIEVA, I. V.; FIRSOV, A. A. Electric field effect in atomically thin carbon films. ***Science***, v.306, p.666-669, 2004.

NOZAKI, A. C.; MARQUES, R. F. C.; DINIZ, I. M. A.; MARQUES, M. M.; MARCHI, J. Avaliação da citotoxicidade de membranas de colágeno visando à aplicação como biomaterial. Congresso Latino Americano de Órgãos Artificiais e Biomateriais 7, de 22 a 25 Agosto, 2012, Natal, RN.

OLAWOYIN, R. Nanotechnology: The future of fire safety. ***Safety Science***, v. 110, p. 214-221, 2018.

PADALA, M. A heart valve is no stronger than its weakest link: The need to improve durability of pericardial leaflets. ***Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery***, v. 156, p. 207-208, 2018.

PENDOLINO, F.; ARMATA, N. ***Graphene Oxide in Environmental Remediation Process,*** Springer (Ed.), v. 7, p. 11, 2017.

PERUZZO, A. M. ***Avaliação Mecânica histológica pericárdio bovino descelularizado submetido à pressão***. 2013. 77 p. Dissertação (Mestrado em Engenharia biomédica) – Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Paraná. 2013.

PIZA, M. A. Reticulação de pericárdio bovino com glutaraldeído: efeito da temperatura, tempo de reação e concentrações. 1997. 81p. Tese (Doutorado em Ciências e Engenharia de Materiais) – Universidade de São Paulo, São Paulo.

PUIG, L. B. Bioprótese cardíaca de dura-máter. ***Arquivos Brasileiros de Cardiologia***, v. 69, 1997.

POLAK, ROBERTA. Preparação, avaliação físico-química e biológica *in vitro* de pericárdio bovino conjugado com fibroína de seda/quitosana via liofilização e irradiação. 2010. 139 p. Dissertação (Mestrado em Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica) – Faculdades de ciências farmacêutica- Universidade de São Paulo- USP, São Paulo.

RALLAPALLI, S.; LIMAN, A. M.; GUHATHAKURTA, S. Hemocompatibility and surface properties of bovine pericardial patches: Effects of gamma sterilization. ***Current Medicine Research and Practice***, v. 6, p. 224-228, 2016.

RAMALINGAM, M. et al. Biomimetics. 2013. IN: AHADIAN, S; RAMALINGAM M.; KHADEMHOSSEINI, A. ***The emerging applications of graphene oxide and graphene in tissue engineering***. p. 279-300, 2013.

REDDY, S.; XU, X.; GUO, T.; ZHU, R.; HE, L.; RAMAKRISHANA, S. Allotropic carbon (graphene oxide and reduced graphene oxide) based biomaterials for neural regeneration**. *Current Opinion in Biomedical Engineering***, v. 6, p. 120-129, 2018.

ROCHA, R. V.; ALMEIDA, R. M. S. Cardiac surgery residency in Brazil: How to deal with the challenges of this unique specialty. ***Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery***, v. 1, p. 2227-2232, 2018.

SADYRALIEV, D. Graphene oxide – What is it? Nanografi Nano Technology, 2018. Disponível em: <https://nanografi.com/blog/graphene-oxide-what-is-it/>. Acesso em: 7 jan. 2019.

SANCHEZ, J. D. Z.; BATEMAN, M. G.; LAIZZO, P. A. ***Engineering in Medicine: Advances and Challenges***, cap. 9 Engineering and Technologies Associated with Cardiac Valve Repair and Replacement Therapies, p. 219-254, 2019.

SANTOS, M. H.; SILVA, R. M.; DUMONT, V. C.; NEVES, J. S.; MANSUR, H. S.; HENEINE, L. G. D. Extraction and characterization of highly purified collagen from bovine pericardium for potential bioengineering applications. ***Materials Science and Engineering C***, v. 33, p. 90-800, 2013.

SANTOS, P. S. ***Estudo e otimização dos parâmetros de processamento por radiação gama em escala industrial considerando fatores operacionais***. 2017. 14 p. Dissertação (Mestrado em Tecnologia Nuclear) – Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares-IPEN-CNEN/SP, São Paulo.

SHOEN, F. J.; LEVY, R. J. Calcification of tissue heart valve substitutes: Progress toward understanding and prevention. ***The Society of Thoracic Surgeons***, v. 79, p. 1072-1080, 2004.

SEABRA, A. B.; PAULA, A. J.; LIMA, R.; ALVES, O. L.; DURÁN, N. Nanotoxicity of graphene and graphene oxide. ***Chemical Research in Toxicology***, v. 27, p. 159-168, 2014.

SHIN, S. R.; AGHAEI-GHAREH-BOLAGH, B.; GAO, X.; NIKKHAH, M.; JUNG, SM.; DOLATSHAHI-PIROUZ, A.; KIM, S. M.; DOKMECI, M. R.; TANG, X. S.; KHADEMHOSSEINI, A. Layer-by-layer assembly of 3D tissue constructs with functionalized graphene. ***Advanced functional materials***, v. 24, p. 6136-6144, 2014.

SHIN, S. R.; LI, Y. C.; JANG, H. L.; KHOSHAKHLAGH, P.; AKBARI, M.; NASAJPOUR, A.; ZHANG, Y. S.; TAMAYOL, A.; KHADEMHOSSEINI, A. Graphene-based materials for tissue engineering. ***Advanced Drug Delivery Reviews***, v. 105, p. 255-274, 2016.

SHRINER, R. L.; HERMANN, K. F.; MORRILL, T. C; CURTIN, D. Y.; FUSON, R. C. ***The systematic identification of organic compounds***, Wiley (Ed.), v. 76, p. 669, 1999.

SIDDIQUI, R. F.; ABRAHAM J. R.; BUTANY J. Bioprosthetic heart valves: modes of failure. ***Histopathology***, v. 55, p. 135-144, 2009.

SILVA, T. F.; PENNA, A. L. B. Colágeno: Características químicas e propriedades funcionais. ***Revista Instituto Adolfo Lutz***, v. 71, p. 530-539, 2012.

SKAKALOVÁ, V.; KAISER, A. B. ***Graphene: Properties, preparation, characterisation and devices***, Elsevier (Ed.), v.57, p.52-53 2014.

SOBOTTA, J.; PAULSEN, F.;WASCHKE, J. ***Sobotta: Atlas de anatomia humana***. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan (Ed.), p. 219-227, 2009.

SOLANKI, A.; CHUENG, S-T. D.; YIN, P. T.; KAPPERA, R.; CHHOWALLA, M.; LEE, K-B. Axonal alignment and enhances neuronal differentiation of neural stem cells on graphene-nanoparticles hybrid strutures. ***Materials Views***, v. 25, p. 5477-5482, 2013.

SONG, J.; WANG, X.; CHANG, C. T. Preparation and characterization of graphene oxide. ***Journal of Nanomaterials***, v.2014, p. 6, 2014.

STOBINSKI, L.; LESIAK, B.; MALOLEPSZY, A.; MAZURKIEWICZ, M.; MIERZWA, B.; ZEMEK, J.; JIRICEK, P.; BIELOSHAPKA, I. Graphene oxide and reduced graphene oxide studied by XDR, TEM and electron spectroscopy methods. ***Journal of Electron Spectroscopy and Related Phenomena***, v.195, p. 145-154, 2014.

TABISH, T. A. Graphene-based materials: The missing piece in nanomedicine. ***Biochemical and Biophysical Research***, v. 4, p. 686-689, 2018.

TAM, H.; ZHANG, W.; INFANTE, D.; PARCHMENT, N.; SACKS, M.; VYAVAHARE, N. Fixation of bovine pericardium-based tissue biomaterial with irreversible chemistry improves biochemical and biomechanical properties. ***Journal of Cardiovascular Translation Research,*** v.10, p. 194-205, 2017.

TIPNIS, N. P.; BURGESS, D. J. Sterilization of Implantable Polymer-Based Medical Devices: A Review***. International Journal of Pharmaceutics***, v. 2, p. 455-460, 2017.

TIWARI, A.; SYVAJARVI, M. ***Graphene Materials- Fundamentals and Emerging Applications***, Wiley (Ed.), p.25-27, 2015.

VASUDEV, S. C.; CHANDY, T. Polyethylene glycol-grafted bovine pericardium: a novel hybrid tissue resistant to calcification, ***Journal of Materials Science: Materials in Medicine,*** v.10, p. 121-128, 1999.

VEN, C. F. T. V. D; WU, P. J.; TIBBITT, M. W.; MIL, A. V.; SLUIJTER, J. P. G.; LANGER, R.; AIKAWA, E. *In vitro* 3D model and miRNA drug delivery to target calcific

aortic valve disease***. Clinical Science***, v. 131, p. 181-195, 2017.

VESELY, I. Heart valve tissue engineering. ***Circulation Research***, v. 8, p.744, 2005.

VOLLHARDT, P.; SCHORE, N. E. **Química Orgânica- Estrutura e Função**. Bookman (Ed.), 2013.

WHELAN, A.; DUFFY, J.; GAUL, R. T.; REILLY, D. O.; NOLAN, D. R.; GUNNING, P.; LALLY, C.; MURPHY, B. Collagen fibre orientation and dispersion govern ultimate tensile strength, stiffness and the fatigue performance of bovine pericardium. ***Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials***, v. 90, p. 54-60, 2018.

WOODSON. T. S.; Public private partnerships and emerging technologies: A look at nanomedicine for diseases of poverty. ***Research Policy***, v.45, p.1410-1418, 2016.

WU, G. ***Technology for Advanced Materials. c***ap.1 Radiation Sources and Radiation Procession, p. 1-11, 2019.

WU, H. Y,; LIN, K. J.; WANG, P. Y..; LIN, C. W.; YANG, H. W. ; MA, C.C.; LU, Y. J ; JAN, T. R. Polyethylene glycol-coated graphene oxide attenuates antigen-specific IgE production and enhanced antigen-induced T-cell reactivity in ovalbumin-sensitized BALB/c mice. ***International Journal of Nanomedicine***, v. 9, 2014.

XU, Z.; WANG, S.; LI, Y.; WANG, M.; SHI, P.; HUANG, X. Covalent functionalization of graphene oxide with Biocompatible poly(ethylene glycol) for delivery of paclitaxel. ***ACS Applied Materials e Interfaces***, v. 6, p. 17268-17276, 2014.

YANG, K.; FENG, L.; XIAOZE, F.; LIU, Z. Nano-graphene in biomedicine: theranostic applications. ***The Royal Society of Chemistry***, v. 42, 2013.

YE, M.; ZHANG, Z.; ZHAO, Y.; QU, L. Graphene Platforms for smart energy generation and storage. ***Joule***, v. 2, 2018.

YU, H.; ZHANG, B.; BULIN, C.; LI, R.; XING, R. High-efficient synthesis of Graphene oxide based on improved hummers method. ***Scientific Reports***, v. 6, 2016.

ZHANG, W.; MA, J.; GAO, D.; ZHOU, Y.; LI, C.; ZHA, J.; ZHANG, J. Preparation of amino-functionalized graphene oxide by Hoffman rearrangement and its performances on polyacrylate coating latex. ***Progress in Organic Coatings***, v. 94, 2016.

ZHAO, J.; LIU, L.; LI, F. ***Graphene Oxide: Physiscs and Applications***., Springer (Ed.), 2015.

ZHENG, Q.; KIM, J. K. ***Graphene for transparent conductors- Synthesis, properties and applications***, Springer (Ed), p. 79-80, 2015.

ZHU, A. S.; GRAND-ALLEN, J. K. Heart valve tissue engineering for valve replacement and disease modelling. ***Current Opinion in Biomedical Engineering***, v. 5, p. 35-41, 2018.

ZHUANG, W.; HE, L.; ZHU, J.; ZHENG, J.; LIU, X.; DONG. Y.; WU, J.; ZHOU, J.; CHEN, Y.; YING, H. Efficient nanobiocatalytic systems of nuclease P1 immobilized on PEG-NH2 modified graphene oxide: Effects of interface property heterogeneity. ***Colloids and Surfaces B: Biointerfaces***, v. 145, p. 785-794, 2016.

ANEXO

ANEXO 1 – Comissão de ética no uso de animais.

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS
UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

ICBUSP

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira", Butantã, São Paulo, SP · Av. Professor Lineu Prestes, 2415 - ICB III - 05508 000
CEUA-ICB/USP - Telefone (11) 3091-7733 - e-mail: cep@icb.usp.br

CERTIFICADO

Certificamos que o projeto intitulado "***Efeito da exposição neonatal ao poluente ambiental 1,2-naftoquinona na inflamação pulmonar e função cardiovascular em camundongos: papel do dimorfismo sexual, dos receptores de potencial transiente (TRP), toll 4 (TLR4) e da apoliproteína (APO-E)***", registrado sob o protocolo nº ***48/2016***, que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de *Pesquisa Científica*, encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle e Experimentação Animal (CONCEA). Ante esta conformidade, o referido projeto foi avaliado e aprovado em ***08/08/2016*** pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo (CEUA-ICB/USP), outorgando esta licença de uso de animais com validade de **4 ano(s)** a partir da data de aprovação.

- Investigador Principal: **Dr.(a.)** ***Soraia Katia Pereira Costa***
- Departamento: *Farmacologia*
- Membros da Equipe: *Charliston Alves da Cunha (Iniciação Científica), Anderson Romério Azevedo Cerqueira (Pós-Graduando), Simone Aparecida Teixeira (Técnico de laboratório), Leandro Rodrigues (Pós-graduando), Karla Barroso Feitosa (Pós-Graduando), Flávia Neto de Jesus (Pós-graduando), Letícia Zorante de Lucena (Iniciação Científica), Lucia Rossetti Lopes (Pesquisador Colaborador), Marcelo Nicolás Muscará (Pesquisador Colaborador), Antonio Garcia Soares Jr (Pós-Graduando), Juliana Florenzano Martorelli (Pós-Graduando)*

Ao final do período outorgado por esta licença, o pesquisador responsável deverá encaminhar a esta comissão, até o último dia de validade da atual proposta, *relatório final* de acordo com a Resolução Normativa CONCEA nº 30/2016 - Diretriz Brasileira para o Cuidado e a Utilização de Animais em Atividades de Ensino ou de Pesquisa Científica (DBCA), conforme modelo constante no endereço eletrônico www.icb.usp.br/ceua. Havendo interesse na renovação do projeto, a solicitação deverá ser protocolada pela Secretaria da CEUA-ICB/USP até o último dia de validade da atual proposta. Após esta data uma nova proposta deverá ser encaminhada.

CERTIFICATE

We hereby certify that the project entitled "***Effect of neonatal exposure to the ambiente pollutant 1,2-naphthoquinone in the lung inflammation and cardiovascular function in mice: role of sexual dimorphism, transient receptors potential channels (TRP), toll 4 receptors (TLR4) and apolipoprotein (APO***", protocol nº ***48/2016***, which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human), for *Scientific Research Purposes*, is in accordance with the provisions of the Law nº 11.794 passed on October 8th, 2008, Decree nº 6899 passed on July 15th, 2009, and the rules issued by the National Council for Control and Animal Experimentation (CONCEA). According to this legislation, the project was evaluated and approved on ***8/8/2016*** by the ETHICS COMMITTEE ON ANIMAL USE, Institute of Biomedical Sciences, University of Sao Paulo (CEUA-ICB/USP), and the license for animal use is valid for **4 year(s)** from the date of approval.

- Principal Investigator: **Dr.(a.)** ***Soraia Katia Pereira Costa***
- Team members: *Charliston Alves da Cunha (Undergraduate Student), Anderson Romério Azevedo Cerqueira (Graduate Student), Simone Aparecida Teixeira (Laboratory Technician), Leandro Rodrigues*

ICB USP

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS
UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira", Butantã, São Paulo, SP · Av. Professor Lineu Prestes, 2415 - ICB III - 05508 000
CEUA-ICB/USP - Telefone (11) 3091-7733 - e-mail: cep@icb.usp.br

(Graduate Student), Karla Barroso Feitosa (Graduate Student), Flávia Neto de Jesus (Graduate Student), Letícia Zorante de Lucena (Undergraduate Student), Lucia Rossetti Lopes (Colaborator Researcher), Marcelo Nicolás Muscará (Colaborator Researcher), Antonio Garcia Soares Jr (Graduate Student), Juliana Florenzano Martorelli (Graduate Student)

At the end of the period granted by this license, the Principal Investigator must submit a final report of the project to this committee, according to the Rule nº 30 and the Diretriz Brasileira para o Cuidado e a Utilização de Animais em Atividades de Ensino ou de Pesquisa Científica (DBCA) issued by the CONCEA. If a renewal of the project is intended, the request must be submitted to the CEUA-ICB/USP secretary before the expiration of the current proposal. After this date, a new proposal must be prepared.

Espécie/Species	Linhagem/Strain	Sexo/Gender	Idade-Peso/ Age-Weight	Total
Mus musculus	*C57BL/6*	*Macho/male*	*2-15 g*	*60*
	C57Bl/6 KO APO-E	*Macho/male*	*2-15 g*	*42*
	C57BL/6	*Fêmea/female*	*2-15 g*	*60*
	C57Bl/6 KO Toll 4 (TLR4)	*Macho/male*	*2-15 g*	*20*

São Paulo, 08 de junho de 2016.

Prof. Dr. **Anderson de Sá Nunes**
Coordenador CEUA-ICB/USP

Eliane Aparecida Gomes de M. Nascimento
Secretária CEUA-ICB/USP

INSTITUTO DE PESQUISAS ENERGÉTICAS E NUCLEARES
Diretoria de Pesquisa, Desenvolvimento e Ensino
Av. Prof. Lineu Prestes, 2242 – Cidade Universitária CEP: 05508-000
Fone/Fax(0XX11) 3133-8908
SÃO PAULO – São Paulo – Brasil
http://www.ipen.br

O IPEN é uma Autaquia vinculada à Secretaria de Desenvolvimento, associada à Universiade de São Paulo e gerida técnica e administrativamente pela Comissão Nacional de Energia Nuclear, órgão do Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação.