



UNIVERSIDADE FEDERAL DO MARANHÃO
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA, PÓS-GRADUAÇÃO E INOVAÇÃO
CENTRO DE CIÊNCIAS SOCIAIS, DA SAÚDE E TECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA DOS MATERIAIS

ÁLEFE ROGER SILVA FRANÇA

**Síntese Sustentável de Grafeno e Análise de Nanocompósitos à Base de
PLA: Impactos da Funcionalização no Polímero e Potenciais Aplicações em
Tratamentos Tópicos Contra Câncer**

Imperatriz

2024

ÁLEFE ROGER SILVA FRANÇA

Síntese Sustentável de Grafeno e Análise de Nanocompósitos à Base de PLA: Impactos da Funcionalização no Polímero e Potenciais Aplicações em Tratamentos Tópicos Contra Câncer

Dissertação apresentada à coordenação do Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Materiais, da Universidade Federal do Maranhão, como requisito parcial para a obtenção do título de mestre em Ciência dos Materiais.

Orientadora: Profa. Dra. Luciana Magalhães Rebelo Alencar

Coorientadora: Profa. Dra. Luzeli Moreira da Silva

Imperatriz

2024

Ficha gerada por meio do SIGAA/Biblioteca com dados fornecidos pelo(a) autor(a).
Diretoria Integrada de Bibliotecas/UFMA

França, Álefe Roger Silva.

Síntese Sustentável de Grafeno e Análise de Nanocompósitos à Base de PLA: Impactos da Funcionalização no Polímero e Potenciais Aplicações em Tratamentos Tópicos Contra Câncer / Álefe Roger Silva França. - 2024.
124 f.

Coorientador(a) 1: Luzeli Moreira da Silva.

Orientador(a): Luciana Magalhães Rebelo Alencar.

Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-graduação em Ciência dos Materiais/ccim, Universidade Federal do Maranhão, Imperatriz - Ma, 2024.

1. Biopolímeros. 2. Grafeno. 3. Manufatura Aditiva.
I. Alencar, Luciana Magalhães Rebelo. II. Silva, Luzeli Moreira da. III. Título.



UNIVERSIDADE FEDERAL DO MARANHÃO - UFMA

Centro de Ciências de Imperatriz - CCIM

Programa Pós-Graduação em Ciência dos Materiais - PPGCM



Membros da comissão julgadora da defesa da dissertação de mestrado do aluno Álefe Roger Silva França apresentada e aprovada ao Programa de Pós-graduação em Ciência dos Materiais (PPGCM), em 16/08/2024.

COMISSÃO JULGADORA:

-Prof^ª. Dr^ª. Luciana Magalhães Rebelo Alencar (PPGCM/UFMA) - Presidente e Orientadora.

-Prof^ª. Dr^ª. Luzeli Moreira da Silva (PPGCM/UFMA) - Avaliadora interna.

-Prof. Dr. Pierre Basílio Almeida Fechine (UFCE) - Avaliador externo.

OBS.: Ata de defesa com as respectivas assinaturas dos membros encontra-se na coordenação do programa da unidade.

DEDICATÓRIA

*Aos meus pais, por sempre fornecerem o apoio
necessário em cada etapa.*

“Vamos viver nossos sonhos, temos tão pouco tempo”.

Charlie Brown Jr.

AGRADECIMENTOS

À Deus, por me guiar pelo caminho certo, sempre colocando pessoas especiais que tornaram a jornada mais leve e apreciável.

À professora Dra. Luciana, que se dispôs indubitavelmente a aceitar orientação deste trabalho, realizando tal feito de forma esplêndida. Palavras não são suficientes para expressar tamanha a gratidão por tudo, mas deixo aqui o meu muitíssimo obrigado;

Aos demais professores que, de alguma forma, tornaram possível e contribuíram para o desenvolvimento e o sucesso deste trabalho. Muito obrigado;

Aos meus pais, Elisângela e Rogério, que sempre me apoiaram e forneceram o suporte necessário para tornar os meus objetivos possíveis. Sem eles não seria possível;

Aos amigos do LBN, Joel, Socorro, Beatriz e Erick. Muito obrigado por compartilharem os seus conhecimentos, pelo companheirismo, e também pelos momentos de descontração, vocês são demais;

Aos amigos que fiz no PPGCM-UFMA, agradeço imensamente pelo conhecimento compartilhado, e por tornarem a jornada mais fácil. Muito obrigado por tudo;

Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo apoio financeiro por meio da bolsa de estudos;

A todos(as) que contribuíram de forma direta ou indireta para a realização deste trabalho.

Muito Obrigado!

RESUMO

Os biopolímeros vem sendo amplamente explorados no âmbito das aplicações biomédicas, principalmente devido a maior facilidade de processamento, e por apresentar um conjunto de propriedades mecânicas, químicas e biológicas que favorecem a sua implementação neste setor. A utilização dos biopolímeros foi impulsionada devido ao avanço das técnicas de manufatura aditiva (MA), em especial os métodos de impressão 3D por fusão e deposição de filamento (FDM), e a impressão de resina por estereolitografia (SLA). A adição de outros materiais à estrutura dos polímeros pode promover um aperfeiçoamento de suas propriedades, tornando-os mais versáteis em termos de aplicações. Nesse sentido, o grafeno tem se mostrado como um ótimo candidato, uma vez que apresenta ótimas propriedades mecânicas, de condução elétrica e térmica, além de ser capaz de modular propriedades físico-químicas dos polímeros. Porém, uma das dificuldades associadas a implementação do grafeno em aplicações biológica se deve a sua síntese, visto que, em grande parte dos procedimentos presentes na literatura, são empregados ácidos fortes. Neste aspecto, um dos principais objetivos desse trabalho foi o desenvolvimento de um processo de síntese verde. Além disso, por meio das impressoras 3D de filamento (FDM) e de resina (SLA), foram produzidas amostras a partir de filamento e resina à base de Ácido Polilático (PLA) e funcionalizadas com grafeno, com o intuito de averiguar as alterações provocadas pela inserção do material à estrutura do polímero, e a possibilidade da implementação destes nanocompósito em aplicações tópicas por meio da redução da viabilidade de crescimento de células cancerígenas. Para tal, foram realizados ensaios de imersão em Fluido Corporal Simulado (SBF), cultura de células e viabilidade celular. Os resultados de DRX e MEV/EDS realizados após a imersão, mostraram a formação de Hidroxiapatita (HA) na superfície das amostras de filamento PLA e PLAG. Com base nos resultados de Raman, AFM/KPFM e Microdureza Vickers, verificou-se que, quando comparado ao polímero puro, a adição de grafeno promove alterações estruturais, morfológicas, e elétricas, que culminam em alterações nas propriedades finais do material, resultando em mudanças no grau de interação das células com a superfície do material.

Palavras-chave: Biopolímeros. Grafeno. Manufatura Aditiva.

ABSTRACT

Due to their greater ease of processing and because they present a set of mechanical, chemical, and biological properties, biopolymers have been widely explored in biomedical applications. The use of biopolymers has been boosted due to the advancement of additive manufacturing (AM) techniques, in particular, 3D printing methods by fusion and filament deposition (FDM) and resin printing by stereolithography (SLA). Adding other materials to the polymer structure can improve their properties, making them more versatile in applications. In this sense, graphene has proven to be an excellent candidate, as it has outstanding mechanical, electrical, and thermal conduction properties and can modulate the physicochemical properties of polymers. However, one of the difficulties associated with implementing graphene in biological applications is due to its synthesis since strong acids are used in a large part of the procedures present in the literature. One of the main objectives of this work was developing a green synthesis process. Furthermore, using filament (FDM) and resin (SLA) 3D printers, samples were produced from filament and resin based on Polylactic Acid (PLA) and functionalized with graphene to investigate the changes caused by inserting the material into the polymer structure and the possibility of implementing this composite in topical applications by reducing the growth viability of cancer cells. To this end, immersion tests in Simulated Body Fluid (SBF), cell culture, and cell viability were carried out. The XRD and SEM/EDS results performed after immersion showed the formation of Hydroxyapatite (HA) on the surface of the PLA and PLAG filament samples. Based on the results of Raman, AFM/KPFM, and Vickers Microhardness, it was found that the addition of graphene promotes structural, morphological, and electrical changes, which culminate in changes in the final properties of the material, which results in changes in the degree of interaction of the cells with the surface of the material.

Keywords: Biopolymers. Graphene. Additive Manufacturing.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Utilização de Biopolímeros na Área Biomédica. Esquema ilustrando as aplicações de biomateriais poliméricos em diferentes áreas biomédicas. Fonte: Próprio autor.	5
Figura 2: Estrutura Química do PLA semicristalino (PLLA). Representação da estrutura química do ácido láctico (monômero), precursor do ácido poli(l-lático) (polímero). Fonte: próprio autor.	6
Figura 3: Requisitos essenciais para a impressão 3D por extrusão de polímeros. Para que os polímeros sejam adequados para impressão FDM, é crucial que possuam uma viscosidade adequada, permitindo a extrusão e a formação de filamentos contínuos. Após a extrusão, o polímero deve adquirir uma consistência mais firme para garantir resistência mecânica suficiente, sustentando as estruturas impressas e prevenindo a delaminação. Figura adaptada da referência [42].....	8
Figura 4: Representação do Funcionamento de uma Impressora SLA. Entre as principais vantagens da impressora de resina, destaca-se a sua capacidade de imprimir objetos com arquitetura bastante complexas, e com altíssima resolução. Figura adaptada da referência [50].	10
Figura 5: Representação esquemática do grafeno. A figura mostra uma representação comparativa entre o grafite (A), constituído a partir da sobreposição camadas de grafeno, e em (B) uma monocamada de grafeno isolada. Fonte: Próprio autor.	11
Figura 6: Métodos de Síntese do Grafeno. Esquema ilustrativo das abordagens utilizadas para obtenção do grafeno. Figura adaptada da referência [60].	13
Figura 7: Cargas de Membrana. Representação esquemática da estrutura da membrana celular explicando a distribuição da carga explicando a distribuição da carga superficial (a esquerda) e o potencial da membrana (a direita). Adaptado de [67].	15
Figura 8: Desenvolvimento do Modelo em Software CAD. Ilustração do passo a passo das etapas para obtenção dos corpos de prova, no software de desenvolvimento CAD Fusion 360 (A), e em seguida, o processo de fatiamento no software Ultimaker Cura (B).....	18
Figura 9: Procedimento Experimental Para Síntese Do Grafeno. Em (1), é mostrado a representação da primeira etapa do procedimento que é a esfoliação eletroquímica do grafite, que foi realizado em uma solução de sulfato de sódio. Após este procedimento, a solução foi levada para um sonicador de ponteira (2), com o objetivo de promover a separação das camadas por meio da esfoliação mecânica. O passo (3) representa o procedimento de limpeza das	

amostras. No total foram realizadas três lavagens com água destilada. Por fim, foi realizada a secagem do grafeno obtido em uma estufa.....	22
Figura 10: Representação da difração de ondas incidentes em uma estrutura cristalina. Um feixe de raios X paralelo, monocromático e coerente incide com um ângulo θ sobre dois planos atômicos paralelos, separados por uma distância interplanar $dhkl$ sendo dispersos pelos átomos A e B.....	25
Figura 11: Princípios Básicos de Funcionamento da Espectroscopia Raman. Representação do princípio de funcionamento da técnica de ER. Quando a luz de um laser monocromático incide sobre uma amostra, a maior parte da luz é espalhada elasticamente (Espalhamento Rayleigh), sem mudança de energia. No entanto, uma pequena fração da luz é espalhada inelasticamente, com uma mudança de energia que corresponde a transições vibracionais, rotacionais ou outras transições baixas de energia das moléculas na amostra (espalhamento Raman). Fonte: próprio autor.	26
Figura 12: Modos de Operação do AFM. Representação dos modos de operação do AFM, com base no regime de forças de interação (potencial de Lennard-Jones). Fonte: próprio autor.	28
Figura 13: Curva de Força Característica de AFM. Curva de força em função da distância sonda-amostra. Fonte: próprio autor. Fonte: próprio autor.	29
Figura 14: Gota de Interação do MEV. Efeitos produzidos pela interação do feixe de elétrons com uma amostra. Fonte: adaptada da referência [85].	31
Figura 15: Penetrador de Diamante MV. Representação da geometria do indentador utilizado para a realização do ensaio de microdureza Vickers e a forma de impressão feita no material. Fonte: próprio autor.	33
Figura 16: Difratoograma das Amostras FPLA/FPLAG. Difratoograma das amostras de FPLA e FPLAG antes da imersão em SBF, e logo após o final do experimento. Nota-se alterações no difratograma de ambas as amostras após a imersão em SBF, que pode ser associado ao crescimento de HA na superfície das amostras.	34
Figura 17: Espectro Raman. Espectro Raman das amostras de FPLA (linha cinza) e FPLAG (linha vermelha) caracterizadas após a impressão 3D. É possível observar todos os modos vibracionais característico do polímero na amostra PLA, porém, nota-se que após a funcionalização com o grafeno, os modos vibracionais característicos do polímero são suprimidos.	36
Figura 18: Mapas Topográficos de AFM e Rugosidade Média. Mapas bidimensionais e tridimensionais das amostras de FPLA (A e B) e FPLAG (C e D). Podemos observar uma	

diminuição da profundidade relativas aos picos e vales da amostra de FPLAG, característica que reflete em um menor valor de rugosidade para a amostra. Os mapas correspondem a varreduras de $5\mu m \times 5\mu m$	38
Figura 19: Mapas de Adesão das Amostras PLA/PLAG Obtidos por AFM. Em (A), podemos observar o mapa representativo de adesão da amostra FPLA, e em (B) da amostra FPLAG. O gráfico comparativo dos valores de adesão das amostras (C), mostra uma diferença significativa entres os dois grupos de amostras. Os mapas correspondem a varreduras de $5\mu m \times 5\mu m$	39
Figura 20: Dados de KPFM. As figuras (A) e (B) apresentam, respectivamente, a função trabalho das amostras FPLA e FPLAG obtidas a partir da técnica de KPFM. Em ambas as figuras observa-se a curva em vermelho, que corresponde ao pico de ajuste (distribuição normal), e a contagem (linha preta) que refere-se ao número de regiões varridas em cada amostra.	41
Figura 21: Superfície das Amostras Impressas de FPLA/FPLAG Antes do Polimento. Imagens de microscópio ótico da superfície das amostras PLAG (A) e PLA (B), antes do procedimento de polimento com lixas de carbetto de silício.	45
Figura 22: Variação do pH da Solução de SBF. Gráfico comparativo dos valores de pH medidos durante os 28 dias de imersão em SBF para ambas as amostras.	45
Figura 23: Imagens de Microscopia Ópticas da Superfície das Amostras FPLA/FPLAG. Superfície das amostras de FPLA (A) e FPLAG (C) após o polimento com lixas de carbetto de silício. As imagens (B) e (D), mostram, respectivamente, a superfície das amostras de FPLA e FPLAG após o período de imersão em SBF.	47
Figura 24: Crescimento Celular Sobre a Superfície das Amostras FPLA/FPLAG. Comparativo das amostras de PLA (A) e PLAG (B) após o ensaio de cultura de células controle. Escala: $100\mu m$	48
Figura 25: Teste de Viabilidade Celular das Amostras FPLA e FPLAG. A partir dos ensaios de viabilidade celular, observa-se que as células da linhagem tumoral (ACP-03) apresentam uma maior afinidade com a superfície da amostra FPLA. Em contrapartida, observa-se o inverso para a amostra FPLAG. Uma vez que as cargas desempenham papel fundamental na interação entre as células e a superfície do material, esse comportamento pode ser atribuído à inversão de cargas no material devido a inserção do grafeno em sua estrutura.	49
Figura 26: Fotomicrografia, Mapas Composicionais e Espectros EDS das amostras FPLA/FPLAG. Imagens de MEV da superfície das amostras FPLA e FPLAG antes da imersão em SBF, e seus respectivos mapas composicionais, além dos espectros EDS.	51

Figura 27: Dados de MEV/EDS amostra FPLA após SBF. Fotomicrografia e mapas composicionais da amostra FPLA após a imersão em SBF. Verifica-se a presença de partículas esféricas na superfície da amostra, além de Cálcio e Fósforo na composição, indicando a formação de HA.....	52
Figura 28: Dados de MEV/EDS amostra FPLAG após SBF. Fotomicrografia e mapas composicionais da amostra FPLAG após a imersão em SBF. Semelhante ao observado anteriormente para a amostra PLA pura, constata-se a presença de partículas esféricas na superfície da amostra, além de Cálcio e Fósforo na composição, indicando a formação de HA. Para o espectro EDS, verifica-se o aumento da intensidade do pico associado ao elemento carbono, que pode ser associado ao grafeno presente na estrutura do material.	53
Figura 29: Microdureza Vickers das Amostras FPLA/FPLAG. Gráfico comparativo dos ensaios de Microdureza Vickers das amostras FPLA puro, e FPLAG. Observa-se um aumento na dureza da amostra PLAG, o que pode ser atribuído à presença do grafeno na forma de nanopartículas.....	55
Figura 30: Difratograma do Grafeno. Comparativo dos difratogramas das amostras de grafeno sintetizados a partir do método de esfoliação eletroquímica utilizando diferentes precursores, e variações no procedimento de limpeza do material.....	56
Figura 31: Espectro Raman do Grafeno. Espectro Raman para a amostra de Grafeno obtido por meio da metodologia de síntese desenvolvida. Este resultado corresponde a síntese no qual foi utilizado como ânodo (da célula eletrolítica) o grafite de lápis 2B.....	59
Figura 32: Amostras de Resina PLA. Amostras impressas de resina PLA pura (RPLA) e funcionalizadas com 0,1 wt.%, 0,2 wt%, e 0,3 wt.% de grafeno (RPLAG).....	61
Figura 33: Difratograma da Resina PLA. Difratograma das amostras de resina PLA pura, e funcionalizada com diferentes concentrações de grafeno.	62
Figura 34: Espectro Raman Resina PLA e PLAG. Espectro Raman das amostras de RPLA e RPLAG caracterizadas após a impressão 3D. Observa-se que ambas as amostras apresentam os mesmos modos vibracionais, diferindo apenas na intensidade de alguns picos. A amostra RPLA + G (0,3%) apresenta ainda três modos vibracionais que não são observados para as outras amostras, que podem ser relacionados a adição do grafeno à estrutura polimérica.	63
Figura 35: Fotomicrografias das amostras de Resina PLA Pura e Funcionalizada com Grafeno. Fotomicrografia das superfícies das amostras de resina PLA pura (A), com 0,1 wt. % (B), 0,2 wt% e 0,3 wt% de grafeno.	64
Figura 36: Dados de MEV/EDS da Amostra RPLA. Em (A), observa-se a fotomicrografia da superfície da amostra, bem como os respectivos pontos no qual foram realizadas as medidas de	

EDS. Em seguida, são apresentados os respectivos mapas composicionais dos elementos presentes na amostra (B, C, D e F). Ao lado, são mostrados os espectros EDS do material (F, G e H).65

Figura 37: Dados de MEV/EDS da Amostra RPLAG 0.1. Em (A), observa-se a fotomicrografia da superfície da amostra, bem como os respectivos pontos no qual foram realizadas as medidas de EDS. Em seguida, são apresentados os respectivos mapas composicionais dos elementos presentes na amostra (B, C, D e F, que correspondem, respectivamente ao C, Al, Ca e N). Ao lado, são mostrados os espectros EDS do material (F, G e H).66

Figura 38: Dados de MEV/EDS da Amostra RPLA. Em (A), observa-se a fotomicrografia da superfície da amostra, bem como os respectivos pontos no qual foram realizadas as medidas de EDS. Em seguida, são apresentados os respectivos mapas composicionais dos elementos presentes na amostra (B, C, D e F, que correspondem, respectivamente ao C, Al, Ca e N). Ao lado, são mostrados os espectros EDS do material (F, G e H).66

Figura 39: Dados de MEV/EDS da Amostra RPLA. Em (A), observa-se a fotomicrografia da superfície da amostra, bem como os respectivos pontos no qual foram realizadas as medidas de EDS. Em seguida, são apresentados os respectivos mapas composicionais dos elementos presentes na amostra (B, C, D e F, que correspondem, respectivamente ao C, Al, Ca e N). Ao lado, são mostrados os espectros EDS do material (F, G e H).67

Figura 40: Mapas de 100 μm^2 e Informações Topográficas das Amostras de Resina PLA pura e Funcionalizada com Diferentes Concentrações de Grafeno. As figuras (A) e (C) apresentam, respectivamente, o mapa de altura e a seção transversal (linha pontilhada azul) para a amostra RPLA. Em seguida, as figuras (B) e (D) apresentam as mesmas informações para a amostra RPLAG 0,1%, (E) e (G) para a amostra RPLAG 0,2%, e (F) e (H) para a amostra RPLAG 0,3%.69

Figura 41: Mapas de 5 $\times$ 5 μm^2 e Informações Topográficas das Amostras de Resina PLA pura e Funcionalizada com Diferentes Concentrações de Grafeno. As figuras (A) e (B) apresentam, respectivamente, mapas 2D e 3D da superfície da amostra RPLA. (C) e (D) da superfície da amostra RPLAG 0,1%, (E) e (F) da amostra RPLAG 0,2%, e (G) e (H) da amostra RPLAG 0,3%.70

Figura 42: Microdureza Vickers da Resina PLA e PLAG. Gráfico comparativo da microdureza das amostras de resina PLA pura, e com diferentes concentrações de grafeno. Os valores médios de MV das amostras RPLA, RPLAG 0,1, RPLAG 0,2 e RPLAG 0,3 são,

respectivamente, 3,46 ($\pm 1,30$ HV), 8,51 ($\pm 0,19$ HV), 2,20 ($\pm 0,39$ HV) e 9,01 ($\pm 0,66$ HV).

..... 71

Figura 43: Variação do pH da solução de SBF para as amostras RPLA e RPLAG. Durante o período de imersão das amostras em SBF, percebe-se uma diminuição nos valores de pH da solução, indicando que ocorreram trocas iônicas. 73

Figura 44: Difratoograma das Amostras RPLA e RPLAG após imersão em SBF. Observa-se que após o período de imersão em SBF, o caráter amorfo de ambas as amostras não sofreu alteração. 74

Figura 45: Viabilidade Celular das Amostras R-PLA e R-PLAG. Gráficos comparativos da viabilidade de células de melanoma (linhagem MV3) em diferentes superfícies. Observa-se uma relação inversamente proporcional entre a viabilidade celular, e o aumento da concentração de grafeno. 75

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Parâmetros básicos para impressão dos corpos de prova	17
Tabela 2: Reagentes utilizados para preparação do SBF, bem como as respectivas ordens de adição.....	19
Tabela 3: Assinaturas vibracionais dos grupos funcionais da amostra de PLA puro, e as bandas características do grafeno observadas na amostra PLAG.....	36
Tabela 4: Parâmetros das amostras de PLA e PLAG antes da imersão em SBF.	44
Tabela 5: Peso das Amostras FPLA e FPLAG antes e após a imersão em SBF.	46
Tabela 7: Modos vibracionais característicos observados para as amostras de resina PLA pura e resina PLA com grafeno.	63

LISTA DE ABREVIATURAS

PLA	Ácido Polilático
FPLA	Amostra de Filamento de PLA Puro
FPLAG	Amostra de Filamento de PLA Funcionalizado com grafeno
RPLA	Resina à base de PLA
RPLAG	Resina à base de PLA, funcionalizada com grafeno
MA	Manufatura Aditiva
FDM	<i>Fused Deposition Modeling</i>
SLA	<i>Stereolithography Apparatus</i>
SBF	<i>Simulated Body Fluid</i>
HA	Hidroxiapatita
DRX	Difração de raios X
ER	Espectroscopia Raman
AFM	<i>Atomic Force Microscopy</i>
MEV	Microscopia eletrônica de varredura
EDS	Espectroscopia de raios X por dispersão em energia
MV	Microdureza <i>Vickers</i>

Sumário

.....	1
1. Introdução.....	1
2. Revisão Bibliográfica.....	4
2.1. Polímeros.....	4
2.1.1. Biopolímeros.....	6
2.2. Manufatura Aditiva	7
2.2.1. Impressoras 3D de Filamento (FDM).....	7
2.2.2. Impressoras 3D de Resina.....	9
2.3. Grafeno.....	11
2.3.1. Síntese do Grafeno	12
2.3.2. Polímeros Otimizados com Grafeno	13
3. Materiais e Métodos	16
3.1. Amostras Impressas em Filamentos (FDM).....	16
3.1.1. Impressão dos Corpos de Prova.....	16
3.1.2. Preparação das Amostras para Realização dos Ensaios <i>In-vitro</i>	18
3.1.3. Ensaios <i>In-vitro</i>	19
3.1.3.1. Ensaio em Fluido Corporal Simulado (SBF)	19
3.1.3.2. Ensaio de Cultura de Células e Viabilidade Celular	20
3.2. Amostras Impressas em Resina (SLA).....	20
3.2.1.1. Síntese do Grafeno	21
3.2.1.2. Adição de Grafeno à Resina	23
3.2.1.3. Impressão das Amostras.....	23
3.3. Técnicas de Caracterização	24
3.3.1. Difração de Raios X (DRX).....	24
3.3.2. Espectroscopia Raman (ER)	25
3.3.3. Microscopia de Força Atômica (AFM).....	27
3.3.4. Microscopia de Sonda por Força Kelvin (KPFM).....	29
3.3.5. Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)/ Espectroscopia de Energia Dispersiva (EDS)	30
3.3.6. Microdureza Vickers (MV).....	32
4. Resultados e Discussão	33
4.1. Parte 1 – Amostras Produzidas por Impressão 3D de Filamento	33
4.1.1. Difração de Raios X (DRX).....	33
4.1.2. Espectroscopia Raman (ER)	35

4.1.3.	Microscopia de Força Atômica (AFM).....	37
4.1.4.	Microscopia de Força por Sonda Kelvin (KPFM).....	40
4.1.5.	Ensaio <i>in-vitro</i>	42
4.1.5.1.	Imersão em SBF.....	42
4.1.5.2.	Cultura de Células.....	47
4.1.6.	Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) e Espectroscopia de Energia Dispersiva por Raio X (EDS)	50
4.1.7.	Microdureza Vickers (MV).....	54
4.2.	Parte 2 – Caracterizações do Grafeno	56
4.2.1.	Difração de Raios X (DRX).....	56
4.2.2.	Espectroscopia Raman (ER)	58
4.3.	Parte 3 – Amostras Produzidas por Impressão 3D Resinas (SLA)	61
4.3.1.	Difração de Raios X (DRX).....	61
4.3.2.	Espectroscopia Raman (ER)	62
4.3.3.	Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV-EDS)	64
4.3.4.	Microscopia de Força Atômica (AFM).....	67
4.3.5.	Microdureza Vickers (MV).....	70
4.3.6.	Imersão das Amostras em SBF	72
4.3.6.1.	Difração de Raio X após Imersão	73
4.3.7.	Estudo de Viabilidade Celular	74
5.	Conclusão e Perspectivas	77
	Referências	80

1. Introdução

Os constantes avanços observados nas áreas de ciências e engenharia dos materiais tendem a impactar diretamente em outras áreas do conhecimento, sobretudo, a área da medicina, visto que demanda soluções capazes de suprir demandas bastante específicas, seja por meio do desenvolvimento de materiais biocompatíveis capazes de resistir à corrosão, que possam interagir de maneira mais segura com o organismo, possibilitando sua utilização em implantes e dispositivos médicos [1], [2], ou pela criação de novos materiais para uso na engenharia de tecidos, com a finalidade de regeneração de órgãos por meio de *scaffolds*¹ [3], [4]. Desta perspectiva, o desenvolvimento da medicina moderna caminha lado a lado com os avanços alcançados nas áreas de ciência e engenharia de materiais. Neste aspecto, os biopolímeros, um tipo de material orgânico bastante versátil, tem ganhado destaque devido ao seu alto nível de biocompatibilidade e biodegradabilidade, bem como sua baixa, ou nenhuma, toxicidade [5], [6].

Os polímeros, de modo geral, são constituídos por longas cadeias de moléculas menores, os monômeros, que interagem entre si formando fortes ligações covalentes, garantindo um material com elevada estabilidade e características, como ponto de fusão, cadeias moleculares e temperatura de transição vítrea, bem definidas [6]. Os biopolímeros (também chamados de polímeros biodegradáveis), são uma classe de materiais poliméricos que apresentam características e propriedades mecânicas, químicas e biológicas que se encaixam em requisitos importantes que viabilizam o seu uso para aplicações médicas. Podemos destacar algumas características básicas para implementação destes materiais em sistemas biológicos como: possuir um alto grau de biocompatibilidade, ser processável, apresentar elevada estabilidade física e química, além de possibilitar adesão e interação celular e tecidual [7].

O desenvolvimento de novos biopolímeros, bem como compósitos de base polimérica para aplicações médicas utilizando como ferramenta de processamento as técnicas de impressão 3D é um campo de pesquisa que cresce a passos largos [3], [8], porém, ao mesmo tempo que se criam novos materiais, é importante visualizar aqueles já existentes por diferentes perspectivas,

¹ O termo “*scaffold*” refere-se a estruturas tridimensionais usadas em engenharia de tecidos para fornecer suporte e ambiente adequados para a regeneração celular e formação de novos tecidos.

podendo assim propor um redirecionamento para novas aplicações destes materiais já comercializados.

A utilização de compósitos de matriz polimérica tem sido fundamental para o progresso na área de ciência dos materiais, principalmente devido a maior facilidade de processamento dos polímeros, além do conjunto de propriedades mecânicas, físico-químicas e biológicas, que viabilizam a utilização deste material em uma vasta gama de aplicações [9]. A partir desta perspectiva, um dos materiais que vem se mostrando como um ótimo candidato para otimizar algumas propriedades dos polímeros é o grafeno, um dos alótropos não naturais do carbono. O grafeno é um material bidimensional que apresenta alta condutividade elétrica e térmica, elevada resistência mecânica, além de possuir comportamento bioativo [10], [11], o que favorece seu uso em conjunto com os biopolímeros.

Podendo ser obtido a partir de processos de quebra de ligações interplanares do grafite [12], o grafeno é um material composto por uma única camada de átomos de carbono organizados em uma estrutura hexagonal, formando uma folha bidimensional [13]. As excelentes propriedades apresentadas pelo grafeno estão diretamente associadas a capacidade do átomo de carbono em formar diferentes tipos de ligação de valência devido a sua “configuração eletrônica especial”, o que reflete diretamente na capacidade deste material em formar interfaces de interação de forma mais eficaz [14].

Além disso, o grafeno tem despertado grande interesse no âmbito das aplicações biológicas devido à sua biocompatibilidade, que o torna adequado para uso em biossensores [15], terapias de liberação controlada de medicamentos [16], e até na regeneração de tecidos [17]. Sua versatilidade e potencial inovador fazem do grafeno um material com um futuro promissor em diversas áreas da ciência e da tecnologia.

Por conta de sua alta biocompatibilidade, os biopolímeros tem sido explorado para aplicações tópicas de crescimento celular devido à sua capacidade de fornecer um ambiente favorável para a adesão, proliferação e diferenciação celular [18], [19]. As células geralmente apresentam cargas elétricas em suas superfícies devido à presença de grupos funcionais, como os grupos fosfato em fosfolipídios das membranas celulares [20]. Isso leva ao surgimento de um fator importante que pode influenciar no grau de adesão entre as células e a superfície polimérica: as suas respectivas cargas líquidas superficiais. Quando as cargas de superfície das células e dos polímeros são opostas, ocorre uma atração eletrostática que pode favorecer a

adesão entre eles [21], [22]. Por outro lado, se as cargas são iguais, a adesão entre a célula e o polímero pode ser reduzida.

Portanto, tendo em vista os diversos desafios associados a criação de novos biopolímeros, bem como o aperfeiçoamento daqueles já existentes e a possibilidade de contribuir para o avanço deste campo de pesquisa, este trabalho tem por objetivo planejar e desenvolver uma nova rota verde de síntese para grafeno, no qual seja possível utilizá-lo em conjunto com qualquer biopolímero. Além disso, propor novas aplicações biológicas para os biopolímeros comerciais. Para tal finalidade, foram realizadas uma série de caracterizações e ensaios *in vitro* a fim de averiguar as propriedades ultraestruturais, nanomecânicas e de biocompatibilidade destes materiais.

No decorrer do trabalho, serão abordados todos os aspectos associados à produção das amostras por meio da impressão 3D de Filamento (FDM) e de resina (SLS), bem como a síntese do grafeno pelo método de esfoliação eletroquímica, além da caracterização estrutural, por meio da técnica de Difração de Raios-X, vibracional, através da Espectroscopia Raman, topográfico e informações sobre as propriedades nanomecânicas por meio da Microscopia de Força Atômica das amostras produzidas e sintetizadas. Ainda neste sentido, serão apresentados os resultados dos ensaios *in-vitro* realizados para as amostras produzidas. Será apresentada, também, uma revisão dos trabalhos encontrados na literatura, que estão correlacionados aos principais tópicos desta pesquisa. Finalmente, os resultados obtidos no decorrer do trabalho serão apresentados e discutidos com base na literatura.

2. Revisão Bibliográfica

No presente capítulo, serão abordados os principais conceitos fundamentais para a completa compreensão dos resultados que serão apresentados e discutidos posteriormente neste trabalho.

2.1. Polímeros

O conceito de polímeros é considerado como uma das grandes ideias do século XX, e teve o seu surgimento na década de 1920 [23]. Os cientistas da área de ciência dos materiais chegaram a seguinte definição para este tipo de material: “um polímero, é uma grande molécula construída a partir de muitas unidades estruturais menores chamadas monômeras, que são ligadas covalentemente” [6]. Essa definição é ampla, sendo válida para todos os tipos de polímeros, independentemente de sua origem ou de sua classificação.

Os polímeros podem ser classificados de maneiras diferentes, sempre tomando como referência alguma das características do material, como a sua origem (sintético ou natural), estrutura molecular (linear ou ramificado), grau de cristalinidade (amorfo ou semicristalino), propriedades térmicas (termofixo ou termoplástico) e aplicações (de uso geral, de engenharia, ou específicas) [24]. Cada classificação oferece uma visão diferente sobre as propriedades e os usos dos polímeros, permitindo uma melhor compreensão de suas características e aplicações potenciais. Do ponto de vista do processamento destes materiais, a classificação mais relevante é aquela com base em suas propriedades térmicas.

Como referido anteriormente, os polímeros remetem a materiais constituídos por grandes cadeias formadas a partir da união de estruturas moleculares. A maneira como estas cadeias poliméricas estão ligadas entre si irá determinar o comportamento do material quando submetido a um gradiente positivo de temperatura. Quando as longas cadeias poliméricas estão interligadas por meio de ligações fortes (ligações primárias), não haverá deslizamento relativo entre estas cadeias devido ao aquecimento do material. Essa característica origina um material com resistência a temperatura, sendo capaz de manter sua integridade estrutural sem fundir, e por esse motivo, os polímeros que se encaixam nestas características são chamados de termofixos [24]. Por outro lado, os polímeros no qual as cadeias estão interligadas por meio de ligações fracas (ligações secundárias), apresentam uma menor resistência a temperaturas

relativamente elevadas, podendo sofrer mudança de fase (são passíveis de sofrerem fusão), e então, devido a esta característica, estes polímeros são classificados como termoplásticos [24].

Desde do início da produção em larga escala, o uso dos polímeros foi difundido em praticamente todas as áreas, sendo amplamente empregado nas indústrias de bens de consumo, e tornou-se um tipo de material indispensável para muitas aplicações em várias áreas, tais como nas indústrias automobilística [25], aeroespacial [26], de cosméticos [27], e para produção de utensílios em geral [28]. A implementação destes materiais na área biomédica teve início praticamente em conjunto com o surgimento e a produção em larga escala dos primeiros polímeros sintéticos [29]. A utilização de polímeros em materiais de implante, dispositivos de diagnóstico, embalagens de medicamentos e outros produtos médicos, se mostrou como um agente transformador para a prática médica, trazendo consigo a possibilidade de desenvolvimento de novas soluções para desafios complexos enfrentados por esta área. A Figura 1 ilustra algumas das principais aplicações dos polímeros na área da biomedicina.

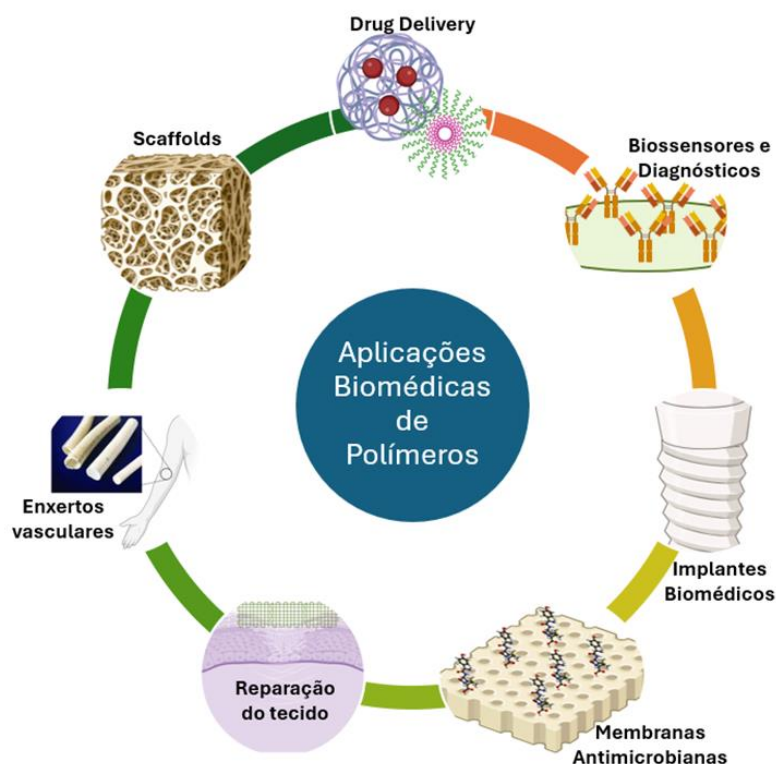


Figura 1: Utilização de Biopolímeros na Área Biomédica. Esquema ilustrando as aplicações de biomateriais poliméricos em diferentes áreas biomédicas. Fonte: Próprio autor.

2.1.1. Biopolímeros

Os biopolímeros (também chamados de polímeros biodegradáveis), são uma classe de materiais que apresentam características e propriedades — mecânicas, químicas e biológicas — que se encaixam perfeitamente nos requisitos básicos para aplicações médicas, principalmente devido às suas propriedades de biocompatibilidade e biodegradabilidade, e a maior facilidade de processamento em comparação com outros materiais, como metais ou cerâmicas [3]. Estes materiais são constituídos por longas cadeias de moléculas menores, os monômeros, que interagem entre si formando fortes ligações covalentes, garantindo um material com elevada estabilidade e propriedades bem definidas.

Entre os biopolímeros mais estudados atualmente está o Ácido Polilático (ou simplesmente PLA), um poliéster termoplástico alifático linear de fórmula química $(C_3H_4O_2)_n$ (Figura 1) [30]. O PLA, ao se degradar no organismo humano forma o ácido láctico, que é produzido naturalmente pelo organismo humano a partir da ação de fermentação de microrganismos [4]. Esta característica corrobora para potencializar a utilização deste material na área biomédica, sendo amplamente explorado devido sua grande versatilidade de aplicações, mostrando-se como um dos biopolímeros mais promissores [31].

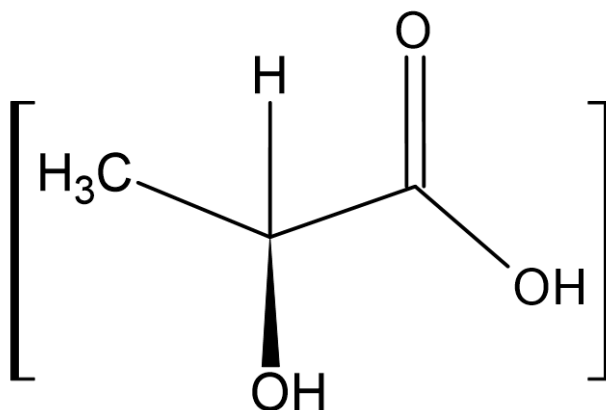


Figura 2: Estrutura Química do PLA semicristalino (PLLA). Representação da estrutura química do ácido láctico (monômero), precursor do ácido poli(L-lático) (polímero). Fonte: próprio autor.

Por conta de apresentar uma elevada maleabilidade quando aquecido, além de um conjunto de propriedades, como rigidez e resistência significativa, que favorecem o seu uso em condições diversas, o PLA é amplamente explorado como matéria-prima para produção de filamentos e resinas que são utilizados na área de impressão 3D. Por conta de sua elevada

versatilidade de aplicações, do grande número de polímeros passíveis de serem processados, e devido a sua capacidade de imprimir estruturas com elevado grau de complexidade, as técnicas de impressão 3D vem ganhando bastante relevância no cenário acadêmico e industrial [32], além de, também, está sendo amplamente explorada em diferentes campos da medicina moderna [33], [34], como por exemplo para a produção de *scaffolds* e parafusos ortopédicos [3].

2.2. Manufatura Aditiva

Os processos de manufatura aditiva (MA), também conhecidos como fabricação aditiva ou impressão 3D, introduzido na década de 1980 [35], e referem-se a um conjunto de técnicas de fabricação nas quais objetos tridimensionais são construídos camada por camada a partir de dados digitais, como modelos CAD (*Computer-Aided Design*), usando materiais como polímeros, metais, cerâmicas ou compósitos [36], [37]. Esses processos têm aplicações em uma grande variedade de indústrias, incluindo manufatura, medicina, automotiva, aeroespacial, dentre outras [37], [38], [39].

Na área médica, a impressão 3D tem se mostrado como uma ferramenta poderosa, uma vez que proporciona a produção rápida e controlada de estruturas complexas, que, por outros métodos de fabricação, seriam mais caras e difíceis de obter, tornando o processo de aquisição de materiais para uso médico mais prático e ágil [3]. As técnicas de MA demonstram ser altamente versáteis, tornando viável a obtenção de objetos que necessitam de um elevado grau de precisão e destreza da técnica. Tal capacidade pode ser observada, por exemplo, por meio dos estudos promissores acerca da viabilidade do uso de impressão 3D para a obtenção de órgãos e tecidos artificiais [40], [41].

2.2.1. Impressoras 3D de Filamento (FDM)

Entre as técnicas de MA, está uma comumente conhecida como Modelagem por Fusão e Deposição (*Fused Deposition Modeling*, ou FDM). A impressora 3D de filamento funciona através do processo de fusão e deposição de material polimérico termoplástico em camadas ordenadas e sucessivas, para criar objetos tridimensionais. Uma extrusora aquecida, com

diâmetro que pode variar entre 1 à 0,2 mm, é alimentada pelo filamento (com diâmetro de 1,75mm), sendo responsável por derreter-lo para possibilitar a deposição na mesa de impressão, movendo-se em coordenadas precisas controladas por meio do *software* da impressora. A plataforma de construção (superfície onde o objeto é formado) e a extrusora responsável por promover a deposição do material, podem se mover nos eixos x, y e z para permitir a adição de novas camadas. Cada camada é depositada sobre a anterior, solidificando-se rapidamente e permitindo a construção gradual do objeto conforme o design digital predefinido no software de fatiamento. A Figura 3 ilustra o mecanismo da impressão por filamento, destacando as propriedades requeridas dos polímeros que são utilizados por esse método de manufatura aditiva.

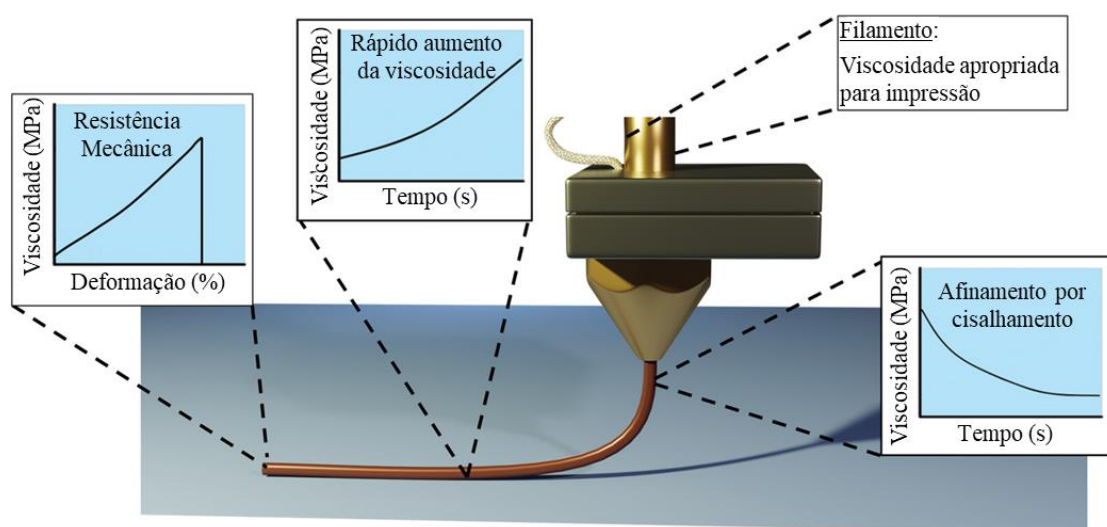


Figura 3: Requisitos essenciais para a impressão 3D por extrusão de polímeros. Para que os polímeros sejam adequados para impressão FDM, é crucial que possuam uma viscosidade adequada, permitindo a extrusão e a formação de filamentos contínuos. Após a extrusão, o polímero deve adquirir uma consistência mais firme para garantir resistência mecânica suficiente, sustentando as estruturas impressas e prevenindo a delaminação. Figura adaptada da referência [42].

De um ponto de vista geral, esta técnica se destaca em comparação as demais devido a uma série de fatores, como: o baixo custo associado a sua operação, a ampla gama de materiais passíveis de serem processados [43], a dispensabilidade de pós-processamento químico, além da sua capacidade de produzir objetos com geometrias complexas [36], [37].

A grande versatilidade desta técnica é um ponto que merece destaque, sendo utilizada para produzir objetos para aplicações em diversas áreas, partindo desde a indústria aeroespacial [44], e chegando até a indústria farmacêutica [45]. Essa ampla capacidade de aplicações se deve

ao rápido progresso envolvendo a produção em escala de filamentos compósitos [46]. A partir deste ponto, um novo mundo de possibilidades surge, visto que, o fácil processamento dos polímeros termoplásticos, bem como a fácil obtenção de compósitos à base destes polímeros, possibilita obter materiais para as mais diferentes finalidades.

Como mostrado por Kirillova, Alina e colaboradores [3], a impressão 3D por filamento tem sido amplamente explorada para a produção de peças, como parafusos e pinos, que são direcionados para o uso em implantes ortopédicos [47], e *scaffolds*, que são direcionados a aplicações na área de engenharia de tecidos [48], [49]. A capacidade da técnica de produzir peças complexas e customizadas a baixo custo e com rapidez, tem revolucionado a forma como problemas técnicos observados na área médica tem sido enfrentado, permitindo soluções mais adaptadas às necessidades específicas observadas nesse campo.

2.2.2. Impressoras 3D de Resina

A impressora 3D de resina, também conhecida pela sigla SLA (do inglês *Stereolithography Apparatus*) ou DLP (*Digital Light Processing*), utiliza resinas líquidas fotopolimerizáveis que são solidificadas camada por camada através da exposição à luz UV. O mecanismo de impressão dos objetos tridimensionais é bastante diferente comparando com a impressora de filamento. Como é possível observar a partir da Figura 4, a impressora possui um tanque, no qual é depositada a resina, onde uma plataforma submerge parcialmente. Um feixe de luz UV é então projetado por uma tela digital, desenhando a primeira camada do objeto na superfície da resina, e em seguida, solidificando-a. A plataforma então se move ligeiramente para cima, permitindo que uma nova camada de resina líquida cubra a área solidificada. Esse processo se repete camada por camada, solidificando a resina e formando o objeto tridimensional com alta precisão e detalhes finos.

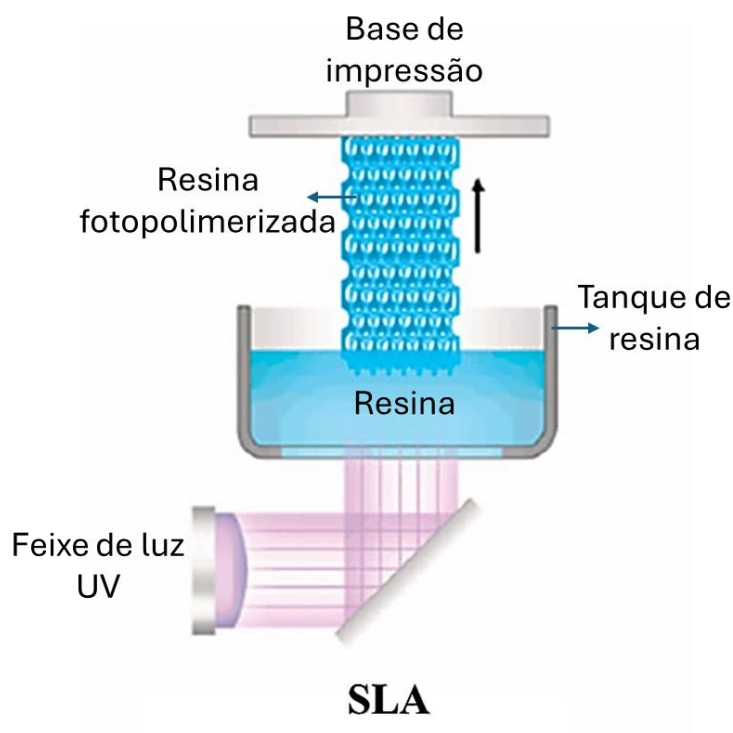


Figura 4: Representação do Funcionamento de uma Impressora SLA. Entre as principais vantagens da impressora de resina, destaca-se a sua capacidade de imprimir objetos com arquitetura bastante complexas, e com altíssima resolução. Figura adaptada da referência [50].

As impressoras 3D de resina oferecem algumas vantagens quando comparadas com as baseadas em fusão e deposição de filamento. Uma das principais vantagens é a capacidade de produzir objetos com detalhes extremamente finos e superfícies lisas, por conta da alta resolução e precisão do processo de fotopolimerização [51]. Além disso, a resina permite a criação de estruturas complexas e intrincadas que seriam difíceis ou impossíveis de obter com filamento.

Desde o início da utilização das impressoras de resina como ferramenta de processamento para a obtenção de estruturas biodegradáveis, avanços significativos foram observados no desenvolvimento de novas resinas biodegradáveis direcionadas a área biológica. Grande parte dos polímeros utilizados na impressão SLA ou DLP utilizados para produção de resinas fotopolimerizáveis são funcionalizados com grupos éster ou carbonatos, permitindo a degradação destas resinas pelo processo de hidrólise [51], [52]. Atualmente, é possível encontrar uma variedade de resinas biocompatíveis direcionadas a aplicações diversas, com grande parte sendo direcionada especificamente para aplicações odontológicas [53].

2.3. Grafeno

No contexto de produção de materiais compósitos de matriz polimérica, um material ganha grande destaque devido às suas propriedades relevantes: o grafeno. Este é um material cristalino bidimensional composto por átomos de carbono que estão dispostos em uma estrutura hexagonal, como está ilustrado na Figura 5 [14]. O grafeno é um dos alótropos não-naturais do carbono, sendo derivado direto do grafite, que é um material formado a partir da hibridização sp^2 do átomo de carbono. O grafite é a superposição de várias camadas de grafeno que estão ligadas por meio de ligações interplanares [14].

Cada átomo de carbono do plano basal do grafeno está ligado aos átomos vizinhos por meio de fortes ligações covalentes (ligações σ), o que garante uma alta estabilidade e resistência mecânica ao material [13]. As diferentes camadas de grafeno, que quando sobrepostas dão origem ao grafite, estão ligadas por meio de ligações mais fracas (ligações do tipo π), o que promove uma baixa resistência a tensões de cisalhamento, gerando, consequentemente, uma baixa resistência a separação das camadas.

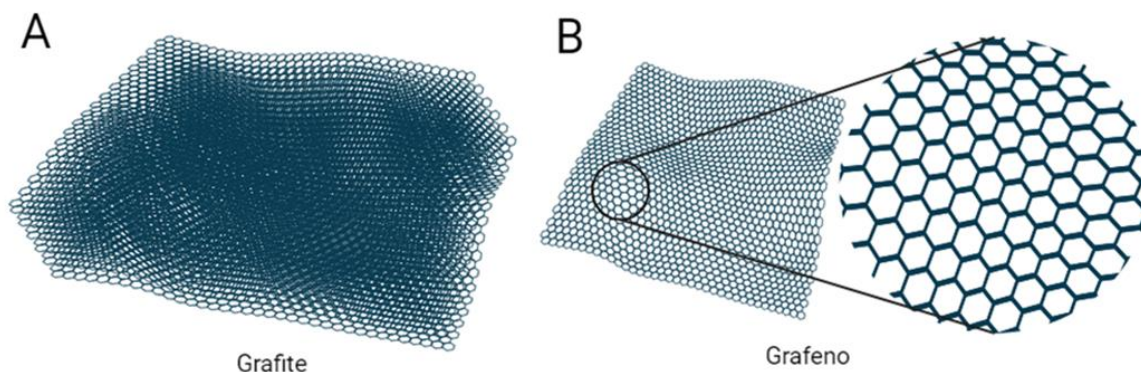


Figura 5: Representação esquemática do grafeno. A figura mostra uma representação comparativa entre o grafite (A), constituído a partir da sobreposição camadas de grafeno, e em (B) uma monocamada de grafeno isolada. Fonte: Próprio autor.

O alto grau de condutibilidade elétrica e térmica do grafeno é uma característica que se deve em grande parte aos elétrons do orbital molecular do tipo π — formados pelos átomos não-hibridizados — que é perpendicular ao plano basal. Como referido anteriormente, os orbitais π possuem uma energia de ligação significativamente menor, o que facilita a remoção dos elétrons destes orbitais, favorecendo os processos de condução [13].

A maior facilidade de remoção dos elétrons dos orbitais moleculares pode ser atribuído ao confinamento em duas dimensões [54], resultando em um comportamento eletrônico favorável para o surgimento de ótimas propriedades elétricas, térmicas e óticas, que dão ao grafeno o status de “material do futuro”. Devido ao fenômeno de confinamento 2D, e a estrutura cristalina hexagonal do grafeno, os elétrons do material passam a se comportar como se tivessem uma massa efetiva muito baixa, assemelhando-se aos férmions de Dirac, o que lhes confere uma alta mobilidade eletrônica devido à baixa interação com as cargas positivas dos átomos que constituem a estrutura do material [55].

2.3.1. Síntese do Grafeno

K. S. Novoselov e colaboradores [56] foram os primeiros capazes de isolar uma única camada de grafeno — a partir do grafite — por meio do processo de exfoliação micromecânica, utilizando para tal feito, uma simples fita adesiva. A partir disso, foi possível estudar e validar experimentalmente as propriedades intrínsecas do grafeno, entretanto, de um ponto de vista prático, era necessário desenvolver técnicas que possibilitassem a obtenção de um material estável e controlado para aplicações em larga escala, e com um custo acessível.

Desde a primeira vez que o grafeno foi isolado por meio da esfoliação mecânica, diversas metodologias para a obtenção deste material foram desenvolvidas, e podem ser divididas em duas classes: “*bottom-up*” e “*top-down*” [12]. A Figura 6 apresenta uma ilustração sobre estas duas formas de obtenção do grafeno. As metodologias “*bottom-up*” para a obtenção de grafeno, envolvem a construção do material a partir de estruturas atômicas menores, como átomos de carbono individuais ou pequenas moléculas de carbono [57], [58]. Já nas metodologias “*top-down*” envolvem a produção do material a partir de estruturas maiores, como o grafite, e subsequentemente reduzindo-as para formar camadas de grafeno [59]. As abordagens “*top-down*” são frequentemente utilizadas devido à sua relativa facilidade de implementação em escala industrial.

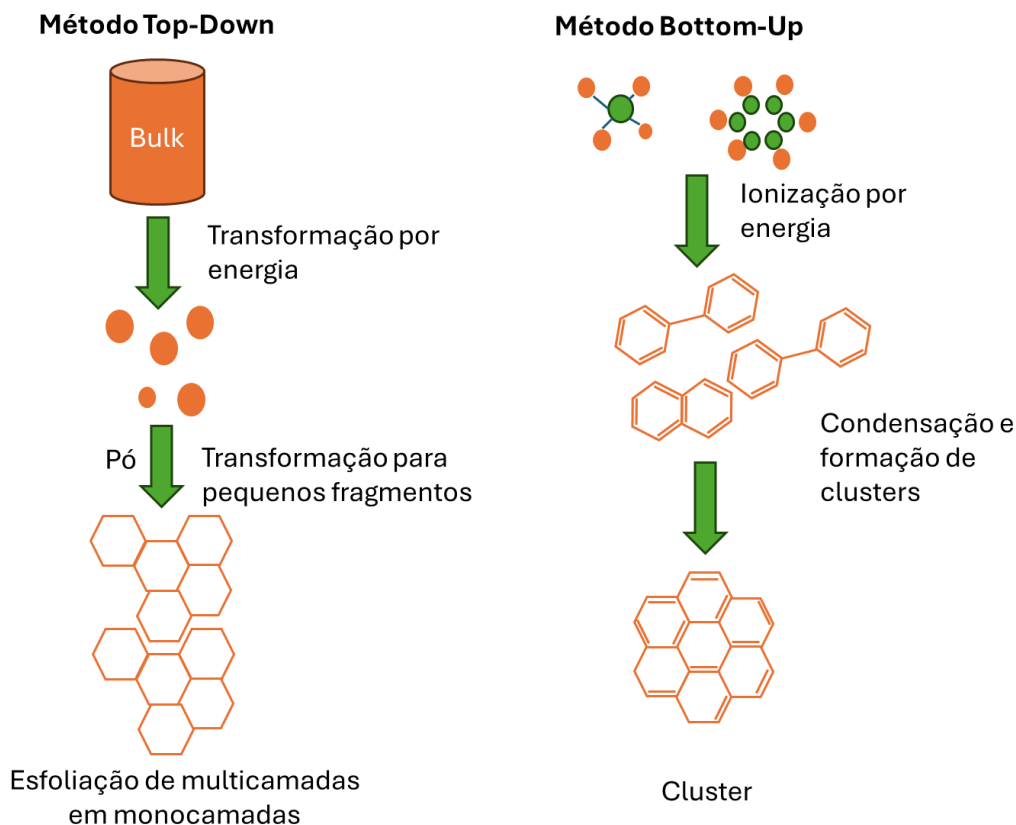


Figura 6: **Métodos de Síntese do Grafeno.** Esquema ilustrativo das abordagens utilizadas para obtenção do grafeno. Figura adaptada da referência [60].

2.3.2. Polímeros Otimizados com Grafeno

Com o desenvolvimento de técnicas que possibilitaram a síntese do grafeno e seus derivados em maior escala, logo estes materiais passaram a ser empregados em conjunto com outros materiais, no qual entre estes estão os polímeros. O grafeno mostrou-se capaz de otimizar as propriedades mecânicas, térmicas e elétricas dos polímeros [61], [62], ampliando ainda mais as possibilidades de aplicações destes materiais, incluindo aquelas direcionadas para a área biológica.

Tendo em vista que, em geral, os polímeros apresentam a característica de serem bons isolantes, a possibilidade de torná-los bons condutores por meio da inserção de grafeno em sua estrutura se mostra como uma alternativa mais sustentável e barata para aplicações como a fabricação de circuitos eletrônicos [63], por exemplo. A capacidade do grafeno em modificar as propriedades elétricas dos polímeros pode ser atribuída a facilidade com a qual esse material consegue formar interfaces de interação com outros materiais. A modulação da carga líquida

superficial de um material também é uma característica muito importante no âmbito das aplicações biológicas.

Quando falamos em utilizar materiais para aplicações médicas, estamos nos referindo direta ou indiretamente da interação destes materiais com uma estrutura biológica fundamental: às células. Esta estrutura é delimitada por uma camada conhecida como membrana plasmática, e desempenha um papel fundamental na interação das células com outros organismos e materiais, sendo essencial para vários processos biológicos importantes, como o transporte de substâncias, comunicação e adesão celular [20].

Uma característica muito importante das membranas celulares é que estas apresentam cargas de superfície, que influenciam nas interações celulares, incluindo adesão celular, interações célula-célula e interações célula-material [20]. A Figura 7 apresenta uma ilustração acerca do mecanismo responsável por promover o surgimento de cargas de membrana. As bombas de sódio-potássio ($Na^+/K^+ - ATP$) transportam ativamente íons através da membrana, mantendo concentrações diferentes de íons Na^+ e potássio K^+ dentro e fora da célula. Esse transporte ativo cria uma diferença de potencial elétrico, gerando uma polarização, e o acúmulo de cargas na membrana. Os canais iônicos por sua vez, permitem a passagem seletiva de íons, de acordo com seus gradientes eletroquímicos. A abertura e fechamento desses canais regulam o fluxo de íons, alterando a distribuição de cargas e contribuindo para a geração do potencial de membrana. Além das cargas, outros parâmetros relacionados a superfície do material, como rugosidade e dureza, influenciam no comportamento celular. A adesão celular e a adsorção de proteínas também é diretamente afetada pela hidrofobicidade/hidrofilicidade e a natureza química da superfície [64]. Um estudo desenvolvido por Arima, Yusuke e Iwata, Hiroo [65] constatou que, de modo geral, células saudáveis apresentam seu maior grau de adesão em superfícies com hidrofobicidade/hidrofilicidade moderada. Ainda neste aspecto, Feng, Jing e Zhiguang Guo [66] destacam a capacidade do grafeno de atuar como uma cobertura capaz de modular a hidrofobicidade/hidrofilicidade da superfície de materiais. Sendo assim, é notável que o grafeno apresenta uma alta capacidade de modulação das características dos polímeros, indo além das propriedades mecânicas e elétricas. Deste ponto de vista, os compósitos a base de polímeros otimizados com grafeno apresentam um grande potencial para aplicações biológicas, podem ser empregados, por exemplo, como superfícies que favorecem ou desfavorecem o crescimento e a proliferação de células.

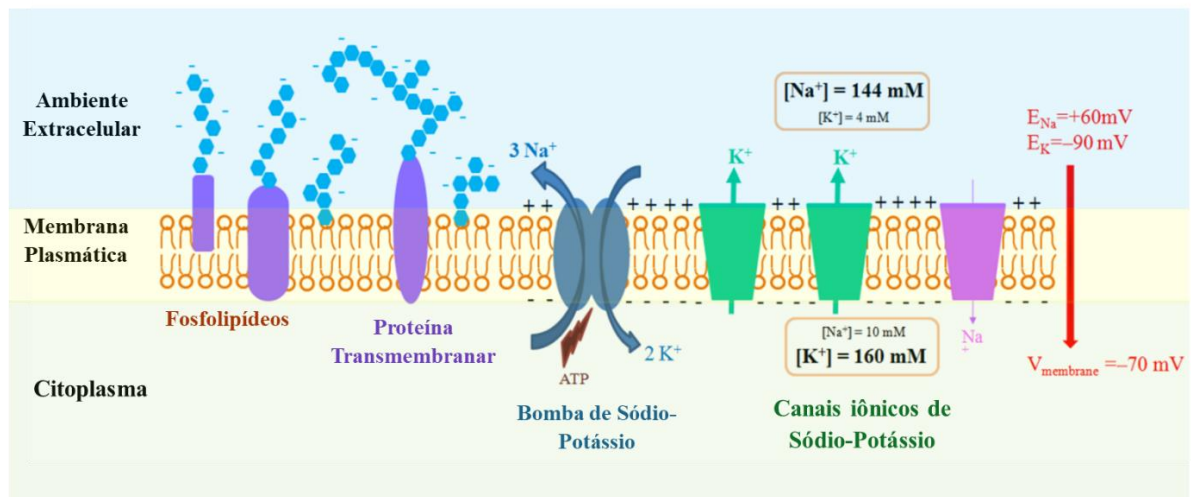


Figura 7: **Cargas de Membrana.** Representação esquemática da estrutura da membrana celular explicando a distribuição da carga explicando a distribuição da carga superficial (a esquerda) e o potencial da membrana (a direita). Adaptado de [67].

3. Materiais e Métodos

Com base nos conceitos apresentados no presente capítulo acerca da síntese do grafeno, e o processamento de materiais poliméricos por meio das técnicas de manufatura aditiva, no capítulo seguinte, serão abordados todos os procedimentos de síntese, preparação, produção e caracterização das amostras obtidas ao decorrer deste trabalho.

3.1. Amostras Impressas em Filamentos (FDM)

A primeira parte do trabalho baseou-se em produzir amostras a base de PLA e PLA funcionalizado com grafeno por meio da impressão 3D por filamento. Neste aspecto, foram utilizados filamentos comerciais de PLA puro, e um filamento especial de PLA-Grafeno. A partir da obtenção dos corpos de prova, deu-se início as caracterizações e os ensaio *in-vitro*, como será mostrado à seguir.

3.1.1. Impressão dos Corpos de Prova

Os corpos de prova foram obtidos a partir de uma impressora 3D, da marca *Creality*, modelo Ender-3 S1 de propriedade do Laboratório de Biofísica e Nanossistemas (LBN). Os moldes das amostras foram criados no software de desenvolvimento CAD *Autodesk Fusion 360*, que se encontra disponível gratuitamente para uso acadêmico. Após a criação dos corpos de prova no Fusion 360, os arquivos foram exportados no formato específico (*.STL) para que fossem fatiados, ou seja, para que os arquivos fossem convertidos para uma extensão compatível com o equipamento.

Para o fatiamento das peças foi utilizado o *software UltiMaker Cura 3D*. Nele, foram ajustados os parâmetros de impressão adequados para o material empregado (Tabela 1), como a temperatura de extrusão, temperatura da mesa e velocidade de impressão, bem como características que podem influenciar nos testes realizados, como por exemplo, a porcentagem de preenchimento da peça, que influencia diretamente na porosidade final da amostra, ou a geometria empregada nas camadas, característica que influencia na resistência mecânica. Após o ajuste destes e de outros parâmetros de impressão, os corpos de prova foram impressos utilizando-se dois tipos de filamentos: PLA transparente, e o PLA Grafeno Condutivo, ambos

da empresa *Voolt 3D*. A proporção de PLA para grafeno do filamento PLA Grafeno condutivo não é fornecida pela empresa *Voolt 3D*, porém, para o filamento condutivo à base de grafeno da empresa *Graphene 3D Lab* [68], a proporção de grafeno é de 30 – 40%. A Figura 8, ilustra os processos criação e fatiamento dos corpos de prova descritos anteriormente.

Tabela 1: Parâmetros básicos para impressão dos corpos de prova

Parâmetros de Impressão	
Temperatura de Extrusão	200°C
Temperatura da Mesa	60°C
Velocidade de Impressão	60 mm/s
Preenchimento da Peça	100%
Geometria do Preenchimento	Retangular
Número de Paredes	3

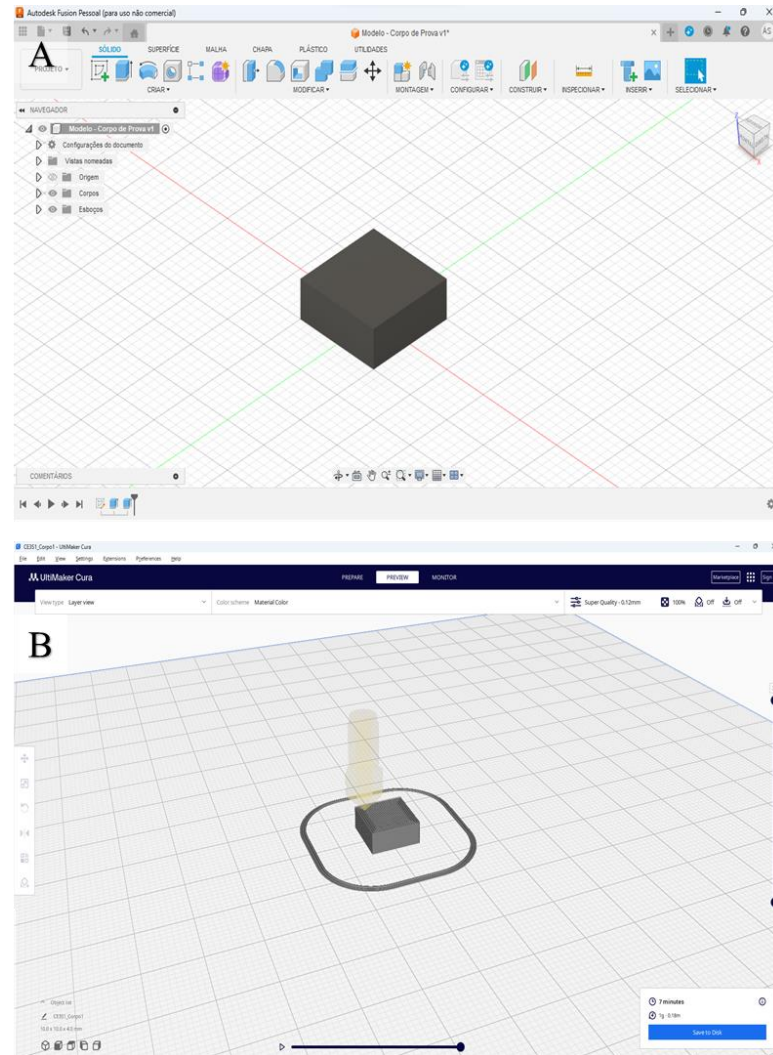


Figura 8: Desenvolvimento do Modelo em Software CAD. Ilustração do passo a passo das etapas para obtenção dos corpos de prova, no software de desenvolvimento CAD Fusion 360 (A), e em seguida, o processo de fatiamento no software Ultimaker Cura (B).

3.1.2. Preparação das Amostras para Realização dos Ensaios *In-vitro*

Antes do início dos testes *in-vitro*, todas as amostras foram polidas com auxílio de uma politriz metalográfica, a fim de remover possíveis irregularidades na superfície do material, bem como promover uma melhora na adesão superficial do material. Neste processo, foram utilizadas lixas de carvão de silício com granulometrias de 800, 1200, 2400 e 3000. A rugosidade é um fator que pode influenciar na adesão das células, logo, tendo em vista os ensaios de cultura de células, as amostras não foram polidas com pasta de diamante. Ao final de todo o processo, as amostras foram limpas com álcool isopropílico.

3.1.3. Ensaios *In-vitro*

3.1.3.1. Ensaio em Fluido Corporal Simulado (SBF)

Os ensaios de imersão das amostras em SBF foram realizados no Laboratório de Biofísica e Nanossistemas (LBN), e em colaboração com o Laboratório de Espectroscopia Óptica e Fototérmica (LEOF). O procedimento teve início com a preparação do SBF, que foi de acordo com a metodologia empregada por Kokubo, Tadashi e colaboradores [69]. A Tabela 2 reúne todos os reagentes utilizados para preparação do SBF, além de suas respectivas ordens de adição.

Em um Becker de 1 litro, foi adicionado aproximadamente 700 *ml* de água destilada a uma temperatura de aproximadamente 36,5°C, no qual foram adicionados de forma gradativa, os reagentes de 1 a 8. Após isso, os reagentes 9 e 10 foram adicionados para regular o pH da solução, que deve estar bem próximo a 7,40 a uma temperatura de 36,5°C.

Tabela 2: Reagentes utilizados para preparação do SBF, bem como as respectivas ordens de adição.

Ordem de Adição	Reagente	Grau de Pureza
1	$NaCl$	99,5%
2	$NaHCO_3$	99,5%
3	KCl	99,5%
4	$K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$	99,0%
5	$MgCl_2 \cdot 6H_2O$	98,0%
6	1.0M – HCl	*
7	$CaCl_2$	95,0%
8	Na_2SO_4	99,9%
9	$(HOCH_2)3CNH_2$	99,9%
10	1.0M – HCl	*

Seis grupos amostrais foram submetidos ao ensaio de imersão em SBF, estes são: FPLA e FPLAG (amostras impressas com filamento), resina PLA pura (R-PLA) e funcionalizada com 0,1; 0,2 e 0,3% de grafeno (R-PLAG) (amostras impressas com resina). O

SBF foi adicionado em tubos Falcon de 50 *ml*, no qual as amostras foram fixadas com auxílio de um prendedor. As amostras foram mantidas em banho maria a uma temperatura de 36,5°C. O procedimento perdurou por 28 dias e foi acompanhado diariamente por meio da medição do Potencial Hidrogeniônico (pH), com auxílio de um pHmetro de bancada.

3.1.3.2. Ensaio de Cultura de Células e Viabilidade Celular

Os ensaios de cultura de células foram realizados em duas etapas: para as amostras de filamento (FPLA e FPLAG) e para as amostras de resina (RPLA e RPLAG). Nas amostras de FPLA, as culturas de células foram realizadas em parceria com o Centro de Pesquisa e Desenvolvimento de Medicamentos da Universidade Federal do Ceará (UFC). Neste ensaio, foram empregadas células controle da linhagem MN01 (células de intestino não tumorais) e células tumorais da linhagem AGP-03 (câncer intestinal). As amostras de FPLA e FPLAG que tiveram sua superfície previamente preparada com o polimento sem a utilização de pasta de diamante. As células foram cultivadas em placas de 16 poços com os corpos de prova no fundo de cada poço, de acordo com a metodologia descrita por Gaspar e colaboradores [70].

O ensaio de viabilidade celular para as amostras RPLA e RPLAG 0,1, 0,2 e 0,3%, iniciou-se 24 horas após o plaqueamento em placa de cultura e a adesão das células de melanoma (linhagem MV3, proveniente do Banco de Células do Rio de Janeiro [71]), para avaliar o potencial de inibição de crescimento de células tumorais. O tratamento foi realizado por 24h e a solução de MTT (brometo de 3- [4,5-dimetil-tiazol-2-il] -2,5-difeniltetrazólio) foi adicionada à 1 *mg/mL* na concentração final com 200 μL de volume final por poço. As células viáveis metabolizam o brometo de tetrazólio MTT em cristais de Formazan insolúveis em água, que podem ser quantificados por espectrofotometria após dissolução em um solvente apropriado [72]. Sendo assim, os cristais de Formazan, que foram dissolvidos com 200 μL de solução absoluta de Dimetilsulfóxido (DMSO) e a placa de absorbância foi lida a 450 *nm*.

3.2. Amostras Impressas em Resina (SLA)

Como referido na Seção 2.3.1, uma das principais dificuldades associadas à implementação do grafeno em aplicações biológicas se deve a sua síntese, uma vez que, em geral, para obter um material com maior grau de pureza por meio de um processo de esfoliação

mais eficaz, é empregado o uso de ácidos fortes. Neste aspecto, no presente trabalho, foi desenvolvido um novo procedimento de síntese sem o uso de ácidos fortes, como o ácido sulfúrico, por exemplo, uma vez que possíveis resquícios destes ácidos podem ser prejudiciais às células e tecidos. Sendo assim, viabilizou-se o uso do grafeno obtido pela rota de esfoliação eletroquímica e mecânica em aplicações biomédicas.

3.2.1.1. Síntese do Grafeno

Para síntese do grafeno, foram testadas diferentes rotas, diferenciando principalmente o material precursor (grafite). O método primário de síntese utilizado e adaptado foi a esfoliação eletroquímica, no qual consiste em utilizar uma solução eletrolítica que é responsável por intermediar a intercalação iônica das camadas de grafite, promovendo a quebra das ligações interplanares, e gerando assim o grafeno.

O procedimento de síntese teve início com a escolha do solvente da solução eletrolítica. Algumas metodologias baseadas na esfoliação eletroquímica disponíveis na literatura, utilizam ataques com ácidos inorgânicos para promover a intercalação iônica. Estas rotas de síntese, que empregam ácidos fortes, como o ácido sulfúrico [12], não são interessantes tendo em vista a proposta de uso para aplicações biológicas do grafeno obtido, uma vez que pode haver resquícios destes ácidos, sendo nocivos para às células e os tecidos com os quais o material terá contato. Por isso, na metodologia desenvolvida neste trabalho foi utilizado um sal inorgânico, o sulfato de sódio (Na_2SO_4), como soluto [12].

Tendo sido escolhido a solução eletrolítica que seria empregada, passou-se para a escolha do cátodo e do ânodo que iriam compor a célula eletrolítica que seria utilizada para a síntese. A partir de alguns testes utilizando folhas de grafite como cátodo e ânodo, optou-se pelo emprego de outros materiais, como Platina (Pt) e Níquel (Ni), tendo em vista a obtenção de um material com maior grau de pureza e menos defeitos estruturais. Neste ponto, optou-se também pelo uso do grafite de lápis, tendo em vista que a composição deste material, grafite + argila, favorece o processo de esfoliação, uma vez que, durante esse processo, parte do grafite não esfoliado irá para o fundo do recipiente junto com a argila [73]. Além disso, a argila presente na composição atua como um agente regulador do processo de esfoliação, impedindo que o processo ocorra de maneira repentina, e evitando a formação de placas.

A partir disso, deu-se início os procedimentos experimentais. Em um Becker de 250ml, foi preparada a célula eletrolítica, que consistia em uma solução de 10,65g de Na_2SO_4 em 75 ml de água destilada, que foi homogeneizada com o auxílio de um agitador magnético. Após a preparação da solução, com o auxílio de uma fita, foram fixados os eletrodos nas paredes do Becker. No terminal positivo (ânodo) de uma fonte, foi ligado a haste de grafite, e no terminal negativo (cátodo) um fio de platina. Foi então aplicado uma diferença de potencial de 10V durante 15 minutos ou até todo o grafite ser esfoliado (Figura 9).

Após a etapa de esfoliação, deu-se início ao procedimento de sonicação (Figura 9.2) com a finalidade separar as camadas de grafeno mecanicamente. Para isso, utilizou-se um sonicador de ponteira com frequência de 40kHz durante 30 min. Finalmente, após a sonicação, iniciou-se a etapa de limpeza e secagem do grafeno. O processo de lavagem ocorreu a partir da centrifugação em 4000 rpm durante 30 min da solução contendo o grafeno disperso (Figura 9.3). Devido a centrifugação, todo o material concentrou-se na parte inferior do tubo Falcon, sendo assim possível descartar parte do fluido. Em seguida adicionou-se água destilada, repetindo o mesmo processo por quatro vezes.

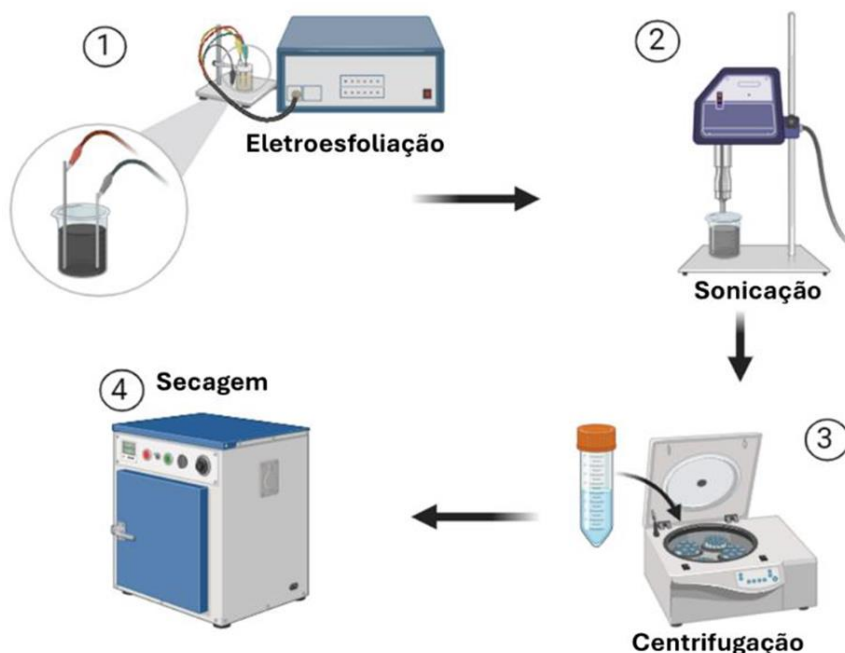


Figura 9: Procedimento Experimental Para Síntese Do Grafeno. Em (1), é mostrado a representação da primeira etapa do procedimento que é a esfoliação eletroquímica do grafite, que foi realizado em uma solução de sulfato de sódio. Após este procedimento, a solução foi levada para um sonicador de ponteira (2), com o objetivo de promover a separação das camadas por meio da esfoliação mecânica.

O passo (3) representa o procedimento de limpeza das amostras. No total foram realizadas três lavagens com água destilada. Por fim, foi realizada a secagem do grafeno obtido em uma estufa.

A última etapa do procedimento foi a secagem do material (Figura 9.4). Todo o grafeno obtido foi depositado em uma placa de Petri e em seguida colocado em uma estufa a 90°C durante 30 minutos. Após essa etapa, os materiais obtidos foram levados para caracterização por DRX e ER.

Todo o procedimento descrito foi testado diversas vezes variando as configurações da célula eletrolítica empregada. Foram utilizados grafite proveniente de lápis com diferentes concentrações de argila, em específico, os grafites 8B, 6B, 2B e HB. Em termos de quantidade de argila na composição, temos a seguinte classificação: $8B < 6B < 2B < HB$. O percentual de grafite para argila pode variar, dependendo da fabricante, porém, em geral, os lápis 8B são compostos por 90-95% de grafite, o 6B por 80-90%, o 2B de 70-80%, e o HB de 60-70% [74]. Além disso, em algumas rotas foi empregado o uso de Níquel no lugar da Platina. Estes testes foram fundamentais para definir qual a melhor configuração para obter um material com elevada pureza e um baixo nível de defeitos estruturais.

3.2.1.2. Adição de Grafeno à Resina

A funcionalização da resina BioPLA (da marca *eSun*) com grafeno deu-se por adição direta. Em um *Becker*, foi adicionado 250 ml de resina, e em seguida adicionado a quantidade de grafeno equivalente a uma concentração de 0,1 – 0,3%. Em seguida, a solução “resina+grafeno” foi levada para um sonicador de ponteira, no qual foi configurado à 80% de sua potência total (40kHz), para promover a homogeneização do material. O tempo de total de sonicação foi de 30 minutos.

3.2.1.3. Impressão das Amostras

O método de impressão das amostras de resina é semelhante ao descrito anteriormente na Seção 3.1.1. O processo teve início com o desenvolvimento do corpo de prova no *software* CAD *Autodesk Fusion 360*. Em seguida, os moldes foram exportados para o *software* de fatiamento *Halot Box*, disponibilizado gratuitamente pela fabricante da impressora. Nesta etapa, foram ajustados os parâmetros de impressão, como tempo de exposição da primeira camada e

camadas subsequentes, espessura das camadas, e velocidade do motor. Ao final desta etapa, os arquivos foram exportados e levados para impressão. O equipamento utilizado foi uma impressora da marca *Crealty*, modelo *Halot Mage 8K*.

3.3. Técnicas de Caracterização

3.3.1. Difração de Raios X (DRX)

O conhecimento acerca do arranjo espacial dos átomos que constituem um material é fundamental para compreender suas propriedades e comportamentos em diferentes condições. A microestrutura dos materiais, que inclui aspectos como tamanho de grão, fases presentes e defeitos cristalinos, tem uma influência direta e significativa nas suas propriedades macroscópicas, como dureza, ductilidade, resistência à fratura e condutividade elétrica [75]. Neste aspecto, um método crucial que auxilia na determinação dessa estrutura é a técnica de difração de raios X, que permite identificar a disposição dos átomos na estrutura do material, revelando detalhes precisos sobre a amostra analisada.

Os chamados raios X foram descobertos em 1895 pelo físico alemão Wilhelm Conrad Röntgen, recebendo este nome devido a sua natureza desconhecida naquele momento. No ano de 1912, durante os experimentos realizados por William Lawrence Bragg, juntamente com seu pai William Henry Bragg, foi observado o fenômeno de difração de raios X através de cristais de *NaCl* e *ZnS*, trazendo então luz acerca da natureza ondulatória dos raios X, e também provendo um novo método capaz de fornecer informações estruturais da matéria [76].

Para o experimento realizado por Bragg, foi utilizada uma fonte de raios X responsável por emitir um feixe contínuo, direcionado para incidir sobre um cristal. Sendo assim, quando os raios X atingissem o material, os planos cristalinos iriam refleti-lo. Com o objetivo de captar os raios refletidos e a suas respectivas intensidades, foram posicionados detectores em diferentes ângulos ao redor do cristal. A intensidade dos raios captados após passarem através do cristal foi medida em termos da variação do ângulo de incidência. Ao observar os padrões de difração e os ângulos nos quais os picos eram observados, Braag foi capaz de chegar à relação matemática que descreve a condição para que ocorra a difração de raios X (Equação 1). A Figura 10 ilustra o fenômeno de difração nas condições definidas pela Lei de Braag.

$$2d\sin(\theta) = n\lambda \quad \text{Eq. 1}$$

Para o presente trabalho, os respectivos difratogramas das amostras foram obtidos a partir de um difratômetro da marca *Bruker*, modelo *D8 Advance* equipado com um tubo de radiação $Cu - k\alpha$ ($\lambda = 1,5406 \text{ \AA}$), tensão de $40kV$, corrente de $40mA$, e detector linear. O equipamento é pertencente às instalações da Central Analítica de Materiais da Universidade Federal do Maranhão, campus Don Delgado. Os dados foram obtidos no intervalo 2θ de 5° a 75° , em passo angular de $0,02^\circ$, tempo de contagem $2s$ por passo.

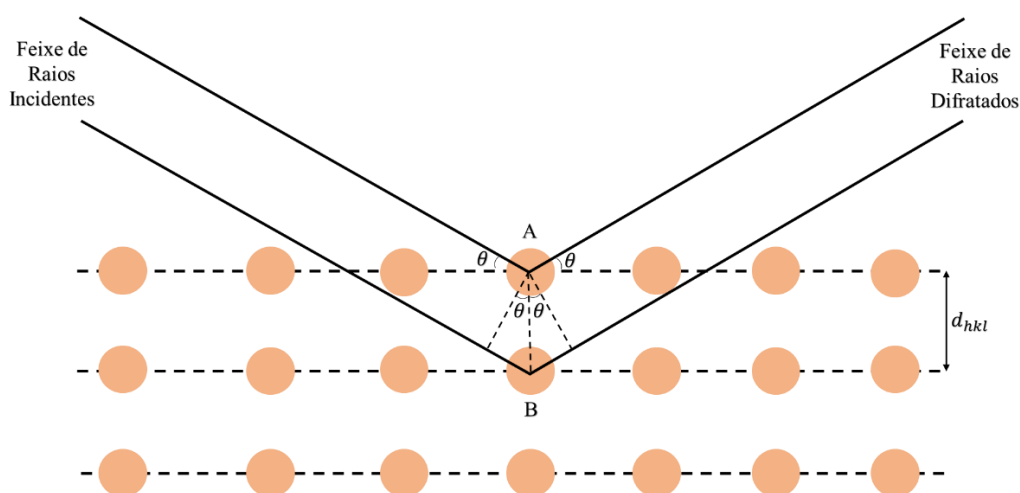


Figura 10: **Representação da difração de ondas incidentes em uma estrutura cristalina.** Um feixe de raios X paralelo, monocromático e coerente incide com um ângulo θ sobre dois planos atômicos paralelos, separados por uma distância interplanar d_{hkl} sendo dispersos pelos átomos A e B.

3.3.2. Espectroscopia Raman (ER)

A descoberta do efeito Raman foi realizada pelo físico indiano Chandrasekhara Venkata Raman em 1928, juntamente com seu colaborador K.S. Krishnan. Esse efeito refere-se à dispersão inelástica de luz, onde um pequeno número de fótons que interage com as moléculas de uma substância sofre uma mudança em seu comprimento de onda. Quando a luz incide sobre uma molécula, a maior parte é espalhada elasticamente (dispersão Rayleigh), mas uma fração muito pequena é espalhada inelasticamente, resultando em uma mudança de energia correspondente a diferentes modos vibracionais ou rotacionais da molécula [77].

O espalhamento inelástico é subdividido em dois tipos principais: espalhamento Stokes e anti-Stokes, como ilustrado na Figura 11. No espalhamento Stokes, os fótons incidentes, com frequência ν_0 , perdem energia para as moléculas do material, resultando em

fótons espalhados com menor energia (portanto, maior comprimento de onda) do que os fótons incidentes. Já no espalhamento anti-Stokes, por outro lado, os fótons incidentes ganham energia das moléculas, resultando em fótons espalhados com maior energia (logo, menor comprimento de onda). Isso acontece quando as moléculas já estão em um estado vibracional ou rotacional excitado e transferem essa energia adicional para os fótons incidentes [78].

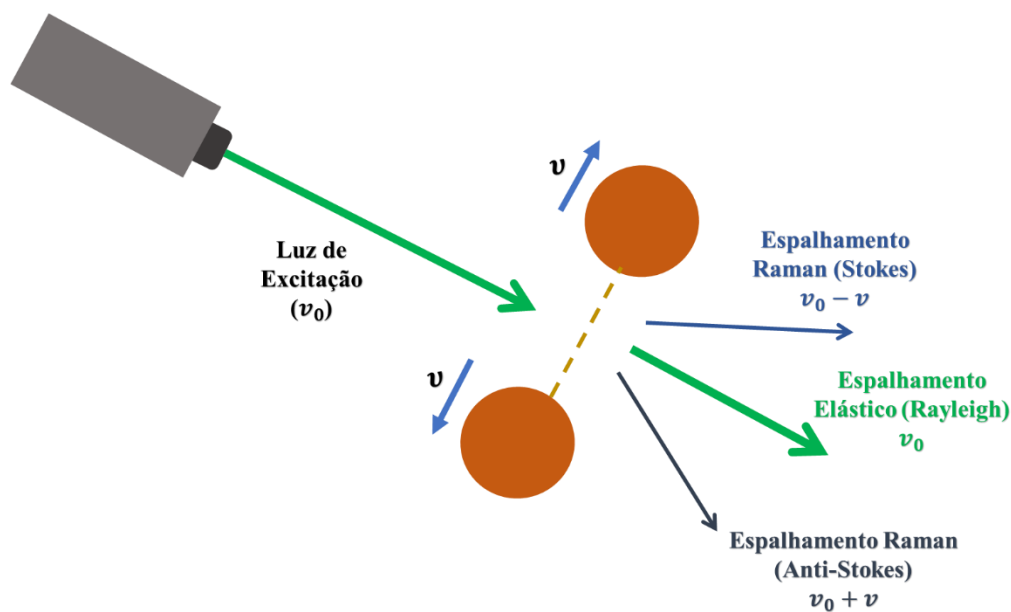


Figura 11: Princípios Básicos de Funcionamento da Espectroscopia Raman. Representação do princípio de funcionamento da técnica de ER. Quando a luz de um laser monocromático incide sobre uma amostra, a maior parte da luz é espalhada elasticamente (Espalhamento Rayleigh), sem mudança de energia. No entanto, uma pequena fração da luz é espalhada inelasticamente, com uma mudança de energia que corresponde a transições vibracionais, rotacionais ou outras transições baixas de energia das moléculas na amostra (espalhamento Raman). Fonte: próprio autor.

A técnica de Espectroscopia Raman é essencial para determinar os modos vibracionais das moléculas e grupos funcionais, fornecendo informações valiosas acerca da composição química, e da estrutura molecular do material. Além disso, a técnica de ER é capaz de fornecer informações sobre a interação molecular, auxiliando, por exemplo, na compreensão das propriedades dos nanocompósitos.

As medidas de ER foram realizadas no Laboratório de Espectroscopia Vibracional e Impedância da UFMA. Para isso, foi utilizado um espectrômetro *Horiba Jobin-Yvon* modelo T64000 ao qual está acoplado a um microscópio *BX41 Olympus*, com uma lente objetiva de 100x com distância de trabalho ($WD = 20,4\text{mm}$) e uma CCD (*Charge-Coupled Devices*) que atua como uma detectora de carga acoplada resfriada com nitrogênio líquido, responsável por

diminuir a interferência vibracional das moléculas do próprio equipamento de detecção. Destaca-se que as medidas foram realizadas nas amostras FPLA e FPLAG impressas e antes da imersão em SBF, não sendo realizadas medidas de ER após o teste em SBF.

3.3.3. Microscopia de Força Atômica (AFM)

A microscopia de força atômica (ou AFM, do inglês *Atomic Force Microscopy*) é uma técnica avançada de caracterização capaz de fornecer informações preciosas acerca das propriedades nanoestruturais e nanomecânicas de uma ampla gama de amostras, e faz parte da família de microscópios de varredura por sonda (SPM, do inglês *Scanning Probe Microscopy*). Desenvolvida por Gerd Binnig, Calvin Quate e Christoph Gerber em 1986 [79], esta técnica permite a visualização de superfícies com resolução atômica, utilizando para isso, uma ponta extremamente fina, com diâmetro de alguns nanômetros, que escaneia a superfície da amostra. Durante a varredura, as interações entre a ponta e a superfície geram forças detectadas pelo sistema, proporcionando informações detalhadas sobre a topografia, propriedades mecânicas e outras características da amostra.

A técnica de AFM funciona com base na interação entre uma pequena ponta afiada e a superfície da amostra. A ponta, montada na extremidade livre de uma alavanca flexível (chamada cantiléver), varre a superfície da amostra enquanto um feixe de laser monocromático é refletido na parte superior do cantiléver para detectar sua deflexão, ocasionada devido a aproximação (ou afastamento) da sonda em relação a superfície da amostra, dando origem a forças intermoleculares. Essas deflexões são medidas pelo movimento do feixe de laser em um detector de posição bastante sensível, gerando mapas bidimensionais e tridimensional detalhados da topografia. O AFM possui diferentes modos de operação, sendo estes: contato, não-contato e contato intermitente. A principal diferença entre os modos de operação é o regime de força de interação entre o conjunto sonda-amostra (Figura 12).

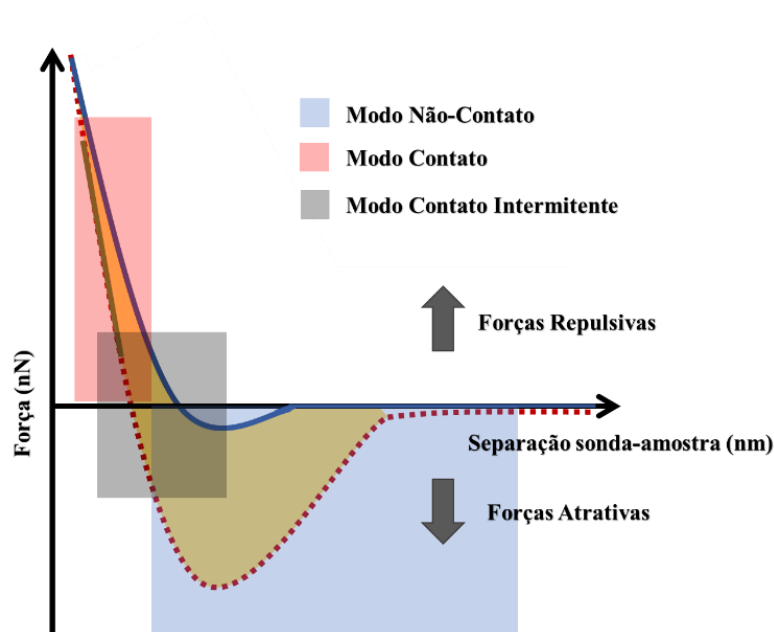


Figura 12: **Modos de Operação do AFM.** Representação dos modos de operação do AFM, com base no regime de forças de interação (potencial de Lennard-Jones). Fonte: próprio autor.

Em comparação com outras técnicas de microscopia, o AFM destaca-se por sua capacidade de fornecer imagens tridimensionais de superfícies com resolução atômica, sem a necessidade de pré-tratamento das amostras, como metalização ou fixação, que são comuns em microscopia eletrônica. Outro ponto positivo da técnica deve-se a sua capacidade de realizar medições em ambientes variados, incluindo líquidos ou vácuo, transformando o equipamento em uma ferramenta poderosa para estudos em biologia e ciência dos materiais.

As curvas de força obtidas a partir das medidas de AFM carregam informações sobre a natureza física da superfície da amostra. A Figura 13 mostra um ciclo de aproximação (linha azul) e retração (linha pontilhada vermelha) de uma sonda AFM da superfície de uma amostra. Cada parte da curva carrega uma informação específica e, para acessá-la, são empregados modelos matemáticos específicos [80], [81].

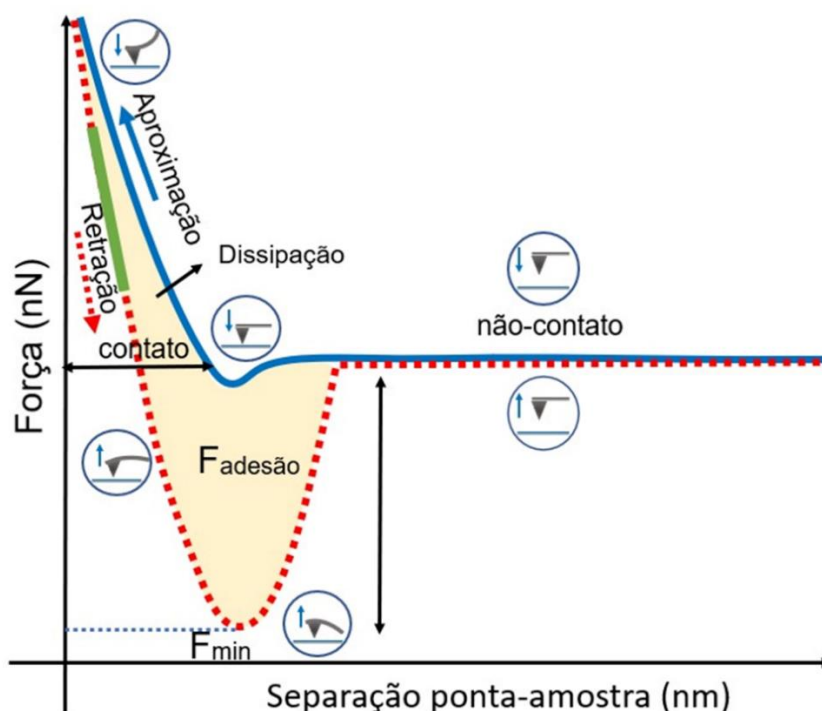


Figura 13: **Curva de Força Característica de AFM.** Curva de força em função da distância sonda-amostra. Fonte: próprio autor. Fonte: próprio autor.

Todos os grupos de amostras foram caracterizadas por AFM no modo de operação *Quantitative NanoMechanics* (QNM), com o objetivo de obter informações sobre a rugosidade superficial, e das propriedades nanomecânicas, tal como a adesão e módulo de Young (YM). As medidas foram realizadas no Laboratório de Biofísica e Nanossistemas da UFMA. Para as medidas, foi utilizado um microscópio de varredura por sonda da marca *Bruker*, modelo *MultiMode 8*, equipado com uma controladora *NanoScope 5*. As medidas ocorreram em temperatura ambiente, e com umidade do ar controlada. As medidas de AFM foram realizadas nas amostras FPLA e FPLAG (impressos), e após a etapa de polimento.

3.3.4. Microscopia de Sonda por Força Kelvin (KPFM)

Com o objetivo de verificar as alterações causadas pela adição de grafeno à estrutura do PLA, foram obtidos, também, dados sobre o potencial de superfície das amostras FPLA e FPLAG por meio da técnica de Microscopia de Força Kelvin (KPFM). A técnica de Microscopia de Sonda por Força Kelvin (KPFM, sigla para *Kelvin Probe Force Microscopy*), se baseia no mesmo princípio de funcionamento da técnica de AFM, no qual uma sonda varre

a superfície da amostra. Porém, o princípio físico de funcionamento é baseado em um microscópio de força eletrostática (ou EFM, da sigla *Electrostatic Force Microscopy*), no qual é capaz de fornecer informações quantitativas sobre a distribuição local do potencial de superfície, bem como a função trabalho do material.

O funcionamento da técnica de KPFM se baseia no alinhamento dos níveis de energia de Fermi² [82]. Uma vez que dois materiais entram em contato, neste caso a superfície da amostra e a sonda, ocorre uma transferência de elétrons até que os seus níveis de Fermi estejam iguais, sendo esta uma resposta a diferença de potencial elétrico, e uma consequência da busca por um estado de menor energia por parte do sistema físico. Logo, a partir desta tendência de equiparação dos níveis de Fermi, e conhecendo a função trabalho da sonda utilizada, o *software* do microscópio é capaz de aferir valores de potencial de superfície e função trabalho do material analisado.

3.3.5. Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)/ Espectroscopia de Energia Dispersiva (EDS)

A Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) é uma técnica crucial para a análise de materiais em alta resolução, permitindo a visualização detalhada das superfícies e estruturas internas dos materiais com ampliação que pode chegar a milhões de vezes [83]. Tendo origem na década de 1960, esta técnica revolucionou diversos campos da ciência e da engenharia ao oferecer imagens com aparência tridimensional, com grande profundidade de campo e alta resolução. A técnica é essencial na caracterização de materiais, falhas em componentes, análise de superfícies e investigação de nanomateriais, contribuindo significativamente para avanços na ciência dos materiais, biologia, medicina e eletrônica, etc [84].

Na técnica de MEV, a radiação de interesse inclui elétrons secundários, elétrons retroespalhados, raios X característicos, elétrons Auger e catodoluminescência (Figura 14). Os elétrons secundários, originados da superfície da amostra, fornecem imagens topográficas de alta resolução. Os elétrons retroespalhados, resultantes de colisões elásticas, fornecem contraste composicional baseado no número atômico. Os raios X característicos, gerados por transições

² O nível de Fermi é a energia máxima que os elétrons em um material podem ter a uma temperatura de zero Kelvin. Em termos práticos, ele indica a probabilidade de ocupação dos estados eletrônicos e é fundamental para determinar as propriedades eletrônicas e de transporte de um material.

eletrônicas internas, são usados na espectroscopia de dispersão em energia (EDS) para análise elementar. Os elétrons Auger, emitidos de maneira similar aos raios X, são utilizados em análises de superfície. A catodoluminescência, emissão de luz visível ou UV, é utilizada para estudar propriedades ópticas e composição de materiais. Essas radiações são coletadas por detectores específicos no MEV, permitindo obter informações detalhadas sobre a morfologia, composição e propriedades dos materiais [84].

Às análises de MEV foram realizadas na CeMatBio-UFMA, utilizando um equipamento *EVO HD*, da empresa *Zeiss*, equipado com uma unidade HD 15 com pressão variável (até 273 Pa), estágio motorizado de 5 eixos concêntricos, câmara com iluminação na faixa do infravermelho, copo de Faraday e monitor de corrente da amostra. Para detecção das radiações de interesse, são acoplados ao equipamento um detector de Elétrons Secundários (SE) para alto vácuo, detector SE em pressão variável (VPSE), um detector de Elétrons Retroespalhados (BSE) de 5 segmentos de 16mm, além de um detector EDS *XFlash 410*, um detector de raios-X em energia dispersiva, com área de detecção de 10mm² e resolução de 129eV a Mn K α .

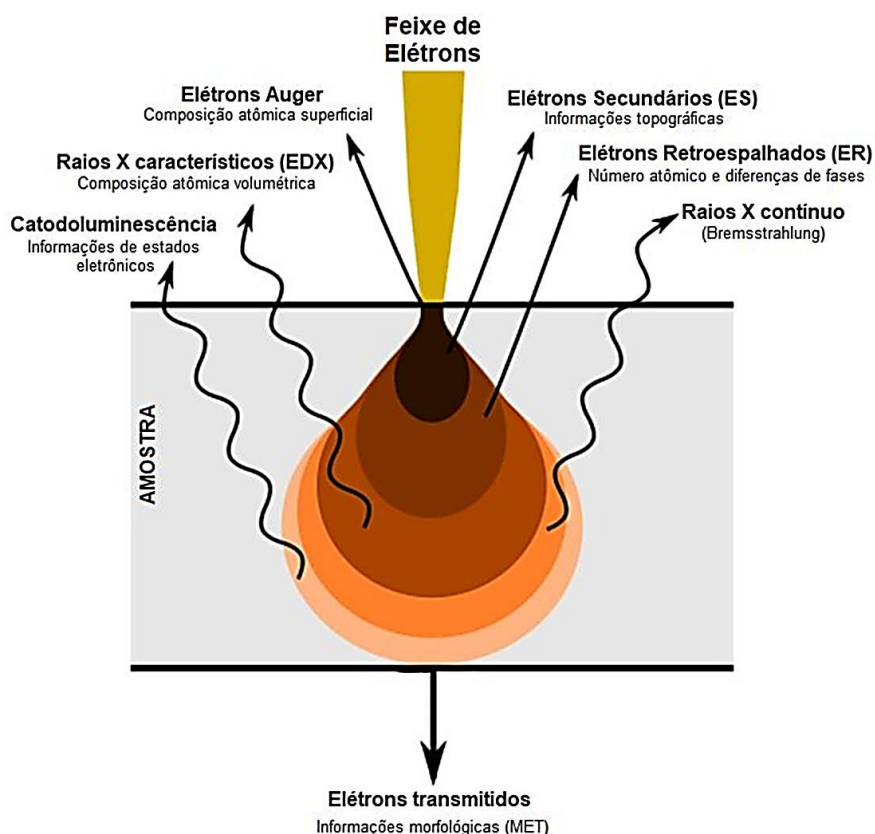


Figura 14: Gota de Interação do MEV. Efeitos produzidos pela interação do feixe de elétrons com uma amostra. Fonte: adaptada da referência [85].

3.3.6. Microdureza Vickers (MV)

A microdureza Vickers é uma técnica de medição de dureza que utiliza um indentador piramidal de diamante com uma base quadrada para penetrar na superfície do material. A dureza é determinada aplicando uma carga conhecida ao indentador e medindo a diagonal da impressão deixada na superfície. Os valores de microdureza Vickers diferem significativamente entre amostras macias e duras devido à resistência intrínseca dos materiais à deformação plástica. Em amostras macias, como alguns metais não tratados ou polímeros, o indentador de diamante penetra mais profundamente, resultando em impressões maiores e, conseqüentemente, valores de dureza Vickers mais baixos [75].

Por outro lado, em amostras duras, como metais endurecidos, cerâmicas ou compósitos, a resistência à penetração é muito maior, produzindo impressões menores e valores de dureza Vickers mais altos. Essa diferença ocorre devido a fatores como ligações atômicas mais fortes e estruturas cristalinas mais resistentes à deformação em materiais duros, enquanto materiais macios possuem estruturas que permitem uma maior mobilidade de deslocamento da microestrutura do material quando submetido a cargas externas.

Os valores de MV das amostras foram obtidos a partir de um microdurômetro Vickers HMT-2T, da empresa Shimadzu, disponível Laboratório de Ensaios Mecânicos e Termomecânicos do Instituto Federal do Maranhão, Campus Monte Castelo. Foram produzidas 10 indentações na superfície de cada amostra, aplicando-se uma carga de 490 *mN* (ou $\approx 0,05 \text{ kgf}$) durante 15 s. Conhecendo a geometria do penetrador, ilustrado na Figura 15, é possível chegar a calcular a microdureza Vickers por meio da seguinte expressão:

$$HV = \frac{1,8544 \times F}{d^2} \quad eq.2$$

onde *HV* corresponde ao valor da Microdureza Vickers, *F* a carga empregada, e *d* a média dos valores das diagonais d_1 e d_2 , como representado na Figura 15.

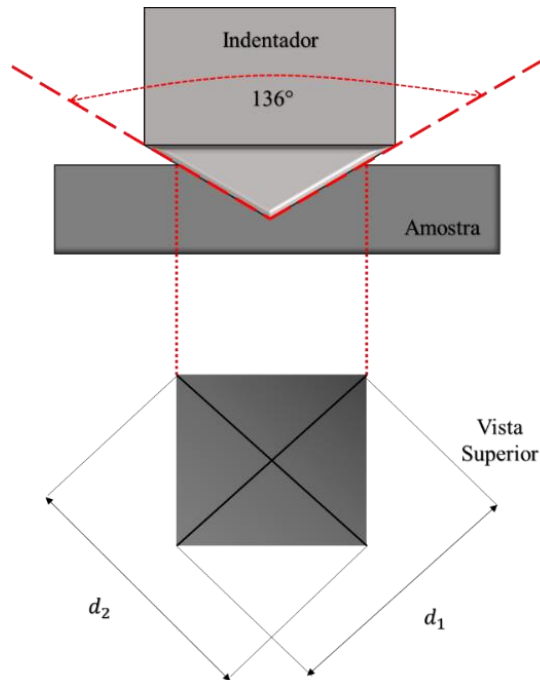


Figura 15: **Penetrador de Diamante MV**. Representação da geometria do indentador utilizado para a realização do ensaio de microdureza Vickers e a forma de impressão feita no material. Fonte: próprio autor.

4. Resultados e Discussão

Na seção anterior foram descritos os procedimentos, métodos e equipamentos utilizados na síntese e na caracterização estrutural, vibracional e elétrica dos materiais analisados. Nesta seção, serão mostrados os resultados obtidos com foco nos objetivos e metas deste trabalho, além de analisá-los com base nas evidências já descritas na literatura.

4.1. Parte 1 – Amostras Produzidas por Impressão 3D de Filamento

4.1.1. Difração de Raios X (DRX)

A Figura 16 mostra o difratograma das amostras de FPLA e FPLAG antes dos ensaios de imersão em SBF. É possível observar que todas as amostras analisadas apresentam picos característicos tanto do PLA, quanto do grafite. A presença destes picos estreitos e intensos indica algum ordenamento das cadeias do polímero, logo, podemos concluir tratar-se do PLLA

(ácido poli-L-láctico), ou de uma mistura racêmica das duas formas enantioméricas do ácido láctico, o copolímero chamado poli-DL-ácido láctico (PDLLA), justamente por apresentar certo grau de cristalinidade. Para o FPLA, foi possível identificar dois picos característicos, que se encontram em torno das posições $2\theta \approx 16,4^\circ$ e $2\theta \approx 18,7^\circ$ (linhas tracejadas destacadas na Figura 16) e são atribuídos aos planos cristalográficos (110)/(220), e (203), respectivamente [38], [86], [87]. Esses picos correspondem às unidades de repetição da estrutura cristalina do PLA e são utilizados para determinar o grau de cristalinidade do material [39], [87].

Já para a amostra de FPLAG, além dos picos característicos do polímero, é possível visualizar também outros dois picos, um com intensidade bastante elevada por volta de $2\theta \approx 26,4^\circ$, que corresponde ao espaçamento de $0,334 \text{ nm}$ entre os planos basais do grafeno, e outro menos intenso por volta de $54,3^\circ$, no qual ambos são característicos do grafite [37], [39]. A intensidade elevada do pico localizado em $2\theta \approx 26,4^\circ$ indica que o material corresponde ao grafeno com o mesmo espaçamento basal do grafite natural [88].

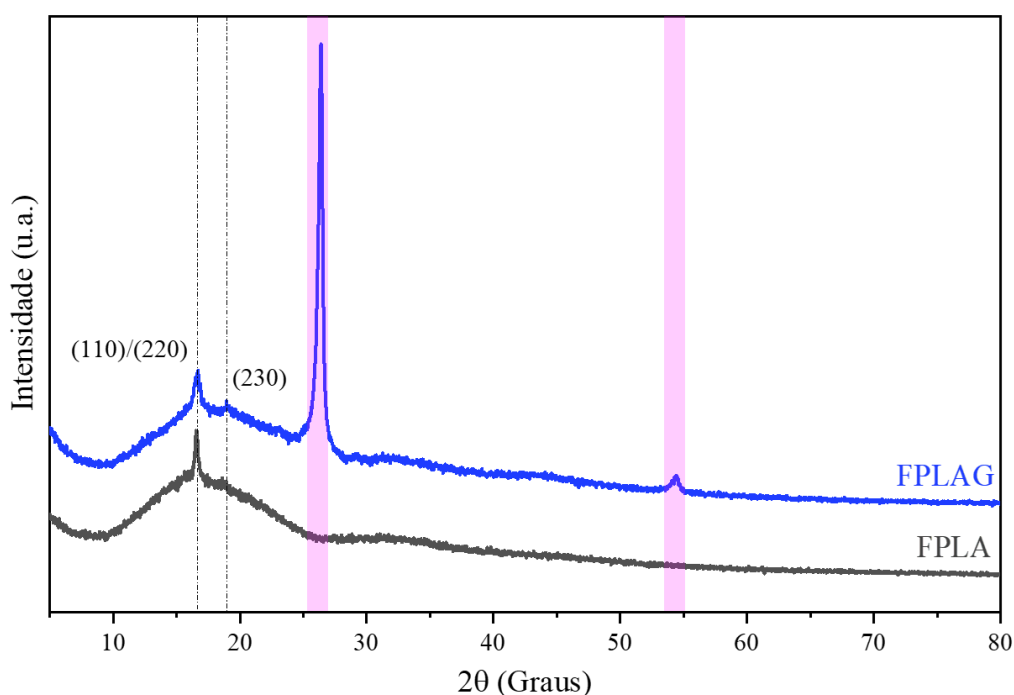


Figura 16: Difratograma das Amostras FPLA/FPLAG. Difratograma das amostras de FPLA e FPLAG antes da imersão em SBF. Para a amostra FPLAG, observa-se o surgimento de picos (sombreados em cor magenta), um com maior intensidade, por volta de $2\theta \approx 26,6^\circ$, e outro menos intenso $54,3^\circ$, ambos associados à presença de grafeno na estrutura.

4.1.2. Espectroscopia Raman (ER)

Por conta do princípio de funcionamento da técnica, que se baseia na detecção de fótons que sofrem espalhamento inelástico devido a interação com a nuvem eletrônica das moléculas do material, a Espectroscopia Raman (ER) possui uma alta sensibilidade de detecção de deslocamentos das nuvens eletrônicas de grupos funcionais presentes nos materiais, logo, no contexto deste estudo, esta técnica pode conceder informações importantes acerca da natureza física e química dos polímeros [91]. A técnica de ER é capaz revelar características únicas do material, auxiliando na determinação da composição, cristalinidade e outras propriedades essenciais para o desenvolvimento e aprimoramento de novos polímeros e nanocompósitos [31], [91].

A Figura 17 mostra o espectro Raman para as amostras FPLA/FPLAG após a impressão 3D, no qual é possível constatar os modos vibracionais característicos do polímero. Observando o espectro da amostra FPLA (linha cinza), é possível verificar a presença de bandas de absorção nas regiões entre 2880 cm^{-1} e 2990 cm^{-1} , as quais podem ser atribuídas aos modos de estiramento das ligações $C-H$ [92]. Podemos observar também a banda característica do modo vibracional de estiramento das ligações $C=O$, por volta de 1770 cm^{-1} , além dos modos vibracionais em 1450 cm^{-1} , que é atribuído a presença de grupos éteres (CH_3) e em 1128 cm^{-1} , que está associado a deformação angular do tipo tesoura, das ligações de grupos CH_3 [31]. Já as bandas em 875 cm^{-1} e 411 cm^{-1} são atribuídas, respectivamente, à vibração de estiramento simétrico e à deformação das ligações químicas do grupo carboxilato ($C-COO$) [31].

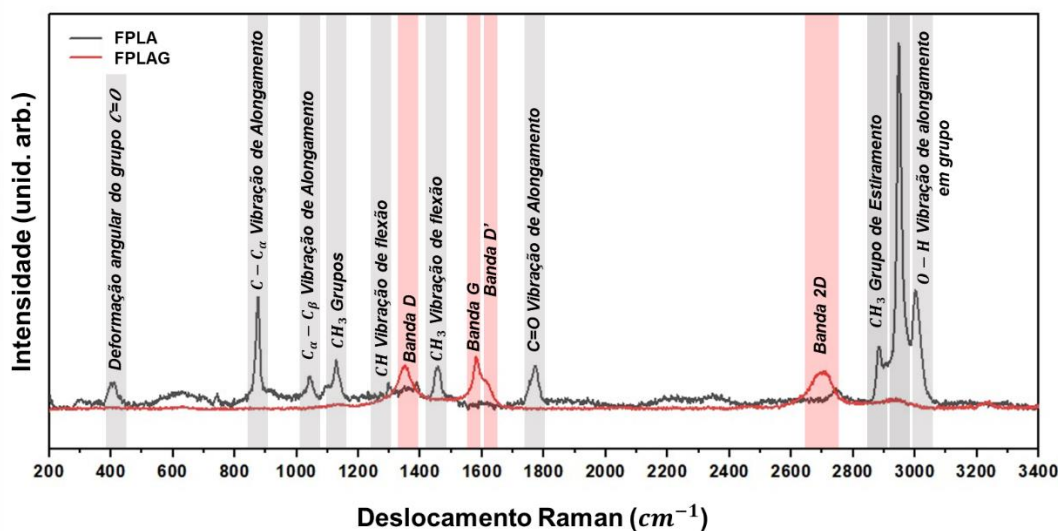


Figura 17: Espectro Raman. Espectro Raman das amostras de FPLA (linha cinza) e FPLAG (linha vermelha) caracterizadas após a impressão 3D. É possível observar todos os modos vibracionais característico do polímero na amostra PLA, porém, nota-se que após a funcionalização com o grafeno, os modos vibracionais característicos do polímero são suprimidos.

Diferente dos resultados observados para o DRX, no qual é possível verificar tanto os picos característicos do PLA quanto do grafeno para a amostra FPLAG, no Raman, apenas a Banda-D ($\approx 1330\text{ cm}^{-1}$), Banda-G ($\approx 1582\text{ cm}^{-1}$), e a Banda-2D (2656 cm^{-1}) [93], que estão associadas a materiais a base de carbono, como grafeno e grafite, são observadas. A ausência de sinal dos modos vibracionais característicos do PLA pode ser atribuída a uma sobreposição por parte dos modos vibracionais do grafeno, uma vez que este material apresenta uma maior capacidade de absorção dos fótons de luz (energia), o que reflete em uma maior intensidade da sua assinatura vibracional. A Tabela 3 reúne todos os modos vibracionais identificados para ambas as amostras.

Tabela 3: Assinaturas vibracionais dos grupos funcionais da amostra de PLA puro, e as bandas características do grafeno observadas na amostra PLAG.

Assinatura Vibracional	Comprimento de Onda (cm^{-1})
PLA	
$^3\nu(\text{O} - \text{H})$	3000
$\nu(\text{C} - \text{H})$	2950
	2880
$\nu(\text{C} = \text{O})$	1770
$\nu(\text{CH}_3)$	1450
$\nu(\text{C} - \text{CH}_3)$	1040
$^4\gamma(\text{CH}_3)$	1128
$\nu(\text{C} - \text{COO})$	875

³ ν : modo vibracional de estiramento.

⁴ γ : deformação angular do tipo tesoura.

${}^5\delta(C - COO)$	411
PLAG	
banda – 2D	2656
banda – G	1582
banda – D	1330

4.1.3. Microscopia de Força Atômica (AFM)

A Microscopia de Força Atômica (AFM) é uma ferramenta poderosa para determinar características importantes de um vasto número de amostras, principalmente por conta de sua alta versatilidade de operação. Devido a sua altíssima resolução espacial, podemos obter mapas topográficos bidimensionais (2D) e tridimensionais (3D) que possibilitam investigar possíveis alterações na superfície de amostras. Além das informações topográficas, a técnica de AFM é capaz de fornecer informações sobre as propriedades nanomecânicas, como adesão e módulo de Young, do material em análise. Com estas informações, podemos averiguar, por exemplo, como a matriz polimérica de PLA se comporta após a inserção do grafeno em sua estrutura.

A Figura 18 mostra os mapas topográficos 2D e 3D das amostras de FPLA (Fig. 18A e Fig. 18B) e FPLAG (Fig. 18 C e Fig. 18D), além do gráfico comparativo dos valores de rugosidade para cada amostra (Fig. 18 E), seguindo a metodologia reportada por Batista e colaboradores (2024) [94]. Os valores médios de rugosidade para cada amostra, FPLA e FPLAG, são, respectivamente, $146 (\pm 57,7 \text{ nm})$, e $86,9 (\pm 22,3 \text{ nm})$. É possível verificar que a profundidade, que podemos considerar como sendo a distância vertical entre os picos e os vales, referente à amostra FPLAG é menor, o que irá refletir em um menor valor para rugosidade média (Fig. 18E).

⁵ δ : modo vibracional de flexão (ou deformação).

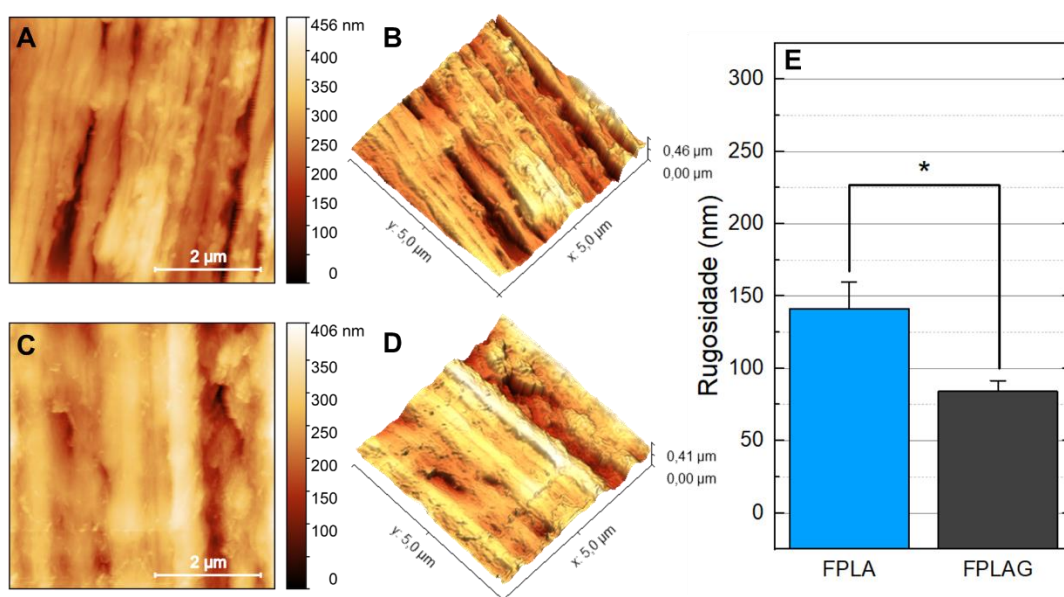


Figura 18: Mapas Topográficos de AFM e Rugosidade Média. Mapas bidimensionais e tridimensionais das amostras de FPLA (A e B) e FPLAG (C e D). Podemos observar uma diminuição da profundidade relativas aos picos e vales da amostra de FPLAG, característica que reflete em um menor valor de rugosidade para a amostra. Os mapas correspondem a varreduras de $5\mu\text{m} \times 5\mu\text{m}$.

Kreta, Ahmed e colaboradores [95], em seu estudo analisando as alterações ocasionadas pela inserção de óxido de grafeno (OG) em filmes finos de quitosana, mostrou que, quando inserido na matriz do material, o OG atua como um agente de preenchimento, ocupando pequenas vacâncias na superfície do material. Logo, a diminuição na rugosidade evidenciada para a amostra PLAG pode ser associado ao preenchimento de lacunas na estrutura do material, devido a inserção do grafeno na forma de nanocompósito à matriz do polímero. Essa característica pode ser associada a forte interação entre o grafeno e as cadeias de ácido polilático, o que garante uma melhor adesão entre as moléculas do polímero, resultando em uma superfície mais uniforme.

A Figura 19 mostra mapas ilustrativos de adesão da amostra FPLA (Fig. 19A) e FPLAG (Fig. 19B), e um gráfico comparativo dos valores médios de adesão de ambas as amostras (Fig. 19C). Os valores médios de força de adesão para cada amostra, FPLA e FPLAG, são, respectivamente, $3,252 (\pm 1,796 \text{ nN})$, e $2,211 (\pm 0,741 \text{ nN})$. Podemos observar que a amostra de FPLAG apresenta um valor médio de adesão menor quando comparado com a amostra de polímero sem a presença de grafeno. Essa diminuição pode ser explicada a partir da influência das cargas líquidas de superfície do material, e a interação de origem eletrostática que ocorre com a sonda de AFM [96], [97].

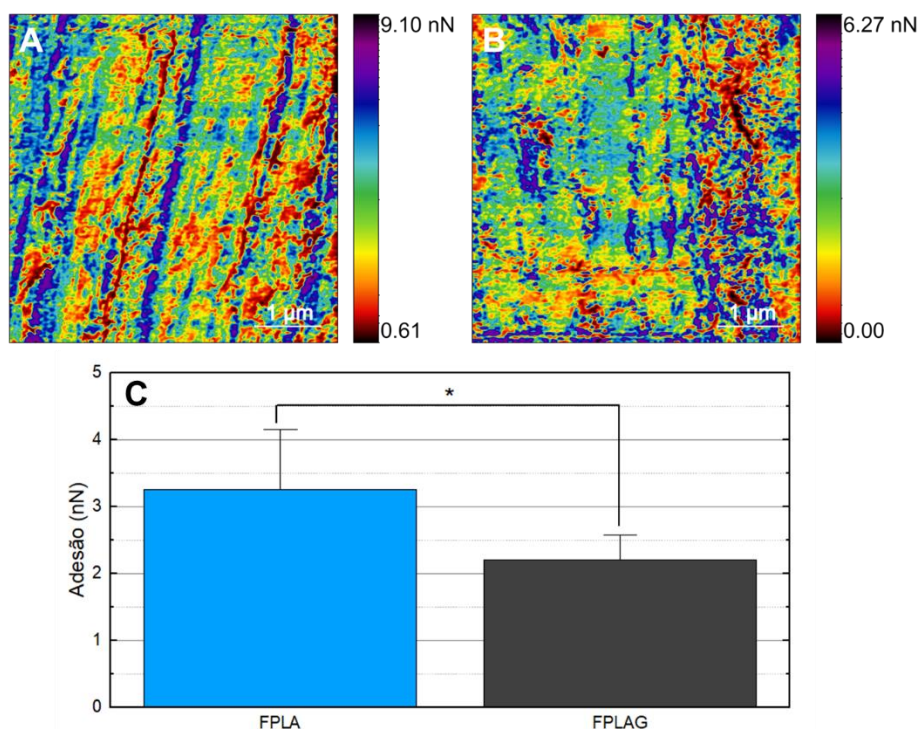


Figura 19: Mapas de Adesão das Amostras PLA/PLAG Obtidos por AFM. Em (A), podemos observar o mapa representativo de adesão da amostra FPLA, e em (B) da amostra FPLAG. O gráfico comparativo dos valores de adesão das amostras (C), mostra uma diferença significativa entre os dois grupos de amostras. Os mapas correspondem a varreduras de $5\mu\text{m} \times 5\mu\text{m}$.

Um parâmetro fundamental para obtenção dos dados de AFM é a frequência de obtenção das curvas de força. Os experimentos descritos neste trabalho utilizando a técnica de AFM no modo QNM, foram realizados com uma frequência de aquisição de 1kHz. É importante notar que os dados referentes a força de adesão obtidos por AFM são influenciados por alguns fatores, como forças de origem eletrostáticas, que surgem devido a eletrização por atrito da sonda devido à alta frequência de oscilação, forças de capilaridade, e de Van der Waals [98]. Especialmente para materiais não condutores, como os polímeros, em condições de baixa umidade, a dissipação de cargas superficiais é pouco efetiva, o que favorece a contribuição das forças de origem eletrostáticas para o resultado de adesão [97].

Como será discutido posteriormente, o grafeno é capaz de alterar as propriedades elétricas, como o potencial de superfície, quando uniformemente distribuído na matriz do polímero. Um estudo realizado por Ze-Fen Liang e colaboradores [99], verificou que o Grafeno apresenta uma distribuição de cargas não uniforme, e dependendo do material na qual é adicionado, pode apresentar uma carga líquida negativa [100]. Sendo assim, ocorrerá uma

repulsão adicional com a sonda de AFM, o que irá ocasionar uma diminuição na adesão entre as superfícies dos materiais.

Além do fator associado ao tipo de material que constitui a sonda de AFM, a frequência na qual as curvas de força são adquiridas também influencia na adesão do sistema sonda-amostra. Para as amostras de FPLA e FPLAG, as varreduras foram realizadas com uma frequência de aquisição de 1kHz . Nestas condições, toda a sonda de AFM irá sofrer eletrização por atrito, o que também irá contribuir para os resultados de adesão. Esse resultado motiva uma aplicação bastante oportuna para esses materiais: superfícies seletivas de controle de crescimento de células tumorais. Células cancerígenas apresentam uma carga de superfície mais negativa quando comparadas às células normais, e isso ocorre devido a alterações em sua composição química e na estrutura de membrana, principalmente em virtude da presença de fosfolipídios de membrana, mucinas O-glicosiladas e gangliosídeos sinalizados em sua superfície [101], [102], [103].

Como observado anteriormente, a amostra de FPLAG apresenta um valor de adesão média menor quando comparado ao FPLA (Fig. 19C), sendo assim, tendo em vista que tanto a superfície do FPLAG, quanto a membrana das células cancerígenas possuem uma carga líquida negativa, podemos pressupor que o polímero funcionalizado com grafeno pode apresentar uma superfície que não favorece o crescimento deste tipo de célula, tornando biofilmes funcionalizados com grafeno como um tratamento promissor para o controle do crescimento de células tumorais. Esse resultado nos motivou a realizar os experimentos *in-vitro* de culturas de células, que será abordado posteriormente.

4.1.4. Microscopia de Força por Sonda Kelvin (KPFM)

As amostras de FPLA e FPLAG também foram analisadas por meio da técnica de KPFM, com o intuito de verificar as alterações nas propriedades elétricas em nanoescala provocadas pela adição do grafeno à matriz de PLA. Esta técnica é capaz de fornecer informações valiosas que podem ser relacionadas com o grau adesão celular na superfície do material, visto que é possível adquirir dados sobre a função trabalho do material. Como mostrado por Metwally, Sara e colaboradores [21], a função trabalho e o potencial de superfície estão relacionados às propriedades elétricas e estruturais do material, e ambos podem influenciar as interações do material com seu ambiente, incluindo interações com células em

aplicações biomédicas. A Figura 20 mostra o gráfico comparativo dos resultados de KPFM para às respectivas funções trabalho do FPLA e do FPLAG. Verificou-se uma diminuição no valor da função trabalho do FPLAG em relação ao FPLA (5,02eV e 15,99eV, respectivamente), o que pode ser traduzido em uma menor energia necessária para que um elétron seja removido da superfície do material, chegando ao valor bem próximo obtido para o grafeno, que é de 4,4eV [104].

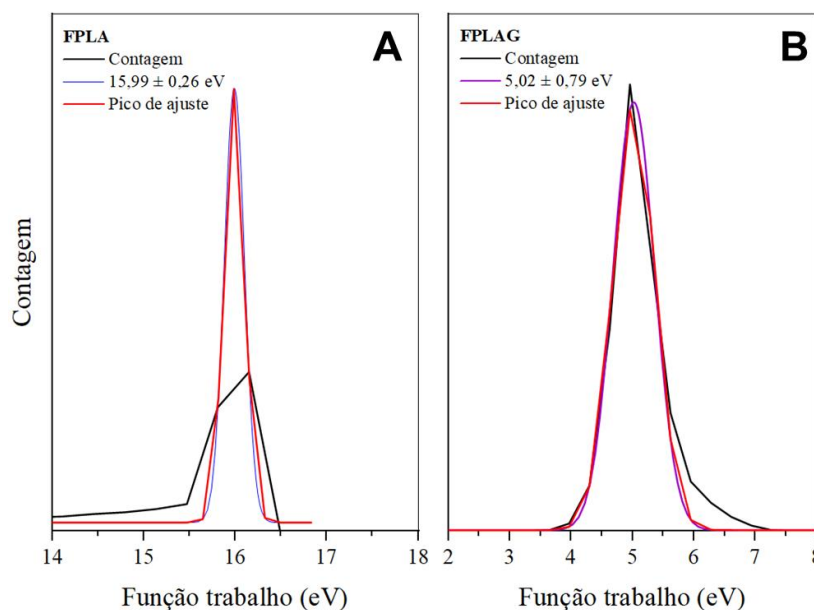


Figura 20: Dados de KPFM. As figuras (A) e (B) apresentam, respectivamente, a função trabalho das amostras FPLA e FPLAG obtidas a partir da técnica de KPFM. Em ambas as figuras observa-se a curva em vermelho, que corresponde ao pico de ajuste (distribuição normal), e a contagem (linha preta) que refere-se ao número de regiões varridas em cada amostra.

Alguns trabalhos sugerem que, a inserção de materiais com boa condutibilidade elétrica e térmica, como o grafeno, à uma matriz polimérica, pode gerar alterações na distribuição das cargas presentes o material [45], [46], [54], o que poderá resultar em mudanças na função trabalho, visto que a presença do grafeno pode criar interfaces elétricas ou modificações na estrutura da superfície, que irão afetar a energia de ligação dos elétrons, ocasionando mudanças na função trabalho do material compósito final [105].

As alterações observadas na função trabalho podem resultar em algumas consequências, incluindo mudanças nas propriedades de transporte de carga, na adesão de células e na forma que o material irá interagir com seu ambiente [106]. Portanto, a adição de grafeno ao PLA, pode oferecer novas possibilidades para modificar e melhorar as propriedades

deste material, visando o seu uso em aplicações específicas por meio da modulação de suas propriedades.

4.1.5. Ensaios *in-vitro*

Os ensaios *in-vitro* são experimentos realizados fora do organismo vivo, com o objetivo de estudar fenômenos biológicos, farmacológicos ou químicos [107]. Esses ensaios são importantes para entender como substâncias interagem com células, tecidos ou sistemas biológicos isolados [108], [109], sem a complexidade e as variáveis associadas a um organismo vivo completo. Estes ensaios são amplamente utilizados na pesquisa científica para auxiliar, por exemplo, no desenvolvimento de medicamentos, permitindo testes preliminares de segurança e eficácia antes de avançar para estudos em animais ou humanos.

Os estudos em SBF (do inglês *Simulated Body Fluid*) em biopolímeros como o PLA são essenciais para avaliar sua biocompatibilidade, degradabilidade, formação de hidroxiapatita (HA) ($Ca_5(PO_4)_3OH_{(s)}$) e o desempenho mecânico do material em condições que simulam o ambiente fisiológico humano, contribuindo assim para o desenvolvimento de materiais biomédicos seguros e eficazes. Ainda sob essa perspectiva, os estudos de cultura de célula também são de grande importância no processo para compreender os mecanismos de interação entre diferentes tipos de células com a superfície de biopolímeros como o PLA, por exemplo, tornando possível otimizar seu uso em aplicações específicas.

4.1.5.1. Imersão em SBF

Os ensaios de imersão em SBF realizados nas amostras de FPLA e FPLAG tiveram como finalidade verificar o suposto comportamento do material quando inserido no organismo. Neste sentido, visando verificar a potencialidade do material para uso em aplicações no qual a ossointegração é um fator importante, o ensaio também objetivou analisar a capacidade do material em atuar como suporte para o crescimento de cristais de HA. Além disso, o ensaio de imersão em SBF teve por objetivo auxiliar na compreensão das possíveis alterações relacionadas a degradabilidade do PLA devido a adição do grafeno em sua estrutura.

A Figura 21 mostra o difratograma das amostras após a realização do ensaio de imersão dos corpos de prova em SBF. Como é possível observar, o pico em $\approx 16,6^\circ$ sofreu alteração,

tanto para a amostra FPLA quanto para a FPLAG. A literatura mostra que o PLA apresenta polimorfismo com três fases principais, estas são: fases α , β , e γ [89]. Os picos $2\theta \approx 16,6^\circ$ e $\approx 19,1^\circ$ são característicos da fase α , e podem sofrer um certo grau de desordem influenciada pela temperatura [89]. Tendo em vista que as amostras estavam imersas a uma temperatura de $36,5^\circ\text{C}$ por um longo período, esse pode ser o fator responsável pela variação observada no difratograma de FPLA e FPLAG após o SBF, uma vez que, como observado por YU, Wangwang e colaboradores [90], o grau de cristalinidade do PLA pode aumentar com a temperatura.

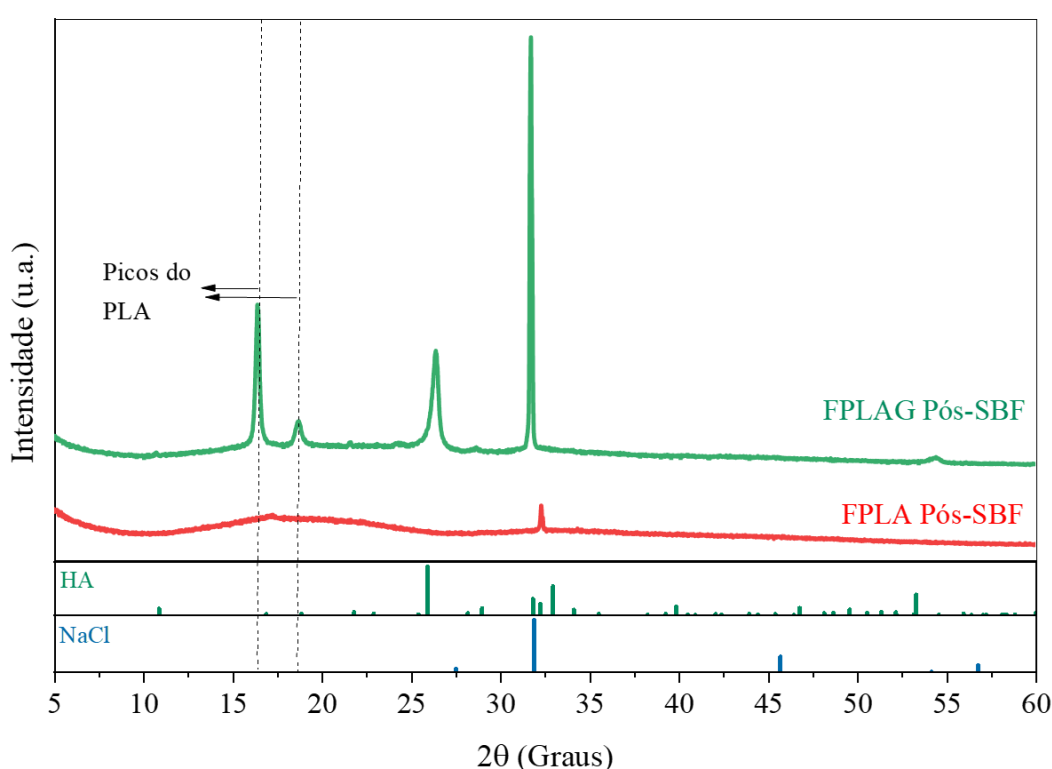


Figura 21: Difratograma das Amostras FPLA e FPLAG após ensaio de imersão em SBF. Nota-se o surgimento de picos em ambas as amostras. Para melhor comparação, são apresentados os picos tanto da HA, quanto do NaCl.

Observa-se ainda que, ambas as amostras (FPLA/FPLAG) apresentam um pico com intensidade elevada por volta da posição $2\theta \approx 32,1^\circ$ (Fig. 21). A partir da análise do difratograma, dois materiais foram considerados como possíveis responsáveis por tal assinatura: a Hidroxiapatita (HA, de fórmula química $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$) e o Cloreto de Sódio (NaCl). Posteriormente, com base nos dados de MEV-EDS (Seção 4.1.6), foi verificado que essa assinatura observada em $2\theta \approx 31,76^\circ$ para a amostra FPLA, e $2\theta \approx 32,36^\circ$ para a amostra FPLAG, corresponde a HA.

Para garantir um maior controle do experimento, uma série de parâmetros dos corpos de prova foram levadas em consideração antes do início dos testes. Os respectivos valores de massa, e as dimensões de cada amostra estão dispostas nas Tabela 4.

Tabela 4: Parâmetros das amostras de PLA e PLAG antes da imersão em SBF.

Parâmetros das Amostras Antes da Imersão em SBF		
<i>Massa das Amostras (g)</i>	FPLA	0,45408
	FPLAG	0,32661
<i>Dimensões das Amostras Antes do SBF (mm)</i>		
	FPLA	FPLAG
<i>Comprimento</i>	10,18	10,08
<i>Largura</i>	9,96	9,85
<i>Espessura</i>	4,02	2,68

Além disso, foi realizado o polimento das amostras afim de padronizar a superfície e de reduzir a presença de impurezas que poderiam influenciar nos resultados do experimento. A Figura 22 mostra a superfície das amostras FPLA (Fig. 22B) e FPLAG (Fig. 22A) antes da realização do polimento. Este procedimento é realizado tendo em vista que a rugosidade das amostras em estudos de imersão em SBF pode ser significativa, pois a rugosidade superficial pode afetar a interação entre o material polimérico e o SBF, assim como a taxa de degradação e a formação de HA [37], [39].

Como já referido na descrição da metodologia empregada no teste de imersão em SBF, todo o processo foi monitorado diariamente por meio da medição do pH da solução. A Figura 23 apresenta o gráfico comparativo da variação do pH observada na solução na qual as amostras de FPLA e FPLAG, estavam imersas durante o período de 28 dias. Apesar das flutuações observados no gráfico, a inclinação da reta de ajuste linear mostra um aumento progressivo nos valores de pH, indicando uma maior disponibilidade de íons OH , fator que favorece a formação de HA, que foi constatado posteriormente a partir da análise de MEV/EDS (Seção 4.1.6). A diminuição acentuada no valor do pH observadas nos primeiros 8 dias de imersão pode ser associada a uma maior taxa de trocas iônicas, visto que o sistema busca a estabilidade. Uma vez que o ponto de saturação é alcançado, as trocas iônicas são cessadas, e o sistema passa a apresentar uma maior estabilidade, possibilitando a precipitação das fases de HA.

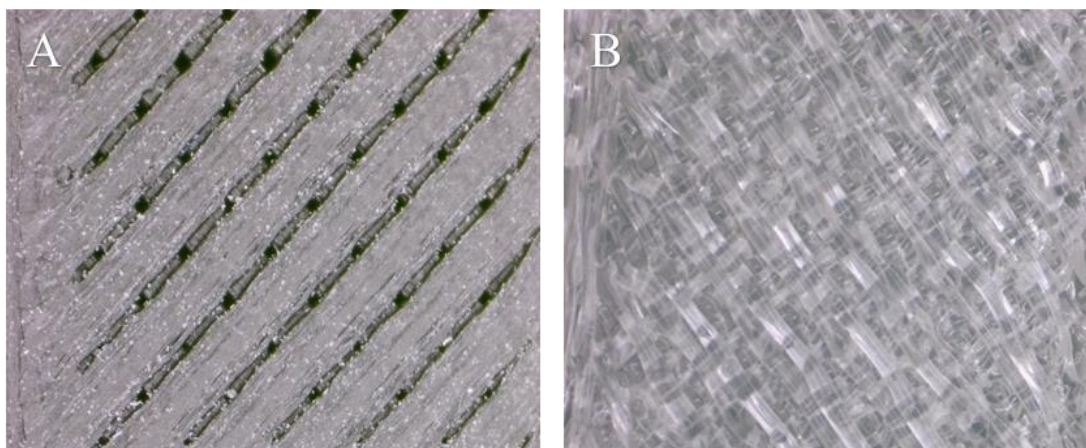


Figura 22: *Superfície das Amostras Impressas de FPLA/FPLAG Antes do Polimento.* Imagens de microscópio ótico da superfície das amostras PLAG (A) e PLA (B), antes do procedimento de polimento com lixas de carbeto de silício.

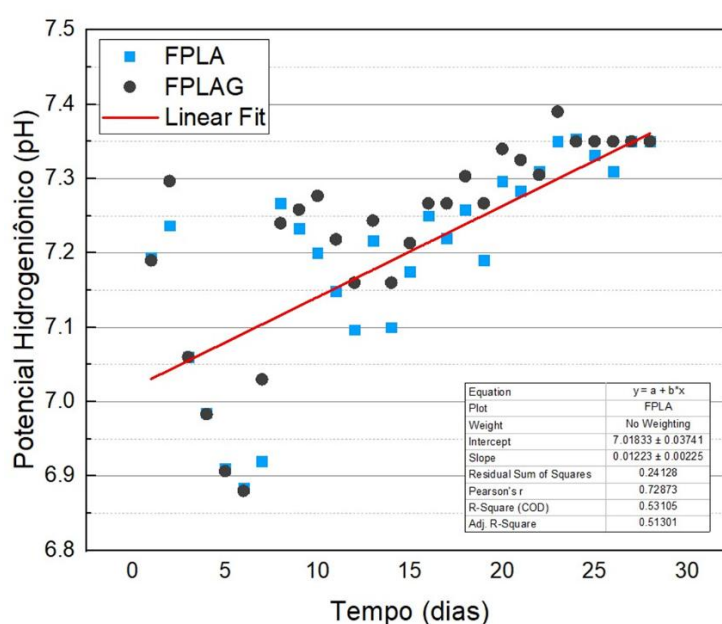


Figura 23: *Variação do pH da Solução de SBF.* Gráfico comparativo dos valores de pH medidos durante os 28 dias de imersão em SBF para ambas as amostras.

Após a realização dos testes em SBF, foram novamente tomadas as medidas das respectivas massas e dimensões dos corpos de prova. Não foram observadas variações significativas tanto nos valores das massas, quanto nas dimensões das amostras, o que pode ser atribuído ao fato do PLA utilizado para a produção dos filamentos apresentar um certo grau de cristalinidade. Como mostrado por Peterson, Gregory I. e colaboradores [110], esse é um fator crucial para o controle da taxa de degradação do material. No caso do PLA semicristalino, esse

processo é bastante demorado, podendo levar de 2 a 5 anos para alcançar a degradação completa [110].

Tabela 5: Comparativo do peso das Amostras FPLA e FPLAG antes e após a imersão em SBF.

Peso das Amostras Antes da Imersão em SBF (g)	
FPLA	0,45408
FPLAG	0,32664
Peso das Amostras Após a Imersão em SBF (g)	
FPLA	0,45452
FPLAG	0,32721

Após a imersão, as amostras foram cuidadosamente removidas e secas, para que posteriormente fossem levadas para a caracterização por DRX (estes resultados foram apresentados e discutidos anteriormente na Seção 4.1.1). A Figura 24 mostra a superfície das duas amostras logo depois do fim dos testes em SBF. Na amostra de FPLAG (Fig. 24D), foi observada uma alteração na coloração da superfície do material, que se tornou mais esbranquiçada. A amostra de PLA também apresentou uma alteração em sua cor, passando de transparente (Fig. 24A), antes do início dos testes, para esbranquiçada (Fig. 24B). Como observado por Bae, Ji-Young e colaboradores [111], em seu estudo envolvendo o bombardeamento de PLA com partículas de HA, essa variação na cor pode estar associada a alterações na composição da superfície da amostra, ou simplesmente devido a formação de sal na estrutura.

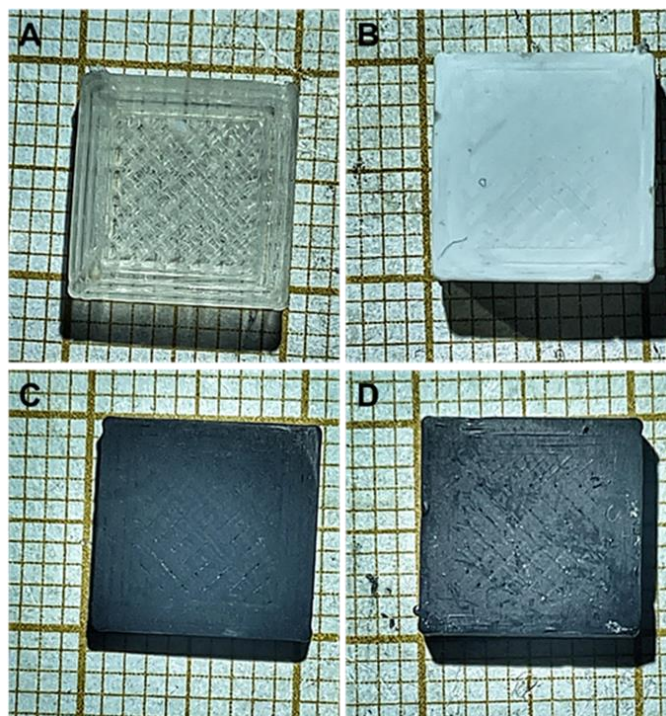


Figura 24: Imagens de Microscopia Óptica da Superfície das Amostras FPLA/FPLAG. Superfície das amostras de FPLA (A) e FPLAG (C) após o polimento com lixas de carbeto de silício. As imagens (B) e (D), mostram, respectivamente, a superfície das amostras de FPLA e FPLAG após o período de imersão em SBF.

4.1.5.2. Cultura de Células

Com o intuito de verificar a potencialidade de aplicação das amostras FPLA e FPLAG como interface para o crescimento de células, um ensaio de crescimento celular foi previamente realizado. Neste primeiro estudo, células controle foram cultivadas na superfície de ambas as amostras, e observou-se que, para ambas, as células apresentaram uma taxa de crescimento considerada boa, com aproximadamente 121 células na superfície da amostra FPLA, e 264 para a amostra FPLAG. A Figura 25 apresenta um comparativo entre a superfície de ambas as amostras após a realização dos ensaios. Como já referido anteriormente, a membrana celular é rica em íons, como íons Potássio (K^+) e íons Sódio (Na^+) [112]. Devido à presença destes íons, ocorre uma polarização da membrana, gerando um acúmulo de cargas na parte interna e externa. Em geral, células saudáveis apresentam uma carga líquida positiva, neste aspecto, e tendo em vista a presença de cargas negativas na amostra FPLAG, o maior número de células presentes nesta amostra pode refletir uma maior afinidade com a superfície, entre outros fatores, devido a atração de origem eletrostática.

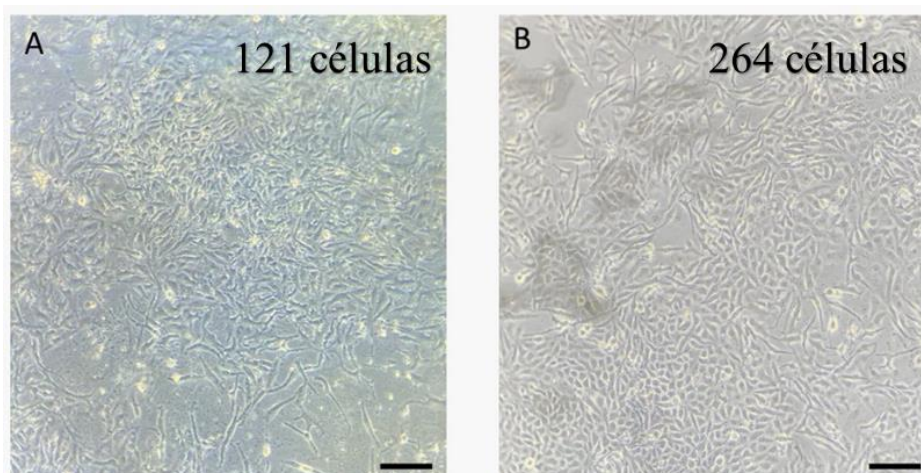


Figura 25: Crescimento Celular Sobre a Superfície das Amostras FPLA/FPLAG. Comparativo das amostras de PLA (A) e PLAG (B) após o ensaio de cultura de células controle. Escala: 100 μ m.

Os testes de viabilidade celular sobre as superfícies das amostras de FPLA e FPLAG são mostrados na Figura 26. Como é possível observar para o controle negativo (poços de cultivo celular convencionais), as células tumorais (linhagem ACP-03, células tumorais de intestino) apresentam uma maior taxa de crescimento quando comparada às células controle (linhagem MN01, que são células de intestino não tumorais), uma característica natural das células cancerígenas [113], que tem maior taxa de proliferação e mobilidade. Para as amostras FPLA, é observada a mesma tendência obtida com o controle negativo, com as células tumorais apresentando uma maior afinidade com a superfície do material, refletindo em uma maior taxa de proliferação destas células. Já para a amostra FPLAG, observa-se uma tendência contrária, com as células do grupo controle apresentando uma maior taxa de crescimento, enquanto às células da linhagem ACP-03 apresentam menor afinidade com a superfície deste material e tendo seu crescimento inibido em 32%.

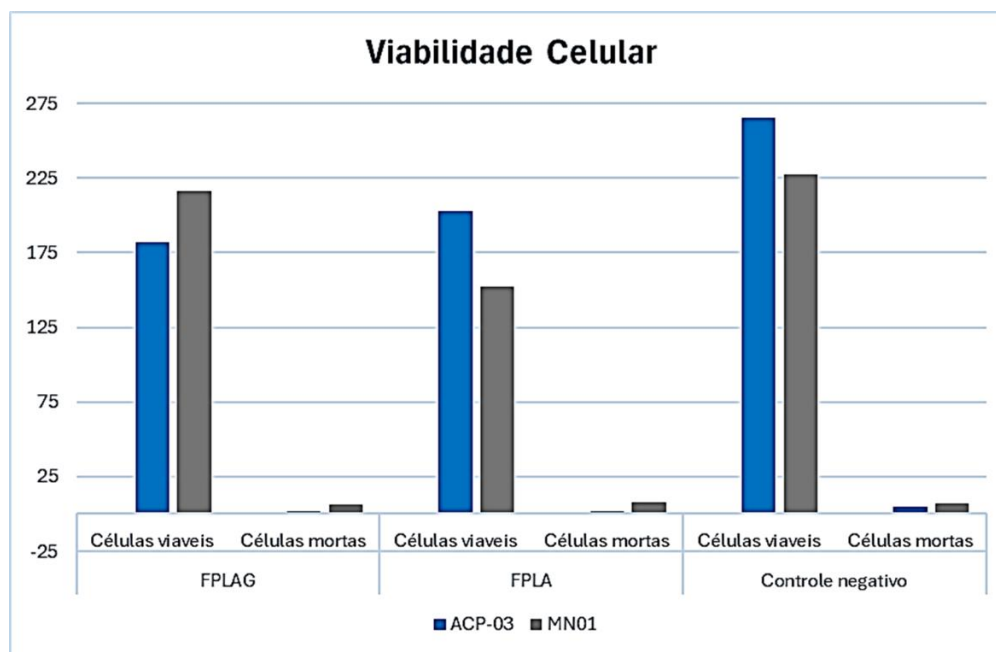


Figura 26: Teste de Viabilidade Celular das Amostras FPLA e FPLAG. A partir dos ensaios de viabilidade celular, observa-se que as células da linhagem tumoral (ACP-03) apresentam uma maior afinidade com a superfície da amostra FPLA. Em contrapartida, observa-se o inverso para a amostra FPLAG. Uma vez que as cargas desempenham papel fundamental na interação entre as células e a superfície do material, esse comportamento pode ser atribuído à inversão de cargas no material devido a inserção do grafeno em sua estrutura.

A viabilidade celular é influenciada por uma série de fatores característicos do material, como por exemplo a rugosidade, composição química, e às cargas de superfície. Como destacado por Metwally, Sara e Stachewicz, Urszula [21], às cargas superficiais possuem uma contribuição bastante significativa para a adesão e posterior desenvolvimento das células. Uma vez que a superfície do PLA pode apresentar uma carga líquida positiva devido a presença de grupos funcionais em sua composição [114], [115], e tendo em vista que células tumorais, em geral, apresentam uma carga líquida negativa por conta de alterações em suas proteínas de membrana [101], a maior viabilidade celular da linhagem ACP-03 observada para a amostra FPLA pode ser atribuída a maior afinidade de cargas, o que resulta em uma maior grau de adesão/proliferação destas células.

Em contrapartida, a inserção do grafeno à estrutura polimérica promove uma alteração na carga líquida do material, tornando-a negativa. Essa característica pode ser atribuída ao caráter negativo do grafeno, principalmente devido à grande disponibilidade de elétrons dos orbitais- π , que estão dispostos paralelamente ao plano basal do material [54]. Sendo assim, uma vez que a superfície do material passa a ser negativa, irá surgir uma repulsão eletrostática

com as células tumorais, o que irá desfavorecer a sua adesão e proliferação. Já às células controle, por possuírem cargas de membrana oposta, irão apresentar maior afinidade com a superfície. Este resultado demonstra, também, a capacidade de seletividade e diferenciação celular do material.

4.1.6. Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) e Espectroscopia de Energia Dispersiva por Raio X (EDS)

Tendo em vista às possíveis correlações entre a microestrutura do material e suas propriedades macroscópicas, a análise investigativa com o intuito de verificar a presença de alterações na estrutura microscópica pode ser fundamental para predizer como estas mudanças influenciam nas propriedades do material. Neste aspecto, a técnica de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) demonstra uma enorme vantagem quando comparado com a microscopia óptica, por exemplo, visto que o seu nível de ampliação é consideravelmente maior. Utilizada em conjunto com o MEV, a técnica Espectroscopia de Energia Dispersiva (EDS) é uma ferramenta eficaz para determinação precisa da composição química do material analisado.

A Figura 27 mostra a fotomicrografia das amostras FPLA e FPLAG polidas (antes da imersão em SBF) obtidas a partir do MEV, além dos seus respectivos mapas composicionais e seus espectros EDS. Verifica-se que a superfície de ambas as amostras apresenta elevado grau de similaridade, exibindo apenas pequenos defeitos (regiões claras), que podem ser atribuídos ao processo de polimento. As marcações em ambas as fotomicrografias indicam a região na qual as análises de EDS foram realizadas.

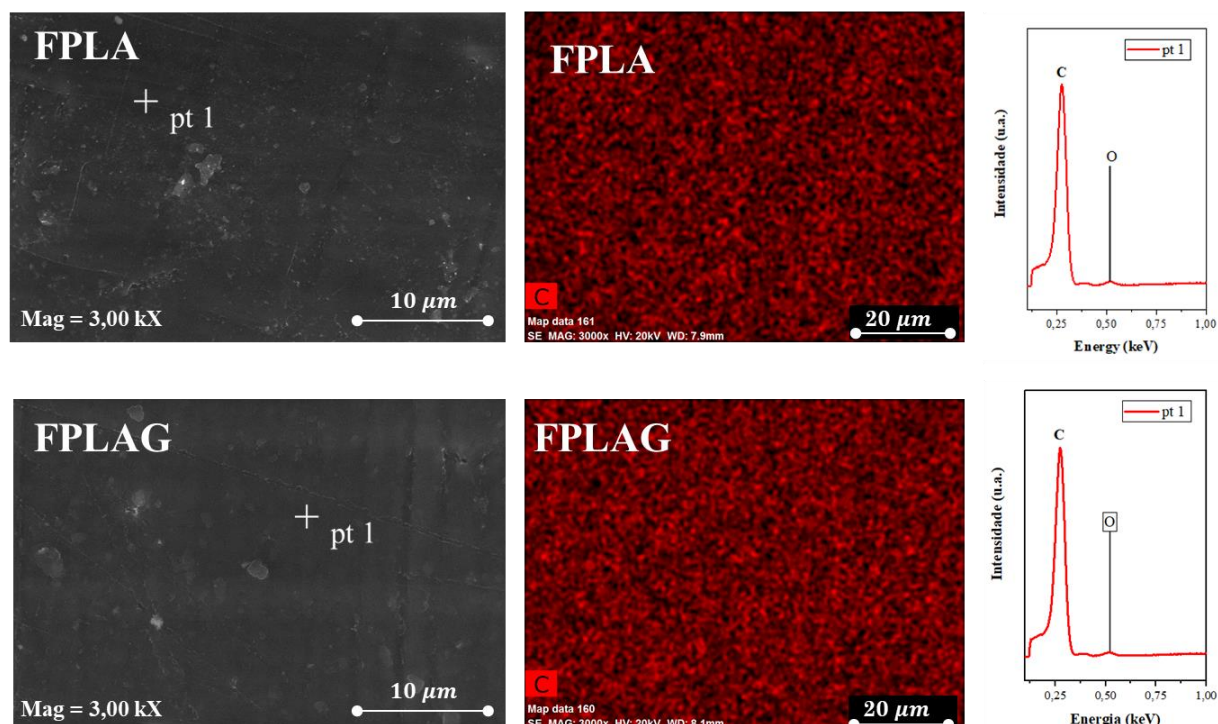


Figura 27: Fotomicrografia, Mapas Composicionais e Espectros EDS das amostras FPLA/FPLAG. Imagens de MEV da superfície das amostras FPLA e FPLAG antes da imersão em SBF, e seus respectivos mapas composicionais, além dos espectros EDS.

A partir da microanálise, verificou-se a presença de dois elementos na composição das amostras FPLA e FPLAG: Carbono (C), em maior teor, e oxigênio (O). A presença de carbono na composição química de ambas as amostras pode ser atribuída tanto ao ácido polilático ($((C_3H_4O_2)_n)$), quanto ao grafeno, para a amostra FPLAG. Já o oxigênio, em menor teor, se deve a presença de grupos éteres e hidroxila na estrutura química do ácido láctico [31].

As informações obtidas a partir da técnica MEV/EDS são importantes para complementar os resultados já obtidos por meios de outras técnicas. Como observado anteriormente na Seção 4.1.1, os difratogramas obtidos após a imersão em SBF das amostras FPLA/FPLAG, apresentaram picos próximos às regiões características do $NaCl$, e da hidroxiapatita (HA). A partir da fotomicrografia e da análise composicional das amostras por meio do EDS, foi possível confirmar a presença de hidroxiapatita em ambas as amostras.

A Figura 28 mostra os resultados de MEV/EDS obtidos para a amostra de PLA puro (FPLA) após o período de imersão em SBF. Como é possível observar na fotomicrografia, houve a formação de partículas esféricas na superfície da amostra, que podem ser atribuídas a HA [116], [117]. Os dados de EDS indicaram a presença de Cálcio (Ca) e Fósforo (P), um indicativo de que se trata de hidroxiapatita, e não de Cloreto de Sódio, que também apresenta

assinatura devido à resíduos que permaneceram após a etapa de limpeza, que ocorreu após a retirada das amostras da solução de SBF.

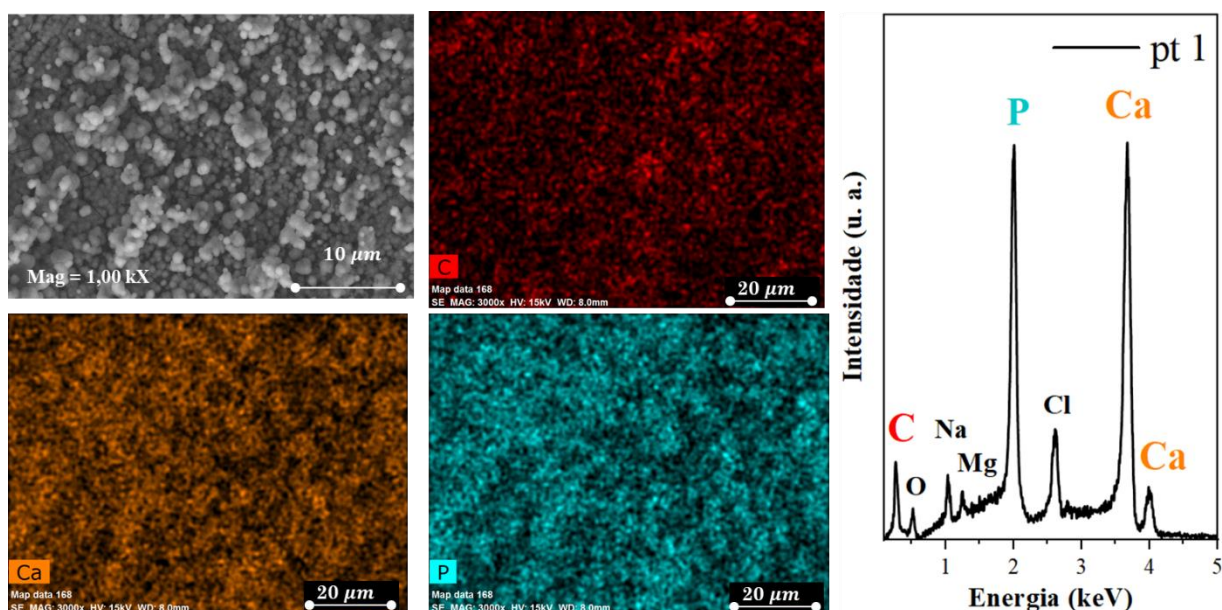


Figura 28: Dados de MEV/EDS amostra FPLA após SBF. Fotomicrografia e mapas composicionais da amostra FPLA após a imersão em SBF. Verifica-se a presença de partículas esféricas na superfície da amostra, além de Cálcio e Fósforo na composição, indicando a formação de HA.

A Figura 29 apresenta os resultados de MEV/EDS para a amostra FPLAG após a imersão em SBF. Semelhante ao observado anteriormente para a amostra de PLA puro, também ocorreu o crescimento de cristais em formato esféricos de HA, o que pode ser confirmado a partir dos resultados de EDS, que indica a presença de Cálcio (Ca) e Fósforo (P) na composição química.

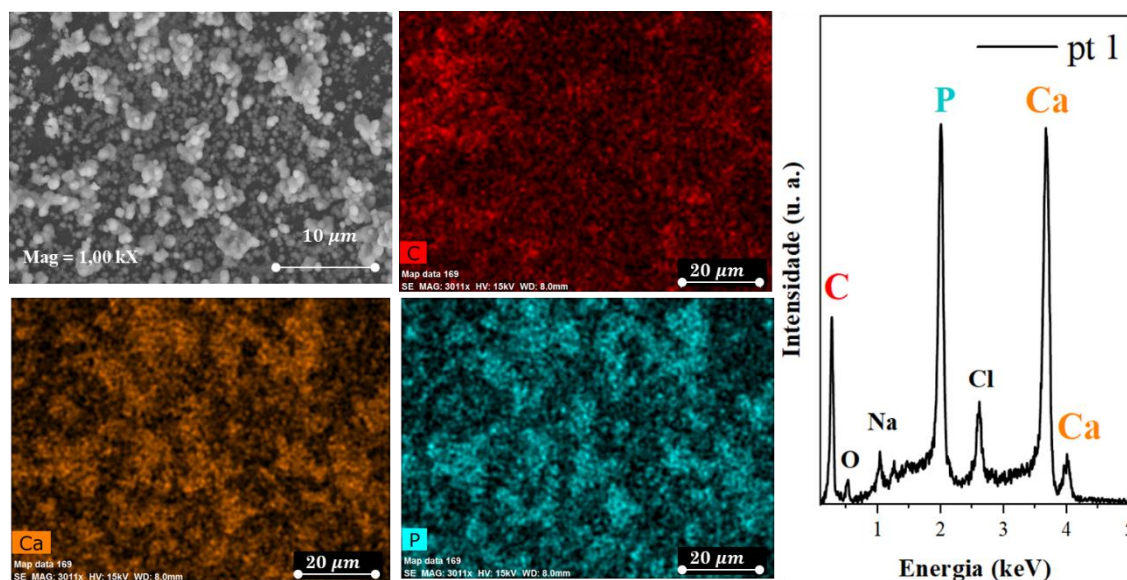


Figura 29: Dados de MEV/EDS amostra FPLAG após SBF. Fotomicrografia e mapas composicionais da amostra FPLAG após a imersão em SBF. Semelhante ao observado anteriormente para a amostra PLA pura, constata-se a presença de partículas esféricas na superfície da amostra, além de Cálcio e Fósforo na composição, indicando a formação de HA. Para o espectro EDS, verifica-se o aumento da intensidade do pico associado ao elemento carbono, que pode ser associado ao grafeno presente na estrutura do material.

Fatores como pH da solução, temperatura, e a presença de íons específicos, influenciam fortemente nos mecanismos crescimento dos cristais de HA na superfície dos materiais [53]. Neste contexto, as superfícies das amostras de FPLA e FPLAG se mostraram como uma ótima plataforma para promover a nucleação, e subsequente crescimento de microcristais esféricos de HA quando imersas em solução de SBF. Essa característica pode ser associada a estrutura molecular dos polímeros, que pode atuar como um agente regulador de nucleação, induzindo a orientação e o crescimento dos cristais de HA, característica já observada para a Polivinilpirrolidona (ou PVP) [118], e para o Polietileno Glicol (PEG) [119].

É notável que a forma dos cristais de HA pode influenciar nas características de superfície, e também na bioatividade do material [120]. Portanto, um maior controle sobre a geometria dos cristais de HA garante a maior possibilidade de expansão de suas aplicações. Do ponto de vista de aplicações biomédicas, como o uso para transporte de medicamentos, os microcristais de HA em sua forma esférica são vistos de forma especial, principalmente por conta de sua maior área superficial [121], [122], logo, maior capacidade carreamento de fármacos. Sendo assim, as superfícies das amostras de FPLA e FPLAG, podem ser observadas como uma “plataforma” favorável para o crescimento de cristais esféricos HA. Neste sentido,

tendo em vista o crescimento ordenado dos cristais esféricos de HA, as amostras FPLA e FPLAG podem ser vistas como plataforma para o crescimento destes cristais, que posteriormente podem ser retirados da superfície e utilizados para a aplicação citada anteriormente.

A formação de HA na superfície de biopolímeros, como o PLA, pode ser vista como um fator positivo que favorece, por exemplo, a utilização destes materiais em aplicações no qual a osseointegração é um fator importante. Além disso, tendo em vista a maior facilidade de processamento, e a capacidade de se obter peças com arquiteturas complexas e elevado grau de resistência mecânica por meio das técnicas de manufatura aditiva [3], podemos destacar o uso destes materiais para a produção de parafusos, implantes ósseos, *scaffolds*, e outros dispositivos direcionados a aplicações biomédicas.

4.1.7. Microdureza Vickers (MV)

A Figura 30 mostra o gráfico comparativo da Microdureza Vickers (MV) das amostras de PLA puro (FPLA), e FPLAG. Os valores médios observados para cada amostra, FPLA e FPLAG, são respectivamente, 17,4 ($\pm 1,48$ HV 0,05) e 21,8 ($\pm 8,79$ HV 0,05), no qual HV refere-se a carga aplicada em quilograma-força (kgf). Neste caso, foi aplicada uma carga de 0,05 kgf. Observa-se um aumento na microdureza da amostra de FPLAG, o que pode ser relacionada a capacidade do grafeno, e seus derivados, em atuar como um “nanopreenchedor”, capaz de otimizar as propriedades mecânicas, quando incorporados na matriz polimérica [123]. Devido ao seu caráter bidimensional, e consequente alta razão área-volume, e o fato de possuir uma estrutura planar, a característica do grafeno de atuar como ótimo nanopreenchedor pode ser atribuída a habilidade deste material em formar interfaces de interação com a matriz polimérica, que podem ser bastante fortes [124], principalmente devido a presença de grupos polares em suas cadeias [125]. Por conta disso, a transferência e a dissipação de estresse mecânico por meio da matriz do material ocorrem de maneira mais efetiva, garantindo uma maior dureza e resistência mecânica ao compósito.

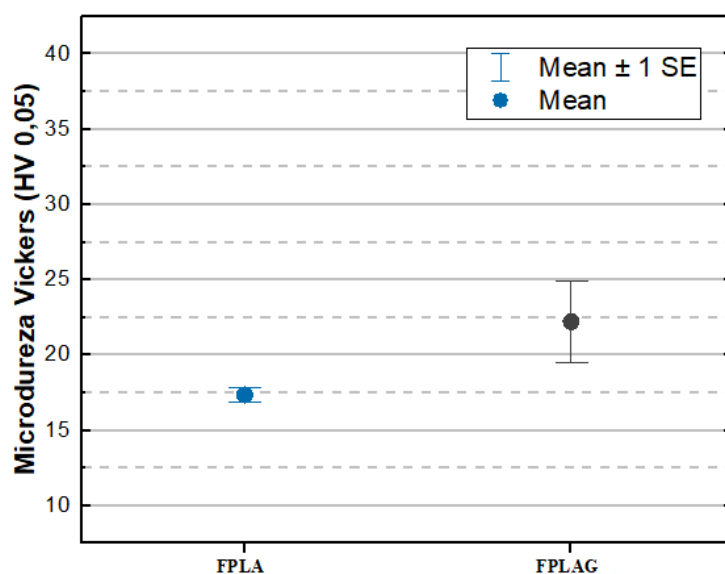


Figura 30: Microdureza Vickers das Amostras FPLA/FPLAG. Gráfico comparativo dos ensaios de Microdureza Vickers das amostras FPLA puro, e FPLAG. Observa-se um aumento na dureza da amostra PLAG, o que pode ser atribuído à presença do grafeno na forma de nanopartículas.

A interação interfacial entre as cadeias poliméricas e o grafeno desempenham um papel chave para definir as propriedades do compósito [126], [127]. Por conta da natureza composicional do grafeno, e devido à disposição espacial dos átomos de carbono que constituem a estrutura cristalina do material, a interação com as moléculas que constituem as cadeias poliméricas está limitada às forças de Van der Waals, empilhamento- π , e interações hidrofóbicas [128], [129]. Portanto, devido a formação de ligações químicas entre o grafeno com a matriz de PLA, ocorre um aprimoramento das propriedades mecânicas do material, o que pode ser visualizado a partir do aumento de sua dureza. O resultado obtido corrobora para o potencial uso deste material em aplicações biomédicas, no qual uma maior resistência mecânica é necessária, como para a produção de parafusos e implantes, uma vez que os valores de MV observados para as amostras FPLA e FPLAG, se aproximam da dureza do chamado osso esponjoso (osso trabecular) de algumas regiões do corpo [130].

Na próxima seção, será dada continuidade com a apresentação e a discussão dos resultados observados para as amostras de resina. De maneira semelhante ao apresentado nesta seção, serão abordados os aspectos composicionais das amostras, por meio das técnicas de DRX, ER e MEV/EDS, bem como as suas propriedades nanomecânicas por meio da técnica de AFM. Além disso, serão discutidos os resultados dos ensaios *in-vitro* de imersão em SBF, e viabilidade celular das amostras.

4.2. Parte 2 – Caracterizações do Grafeno

4.2.1. Difração de Raios X (DRX)

O grafeno obtido a partir das diferentes rotas desenvolvidas também foram caracterizadas por meio da técnica de DRX. A Figura 31 apresenta o difratograma das amostras de grafeno obtidas por meio das rotas adaptadas, entre as quais a principal diferença se deve ao tipo de precursor (grafite) utilizado para o processo de esfoliação eletroquímica. Análises utilizando DRX foram realizadas para avaliar a eficácia do processo de esfoliação das camadas de grafite. Os picos $2\theta \approx 26,6^\circ$ e $54,4^\circ$ são característicos da estrutura do grafite, correspondendo aos planos 002 e 004, respectivamente [131], [132], [133]. Os diferentes tipos de grafite que foram utilizados como ânodos na célula eletrolítica para as rotas se diferem pela concentração de argila empregadas no compósito de “grafite + argila”. Devido à sua estrutura bidimensional, o grafeno exibe um padrão de difração de raios X diferente do grafite, como é possível observar na figura abaixo.

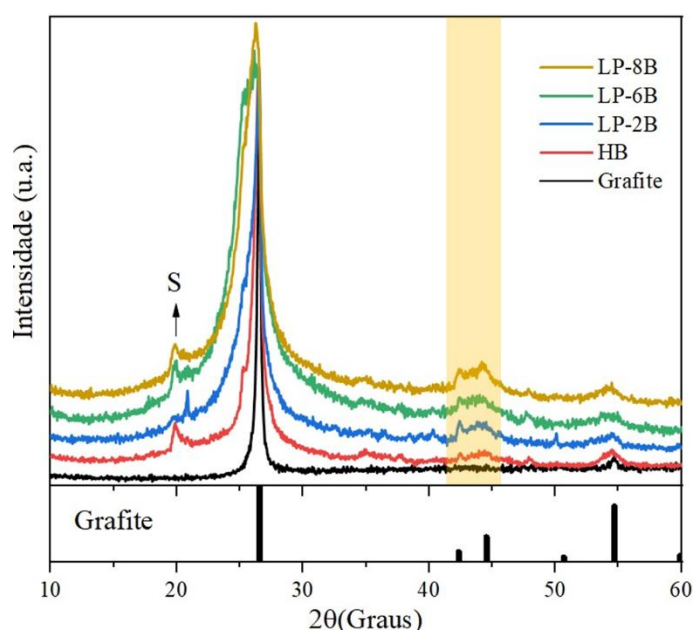


Figura 31: **Difratograma do Grafeno.** Comparativo dos difratogramas das amostras de grafeno sintetizados a partir do método de esfoliação eletroquímica utilizando diferentes precursores, e variações no procedimento de limpeza do material.

Ainda na Figura 31, a seta com a letra S aponta para o pico $2\theta \approx 19,8^\circ$ que corresponde ao enxofre (S_{18}) de estrutura ortorrômbica e grupo espacial P212121. Aqui, apresentamos a hipótese de que, como foram realizadas sucessivas lavagens na síntese do grafeno, esse enxofre pode estar ligado à sua estrutura. Esse fato pode ser corroborado pois o pico $2\theta \approx 26,6^\circ$ está levemente deslocado de sua posição. Yadav, Rohit e colaboradores mostraram que síntese de grafeno funcionalizado com nitrogênio é certificada por meio da mudança de posição de pico do plano (002) [134]. Devido ao amorfismo sofrido por conta do surgimento das bordas e defeitos no plano basal, o grafeno geralmente produz picos de difração mais largos, enquanto o grafite exibe picos mais estreitos e intensos [133].

A característica do grafite de apresentar picos mais intensos quando comparado ao grafeno, pode ser associado à sua estrutura cristalina altamente ordenada [132], [133], uma vez que os defeitos no plano basal, e nas bordas das camadas de grafeno, são interpretados como uma diminuição do grau de cristalinidade do material, que também pode ser visualizado a partir do alargamento da base dos picos. Sendo assim, podemos verificar que, conforme a concentração de argila associada ao grafite diminui, os difratogramas das amostras apresentam alargamento nos picos $2\theta \approx 26,6^\circ$ e $2\theta \approx 54,4^\circ$, além de apresentarem um deslocamento para esquerda, podendo esse fato ser atribuído tanto a remoção de impurezas, quanto a uma dissociação mais eficaz das camadas de grafeno, resultando na obtenção de grafeno nanométrico (~ 20 nm) [88]. Uma outra hipótese importante levantada é que não há presença de grupos à base de oxigênio, os quais geralmente apresentam um pico característico por volta de $2\theta = 11,6^\circ$ [135], demonstrando se tratar provavelmente de grafeno puro, e não de óxido de grafeno.

Com base nas condições de síntese e processamento do material, duas fases podem ser observadas no grafeno multicamada, estas são as fases 3R (romboédrica) e 2H (hexagonal), que podem ser enxergadas como fases polimorfas do grafeno multicamadas [136], [137]. A fase 2H, com empilhamento ABA, é a mais comum e encontrada em grafeno obtido por métodos como esfoliação mecânica ou deposição química a partir da fase vapor (CVD). A fase 3R, com empilhamento ABC, é menos comum e pode ser observada sob condições específicas de síntese, como controle preciso durante CVD ou tratamentos térmicos [138]. Estas diferentes configurações de empilhamento afetam significativamente as propriedades eletrônicas e estruturais do grafeno multicamada, e como referido por Low, It-Meng e colaboradores [133],

a presença da estrutura 3R é importante para garantir ao grafeno um caráter semicondutor com *bandgap*⁶ ajustável.

Neste aspecto, os difratogramas das rotas HB, LP-2B, LP-6B e LP-8B apresentam picos em comum na região entre $2\theta = 40 - 62^\circ$, principalmente na região sombreada na Figura 31, que podem ser atribuídos as fases 2H e 3R. Para o grafeno obtido a partir da rota HB, são observados picos mais intensos nas posições $2\theta \approx 54,49^\circ$, e $62,26^\circ$, que podem ser atribuídos, respectivamente, aos planos $2H(004)$, e $3R(10 - 5)$ [138]. Já o difratograma do grafeno obtido por meio da rota LP-2B apresenta picos nas posições $2\theta \approx 42,35^\circ$, que é atribuído ao plano $2H(100)$, $2\theta \approx 44,30^\circ$, associado ao plano $2H(101)$, $2\theta \approx 50,02^\circ$ ($2H(102)$), e o pico em $2\theta \approx 54,59^\circ$, associado ao plano $2H(004)$ [133], [138]. O difratograma do grafeno obtido por meio da rota LP-8B, também apresenta picos mais intensos nas posições $2\theta \approx 42,46^\circ$, $\approx 44,23^\circ$, e $54,39^\circ$, que são atribuídos, respectivamente, aos planos $2H(100)$, $2H(101)$, e $2H(004)$; $3R(006)$ [136].

4.2.2. Espectroscopia Raman (ER)

A Figura 32, mostra o espectro Raman obtido para a amostra de grafeno que foi obtido a partir da metodologia de síntese desenvolvida no decorrer dos experimentos, no qual foi utilizado como agente percussor para esfoliação eletroquímica, o grafite 2B. No gráfico, é possível visualizar os picos que correspondem as bandas G, por volta de 1580 cm^{-1} , e D, por volta de 1370 cm^{-1} [139], além da banda D' , por volta de 1620 cm^{-1} . Também é possível observar uma banda com base ampla, localizado por volta de 2700 cm^{-1} , que é atribuída à banda 2D [88]. As bandas G e D são vistas como uma assinatura dos materiais a base de carbono e estão presentes em todos os hidrocarbonetos poliaromáticos [140]. Estas são características importantes do espectro Raman para grafeno, uma vez que fornecem informações sobre a estrutura do material [93].

⁶ O *bandgap* é a diferença de energia entre a banda de valência e a banda de condução em um material sólido, determinando a quantidade de energia necessária para que um elétron se mova da banda de valência para a de condução.

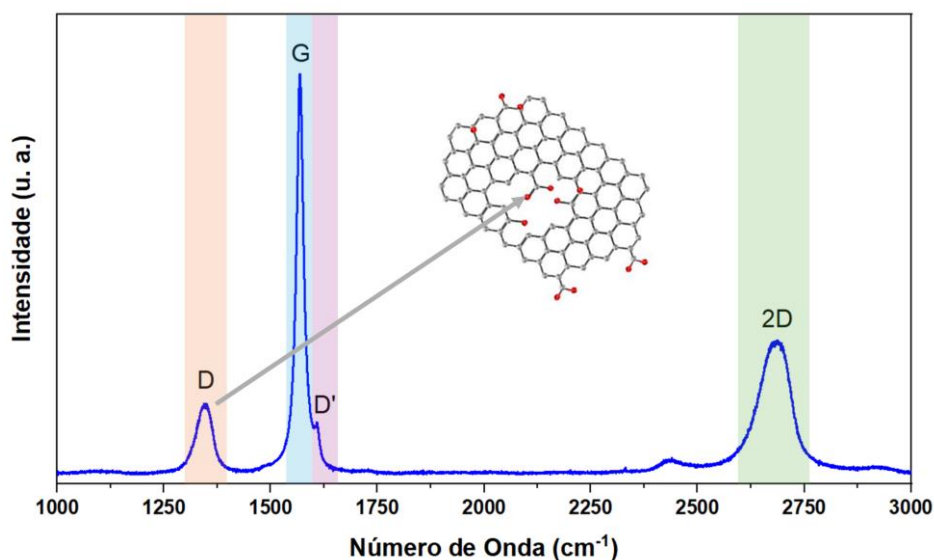


Figura 32: **Espectro Raman do Grafeno.** Espectro Raman para a amostra de Grafeno obtido por meio da metodologia de síntese desenvolvida. Este resultado corresponde a síntese no qual foi utilizado como ânodo (da célula eletrolítica) o grafite de lápis 2B.

A banda G pode ser considerada como a principal banda Raman do grafeno, pelo fato de ser a única banda associada a um espalhamento de primeira ordem [93], sendo atribuída ao estiramento das ligações $C - C$ de pares de átomos presentes na estrutura planar do material, que sofreram hibridização do tipo sp^2 [141]. Como característica, a banda G apresenta uma intensidade elevada, podendo ser um indicativo para a obtenção de um material com alta qualidade estrutural [142]. A banda D, por outro lado, está associada aos chamados modos vibracionais de respiração (ou do inglês *breathing modes*) dos átomos de carbono hibridizados (sp^2) que constituem os anéis aromáticos presentes na estrutura do material [140], [143]. De forma mais direta, a banda D indica a presença de bordas, que são vistas como defeitos, na estrutura no grafeno. Já a banda D' também é originada por defeitos no grafeno, mas ao contrário da banda D, ela não necessita de dupla ressonância para aparecer [93].

Uma vez que a intensidade das bandas G e D variam inversamente com o tamanho do grão cristalino ou com a distância entre defeitos [144], a razão entre a intensidade das bandas D e G (I_D/I_G), é fundamental para aferir a qualidade do grafeno obtido, tornando possível verificar o grau de defeitos (bordas) presente na estrutura do material [54], [55], incluído a presença de grupos funcionais de oxigênio [145]. A partir do resultado obtido, foram tomados os valores das intensidades referente as bandas D e G, obtendo-se, respectivamente 377,46 e 2172,41. Calculando a razão I_D/I_G , chegou-se ao valor de 0.17. Como mostrado por Das, Anindya e colaboradores [146], quanto mais próximo de zero é o valor da razão entre as

intensidade das bandas G e D, maior a qualidade do material. Portanto, este resultado indica que o material obtido apresenta um baixo nível de defeitos ($I_D/I_G < 0,45$) associados à sua estrutura [12], o que se traduz em uma elevada qualidade, o que garante a conservação das propriedades do grafeno.

4.3. Parte 3 – Amostras Produzidas por Impressão 3D Resinas (SLA)

O grafeno obtido por meio do método de esfoliação eletroquímica, foi incorporado à resina PLA (RPLA) em diferentes concentrações, sendo estas 0,1 wt%, 0,2 wt% e 0,3 wt%. As concentrações foram definidas com base no limite de toxicidade do grafeno [147], e pelo fato das amostras, nessas concentrações, apresentarem certo grau de translucidez (Figura 33). Tendo em vista aplicações nas quais o aspecto visual do material é importante, como em aplicações de implantes odontológicos, essa característica é um fator importante.

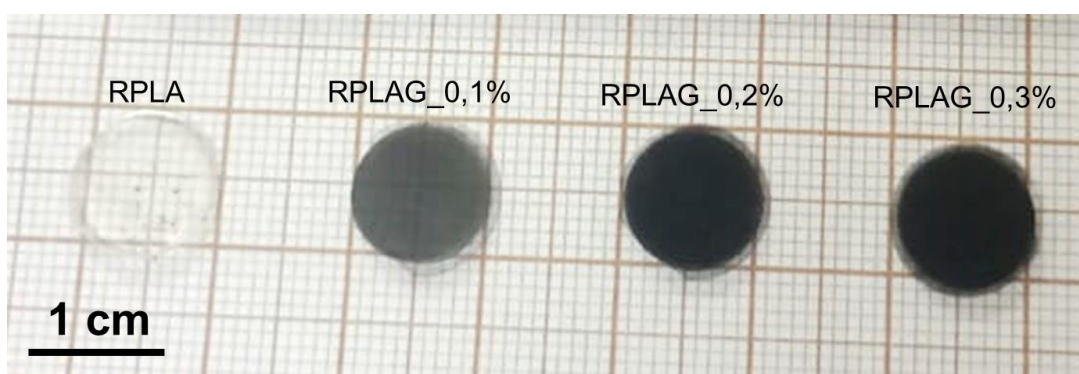


Figura 33: Amostras de Resina PLA. Amostras impressas de resina PLA pura (RPLA) e funcionalizadas com 0,1 wt.%, 0,2 wt%, e 0,3 wt.% de grafeno (RPLAG).

4.3.1. Difração de Raios X (DRX)

A Figura 34 apresenta o difratograma obtidos para as amostras de resina PLA pura (RPLA), e resina PLA funcionalizada com 0,1 wt.%, 0,2 wt.% e 0,3 wt.% de grafeno (RPLAG). Observa-se que ambas as amostras apresentam padrões de difração similares, que varia de $2\theta \approx 10^\circ$ a $\approx 27^\circ$, atribuído ao caráter completamente amorfo da resina PLA [148].

Os difratogramas das amostras RPLA e RPLAG (Figura 34) apresentaram uma variação na intensidade do halo amorfo. Essa característica pode ser atribuída a uma variação no grau de cristalinidade do material [149, p. 14], podendo significar um aumento na organização das cadeias do poliméricas devido a interação interfacial das moléculas constituintes do material com as camadas de grafeno [150].

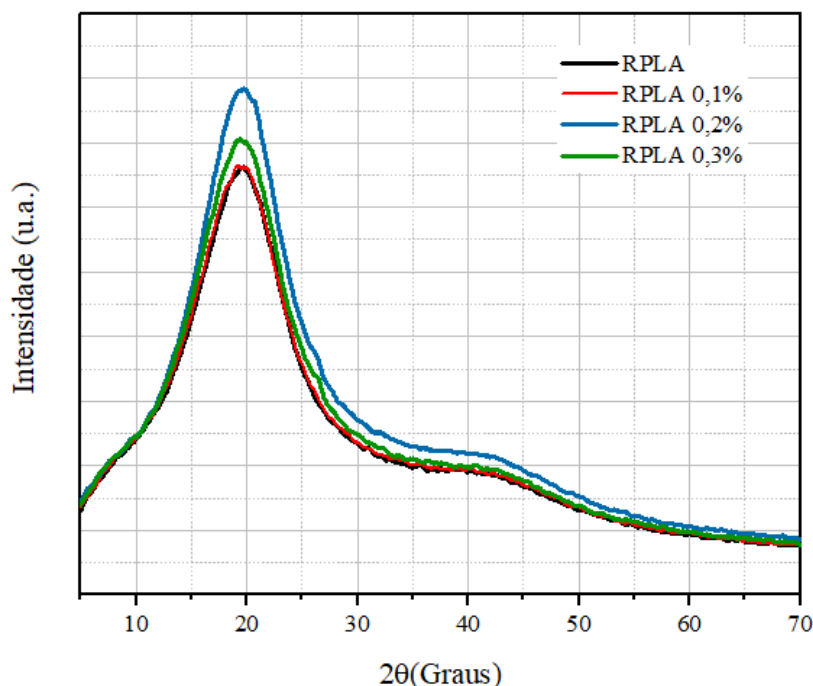


Figura 34: **Difratograma da Resina PLA.** Difratograma das amostras de resina PLA pura, e funcionalizada com diferentes concentrações de grafeno.

4.3.2. Espectroscopia Raman (ER)

A Figura 35 mostra o espectro Raman das amostras de RPLA pura, e RPLA com diferentes concentrações de grafeno. O espectro Raman das amostras aponta bandas em 2935 cm^{-1} e 2880 cm^{-1} , que são atribuídas, respectivamente, ao estiramento das ligações de grupos CH e CH_3 [77], [151]. Já a banda em 1726 cm^{-1} se deve ao estiramento das ligações de grupos $C=O$ [152]. O modo vibracional observado próximo a 1460 cm^{-1} pode ser atribuído a deformação simétrica das ligações de grupos CH_3 [153]. As bandas presentes em 1350 cm^{-1} e 1300 cm^{-1} correspondem a deformação de grupos CH_3 e grupos CH [31], [151]. Já as bandas próximas a 1020 cm^{-1} e 1000 cm^{-1} correspondem, respectivamente, ao estiramento das ligações de grupos $C-CH_3$ e ao estiramento de ligações CC [31]. A banda por volta de 850 cm^{-1} se deve ao estiramento das ligações de grupos éteres [77]. O espectro Raman da amostra RPLA apresenta três modos vibracionais que não são observados para as outras amostras, estes são os modos em $\approx 680\text{ cm}^{-1}$, $\approx 350\text{ cm}^{-1}$ e $\approx 200\text{ cm}^{-1}$. Estes modos podem ser atribuídos, respectivamente, ao estiramento das ligações de grupos carbonila ($C=O$), a deformação das ligações dos grupos $C-CH_3$ e COC , e a torção das ligações CC . A Tabela

6 reúne todos os modos vibracionais característicos dos compostos orgânicos que são observados no espectro Raman das amostras de resina PLA pura e funcionalizada com grafeno.

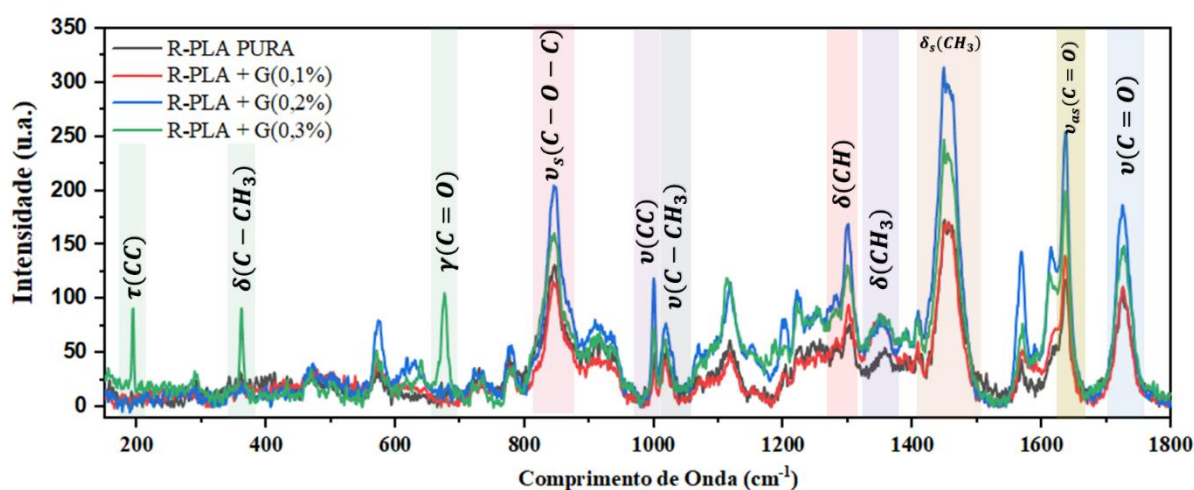


Figura 35: Espectro Raman Resina PLA e PLAG. Espectro Raman das amostras de RPLA e RPLAG caracterizadas após a impressão 3D. Observa-se que ambas as amostras apresentam os mesmos modos vibracionais, diferindo apenas na intensidade de alguns picos. A amostra RPLA + G (0,3%) apresenta ainda três modos vibracionais que não são observados para as outras amostras, que podem ser relacionados a adição do grafeno à estrutura polimérica.

Tabela 6: Modos vibracionais característicos observados para as amostras de resina PLA pura e resina PLA com grafeno.

Assinatura Vibracional	Comprimento de Onda (cm^{-1})
$\nu(\text{CH})$	2935
$\nu(\text{CH}_3)$	2880
$\nu(\text{C}=\text{O})$	1726
$\delta_s(\text{CH}_3)$	1460
$\delta(\text{CH}_3)$	1350
$\delta(\text{CH})$	1300
$\nu(\text{C}-\text{CH}_3)$	1020
$\nu(\text{CC})$	1000
$\nu_s(\text{C}-\text{O}-\text{C})$	850
$\gamma(\text{C}=\text{O})$	650
$\delta(\text{C}-\text{CH}_3)$	350
$\tau^7(\text{CC})$	200

⁷ $\tau(\text{CC})$: torção das ligações CC

4.3.3. Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV-EDS)

A Figura 36 apresenta as fotomicrografias de MEV obtidas para as amostras de resina PLA pura (RPLA), e funcionalizadas com diferentes concentrações de grafeno (RPLAG 0,1, 0,2, e 0,3 wt.%). Nesse grau de magnificação, a superfície das amostras se apresenta uniformes, mostrando que a incorporação do grafeno à estrutura do material não provocou grandes alterações em sua morfologia. Essa característica pode ser observada como um fator positivo para a utilização das resinas otimizadas com grafeno em próteses dentárias, por exemplo, uma vez que a alta homogeneidade do material, somada a uma topografia plana, desfavorece o acúmulo de microrganismos [154] e a abrasão, devido ao estresse mecânico por conta da escovação dentária [155].

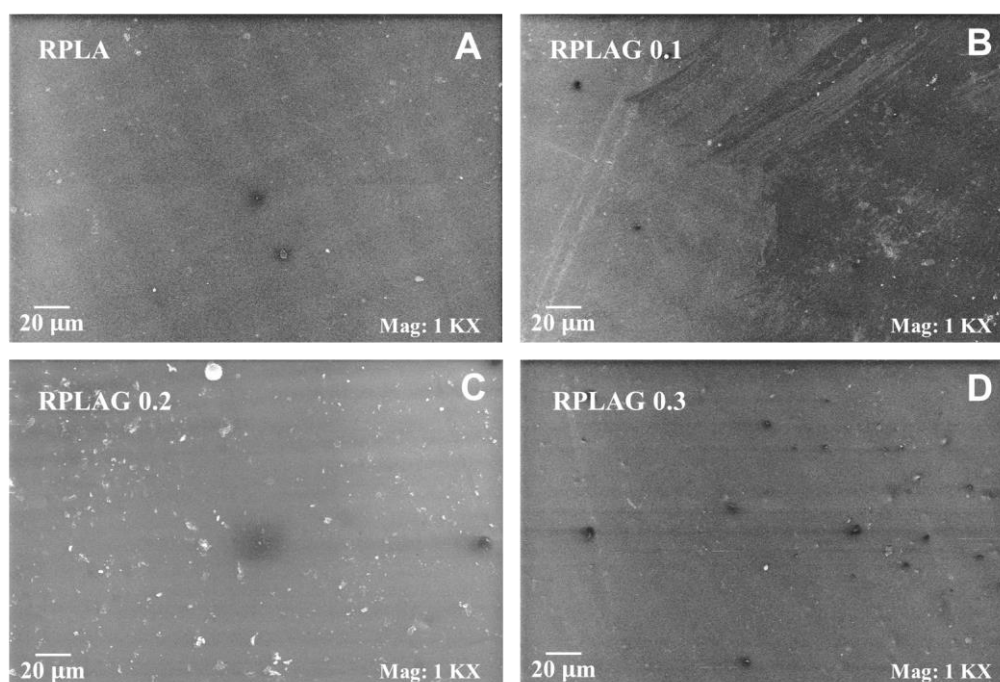


Figura 36: Fotomicrografias das amostras de Resina PLA Pura e Funcionalizada com Grafeno. Fotomicrografia das superfícies das amostras de resina PLA pura (A), com 0,1 wt. % (B), 0,2 wt% e 0,3 wt% de grafeno.

Tendo em vista que as amostras não foram submetidas ao processo de polimento, as pequenas imperfeições observadas (regiões mais escuras), e a presença de algumas partículas na superfície, principalmente na amostra RPLAG 0.2, estão associadas a alguns fatores: (i) ao carregamento do feixe de elétrons na superfície do material, visto que, como a amostra não foi

metalizada, a superfície sofreu carregamento devido à sonda de elétrons, queimando a resina nos pontos de foco do feixe; (ii) ao próprio processo de impressão das resinas, no qual é observado um padrão semelhante a grade, sendo proveniente do caminho ótico do feixe de luz UV da impressora, como será visualizado mais adiante, de maneira mais clara, a partir dos mapas topográfico de AFM e (iii) contaminação dos micropreenchedores utilizados em conjunto com os fotoiniciadores [156].

As Figuras 37 a 40, mostram, respectivamente, os dados de MEV/EDS das amostras RPLA, RPLAG 0,1%, RPLAG 0,2% e RPLA 0,3%. Os espectros EDS indicam a presença de carbono (C), sendo este o principal elemento das moléculas e grupos orgânicos que estão presentes na estrutura do das amostras. Os demais elementos observados no espectro EDS, como o Alumínio (Al), Nitrogênio (N) e Cálcio (Ca), estão associados a composição do agente fotopolimerizador, visto que, podem ser utilizados em conjunto com outros agentes fotopolimerizantes com o intuito de aumentar a eficácia do processo de polimerização ou cura da resina [157], [158]. Entendemos que nesse caso, esses elementos são da própria composição da resina pois, ao observamos os mapas composicionais, tais elementos estão uniformemente distribuídos na matriz da resina. Para nós, essa informação não era conhecida, pois a composição da bioresina aqui utilizada está sob segredo de patente.

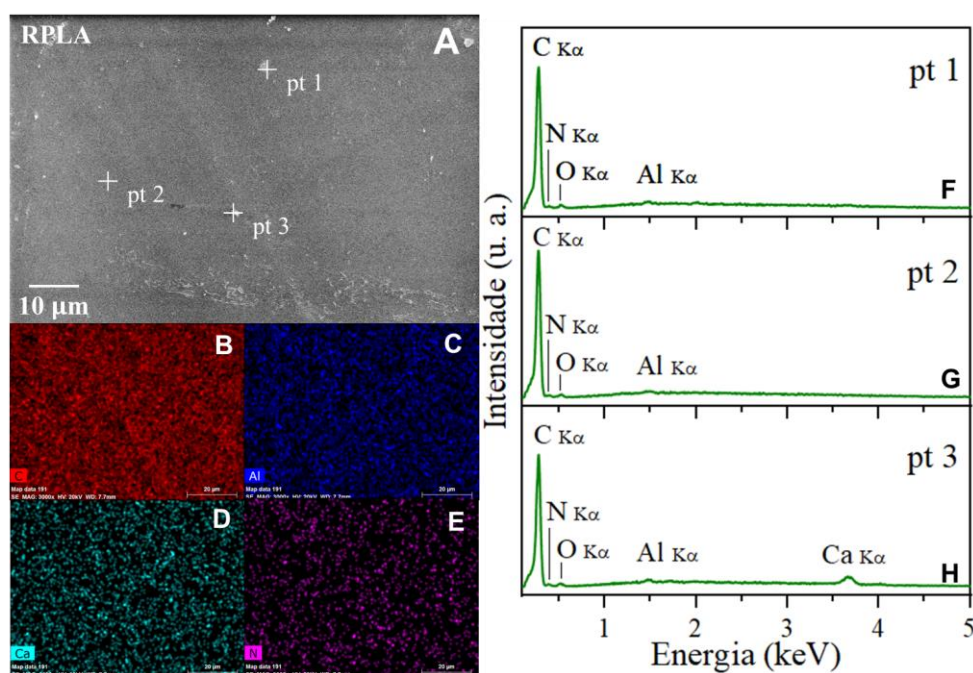


Figura 37: Dados de MEV/EDS da Amostra RPLA. Em (A), observa-se a fotomicrografia da superfície da amostra, bem como os respectivos pontos no qual foram realizadas as medidas de EDS. Em seguida,

são apresentados os respectivos mapas composicionais dos elementos presentes na amostra (B, C, D e F). Ao lado, são mostrados os espectros EDS do material (F, G e H).

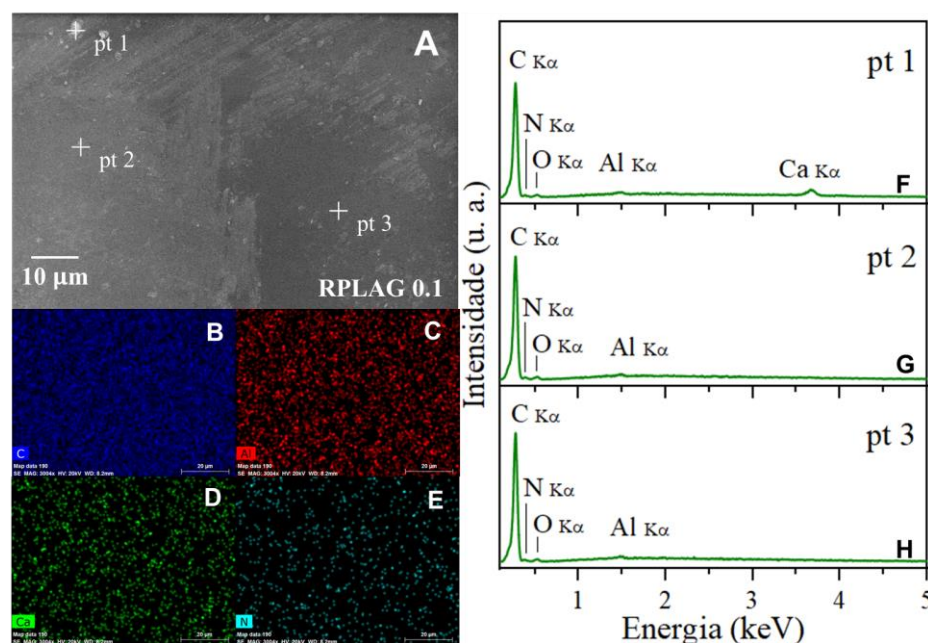


Figura 38: **Dados de MEV/EDS da Amostra RPLAG 0.1.** Em (A), observa-se a fotomicrografia da superfície da amostra, bem como os respectivos pontos no qual foram realizadas as medidas de EDS. Em seguida, são apresentados os respectivos mapas composicionais dos elementos presentes na amostra (B, C, D e F, que correspondem, respectivamente ao C, Al, Ca e N). Ao lado, são mostrados os espectros EDS do material (F, G e H).

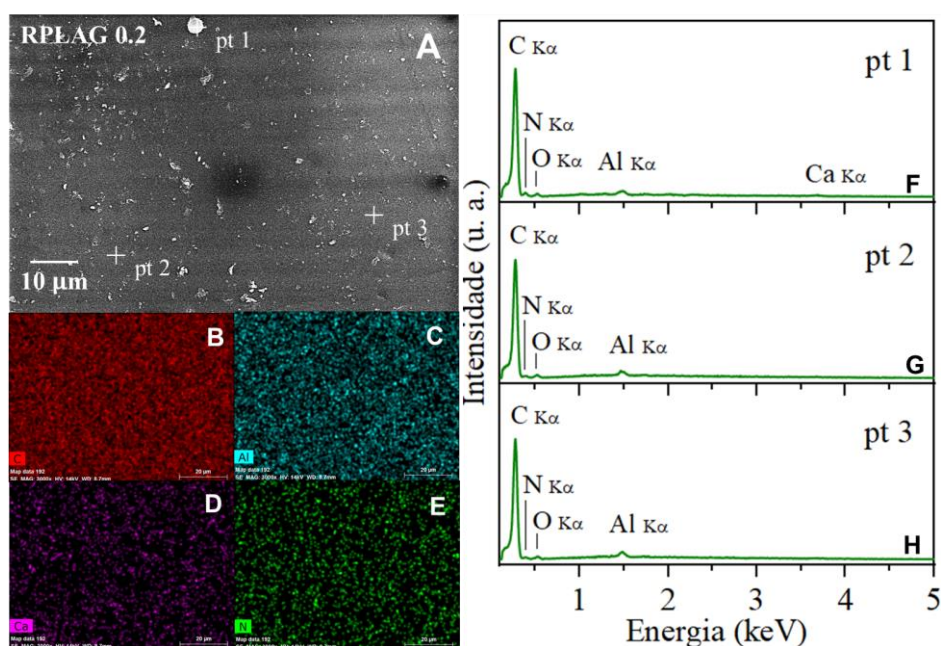


Figura 39: **Dados de MEV/EDS da Amostra RPLA.** Em (A), observa-se a fotomicrografia da superfície da amostra, bem como os respectivos pontos no qual foram realizadas as medidas de EDS. Em seguida,

são apresentados os respectivos mapas composicionais dos elementos presentes na amostra (B, C, D e F, que correspondem, respectivamente ao C, Al, Ca e N). Ao lado, são mostrados os espectros EDS do material (F, G e H).

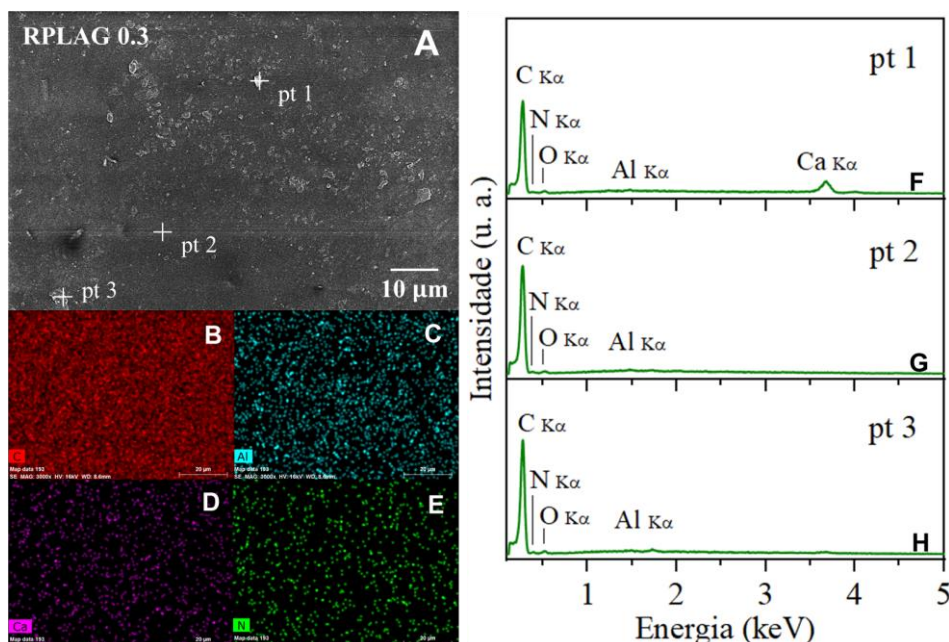


Figura 40: **Dados de MEV/EDS da Amostra RPLA.** Em (A), observa-se a fotomicrografia da superfície da amostra, bem como os respectivos pontos no qual foram realizadas as medidas de EDS. Em seguida, são apresentados os respectivos mapas composicionais dos elementos presentes na amostra (B, C, D e F, que correspondem, respectivamente ao C, Al, Ca e N). Ao lado, são mostrados os espectros EDS do material (F, G e H).

4.3.4. Microscopia de Força Atômica (AFM)

A Figura 41 apresenta os mapas topográficos de 100 x 100 μm obtidos para as amostras RPLA (Fig. 40A), RPLAG-0,1% (Fig. 40B), RPLAG-0,2% (Fig. 40E) e RPLAG-0,3% (Fig. 40F). Como é possível observar a partir dos mapas e de suas respectivas secções transversais, todas as amostras apresentam ondulações em sua superfície, semelhante a um “padrão de grade”, como foi observado anteriormente por meio da técnica de MEV (Seção 4.3.3). Este padrão se deve a forma de iluminação utilizada na técnica de impressão (SLA), que se baseia na utilização de milhares de microespelhos que constituem um dispositivo DMD (sigla para *Digital Micromirror Device*), no qual cada espelho atua como uma micro abertura que permite a passagem de luz [159], [160].

Nota-se que a adição de grafeno à estrutura da resina promove uma alteração nos padrões de grade. A partir dos gráficos das secções transversais (Figura 41), observa-se a distância média entre vales em todas as amostras permanece constante com valores de $\sim 27 \mu\text{m}$, entretanto, a distância entre picos e vales (h) sofre alterações, tendo a amplitude dessas estruturas onduladas reduzidas a medida que o percentual de grafeno aumenta na matriz de resina ($h_{\text{RPLA}} \sim 510 \text{ nm}$; $h_{\text{RPLA01}} \sim 480 \text{ nm}$; $h_{\text{RPLA02}} \sim 420 \text{ nm}$; $h_{\text{RPLA03}} \sim 350 \text{ nm}$). Este parâmetro também está associado ao grau de transparência da peça impressa pela técnica de SLA [161], [162].

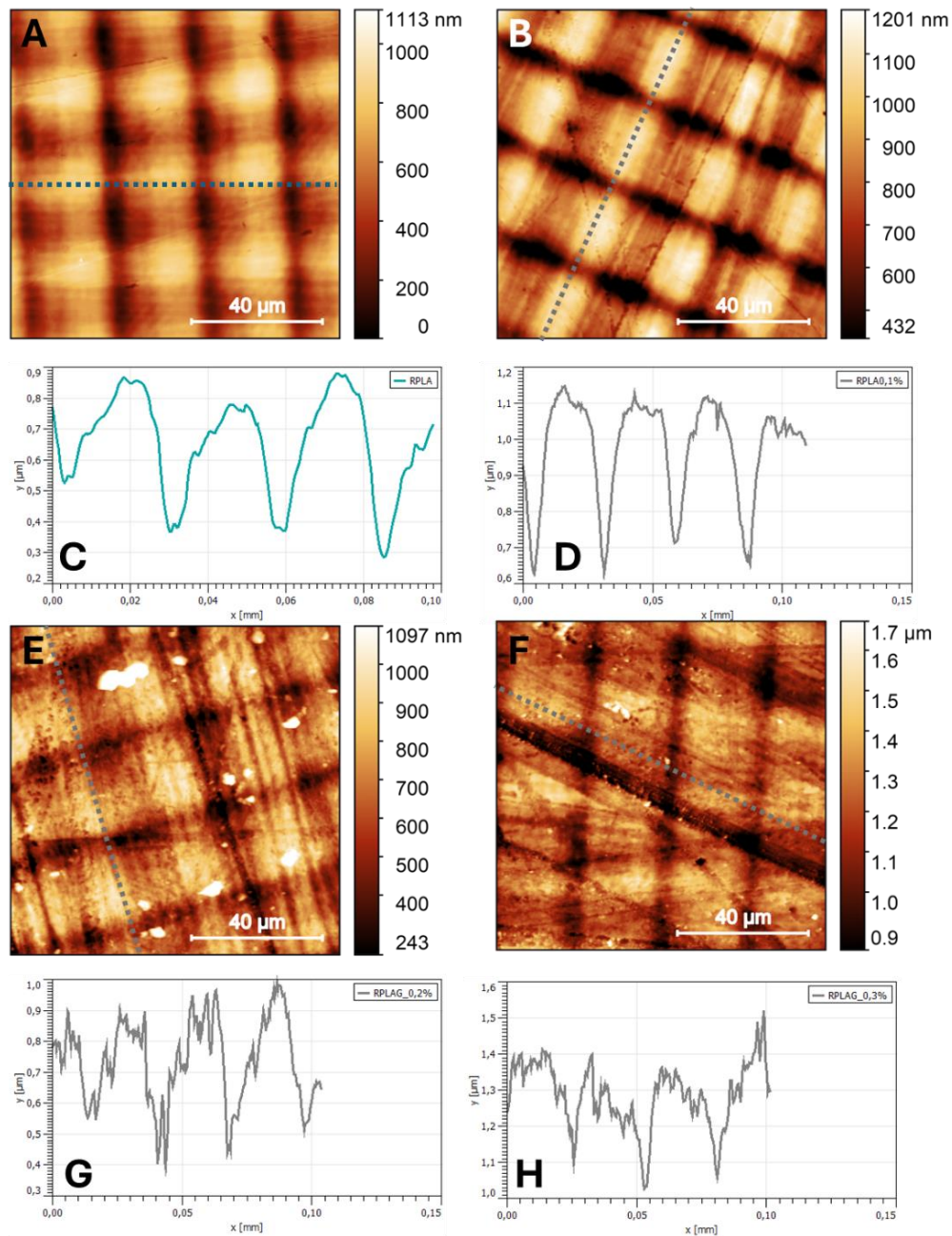


Figura 41: Mapas de 100 μm^2 e Informações Topográficas das Amostras de Resina PLA pura e Funcionalizada com Diferentes Concentrações de Grafeno. As figuras (A) e (C) apresentam, respectivamente, o mapa de altura e a seção transversal (linha pontilhada azul) para a amostra RPLA. Em seguida, as figuras (B) e (D) apresentam as mesmas informações para a amostra RPLAG 0,1%, (E) e (G) para a amostra RPLAG 0,2%, e (F) e (H) para a amostra RPLAG 0,3%.

A diminuição da distância média entre picos e vales observadas para as amostras contendo grafeno reflete na atenuação do padrão de grade conforme a concentração de grafeno aumenta, o que pode ser atribuído à capacidade do grafeno em atuar como nanopreenchedor. Essa característica corrobora, por exemplo, com o aumento da microdureza local do compósito, visto que a força aplicada será dissipada de maneira mais eficiente [124].

Para melhor entender o papel da inserção do grafeno na matriz da resina de PLA, mapas de 5 x 5 μm foram obtidos a partir da técnica de AFM, no modo QNM (*Quantitative NanoMechanics*) revelando a ultraestrutura da superfície das amostras (Figura 42). Nota-se que, à medida que a concentração de grafeno aumenta, a rugosidade das superfícies também aumenta. Porém quando comparada com a amostra com maior concentração de grafeno (RPLA 0,3%) a amostra RPLA 0,2% apresenta um maior valor de rugosidade média quadrática (R_q). Esse fato é interessante pois, como observado anteriormente nos dados de DRX e ER, tanto o halo amorfo, quando alguns dos modos vibracionais associados a esta amostra se apresentam mais intensos quando comparados às amostras RPLA 0,1% e RPLA 0,3%. Essa característica pode ser associada a segregação do grafeno em determinadas regiões do material, durante a formação do nanocompósito, ocasionando no surgimento de uma segunda fase. Devido a agregação das camadas de grafeno, a área superficial e o *aspect ratio* do material sofre uma diminuição, levando a uma dispersão incompleta do material na matriz polimérica, afetando negativamente a capacidade do material em formar interfaces de interação com as moléculas constituintes do polímero, resultando em uma desestruturação das redes poliméricas. Sendo assim, a partir da correlação dos resultados anteriores (DRX, ER) com os resultados de AFM, podemos associar esse comportamento observado para a amostra contendo 0,2 wt.% de grafeno ao limite de solubilidade do material na matriz do polímero, desorganizando suas cadeias, tornando a R_q mais elevada [163], [164], [165]. Quando a fração de grafeno é aumentada, este atua como nanopreenchedor, reduzindo a R_q da amostra.

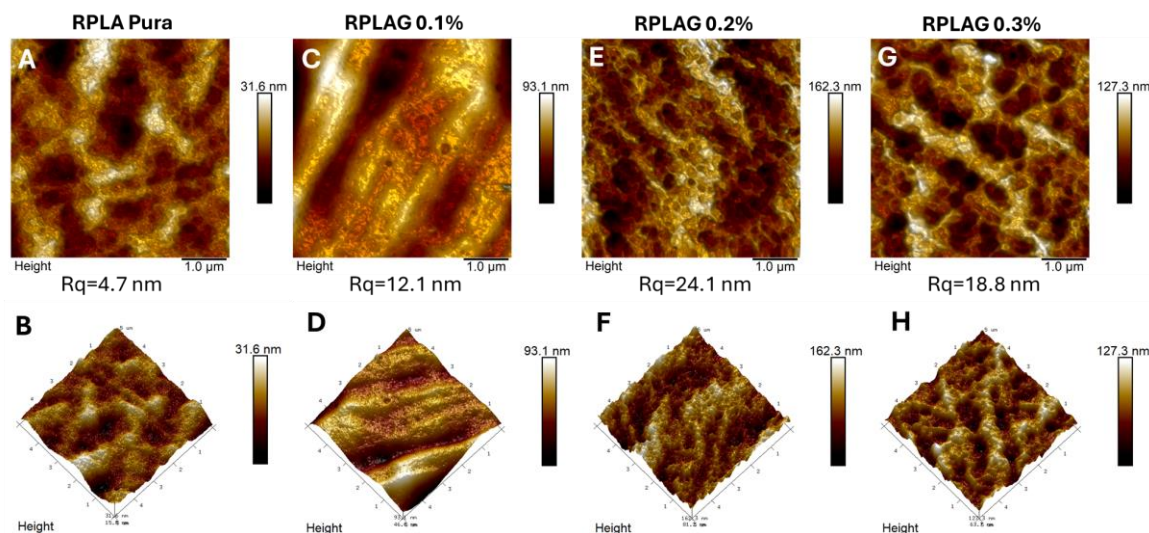


Figura 42: Mapas de $5 \times 5 \mu\text{m}^2$ e Informações Topográficas das Amostras de Resina PLA pura e Funcionalizada com Diferentes Concentrações de Grafeno. As figuras (A) e (B) apresentam, respectivamente, mapas 2D e 3D da superfície da amostra RPLA. (C) e (D) da superfície da amostra RPLAG 0,1%, (E) e (F) da amostra RPLAG 0,2%, e (G) e (H) da amostra RPLAG 0,3%.

As alterações na rugosidade ocasionadas pela inserção do grafeno à estrutura molecular da resina também provocam alterações na microdureza do material e na interação de células com a sua superfície, como será discutido na seção a seguir.

4.3.5. Microdureza Vickers (MV)

A Figura 43 apresenta o gráfico comparativo dos valores de Microdureza Vickers (MV) obtidos para as amostras de resina PLA pura, e funcionalizada com diferentes concentrações de grafeno. Observa-se que a inserção do grafeno a matriz do material proporcionou um aumento em sua dureza local. Como observado anteriormente para as amostras FPLA/FPLAG (Seção 4.1.7), o grafeno apresenta a capacidade de formar interfaces de interação com certa facilidade, em grande parte devido a sua área superficial [166], [167], e a sua estrutura eletrônica, com os elétrons dos orbitais π , perpendiculares ao plano basal do grafeno [14], sendo responsáveis por interagir com os elétrons das moléculas que constituem o material no qual o grafeno está imerso, formando ligações químicas [168], [169].

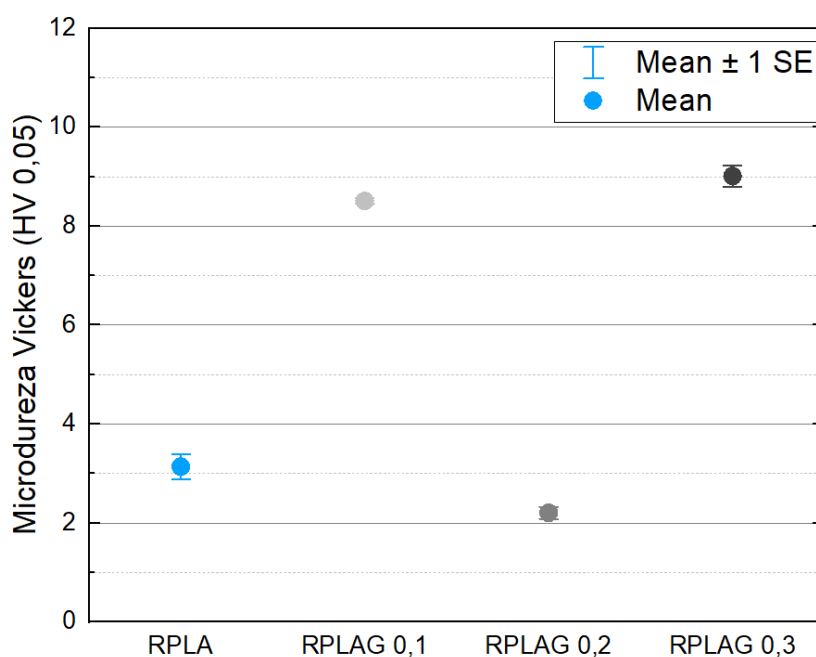


Figura 43: Microdureza Vickers da Resina PLA e PLAG. Gráfico comparativo da microdureza das amostras de resina PLA pura, e com diferentes concentrações de grafeno. Os valores médios de MV das amostras RPLA, RPLAG 0,1, RPLAG 0,2 e RPLAG 0,3 são, respectivamente, 3,46 ($\pm 1,30$ HV), 8,51 ($\pm 0,19$ HV), 2,20 ($\pm 0,39$ HV) e 9,01 ($\pm 0,66$ HV).

Para o ensaio de MV, foi aplicada uma força de 0,05 HV (ou 0,05 kgf, equivalente à 0,49 N), no qual foi observado que, para a concentração de 0,1 wt. % de grafeno, o compósito apresenta um aumento significativo na microdureza local (8,51 ($\pm 0,19$ HV)). Entretanto, para a concentração de 0,2 wt. % de grafeno, a MV do material apresenta uma diminuição significativa 2,20 ($\pm 0,39$ HV). É conhecido que a adição de um outro material à resina pode introduzir certo grau de heterogeneidade em sua estrutura, principalmente devido a segregação do nanopreenchedor (neste caso o grafeno) em certas regiões da matriz polimérica, induzindo a uma desorganização das cadeias do polímero, que por sua vez, influencia diretamente nas propriedades mecânicas do compósito. Neste aspecto, a diminuição da MV para a amostra RPLA 0,2, pode ser atribuída ao aumento da desordem na nanoestrutura das cadeias poliméricas, induzido pelo surgimento de regiões que apresentam agregados de grafeno.

Já o aumento observado no valor da MV para a amostra RPLA 0,3 wt. %, pode ser atribuído uma maior homogeneidade estrutural, uma vez que a maior quantidade de grafeno irá contribuir para o preenchimento uniforme das cadeias poliméricas, diminuindo a formação de regiões segregadas. Como mostrado por Heinrich, G. e Vilgis, Thomas A. [170], o aumento da concentração de nanopreenchedores, função aqui atribuída ao grafeno, na matriz polimérica,

promove um encurtamento das ligações entre cadeias, e número de emaranhados entre ligações cruzadas diminui, proporcionando um maior alinhamento das cadeias poliméricas. Sendo assim, para esta configuração de cadeias mais curtas, é esperado uma maior dureza local, visto que a estrutura do polímero irá apresentar uma maior densidade de empacotamento, promovendo uma melhor dissipação de forças.

4.3.6. Imersão das Amostras em SBF

Diferente das amostras FPLA e PLAG, analisadas na Seção 4.1, as amostras de resina PLA apresentam um carácter completamente amorfo, o que resulta em alterações significativas das suas propriedades. Em termos de degradação *in-vivo*, por exemplo, o PLLA (PLA semicristalino) leva por volta de 2 a 5 anos para sofrer degradação completa, enquanto o PDLA (PLA completamente amorfo), leva em torno de 1 a 2 meses [171]. Neste aspecto, foi realizada a imersão em SBF das amostras RPLA e RPLAG 0,1%, com o objetivo de verificar a ocorrência de alterações estruturais nos materiais. A Figura 44 apresenta o gráfico comparativo da variação dos valores de pH das soluções nas quais as amostras estavam imersas. A partir do ajuste linear realizado para ambos os grupos de dados, observa-se uma tendência de diminuição do valor do pH da solução, indicando a ocorrência de trocas iônicas que favorecem a maior disponibilidade de íons H^+ . A solução SBF no qual as amostras estavam imersas, após os 28 dias, permaneceu em uma região de pH básico (6,94 para a amostra RPLA, e 7,01 para a amostra RPLAG 0,1%), não apresentando nenhum risco que impossibilite o uso do material em aplicações biológicas. Ainda neste aspecto, a degradação do PLA semicristalino e totalmente amorfo, não apresenta riscos à saúde, visto que ocorre a formação de ácido láctico, que é um composto orgânico naturalmente produzido pelo organismo a partir da quebra da molécula de glicose [31]. Após os testes em SBF, foram realizadas medidas de DRX, que são apresentadas na seção seguinte, com o objetivo de verificar possíveis alterações na estrutura do material.

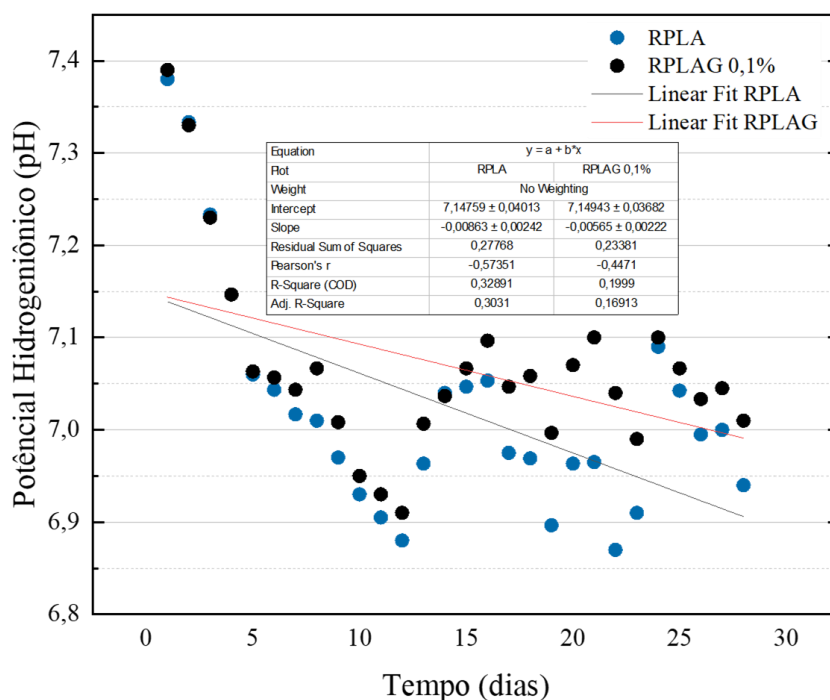


Figura 44: *Variação do pH da solução de SBF para as amostras RPLA e RPLAG. Durante o período de imersão das amostras em SBF, percebe-se uma diminuição nos valores de pH da solução, indicando que ocorreram trocas iônicas.*

4.3.6.1. Difração de Raio X após Imersão

A Figura 45 apresenta os difratogramas das amostras RPLA e RPLAG 0,1% após a imersão em SBF realizada durante um período de 28 dias. Observa-se que o halo amorfo não sofreu alteração quando comparado com o difratograma da amostra antes da imersão em SBF, mostrando, assim, que não houve nenhuma alteração estrutural do material devido à imersão ou crescimento de HA. Visualmente, ambas as amostras não apresentaram nenhuma diferença abrupta, mantendo a mesma geometria do início dos testes. No âmbito de aplicações biológicas, as resinas à base de PLA completamente amorfo podem ser direcionadas para aplicações na qual a ossointegração não é um fator requerido, além de uso como revestimento protetor com o intuito de atenuar a oxidação, garantindo uma maior estabilidade e integridade dos materiais [3].

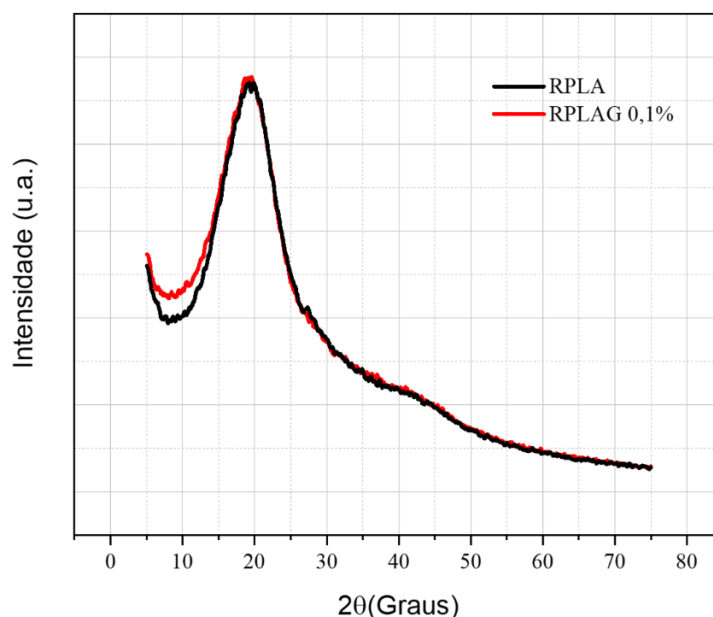


Figura 45: **Difratograma das Amostras RPLA e RPLAG após imersão em SBF.** Observa-se que após o período de imersão em SBF, o caráter amorfo de ambas as amostras não sofreu alteração.

4.3.7. Estudo de Viabilidade Celular

Por conta do grande impacto causado na comunidade acadêmica devido às suas propriedades físico-químicas únicas [54], cientistas de diversas áreas do conhecimento deram início a uma vasta exploração do potencial de uso do grafeno, e seus derivados, em diferentes campos de aplicações. Como mostrado por Orecchioni, Marco e colaboradores [172], no campo biológico e biomédico, a utilização deste material tem sido amplamente explorada na pesquisa do câncer, uma vez que é observado um aumento significativo no número de estudos voltados para o diagnóstico e/ou terapia de diferentes tipos da doença. Entretanto, os efeitos devido a interação das células cancerígenas com o grafeno ainda não são totalmente claros, uma vez que há conflitos acerca do desempenho deste material no tratamento da patologia.

Na tentativa de elucidar a interação de células cancerígenas com a superfícies das resinas PLA puras e funcionalizadas com grafeno, foram realizados testes de viabilidade celular. A Figura 46 mostra o comparativo dos resultados obtidos para as diferentes amostras analisadas. Observando a imagem, nota-se que tanto a amostra RPLA pura, quanto o grafeno puro, apresentam grau de viabilidade para esta linhagem de células cancerígenas. Entretanto, quando o grafeno é adicionado à matriz polimérica, percebe-se uma diminuição bastante expressiva na viabilidade celular conforme a concentração de grafeno aumenta. Nota-se também uma “anomalia” para a amostra RPLA 0,2, uma vez que a viabilidade celular é menor quando

comparada a amostra com uma maior concentração de grafeno. Como observado na Seção 4.3.4, a amostra RPLA 0,2% apresentou uma maior rugosidade média quando comparada com as demais amostras, logo, essa tendência pode refletir, também, no grau de viabilidade celular, visto que a rugosidade é um fator crucial para a adesão e proliferação das células [173].

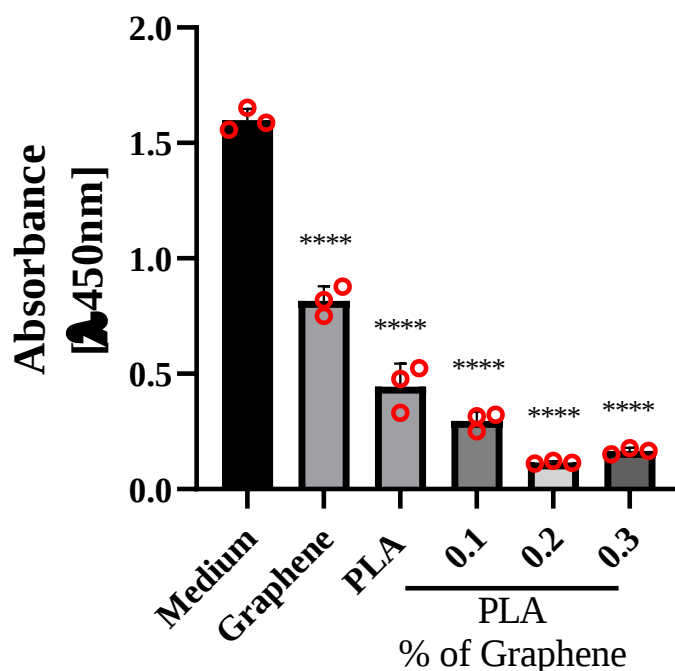


Figura 46: Viabilidade Celular das Amostras R-PLA e R-PLAG. Gráficos comparativos da viabilidade de células de melanoma (linhagem MV3) em diferentes superfícies. Observa-se uma relação inversamente proporcional entre a viabilidade celular, e o aumento da concentração de grafeno.

A interação entre a membrana celular e a superfície de materiais é algo complexo, sendo influenciada por uma série de características dos materiais, como composição química, biocompatibilidade, cargas, rugosidade da superfície, além da hidrofilicidade/hidrofobicidade (ou energia livre de superfície) [174]. Neste aspecto, a menor afinidade das células da linhagem MV3 com a superfície das amostras funcionalizadas com grafeno, pode ser atribuída às alterações nas características dos materiais devido a inserção do grafeno, como já discutido nas seções anteriores. Como referido anteriormente com base na literatura, em geral, às células cancerígenas apresentam uma carga líquida de superfície negativa, e o mesmo é observado para o grafeno e seus derivados quando dispersos em matriz polimérica [175], [176]. Sendo assim, é esperado que ocorra uma repulsão de origem eletrostática entre as células e a superfície do material, devido a alterações na energia de superfície.

Além das cargas de superfície, o grafeno é responsável por promover alterações da rugosidade superficial dos materiais, um fator crucial para a adesão, proliferação e

diferenciação celular [173]. Como observado por Majhy, B. e colaboradores [174], superfícies com rugosidade muito baixa não são favoráveis para o crescimento e a proliferação celular, uma vez que a elongação da membrana celular é prejudicada, ocasionando diminuição significativa da capacidade de fixação das células.

Outra propriedade do substrato que influencia no comportamento celular é a sua elasticidade, uma vez que as células são capazes de “sentir” a superfície do material por meio da aplicação de forças provenientes da reorganização do citoesqueleto durante o reajuste da sua estrutura [177]. Embora o comportamento devido a influência da rigidez da superfície possa variar de célula para célula, em geral, uma superfície que apresenta uma rigidez moderada irá promover uma melhor proliferação e diferenciação celular [178]. A nível de comparação, o poli(dimetilsiloxano) (PMDS), que é considerado um substrato que promove de maneira significativa proliferação, e consequente cultura celular [179], possui dureza de $K \approx 1000kPa$ [174].

Portanto, pode-se afirmar, com base nos resultados observados anteriormente, que as alterações provocadas pela inserção de grafeno na estrutura da resina PLA provocaram uma série de mudanças nas propriedades do material, ocasionando uma diminuição da viabilidade de proliferação e crescimento de células da linhagem MV3.

5. Conclusão e Perspectivas

Os resultados obtidos a partir da técnica de DRX foram fundamentais para verificar informações como a presença de um certo grau cristalinidade das amostras PLA e PLAG filamento, bem como o amorfismo das amostras de resina PLA, tanto pura, quanto funcionalizada com diferentes concentrações de grafeno. A partir dos resultados de DRX, foi possível averiguar a presença de grafeno na amostra FPLAG comercial, no qual foram observados picos característicos deste material. Esta caracterização é importante tendo em vista o direcionamento para aplicação em sistemas biológicos, e para a realização de testes *in-vitro* e posteriormente *in-vivo*. O DRX também foi fundamental para validar a rota de síntese desenvolvida para grafeno, no qual constatou-se a obtenção de grafeno nanométrico. A partir destes resultados, foi possível refinar os passos da metodologia, e confirmar qual o melhor prodimento para a obtenção de um material com maior grau de pureza.

Ainda neste sentido, a técnica de ER demonstrou ser fundamental para verificar a qualidade do grafeno obtido. Verificou-se a presença das bandas G e D, que são características de materiais carbonosos, como o grafeno e seus derivados. Além disso, pôde-se verificar, a partir da razão I_G/I_D , que o grafeno obtido pela rota desenvolvida apresenta poucos defeitos estruturais. Quando comparando com os resultados obtidos por DRX, é possível validar ainda que o grafeno obtido não possui grande números de defeitos associados a presença de grupos funcionais à base de oxigênio em sua estrutura. A técnica de ER também teve papel fundamental para auxiliar na compreensão da composição das amostras de resina PLA, com base na assinatura vibracional dos grupos orgânicos presentes nos materiais. Verificou-se que, com o aumento da concentração de grafeno, os modos vibracionais apresentam maior intensidade, chegando a novas bandas associadas à presença do grafeno na estrutura.

A técnica de AFM demonstrou ser fundamental para o redirecionamento das aplicações dos biopolímero comerciais, uma vez que, a partir dos resultados de adesão, foi possível verificar que a carga de superfície do polímero funcionalizado com grafeno é igual da carga de membrana de células cancerígenas. Este resultado pode confirmar que a superfície deste material pode ser promissora para controlar a “proliferação” destas células carcinogênicas, potencializando o uso de polímeros funcionalizados com grafeno para aplicações tópicas. Os resultados das medidas de KPFM realizadas nas amostras FPLA e FPLAG, também contribuíram para esta perspectiva, visto que se verificou que o grafeno é capaz de alterar o

potencial de superfície de polímeros. Além disso, por meio do AFM, verificou-se alterações na rugosidade superficial das amostras de resina devido à inserção de grafeno em sua estrutura, sendo este um outro fator que influencia diretamente na interação das células com a superfície do material.

Já os resultados *in-vitro* demonstraram ser promissores. O ensaio em SBF mostrou que tanto o FPLA quanto o FPLAG são altamente estáveis em condições normais de pH e temperatura, logo, são materiais que podem ser direcionados para aplicações médicas. Além disso, a partir das análises DRX e MEV/EDS, confirmou-se que ambas as amostras apresentaram crescimento de cristais esféricos de hidroxiapatita em sua superfície, um fator extremamente positivo para aplicações no qual o material deve apresentar propriedade de osseointegração. Esse resultado também demonstra que a superfície das amostras à base de PLA podem servir como plataforma para o crescimento dos cristais esféricos de HA. Já o ensaio de cultura de células se mostrou promissor, com base na hipótese levantada acerca do uso do grafeno como agente redutor para a proliferação de células cancerígenas.

A partir dos ensaios de imersão em SBF das amostras RPLA e RPLAG 0,1%, observou-se que, diferente das amostras FPLA e FPLAG, observa-se uma tendência de diminuição do valor do pH da solução, o que pode ser associado a uma maior taxa de degradação devido ao caráter completamente amorfo do material. A partir da análise de DRX realizada após o período de imersão, verificou-se que não ocorreram alterações na estrutura do material. Isso demonstra a versatilidade dos materiais a base de PLA, no qual, tanto o PLA completamente amorfo, quanto o PLA semicristalino, são altamente versáteis, podendo ser direcionados para aplicações como, por exemplo, a produção revestimentos para implantes que não se deseja osseointegração, e também para a produção de próteses ósseas e parafusos ortopédicos.

O ensaio de viabilidade celular realizado nas amostras de RPLA e RPLAG com diferentes concentrações de grafeno se mostrou bastante promissor. Verificou-se que, para as amostras de resina PLA contendo grafeno, o crescimento de células cancerígenas foi bastante prejudicado, principalmente devido as alterações superficiais e de cargas associadas a incorporação do grafeno a estrutura.

Portanto, como perspectiva deste trabalho, do ponto de vista de aplicações biológicas, sugere-se a realização de ensaios *in-vivo*, com o objetivo de verificar a eficácia dos materiais sintetizados, produzidos e analisados no decorrer da pesquisa, em condições reais de uso. A fim

de se obter mais informações sobre a estrutura e os grupos funcionais presentes nas amostras de resina PLA, com o objetivo de melhor compreender as diferenças observadas nos espectros de absorção e transmissão, almeja-se realizar a caracterização das amostras por meio da técnica de Espectroscopia no Infravermelho por Transformada de Fourier (FT-IR). Além disso, com o intuito de evidenciar possíveis alterações na função trabalho da resina PLA devido a inserção de grafeno em diferentes concentrações em sua estrutura, objetiva-se a realização de novas medidas de KPFM.

Referências

- [1] A. J. T. Teo, A. Mishra, I. Park, Y.-J. Kim, W.-T. Park, e Y.-J. Yoon, “Polymeric Biomaterials for Medical Implants and Devices”, *ACS Biomater. Sci. Eng.*, vol. 2, n° 4, p. 454–472, abr. 2016, doi: 10.1021/acsbiomaterials.5b00429.
- [2] D. Puppi, F. Chiellini, A. M. Piras, e E. Chiellini, “Polymeric materials for bone and cartilage repair”, *Prog. Polym. Sci.*, vol. 35, n° 4, p. 403–440, abr. 2010, doi: 10.1016/j.progpolymsci.2010.01.006.
- [3] A. Kirillova *et al.*, “Fabrication of Biomedical Scaffolds Using Biodegradable Polymers”, *Chem. Rev.*, vol. 121, n° 18, p. 11238–11304, set. 2021, doi: 10.1021/acs.chemrev.0c01200.
- [4] L. T. Sin, *Polylactic Acid: PLA Biopolymer Technology and Applications*. William Andrew, 2012.
- [5] A. George, M. R. Sanjay, R. Srisuk, J. Parameswaranpillai, e S. Siengchin, “A comprehensive review on chemical properties and applications of biopolymers and their composites”, *Int. J. Biol. Macromol.*, vol. 154, p. 329–338, jul. 2020, doi: 10.1016/j.ijbiomac.2020.03.120.
- [6] J. M. G. Cowie e V. Arrighi, *Polymers: Chemistry and Physics of Modern Materials, Third Edition*. CRC Press, 2007.
- [7] J. Dobkowski, R. Kołos, J. Kamiński, e H. M. Kowalczyńska, “Cell adhesion to polymeric surfaces: Experimental study and simple theoretical approach”, *J. Biomed. Mater. Res.*, vol. 47, n° 2, p. 234–242, 1999, doi: 10.1002/(SICI)1097-4636(199911)47:2<234::AID-JBM14>3.0.CO;2-X.
- [8] G. P. Udayakumar *et al.*, “Biopolymers and composites: Properties, characterization and their applications in food, medical and pharmaceutical industries”, *J. Environ. Chem. Eng.*, vol. 9, n° 4, p. 105322, ago. 2021, doi: 10.1016/j.jece.2021.105322.
- [9] S. Kangishwar, N. Radhika, A. A. Sheik, A. Chavali, e S. Hariharan, “A comprehensive review on polymer matrix composites: material selection, fabrication, and application”, *Polym. Bull.*, vol. 80, n° 1, p. 47–87, jan. 2023, doi: 10.1007/s00289-022-04087-4.
- [10] N. Shadjou e M. Hasanzadeh, “Graphene and its nanostructure derivatives for use in bone tissue engineering: Recent advances”, *J. Biomed. Mater. Res. A*, vol. 104, n° 5, p. 1250–1275, 2016, doi: 10.1002/jbm.a.35645.

- [11] W.-F. Lai e W.-T. Wong, “Use of graphene-based materials as carriers of bioactive agents”, *Asian J. Pharm. Sci.*, vol. 16, n° 5, p. 577–588, set. 2021, doi: 10.1016/j.ajps.2020.11.004.
- [12] F. Liu *et al.*, “Synthesis of graphene materials by electrochemical exfoliation: Recent progress and future potential”, *Carbon Energy*, vol. 1, n° 2, p. 173–199, dez. 2019, doi: 10.1002/cey2.14.
- [13] H. Aoki e M. S. Dresselhaus, *Physics of Graphene*. Springer Science & Business Media, 2013.
- [14] J. H. Warner, F. Schaffel, M. Rummeli, e A. Bachmatiuk, *Graphene: Fundamentals and Emergent Applications*. Newnes, 2012.
- [15] S. Szunerits e R. Boukherroub, “Graphene-based biosensors”, *Interface Focus*, vol. 8, n° 3, p. 20160132, abr. 2018, doi: 10.1098/rsfs.2016.0132.
- [16] D. Depan, J. Shah, e R. D. K. Misra, “Controlled release of drug from folate-decorated and graphene mediated drug delivery system: Synthesis, loading efficiency, and drug release response”, *Mater. Sci. Eng. C*, vol. 31, n° 7, p. 1305–1312, out. 2011, doi: 10.1016/j.msec.2011.04.010.
- [17] T. Aydin, C. Gurcan, H. Taheri, e A. Yilmazer, “Graphene Based Materials in Neural Tissue Regeneration”, em *Cell Biology and Translational Medicine, Volume 3: Stem Cells, Bio-materials and Tissue Engineering*, K. Turksen, Org., em *Advances in Experimental Medicine and Biology*, Cham: Springer International Publishing, 2018, p. 129–142. doi: 10.1007/5584_2018_221.
- [18] S. Lakard *et al.*, “Adhesion and proliferation of cells on new polymers modified biomaterials”, *Bioelectrochemistry*, vol. 62, n° 1, p. 19–27, abr. 2004, doi: 10.1016/j.bioelechem.2003.09.009.
- [19] U. Hersel, C. Dahmen, e H. Kessler, “RGD modified polymers: biomaterials for stimulated cell adhesion and beyond”, *Biomaterials*, vol. 24, n° 24, p. 4385–4415, nov. 2003, doi: 10.1016/S0142-9612(03)00343-0.
- [20] R. Glaser e D. Gingell, *Biophysics of the Cell Surface*. Springer Science & Business Media, 2013.
- [21] S. Metwally e U. Stachewicz, “Surface potential and charges impact on cell responses on biomaterials interfaces for medical applications”, *Mater. Sci. Eng. C*, vol. 104, p. 109883, nov. 2019, doi: 10.1016/j.msec.2019.109883.

- [22] G. Speranza *et al.*, “Role of chemical interactions in bacterial adhesion to polymer surfaces”, *Biomaterials*, vol. 25, nº 11, p. 2029–2037, maio 2004, doi: 10.1016/j.biomaterials.2003.08.061.
- [23] D. Feldman, “Polymer History”, *Des. Monomers Polym.*, vol. 11, nº 1, p. 1–15, jan. 2008, doi: 10.1163/156855508X292383.
- [24] D. R. Askeland, F. Haddleton, P. Green, e H. Robertson, *The Science and Engineering of Materials*. Springer US, 2013. [Online]. Disponível em: <https://books.google.com.br/books?id=CIIIiBAAQBAJ>
- [25] A. Patil, A. Patel, e R. Purohit, “An overview of Polymeric Materials for Automotive Applications”, *Mater. Today Proc.*, vol. 4, nº 2, Part A, p. 3807–3815, jan. 2017, doi: 10.1016/j.matpr.2017.02.278.
- [26] S. W. Ghori, R. Siakeng, M. Rasheed, N. Saba, e M. Jawaaid, “2 - The role of advanced polymer materials in aerospace”, em *Sustainable Composites for Aerospace Applications*, M. Jawaaid e M. Thariq, Orgs., em Woodhead Publishing Series in Composites Science and Engineering. , Woodhead Publishing, 2018, p. 19–34. doi: 10.1016/B978-0-08-102131-6.00002-5.
- [27] R. P. Gawade, S. L. Chinke, e P. S. Alegaonkar, “Chapter 17 - Polymers in cosmetics”, em *Polymer Science and Innovative Applications*, M. A. A. AlMaadeed, D. Ponnammam, e M. A. Carignano, Orgs., Elsevier, 2020, p. 545–565. doi: 10.1016/B978-0-12-816808-0.00017-2.
- [28] R. Geyer, “Chapter 2 - Production, use, and fate of synthetic polymers”, em *Plastic Waste and Recycling*, T. M. Letcher, Org., Academic Press, 2020, p. 13–32. doi: 10.1016/B978-0-12-817880-5.00002-5.
- [29] L. Rodrigues, “Aplicações de biomateriais em ortopedia”, *Estud. Tecnológicos Em Eng.*, vol. 9, dez. 2013, doi: 10.4013/ete.2013.92.02.
- [30] J. Muller, C. González-Martínez, e A. Chiralt, “Combination of Poly(lactic) Acid and Starch for Biodegradable Food Packaging”, *Materials*, vol. 10, nº 8, p. 952, ago. 2017, doi: 10.3390/ma10080952.
- [31] R. A. Auras, L.-T. Lim, S. E. M. Selke, e H. Tsuji, *Poly(lactic acid): Synthesis, Structures, Properties, Processing, and Applications*. John Wiley & Sons, 2011.
- [32] J. W. Stansbury e M. J. Idacavage, “3D printing with polymers: Challenges among expanding options and opportunities”, *Dent. Mater.*, vol. 32, nº 1, p. 54–64, jan. 2016, doi: 10.1016/j.dental.2015.09.018.

- [33] A. Kantaros, “3D printing in regenerative medicine: Technologies and resources utilized”, *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 23, n° 23, p. 14621, 2022.
- [34] Y. Joo, I. Shin, G. Ham, S. M. Abuzar, S.-M. Hyun, e S.-J. Hwang, “The advent of a novel manufacturing technology in pharmaceuticals: superiority of fused deposition modeling 3D printer”, *J. Pharm. Investig.*, vol. 50, n° 2, p. 131–145, mar. 2020, doi: 10.1007/s40005-019-00451-1.
- [35] C. W. Hull, “Apparatus for production of three-dimensional objects by stereolithography”, US4575330A, 11 de março de 1986 Acesso em: 14 de junho de 2024. [Online]. Disponível em: <https://patents.google.com/patent/US4575330A/en>
- [36] K. V. Wong e A. Hernandez, “A Review of Additive Manufacturing”, *ISRN Mech. Eng.*, vol. 2012, p. 1–10, ago. 2012, doi: 10.5402/2012/208760.
- [37] S. Negi e R. Sharma, “Basics, applications and future of additive manufacturing technologies: A review”, *J. Manuf. Technol. Res.*, vol. 5, p. 75–96, mar. 2013.
- [38] C. Mota, D. Puppi, F. Chiellini, e E. Chiellini, “Additive manufacturing techniques for the production of tissue engineering constructs”, *J. Tissue Eng. Regen. Med.*, vol. 9, n° 3, p. 174–190, 2015, doi: 10.1002/term.1635.
- [39] M. Salmi, “Additive Manufacturing Processes in Medical Applications”, *Materials*, vol. 14, n° 1, Art. n° 1, jan. 2021, doi: 10.3390/ma14010191.
- [40] K. Wang, C.-C. Ho, C. Zhang, e B. Wang, “A Review on the 3D Printing of Functional Structures for Medical Phantoms and Regenerated Tissue and Organ Applications”, *Engineering*, vol. 3, n° 5, p. 653–662, out. 2017, doi: 10.1016/J.ENG.2017.05.013.
- [41] H.-G. Yi, H. Lee, e D.-W. Cho, “3D Printing of Organs-On-Chips”, *Bioengineering*, vol. 4, n° 1, Art. n° 1, mar. 2017, doi: 10.3390/bioengineering4010010.
- [42] Z. Jiang, B. Diggle, M. L. Tan, J. Viktorova, C. W. Bennett, e L. A. Connal, “Extrusion 3D Printing of Polymeric Materials with Advanced Properties”, *Adv. Sci.*, vol. 7, n° 17, p. 2001379, 2020, doi: 10.1002/advs.202001379.
- [43] K. Rajan, M. Samykano, K. Kadirgama, W. S. W. Harun, e Md. M. Rahman, “Fused deposition modeling: process, materials, parameters, properties, and applications”, *Int. J. Adv. Manuf. Technol.*, vol. 120, n° 3–4, p. 1531–1570, maio 2022, doi: 10.1007/s00170-022-08860-7.
- [44] M. Kalender, S. E. Kılıç, S. Ersoy, Y. Bozkurt, e S. Salman, “Additive Manufacturing and 3D Printer Technology in Aerospace Industry”, em *2019 9th International Conference on Recent Advances in Space Technologies (RAST)*, jun. 2019, p. 689–694. doi: 10.1109/RAST.2019.8767881.

- [45] D. K. Tan, M. Maniruzzaman, e A. Nokhodchi, “Advanced Pharmaceutical Applications of Hot-Melt Extrusion Coupled with Fused Deposition Modelling (FDM) 3D Printing for Personalised Drug Delivery”, *Pharmaceutics*, vol. 10, n° 4, Art. n° 4, dez. 2018, doi: 10.3390/pharmaceutics10040203.
- [46] S. T., S. P., e A. M.S., “A review on advancements in applications of fused deposition modelling process”, *Rapid Prototyp. J.*, vol. 26, n° 4, p. 669–687, jan. 2020, doi: 10.1108/RPJ-08-2018-0199.
- [47] R. Dhandapani *et al.*, “Additive manufacturing of biodegradable porous orthopaedic screw”, *Bioact. Mater.*, vol. 5, n° 3, p. 458–467, set. 2020, doi: 10.1016/j.bioactmat.2020.03.009.
- [48] S. Chen, L. Zhu, W. Wen, L. Lu, C. Zhou, e B. Luo, “Fabrication and Evaluation of 3D Printed Poly(l-lactide) Scaffold Functionalized with Quercetin-Polydopamine for Bone Tissue Engineering”, *ACS Biomater. Sci. Eng.*, vol. 5, n° 5, p. 2506–2518, maio 2019, doi: 10.1021/acsbiomaterials.9b00254.
- [49] Y. Gao *et al.*, “Pilot Mouse Study of 1 mm Inner Diameter (ID) Vascular Graft Using Electrospun Poly(ester urea) Nanofibers”, *Adv. Healthc. Mater.*, vol. 5, n° 18, p. 2427–2436, 2016, doi: 10.1002/adhm.201600400.
- [50] M. L. Bedell, A. M. Navara, Y. Du, S. Zhang, e A. G. Mikos, “Polymeric Systems for Bioprinting”, *Chem. Rev.*, vol. 120, n° 19, p. 10744–10792, out. 2020, doi: 10.1021/acs.chemrev.9b00834.
- [51] S. A. Skoog, P. L. Goering, e R. J. Narayan, “Stereolithography in tissue engineering”, *J. Mater. Sci. Mater. Med.*, vol. 25, n° 3, p. 845–856, mar. 2014, doi: 10.1007/s10856-013-5107-y.
- [52] Y. Yuts, M. Bohley, A. Krivitsky, Y. Bao, Z. Luo, e J. Leroux, “Photopolymerization Inks for 3D Printing of Elastic, Strong, and Biodegradable Oral Delivery Devices”, *Adv. Funct. Mater.*, vol. 34, n° 9, p. 2310111, 2024.
- [53] M. Manoj, R. Subbiah, D. Mangalaraj, N. Ponpandian, C. Viswanathan, e K. Park, “Influence of Growth Parameters on the Formation of Hydroxyapatite (HAp) Nanostructures and Their Cell Viability Studies”, *Nanobiomedicine*, vol. 2, p. 2, jan. 2015, doi: 10.5772/60116.
- [54] A. K. Geim e K. S. Novoselov, “The rise of graphene”, *Nat. Mater.*, vol. 6, n° 3, Art. n° 3, mar. 2007, doi: 10.1038/nmat1849.
- [55] K. S. Novoselov *et al.*, “Two-dimensional gas of massless Dirac fermions in graphene”, *nature*, vol. 438, n° 7065, p. 197–200, 2005.

- [56] K. S. Novoselov *et al.*, “Electric Field Effect in Atomically Thin Carbon Films”, *Science*, vol. 306, n° 5696, p. 666–669, out. 2004, doi: 10.1126/science.1102896.
- [57] Z. Liu *et al.*, “Bottom-Up, On-Surface-Synthesized Armchair Graphene Nanoribbons for Ultra-High-Power Micro-Supercapacitors”, *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 142, n° 42, p. 17881–17886, out. 2020, doi: 10.1021/jacs.0c06109.
- [58] P. B. Bennett *et al.*, “Bottom-up graphene nanoribbon field-effect transistors”, *Appl. Phys. Lett.*, vol. 103, n° 25, 2013.
- [59] N. Kumar *et al.*, “Top-down synthesis of graphene: A comprehensive review”, *FlatChem*, vol. 27, p. 100224, maio 2021, doi: 10.1016/j.flatc.2021.100224.
- [60] Y. Du, P. Xiao, J. Yuan, e J. Chen, “Research Progress of Graphene-Based Materials on Flexible Supercapacitors”, *Coatings*, vol. 10, n° 9, Art. n° 9, set. 2020, doi: 10.3390/coatings10090892.
- [61] R. S. Lodhi, P. Kumar, A. Achuthanunni, M. Rahaman, e P. Das, “3 - Mechanical properties of polymer/graphene composites”, em *Polymer Nanocomposites Containing Graphene*, M. Rahaman, L. Nayak, I. A. Hussein, e N. C. Das, Orgs., em Woodhead Publishing Series in Composites Science and Engineering. , Woodhead Publishing, 2022, p. 75–105. doi: 10.1016/B978-0-12-821639-2.00019-7.
- [62] P. N. Khanam, D. Ponnamm, e M. A. AL-Madeed, “Electrical Properties of Graphene Polymer Nanocomposites”, em *Graphene-Based Polymer Nanocomposites in Electronics*, K. K. Sadasivuni, D. Ponnamm, J. Kim, e S. Thomas, Orgs., em Springer Series on Polymer and Composite Materials. , Cham: Springer International Publishing, 2015, p. 25–47. doi: 10.1007/978-3-319-13875-6_2.
- [63] D. Zhang *et al.*, “Fabrication of highly conductive graphene flexible circuits by 3D printing”, *Synth. Met.*, vol. 217, p. 79–86, jul. 2016, doi: 10.1016/j.synthmet.2016.03.014.
- [64] J. F. Mano, “Biomimetic Materials: Smart Polymer Surfaces for Tissue Engineering”, em *Concise Encyclopedia of Biomedical Polymers and Polymeric Biomaterials*, CRC Press, 2017.
- [65] Y. Arima e H. Iwata, “Effect of wettability and surface functional groups on protein adsorption and cell adhesion using well-defined mixed self-assembled monolayers”, *Biomaterials*, vol. 28, n° 20, p. 3074–3082, jul. 2007, doi: 10.1016/j.biomaterials.2007.03.013.
- [66] J. Feng e Z. Guo, “Wettability of graphene: from influencing factors and reversible conversions to potential applications”, *Nanoscale Horiz.*, vol. 4, n° 2, p. 339–364, 2019, doi: 10.1039/C8NH00348C.

- [67] V. Forest e J. Pourchez, “Preferential binding of positive nanoparticles on cell membranes is due to electrostatic interactions: A too simplistic explanation that does not take into account the nanoparticle protein corona”, *Mater. Sci. Eng. C*, vol. 70, set. 2016, doi: 10.1016/j.msec.2016.09.016.
- [68] “Filamento Condutivo de Grafeno | Filament2Print”. Acesso em: 23 de julho de 2024. [Online]. Disponível em: <https://filament2print.com/pt/grafeno/653-grafeno-conductivo.html>
- [69] T. Kokubo e H. Takadama, “How useful is SBF in predicting in vivo bone bioactivity?”, *Biomaterials*, vol. 27, n° 15, p. 2907–2915, maio 2006, doi: 10.1016/j.biomaterials.2006.01.017.
- [70] R. Gaspar *et al.*, “Protein disulphide isomerase A1 (PDI) supports platelet-endothelium interaction in hyperglycaemia: impacts on endothelial membrane biophysics and secretion of adhesion-related proteins”, *Free Radic. Biol. Med.*, vol. 208, p. S87, nov. 2023, doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2023.10.195.
- [71] “Banco de Células do Rio de Janeiro”, BCRJ. Acesso em: 19 de junho de 2024. [Online]. Disponível em: <https://bcrj.org.br/celula/mv3/>
- [72] L. Lü, L. Zhang, M. S. M. Wai, D. T. W. Yew, e J. Xu, “Exocytosis of MTT formazan could exacerbate cell injury”, *Toxicol. In Vitro*, vol. 26, n° 4, p. 636–644, jun. 2012, doi: 10.1016/j.tiv.2012.02.006.
- [73] K. Chen, D. Xue, e S. Komarneni, “Nanoclay assisted electrochemical exfoliation of pencil core to high conductive graphene thin-film electrode”, *J. Colloid Interface Sci.*, vol. 487, p. 156–161, fev. 2017, doi: 10.1016/j.jcis.2016.10.028.
- [74] M. C. Sousa e J. W. Buchanan, “Observational Models of Graphite Pencil Materials”, *Comput. Graph. Forum*, vol. 19, n° 1, p. 27–49, 2000, doi: 10.1111/1467-8659.00386.
- [75] W. D. Callister e D. G. Rethwisch, *Materials Science and Engineering: An Introduction*. em Wiley Plus Products. Wiley, 2008. [Online]. Disponível em: <https://books.google.com.br/books?id=xNA3OwAACAAJ>
- [76] B. D. Cullity e S. R. Stock, *Elements of X-ray Diffraction*. Prentice Hall, 2001.
- [77] B. Schrader, *Infrared and Raman Spectroscopy: Methods and Applications*. John Wiley & Sons, 2008.
- [78] J. R. Ferraro, *Introductory Raman Spectroscopy*. Elsevier Science, 2002. [Online]. Disponível em: https://books.google.com.br/books?id=_aIqxQEACAAJ

- [79] G. Binnig, H. Rohrer, Ch. Gerber, e E. Weibel, “Surface Studies by Scanning Tunneling Microscopy”, *Phys. Rev. Lett.*, vol. 49, nº 1, p. 57–61, jul. 1982, doi: 10.1103/PhysRevLett.49.57.
- [80] P. Eaton e P. West, *Atomic Force Microscopy*. OUP Oxford, 2010. [Online]. Disponível em: <https://books.google.com.br/books?id=VB0UDAAAQBAJ>
- [81] R. García e R. Pérez, “Dynamic atomic force microscopy methods”, *Surf. Sci. Rep.*, vol. 47, nº 6, p. 197–301, set. 2002, doi: 10.1016/S0167-5729(02)00077-8.
- [82] I. Jankov, I. Goldman, e R. N. Szent, “Principles of the Kelvin probe force microscopy”, *Rev Bras Ensino Física*, vol. 22, p. 503–509, 2000.
- [83] R. F. Egerton, *Physical Principles of Electron Microscopy: An Introduction to TEM, SEM, and AEM*. Springer International Publishing, 2016. [Online]. Disponível em: <https://books.google.com.br/books?id=e8bMjwEACAAJ>
- [84] A. Ul-Hamid, *A Beginners’ Guide to Scanning Electron Microscopy*. Springer International Publishing, 2018. [Online]. Disponível em: <https://books.google.com.br/books?id=Wyt1DwAAQBAJ>
- [85] M. Ezzahmouly *et al.*, “Micro-computed tomographic and SEM study of porous bioceramics using an adaptive method based on the mathematical morphological operations”, *Heliyon*, vol. 5, nº 12, 2019.
- [86] S. Pantermehl *et al.*, “3D Printing for Soft Tissue Regeneration and Applications in Medicine”, *Biomedicines*, vol. 9, nº 4, p. 336, mar. 2021, doi: 10.3390/biomedicines9040336.
- [87] C. Yan *et al.*, “PETG: Applications in Modern Medicine”, *Eng. Regen.*, vol. 5, nº 1, p. 45–55, mar. 2024, doi: 10.1016/j.engreg.2023.11.001.
- [88] R. Hack, C. H. G. Correia, R. A. D. S. Zanon, e S. H. Pezzin, “Characterization of graphene nanosheets obtained by a modified Hummer’s method”, *Matér. Rio Jan.*, vol. 23, nº 1, mar. 2018, doi: 10.1590/s1517-707620170001.0324.
- [89] R. B. da Cunha, F. R. Pê, P. Agrawal, G. de F. Brito, e T. J. A. de Mélo, “Influence of crystallization on the shape memory effect of poly (lactic acid)”, *Smart Mater. Struct.*, vol. 32, nº 8, p. 085016, jul. 2023, doi: 10.1088/1361-665X/ace226.
- [90] W. Yu, X. Wang, E. Ferraris, e J. Zhang, “Melt crystallization of PLA/Talc in fused filament fabrication”, *Mater. Des.*, vol. 182, p. 108013, nov. 2019, doi: 10.1016/j.matdes.2019.108013.
- [91] D. L. Pavia, G. M. Lampman, G. S. Kriz, e J. A. Vyvyan, *Introduction to Spectroscopy*. Cengage Learning, 2014.

- [92] T. Suzuki, A. Ei, Y. Takada, H. Uehara, T. Yamanobe, e K. Takahashi, “Modification of physical properties of poly (L-lactic acid) by addition of methyl- β -cyclodextrin”, *Beilstein J. Org. Chem.*, vol. 10, n° 1, p. 2997–3006, 2014.
- [93] L. M. Malard, M. A. Pimenta, G. Dresselhaus, e M. S. Dresselhaus, “Raman spectroscopy in graphene”, *Phys. Rep.*, vol. 473, n° 5, p. 51–87, abr. 2009, doi: 10.1016/j.physrep.2009.02.003.
- [94] B. da Silva Batista *et al.*, “Physical, morphological and bioactive properties of Co–Cr–W–Ta alloys: Influence of insertion of tantalum and surface thermochemical treatment on bioactivity”, *J. Biomed. Mater. Res. B Appl. Biomater.*, vol. 111, n° 6, p. 1247–1258, 2023.
- [95] A. Kreta, E. Pavlica, M. Božič, e G. Bratina, “Nanoscopic Roughness Characterization of Chitosan with Buried Graphene Oxide for Fuel Cell Application”, em *ASEC 2022*, MDPI, dez. 2022, p. 26. doi: 10.3390/ASEC2022-13819.
- [96] M. do S. do N. Amorim, J. A. Batista, F. M. Junior, A. Fontes, R. Santos-Oliveira, e L. M. Rebelo Alencar, “New Insights into Hemolytic Anemias: Ultrastructural and Nanomechanical Investigation of Red Blood Cells Showed Early Morphological Changes”, *J. Biomed. Nanotechnol.*, vol. 18, n° 2, p. 405–421, fev. 2022, doi: 10.1166/jbn.2022.3267.
- [97] R. Cardoso-Lima, P. F. N. Souza, M. I. F. Guedes, R. Santos-Oliveira, e L. M. Rebelo Alencar, “SARS-CoV-2 Unrevealed: Ultrastructural and Nanomechanical Analysis”, *Langmuir*, vol. 37, n° 36, p. 10762–10769, set. 2021, doi: 10.1021/acs.langmuir.1c01488.
- [98] H.-J. Butt, B. Cappella, e M. Kappl, “Force measurements with the atomic force microscope: Technique, interpretation and applications”, *Surf. Sci. Rep.*, vol. 59, n° 1, p. 1–152, out. 2005, doi: 10.1016/j.surfrep.2005.08.003.
- [99] Z.-F. Liang, S.-L. Ma, H.-T. Xue, F. Ding, J. L. Liu, e F.-L. Tang, “Charge distribution in graphene from quantum calculation*”, *Chin. Phys. B*, vol. 27, n° 1, p. 016801, jan. 2018, doi: 10.1088/1674-1056/27/1/016801.
- [100] V. Singh, D. Joung, L. Zhai, S. Das, S. I. Khondaker, e S. Seal, “Graphene based materials: Past, present and future”, *Prog. Mater. Sci.*, vol. 56, n° 8, p. 1178–1271, out. 2011, doi: 10.1016/j.pmatsci.2011.03.003.
- [101] A. A. Baxter, F. T. Lay, I. K. Poon, M. Kvansakul, e M. D. Hulett, “Tumor cell membrane-targeting cationic antimicrobial peptides: novel insights into mechanisms of action and therapeutic prospects”, *Cell. Mol. Life Sci.*, vol. 74, n° 20, p. 3809–3825, 2017.
- [102] E. Moeendarbary e A. R. Harris, “Cell mechanics: principles, practices, and prospects”, *WIREs Syst. Biol. Med.*, vol. 6, n° 5, p. 371–388, 2014, doi: 10.1002/wsbm.1275.

- [103] D. Gaspar, A. S. Veiga, e M. A. R. B. Castanho, “From antimicrobial to anticancer peptides. A review”, *Front. Microbiol.*, vol. 4, 2013, Acesso em: 19 de fevereiro de 2024. [Online]. Disponível em: <https://www.frontiersin.org/journals/microbiology/articles/10.3389/fmicb.2013.00294>
- [104] J. H. Warner, “Chapter 1 - Introduction”, em *Graphene*, J. H. Warner, F. Schäffel, A. Bachmatiuk, e M. H. Rummeli, Orgs., Elsevier, 2013, p. 1–4. doi: 10.1016/B978-0-12-394593-8.00001-1.
- [105] R. Garg, N. K. Dutta, e N. Roy Choudhury, “Work function engineering of graphene”, *Nanomaterials*, vol. 4, nº 2, p. 267–300, 2014.
- [106] K. L. Mittal, “Adhesion aspects of metallization of organic polymer surfaces”, *J. Vac. Sci. Technol.*, vol. 13, nº 1, p. 19–25, jan. 1976, doi: 10.1116/1.568850.
- [107] M. Glicksman *et al.*, “In Vitro Cell Based Assays”, em *Assay Guidance Manual [Internet]*, Eli Lilly & Company and the National Center for Advancing Translational Sciences, 2004. Acesso em: 7 de fevereiro de 2024. [Online]. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK206715/>
- [108] M. K. Ediriweera, K. H. Tennekoon, e S. R. Samarakoon, “In vitro assays and techniques utilized in anticancer drug discovery”, *J. Appl. Toxicol.*, vol. 39, nº 1, p. 38–71, 2019, doi: 10.1002/jat.3658.
- [109] F. A. Groothuis, M. B. Heringa, B. Nicol, J. L. M. Hermens, Bas. J. Blaauboer, e N. I. Kramer, “Dose metric considerations in in vitro assays to improve quantitative in vitro–in vivo dose extrapolations”, *Toxicology*, vol. 332, p. 30–40, jun. 2015, doi: 10.1016/j.tox.2013.08.012.
- [110] G. I. Peterson, A. V. Dobrynin, e M. L. Becker, “Biodegradable Shape Memory Polymers in Medicine”, *Adv. Healthc. Mater.*, vol. 6, nº 21, p. 1700694, 2017, doi: 10.1002/adhm.201700694.
- [111] J.-Y. Bae, J.-E. Won, J.-S. Park, H.-H. Lee, e H.-W. Kim, “Improvement of surface bioactivity of poly(lactic acid) biopolymer by sandblasting with hydroxyapatite bioceramic”, *Mater. Lett.*, vol. 65, nº 19, p. 2951–2955, out. 2011, doi: 10.1016/j.matlet.2011.06.023.
- [112] E. Epstein, “Mechanisms of Ion Transport through Plant Cell Membranes”, em *International Review of Cytology*, vol. 34, G. H. Bourne e J. F. Danielli, Orgs., Academic Press, 1973, p. 123–168. doi: 10.1016/S0074-7696(08)61936-1.

- [113] X. Tong, F. Zhao, e C. B. Thompson, “The molecular determinants of *de novo* nucleotide biosynthesis in cancer cells”, *Curr. Opin. Genet. Dev.*, vol. 19, n° 1, p. 32–37, fev. 2009, doi: 10.1016/j.gde.2009.01.002.
- [114] T. Wang *et al.*, “Improve the Strength of PLA/HA Composite Through the Use of Surface Initiated Polymerization and Phosphonic Acid Coupling Agent”, *J. Res. Natl. Inst. Stand. Technol.*, vol. 116, n° 5, p. 785–796, 2011, doi: 10.6028/jres.116.021.
- [115] J. Yang, J. Bei, e S. Wang, “Enhanced cell affinity of poly (d,l-lactide) by combining plasma treatment with collagen anchorage”, *Biomaterials*, vol. 23, n° 12, p. 2607–2614, jun. 2002, doi: 10.1016/S0142-9612(01)00400-8.
- [116] S. Zhong *et al.*, “Assembly synthesis of spherical hydroxyapatite with hierarchical structure”, *Mater. Lett.*, vol. 194, p. 1–4, maio 2017, doi: 10.1016/j.matlet.2017.01.146.
- [117] C. Qiu, X. Xiao, e R. Liu, “Biomimetic synthesis of spherical nano-hydroxyapatite in the presence of polyethylene glycol”, *Ceram. Int.*, vol. 34, n° 7, p. 1747–1751, set. 2008, doi: 10.1016/j.ceramint.2007.06.001.
- [118] X. Du, Y. Chu, S. Xing, e L. Dong, “Hydrothermal synthesis of calcium hydroxyapatite nanorods in the presence of PVP”, *J. Mater. Sci.*, vol. 44, n° 23, p. 6273–6279, dez. 2009, doi: 10.1007/s10853-009-3860-6.
- [119] J. Duan, X. Huang, e E. Wang, “PEG-assisted synthesis of ZnO nanotubes”, *Mater. Lett.*, vol. 60, n° 15, p. 1918–1921, jul. 2006, doi: 10.1016/j.matlet.2005.12.052.
- [120] D. K. Dubey e V. Tomar, “Role of hydroxyapatite crystal shape in nanoscale mechanical behavior of model tropocollagen–hydroxyapatite hard biomaterials”, *Mater. Sci. Eng. C*, vol. 29, n° 7, p. 2133–2140, ago. 2009, doi: 10.1016/j.msec.2009.04.015.
- [121] K. Lin *et al.*, “Strontium substituted hydroxyapatite porous microspheres: Surfactant-free hydrothermal synthesis, enhanced biological response and sustained drug release”, *Chem. Eng. J.*, vol. 222, p. 49–59, abr. 2013, doi: 10.1016/j.cej.2013.02.037.
- [122] H. Duan, Y. Ma, X. Liu, L. Hao, e N. Zhao, “Hierarchically nanostructured hydroxyapatite microspheres as drug delivery carriers and their effects on cell viability”, *RSC Adv.*, vol. 5, n° 101, p. 83522–83529, set. 2015, doi: 10.1039/C5RA11956A.
- [123] S. C. Tjong, “10 - Synthesis and Structural–Mechanical Property Characteristics of Graphene–Polymer Nanocomposites”, em *Nanocrystalline Materials (Second Edition)*, S.-C. Tjong, Org., Oxford: Elsevier, 2014, p. 335–375. doi: 10.1016/B978-0-12-407796-6.00010-5.

- [124] K. Hu, D. D. Kulkarni, I. Choi, e V. V. Tsukruk, “Graphene-polymer nanocomposites for structural and functional applications”, *Prog. Polym. Sci.*, vol. 39, n° 11, p. 1934–1972, nov. 2014, doi: 10.1016/j.progpolymsci.2014.03.001.
- [125] Y. Zhang, Q. Zhang, D. Hou, e J. Zhang, “Tuning interfacial structure and mechanical properties of graphene oxide sheets/polymer nanocomposites by controlling functional groups of polymer”, *Appl. Surf. Sci.*, vol. 504, p. 144152, 2020.
- [126] X. Sun *et al.*, “Recent progress in graphene/polymer nanocomposites”, *Adv. Mater.*, vol. 33, n° 6, p. 2001105, 2021.
- [127] C. I. Idumah e C. M. Obele, “Understanding interfacial influence on properties of polymer nanocomposites”, *Surf. Interfaces*, vol. 22, p. 100879, fev. 2021, doi: 10.1016/j.surf.2020.100879.
- [128] J. N. Israelachvili, *Intermolecular and Surface Forces*. Academic Press, 2011.
- [129] A. W. Adamson e A. P. Gast, *Physical Chemistry of Surfaces*. Wiley, 1997. [Online]. Disponível em: <https://books.google.com.br/books?id=rK4PAQAAMAAJ>
- [130] J. Y. Rho, R. B. Ashman, e C. H. Turner, “Young’s modulus of trabecular and cortical bone material: Ultrasonic and microtensile measurements”, *J. Biomech.*, vol. 26, n° 2, p. 111–119, fev. 1993, doi: 10.1016/0021-9290(93)90042-D.
- [131] M. J. McAllister *et al.*, “Single Sheet Functionalized Graphene by Oxidation and Thermal Expansion of Graphite”, *Chem. Mater.*, vol. 19, n° 18, p. 4396–4404, set. 2007, doi: 10.1021/cm0630800.
- [132] B. Andonovic, A. Grozdanov, P. Paunović, e A. T. Dimitrov, “X-ray diffraction analysis on layers in graphene samples obtained by electrolysis in molten salts: a new perspective”, *Micro Nano Lett.*, vol. 10, n° 12, p. 683–685, 2015, doi: 10.1049/mnl.2015.0325.
- [133] I.-M. Low, H. M. Albetran, e M. Degiorgio, “Structural Characterization of Commercial Graphite and Graphene Materials”, *J. Nanotechnol. Nanomater.*, vol. Volume 1, n° Issue 1, Art. n° Issue 1, jun. 2020, doi: 10.33696/Nanotechnol.1.005.
- [134] R. Yadav, P. Joshi, M. Hara, T. Yana, S. Hashimoto, e M. Yoshimura, “Intercorrelation between physical and electrochemical behavior of nitrogen-doping in graphene for symmetric supercapacitor electrode”, *SN Appl. Sci.*, vol. 2, n° 10, p. 1630, set. 2020, doi: 10.1007/s42452-020-03401-x.
- [135] R. Siburian, H. Sihotang, S. L. Raja, M. Supeno, e C. Simanjuntak, “New route to synthesise of graphene nano sheets”, *Orient. J. Chem.*, vol. 34, n° 1, p. 182, 2018.

- [136] M. S. Seehra, U. K. Geddam, D. Schwegler-Berry, e A. B. Stefaniak, “Detection and quantification of 2H and 3R phases in commercial graphene-based materials”, *Carbon*, vol. 95, p. 818–823, dez. 2015, doi: 10.1016/j.carbon.2015.08.109.
- [137] H. Bergeron, D. Lebedev, e M. C. Hersam, “Polymorphism in post-dichalcogenide two-dimensional materials”, *Chem. Rev.*, vol. 121, n° 4, p. 2713–2775, 2021.
- [138] F. Pan *et al.*, “Phase-changing in graphite assisted by interface charge injection”, *Nano Lett.*, vol. 21, n° 13, p. 5648–5654, 2021.
- [139] K. Parvez *et al.*, “Electrochemically Exfoliated Graphene as Solution-Processable, Highly Conductive Electrodes for Organic Electronics”, *ACS Nano*, vol. 7, n° 4, p. 3598–3606, abr. 2013, doi: 10.1021/nn400576v.
- [140] C. Castiglioni, F. Negri, M. Rigolio, e G. Zerbi, “Raman activation in disordered graphites of the A1' symmetry forbidden $k \neq 0$ phonon: The origin of the D line”, *J. Chem. Phys.*, vol. 115, n° 8, p. 3769–3778, ago. 2001, doi: 10.1063/1.1381529.
- [141] A. C. Ferrari, “Raman spectroscopy of graphene and graphite: Disorder, electron–phonon coupling, doping and nonadiabatic effects”, *Solid State Commun.*, vol. 143, n° 1, p. 47–57, jul. 2007, doi: 10.1016/j.ssc.2007.03.052.
- [142] A. Jorio, E. H. M. Ferreira, M. V. Moutinho, F. Stavale, C. A. Achete, e R. B. Capaz, “Measuring disorder in graphene with the G and D bands”, *Phys. Status Solidi B*, vol. 247, n° 11-12, p. 2980–2982, 2010.
- [143] I. A. Popov, K. V. Bozhenko, e A. I. Boldyrev, “Is graphene aromatic?”, *Nano Res.*, vol. 5, n° 2, p. 117–123, fev. 2012, doi: 10.1007/s12274-011-0192-z.
- [144] C. Casiraghi *et al.*, “Raman Spectroscopy of Graphene Edges”, *Nano Lett.*, vol. 9, n° 4, p. 1433–1441, abr. 2009, doi: 10.1021/nl8032697.
- [145] F. Liu, S. Song, D. Xue, e H. Zhang, “Folded structured graphene paper for high performance electrode materials”, *Adv. Mater. Deerfield Beach Fla*, vol. 24, n° 8, p. 1089–1094, fev. 2012, doi: 10.1002/adma.201104691.
- [146] A. Das, B. Chakraborty, e A. K. Sood, “Raman spectroscopy of graphene on different substrates and influence of defects”, *Bull. Mater. Sci.*, vol. 31, n° 3, p. 579–584, jun. 2008, doi: 10.1007/s12034-008-0090-5.
- [147] A. B. Seabra, A. J. Paula, R. de Lima, O. L. Alves, e N. Durán, “Nanotoxicity of Graphene and Graphene Oxide”, *Chem. Res. Toxicol.*, vol. 27, n° 2, p. 159–168, fev. 2014, doi: 10.1021/tx400385x.

- [148] H. Alhumade, A. Yu, A. Elkamel, L. Simon, e A. Abdala, “Enhanced protective properties and UV stability of epoxy/graphene nanocomposite coating on stainless steel.”, *Express Polym. Lett.*, vol. 10, n° 12, 2016.
- [149] V. Abhilash, N. Rajender, e K. Suresh, “Chapter 14 - X-ray diffraction spectroscopy of polymer nanocomposites”, em *Spectroscopy of Polymer Nanocomposites*, S. Thomas, D. Rouxel, e D. Ponnamm, Orgs., William Andrew Publishing, 2016, p. 410–451. doi: 10.1016/B978-0-323-40183-8.00014-8.
- [150] K. Pramoda, A. Mohamed, I. Yee Phang, e T. Liu, “Crystal transformation and thermomechanical properties of poly(vinylidene fluoride)/clay nanocomposites”, *Polym. Int.*, vol. 54, n° 1, p. 226–232, 2005, doi: 10.1002/pi.1692.
- [151] T. Suzuki, K. Takahashi, H. Uehara, e T. Yamanobe, “Application and analysis of a DSC-Raman spectroscopy for indium and poly(lactic acid)”, *J. Therm. Anal. Calorim.*, vol. 113, n° 3, p. 1543–1549, set. 2013, doi: 10.1007/s10973-013-3098-z.
- [152] G. Kister, G. Cassanas, e M. Vert, “Effects of morphology, conformation and configuration on the IR and Raman spectra of various poly(lactic acid)s”, *Polymer*, vol. 39, n° 2, p. 267–273, jan. 1998, doi: 10.1016/S0032-3861(97)00229-2.
- [153] M. A. Cuiffo, J. Snyder, A. M. Elliott, N. Romero, S. Kannan, e G. P. Halada, “Impact of the Fused Deposition (FDM) Printing Process on Polylactic Acid (PLA) Chemistry and Structure”, *Appl. Sci.*, vol. 7, n° 6, Art. n° 6, jun. 2017, doi: 10.3390/app7060579.
- [154] Y. Takahashi, S. Imazato, R. Russell, Y. Noiri, e S. Ebisu, “Influence of resin monomers on growth of oral streptococci”, *J. Dent. Res.*, vol. 83, n° 4, p. 302–306, 2004.
- [155] B. C. Borges *et al.*, “Preheating of resin-based flowable materials in a microwave device: a promising approach to increasing hardness and softening resistance under cariogenic challenge”, *Eur J Esthet Dent*, vol. 8, n° 4, p. 558–568, 2013.
- [156] Y. H. Kwon, G. Jeon, C. Jang, H. Seol, e H. Kim, “Evaluation of polymerization of light-curing hybrid composite resins”, *J. Biomed. Mater. Res. Part B Appl. Biomater. Off. J. Soc. Biomater. Jpn. Soc. Biomater. Aust. Soc. Biomater. Korean Soc. Biomater.*, vol. 76, n° 1, p. 106–113, 2006.
- [157] M. Robakowska *et al.*, “Influence of the Addition of Sialon and Aluminum Nitride Fillers on the Photocuring Process of Polymer Coatings”, *Coatings*, vol. 12, n° 10, Art. n° 10, out. 2022, doi: 10.3390/coatings12101389.
- [158] Y. Liu, Y. Lin, T. Jiao, G. Lu, e J. Liu, “Photocurable modification of inorganic fillers and their application in photopolymers for 3D printing”, *Polym. Chem.*, vol. 10, n° 46, p. 6350–6359, 2019.

- [159] C. Sun, N. Fang, D. M. Wu, e X. Zhang, “Projection micro-stereolithography using digital micro-mirror dynamic mask”, *Sens. Actuators Phys.*, vol. 121, n° 1, p. 113–120, maio 2005, doi: 10.1016/j.sna.2004.12.011.
- [160] K. G. Mostafa, D. S. Nobes, e A. J. Qureshi, “Investigation of Light-Induced Surface Roughness in Projection Micro-Stereolithography Additive Manufacturing (PμSLA)”, *Procedia CIRP*, vol. 92, p. 187–193, jan. 2020, doi: 10.1016/j.procir.2020.05.177.
- [161] A. Urrios *et al.*, “3D-printing of transparent bio-microfluidic devices in PEG-DA”, *Lab. Chip*, vol. 16, n° 12, p. 2287–2294, jun. 2016, doi: 10.1039/C6LC00153J.
- [162] N. Bhattacharjee, C. Parra-Cabrera, Y. T. Kim, A. P. Kuo, e A. Folch, “Desktop-Stereolithography 3D-Printing of a Poly(dimethylsiloxane)-Based Material with Sylgard-184 Properties”, *Adv. Mater.*, vol. 30, n° 22, p. 1800001, 2018, doi: 10.1002/adma.201800001.
- [163] T. Kuilla, S. Bhadra, D. Yao, N. H. Kim, S. Bose, e J. H. Lee, “Recent advances in graphene based polymer composites”, *Prog. Polym. Sci.*, vol. 35, n° 11, p. 1350–1375, nov. 2010, doi: 10.1016/j.progpolymsci.2010.07.005.
- [164] H. Kim, A. A. Abdala, e C. W. Macosko, “Graphene/Polymer Nanocomposites”, *Macromolecules*, vol. 43, n° 16, p. 6515–6530, ago. 2010, doi: 10.1021/ma100572e.
- [165] V. Mittal, “Functional Polymer Nanocomposites with Graphene: A Review”, *Macromol. Mater. Eng.*, vol. 299, n° 8, p. 906–931, 2014, doi: 10.1002/mame.201300394.
- [166] C. Rao, K. Biswas, K. Subrahmanyam, e Ajj. Govindaraj, “Graphene, the new nanocarbon”, *J. Mater. Chem.*, vol. 19, n° 17, p. 2457–2469, 2009.
- [167] A. Peigney, Ch. Laurent, E. Flahaut, R. R. Bacsá, e A. Rousset, “Specific surface area of carbon nanotubes and bundles of carbon nanotubes”, *Carbon*, vol. 39, n° 4, p. 507–514, abr. 2001, doi: 10.1016/S0008-6223(00)00155-X.
- [168] T. S. Sreeprasad e V. Berry, “How Do the Electrical Properties of Graphene Change with its Functionalization?”, *Small*, vol. 9, n° 3, p. 341–350, 2013, doi: 10.1002/smll.201202196.
- [169] Z. Zhang, H. Huang, X. Yang, e L. Zang, “Tailoring Electronic Properties of Graphene by π - π Stacking with Aromatic Molecules”, *J. Phys. Chem. Lett.*, vol. 2, n° 22, p. 2897–2905, nov. 2011, doi: 10.1021/jz201273r.
- [170] G. Heinrich e T. A. Vilgis, “Contribution of entanglements to the mechanical properties of carbon black-filled polymer networks”, *Macromolecules*, vol. 26, n° 5, p. 1109–1119, 1993.
- [171] L. S. Nair e C. T. Laurencin, “Biodegradable polymers as biomaterials”, *Prog. Polym. Sci.*, vol. 32, n° 8, p. 762–798, ago. 2007, doi: 10.1016/j.progpolymsci.2007.05.017.

- [172] M. Orecchioni, R. Cabizza, A. Bianco, e L. G. Delogu, “Graphene as Cancer Theranostic Tool: Progress and Future Challenges”, *Theranostics*, vol. 5, n° 7, p. 710–723, mar. 2015, doi: 10.7150/thno.11387.
- [173] A. Allion, J.-P. Baron, e L. Boulange-Petermann, “Impact of surface energy and roughness on cell distribution and viability”, *Biofouling*, vol. 22, n° 5, p. 269–278, jan. 2006, doi: 10.1080/08927010600902789.
- [174] B. Majhy, P. Priyadarshini, e A. K. Sen, “Effect of surface energy and roughness on cell adhesion and growth – facile surface modification for enhanced cell culture”, *RSC Adv.*, vol. 11, n° 25, p. 15467–15476, 2021, doi: 10.1039/D1RA02402G.
- [175] W. K. Chee, H. N. Lim, N. M. Huang, e I. Harrison, “Nanocomposites of graphene/polymers: a review”, *RSC Adv.*, vol. 5, n° 83, p. 68014–68051, ago. 2015, doi: 10.1039/C5RA07989F.
- [176] M. Deng *et al.*, “Electrochemical deposition of polypyrrole/graphene oxide composite on microelectrodes towards tuning the electrochemical properties of neural probes”, *Sens. Actuators B Chem.*, vol. 158, n° 1, p. 176–184, 2011.
- [177] D. E. Discher, P. Janmey, e Y. Wang, “Tissue Cells Feel and Respond to the Stiffness of Their Substrate”, *Science*, vol. 310, n° 5751, p. 1139–1143, nov. 2005, doi: 10.1126/science.1116995.
- [178] R. G. Wells, “The role of matrix stiffness in regulating cell behavior”, *Hepatology*, vol. 47, n° 4, p. 1394–1400, 2008.
- [179] J. Y. Park, S. J. Yoo, E.-J. Lee, D. H. Lee, J. Y. Kim, e S.-H. Lee, “Increased poly(dimethylsiloxane) stiffness improves viability and morphology of mouse fibroblast cells”, *BioChip J.*, vol. 4, n° 3, p. 230–236, set. 2010, doi: 10.1007/s13206-010-4311-9.