

Síntese e Aplicação de Nanotubos de Carbono em Biotecnologia
Edelma Elete da Silva
Orientador: Prof. Luiz Orlando Ladeira
Co-orientador: Prof. Rodrigo Gribel Lacerda

Março 2007

EDELMA ELETO DA SILVA

Síntese e Aplicação de Nanotubos de Carbono
em Biotecnologia.

Belo Horizonte – 2007

Universidade Federal de Minas Gerais - UFMG

Síntese e Aplicação de Nanotubos de Carbono em Biotecnologia.

Tese apresentada ao Departamento de Pós Graduação de Física da Universidade Federal de Minas Gerais em preenchimento parcial dos requisitos para obtenção do grau de Doutor em Física.

Orientador: Prof. Luiz Orlando Ladeira.

Co-orientador: Prof. Rodrigo Gribel Lacerda

Belo Horizonte – 2007

Folha de aprovação



A minha família
e aos meus Orientadores



Agradecimentos

Sou imensamente grata ao professor Luiz Orlando Ladeira, pelos valiosíssimos ensinamentos, a excelente orientação, as grandiosas idéias, a invejável empolgação destinada a este trabalho, e principalmente ao companheirismo durante toda minha estada na UFMG.

Gostaria de agradecer ao professor Rodrigo Gribel Lacerda, meu co-orientador, que desde sua chegada fez crescer, de maneira surpreendente, as atividades de pesquisa dentro do Laboratório de Nanomateriais, com muitos alunos, colaborações interdisciplinares e interinstitucionais, sem esquecer da paciência e dedicação dados a todos. Ao professor André Ferlauto que me auxiliou desde as primeiras sínteses via CVD até na revisão desta tese. Ao Sérgio Oliveira, que me ajudou a crescer como pesquisadora e pessoa, sendo professor, conselheiro, entusiasta e amigo.

Meus sinceros agradecimentos aos professores e respectivos orientados que abriram as portas de seus laboratórios, contribuindo assim para a realização deste trabalho:

No departamento de Física: aos professores Roberto Moreira e Ariete Righi do Laboratório de Espectroscopia de Infravermelho, aos professores Marcos Pimenta e Ado Jório do Laboratório de Espectroscopia Raman, ao professor Luiz Cury do Laboratório de Ótica de Semicondutores ao professor Matias do Laboratório de Sistemas não lineares - Caos ao professor Pedro Barbosa do laboratório de fluidos complexos aos professores Klaus Krambrock e Maurício V. Pinheiro do Laboratório de Ressonância Paramagnética a professora Karla Balzuweit, ao Garcia e ao Willian do Laboratório de Microanálise, ao professor Bernardo Neves do Laboratório de Nanoscopia e ao professor Nivaldo Speziali do Laboratório de Difração de Raios-X.

No Departamento de Química: A professora Gláucia G. Silva do Laboratório de Materiais e a Professora Rossimiriam P.F. Gil do Laboratório de Química Orgânica e Síntese.

No Departamento de Biologia e Odontologia: o professor Mauro Teixeira do Laboratório de Imunologia, o professor Gregory Kitten do Laboratório de Morfologia, o professor Ari Corrêa do Laboratório de Botânica, a professora Tarcila A. da Silva da Odontologia e as professoras Maria de Fátima Leite e Patrícia Valério e do laboratório de Fisiologia e biofísica e a professora Silvia Carolina G. Fonseca do laboratório Eletrocel.

No CDTN ao professor José Domingos do laboratório de física de superfícies e as professoras Adelina P. Santos e Classídia A. Furtado dos laboratórios de nanomateriais.

No Departamento de Bioengenharia ao professor Marcos Pinnote, ao veterinário Luiz Fernando Ferreira e demais colaboradores.

Nas oficinas mecânica, eletrônica e criogenia ao Sr. João Batista, Joércio, Raimundo, Gilberto, Rubéns, Cloves e Valter.

No departamento de Metalurgia ao professor Herman Mansur.

Na Universidade Federal do Ceará ao professor Valder N. Freire, Júlio Góes.

E aos colegas e amigos que me auxiliaram dia após dia.

Débora Pinto, Rafael Gonçalves, Blanda, Erick Ávila, Rodrigo Guimarães, Daniel Bretas, Leonardo Campos e Leonardo Rodrigues, Além-Mar, Gustavo Catão, Marina Ladeira, Marcelo Valadares, Giselle.



**...Trabalhar com vocês foi uma experiência
Única e inigualável!**

C A R B O N I O S I T O S
C A R B O N I O S I T O S
N A O
N I S
C O M P O S I T O S
T P O E
U L S C
B A I
O N O D
S T O
E S
S

Resumo

A possibilidade de reconstituição dos tecidos ósseos nos incentivou a buscar novos materiais para a formação de um compósito que fosse biocompatível, biofuncional e que possuíssem as principais características físicas de um arcabouço de crescimento de tecidos. Por exemplo, a mistura de nanotubos de carbono com outros materiais como polímeros podem gerar compósitos inteligentes com novas propriedades elétricas e mecânicas. Apesar do uso de polímeros apesar ter aumentado enormemente nas últimas décadas, este ainda tem seu uso muito limitado na área biomédica devido a sua baixa biocompatibilidade. Uma alternativa viável para substituição destes polímeros é o colágeno, que é uma biomolécula que se estrutura em forma de uma matriz altamente porosa. Baseados nesta característica e nas possíveis variações estruturais que podem ser causadas pelos NTC ao se incorporar nesta matriz começamos a desenvolver esse trabalho que envolve aspectos de pesquisa e desenvolvimento na área de biotecnologia. Além disso, o estudo de compósitos de colágeno e nanotubos de carbono, de modo a construir nanoestruturas que possam substituir estruturas biológicas, permitindo sua regeneração, restauração e manutenção da sua função. Nesta dissertação iremos trabalhar com dois sistemas nanométricos de grande importância: o colágeno, que é uma seqüência de moléculas de aminoácidos; e o NTC, que é um conjunto de átomos de carbono ordenados nanoscopicamente em forma de tubos, visando modificar, melhorar e criar novas aplicações nas áreas de reconstrução de tecido e biointegração.

O objetivo principal deste estudo é a construção de estruturas que possam ser colocadas em substituição a perdas de tecido, de modo a prover suporte para o meio extracelular, bem como permitir que células hospedeiras recriem um novo tecido natural. Para que este objetivo fosse alcançado foi necessária uma grande quantidade de NTC e conseqüentemente, o desenvolvimento do crescimento destas estruturas em larga escala. Como primeiro passo de desenvolvimento deste trabalho a realização de síntese em larga escala de NTC via deposição química na fase vapor (CVD) pela pirólise do gás hidrocarboneto sobre suportes cerâmicos. Na segunda parte de deste projeto, realizei o estudo da incorporação de NTC em matrizes biodegradáveis (colágeno) para promover a formação do biocompósito colágeno: NTC. O biocompósito, como previsto, sofreu alterações em sua resistência mecânica tornando-se muito superior a matriz de colágeno puro, o que torna viável a utilização dos mesmos para reparos de imperfeições ósseas. Isto foi possível por causa das características morfológicas superiores e baixa toxicidade que possibilitaram uma reação tecidual favorável, uma maior estabilidade química dos componentes, e um maior estímulo a atividade celular na formação da matriz óssea, não havendo reações de hipersensibilidade promovendo a osteointegração este material.

Abstract

Recent advances on bone tissue engineering led us to search new materials that are biocompatible, with different active bio functions and characteristics which are similar to real growth tissues. Recently, it has been demonstrated that new composites with improved mechanical and electrical properties can be created by the introduction of small amounts of carbon nanotubes (CNT) into other matrices (like polymers). However, in spite of the considerable amount of studies performed in polymers in these last decades, its low degree of biocompatibility has hindered its wide use in biomedicine. An alternative and interesting material for a composite would be the use of collagen. Collagen is a biomolecule that has a highly porous matrix. Based on this characteristic we propose to develop a new biomaterial composed by a mixture of collagen and carbon nanotubes. This new biocomposite is a scaffold that can have important implications in a wide range of biotechnology areas. This material has the potential to substitute biological structures, to allow a more effective tissue regeneration, restitution and physical properties. Additionally, the focus of the work involves two nanometer size systems of great interest: the collagen which is a sequence of amino acids and the CNT that is composed by atoms of carbon in the form of tubes.

The main focus of present thesis was to develop new structures that can be used for tissue regeneration, support for cellular growth, and to permit host cells to create new tissue. Firstly, a large scale synthesis method was developed via chemical vapor deposition (cvd) using ethylene over ceramic oxides like MgO. Secondly, I studied the incorporation of CNT into the scaffold (collagen) to form biocomposite. It was verified that the biocomposite had improved mechanical properties when compared with the pure collagen scaffold. The altered mechanical resistance superiority than scaffold of pure collagen. This material has also proved to repair a bone imperfection and indicated to have a rapid adherence to the wound area when implanted. This was possible due to the enhanced morphological characteristics of the composite and due to its low toxicity that can be favorable for tissue reaction and to improve cellular activity in the form of a bone scaffold.

Sumário

Lista de figuras	14
Lista de tabelas	19
1. Introdução	20
1.1. <i>Nanotubos de carbono</i>	24
1.2. <i>Colágeno</i>	29
1.3. <i>Compósitos</i>	33
1.4. <i>Biocompósitos</i>	34
Referência bibliográfica.....	37
2. Síntese de nanotubos de carbono	39
2.1. <i>Processo de síntese de nanotubos de carbono por deposição química na fase vapor.</i>	39
2.2. <i>Preparo do catalisador para deposição química na fase vapor</i>	41
2.3. <i>Caracterização do catalisador</i>	43
2.4. <i>Caracterização dos nanotubos de carbono via deposição química na fase vapor</i>	49
2.5. <i>Processo de síntese de nanotubos de carbono por arco elétrico</i>	61
2.6. <i>Caracterização dos nanotubos de carbono via arco elétrico</i>	64
Referências bibliográficas.....	67
3. Purificação de nanotubos de carbono.	69
3.1. <i>Nanotubos de carbono via deposição química na fase vapor</i>	72
3.2. <i>Nanotubos de carbono via arco elétrico</i>	76
Referências bibliográficas.....	82
4. Nanotubos de carbono funcionalizados.....	83
4.1. <i>Carboxilação</i> :.....	84
4.2. <i>Ácido oxálico</i>	91

4.3.	<i>Alendronato de sódio</i>	95
4.4.	<i>Ouro</i>	100
4.5.	<i>Hidróxido de amônia</i>	102
4.6.	<i>L-alanina</i>	106
4.7.	<i>Nanotubos de carbono- RNA INF24</i>	111
4.8.	<i>Polissacarídeos</i>	115
4.9.	<i>Solubilidade de nanotubos de carbono funcionalizados em solução aquosa.</i>	120
Referências bibliográficas		122
5. Nanotubos de carbono curtos		123
Referências bibliográficas		130
6. Compósito de NTC e colágeno		131
6.1.	<i>Extração do colágeno e produção do compósito</i>	133
6.2.	<i>Análise térmica</i>	140
6.3.	<i>Ensaio de Tração</i>	142
6.4.	<i>Hidratação dos compósitos</i>	145
6.5.	<i>Hipóteses de interações</i>	149
Referências bibliográficas		153
7. Mineralização de nanoestruturas		154
7.1.	<i>Teste in vitro</i>	157
7.2.	<i>Teste in vivo</i>	170
Referências bibliográficas		177
8. Conclusão		178
A. Anexo		180
1.	<i>Caracterizações utilizadas</i>	180
1.1.	<i>Microscopia de força atômica</i>	180
1.2.	<i>Microscopia eletrônica de varredura</i>	181

1.3.	<i>Espectroscopia Raman</i>	181
1.4.	<i>Análise termogravimétrica</i>	182
1.5.	<i>Espectroscopia na infravermelho (modo transmissão)</i>	182
1.6.	<i>Microscopia eletrônica de transmissão</i>	183
1.7.	<i>Preparação de amostra para medida de solubilidade</i>	183
B.	Anexo	184
1.	<i>Toxicidade</i>	184
1.1.	<i>Efeito da adição de nanotubos na viabilidade celular em uma cultura de macrófagos murinos</i>	186
1.2.	<i>O efeito dos nanotubos de carbono em soluções para proliferação de osteoblastos e produção de fosfatase alcalina</i>	188
1.3.	<i>Cultura de osteoblastos</i>	190
1.4.	<i>Transfecção de nanotubos de carbono funcionalizados com si-RNA1</i>	191
1.5.	<i>Novo método de transporte em células usando nanotecnologia: Transporte SWNT cobertos por inf-24 em germinados tubos de <i>Uromyces appendiculatus</i></i>	194
	Referências bibliográficas	198

Lista de figuras

Figura 1-1: Vetores que descrevem a rede grafítica dos nanotubos de parede simples	25
Figura 1-2: Tipos de nanotubos de carbono monocamada segundo orientação de suas redes cristalinas(a) nanotubos armchair (5,5), (b) nanotubos zigzag (9,0) e (c) nanotubos chiral (10,5).....	25
Figura 1-3: Exemplos de vetores quirais possíveis. Os círculos maiores indicam nanotubos metálicos, enquanto os círculos menores, nanotubos semicondutores.	27
Figura 1-4: Estrutura do colágeno indicando a cadeia alfa.....	30
Figura 1-5: Estrutura do colágeno a)cadeias de tripleto presente nas matrizes de colágeno b) tropocolágeno c) hélice tripla ¹⁴	31
Figura 2-1: Desenho esquemático do sistema de crescimento de nanotubos de carbono por CVD....	40
Figura 2-2: Curva de perda de massa por aquecimento durante a calcinação	44
Figura 2-3: Isoterma de absorção e dessorção de hidrogênio no catalisador Fé:Mo/MgO com variação molar de MgO.	45
Figura 2-4: Espectros Mössbauer a temperatura ambiente do catalisador Fe:Mo/MgO tratado termicamente em diferentes temperaturas em atmosfera de argônio. As linhas cinza contínuas são associadas à fase $Fe_{1-x}Mg_xO$; as linhas cinza pontilhadas estão associadas a dois tipos de fase da magnetita e a linha pontilhada preta é associada à fase $Fe_{1-x}Mo_xO_y$	47
Figura 2-5: Áreas relativas dos sub-espectros das três fases observadas nos espectros Mössbauer a temperatura ambiente: fase óxido de ferro magnésio (retângulos); Fe_3O_4 (Triângulos) e $Fe_{1-x}Mo_xO_y$ (estrelas).....	48
Figura 2-6: Difractogramas de raios-X das amostras tratadas termicamente em diferentes temperaturas sob atmosfera de argônio. (a) – MgO; (b) – $Fe_{1-x}Mg_xO$; (c) – Fe_3O_4 ; (d) – MoO_2 e (e) – $FeMoO_4$	49
Figura 2-7: Imagens de MEV de amostras de NTC crescidos sobre Fe:Mo/MgO utilizando diferentes temperaturas de síntese, T (a) T=500°C, (b) T=600°C, (c) T=700°C, (d) T=800°C, (e) T=900°C, e (f) T=1000°C	50
Figura 2-8: MET de NTC em sínteses à temperatura de a) 700°C e b) 900°C	51
Figura 2-9: Espectro Raman de NTC (a) Região da banda G e (b) RBM (usando comprimento de onda 514,5nm).....	53
Figura 2-10: Mostra a dependência da temperatura com o rendimento do processo de produção de NTC.....	54
Figura 2-11: Foto barquinho a)catalisador e b) NTC para comparação de volume acrescido no processo	55
Figura 2-12: Rendimento da síntese de NTC (a) comparação entre concentração do catalisador e rendimentos (b) dependência da temperatura com o rendimento	56
Figura 2-13: Imagem de microscopia eletrônica de varredura onde são indicadas nanopartículas de óxido de magnésio.....	58

Figura 2-14 Os espectros Mössbauer de transmissão, obtidos à temperatura ambiente, do catalisador sem qualquer tratamento térmico e das amostras de nanotubos de carbono crescidos a 500, 600, 775 e 900°C. A linha contínua em cinza claro está associada à fase $Fe_{1-x}Mg_xO$. A linha contínua em cinza está associada à fase $Fe_{1-x}O_x$, as linhas pontilhadas cinza estão associadas à carvão e as em preto estão associadas à solução sólida $\gamma-Fe(C)$	59
Figura 2-15: Área espectral das fases do nanotubos de carbono	60
Figura 2-16: Desenho esquemático de um sistema de síntese por arco elétrico.....	62
Figura 2-17: Foto da parte interna da câmara após deposição de NTC, usando catalisador C/Ni/Y à 550Torr em atmosfera de hélio e com 100A e 17V.....	64
Figura 2-18: NTPS sintetizado via arco elétrico a) MEV, b) MET	65
Figura 2-19: Espectroscopia Raman	66
Figura 3-1: Curva de TG referente a queima de NTC a) purificados e b) não purificados em nanotubos sintetizados via CVD.	73
Figura 3-2 MEV de NTC e NTC purificado	74
Figura 3-3: MET de NTC sintetizados via CVD a) não purificados e b) purificado	75
Figura 3-4: Espectroscopia Raman de NTC	76
Figura 3-5: Curvas TG e DTG da decomposição térmica dos NTC a) purificados e b) não purificados	78
Figura 3-6: MEV de comparativos NTC purificados e não purificados.....	79
Figura 3-7: MET de NTC sintetizados via arco elétrico não purificados na primeira linha e purificado na segunda linha	80
Figura 3-8: Espectroscopia Raman de NTC sintetizado via arco elétrico e deste NTC purificado. ...	81
Figura 4-1: Nanotubos de carbono carboxilados.....	85
Figura 4-2: Espectroscopia IR de NTC carboxilado	86
Figura 4-3: Análise térmica dos NTC	87
Figura 4-4: AFM dos NTC COH	88
Figura 4-5: Solubilização instantânea dos NTC funcionalizados com carboxila.	89
Figura 4-6: MEV de NTC COOH.	90
Figura 4-7: Espectroscopia Raman de NTC funcionalizados com carboxila.	90
Figura 4-8: NTC – ácido oxálico.....	92
Figura 4-9: Infravermelho das funcionalizações com ácido oxálico, ácido nítrico e oxálico e a anterior com tratamento térmico de 200°C por 3 horas.	93
Figura 4-10: Espectroscopia Raman de NTC funcionalizado com ácido oxálico e nítrico.	94
Figura 4-11: MEV NTC funcionalizados com a) ácido oxálico e b) ácido oxálico e nítrico.	95
Figura 4-12: AFM de NTC bifosfonados sobre substrato de silício.	97
Figura 4-13: Espectro IR do NTC funcionalizado com Alendronato de sódio.....	98
Figura 4-14: Espectroscopia Raman de NTC funcionalizados com alendronato.....	99
Figura 4-15: AFM dos NTC decorados com ouro	101
Figura 4-16: Espectroscopia Raman dos NTC decorados com ouro.....	101

Figura 4-17: NTC funcionalizado com amônia	103
Figura 4-18: NTC em água a) purificado, b) funcionalizado com amônia, c) o anterior com tratamento térmico à 150°C.....	103
Figura 4-19: AFM de NTC funcionalizado com hidróxido de amônia.	104
Figura 4-20: Espectroscopia IR NTC amônia e após tratamento térmico.....	105
Figura 4-21: Espectroscopia IR da a) NTC carboxilados, b) L-alanina e c) NTC com L-Alanina...	108
Figura 4-22: AFM de nanotubos funcionalizados com L-alanina.....	109
Figura 4-23: MEV de NTC funcionalizados com L-alanina.....	109
Figura 4-24: Foto de parte da simulação da interação entre a) NTC e L-alanina e b) NTC-COOH e L- alanina	110
Figura 4-25: AFM NTC funcionalizados com oligonucléicos.....	112
Figura 4-26: Espectro Raman dos CNT funcionalizados com o oligonucléico Inf24.....	113
Figura 4-27: Espectroscopia IR NTC INF.....	114
Figura 4-28: IR de polissacarídeos, goma arábica, NTC funcionalizado com goma arábica e com goma de cajueiro.	117
Figura 4-29: Espectro Raman de NTC e NTC funcionalizado com goma Arábica.....	118
Figura 4-30: Gráfico comparativo de solubilidade entre polissacarídeos com 5% de NTC.....	118
Figura 4-31: Gráfico comparativo de solubilidade de goma arábica com quantidade diferenciada de NTC.	119
Figura 4-32: Gráfico de comparação de solubilidade entre diversos NTC.	121
Figura 5-1: Imagem de AFM de NTC-COOH picotado	124
Figura 5-2: Imagem de AFM de NTC-COOH picotado	125
Figura 5-3: Espectroscopia Raman NTC picotados Espectros Raman: NTC Carboxilado picotado. e NTC picotado não-funcionalizado. As medidas foram feitas no pó de NTC	126
Figura 5-4: Espectroscopia IR NTC picotados.....	127
Figura 5-5: MEV a) nanotubos picotados, b) fio de NTC obtido por centrifugação, c) ampliação de b.....	128
Figura 6-1: Compósito Colágeno: NTC fabricado no laboratório	132
Figura 6-2: Micrografias da estrutura morfológica de colágeno produzidos de a) tendões de ovelha, b) e o compósito originado deste colágeno, c) colágeno produzidos de caudas de rato e d) compósito originado este colágeno, e respectivas ampliações.....	137
Figura 6-3: Espectro IR do compósito de colágeno com NTC	139
Figura 6-4: Espectro Raman do compósito de colágeno com NTC	139
Figura 6-5: Análise térmica de estruturas de compósito e colágeno a) de cauda de rato e b) de tendão de carneiro.	141
Figura 6-6: Exemplo das curvas de tensão versus alongação de filmes colágeno e compósito.	143
Figura 6-7: Distribuição de tensão de ruptura para duas amostragens de colágeno.	145
Figura 6-8: Comparativo entre a hidratação de colágeno e compósito em forma de filme e de suporte 3D.....	147

Figura 6-9: Imagem para comparação de densidade qualitativa.....	147
Figura 6-10: Solubilização de compósitos com diferentes concentrações de nanotubos de carbono.....	148
Figura 6-11: Possibilidades de arranjos de colágeno em NTC.....	151
Figura 6-12: Fragmento de uma hélice do colágeno (seqüência de proteínas) ligada ao NTC.	152
Figura 7-1: Imagens comparativas de HAp sobre substrato de Si, mostrando a mineralização a) solução fisiológica b) solução molar.	158
Figura 7-2: Materiais expostos a solução fisiológica de Ca^{2+} e PO_4^{3-} A) NTC, B) Compósito expostos por 1 semana e C) Nanotubo de carbono e D) compósito expostos por 4 semanas...	159
Figura 7-3: Espectro de Raios-X de HAp sobre substrato amorfo com solução molar.....	160
Figura 7-4: Mineralização sobre NTC-COOH.....	161
Figura 7-5: Difração de raio-X sobre NTC	162
Figura 7-6: Comparação de formação de HAp sobre substrato de Si linha a) sem agitação e linha b) sob agitação com as respectivas ampliações.	163
Figura 7-7: Comparação morfológica de HAp em a) colágeno imerso por 1 semana e c) colágeno imerso há 4 semanas e b) compósito imerso a 1 semana d) compósito imerso por 1 semana ..	165
Figura 7-8: Difração de raio-X das matrizes de a) colágeno e b) compósito.....	166
Figura 7-9: Espectro na região do infravermelho para estrutura do colágeno e do compósito.	167
Figura 7-10: Desenho esquemático da relação entre a interface do compósito de HAp e Colágeno ⁸	169
Figura 7-11: Desenho esquemático da relação entre a interface do NTC e da HAp.....	169
Figura 7-12: Passos da cirurgia em fêmur de cão.....	171
Figura 7-13: Radiografias para acompanhamento de reestruturação óssea. a e b primeiro dia, c e d trinta dias após a cirurgia.	173
figura 7-14: Fotomicrografias das regiões implantadas com a) controle b) colágeno c) compósito COOH - As setas menores indicam a área de ossificação, as setas maiores indicam os limites do defeito ósseo, As setas brancas indicam o colágeno:nanotubo carboxilado, a área delimitada indica o tecido conjuntivo com intenso infiltrado inflamatório.	175
Figura B-1: Viabilidade celular.....	187
Figura B-2: Produção de fosfatase alcalina em culturas contendo NTC.....	189
Figura B-3: Proliferação de osteoblastos	189
Figura B-4: Secreção de colágeno.....	190
Figura B-5: Histogramas de proliferação celular e produção de fosfatase alcalina por osteoblastos.	191
Figura B-6: IMF em células SK-Hep 1 para InsP3 R III. NTC Picotado adicionados á diferentes concentrações de siRNA funcionam como um eficiente agente de transfecção.....	193
Figura B-7: Desenvolvimento percentual de apressórios em diferentes CNT.....	195
Figura B-8: Desenvolvimento percentual de apressórios em U appendiculatus tratados com NTC funcionalizados com inf24 s em diferentes concentrações.	196

Figura B-9: Desenvolvimento percentual de apressórios em *U appendiculatus* tratados com NTC
funcionalizados com inf-24 RC em diferentes concentrações..... 196

Lista de tabelas

Tabela 2-1: Catalisador Fe:Mo/MgO com variação molar de MgO comparação de volume absorvido, diâmetro dos poros e área superficial.....	45
Tabela 4-1: Freqüências de vibração do IR da molécula de amônia.....	106
Tabela 6-1 Tensão na ruptura (MPa), e módulo elástico (MPa) para colágenos, compósitos e outras matrizes poliméricas.....	144

1. Introdução

Em 1959, no Encontro da Sociedade Americana de Física no Caltech, Richard Feynman, instigou a curiosidade dos pesquisadores em sua palestra “There’s plenty of room at the bottom”. Abordando perspectivas da miniaturização, ele profetizou o início de uma nova maneira de pensar os processos e construção de estruturas moleculares, invertendo a direção usual da construção de dispositivos. Sua idéia propunha construir dispositivos ou estruturas funcionais a partir das moléculas ou entidades supramoleculares, ou seja, dos constituintes básicos da matéria no lugar da abordagem convencional da escala macro em direção ao micro (miniaturização). Materiais e dispositivos produzidos em escala menores apresentam propriedades físico-químicas exóticas devido ao aparecimento de efeitos quânticos, redução de tamanho, grande área interfacial e rapidez de operação, abrindo uma oportunidade enorme à criatividade humana em vários segmentos da ciência e tecnologia.

Em particular, uma classe de materiais criados pelo homem usados em nanotecnologia são os materiais nano estruturados de carbono, tais como: fullerenos sintetizados em 1985¹ e os nanotubos de carbono descobertos por Ijima em 1991². Tais materiais de carbono, hoje apresentam um grande interesse de pesquisa em física da matéria condensada, bem como em outras áreas de conhecimento como química, petroquímica, ciência, engenharia de materiais, eletrônica, informática, biomateriais e medicina. Nos últimos anos, a pesquisa em nanotubos de carbono (NTC) se tornou extremamente ampla e diversificada abrindo novos campos de estudo e grandes perspectivas de aplicação em todas as áreas acima mencionadas com um caráter altamente multidisciplinar, permeando grande parte do conhecimento. Existe na literatura atual uma vasta bibliografia a respeito das propriedades físicas, eletrônicas e mecânicas dos NTC, uma boa referência deste assunto é Dresselhaus³.

Os NTC podem ser considerados como sistemas unidimensionais e dependendo de seu raio e simetria (ou quiralidade), podem se comportar como um metal ou semicondutor. Devido a forte ligação covalente de seus átomos, os NTC possuem uma alta condutividade térmica e uma grande resistência mecânica. Os NTC podem ser encontrados com parede simples (NTPS) ou com paredes múltiplas (NTPM)⁴.

Atualmente, o potencial de aplicações dos NTC é imenso devido a suas propriedades como grande área superficial e excelentes propriedades termomecânicas, que possibilita a aplicação em sensores, filtro sem membranas e também na criação de novos biomateriais como compósitos na engenharia de reconstrução de tecidos⁵.

A mistura de NTC com outros materiais (como polímeros e polímeros biocompatíveis) pode gerar compósitos inteligentes com novas propriedades elétricas e mecânicas. Embora o uso de polímeros tenha aumentado enormemente nas últimas décadas, o seu uso na área biomédica é ainda muito limitado devido a sua baixa biocompatibilidade. O estudo destas estruturas visa o estudo e o desenvolvimento de novos biomateriais baseados em compósitos de NTC e colágeno, visando modificar, melhorar e criar novas aplicações nas áreas de reconstrução de tecido e biointegração. Desta forma, esse estudo envolve aspectos de pesquisa e desenvolvimento na área de biotecnologia, como o estudo de compósitos de colágeno e nanotubos de carbono, de modo a construir nano estruturas que possam substituir estruturas biológicas, permitindo sua regeneração, restauração e manutenção da sua função através da interação destes dois sistemas nano métricos de grande importância: o colágeno, que é uma seqüência de moléculas de aminoácidos; e o NTC, que é um conjunto de átomos de carbono ordenados nanoscopicamente em forma de tubos.

O objetivo principal deste estudo é a construção de estruturas que possam ser colocadas em substituição a perdas de tecido, de modo a prover suporte para o meio extracelular, bem como permitir que células hospedeiras recriem um novo tecido natural.

Este tipo de estudo pode ser efetuado graças ao desenvolvimento da implantologia, que tem dado incentivo a pesquisas em biomateriais, que buscam o conhecer as reações que ocorrem na interface tecido-implante. Inicialmente, os implantes eram feitos com a utilização de materiais inertes como aços inoxidáveis e alumina. A partir dos anos 70, Per-Ingvar Brånemark introduziu o conceito de osteointegração como sendo a ligação direta, estrutural e funcional entre osso ordenado e vivo e a superfície de um implante sujeito a cargas funcionais. Com a introdução desse conceito, as pesquisas passaram a se concentrar em materiais e projetos, visando acelerar a osteointegração, ou seja, diminuir o tempo necessário

para a reposição óssea. O biomaterial sempre deve permitir um crescimento sustentado do osso vizinho, promovendo contato direto entre o osso e o material, para que ocorra o fenômeno da osteointegração. O interesse pela hidroxiapatita (HAp) como um biomaterial está então relacionado com o fato desta ser a principal fase mineral encontrada no tecido ósseo e ter alta biocompatibilidade. Colágeno pode ser usado como arcabouço de HAp por ser um agente de união biocompatível e reabsorvível, responsável pela prevenção da migração das partículas de HAp até sua incorporação no tecido.

Sabendo destes argumentos, começamos a estudar a incorporação da HAp sobre os materiais por nós estudados, isto é NTC, colágeno e compósitos. Para verificar se com uma pequena concentração de grupos fosfato “buscadores” de íons Ca^{2+} seria possível obter respostas bem parecidas com as já encontradas com a utilização de HAp, sem que ela esteja presente no material de implante, utilizando o metabolismo do próprio corpo para sintetizá-la. Várias técnicas de avaliação da adequação de um novo material para aplicações biomédicas têm sido desenvolvidas em uma tentativa de simular do desempenho do material após sua inserção no corpo humano. Essas técnicas compreendem testes *in vitro* e *in vivo*. Para testes *in vitro*, são utilizados normalmente testes de bioatividade em líquido corporal simulado e estudos em cultura de células. Os estudos em cultura de células normalmente compreendem testes de citotoxicidade, medições bioquímicas de atividade celular, avaliação de proliferação, crescimento e morfologia celular. Durante o desenvolvimento deste estudo, a manipulação de materiais biológicos e os procedimentos necessários para testá-los foram realizados em colaboração com professores do Instituto de Ciências Biológicas da UFMG, que se mostraram altamente interessados neste trabalho. Vale então ressaltar o caráter multidisciplinar do presente trabalho e agradecer as colaborações externas e disponibilização de seus laboratórios, indispensáveis para sua realização.

Porém, antes de serem fabricados os compósitos, foi realizado o estudo e desenvolvimento das matérias primas para a fabricação do compósito. Para isto, a primeira etapa da tese foi dedicada ao estudo experimental que compreendia a busca pelo catalisador ideal para produção de NTC, o desenvolvimento de procedimentos para viabilizar a produção em larga escala, a promoção de mudanças superficiais

destes NTC para permitir a utilização dos mesmos no desenvolvimento de um novo compósito utilizando colágeno e a sua posterior aplicação.

No capítulo 2, será mostrada a síntese dos NTC por duas técnicas, a saber: deposição via descarga de arco elétrico, desenvolvida desde 2000 e a técnica de deposição química na fase vapor (CVD), desenvolvida desde 2002, com a compra do forno de decomposição química na fase vapor no laboratório de nanomateriais. Neste período foram iniciados os estudos e desenvolvimento de catalisadores e de técnicas de deposição. Inicialmente a produção era em pequena escala, mas com o desenvolvimento dos catalisadores e das sínteses o rendimento na produção de NTC foi aumentando, e obtivemos um processo de síntese em larga escala. Durante esses estudos foram sendo desenvolvidas técnicas de purificação e funcionalização que causam mudanças superficiais, para promover aplicabilidade aos NTC. Estas técnicas serão descritas nos capítulos 3, 4 e 5, mostrando processos de purificação específicos para cada tipo de NTC e alguns processos de funcionalização e de picotamento destes NTC.

No capítulo 6 será apresentado o compósito produzido a partir de colágeno e NTC, um material desenvolvido no nosso laboratório, e que nos proporcionou a primeira patente nacional sobre compósitos com matriz de colágeno utilizando NTC. Esta patente foi depositada no Instituto Nacional de Propriedade Industrial (INPI) sob o número PI0601751, em 12/04/06. Neste capítulo também serão apresentadas as caracterizações e diferenças entre o compósito e o colágeno.

No capítulo 7 será apresentado o processo de mineralização dos NTC e compósitos. Seguidos da conclusão e de anexos onde estarão detalhadas as preparações de amostras para as caracterizações utilizadas no desenvolvimento deste trabalho. E serão relatadas algumas publicações sobre toxicidade e alguns trabalhos iniciados em colaboração com professores do Instituto de Ciências Biológicas e da Escola de Odontologia

1.1. Nanotubos de carbono

Os NTC são formas metaestáveis de carbono resultante do enrolamento de um plano de átomos de carbono em hibridização sp_2 com diâmetro típico da ordem de 1 nm e comprimento na ordem de 3-10 μm . Com diâmetro na ordem de 1 nm, efeitos quânticos de confinamento levam este material a ser considerado um sistema unidimensional e suas propriedades eletrônicas dependentes de sua cristalografia, ou seja, seu raio e simetria (ou quiralidade), podendo se comportar como um metal ou semicondutor. A forte ligação covalente de seus átomos proporciona aos nanotubos de carbono características de um material com alta resistência mecânica, e seu caráter metálico, uma alta condutividade térmica e elétrica. Além disso, a ausência de ligações pendentes dá a este material grande inércia química, fundamental, para o seu uso em aplicações biotecnológicas e bioquímicas.

Este material se apresenta em duas formas distintas, a saber:

1. com parede simples (NTPS) formado de uma única folha de grafeno enrolada em várias direções em relação aos hexágonos de carbono (helicidade) com diâmetro e as propriedades eletrônicas dependentes.
2. com paredes múltiplas formado de três ou mais folhas de grafeno enroladas concêntricamente com helicidade aleatória característica de estruturas turbostráticas.

A maioria das propriedades dos NTPS depende do seu diâmetro e ângulo quiral, também chamado helicidade. Estes dois parâmetros, diâmetro e helicidade, são cristalograficamente definidos por dois índices (n,m) conhecidos como índices de Hamada⁶. Como é mostrado na figura 1-1, um nanotubo de carbono de parede simples pode ser construído por uma folha de grafite enrolada de tal forma, que coincidam dois sítios cristalograficamente equivalentes de sua rede hexagonal. O vetor \vec{C}_h chamado chiral, que define a posição relativa dos dois sítios sendo definido mediante dois números inteiros (n,m) e pelos vetores unitários da rede hexagonal \vec{a}_1 e \vec{a}_2 ($\vec{C}_h = n\vec{a}_1 + m\vec{a}_2$). Um tubo é chamado “armchair” se $m=n$, e “zigzag” quando

$m=0$ e quiral em todos os outros casos ($n \neq m \neq 0$) e estão definidos pelo ângulo de helicidade θ . Se θ varia de 0° a 30° podemos gerar tubos partindo do tipo “armchair” até o “zigzag” como limites, passando pelos tubos “chiral”. Na figura 1-2 são mostrados os três tipos de tubos mencionados.

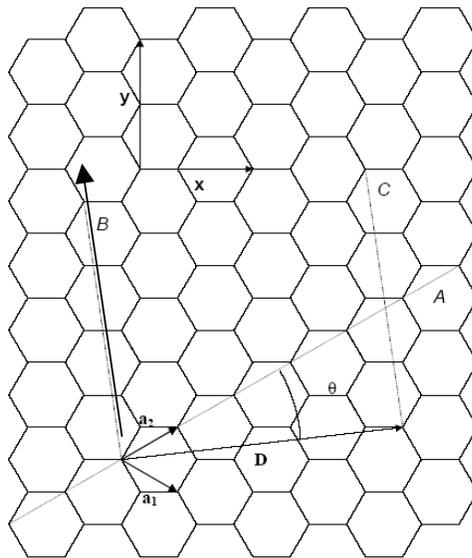


Figura 1-1: Vetores que descrevem a rede gráfica dos nanotubos de parede simples ⁷

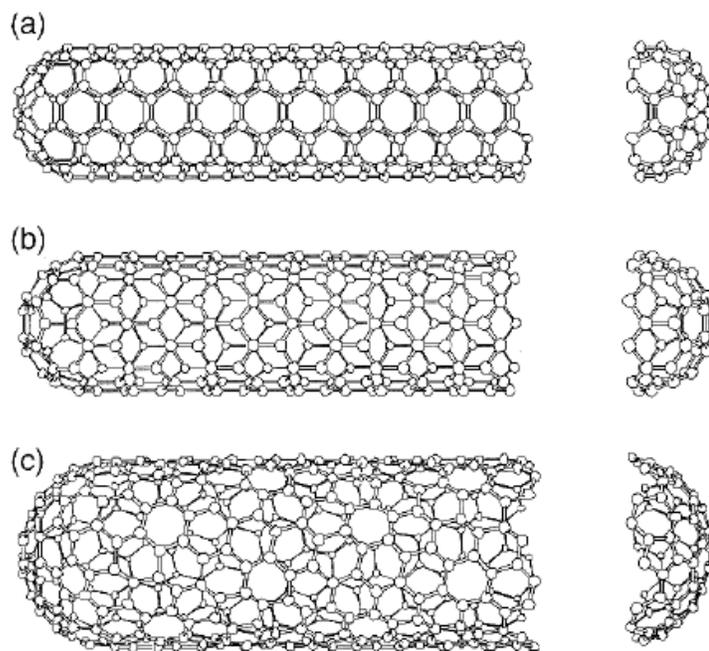


Figura 1-2: Tipos de nanotubos de carbono monocamada segundo orientação de suas redes cristalinas (a) nanotubos armchair (5,5), (b) nanotubos zigzag (9,0) e (c) nanotubos chiral (10,5) ⁸.

Em termos dos inteiros (n, m) , os diâmetros dos tubos estão definidos por^{7,3}.

$$d = \frac{C_h}{\pi} = \frac{\sqrt{3}a_{c-c}\sqrt{n^2 + nm + m^2}}{\pi}$$

onde a_{c-c} é a distância entre dois átomos vizinhos mais próximos (1,42 Å). O ângulo chiral, é definido por⁷.

$$\theta = \tan^{-1} \left[\frac{\sqrt{3}n}{2m+n} \right]$$

Para estudar as propriedades dos NTC como sistemas unidimensionais, é necessário definir o vetor de rede \vec{T} ao longo do eixo do tubo e perpendicular ao vetor chiral. O vetor \vec{T} define a cela unitária de um nanotubo unidimensional. Seu módulo T corresponde ao primeiro ponto da rede da folha bidimensional do grafite, pelo qual passa a vetor \vec{T} .

A partir da figura 1-1, para um nanotubo chiral, o vetor \vec{T} pode ser escrito da seguinte maneira⁷:

$$\vec{T} = \frac{[(2m+n)a_1 - (2n+m)a_2]}{d_R}$$

cujo módulo é igual a:

$$T = \frac{\sqrt{3}C_h}{d_R}$$

e d_R é definido pela seguinte relação⁷:

$$d_R \begin{cases} d, & \text{se } n-m \text{ não é múltiplo de } 3d. \\ 3d, & \text{se } n-m \text{ é múltiplo de } 3d \end{cases}$$

onde d é o máximo comum divisor de n e m .

A partir do tamanho da cela unitária de um nanotubos bidimensional definido pelos vetores ortogonais \vec{T} e \vec{C}_h , o número de hexágonos, N , por cela unitária de nanotubos chiral resulta em⁷:

$$N = \frac{(n^2 + nm + m^2)}{d_R}$$

sendo que por cada hexágono são considerados 2 átomos de carbono, ou seja, em cada cela unitária existem $2N$ átomos de carbono.

Uma vez que a relação entre o comprimento e o diâmetro dos nanotubos é grande, o movimento de elétrons fica confinado ao longo do comprimento do tubo.

Com isto, os NTC mais finos podem ser considerados como fios quânticos, mostrando densidades de estados eletrônicos unidimensionais com singularidades de Van Hove, acima e abaixo do nível de Fermi, E_F .

Em termos dos índices (n,m) , um nanotubo é metálico quando $n-m$ é múltiplo de 3, em caso contrário é semicondutor^{9,10}. Todos os nanotubos “armchair” são metálicos, enquanto que os “zigzag” e chiral podem ser metálicos ou semicondutores.

Na figura 1-3 está representada uma parte dos vetores quirais que geram todos os nanotubos possíveis, onde 1/3 deles são metálicos, isto é, o conjunto de seus estados permitidos inclui o nível de Fermi, e 2/3, semicondutores. Isso acontece devido à simetria hexagonal da estrutura da lâmina de grafeno.

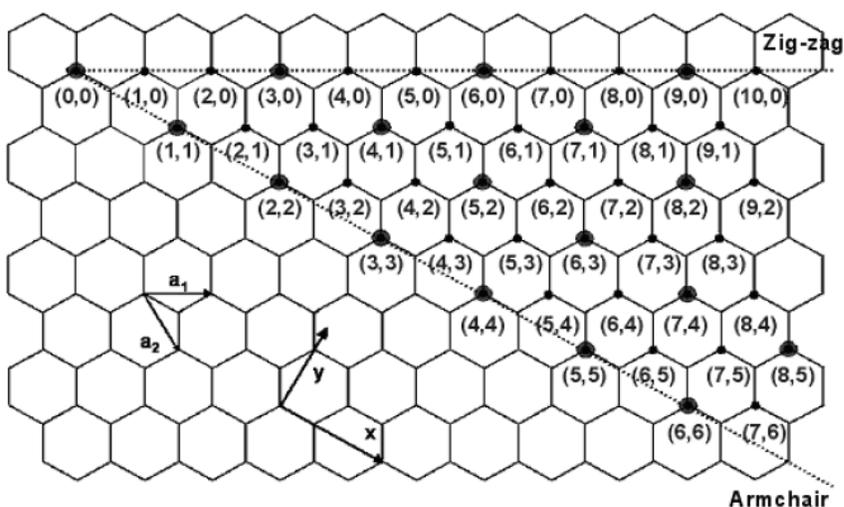


Figura 1-3: Exemplos de vetores quirais possíveis. Os círculos maiores indicam nanotubos metálicos, enquanto os círculos menores, nanotubos semicondutores.

O tipo de condução é determinado pelo subconjunto de estados eletrônicos permitidos no nanotubo. Se o nível de Fermi do grafite estiver contido no subconjunto de estados permitidos, tem-se um nanotubo metálico, caso contrário tem-se um nanotubo semicondutor. Esse resultado é obtido, aplicando-se a condição de contorno periódica¹¹.

$$\mathbf{D} \cdot \mathbf{k} = 2\pi m$$

onde m é inteiro.

A relação de dispersão bidimensional para as bandas π do grafite dada por¹¹.

$$E_{2D} = \pm \gamma_0 \left[1 + 4 \cos\left(\frac{\sqrt{3}k_x a}{2}\right) \cos\left(\frac{k_y a}{2}\right) + 4 \cos^2\left(\frac{k_y a}{2}\right) \right]^{1/2}$$

onde γ_0 é a integral de sobreposição entre primeiros vizinhos. De onde se obtém que todo nanotubo metálico satisfaz a condição $2n_1 + n_2 = 3q$, onde q é inteiro. Portanto, os nanotubos podem se comportar tanto como um metal, quanto um semiconductor.

Nos semicondutores, a condução só é possível quando se fornece a energia necessária para que um elétron da banda de valência possa atravessar a faixa de energia proibida entre ela e a banda de condução. O tamanho dessa zona proibida, ou *gap*, varia conforme o material. Nos nanotubos, o tamanho do *gap* depende do diâmetro dos mesmos¹².

Como se pode notar do que foi exposto acima, os nanotubos podem se comportar tanto como um metal, quanto um semiconductor, como o silício, por exemplo. Nos semicondutores, a condução só é possível quando se fornece a energia necessária para que um elétron da banda de valência possa atravessar a faixa de energia proibida entre ela e a banda de condução. Isso permite que eles sejam ajustáveis. Algo impossível com os materiais semicondutores conhecidos, mas que no futuro, quando se dominar a técnica de síntese de nanotubos de diâmetros bem definidos, pode se tornar realidade. Nos nanotubos multicamadas, a situação é bem mais complexa, uma vez que cada nanotubo monocamada que o compõe pode ser “enrolado” de uma maneira diferente, alternando-se aí nanotubos metálicos e semicondutores.

1.2. Colágeno

Os colágenos constituem uma das famílias de biomoléculas (proteínas) mais abundantes nos tecidos, havendo pelo menos 20 tipos de cadeias que se combinam para produzir formas diferentes com propriedades mecânicas e bioquímicas diferenciadas e adequadas à especificidade dos tecidos.

Na estrutura do colágeno se entrelaçam mais de 10 mil triplas de longos polipeptídeos formando uma grande diversidade de moléculas de colágeno atualmente conhecidas. Nos tecidos duros, o colágeno funciona como um suporte para a deposição mineral. Nos tecidos moles ele forma uma matriz onde se alojam várias substâncias e células. Ele atua na manutenção da forma e da integridade dos tecidos. O colágeno está presente em: glândulas, órgãos internos, vasos sanguíneos e linfáticos, paredes celulares, ossos, pele, ligamentos, tendões, córnea, cristalino ocular, cartilagens, meniscos, discos intervertebrais e plasma sanguíneo.

Os aminoácidos que compõem o colágeno em maior quantidade são: hidroxiprolina, ácido aspártico, treonina, serina, ácido glutâmico, prolina, glicina, alanina, valina, metionina, isoleucina, leucina, tirosina, fenilalanina, hidroxilisina, lisina, histidina, arginina, entre outros.

Sua estrutura molecular consiste em seqüências primárias de proteínas, o que causa diferenças entre os diversos tipos de colágeno. O colágeno pode ter hélice rica em prolinas, hélice rica em glicinas etc. Estes resíduos são os fatores importantes na formação de fibras de colágeno de estrutura de ordem superior.

Nesta tese estudamos a formação de compósito utilizando o colágeno tipo I que é um colágeno fibrilar formado por três cadeias polipeptídicas (alfa) representadas pela figura 1-4, Estas cadeias se organizam em uma conformação tripla hélice, sendo denominada de procolágeno.

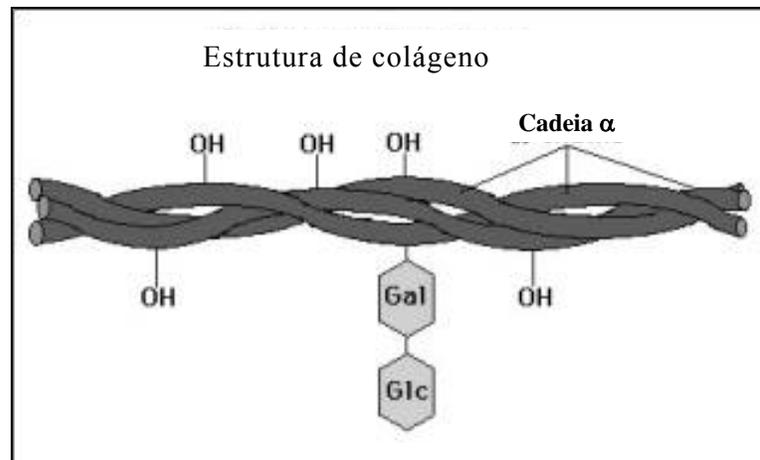


Figura 1-4: Estrutura do colágeno indicando a cadeia alfa¹³

O colágeno é originado no retículo endoplasmático onde ocorre hidroxilação dos aminoácidos prolina e lisina da molécula, além da glicosilação de resíduos hidroxilil nas cadeias em formação. Tanto no início quanto no final da molécula de procolágeno existem expansões polipeptídicas não-helicoidais, sendo denominadas peptídeos de registro.

Ao sair do meio intracelular, ocorre clivagem das extensões, deixando funcionalmente a área central (tropocolágeno), permitindo que as moléculas se organizem em arranjos lineares formando filamentos longos. Esta macromolécula linear semiflexível possui comprimento aproximado de 300 nm e 1,5 nm diâmetro e sua massa molecular média é 300.000 Da. As três cadeias polipeptídicas se dispõem em duas cadeias iguais com 1.055 resíduos de aminoácidos e uma cadeia diferenciada com 1.029 resíduos de aminoácidos ligadas entre si por ligações tipo ponte de hidrogênio e interações eletrostáticas. A sua estrutura primária é caracterizada pela repetição do tripeto Glicina (gly) 33%, Prolina (Pro) 12% e Hidroxiprolina (Hypro) 11% como mostrado na figura 1-5. Este arranjo molecular apresenta grande resistência às forças de tensão e são inelásticas¹⁴.

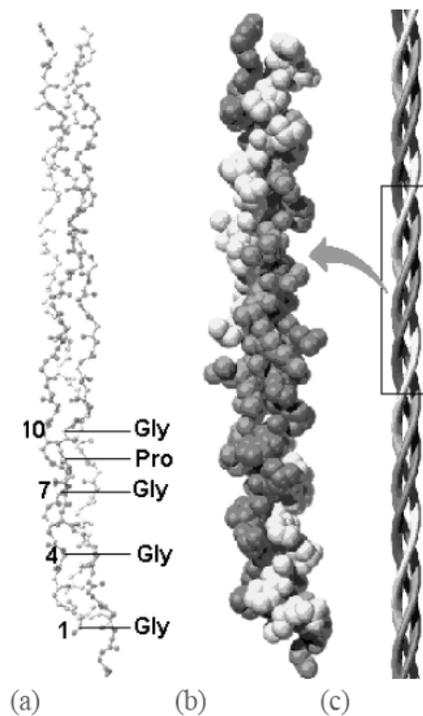


Figura 1-5: Estrutura do colágeno a) cadeias de triplete presente nas matrizes de colágeno b) tropocolágeno c) hélice tripla¹⁴

O colágeno promove elasticidade e resistência à pele, músculos, tendões, meniscos, ligamentos, veias, vasos e artérias, transmissão de luz na córnea, distribuição de fluídos em vasos sanguíneos e linfáticos, no próprio osso, etc. Nos tecidos duros como os ossos, o colágeno funciona como um suporte para a deposição mineral. Nos tecidos moles como a pele, o colágeno forma uma matriz onde se alojam várias substâncias e células. Ele é essencial para a manutenção da forma e da integridade do tecido. No tecido cardiovascular o colágeno forma uma rede através das artérias dando a elas um maior poder de expansão e protegendo de possíveis lesões por excesso de expansão. Outra função importante do colágeno é a sua atuação na agregação, aderência e ativação das plaquetas. Age ainda como fator do mecanismo intrínseco para o sangue coagular¹³.

Devido a estas características, o uso de suportes biodegradáveis na área de engenharia tem aumentado consideravelmente. Baseado no fato de que polímeros naturais que formam a matriz orgânica interagem com receptores específicos na superfície celular e participam ativamente dos processos que regulam a expressão

fenotípica da célula. Portanto o colágeno promove a manutenção morfológica e remodelagem dos tecidos¹⁴.

A partir deste material descrito é possível obter novos biomateriais através de sua mistura com NTC, por exemplo. Estes materiais derivados de misturas são denominados compósitos.

1.3. Compósitos.

Os compósitos são materiais em cuja composição entram dois ou mais tipos de materiais diferentes. Alguns exemplos são misturas de metais e polímeros, metais e cerâmicas ou polímeros e cerâmicas. Os materiais nos quais são feitos os compósitos são usualmente classificados como matriz e reforço. O material matriz proporciona estrutura ao compósito, ele preenche os espaços vazios que ficam entre os materiais reforços e mantendo-os em suas posições relativas. O material reforço é aquele que proporciona variação das propriedades mecânicas, eletromagnéticas ou químicas do material compósito como um todo.

A combinação das propriedades físicas dos NTC com as dos polímeros biocompatíveis abrem um novo campo em direção a uma nova geração de engenharia de tecidos. O que permite seu uso como suporte para crescimento celular e a reconstrução de tecidos naturais sujeitos as altas tensões mecânicas, além de possibilitar alterações em propriedades físicas, tais como condutividade térmica e elétrica, de modo a imitar as condições químicas e físicas existentes no meio biológico natural. Embora o uso de polímeros tenha aumentado enormemente nas últimas décadas, seu uso na área biomédica é muito limitado devido, geralmente, a sua baixa biocompatibilidade. Polímeros usados em aplicações médicas são agrupados em duas categorias: os bioestáveis e os biodegradáveis. Os bioestáveis são suficientemente materiais de vida longa, permitindo seu uso em implantes de longa duração tais como, vasos sanguíneos, válvulas cardíacas e juntas ósseas. Por outro lado, os biodegradáveis são usados em implantes temporários e usualmente decompõem em moléculas menores sendo metabolizadas ou excretadas pelo corpo. Implantes utilizando colágeno como biomaterial hospedeiro podem ser classificados nesta segunda categoria. Seu uso é limitado devido à sua baixa resistência mecânica. Entretanto, com a incorporação de NTC no colágeno a sua resistência mecânica pode ser muito melhorada uma vez que tais nano estruturas possuem resistência mecânica 100 vezes maior que o aço e 1/6 mais leves. Além do aumento da resistência, os NTC possuem alta condutividade térmica e elétrica (6000 siemens/cm), flexibilidade, alta superfície específica (1000 a 1600 m²/g) e biocompatibilidade, que os tornam um material ideal para a criação de biocompósitos biodegradáveis.

O compósito produzido por colágeno e NTC é original, no início de nossas pesquisas nenhum artigo sobre compósito usavam ao mesmo tempo colágeno e NTC.

1.4. Biocompósitos.

Pesquisas que visam à substituição de tecido ósseo, e o conhecimento das propriedades deste tecido e do material nele empregado, são vastamente realizadas desde a obtenção da base científica do implante ósseo.

“A base científica do transplante ósseo foi estabelecida na metade do século IX com observações feitas por OLLIER (1867) sobre as propriedades osteogênicas do osso e periósteo, assim como por FRIEDLANDER (1885), a influência benéfica do frio na preservação dessas características. INCLAN em 1942, e WILSON em 1947-51 publicaram estudos onde descreviam o uso de osso preservado em cirurgia ortopédica. A necessidade de encontrar material de enxerto para as falhas ósseas segmentares criadas no esqueleto vem crescendo dia-a-dia, como se pode evidenciar nas publicações de vários autores”¹⁵.

As substituições dos tecidos ósseos têm incentivado, de uma forma geral, pesquisas em busca de novos materiais também denominados biomateriais. Alguns fatores são fundamentais nas características dos suportes como morfologia, dimensão, distribuição de poros e propriedades mecânicas.

A regulamentação de produtos para a engenharia de tecidos como, por exemplo, os suportes porosos para implantes são normalizados pelas normas ASTM e por órgãos governamentais de países como Canadá, Japão e EUA (LLOYD-EVANS, 2004). A norma ASTM F1185-03, por sua vez, padroniza a composição da hidroxiapatita para implantes cirúrgicos. Os materiais para uso em engenharia de tecido ósseo podem ser cerâmicos tais como fosfatos de cálcio, vidro bioativo, vidro-cerâmico, alumina e zircônia. Podem também ser poliméricos (naturais ou sintéticos) como o quitosana, ácido (poli)lático (PLA) e ácido (poli) glicólico (PGA). Podem ainda ser metálicos como titânio, aço inox e ainda compósitos¹⁶.

Estes materiais devem ter as seguintes características: permitir a adesão e o crescimento celular; nenhum componente ou produto de sua degradação pode provocar reações inflamatórias ou de toxicidade; devem ter forma tridimensional; sua porosidade deve proporcionar grande área superficial para interação entre a célula e o suporte; devem ter espaço para regeneração superficial da matriz extracelular e

possibilitar difusão durante a cultura *in vivo* e taxa de regeneração ajustável para combinar com a taxa de regeneração do tecido de interesse¹⁷.

Os biomateriais regulamentados são aplicados em diversas situações como relatado na tese de regeneração de cartilagem baseada em nanocompósitos com nanotubos de carbono¹⁸. Esta tese refere-se a um compósito em nanoescala contendo PLA reforçado com NTC. Ele tem função de suporte para cartilagem como um osso no campo de engenharia de tecidos. O nanocompósito tem uma estrutura única composta por matriz de PLA em forma de nanofibras, Este material é caracterizado por sua grande área superficial em uma pequena porção do mesmo ($10^3 \text{ m}^2/\text{g}$) e pela alta porosidade, que é produzida por processo de eletrospinning com o emaranhamento das fibras. A porosidade deste material é ideal para migração de células e transporte de nutrientes, podendo ser controlável. Estudos *in vitro* mostraram que as nanofibras de PLA com NTC promovem o crescimento celular sem danos visíveis à proliferação celular pela presença dos NTC. Eles concluíram que o NTC não é um material nocivo *cell friendly* em relação às células. Foi observado também, neste trabalho, que a rugosidade do compósito diminui com o aumento de NTC, por outro lado, as fibras sem NTC são muito planas. As propriedades mecânicas das fibras emaranhadas aumentam com o aumento percentual de NTC. Esta tese mostra a fabricação do compósito, e algumas aplicações possíveis, porém não realiza testes de indução de mineralização ou de osteogênese.

A tese de Naguib¹⁹ relata várias aplicações de NTC combinados com matrizes para biomateriais, incluindo polímeros, compósitos como epóxi, termoplásticos, gels, poli (metil metacrilato) (PMMA), poly acrilonitrila (PAN) e alguns outros polímeros. Os NTC também podem ser incluídos em matrizes cerâmicas como alumina (Al_2O_3), sílica (SiO_x) e carbetos de silício (SiC) ou matrizes metálicas como níquel (Ni), titânio (Ti) e alumínio (Al) para fazer compósitos. Ele coloca como maior problema para a utilização destes compósitos a dispersão dos NTC. Realmente, vários grupos estudam a dispersão dos NTC e pouco se sabe sobre as interações que ocorrem durante a dispersão. A tese discute também sobre o alinhamento dos NTC nestas matrizes. Este alinhamento é conseguido por dois processos:

1º. Via “electrospinning”, no qual um fluxo contínuo de solução de PVA: NTC é produzido pela ruptura da tensão superficial entre o líquido e o ar. As gotas de

solução polimérica saem da ponta de tubos capilares por meio de uma força elétrica gerada entre a fonte de polímero (tubo capilar) e o alvo (placa plana de Cu); onde uma alta diferença de potencial é aplicada. O campo elétrico aplicado também induz um alinhamento dos NTC paralelos à direção do fluxo. Este processo é de alta eficiência na produção de nanofibras, além de proporcionar o alinhamento dos NTC paralelos à direção axial da fibra.

2º. O alinhamento é feito por uma espécie de spray que expelle o polímero misturado ao NTC que se funde ao ser ejetado. Neste caso, uma dispersão de nanotubos é feita em solução aquosa com álcool polivinílico (PVA) ou ácido poliláctico glucólico (PLGA), e injetada com micro-seringas em clorofórmio. Desta forma, os nanotubos tendem a se alinhar e coagulam junto com o PVA ou PLGA, formando microfibras.

Baseado nestes estudos e em outros que serão posteriormente citados, estudamos a incorporação de NTC em colágeno e sua aplicabilidade em biotecnologia.

Referência bibliográfica

- 1 H. W. Kroto, et al. *Nature*; **318**: 162 (1985).
- 2 S. Iijima, *Nature*; **56**: 354 (1991).
- 3 M. S. Dresselhaus, G. Dresselhaus, P. C. Ecklund, *Science of Fullerenes and Carbon Nanotubes*, Academic Press, San Diego (1996)
- 4 M.S. Dresselhaus, G. Dresselhaus, Ph. Avouris, *Carbon nanotubes*, Springer Verlag, Berlin, 2001
- 5 Bin Zhao, et al. *Chem Mater.*; **17**: 3235 (2005)
- 6 Hamada, N.; Sawada, S.; Oshiyama, S.; *Phys. Rev. Lett.*; **68**: 1579(1992).
- 7 M. S. Dresselhaus, G. Dresselhaus, P. C. Ecklund, *Science of Fullerenes and Carbon Nanotubes*, Academic Press, San Diego (1996).
- 8 Dresselhaus M.S., et al., *Carbon*; **33**: 883 (1995)
- 9 Saito, R.; Fujita, M.; Dresselhaus, M.; Dresselhaus, G.; *Phys. Rev. B*; **46**: 1804(1992)
- 10 Saito, R; et al.; *Appl. Phys. Lett.*; **60**: 2204 (1992)
- 11 Droppa Junior, Roosevelt *Síntese e caracterização de nanotubos e fulerenos nitrogenados gerados por arco elétrico*. Campinas, SP : [s.n.],. Orientador: Fernando Alvarez. Tese (doutorado) - Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Física “Gleb Wataghin”. 2004
- 12 P. G. Collins et al., *Scientific American.*; **38**: 283, (2000).
- 13 <http://www.maxway.com.br/Essence/kollagen-3.htm> em 01/08/2005
- 14 VULCANI, Valcinir Aloísio. *Matrizes de colágeno para liberação controlada de progesterona tese de mestrado Universidade de São Paulo. São Carlos.*, orientador Ana Maria Guzzi Plepis, 2004
- 15 R. Jesus-GARCIA, Edilene Tristão FEOFIOFF *Técnicas de obtenção, processamento, armazenamento e utilização de homo-enxertos ósseos* Protocolo do Banco de Ossos da Escola Paulista de Medicina <http://www.unifesp.br/dorto-onco/banco.htm>, tal como foi obtida em 29 Dez 2006 20:30:04 GMT
- 16 CAMILO, C.C. *Escafoides para implantes ósseos em alumina /hidroxiapatita /biovidro: Análises mecânica e in vitro* Dep. Eng. Mec. Escola de Engenharia de Tese Doutorado

São CarlosUSP 2006

17 US 6.544.290 B1(2003)

18 Sakina Sharmin Khan *Carbon Nanotube Based Nanocomposite Fibril for Cartilage Regeneration* Masters of Science in Biomedical Science Thesis Drexel University September 2002

19 Nevin N. Naguib. *Filling and Chemical Modification of Carbon Nanotubes* Doctor of Philosophy Drexel University, July 2004

2. Síntese de nanotubos de carbono

A aplicação de NTC em materiais biofuncionais como PVA, colágeno, PMMA para formação de compósitos requer sua produção em larga escala. Então começamos os primeiros questionamentos: como produzir NTC em larga escala? Qual método de síntese utilizar? De posse destes NTC, como prepará-los para incorporação nas matrizes? Como purificar, funcionalizar e dispersar?

Nas próximas seções serão relatados os procedimentos que foram seguidos para obter este material pronto para ser incorporado na matriz, desde a busca do catalisador, passando pela síntese, purificação e funcionalização.

2.1. Processo de síntese de nanotubos de carbono por deposição química na fase vapor.

O processo de deposição química na fase vapor (CVD) foi o principal método utilizado para produção de NTC na primeira etapa deste trabalho. O objetivo dessa etapa era gerar um processo de deposição em larga escala com o emprego de uma matriz cerâmica como suporte catalítico. O desenvolvimento deste processo demandou grande esforço e dedicação ora na busca do catalisador ora na otimização dos parâmetros como fluxo de gases, temperatura e tempo de síntese.

O processo de CVD para síntese de NTC funciona basicamente via a termodecomposição ou pirólise de hidrocarbonetos leves (metano, etileno, acetileno etc.) como agentes precursores de carbono. Esta termodecomposição é feita sob atmosfera controlada utilizando principalmente gases inertes como agente de controle do ambiente de crescimento e carreamento dos subprodutos de reação. O sistema CVD é constituído basicamente de um forno tubular com controladores de temperatura e de vazão dos gases envolvidos no processo, o qual está ilustrado esquematicamente na figura 2-1. Em geral, os processos de crescimento de NTC por CVD ocorrem à pressão atmosférica e a reação de síntese é catalisada com a utilização de metais de transição em forma de nanopartículas ancoradas em um suporte metal-óxido termicamente estável. A função do catalisador é favorecer o progresso de catálise heterogênea, isto é, promover uma seletividade na reação de

pirólise de modo que ela ocorra preferencialmente na superfície destas nanopartículas.

A partir do esquema apresentado na figura 2-1, pode-se idealizar o seguinte mecanismo para a formação dos NTC.

1. o hidrocarboneto é adsorvido e dissociado na superfície metálica, com formação de átomos de carbono adsorvidos;
2. estes átomos de carbono podem dissolver-se e difundir-se através do metal, precipitando em regiões de crescimento preferencial, como as fronteiras de grão ou as interfaces metal:suporte. Desta forma, as partículas metálicas são destacadas da superfície e transportadas com os filamentos em crescimento, enquanto que a superfície ativa continua disponível para a reação já que o carbono não se acumula sobre ela;
3. é também possível a nucleação na superfície, conduzindo à formação de filmes de carbono que efetivamente desativam o catalisador, o qual é denominado carbono encapsulante.

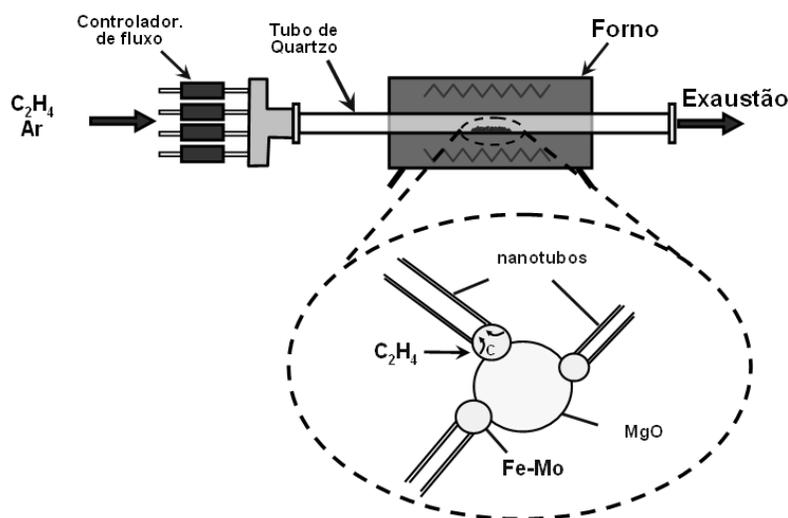


Figura 2-1: Desenho esquemático do sistema de crescimento de nanotubos de carbono por CVD

Para a síntese de NTC em nosso laboratório, foi utilizado um sistema de CVD comercial¹. Tal sistema consiste de um tubo de quartzo posicionado dentro de um forno tubular com controle automatizado, via computador, da temperatura (até 1000°C) e do fluxo de gases dentro do reator (tubo de quartzo). Quatro linhas de gás independentes estão disponíveis, e os gases utilizados são metano, etileno, hidrogênio, amônia e argônio. Este sistema é bastante versátil, simples e eficiente, permitindo a produção de amostras de ótima qualidade e com alta reprodutibilidade.

O processo de síntese de NTC estudado consiste dos seguintes passos:

- aquecimento do catalisador em atmosfera de argônio até a temperatura desejada.
- injeção de gás etileno (C₂H₄) com fluxo inferior a 40 sccm por um tempo mínimo de 25 min.
- resfriamento em atmosfera de argônio.

É importante destacar que do processo de síntese de NTC resulta uma mistura composta de catalisador com partículas metálicas, NTC e outras formas de carbono como grafite e /ou carbono amorfo. Além disso, pode-se obter estruturas de NTC diferenciadas em relação ao número de paredes variando as condições de síntese, como temperatura, taxa de aquecimento e atmosfera.

2.2. Preparo do catalisador para deposição química na fase vapor

Uma das rotas mais adotadas para o preparo de catalisadores é a utilização de materiais mesoporosos, como óxidos refratários do tipo Al₂O₃, como suporte para as nanopartículas dos metais catalisadores². O catalisador metálico pode ser introduzido no sistema de crescimento diretamente na fase de vapor (como ferroceno³), como filmes finos em substratos⁴, na forma de nanopartículas, ou embutido em uma matriz cerâmica porosa (como SiO₂, Al₂O₃, MgO, etc.)^{5,6}. Esta última é a mais apropriada para produção em grande escala de NTC.

Já foram investigadas combinações extensas de catalisadores metálicos e suportes catalíticos para a produção em larga escala de NTC, na ordem de gramas/deposição^{7, 8, 9}. Recentemente, a utilização MgO como suporte catalítico tem sido alvo de uma atenção particular^{10, 11, 12}. A vantagem principal de MgO é que este pode ser removido facilmente através de soluções ácidas "fracas", diluídas¹³, ao invés de soluções de ácido fluorídrico concentrado necessárias para remover o Al₂O₃ e o

SiO₂, os suportes mais comuns. Este fato é importante, pois simplifica enormemente os processos de purificação, usados na remoção destes materiais sem afetar a qualidade dos NTC gerados, em processos posteriores à síntese.

Neste trabalho, foram testados vários suportes catalíticos tais como: microesferas de sílica, Al₂O₃ mesoporoso, micro esferas mesoporosas de CaCO₃ e MgO, ancorando nanopartículas de Fe:Mo. Os suportes catalíticos acima citados exceto o MgO geram NTC com eficiência da ordem de 10-20% de rendimento total, não sendo satisfatória para processos de larga escala e portanto fora da meta proposta no presente trabalho. Descrevo a seguir, os resultados obtidos com o crescimento de NTC obtidos com catalisador de Fe:Mo em suporte de MgO.

O pó catalisador foi produzido a partir de solução aquosa de compostos contendo ferro III obtida pela dissolução de nitrato ou sulfato de ferro com molaridade variável na presença de MgO em dispersão. Após um período de agitação, a mistura foi seca em uma estufa e o pó resultante foi calcinado a uma temperatura de 500°C para a eliminação dos subprodutos indesejados com nitratos, sulfatos etc. Em alguns casos, além do metal de transição, que é o catalisador propriamente dito, foi adicionado também o molibdênio em forma de óxido, com o intuito de aumentar a atividade catalítica. O papel do molibdênio é reduzir a energia interfacial vapor-sólido em sistemas óxidos de modo a diminuir o tamanho da nanopartículas de óxido de ferro além de aumentar sua dispersão sobre suporte óxido¹⁴. Utilizando MgO como suporte foram feitas duas séries de experimentos na qual se investigou a influência da temperatura no suporte catalítico e a influência da concentração do suporte catalítico e da temperatura de síntese na eficiência da síntese de NTC.

Na série sobre a influência da temperatura no suporte catalítico foi feito o aquecimento do catalisador por 15 min utilizando atmosfera de Ar com fluxo de 2000 sccm.

Nas séries sobre a influência da concentração do suporte catalítico e da temperatura de síntese de NTC, os experimentos foram realizados com fluxo de gases constante utilizando proporção de mistura igual á [C₂H₄]:[Ar]=35:2000 sccm.

A composição molar inicial do catalisador foi de Fe:Mo/MgO = 1:0,35:11,5. O procedimento de manufatura do catalisador foi igualmente repetido em todos os experimentos de síntese que basicamente consiste de:

1. Os reagentes nitrato de ferro, óxido de molibdênio e óxido de magnésio são misturados em composição molar pré-estabelecida.
2. A solução catalisadora é levada à estufa por aproximadamente 12h ou até que esteja totalmente seca.
3. O pó é descompactado através de moagem mecânica com uso de grau e cadinho.
4. O catalisador é levado ao forno com temperatura de 500°C por 2 horas para sua calcinação para que sejam eliminados vapores nitrosos e orgânicos que possam estar presentes na síntese.
5. Após esfriar, o pó catalisador é novamente descompactado por moagem mecânica e conservado em recipiente bem fechado em lugar seco e fresco para uso futuro.

O catalisador feito com suporte catalítico de óxido de Magnésio sintetizado mostrou sua excelência pela adequada distribuição de partículas metálicas e por ser facilmente extraído dos NTC por ataque químico em bases ou ácidos fracos o que não prejudica a estrutura dos mesmos. Ainda neste capítulo, veremos sua eficiência na produção em larga escala de nanotubos de carbono via CVD.

2.3. Caracterização do catalisador

O catalisador tem importante papel na qualidade e no rendimento da produção dos NTC, pois a sua formação depende fortemente do método de introdução do metal no suporte e sua distribuição no mesmo. Praticamente todas as referências já citadas na preparação de catalisadores mostram preparações por impregnação, co-precipitação e troca iônica, métodos clássicos também realizados nos nossos experimentos.

O catalisador de Fe:Mo/MgO é sintetizado a partir de elementos compostos como por exemplo, nitratos de ferro, que não fazem parte do catalisador, estes elementos após a síntese devem ser retirados da mistura catalítica através de calcinação. Com a calcinação são extraídas da mistura catalítica inicial impurezas como nitratos, e outras substâncias como molibdênio livre e água adsorvida. Na Figura 2-2 podemos observar a curva de decomposição térmica do catalisador.

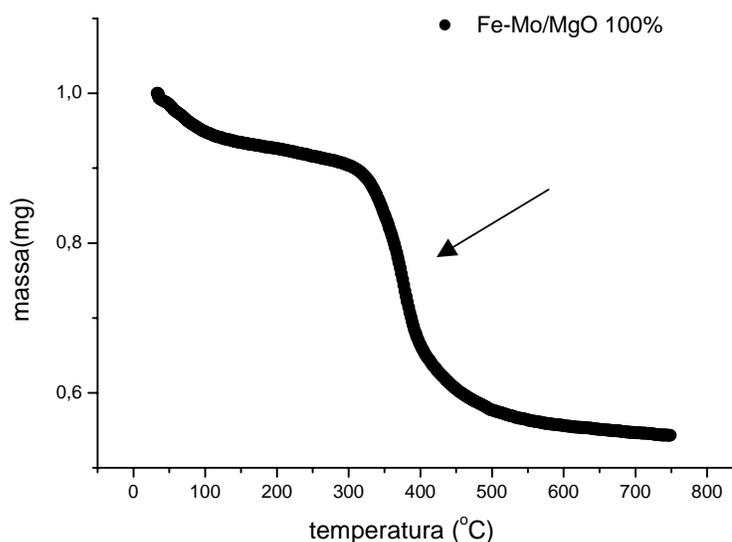


Figura 2-2: Curva de perda de massa por aquecimento durante a calcinação

Nesta curva podemos observar que a 350°C há a maior perda de massa, onde são liberados gases nitrosos e outras impurezas voláteis nesta temperatura. A partir desta temperatura, o material se encontra calcinado e com maior estabilidade devido à ausência de impurezas acima citadas. O catalisador foi feito em quatro concentrações molares distintas Fe:Mo/MgO: 1.0:0,35:11,5; 1.0:0.35:8,6; 1.0:0,35:5,8 e 1.0:0.35:0.

A análise BET, ilustrada pela figura 2-3, mostra isotermas tipo II as quais identificam poros de formato regular em sólidos mesoporosos e macroporosos com histerese tipo H1. O volume de gás adsorvido está em torno de 5 cc/g aumentando suavemente com o aumento na quantidade de MgO. O volume máximo de gás adsorvido é em torno de 37,25 e aumenta para 73,05 e para 77,75 com o aumento de suporte catalítico. Isto indica que a porosidade diminui com o aumento de metais catalisadores impregnados no suporte de MgO.

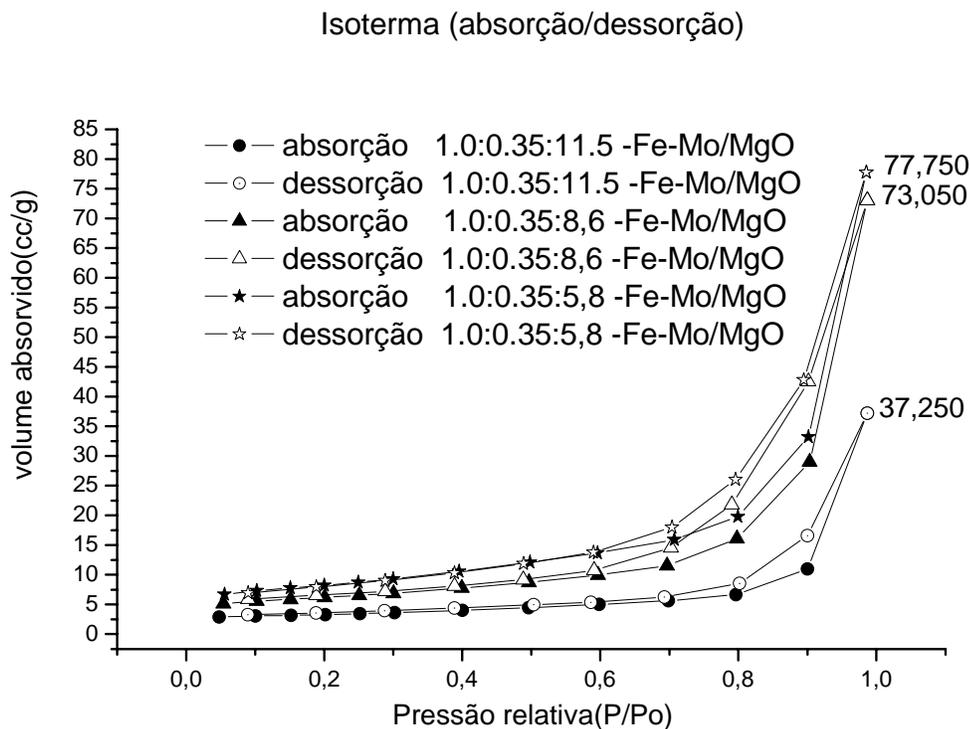


Figura 2-3: Isoterma de adsorção e dessorção de hidrogênio no catalisador Fé:Mo/MgO com variação molar de MgO.

Nesta mesma análise, é possível estipular também a área superficial e a porosidade do material analisado. Observa-se na Tabela 2-1 uma grande variação da área superficial. Com o aumento da quantidade de metais catalisadores a área superficial diminui. Isto já era esperado devido à diminuição da capacidade máxima de adsorção, como foi verificado nas isotermas da adsorção dos mesmos sistemas.

Tabela 2-1: Catalisador Fe:Mo/MgO com variação molar de MgO comparação de volume absorvido, diâmetro dos poros e área superficial.

Catalisador Fe:Mo/MgO	Volume absorvido BET (cc/g)	diâmetro poro (Å)	Área superficial (m ² /g)
1.0:0.35:11,5	77,8	168	2,50
1.0:0.35:8,6	73,1	215	1,91
1.0:0.35:5,8	37,3	210	0,99

Nesta mesma tabela, (Tabela 2-1) podemos verificar uma variação do raio médio de poros para valores maiores em função do aumento de metais no catalisador.

Este resultado, associado à diminuição do volume de poros, observado nas isotermas de adsorção, indicam a ocorrência de processos de coalescência entre poros de menor diâmetro, para a formação de poros maiores. Observa-se que a quantidades destes poros diminui com o aumento de metais. Este efeito não é tão claro comparando as amostra Fe:Mo/MgO 1.0:0.35:8,6 e Fe:Mo/MgO 1.0:0.35:5,8. Esta variação estrutural em função da temperatura causa drásticas variações na síntese dos NTC. Como poderá ser vista na próxima seção. Onde serão utilizados o catalisador com concentração Molar Fe:Mo/MgO 1.0:0.35:5,8. Este catalisador foi escolhido por apresentar melhor rendimento durante as sínteses.

Para estabelecer as variações decorrentes da mudança de temperatura na estrutura do catalisador já calcinado, foram realizados alguns experimentos indicadores de fases estruturais como difração de raios-X e espectroscopia Mössbauer.

A figura 2-4 mostra os espectros Mössbauer de transmissão, obtidos à temperatura ambiente, do pó catalisador Fe:Mo/MgO tratado termicamente entre 500 e 900 °C, por 15 minutos, sob atmosfera de argônio. Este experimento foi feito para tentar simular como o catalisador estaria logo antes do início do crescimento. Isto é, logo antes da introdução do etileno para o início da síntese.

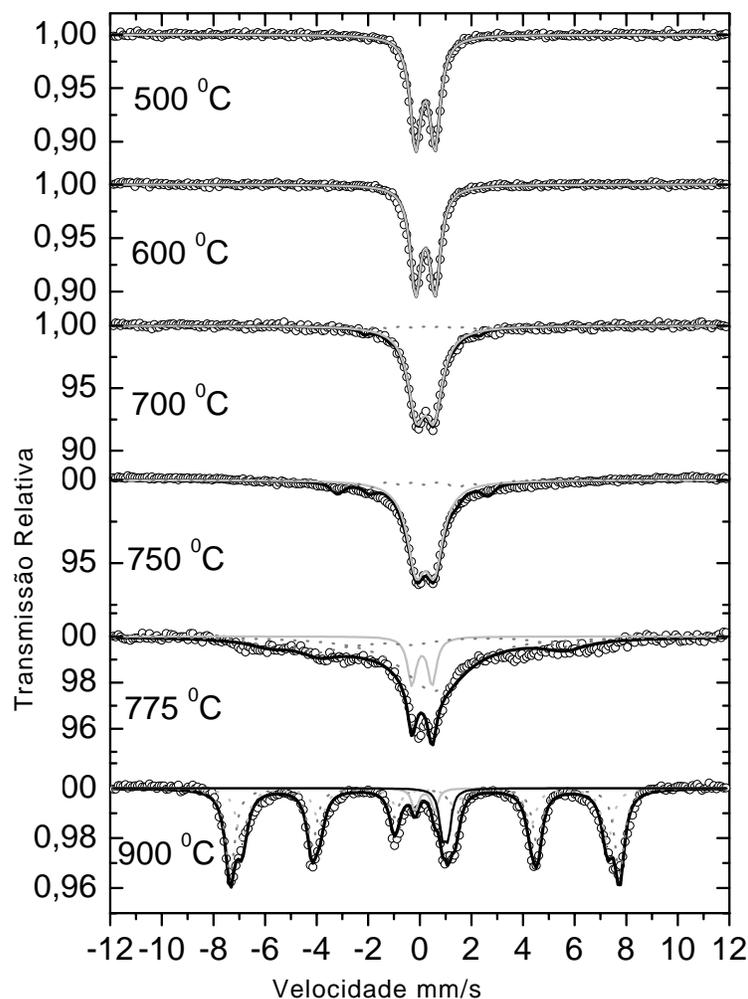


Figura 2-4: Espectros Mössbauer a temperatura ambiente do catalisador Fe:Mo/MgO tratado termicamente em diferentes temperaturas em atmosfera de argônio. As linhas cinza contínuas são associadas à fase $\text{Fe}_{1-x}\text{Mg}_x\text{O}$; as linhas cinza pontilhadas estão associadas a dois tipos de fase da magnetita e a linha pontilhada preta é associada à fase $\text{Fe}_{1-x}\text{Mo}_x\text{O}_y$.

Os espectros Mössbauer dos catalisadores após serem aquecidos em atmosfera inerte a 500, 600 e 700°C mostram um dubleto, correspondente a sítios de Fe^{3+} na solução sólida $\text{Fe}_{1-x}\text{Mg}_x\text{O}$ ¹⁵. Para as amostras tratadas a 750 e 775°C, além destes dubleto aparecem dois sextetos melhor definidos a 900°C. Estes são associados aos sítios tetraédrico e octaédrico da magnésia ferrita (MgFe_2O_4), respectivamente^{16,17,18}.

No espectro da amostra a 900°C, foram ajustados dois dubletos, o primeiro já citado e um segundo associado à fase $\text{Fe}_{1-x}\text{Mo}_x\text{O}_y$ ¹⁸. Foram calculadas também as áreas espectrais, as quais se referem às quantidades relativas de cada fase identificada nos espectros. Estas apresentam forte dependência com a temperatura, como mostrado na figura 2-5.

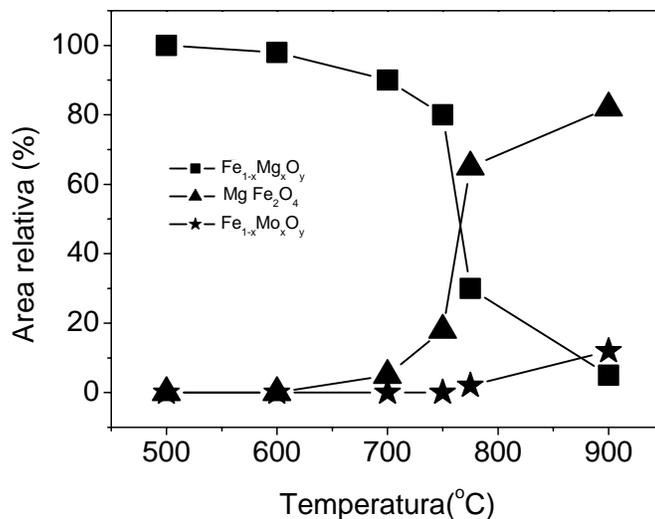


Figura 2-5: Áreas relativas dos sub-espectros das três fases observadas nos espectros Mössbauer a temperatura ambiente: fase óxido de ferro magnésio (retângulos); Fe_3O_4 (Triângulos) e $\text{Fe}_{1-x}\text{Mo}_x\text{O}_y$ (estrelas)

É interessante notar que as áreas espectrais das fases $\text{Fe}_{1-x}\text{Mg}_x\text{O}$ e MgFe_2O_4 entre 500 e 750°C não apresentam alterações significativas. Por outro lado, entre 750 e 900°C, a área espectral da solução sólida $\text{Fe}_{1-x}\text{Mg}_x\text{O}$ decresce rapidamente, indicando a decomposição do catalisador e conseqüente liberação de ferro para o sistema. Ao mesmo tempo, o rápido crescimento da área espectral da magnetita entre 750 e 775°C sugere que grande parte (~90%) do ferro liberado está sendo consumida na formação da MgFe_2O_4 . O restante do ferro livre (~5% de área relativa) forma a fase $\text{Fe}_{1-x}\text{Mo}_x\text{O}_y$.

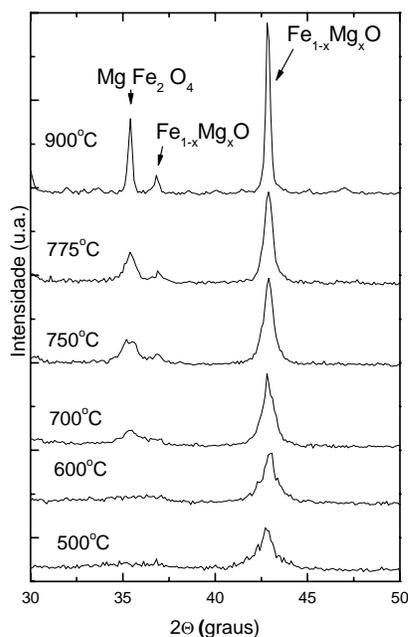


Figura 2-6: Difratogramas de raios-X das amostras tratadas termicamente em diferentes temperaturas sob atmosfera de argônio. (a) – MgO; (b) – $\text{Fe}_{1-x}\text{Mg}_x\text{O}$; (c) – Fe_3O_4 ; (d) – MoO_2 e (e) – FeMoO_4

Esses resultados são confirmados por difração de raios-X (figura 2-6), onde podemos perceber que com tratamento térmico à 700°C aparecem picos de difração referentes à fase MgFe_2O_4 , os quais se intensificam a 900°C . As duas técnicas utilizadas mostram o aparecimento da fase MgFe_2O_4 durante o tratamento térmico, e a existência das fases $\text{Fe}_{1-x}\text{Mg}_x\text{O}$ e MgFe_2O_4 a partir de 700°C

2.4. Caracterização dos nanotubos de carbono via deposição química na fase vapor

Os NTC sintetizados via CVD apresentam características estruturais similares aos NTC sintetizados por outros métodos. Neste capítulo discutiremos as diferenças estruturais baseadas no catalisador descrito na seção anterior. Uma vez que ele apresenta diferenciações com a variação de tratamento térmico.

As imagens de microscopia eletrônica de varredura, ilustradas na figura 2-7, mostram o efeito da temperatura no processo de crescimento dos NTC em relação a sua morfologia. Pode-se observar que para as amostras produzidas com temperatura inferior a 600°C não existem vestígios de NTC [figura 2-7 (a)], e para $T=600^\circ\text{C}$

somente poucos NTC são observados [figura 2-7 (b)]. No caso das temperaturas de síntese entre 700 e 1000°C [figura 2-7 (c-f)], a morfologia das amostras é muito semelhante, com a presença de uma grande quantidade de NTC espalhados por toda amostra, praticamente escondendo as partículas de suporte catalítico.

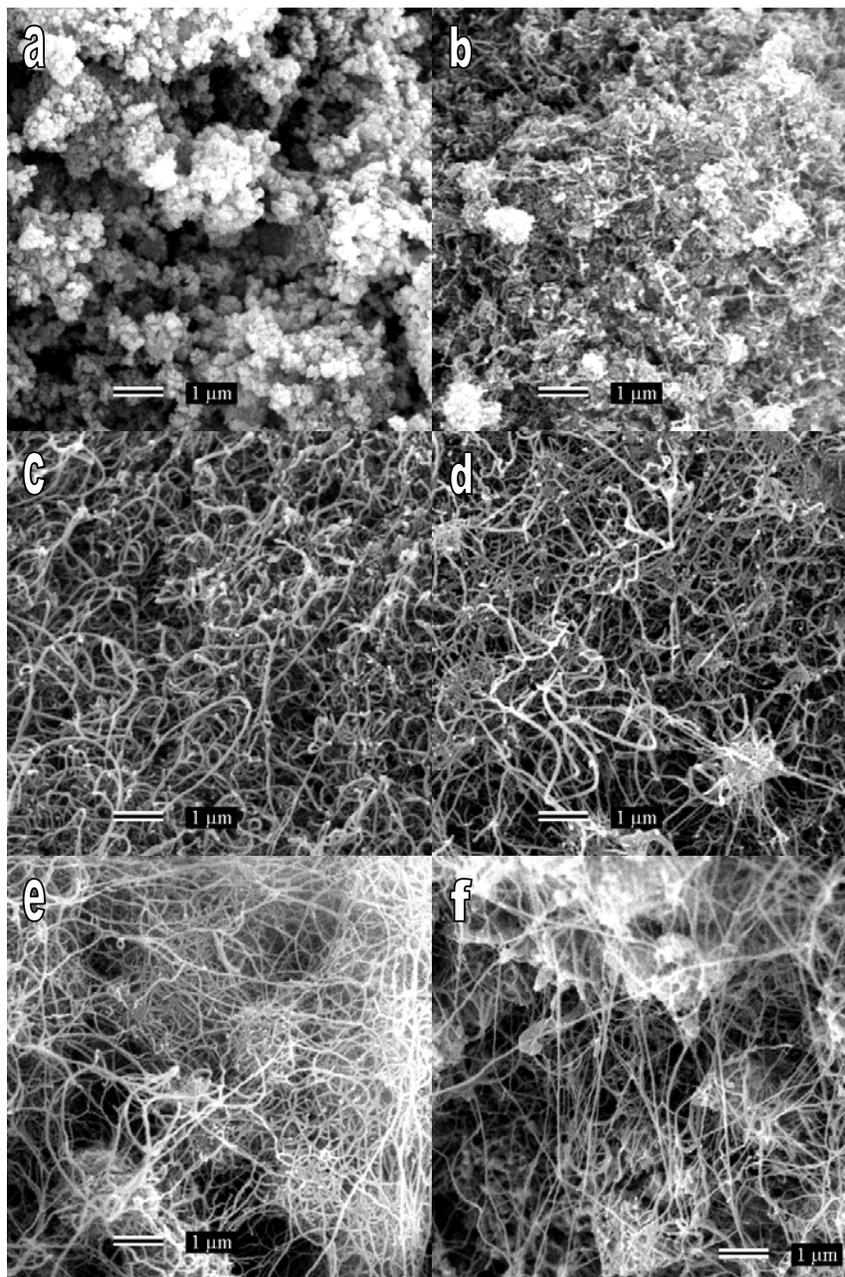


Figura 2-7: Imagens de MEV de amostras de NTC crescidos sobre Fe:Mo/MgO utilizando diferentes temperaturas de síntese, T (a) T=500°C, (b) T=600°C, (c) T=700°C, (d) T=800°C, (e) T=900°C, e (f) T=1000°C.

A semelhança entre a morfologia dos NTC é em parte devida à resolução limitada do MEV, não correspondendo à semelhança estrutural. As amostras podem ser melhor estudadas por MET. Esta técnica permite distinção entre NTPS e NTPM, como pode ser visto na figura 2-8. Esta figura mostra imagens de MET de amostras preparadas com temperaturas distintas (a) $T=700^{\circ}\text{C}$ e (b) 900°C .

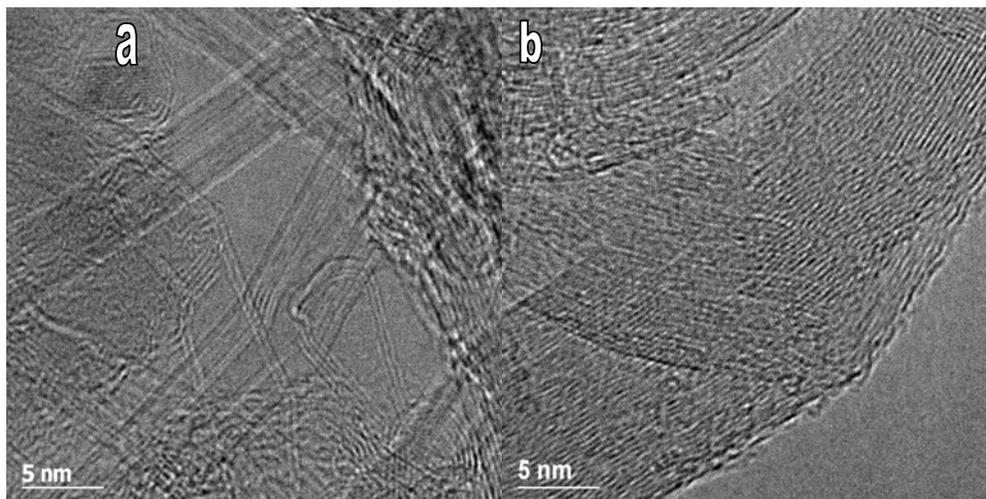


Figura 2-8: MET de NTC em sínteses à temperatura de a) 700°C e b) 900°C

As imagens de MET indicam que para temperaturas de síntese inferiores a 750°C , são formados preferencialmente nanotubos de parede múltipla, no entanto para temperatura $T > 800^{\circ}\text{C}$, ocorre uma preferência de crescimento de nanotubos de parede única. Na região em torno de 750°C , ocorre à transição entre a formação de NTPM para NTPS. Além disso, as imagens de MET revelam a ausência de carbono amorfo nas amostras crescidas com temperatura maiores do que 725°C . Esta seletividade entre a produção de NTPM e NTPS em função da temperatura já foi observada em alguns trabalhos de síntese de NTC sobre substrato^{19, 20}.

Para avaliar a qualidade dos NTC utilizamos a espectroscopia Raman que pode identificar subprodutos de carbono (carbono amorfo, grafite) e a própria estrutura deste material. A figura 2-9 revela o espectro Raman do nanotubo de carbono preparados a 900°C . O espectro na figura 2-9 (b) inclui a região de bandas de energia da desordem (D) e do grafite (G). É bem conhecido que a banda D centrada em $\sim 1350\text{ cm}^{-1}$ está relacionada com a presença de carbono amorfo ou defeitos estruturais no nanotubo de carbono^{21,22,23}. Sabe-se também que a banda G corresponde ao modo de vibração tangencial do grafite (E_{2g}) que está ativo tanto no NTPS quanto no NTPM. A intensidade relativa entre as intensidades das bandas D e

G podem ser utilizadas como indicio da presença de carbono amorfo e ou defeito estrutural no nanotubo de carbono. No caso do nanotubo de carbono produzido com temperatura 900°C, a baixa razão entre as intensidades indica uma quantidade ínfima de carbono amorfo ou defeito estrutural na amostra de nanotubos de parede única. Os diâmetros dos nanotubos de carbono são inferidos a partir da região de baixas frequências no espectro Raman, onde os modos de respiração radial (RBM) são observados. Estes modos vibracionais relacionados com o diâmetro do tubo não dependem da quiralidade dos nanotubos de carbono Sendo assim, para diferentes simetrias dos nanotubos de carbono, (zigzag (n,0), armchair (n,n), e chiral (n,m)) vale a seguinte relação:

$$\nu(cm^{-1}) = 6,5 + \frac{232}{d(nm)}$$

Onde a frequência dos modos de respiração radial (ν) é inversamente proporcional ao diâmetro (d) de todos os nanotubos de carbono^{24,25}. O espectro Raman para baixa frequência mostrado na figura 2-9 (a) apresenta picos correspondentes ao modo de respiração radial (RBM) que aponta a presença de nanotubos de carbono com paredes simples²³. Devido à relação inversa entre a frequência do modo RBM e o diâmetro dos NTC em nosso caso indica diâmetros na faixa de ~1-1.3 nm.

Amostras de NTC produzidos com temperatura inferior à 750°C apresentam banda D mais larga e não apresenta picos para baixa energia (RBM), confirmando a presença de NTPM.

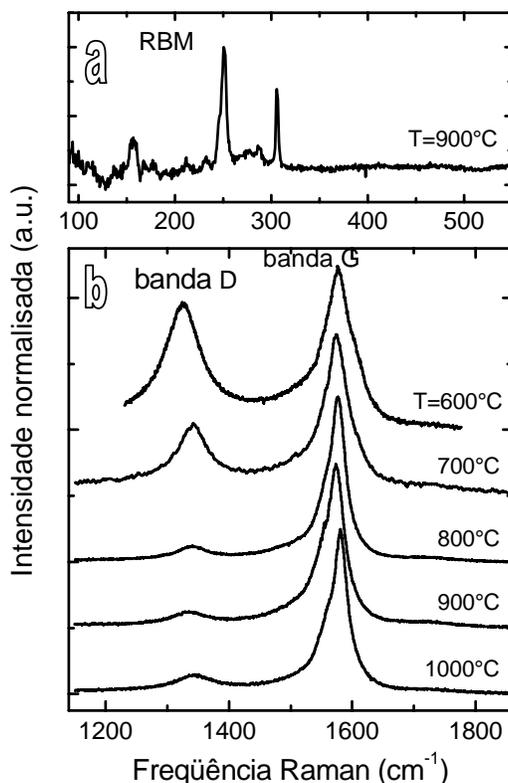


Figura 2-9: Espectro Raman de NTC (a) Região da banda G e (b) RBM (usando comprimento de onda 514,5nm)

Outro dado importante que podemos extrair da espectroscopia Raman é fator de qualidade. Este fator foi de suma importância para decidirmos quais NTC deveriam ser sintetizados em larga escala para possíveis funcionalizações e aplicações como em sensores, compósitos ou outras aplicações. Esse fator é definido como a razão de intensidade integrada das bandas D e G nos nanotubos de carbono, ele caracteriza o nível de desordem do material fornecendo o chamado ‘parâmetro de qualidade’ Q e reflete a aproximadamente proporção de nanotubos perfeitos numa determinada amostra.

$$Q = 1 - \frac{I(D)}{I(G)}$$

A figura 2-10 mostram o fator de qualidade para os NTC produzidos em diversas temperaturas, onde podemos observar que ela decresce até com o aumento de temperatura de síntese dos NTC e torna a crescer à temperatura de síntese. O menor fator de qualidade está em volta de 0,9 e se referem aos NTC sintetizado à 900°C produzido com o catalisador de maior rentabilidade identificado na figura 2-12 (a) como Fe:Mo:MgO 1,0:0,5:5,8M

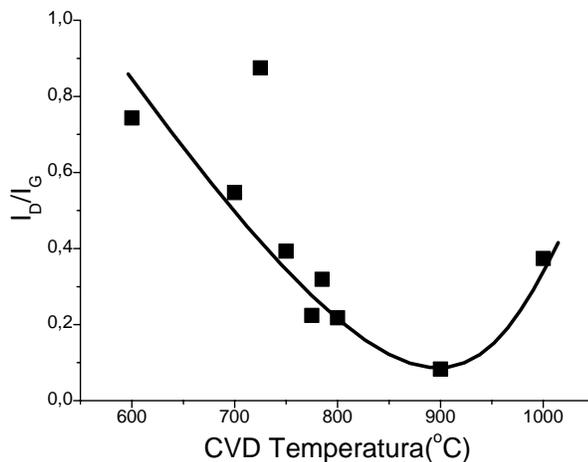


Figura 2-10: Mostra a dependência da temperatura com o rendimento do processo de produção de NTC.

Os resultados mostrados neste capítulo, foram obtidos após vários processos de produção de nanotubos de carbono utilizando uma quantidade inicial de 100 mg do catalisador. A fim de obter quantidades maiores de NTC em um único processo, este método de síntese foi otimizado para larga escala de produção com intuito de gerar 1,5-5 g de nanotubos de carbono. O pó catalisador foi espalhado finamente sobre um barco de 15x3 cm², e a variação da temperatura sobre esta área é menor que 50°C, esta diferença de temperatura é insuficiente para induzir uma variação significativa na morfologia material. Aumentando o tempo de deposição de 25 para 60 minutos, a eficiência de síntese permanece a mesma. Como um exemplo, a figura 2-11 mostra a aparência do barquinho antes e depois do processo à 900°C.

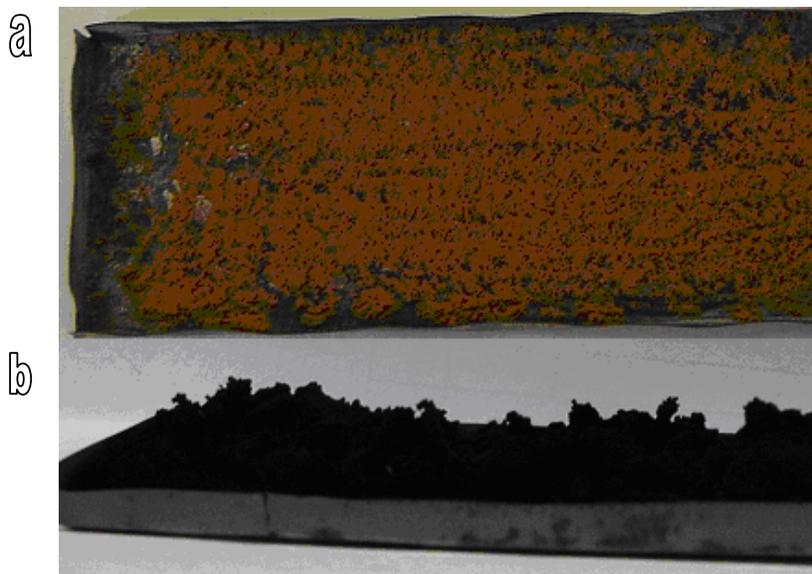


Figura 2-11: Foto barquinho a) catalisador e b) NTC para comparação de volume acrescido no processo

Através da figura 2-12 (a) podemos verificar que para porcentagens diferenciadas do catalisador no suporte catalítico a característica do rendimento é semelhante considerando as variações de temperatura onde para qualquer concentração de metais catalisadores o maior rendimento é obtido pelo processo de síntese à 775°C. Na figura 2-12 (b) pode ser observado que em sínteses com baixa temperatura são formados principalmente NTPM. Já em sínteses com temperaturas mais elevadas são formados NTPS. Estes dados podem ser confirmados na figura 2-7, onde vemos as estruturas tubulares de carbono, com paredes múltiplas na Figura 2-7a e paredes simples na figura 2-7(b).

O rendimento é definido pela razão $CNT\% = \frac{m_{total} - m_{catalisador}}{m_{metais}}$, onde m_{total} é a massa total após a síntese, $m_{catalisador}$ é a massa do catalisador antes da síntese (suporte catalítico e metais catalisadores) e m_{metais} é a massa dos metais catalisadores incorporados no suporte catalítico²⁶.

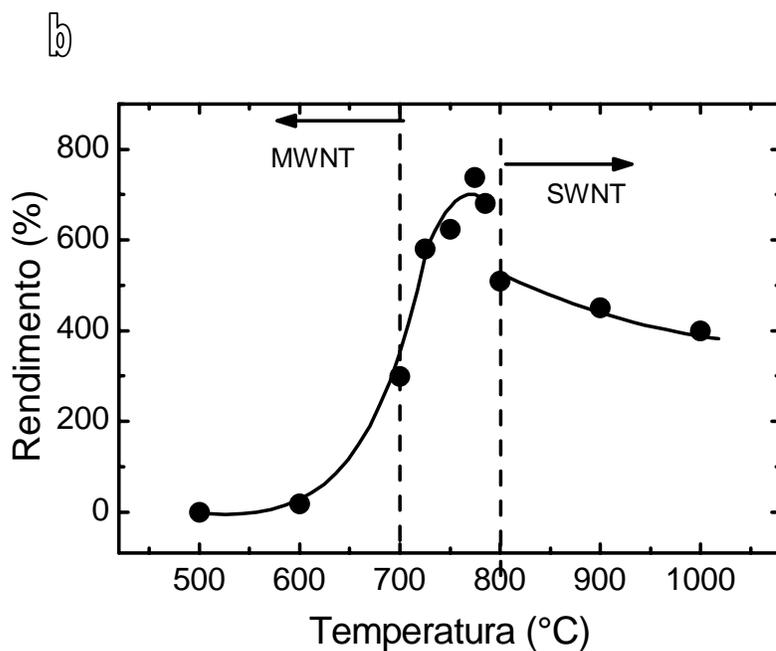
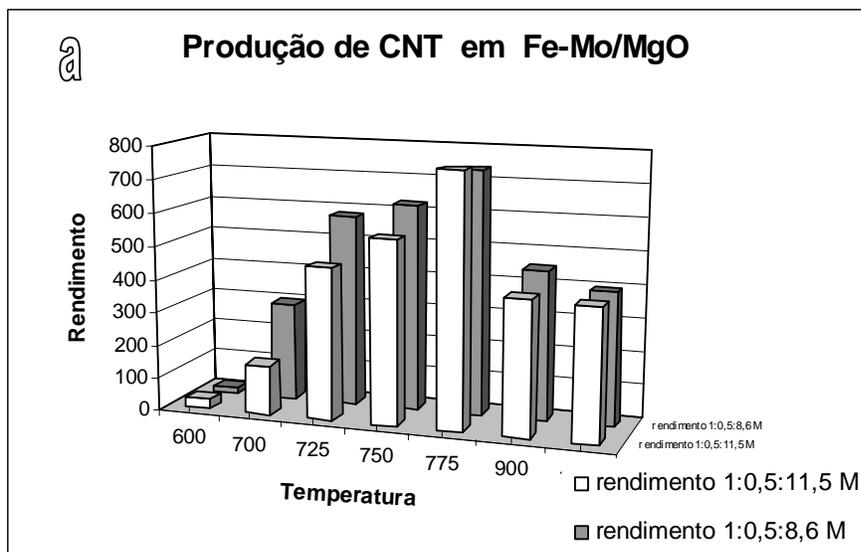


Figura 2-12: Rendimento da síntese de NTC (a) comparação entre concentração do catalisador e rendimentos (b) dependência da temperatura com o rendimento

Esta diferença ocorre principalmente por causa do tamanho das nanopartículas das diferentes fases do catalisador. Em nosso processo de síntese, o aumento da temperatura implica no aumento da taxa de decomposição do etileno, o que explica o aumento de rendimento para a faixa de 600-800°C. Por outro lado, na faixa de 800-1000°C o aumento na taxa de decomposição resulta na formação de carbono amorfo

ou nanocristalinos de grafite na superfície das nanopartículas (NPs), reduzindo a atividade catalítica das mesmas²⁷.

Um fato interessante é que justamente na temperatura onde ocorrem a transição de nanotubos de paredes múltiplas para nanotubos de paredes únicas (T=750-775°C) observa-se o rendimento máximo comparando todos os processos. Para temperaturas em torno de 800°C, o rendimento do processo diminui consideravelmente. A relação entre a redução da taxa de crescimento e a transição de NTPM para NTPS crescidos com aumento da temperatura foi discutido por Geohegan *et al.* através de medidas in-situ das taxas de crescimento de NTPM verticalmente alinhado em substratos cobertos com os catalisadores em forma de filmes finos²⁸.

Com o aumento da temperatura, o rendimento na produção de nanotubos também aumenta indicando que a atividade do catalisador tem dependência térmica. Recentemente este efeito também foi observado sobre substratos onde foram sintetizados NTPM^{29,30}. Em outros estudos como os de Lacerda³¹, sobre NTC usando catalisadores em forma de filmes finos, esta transição entre crescimentos de NTPM para NTPS com o aumento da temperatura foi também observado. Onde o catalisador usado é a base de multicamadas de Al e Fe, e o crescimento de NTPS com temperatura elevada está associado com a formação de uma camada rugosa de óxido de alumínio que induz uma redução no tamanho das nanopartículas de ferro no catalisador. O tamanho destas partículas ativa sítios de nucleação e os nanotubos de parede simples ou múltiplas são formados. Em nosso caso, um mecanismo similar ocorre. Se a concentração do óxido do ferro no pó dos catalisadores for mantida baixa, o aumento na temperatura favorecerá a redução dos óxidos do ferro e haverá uma homogeneidade de partículas envoltas ao MgO, e conseqüentemente, as partículas de Fe com pequenos diâmetros serão formadas³². Na figura 2-13 é possível observar nanopartículas de MgO sobre o NTC sintetizado.

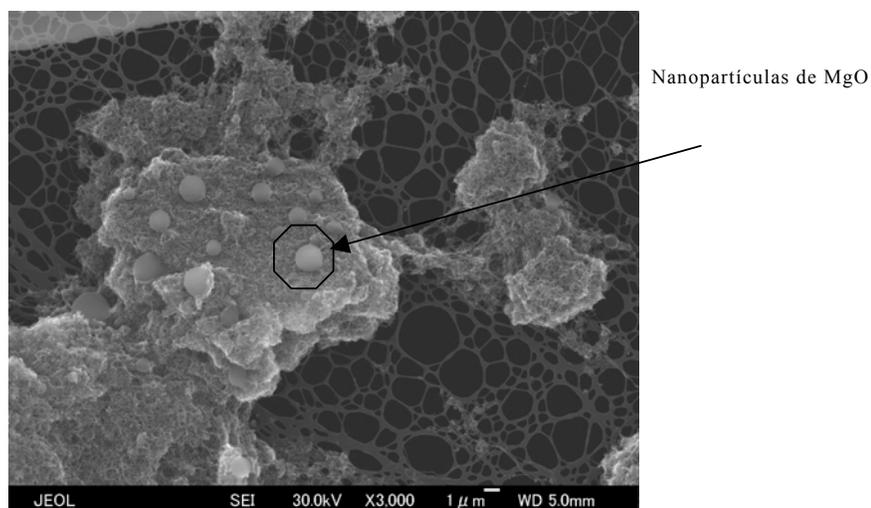


Figura 2-13: Imagem de microscopia eletrônica de varredura onde são indicadas nanopartículas de óxido de magnésio

Além disto presença do Mo no catalisador favorece também a estabilização das partículas de pequeno diâmetro do Fe³². O rendimento medido em termos do percentual total de carbono na amostra ao final do processo de crescimento entre 700 e 800°C foi visto ser quatro vezes maior que aquele acima de 800°C. Se considerarmos que os NTPM crescidos até 775°C têm em média quatro paredes concêntricas, como observado por MET figura 2-8, podemos sugerir que o rendimento do processo na formação de NTPM (abaixo de 775°C) e de NTPS (acima de 775°C) foi de certa forma similar.

Se observarmos as figura 2-10 e a figura 2-5, o máximo de rendimento no crescimento de NTPM (~750°C) e de NTPS (775-800°C) coincide com, respectivamente, o início e o aumento abrupto da formação da fase MgFe₂O₄ no sistema.

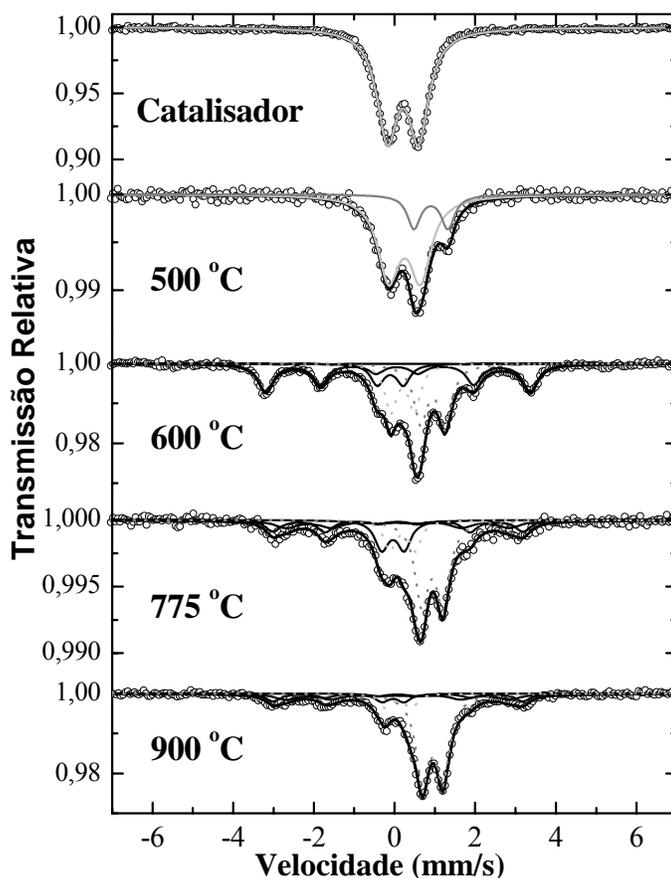


Figura 2-14 Os espectros Mössbauer de transmissão, obtidos à temperatura ambiente, do catalisador sem qualquer tratamento térmico e das amostras de nanotubos de carbono crescidos a 500, 600, 775 e 900°C. A linha contínua em cinza claro está associada à fase $Fe_{1-x}Mg_xO$. A linha contínua em cinza está associada à fase $Fe_{1-x}O_x$, as linhas pontilhadas cinza estão associadas à carbeta e as em preto estão associadas à solução sólida γ -Fe(C).

Os espectros Mössbauer de transmissão, obtidos à temperatura ambiente, do catalisador sem qualquer tratamento térmico e das amostras de nanotubos de carbono crescidos a 500, 600, 775 e 900°C são mostrados na figura 2-14. O espectro do pó catalisador (1ª espectro) foi ajustado com um dubleto e um desdobramento quadrupolar correspondentes a uma solução sólida $Fe_{1-x}Mg_xO$ ³³. Já o espectro da amostra de nanotubos de carbono crescida a 500°C, apresenta um segundo dubleto correspondente à fase $Fe_{1-x}O_x$,^{34,35} além daquele referente à fase $Fe_{1-x}Mo_xO_y$, indicando o início da decomposição do catalisador. Mesmo uma análise bastante criteriosa desse espectro não mostrou nenhuma fase relacionada a um composto de

Tese Doutorado Edelma Eleto da Silva

ferro contendo carbono. Finalmente, os espectros das amostras contendo nanotubos (600 – 900°C) foram ajustados com um conjunto de três dubletos, associados às fases não magnéticas $Fe_{1-x}Mg_xO_y$ ^{34, 35}; $Fe_{1-x}O_x$ ³³ e a solução sólida γ -Fe(C)^{34,35}; e dois conjuntos de sextetos associados às fases magnéticas Fe_3C e Fe_xC_y ^{34,35}. As áreas relativas, correspondentes às cinco fases identificadas, são mostrados na figura 2-15.

De acordo com a figura 2-15, a introdução de uma fonte de carbono catalisa a decomposição do pó catalisador. A 600°C, onde a formação de nanotubos é bastante pequena, a fase carbeta é predominante. A formação de carbeto foi vista como limitador da atividade de catalisadores contendo ferro na síntese de nanotubos de carbono, como reportado por Coquay e cols³⁶. O rendimento da formação de nanotubos é máximo (775°C) quando a fase $Fe_{1-x}O_y$ passa a ser predominante e a formação da solução sólida γ -Fe(C) passa por um máximo. Nesta mesma temperatura ocorre a transição da formação de NTPM para NTPS e também a fusão do MoO_2 .

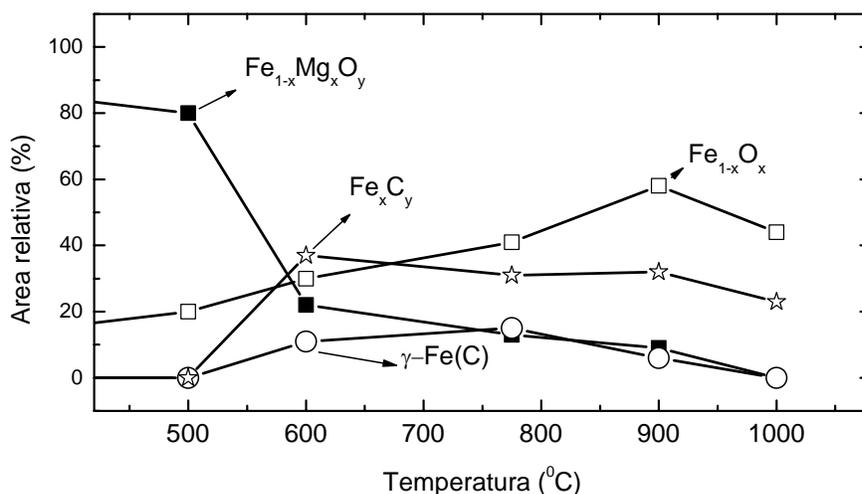


Figura 2-15: Área espectral das fases do nanotubos de carbono

Como observado por diferentes autores^{37,38}, a distribuição de tamanho das partículas catalisadoras é um fator determinante no crescimento dos tubos e na formação de tubos com paredes múltiplas ou simples. De forma bem geral, partículas catalisadoras maiores formam NTPM, enquanto as menores formam NTPS. Assim, de acordo com o que foi observado na figura 2-5, a 750°C ~85% do Fe no sistema ainda está na fase $Fe_{1-x}Mg_xO_y$ e ~15% se separa na fase $MgFe_2O_4$, sendo esta talvez a fase

responsável pela formação do nanotubo de carbono. Como nessa temperatura são formados preferencialmente NTPM, a liberação do ferro se daria provavelmente pela segregação da fase $MgFe_2O_4$, formando ilhas ou aglomerados menores na superfície de um cluster maior da fase $Fe_{1-x}Mg_xO$. A partícula catalisadora seria, neste caso, relativamente maior e composta de pequenos sítios ativos de Fe segregados, mas ainda suportados pela matriz cerâmica. A partir de $775^\circ C$, a o surgimento da fase $MgFe_2O_4$ conforme ilustrados na figura 2-5, e na figura 2-6 induz a formação de partículas relativamente menores e favorecendo a formação do NTPS. Os mecanismos responsáveis por este fenômeno ainda não são bem conhecidos.

Em resumo, em um único processo, nós podemos gerar até 5,0 g de material com NTPS (em $T=900^\circ C$) ou com NTPM (em $T=750^\circ C$). Ou seja, após ter removido o pó do barco e submetê-lo ao processo de purificação, teremos entre 1,1 e 2,5 g de nanotubos de carbono. O processo de deposição química na fase vapor com catalisador de Fe:Mo/Mgo possui grande eficiência para produção de NTPS ou NTPM. De acordo com as análises do catalisador que sofre mudanças de fase de acordo com a variação da temperatura, os NTC são catalisados a partir da fase $Fe_{1-x}Mg_xO_y$ que com o efeito da temperatura, durante a síntese, se dissocia em nanopartículas de Fe e óxido de Mg e a fase $MgFe_2O_4$ com partículas maiores do que 20 nm não atua na síntese. Este resultado viabiliza a produção de compósitos e outras aplicações. No entanto para que sejam realmente efetivas as aplicações os NTC processos de purificação se fazem necessários para retirada de suporte catalítico e metais catalisadores residuais processos estes relatados nas próximas seções.

2.5. Processo de síntese de nanotubos de carbono por arco elétrico.

A síntese por arco elétrico é a técnica mais utilizada para produzir nanotubos, assim como fullerenos³⁹. O método baseia-se em uma descarga de arco elétrico gerado entre dois eletrodos de grafite em uma atmosfera de hélio ou argônio³⁹. Este método derivou-se do sistema de vaporização de um eletrodo de grafite pelo seu aquecimento resistivo, o qual foi desenvolvido em 1990 pelo grupo de Krätschmer e colaboradores⁴⁰.

O processo de arco elétrico consiste na montagem de eletrodos de grafite em uma câmara em atmosfera inerte (hélio) à baixa pressão. As pontas dos eletrodos são aproximadas até cerca de 1 a 2 mm de distância e uma diferença de potencial elétrico

é aplicada entre eles. Quando a distância entre os eletrodos se torna suficientemente pequena, ocorre a formação de um arco elétrico entre os eletrodos, ionizando o gás ao redor do arco e gerando um plasma ao redor dos eletrodos. A figura 2-16 mostra um modelo simplificado de uma câmara de arco elétrico com seus principais componentes indicados.

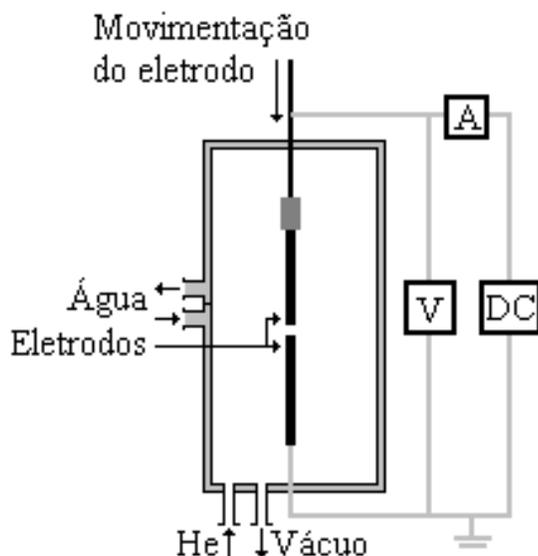


Figura 2-16: Desenho esquemático de um sistema de síntese por arco elétrico.

A quantidade e qualidade dos nanotubos formados dependem principalmente da mistura de metal catalisador e carbono. Os resultados variam de um autor para outro, já que as condições experimentais dependem de vários parâmetros tais como: concentração do metal⁴¹, pressão do gás inerte, natureza do gás⁴², corrente elétrica e geometria do sistema utilizado para a síntese.

A técnica de deposição via arco elétrico é muito eficiente e relativamente simples, porém apresenta um problema que impede sua utilização contínua para a queima de grandes quantidades de grafite e conseqüente geração de uma maior massa de NTC. Este problema está relacionado com a formação de um depósito de carbono grafítico (tipo tubostrático) sobre o cátodo, que cresce durante o processo de síntese⁴³. Este depósito apresenta propriedades elétricas muito diferentes das apresentadas pelos eletrodos, impedindo que o arco elétrico se mantenha estável e com as mesmas condições do início da síntese.

Neste trabalho, utilizou-se uma modificação de um sistema Czochralski de crescimento de cristais, que consiste em uma câmara de aço de atmosfera controlada, com sistema de refrigeração das paredes, capaz de suportar uma grande amplitude de pressões, entre 10^{-6} e 10^4 Torr. Dois eletrodos de grafite de alta pureza são montados no interior da câmara, sendo que o ânodo é dopado com metais catalisadores, como Ni/Y e Co/Ni, em um sistema acoplado a um motor de passo que permite alterar continuamente a distância entre os eletrodos. Os eletrodos são ligados externamente a uma fonte de tensão DC de 30kW (Saban Electric Corp.) que opera entre 0 e 35 eV com correntes até 1500 A. Uma janela óptica protegida com um vidro escuro bloqueador de radiação UV é utilizada para acompanhar o processo. Após o fechamento da câmara, realiza-se uma purga da atmosfera para remoção de oxigênio e outros possíveis contaminantes. A câmara é evacuada até 10^{-2} Torr e preenchida com hélio, em uma pressão de 500Torr. O processo de síntese ocorre com a aplicação de um potencial de cerca de 25 eV entre os eletrodos, que são aproximados até uma distância de cerca de 2 mm entre as pontas. No momento em que os eletrodos se aproximaram o suficiente para que seja possível a formação de um arco elétrico entre eles, o potencial cai para cerca de 23 eV e a corrente estabiliza-se em 100 A. Estas condições de diferença de potencial e corrente elétrica foram aceitas como ótimas e repetidas em todos os processos, por gerarem um plasma estável e de alta temperatura, estimada em 4000 K. Através do controle da corrente elétrica e da pressão então é possível modificar o tamanho da região de plasma e o fluxo de gás na região de interface. O correto ajuste destes parâmetros torna energeticamente favorável a formação de NTC. Após todo o anodo ser desgastado, o processo é interrompido e a pressão interna da câmara é igualada à externa. A câmara é então aberta e a fuligem gerada pelo processo é recolhida das superfícies da câmara, seguindo para a etapa de purificação⁴⁴. A figura 2-17 mostra uma foto da parte interna da câmara após uma deposição em nosso laboratório. Pode-se perceber a formação de uma espécie de manta e grande quantidade de pó aderido à parede da câmara que aqui denominamos fuligem gerada pelo processo de síntese.

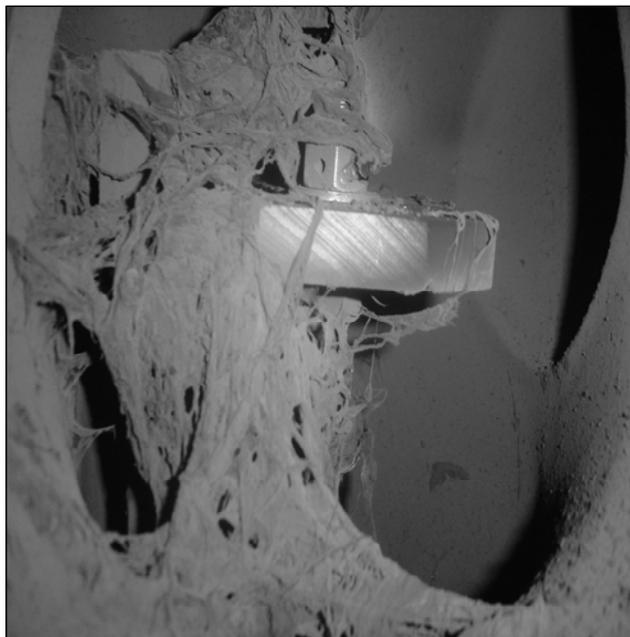


Figura 2-17: Foto da parte interna da câmara após deposição de NTC, usando catalisador C/Ni/Y à 550Torr em atmosfera de hélio e com 100A e 17V.

Em geral, o eletrodo de grafite é preparado com metais catalisadores e após a reação de erosão do anodo observa-se no catodo um espesso depósito que contém nanopartículas grafíticas, metal catalisador encapsulado por carbono, além de uma grande quantidade de fuligem rica em NTC. Neste material aproximadamente 50% é composto de NTC, 10% de metais catalisadores e os outros 40% de partículas grafíticas

2.6. Caracterização dos nanotubos de carbono via arco elétrico.

Nesta parte, serão mostrados os resultados obtidos a partir das amostras de NTC sintetizados via arco elétrico com catalisador de Ni/Co com relação massa: massa de 1:1. A análise das amostras de nanotubos por microscopia eletrônica revela a presença de grande quantidade de estruturas tubulares em feixes assim como formas grafíticas irregulares e carbono amorfo. A amostra gerada na câmara do reator de arco elétrico é caracterizada pela predominância de nanotubos do tipo parede única. Na figura 2-18, são mostradas imagens de MET e MEV, revelando aspectos morfológicos da amostra. A figura 2-18 apresenta uma serie de três imagens, onde na última observa-se feixes de nanotubos de parede única recobertos por uma grande porção de material amorfo. Na segunda vêem-se mais claramente outros feixes sem

essa camada, ao lado de resíduos de material amorfo, assim com na primeira. Os tubos têm alguns microns de comprimento e diâmetros em torno de 1,4 nm. A figura 2-18 (a) mostra uma serie de três imagens onde a superfície da amostra vista por MEV, em todas as imagens podem ser vistos feixes emaranhados que podem ser identificados como feixes de NTPS e porções de impurezas.

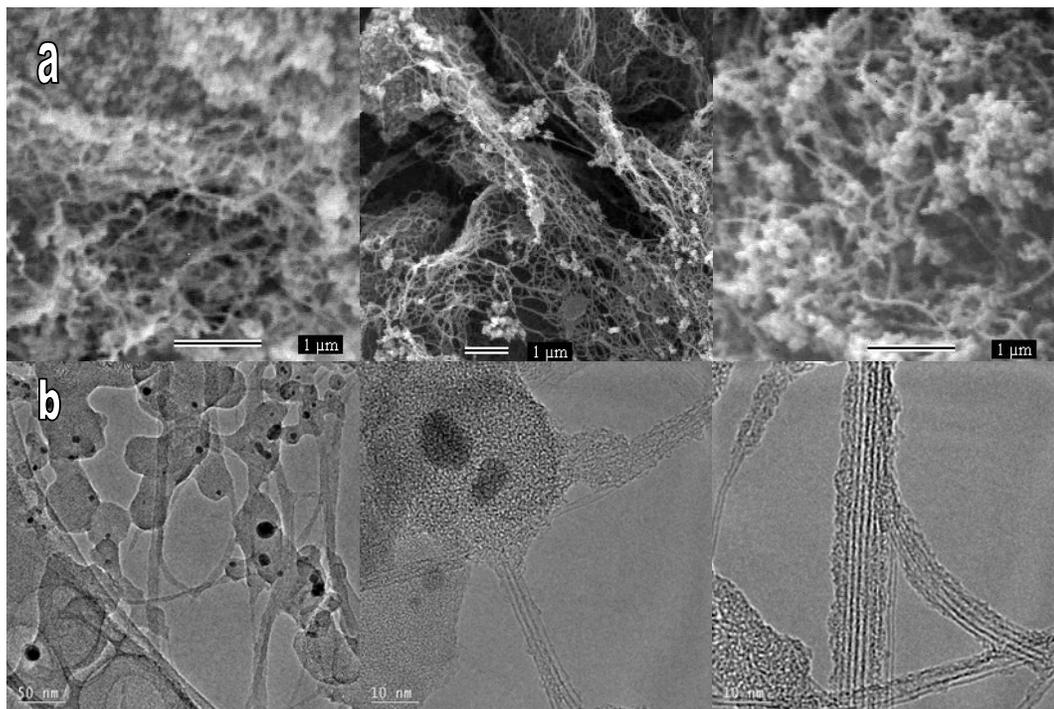


Figura 2-18: NTPS sintetizado via arco elétrico a) MEV, b) MET

As amostras NTC são caracterizadas por conterem predominantemente formas tubulares, que apresentam diâmetros da mesma ordem, como se pode ser comprovado pela técnica de espectroscopia Raman. Esta técnica indica que os NTPS apresentam poucos defeitos estruturais e, apesar das porções de impurezas mostradas nas imagens de MEV e MET a área e intensidade da banda D é muito pequena comparada à área da banda G o que resulta um fator de qualidade de 0,94, como pode ser visto na figura 2-19. Os NTC se caracterizam por possuir um intenso modo de vibração em torno de 180 cm^{-1} pelo qual confirmamos o diâmetro dos NTC que é em média 1,4 nm.

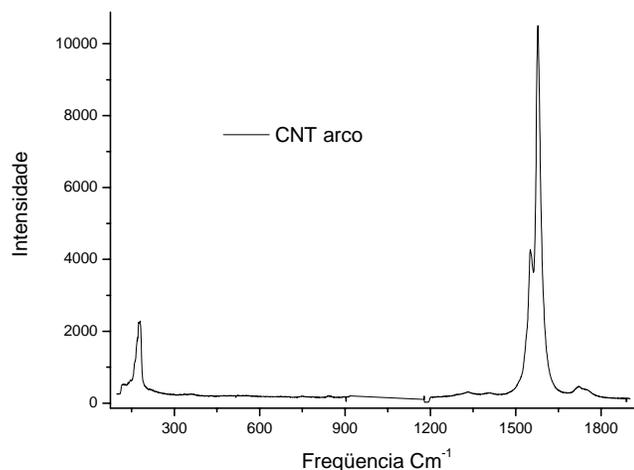


Figura 2-19: Espectroscopia Raman

Em síntese, estes NTC se apresentam em feixes com pequenas porções de impurezas e estruturalmente com poucos defeitos indicados pela baixíssima intensidade da banda D e a banda G intensa e estreita. Esta síntese resulta NTPS com diâmetro de aproximadamente 1,4 nm, de alto fator de qualidade, poucos defeitos estruturais como mostrado no espectro Raman, porém com grande quantidade de partículas amorfas.

Descreveremos nas próximas sessões a purificação e funcionalização dos nanotubos de carbono onde foram utilizados NTC, sintetizados em CVD e também NTC produzidos via arco elétrico, para realizar teses de purificação. A princípio, a origem dos NTC não desempenha mudança em sua cristalografia.

Referências bibliográficas

- 1 Sistema “EASY TUBE”, fabricado pela empresa First Nano Inc. (EUA)
- 2 Cassell A., et al. *J Phys Chem B*; **103**: 6484-92; (1999);.
- 3 Zhang Z.J., et al. *Appl Phys Lett*; **77**: 23 3764-3766 (2000)
- 4 Cui H, Eres G, et al. *Chem Phys Lett*; **374**: 222-8(2003)
- 5 Kathyayini H., et al. *J Mol Catal A*; **223**: 29-36(2004).
- 6 Harutyunyan A.R., et al.. *Nano Lett*; **2**: 525-30 (2002).
- 7 Cassell A., et al. *J Phys Chem B*; **103**: 6484-92(1999).
- 8 Lyu S.C., et al. *J Phys Chem B*; **108**: 2192-4 (2004).
- 9 Geng JF, et al. *Chem Comm*; **22**: 2666-7 (2002).
- 10 Tang S., et al.. *Chem Phys Lett*; **350**: 19-26 (2001).
- 11 Liu B.C., et al.. *Chem Phys Lett*; **383**: 104-8 (2004).
- 12 Shajahan M.D., et al.. *Carbon*; **42**: 2245-53 (2004).
- 13 Tang S., et al.. *Chem Phys Lett*; **350**: 19-26(2001).
- 14 Michell J. Sienko, Robert A. Plane, Quimica2 edição São Paulo Editora Nacional 1968
- 15 V. Charles, et al., *Solid State ionics*; **83**: 309-321(1996).
- 16 B. Benaichouba, et al.. *Applied Catalysis A.: General*; **130**: 31-45(1995).
- 17 M. Ron, Iron-Carbon and iron-nitrogen systems, in: R.L.Cohen (Ed.), Application of Mössbauer Spectroscopy, vol .II, Academic Press, New York, 1980, p.329
- 18 Zhang H., et al.. *Journal of Solid State Chemistry*; **117**: 127-135 (1995)
- 19 Delzeit L., et al. *Chem. Phys. Lett*; **348**: 368 (2001).
- 20 Shajahan M.D., et al.. *Carbon*; **42**: 2245-53(2004).
- 21 Zhou W., et al.. *Chem Phys Lett*; **350**: 6-14 (2001).
- 22 Arepalli .S, et al. *Carbon*; **42**: 1783-91(2004).
- 23 Jorio A., et al. *New J. of Phys.*; **5**: 139 (2003)
- 24 Laurent Alvarez , et al.. *Chemical Physics Letters*; **316**: 186–190 (2000)
- 25 A. Jorio,et al.. *Phys. Rev. Lett.*; **86**: 1118 (2001).
- 26 Lyu S.C., et al.. *J Phys Chem B*; **108**: 2192-4 (2004)

-
- 27 Hornyak G.L., et al. *J. Phys. Chem. B* ;**106**: 2821 (2002).
- 28 Geohegan D.B. et al.. *Appl Phys Lett*; **83**:1851-3 (2003).
- 29 Chhowalla M., et al. *J. Appl. Phys.*; **90**: 5308-9 (2001)
- 30 Kim K-E., et al. *Chem Phys Lett*; **401**: 459-64. (2005)
- 31 Lacerda R.G., et al. *Journal of Applied Physics*; **96**: (8): 4456-4462. (2004)
- 32 Shajahan M.D., et al.. *Carbon*; **42**: 2245-53. (2004)
- 33 N.N. Greenwood, T. C. Gibb, *Mossbauer Spectroscopy*, Chapman and Hall Ltd, London,1971, p.248
- 34 M. Ron, Iron-Carbon and iron-nitrogen systems, in: R.L.Cohen (Ed.), *Application of Mössbauer Spectroscopy*, vol .II, Academic Press, New York, 1980, p.329
- 35 Benaichouba B., et al., *Applied Catalysis A.: General*; **130**: 31-45 (1995)
- 36 Coquay, P., et al., *Hyperfine Interactions*; **130**: 275-299 (2000).
- 37 Ding F., et al. *J. Phys. Chem.*; **121**: 2775, 2004
- 38 . H. Hafner, et al. *Chem. Phys. Lett.*; **296**: 195 (1998)
- 39 Romero J.G.V., et al. *Quim. Nova*; **25**(1): 59-61, (2002).
- 40 Krätschmer W., et al., *Chem. Phys. Lett.*; **170**: 176–170 (1990).
- 41 Lambert J.M., et al., *Chem.Phys. Lett.*; **226**: 364 (1994)
- 42 Zhao X., et al., *Carbon*; **35**: 775 (1997)
- 43 Belz T., et al., *Synthetic Metals*; **77**: 223. (1996)
- 44 Adaptação de Alves, Gustavo Catão Síntese e caracterização de fullerenos e fullerols visando aplicações biológicas tese de mestrado departamento de Física UFMG, 2006 p 18-22

3. Purificação de nanotubos de carbono.

A obtenção de NTC de alta pureza é muito importante para algumas aplicações devido às características nocivas dos catalisadores e partículas de carbono nas misturas com outros materiais ou em diferentes tipos de experimentações físicas.

Por exemplo, para aplicações biológicas, o catalisador pode provocar o encadeamento de reações que aumentam a toxicidade. Desta forma, para utilizarmos estes NTC, desenvolvemos processos de purificação utilizando vias químicas e físicas. A maioria dos processos de purificação encontrada na literatura resulta em NTC com pureza da ordem de 90-96%. Entretanto, a eficiência da purificação ainda é muito baixa¹.

O processo de purificação cujo resultado mostrou grande eficiência na remoção de impurezas e alto rendimento para os NTC sintetizados via CVD, produzidos a partir de catalisador com suporte de MgO, encontra-se descrito abaixo:

1. Etapa de oxidação térmica

- os produtos de síntese são colocados dentro de um forno com temperatura em torno de 400°C por 2 horas sem controle atmosférico

ou

- colocado em um forno de microondas doméstico com potência média da ordem de 1 kW por 15 minutos.

Ambos os procedimentos visam à eliminação do carbono amorfo presente via uma oxidação preferencial.

2. Etapa de remoção do suporte catalítico – o produto anterior é dissolvido em uma solução de NaOH 0,2M à 65°C por 24h sob agitação magnética.

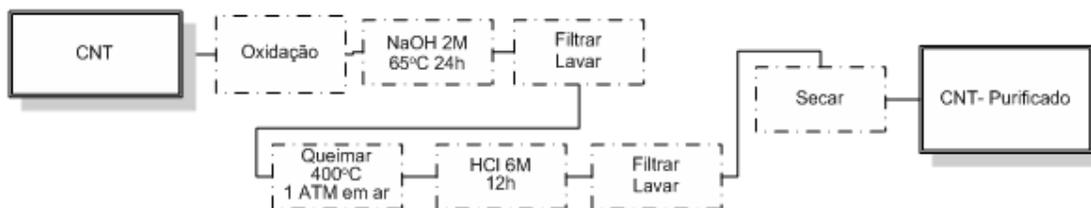
3. Etapa de eliminação de resíduos - o produto anterior é filtrado (filtro à vácuo com membrana de 0.2µm) e lavado para retirar o NaOH e resíduos solúveis gerados no ataque químico anterior. A eliminação dos resíduos é considerada finalizada quando o pH da solução que passa pelo filtro se neutraliza.

4. Etapa de eliminação de partículas de carbono – o produto anterior é recolocado dentro de um forno e levado a uma temperatura de 400°C sob um fluxo de vapor de água por 24 horas.

5. Etapa de eliminação de partículas metálicas – o produto anterior é submetido a um ataque químico de HCl 6M por 12 horas.

6. Etapa de filtração final - o produto anterior é filtrado e lavado novamente até atingir pH 7.

Esta seqüência de purificação pode ser esquematizada desta forma:



Os processos de purificação utilizados foram baseados na combinação de várias técnicas. Os NTC produzidos via CVD e via arco elétrico por possuírem características de síntese diferenciada também possuem técnicas diferentes de purificação, com ataques residuais mais eficientes para cada uma delas.

Os NTC produzidos via arco elétrico depois de sintetizados necessitam de purificação para retirar as impurezas. Para isto podem ser feitos dois processos em quatro estágios cada um.

1. Oxidação:

- Primeiro a fuligem é aquecida em microondas doméstico com potência média da ordem de 1 kW durante 4 tempos de 5 minutos. Este processo promove a oxidação seletiva dos carbonos amorfos que recobrem NTC e partículas metálicas².

ou

- os produtos de síntese são colocados dentro de um forno com temperatura em torno de 400°C por 2 horas sem controle atmosférico.

2. Eliminação de partículas metálicas:

- o produto anterior é submetido a um ataque químico de HCl 6M por 12 horas.

ou

- O produto anterior é submetido a um refluxo de ácido nítrico 3M aquecido a 120°C por 48h

3. Filtração final - o produto anterior é filtrado e lavado novamente até atingir pH 7.

4. Secagem - Os NTC são colocados em estufa a 60°C durante aproximadamente 24h.

Processos assim esquematizados:



O processo de eliminação de partículas quando feita com ácido nítrico, além de purificar os NTC também o funcionaliza, com grupos carboxílicos. Este processo será explicado, de forma mais específica, no capítulo de funcionalizações.

No procedimento de filtração, descrito a seguir, primeiramente, a amostra é dispersa e agitada segundo esquemas mencionados. Essa suspensão é então posta para filtrar em uma montagem simples composta de um Erlenmeyer acoplado a um funil de 35 mm de diâmetro 30 ml em volume com microfiltro de vidro com poros de diâmetros entre 10 e 16 μm segundo dados do fabricante. A filtração é auxiliada por pressão diferencial. Periodicamente, quando os poros do filtro estiverem totalmente bloqueados pelo material acumulado, o filtro deve ser retirado, cheio com mais solvente e posto em um ultra-som para agitação do sedimento. Esse processo segue até que todo o solvente passe pelo filtro sem se turvar. Em seguida, o resíduo remanescente no filtro é retirado e suspenso em água. Finalmente, o material é suspenso e filtrado novamente em água, sendo, por último, deixado em forno a 100°C por 1 dia para secar. O resultado é um material em forma de fuligem ou pequenos aglomerados pretos e duros. Apesar de todas as etapas de purificação, ainda assim partículas de catalisadores metálicos permanecem na amostra final, como pode ser visto nas micrografias. Foi feita uma análise quantitativa do grau de pureza alcançado com esse procedimento, para nanotubos sintetizados via CVD e arco elétrico, como está descrito a seguir.

O método quantitativo usado para avaliar a pureza dos NTC é a TG. Esta técnica é aplicada para quantificar a quantidade relativa de NTC, carbono amorfo e material catalítico (metal e suporte cerâmico) existente na amostra^{3,4,5}.

3.1. Nanotubos de carbono via deposição química na fase vapor

A caracterização dos NTC purificados foi viabilizada pela utilização da técnica TG e foram feitas comparações dos NTC antes e depois desta etapa.

A figura 3-1(a) mostra a curva termogravimétrica da amostra de nanotubo de carbono preparado à 900°C (linha contínua). Neste resultado observa-se uma perda de massa na faixa de 350-380°C que corresponde a oxidação de carbono amorfo. A ausência de perda de massa nesta faixa nas amostras sem e com purificação permite concluir a ausência de carbono amorfo neste processo de síntese. Com este resultado, a primeira etapa de purificação acima descrita pode ser evitada diminuindo o tempo e custo de purificação do material produzido⁶. A principal perda de massa acontece a 550°C é causada pela oxidação do NTC. Em torno de 600°C, a curva de TG estabiliza com massa 55% de massa. Esta massa corresponde a quantidade de catalisador restante, (MgO, Fe e Mo) ou percentagem de impurezas.

Como é sabido, a principal vantagem de usar MgO como catalisador é a facilidade de removê-lo utilizando ácidos fracos como HCl, ácido fosfórico ou bases como NaOH. Desta forma, utilizando o processo descrito acima purificamos este material e sua curva termogravimétrica pode ser observada na figura 3-1(a) indicada por linhas pontilhadas.

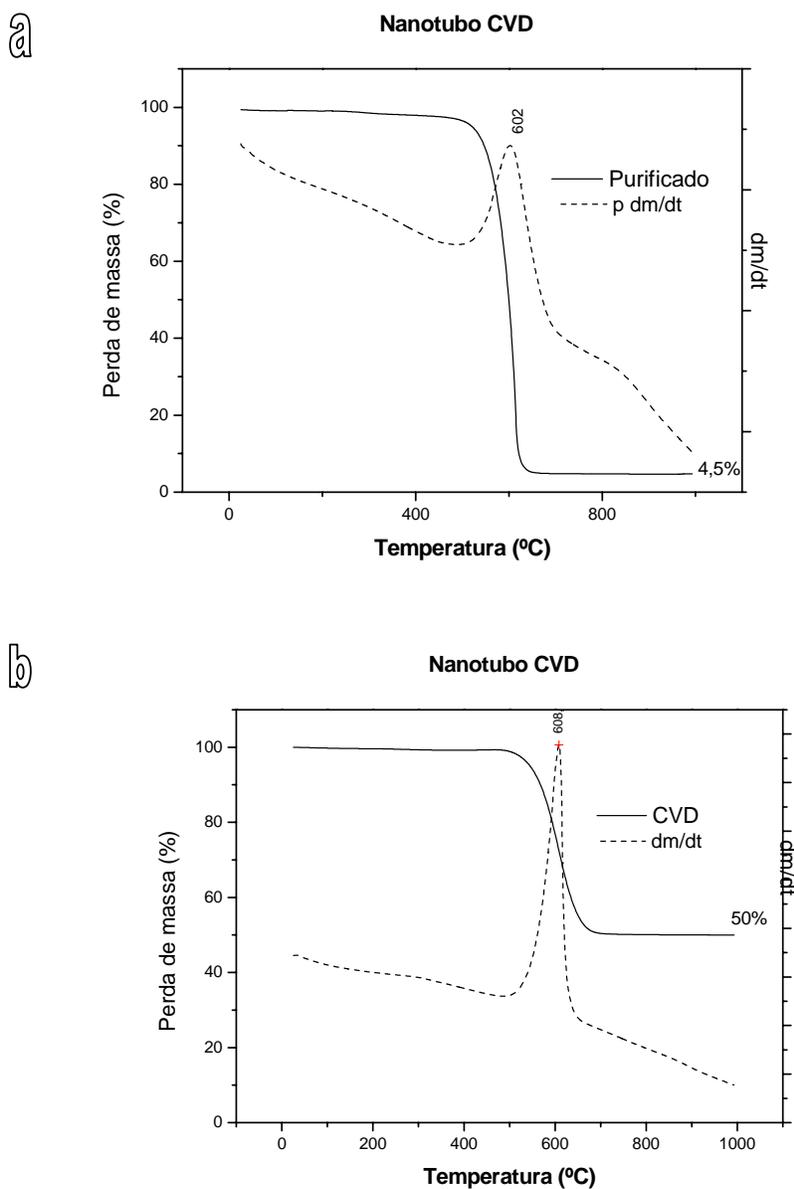


Figura 3-1: Curva de TG referente a queima de NTC a) purificados e b) não purificados em nanotubos sintetizados via CVD.

Na curva de TG dos NTC sintetizados via CVD não há mudanças no que corresponde a oxidação de NTC. A figura 3-1(b) mostra que antes da purificação os NTC apresentam queda proporcional a 50,0% enquanto a derivada da curva referente aos nanotubos após purificação mostra perda de massa proporcional a 95%.

O resíduo final em região de temperatura maior que 600°C indica a presença de impurezas não removidas pelo processo de purificação acima descrito indicando uma pureza final de aproximadamente 95%. A quantidade de resíduo presente destes

nanotubos não apresenta malefícios a funcionalização e aplicação destes nanotubos nesta fase da pesquisa. A eliminação completa de resíduos por processos de purificação envolvendo oxidação térmica e ataque químico não são efetivos na eliminação dos 5% de impurezas ainda presentes. Este resíduo é constituído basicamente de nanopartículas de metal catalisador dentro dos NTC e/ou carbetos metálicos cuja eliminação é extremamente complexa. A eliminação completa deste resíduo foi obtida submetendo as amostras de nanotubo de carbono de 95% de pureza a um tratamento térmico sob alto vácuo (10^{-6} Torr) em temperatura de 1000°C por 92 horas.

As mudanças nas características morfológicas antes e depois da purificação, visualizadas por microscopia eletrônica não são claramente notadas, na figura 3-2(a) podemos visualizar os NTC não purificados. Nesta amostra é possível observar feixes de nanotubos, onde estes feixes se encontram mais separados sem emaranhados e com grandes comprimentos. Na figura 3-2(b) podemos visualizar NTC purificados, onde é possível observar uma grande quantidade de feixes de NTC emaranhados de difícil separação visual.

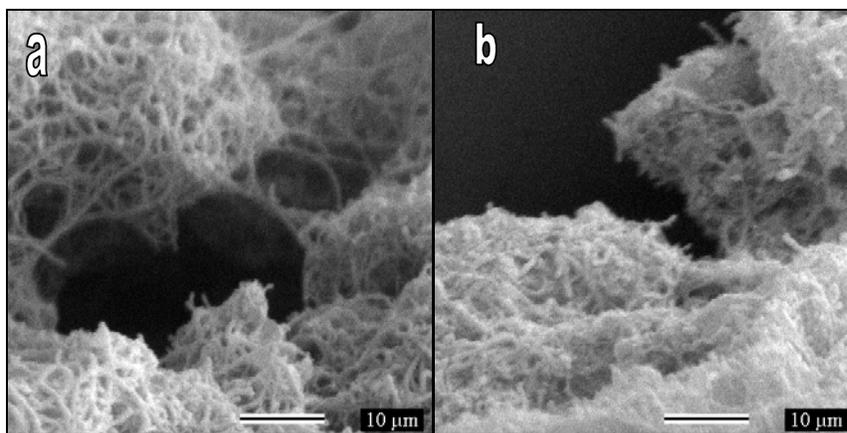


Figura 3-2 MEV de NTC e NTC purificado

A microscopia de transmissão também evidencia esta característica. A presença de partículas nos NTC não purificados é bem maior do que nos NTC purificados. As imagens mostradas na figura 3-3 representam de uma forma geral a características destes NTC. Eles se encontram em feixes e é possível observar que possuem tanto nanotubos de parede única quanto de parede múltiplas. Na última

imagem da série de NTC purificados podemos verificar uma grande distribuição de NTPS. As setas na figura 3-3 indicam a posição das nanopartículas.

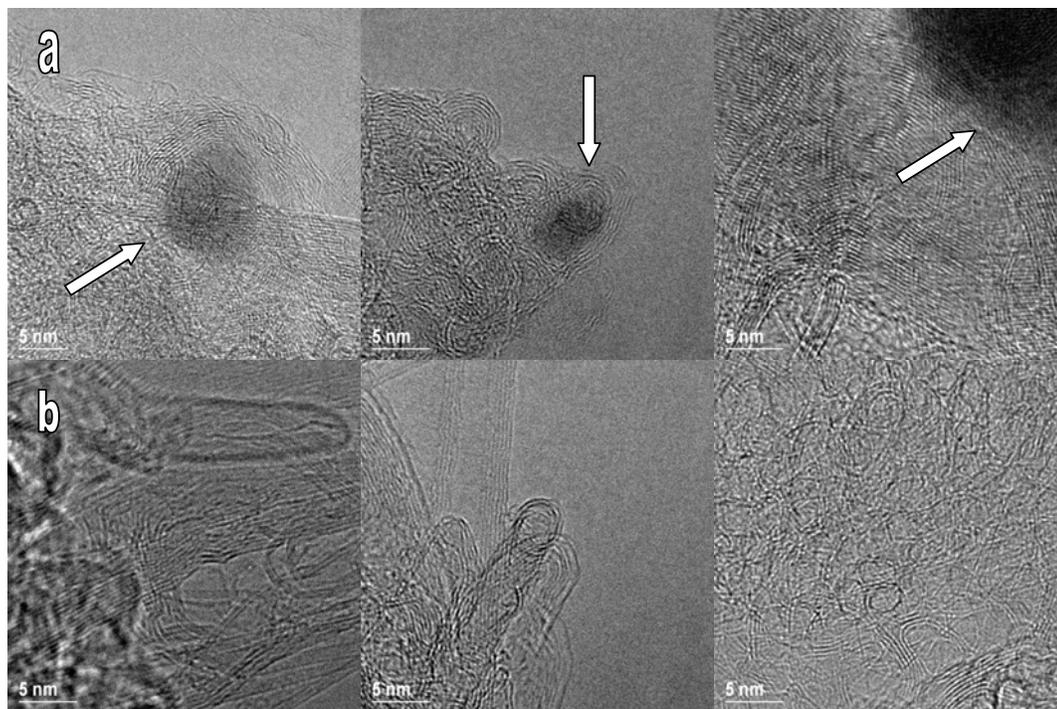


Figura 3-3: MET de NTC sintetizados via CVD a) não purificados e b) purificado

A análise desse material por espectroscopia Raman, ilustrada pela figura 3-4 mostra três espectros, os espectros dos NTC por CVD (figura 3-4 CVD) possui três frequências bem definidas no modo de respiração radial. Quando estes NTC são purificados (figura 3-4 CVD purificado), com tratamento térmico e ataque com ácido clorídrico, o modo de maior frequência é extinto, este fato pode indicar que a purificação pode ser destrutiva para nanotubos de menor diâmetro. Além disto, ainda é possível observar o aumento relativo da banda D, comparada à banda G do NTC antes de qualquer tratamento. A purificação com ácido nítrico provoca a funcionalização dos NTC (figura 3-4 CVD funcionalizado), provoca nos NTC uma desordem estrutural visualizada pelo alto grau de desordem indicado pelo aumento da banda D, além de não ser possível observar frequências de vibração no RBM.

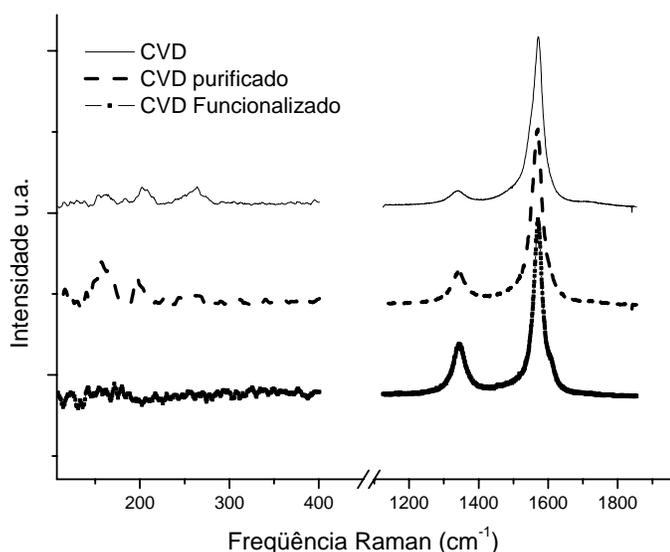


Figura 3-4: Espectroscopia Raman de NTC

Através da relação I_d/I_g verificamos que o fator de qualidade decresce abruptamente para ataques químicos mais abrasivos. Neste caso o NTC não purificado iniciou o processo de tratamento com um fator de qualidade igual a 0,86 com o para tratamento com ácido clorídrico este fator teve uma redução de 13,28 % e com o tratamento com ácido nítrico a 120°C o fator reduziu em 29,84% .

Através destes resultados verificamos que os métodos de purificação são eficientes, deixando na amostra apenas 4% de impurezas, a análise dos resíduos indicam que este material é formado basicamente de carbetos, material este de difícil eliminação por meios químicos ou físicos. Este trabalho teve a colaboração das professoras Classídia e Adelina do CDTN. Elas abraçaram este trabalho com grande dedicação, mostrando procedimentos viáveis para eliminação de impurezas encontradas no NTC, fazendo análises de caracterização a cada passo do processo.

3.2. Nanotubos de carbono via arco elétrico

Os NTC produzidos por arco elétrico foram caracterizados antes e após sua purificação por microscopia eletrônica de varredura, microscopia eletrônica de transmissão, espectroscopia Raman e TG.

A figura abaixo mostra curvas TG e DTG da decomposição térmica dos NTC purificados (figura 3-5a) e não purificados (figura 3-5b) embora não seja possível por

meio da curva TG observar claramente a decomposição dos NTC, pois os efeitos de degradação térmica se sobrepõem, a curva DTG mostra algumas separações de máximos de decomposição. Portanto, a melhor forma para se relacionar o efeito do tipo de elemento decomposto, carbono amorfo, nanotubos, metais, nanopartículas é através do DTG. A perda de massa começou por volta de 350°C em ambos os NTC e terminou por volta de 800°C para os NTC purificados e por volta de 900°C para o NTC não purificado. Cada variação de perda de massa corresponde a um tipo de degradação alguns trabalhos sugerem que à 450°C são queimados nanopartículas e carbono amorfo e em temperatura mais elevadas ~550-800°C são queimados os NTC, acima desta temperatura possivelmente degradam partículas metálicas que foram expostas com a queima do carbono amorfo^{7,8}.

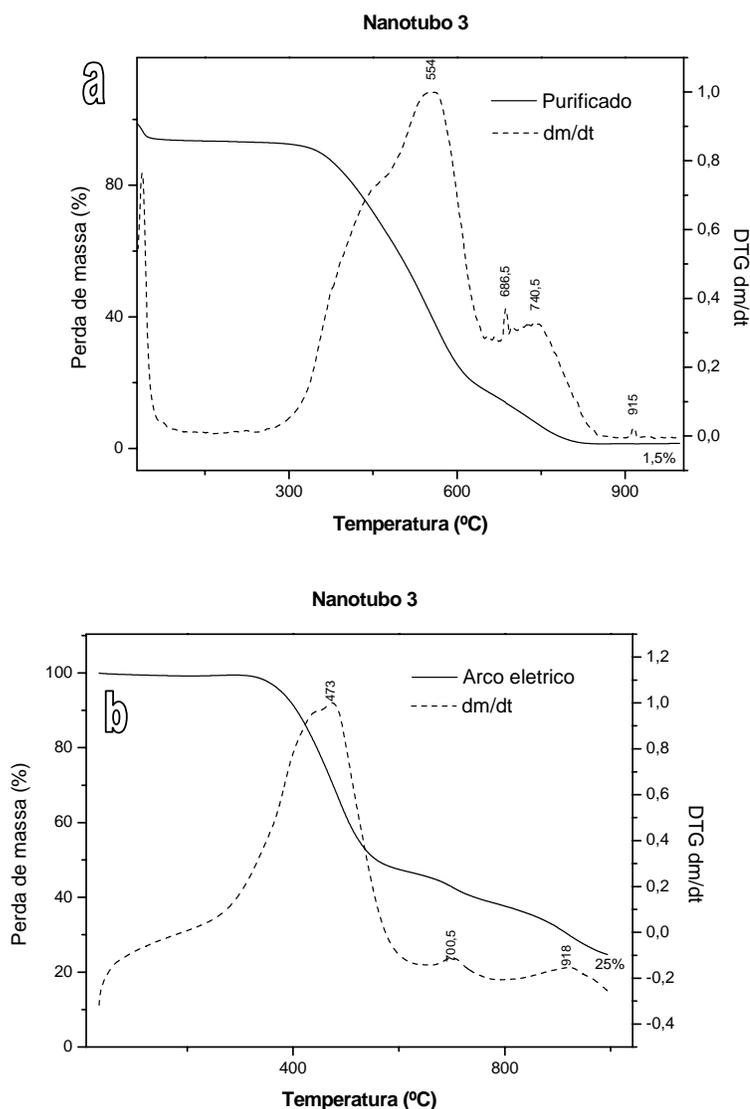


Figura 3-5: Curvas TG e DTG da decomposição térmica dos NTC a) purificados e b) não purificados

A purificação dos NTC utilizando o processo de purificação descrito no início do capítulo, com oxidação e ataque ácido, deixam os NTC com aproximadamente 99% de pureza, isto é após todas as etapas de purificação restam apenas 1,5% de impurezas. Porém, experimentalmente temos uma variação neste fator, na média conseguimos uma purificação de 96%.

As mudanças nas características morfológicas antes e depois da purificação, visualizadas por microscopia eletrônica, são claramente notadas. Na figura 3-6 a

podemos visualizar, nas seqüências de imagens, NTC não purificados. Nesta amostra é possível observar várias partículas sobrepondo os feixes de nanotubos. Estes feixes ora não podem ser visualizados facilmente devido às partículas, ora se apresentam em grandes regiões sem partículas. Na figura 3-6b podemos visualizar NTC purificados. Nesta amostra é possível observar uma grande quantidade de feixes de NTC emaranhados, sem a presença considerável de partículas.

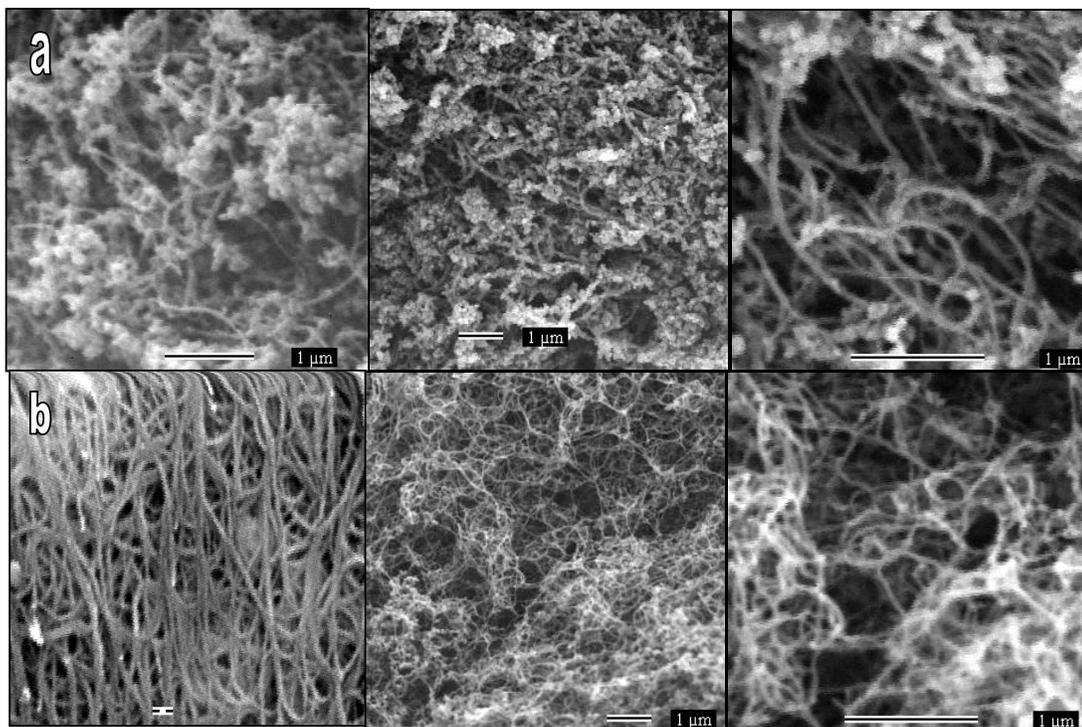


Figura 3-6: MEV de comparativos NTC purificados e não purificados

A microscopia de transmissão também evidencia esta característica. A presença de partículas nos NTC não purificados é bem maior do que nos NTC purificados. As imagens mostradas na figura 3-7 representam de uma forma geral a características destes NTC, os quais se organizam em feixes de NTPS. Na inserção da figura 3-7b são mostrados os NTC purificados com as extremidades abertas dos nanotubos em um feixe de aproximadamente oito NTC. Esta é uma imagem muito representativa e difícil de ser visualizada nas condições usuais de preparação de amostras.

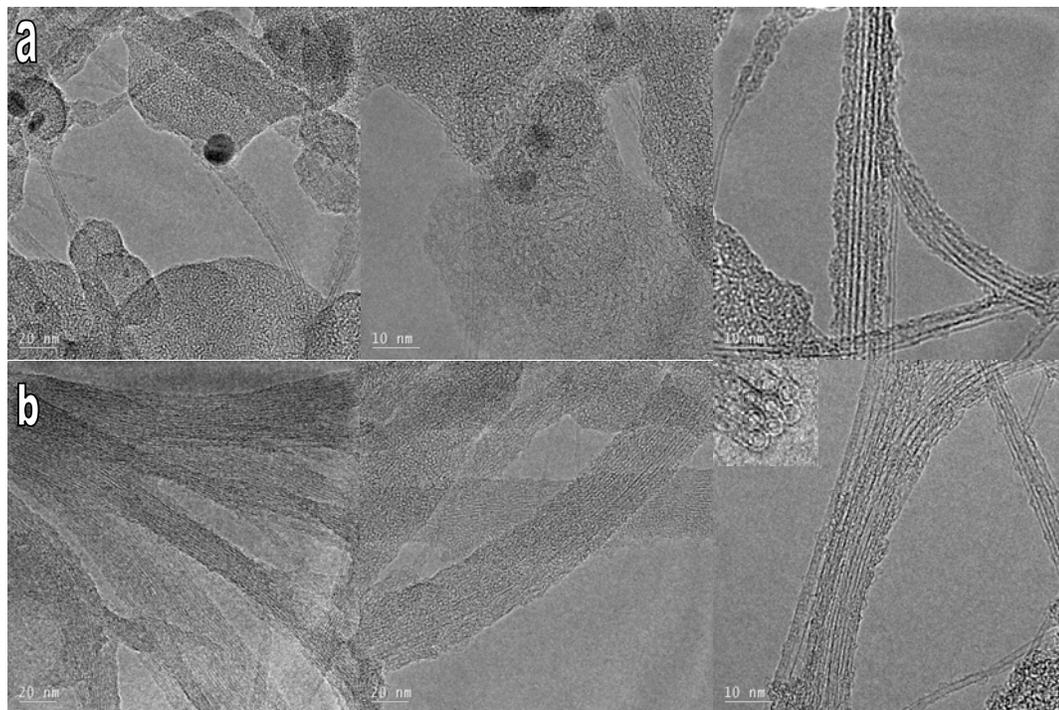


Figura 3-7: MET de NTC sintetizados via arco elétrico não purificados na primeira linha e purificado na segunda linha

A espectroscopia Raman indica a existência de NTC de parede simples com diâmetro de 1,4 nm em ambas as amostras. Este fato caracteriza o processo de purificação como não degradativo, isto é, as etapas de purificação não promovem a eliminação de tubos com diâmetros diferenciados preservando a integridade dos NTPS.

A figura 3-8 mostra os espectros Raman para uma amostra antes e depois de sua purificação podemos observar que os espectros são idênticos preservando os modos RBM, bandas D e G.

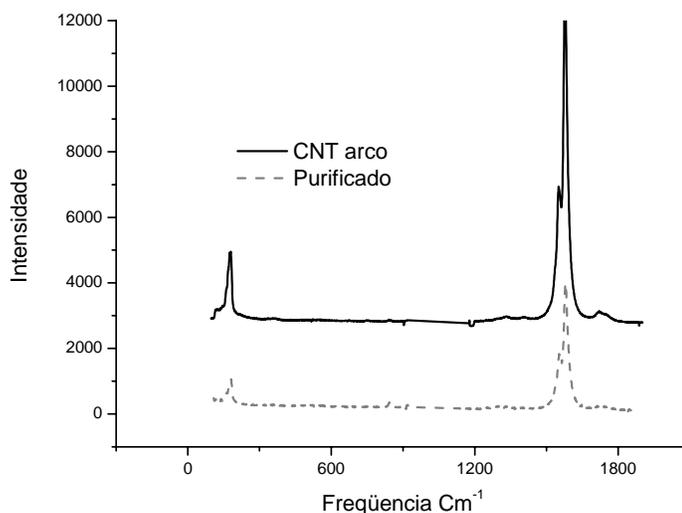


Figura 3-8: Espectroscopia Raman de NTC sintetizado via arco elétrico e deste NTC purificado.

Claramente a purificação dos NTC não afetou a sua qualidade. O fator de qualidade sofreu um decréscimo de 4%, (valor ínfimo), dentro do erro estatístico deste fator para uma mesma amostragem.

De forma geral, através da purificação, foram obtidos NTC com no mínimo 96% de pureza. Se comparados os NTC sintetizados via CVD e via arco elétrico verificamos que os processos são mais eficientes para os de arco. Estes também têm uma síntese mais homogênea em relação ao diâmetro e número de parede dos NTC. Percebe-se também um entrelaçamento maior nos feixes destes nanotubos, fato que não prejudica sua individualização em soluções com surfactantes. O que é indicio de que também serão facilmente isolados se estiverem funcionalizados. Estes NTC, devido a sua excelência, foram utilizados para todas as aplicações, deste as funcionalizações até a formação de novos materiais como compósitos e demais estudos realizados.

Referências bibliográficas

- 1 Park YS, et al.. *Carbon*; **39**: 655-61 (2001).
- 2 Harutyunyan A. R., et al.. *J. Phys. Chem. B*; **106**: 9671-8675 (2002)
- 3 Liu B.C., et al.. *Chem Phys Lett*; **373**: 475-9 (2003).
- 4 Murakami Y., et al.. *Chem Phys Lett*; **374**: 53-8 (2003.)
- 5 Li W.Z., et al.. *Chem Phys Lett*; **368**: 299-306 (2003).
- 6 Furtado CA, et al.. *J Amer Chem Soc*; **126**: 6095-105 (2004).
- 7 Avetik R. H., et.al.. *J. phys chem. B*; **106**: 8671-8675 (2002).
- 8 Chen X.H., et.al.. *Material Letters*; **57**: 734-738 (2002).

4. Nanotubos de carbono funcionalizados.

Como foi descrito no primeiro capítulo, os NTC foram desenvolvidos para serem aplicados principalmente em biocompósitos. Porém, para este emprego, ainda é necessário agregar uma característica não existente nos NTC antes da funcionalização, a hidrofiliabilidade. Isto é, os NTC com alguns tipos de funcionalização se tornam solúveis em água, devido grupos funcionais a eles agregados, o que viabiliza sua aplicação em várias áreas do conhecimento. Entre os mais destacados podemos citar as aplicações biológicas e biomédicas, como sensores ultra-rápidos e seletivos, como agente carreador de drogas, como base para crescimento celular e como compósitos para implantes, etc.

Como os NTC sintetizados ou purificados não são solúveis e não permanecem dispersos em água, foram feitos vários testes com reagentes diferenciados. Destes reagentes, alguns deixaram grupos funcionais ligados aos NTC. Essas funcionalizações se apresentam de duas formas: com interações não covalentes, que possibilitam a obtenção de tubos isolados sem modificar extensamente sua propriedade eletrônica e com interações covalentes que possibilitam a obtenção de tubos isolados com especificidades químicas. A funcionalização dos NTC agrega a ele importantes características devido a diferenciações de suas propriedades químicas e físicas e a facilitação de sua manipulação.

As reações de funcionalização são realizadas, em geral, através de simples mistura de reagentes. As reações ocorrem à temperatura ambiente ou através de refluxo, neste último elas acontecem com temperatura mínima, igual ou superior ao ponto de ebulição do solvente utilizado, o que corresponde à 120°C na maioria das funcionalizações realizadas durante o desenvolvimento deste trabalho. Como será mostrado a seguir.

Antes disto, vale salientar que a chave para o desenvolvimento efetivo de tecnologias envolvendo NTC é a funcionalização química dos mesmos, ou seja, a união de grupos funcionais à superfície dos NTC em grande quantidade, a fim de tornar experimentos factíveis em escala mínima para aplicações futuras.

Hoje em dia, apesar do êxito em dispersar NTC em diferentes meios, um método simples e fácil de funcionalização em escalas industriais ainda é necessário. Por outro lado, a união com moléculas biológicas específicas, como aminoácidos,

pode possibilitar interações e ligações seletivas em moléculas alvo, ainda em menor escala.

Foram investigadas, neste trabalho, funcionalizações que alcançam esses dois enfoques, a larga escala e aplicações biológicas. As funcionalizações com alendronato de sódio, e a carboxilação foram realizadas para solubilizar os NTC em água e posteriormente adicioná-los ao colágeno para formar um biocompósito e realizar aplicações biológicas como, por exemplo, testes de osteogênese; as funcionalizações com, oligonucleotídios, foram feitas para aplicações biológicas específicas como a inibição de proliferação de fungos do feijoeiro; a funcionalização com RNA-i foi elaborado para realizar transfecção celular em células de mamíferos, tanto em NTC longos quanto nos picotados; as funcionalizações com NH₄OH e ácido oxálico foram elaboradas como uma forma rápida e eficaz de solubilizar NTC; as funcionalizações com L-alanina foi elaborada com intuito de realizar aplicações biológicas para realizar interações específicas e ser alvo de ligações biomoleculares; a funcionalização com polissacarídeos foram realizadas para sanar nossa curiosidade a respeito das diferenciações entre a goma arábica e a goma de cajueiro, que é um produto tipicamente brasileiro; a funcionalização com ouro foi realizada para solucionar problemas de ligações de grupos fosfatos nos NTC, o que não deu certo, e agora vai ser utilizado por outros alunos como marcadores biológicos e veículos radioterápicos, também foram realizadas reações oxidativas causadas por alguns destes procedimentos, reações estas que causam a redução do comprimento dos NTC, que denominamos picotamento. Para cada uma das funcionalizações existem especificidades de processos e aplicações que serão comentadas a cada grupo funcional adicionado ao NTC. A seguir entraremos em detalhe dos processos de obtenção e caracterizações destas funcionalizações.

4.1. Carboxilação:

A carboxilação é uma das funcionalizações mais estudadas, pois a mesma é utilizada para incluir a carboxila, que é um grupo funcional muito importante como indutor de outras funcionalizações. Esta funcionalização também torna os NTC solúveis em água. A terminação carboxila é aplicada em quase todas as funcionalizações conjugadas e por isto tem sido amplamente divulgada^{1,15}. Usualmente, ela é feita através de refluxo com ácido nítrico, porém descobrimos uma

nova forma de funcionalizar com este grupo, que será mostrado mais a diante, logo depois do método convencional de funcionalização.

As funcionalizações com ácido nítrico são as que apresentam melhor estabilidade do grupo funcional, uma vez que ele está ligado à parede ou/e extremidades dos NTC com interação química forte, tipo covalente.

Os NTC foram submetidos aos seguintes procedimentos:

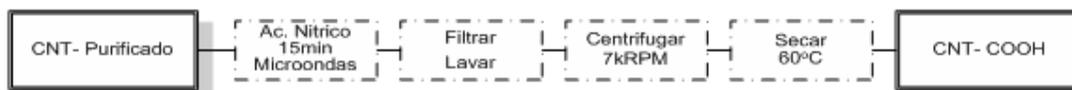


ou



Para ambos os procedimentos, devem ser utilizados 100ml de ácido nítrico 3M para cada grama de NTC.

ou



Provavelmente, esta ligação acontece como ilustrado na figura abaixo nas extremidades e na parede do tubo.

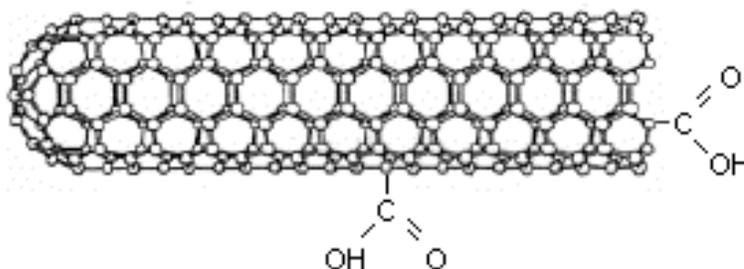


Figura 4-1: Nanotubos de carbono carboxilados.

Neste caso deve-se usar 50 l de ácido nítrico 6 para cada grama de carbono. A variação entre estes processos de funcionalização não causa alterações no resultado final da mesma, devendo ser escolhido o método mais viável para cada laboratório.

Uma das etapas mais trabalhosas deste processo é a centrifugação, esta etapa é responsável pela variação do pH. Quando a solução centrifugada está com pH em torno de 5, os NTC começam a suspender. Depois de inúmeras lavagens ficam precipitados somente os NTC não funcionalizados e pequenas partículas que não foram retiradas durante a purificação. Nas primeiras centrifugações, a solução tem

um tom um pouco amarelado, que corresponde à solução de ácido nítrico oxidada, durante a suspensão a solução torna-se acinzentada e no final do processo, ela fica translúcida.

Este método, além de adicionar grupos funcionais também incrementa a purificação dos NTC. Se houver necessidade, para quaisquer aplicações, de utilização dos NTC de alta pureza sem grupos funcionais adsorvidos, a funcionalização pode ser revertida através de tratamento térmico, colocando os nanotubos de carbono carboxilados a 400°C em vácuo mecânico por no mínimo 1h de tratamento por grama de NTC. Após este procedimento os NTC não ficam mais suspensos em água.

Análises de espectroscopia na região do infravermelho foram realizadas para identificar possíveis funcionalizações nos NTC após processo de carboxilação. É conhecido que os grupos funcionais se ligam às regiões mais reativas dos NTC. Estas regiões estão localizadas nas extremidades do tubo ou/e em defeitos estruturais na parede do mesmo.

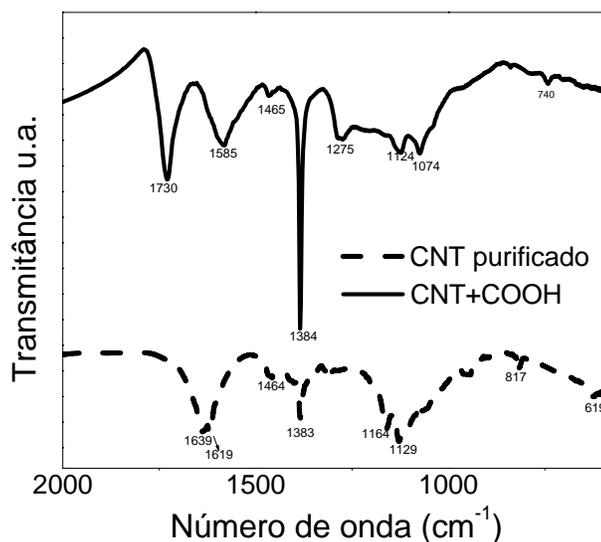


Figura 4-2: Espectroscopia IR de NTC carboxilado

No espectro da região do infravermelho (figura 4-2) podemos visualizar dois espectros, a saber: o referente aos NTC purificados (em linhas pontilhadas), onde podem ser observados os modos vibracionais dos grupos funcionais, por exemplo, de estiramentos C-H (~ 1640 cm⁻¹ e 1383 cm⁻¹) e modos de vibração ainda não identificados como ~ 1464 cm⁻¹ e deformação C-O ~ 1150 cm⁻¹ que sempre aparecem

em NTC purificados² referentes grupos funcionais que foram adsorvidos provavelmente durante a queima de carbonos amorfos; o referente aos NTC carboxilados (em linha contínua) onde estão indicados os modos vibracionais dos grupos funcionais vibrações referentes ao estiramento C=O referente à carboxila, ($\sim 1730\text{ cm}^{-1}$) modo normal de vibração dos NTC referentes à ligação C=C ou ligação C=O ($\sim 1580\text{ cm}^{-1}$) estiramento C-H ($\sim 1380\text{ cm}^{-1}$), e deformação OH ($\sim 1100\text{ cm}^{-1}$ $\sim 1070\text{ cm}^{-1}$).

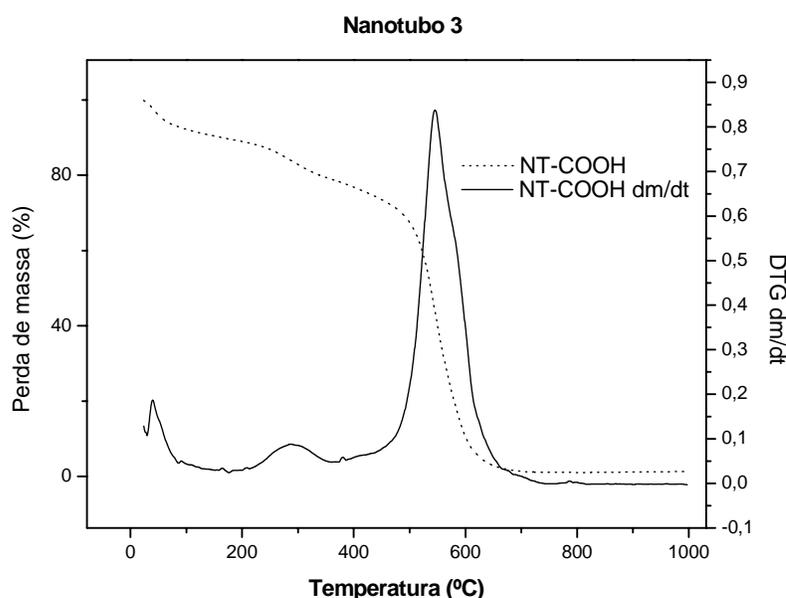


Figura 4-3: Análise térmica dos NTC

A análise de termogravimétrica ilustrada pela figura 4-3 mostra duas curvas, uma relativa à perda de massa e outra referente à análise diferencial (dm/dt). A linha contínua indica a presença de duas importantes perdas de massa. A primeira centrada em 286°C referente à perda dos grupos carboxilas e a segunda em 550°C referente à perda de massa de carbono. Como a área sob a curva dm/dt é proporcional à massa perdida durante a queima, podemos calcular a razão de carbonos ligados à carboxila. Para isto precisamos saber:

$$\text{Peso Molecular da carboxila } PM = 45 \frac{\text{g}}{\text{mol}};$$

Peso molecular do carbono $PM = 12 \frac{\text{g}}{\text{mol}}$;

Percentuais de perda de massa para o C e o COOH, onde a massa de carbono equivale a 75,8% e a massa de carboxila equivale a 9,7% e a massa dos resíduos equivale a 14%, portanto esta razão é:

$$\frac{\text{COOH}}{\text{C}} = \frac{m\%_{\text{cooh}}}{PM_{\text{cooh}}} / \frac{m\%_{\text{c}}}{PM_{\text{c}}} = \frac{9,7}{45} / \frac{75,8}{12} = 0,034 = 3,4\%$$

, que equivale a 3,4% moles de carbono com carboxilas. Isto é, em um NTC com $3 \mu\text{m}$ com um total de aproximadamente 281000 átomos pelo menos 9500 estão ligados a carboxilas e em média existem 25 átomos em cada extremidade do NTC com 1,4 nm de diâmetro, portanto as carboxilas não estão ligadas somente nas extremidades dos NTC.

De acordo com as imagens de AFM para estas amostras pode-se concluir que os NTC carboxilados apresentam comprimento médio entre 2 e $3 \mu\text{m}$ com uma distribuição larga de comprimentos, pois é possível perceber alguns NTC com comprimento muito pequeno, na ordem de 200 nm. Pela análise de perfil podemos verificar que estes NTC estão dispostos em pequenos feixes de 4,5 nm com aproximadamente três NTC. É possível encontrar NTC curtos nesta amostra devido aos tratamentos químicos a que eles são submetidos.

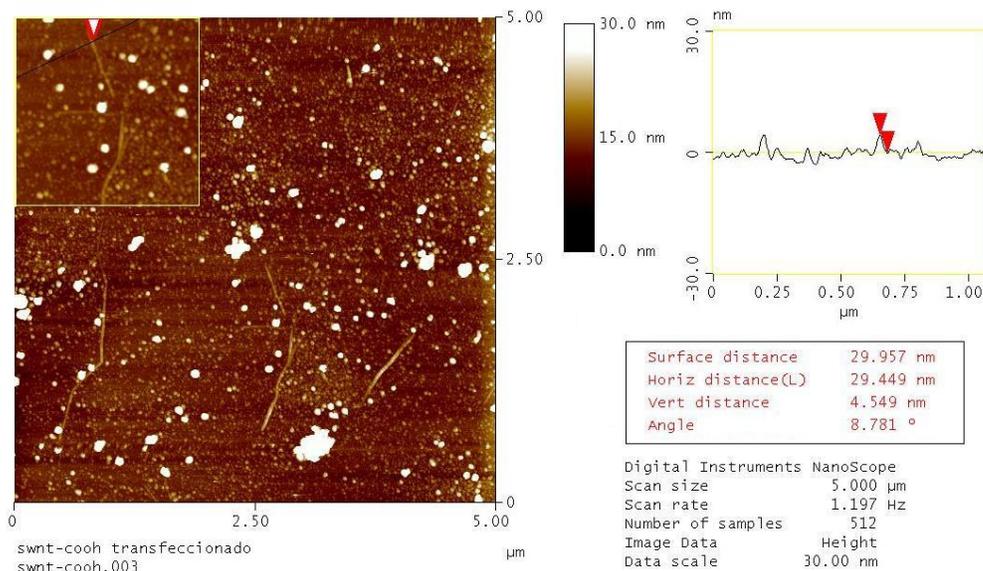


Figura 4-4: AFM dos NTC COH

Um fato interessante é que mesmo com maior interação dos NTC funcionalizados eles têm a propriedade de autosolubilização, isto é, quando estes NTC são adicionados em solventes como água ou tampões, parte dele é precipitado e parte dele solubiliza como pode ser observado na figura 4-5. Dentro do limite de concentração para saturação, pelo menos 50% de sua massa solubiliza instantaneamente. Os NTC que precipitam devem ser suspensos com ultra-som por no mínimo 3 minutos. A solubilização será tratada melhor no fim deste capítulo.



Figura 4-5: Solubilização instantânea dos NTC funcionalizados com carboxila.

A mudança na morfologia dos feixes de nanotubos, após o procedimento de funcionalização foi observada por microscopia eletrônica de varredura. Os NTC em parte se organizam em feixes e em parte se aglomeram. Os NTC com maior comprimento devem interagir mais fortemente um com os outros, devido a menor densidade de grupos funcionais adsorvidos na extremidade e corpo dos NTC, tendo como consequência a intensificação das interações entre os NTC, e se organizando em forma de feixes. Como pode ser visto na figura 4-6.

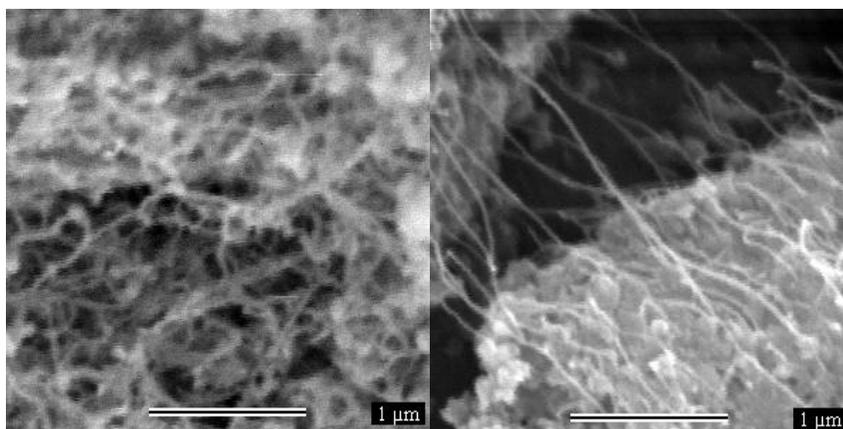


Figura 4-6: MEV de NTC COOH.

A espectroscopia Raman apresenta algumas diferenças entre o material funcionalizado e o não funcionalizado, principalmente com relação à intensidade da banda D. Podemos verificar que o fator de qualidade sofreu uma variação de 21% porém não é percebido alargamento na banda G. A intensidade relativa do RBM indica a presença de tubos com diâmetro entre 1,2 e 1,5 nm.

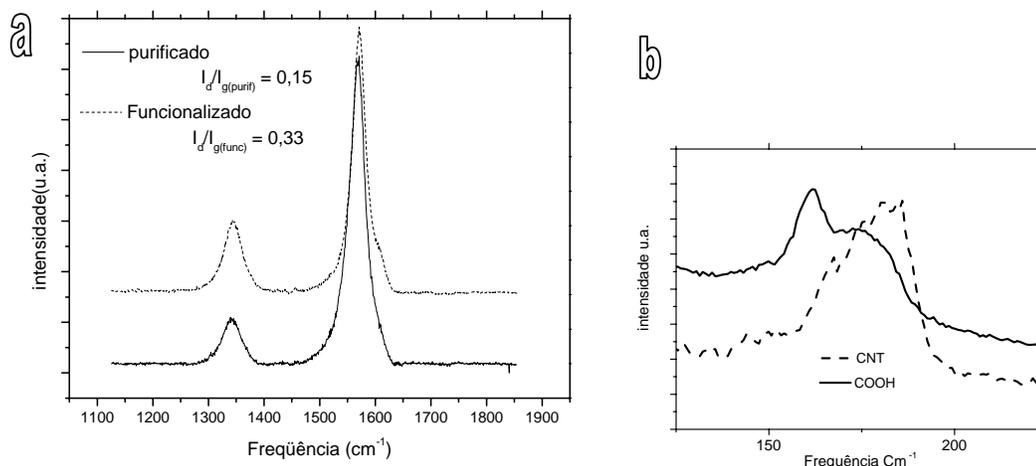


Figura 4-7: Espectroscopia Raman de NTC funcionalizados com carboxila.

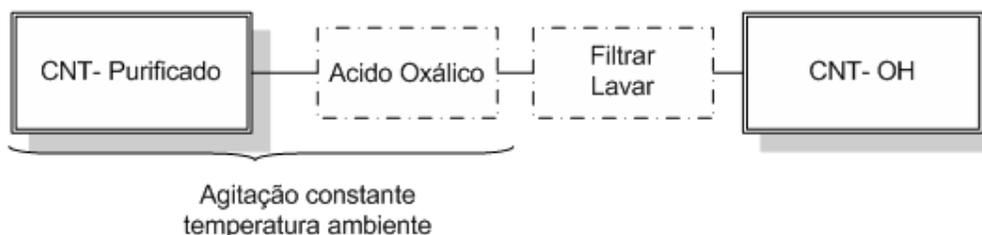
A carboxilação dos NTC teve êxito, concluímos então que temos um método confiável de funcionalização. Em média 3,4% dos carbonos existentes na estrutura do NTC estão com uma molécula de COOH ligada. Esta quantidade de moléculas ligadas ao NTC é suficiente para deixá-lo suspenso em solução aquosa por tempo indeterminado sendo que estas estão ligadas tanto nas extremidades do NTC quanto

em seu corpo. A solução mais antiga desta solução data de 3 anos e não apresentam material precipitado no recipiente.

4.2. Ácido oxálico

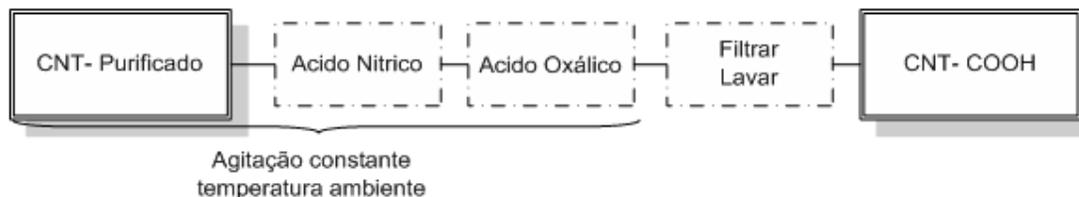
Como foi mencionado no início deste capítulo a funcionalização mais conhecida para a carboxilação é feita através de ácido nítrico e a temperatura elevada. A principal vantagem da funcionalização com ácido oxálico método aqui descrito, é a carboxilação realizada a temperatura ambiente utilizando ácido fraco. Possivelmente, este método não se difere do anterior, no que se diz respeito à estabilidade da funcionalização. Com isto podem ser feitas, nestes NTC, funcionalizações conjugadas, isto é, a colocação de novos grupos funcionais ligados as carboxilas dos NTC-COOH.

A funcionalização com ácido oxálico, que é um método original, é realizada de duas formas principais, cada uma delas trás ao NTC uma característica específica. A primeira, utilizando ácido oxálico puro acresce ao NTC a capacidade de ficar suspenso em água e outros solventes polares; Nesta funcionalização são utilizadas 0,5 mg NTC, 10 g de ácido oxálico e 50 ml de água. Esta mistura é colocada em ultra-som por aproximadamente 20 minutos. Seguindo o seguinte esquema:



A segunda, utilizando uma mistura de ácido oxálico e ácido nítrico adiciona aos NTC, mesmo a temperatura ambiente, grupos carboxílicos, que depois de adicionados precisam de altas temperaturas para que a funcionalização seja desfeita.

Essa funcionalização é realizada como esquematizado a seguir:



Nesta funcionalização são utilizados 0,5 mg NTC e uma solução com 10 g de ácido oxálico e 50 ml de água e é acrescido ao ácido oxálico 25 ml ácido nítrico. Esta mistura é levada ao ultra-som por 30 minutos e posteriormente lavada e seca.

No primeiro método, provavelmente a molécula do ácido oxálico está adsorvido na superfície do NTC como ilustrado na figura 4-8 e, no segundo, provavelmente a molécula se quebra e interage como no método de carboxilação tradicional ilustrado pela figura 4-1.

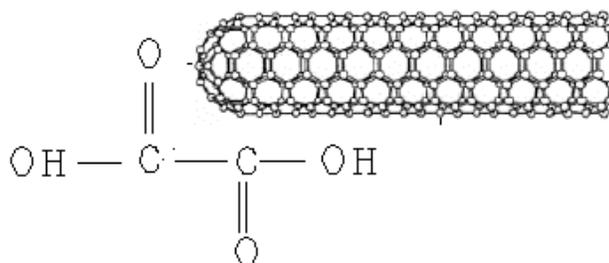


Figura 4-8: NTC – ácido oxálico

A diferenciação visual entre os métodos é a presença de NTC agregados dispersos na solução dos NTC funcionalizados somente com o ácido oxálico, isto é uma solução não homogênea. Isto se deve provavelmente a funcionalização de feixes de NTC.

Na figura 4-9 podemos observar o espectro da região do infravermelho de três amostras de NTC: a primeira de NTC funcionalizados com ácido oxálico puro. Podemos observar os modos vibracionais do grupo funcional carboxilato³, com modos de vibração correspondentes em $(1610-1550\text{ cm}^{-1}$ e $1420-1300\text{ cm}^{-1})$. Estas vibrações correspondem aos modos estiramento $\text{O}=\text{C}-\text{OH}$ do sal-ácido carboxílico. O pico em $\sim 3442\text{ cm}^{-1}$ indicam estiramento de $\text{O}-\text{H}$ associados e os picos em ~ 1100 devem estar associadas ao estiramento $\text{C}-\text{C}-\text{O}$ associado a deformação OH e estiramento $\text{C}-\text{O}$.

No segundo espectro de NTC funcionalizados com ácido oxálico e ácido nítrico onde estão indicados os modos vibracionais referentes ao estiramento $\text{C}=\text{O}$ referente à carboxila, ($\sim 1730\text{ cm}^{-1}$) modo normal de vibração dos NTC referentes à ligação $\text{C}=\text{C}$ ou ligação $\text{C}=\text{O}$ ($\sim 1580\text{ cm}^{-1}$), deformação OH ($\sim 1100\text{ cm}^{-1}$ $\sim 1070\text{ cm}^{-1}$).

No terceiro espectro de NTC funcionalizados com ácido oxálico e ácido nítrico após tratamento térmico a 200°C, onde estão indicados os modos vibracionais referentes ao estiramento C=O referente à carboxila, ($\sim 1740\text{ cm}^{-1}$) modo normal de vibração dos NTC referentes à ligação C=C ou ligação C=O ($\sim 1587\text{ cm}^{-1}$). Estes dois últimos espectros comprovam que estes nanotubos estão realmente carboxilados e para a reversão deste estado é necessária grande energia térmica.

Como vimos anteriormente, a temperatura de decomposição da carboxila ligada ao NTC está em torno de 280°C. Fizemos então um tratamento térmico de 2h à 200°C para verificar se a funcionalização com carboxila iria ser extinta. Como podemos observar no terceiro espectro a funcionalização permanece inalterada comprovando a eficiência do método de carboxilação de NTC a frio, com estes resultados podemos observar o aparecimento dos modos vibracionais dos grupos carboxila para os NTC funcionalizados com a mistura de ácidos.

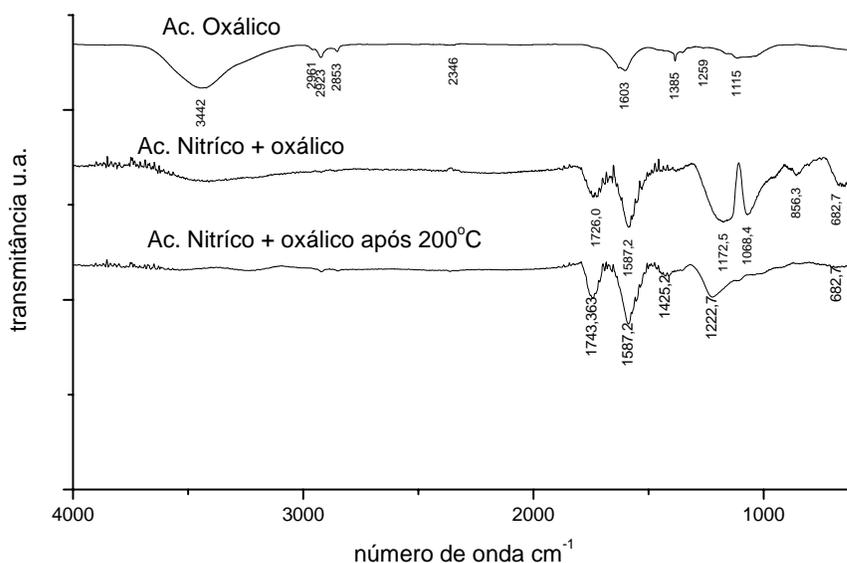


Figura 4-9: Infravermelho das funcionalizações com ácido oxálico, ácido nítrico e oxálico e a anterior com tratamento térmico de 200°C por 3 horas.

Através destes espectros podemos concluir que há uma diferenciação entre os dois métodos de funcionalização, os NTC funcionalizados com ácido oxálico puro apresenta-se funcionalizado com carboxilato, enquanto os funcionalizados com ácido nítrico e oxálico apresentam grupos carboxila ligados. Esta ligação não é reversível

com variação de temperatura de até 200°C o que indica possivelmente uma ligação covalente.

Foram feitas análises por espectroscopia Raman para verificar se houveram mudanças na estrutura dos NTC para estas funcionalizações. Os espectros indicam que os NTC funcionalizados e não-funcionalizados não apresentam diferenças significativas. O modo de respiração radial no NTC funcionalizado com ácido nítrico e oxálico teve o mesmo comportamento dos funcionalizados com ácido nítrico puro. Os espectros de nanotubos purificados e funcionalizados com ácido oxálico puro são semelhantes. Para todas as amostras não houve diferenciações no espectro em alta frequência, sendo o fator de qualidade é aproximadamente 0,75. Como pode ser observado na figura 4-10 que mostra o espectro para os NTC funcionalizados com a mistura de ácidos oxálicos e nítricos.

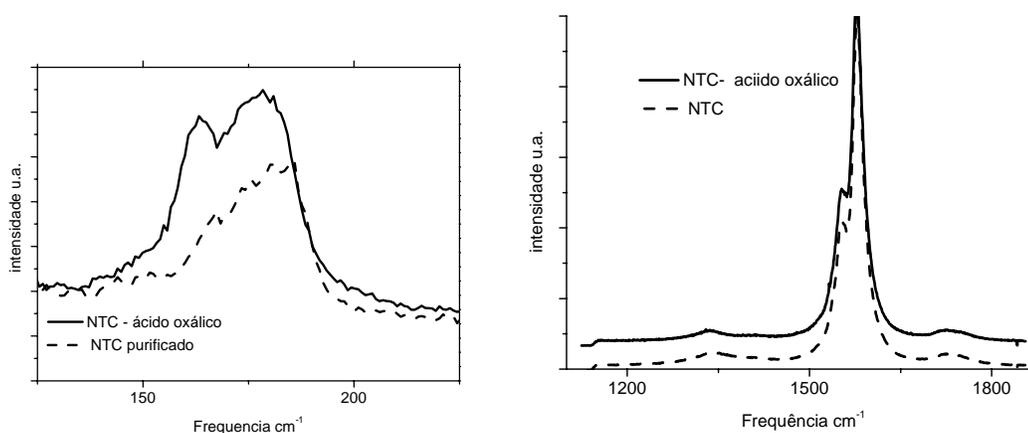


Figura 4-10: Espectroscopia Raman de NTC funcionalizado com ácido oxálico e nítrico.

Os feixes de nanotubos após o procedimento de funcionalização foram observados por microscopia eletrônica de varredura. Os NTC em parte se organizam em grandes feixes e em parte como os demais nanotubos se aglomeram e não é possível distinguir o tipo de funcionalização utilizada, como pode ser observado na figura 4-11 que mostram as micrografias dos NTC funcionalizados por ácido oxálico puro (figura 4-11a) e pela mistura de ácidos (figura 4-11b).

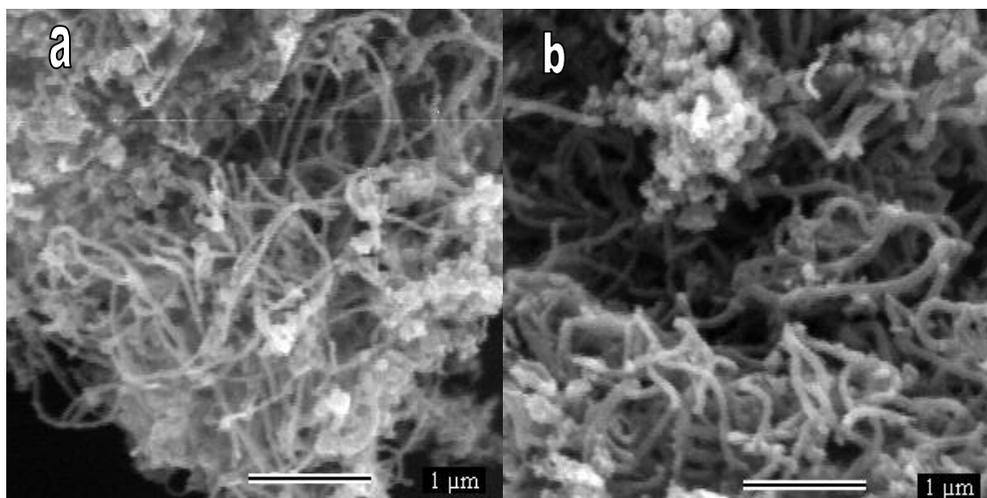


Figura 4-11: MEV NTC funcionalizados com a) ácido oxálico e b) ácido oxálico e nítrico.

Em resumo, a principal vantagem deste método é que o processo ocorre à temperatura ambiente com pequena concentração de ácido nítrico, diferentemente do processo comum de funcionalização que necessita de procedimento de longa duração e elevadas temperaturas com ácidos fortes. Os NTC por serem processados a frio, possibilitam a funcionalização de feixes de NTC, o que pode ser minimizado por mudança de frequência de ultra sonificação durante o processo de funcionalização. Após a suspensão, sempre é possível observar aglomerados de NTC funcionalizados com ácido oxálico puro em meio aquoso.

Os NTC funcionalizados pelos ácidos nítrico e oxálico possuem características similares aos funcionalizados somente com ácido nítrico, como a presença de grupos carboxílicos, que promovem a solubilização.

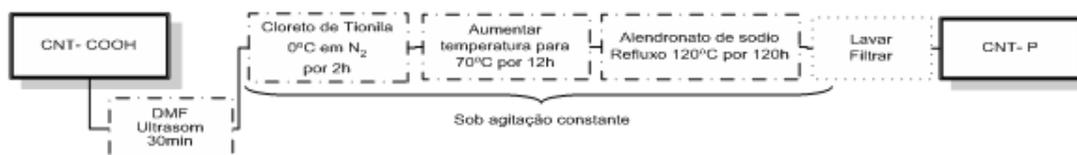
Apresentaremos a seguir métodos de funcionalização visando aplicações biológicas.

4.3. Alendronato de sódio

Esta funcionalização é uma das que causou maior expectativa por causa das aplicações possíveis destes NTC funcionalizados como precursor de cristalização de HAp. O Alendronato de sódio é o principal componente de medicamentos de manutenção de desordens ósseas, como a osteoporose. Ele é um fármaco presente a um grupo de compostos denominados bifosfonados, sendo o responsável pela inibição específica da reabsorção óssea mediada por osteoclastos. O mecanismo de ação dos bifosfonados pode estar relacionado à capacidade de se fixarem na matriz

óssea, sendo assimilados pelos osteoclastos. Com esta especificidade podem-se utilizar estes nanotubos em compósitos implantáveis para serem usados em fraturas ou outras desordens ósseas que necessitam de enxerto.

A funcionalização com alendronato de sódio também é realizado através de várias etapas. Este processo foi baseado no artigo Bin Zhao e colaboradores⁴, onde é feita uma funcionalização com poly-(*m*-aminobenzene sulfonic acid)(PABS). Para realizar esta funcionalização foi adicionado 12 mg de NTC em 20 ml de dimetilformamida (DMF) e levada ao ultra-som por 30 minutos. A temperatura desta solução foi levada a 0°C e acrescentado, em atmosfera de nitrogênio, 0,4 ml de cloreto de tionila e mantida sobre agitação constante. A temperatura foi elevada á 70°C para remover o cloreto de tionila sob atmosfera de oxigênio. Como última etapa, foi dissolvido o alendronato em DMF e adicionado à solução inicial ficando em refluxo por 5 dias. Esta solução é posteriormente lavada com álcool etílico e água deionizada. Podemos descrever esta funcionalização de forma simples através do esquema abaixo:



De acordo com a imagem de AFM para estas amostras, ilustradas pela figura 4-12, pode-se concluir que os NTC fosfonados apresentam comprimento que variam de centenas de nanômetros a alguns micrometros. Os NTC muito curtos provavelmente aparecem por ser um método de preparação com reações químicas fortes e de longa duração. Pode-se ainda perceber que os nanotubos longos, mesmo dispersos, se organizam em pequenos feixes de dois a três NTC, e os NTC curtos apresentam-se isolados.

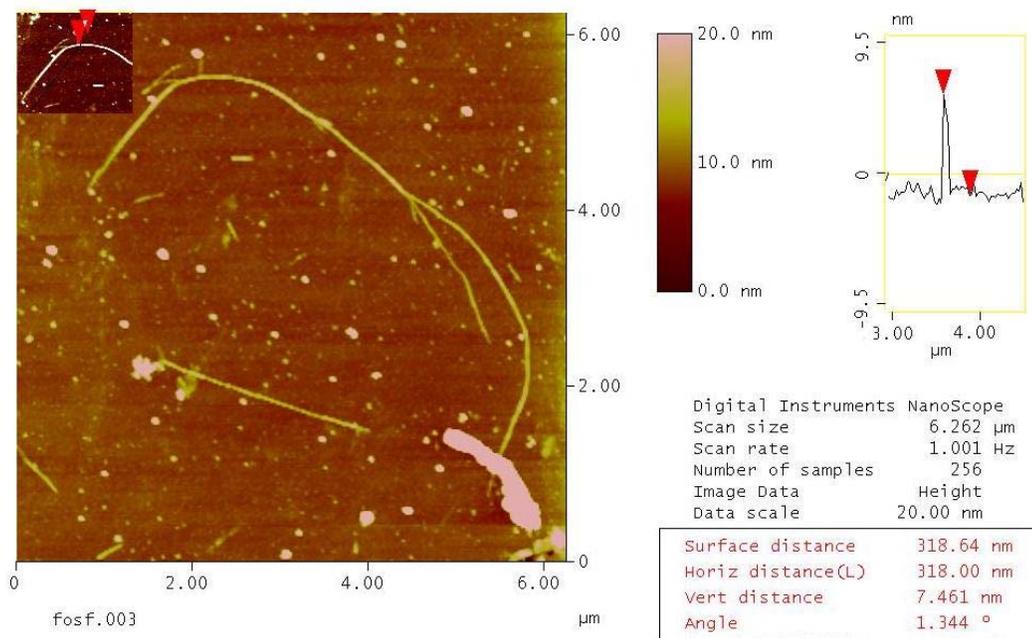


Figura 4-12: AFM de NTC bifosfonados sobre substrato de silício.

No espectro da região do infravermelho (figura 4-13) podemos visualizar os espectros dos NTC funcionalizados com alendronato de sódio, onde os principais modos vibracionais dos grupos funcionais adicionados à superfície do tubo são os estiramentos C=C ($\sim 1640\text{ cm}^{-1}$ até 1580 cm^{-1}), P-C ($\sim 1440\text{--}1280\text{ cm}^{-1}$ referente à estiramento C - P=O), -POH($\sim 2700\text{--}2560\text{ cm}^{-1}$ e $1040\text{--}900\text{ cm}^{-1}$) e P-O ($\sim 1200\text{--}900\text{ cm}^{-1}$) forte e o estiramento livre - P=O ($\sim 1300\text{--}1250\text{ cm}^{-1}$).

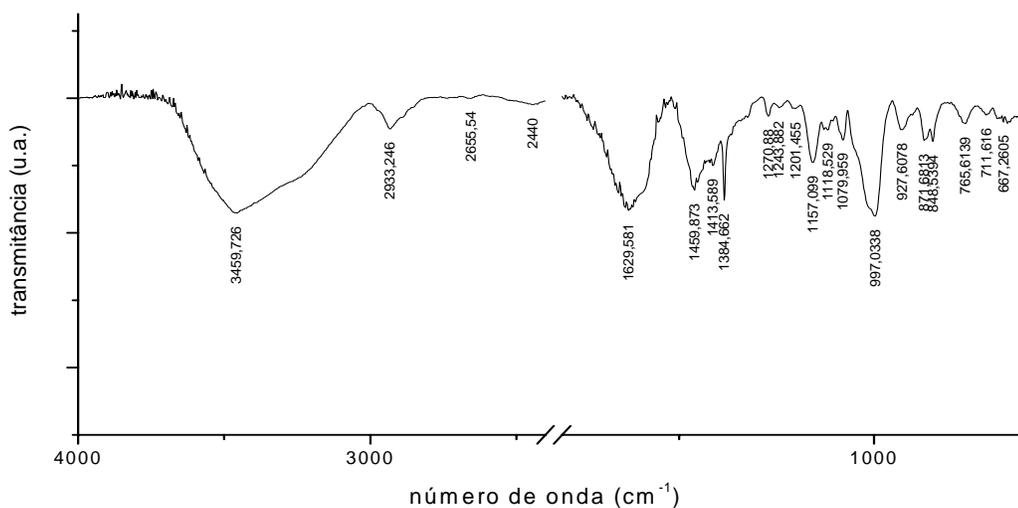


Figura 4-13: Espectro IR do NTC funcionalizado com Alendronato de sódio

Provavelmente a ligação do alendronato ocorre covalentemente, pois durante a funcionalização é utilizado o cloreto de tionila que se liga a carboxila adicionando um átomo de cloro a este grupo. Como o cloro é um bom abandonador, o fosfato o substitui na ligação.

A análise por espectroscopia Raman mostra na figura 1-14 que os espectros dos NTC funcionalizados com alendronato de sódio apresentam algumas diferenças. Às baixas frequências, o modo de respiração radial não pode ser mais observado. No espectro em alta frequência pode ser observado alargamento na banda G e aumento na banda D que se une a banda G. Isto mostra que houve mudanças estruturais dos NTC como o aumento de defeitos pelo processo altamente reativo.

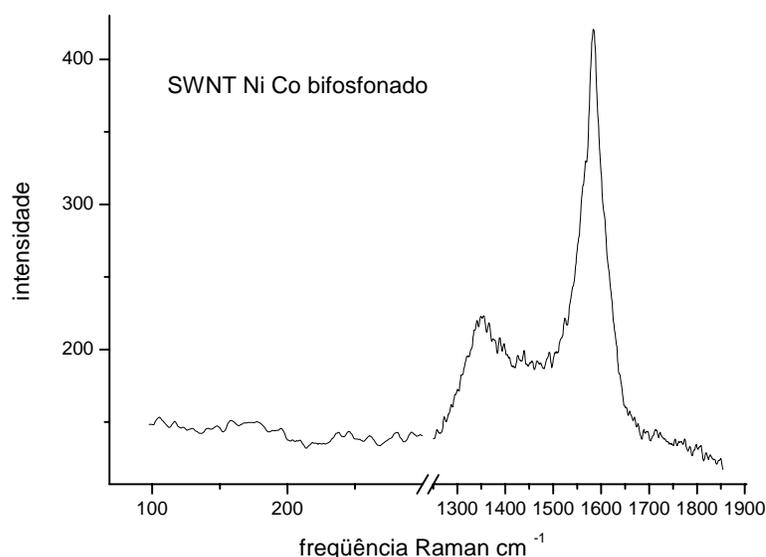


Figura 4-14: Espectroscopia Raman de NTC funcionalizados com alendronato.

Como foi visto a funcionalização dos NTC com alendronato de sódio é viável, onde há grupos fosfônicos ligados a sua superfície.

O efeito biológico principal dos fosfonatos é representado pela inibição da reabsorção óssea. O mecanismo exato de ação do alendronato ainda não é totalmente conhecido, mas ele parece ter dois mecanismos principais de ação: em primeiro lugar, o alendronato se liga fortemente aos cristais de fosfato de cálcio, inibindo, assim, a formação, a agregação e a dissolução dos cristais. Apesar disso, o alendronato não apresenta o efeito indesejável de alguns outros medicamentos de inibir também, a mineralização do osso normal. Em segundo lugar, o alendronato agiria como inibidor da reabsorção óssea através de uma ligação direta sobre a geração e/ou sobre a atividade dos osteoclastos.

Portanto, o alendronato melhora a rigidez do osso através de sua ligação com os cristais de hidroxiapatita. Ao mesmo tempo, é também capaz de interromper a atividade aumentada dos osteoclastos, diminuindo, assim, a reabsorção óssea.

De posse destes resultados e sabendo da capacidade de solubilização destes nanotubos, foi possível utilizá-los na produção de biocompósitos estes NTC que serão relatados nos próximos capítulos.

4.4. Ouro

O ouro é um bom ligante para moléculas contendo tiol pela afinidade do enxofre com ouro. Verificamos que alguns fosfatos comerciais tinham uma cadeia tiol em uma das extremidades da molécula, e por este motivo, viemos a decorar os NTC com ouro. O processo mais eficiente para esta decoração realizada no nosso laboratório foi inspirado no trabalho de Michael Faraday⁵ que fez nanopartículas de ouro em 1857, as quais estão suspensas, sem qualquer depósito perceptível até os dias de hoje no museu de Londres. Faraday faz a suspensão coloidal de ouro através de redução lenta de ácido cloroáurico, HAuCl_4 por meio de agente redutor como, por exemplo, hidrazina, N_2H_4 . Acrescentando os NTC a este processo de produção de nanopartículas obtivemos um segundo processo inovador, o de decoração de NTC com partículas de ouro. Neste processo são colocados 12 mg de NTC purificados em recipiente com 20ml de água destilada. Estas são colocadas sob agitação e são adicionados 50mg de cloreto de ouro hidratado e 0,2 ml de hidrazina. Esta mistura permanece sob agitação constante por no mínimo 6h e é posteriormente filtrada e lavada para retirar partículas não aderidas aos NTC e secas.

Este processo pode ser assim esquematizado:



Após o procedimento de funcionalização com nanopartículas de ouro podemos observar por AFM que os NTC se organizam em feixes, onde é possível observar que os NTC apresentam ao longo de seu comprimento nanopartículas de ouro e alguns aglomerados os quais foram identificadas por EDX. Os aglomerados se formaram principalmente devido à forma de secagem dos nanotubos dispersos, e também de excesso de nanopartículas de ouro na solução.

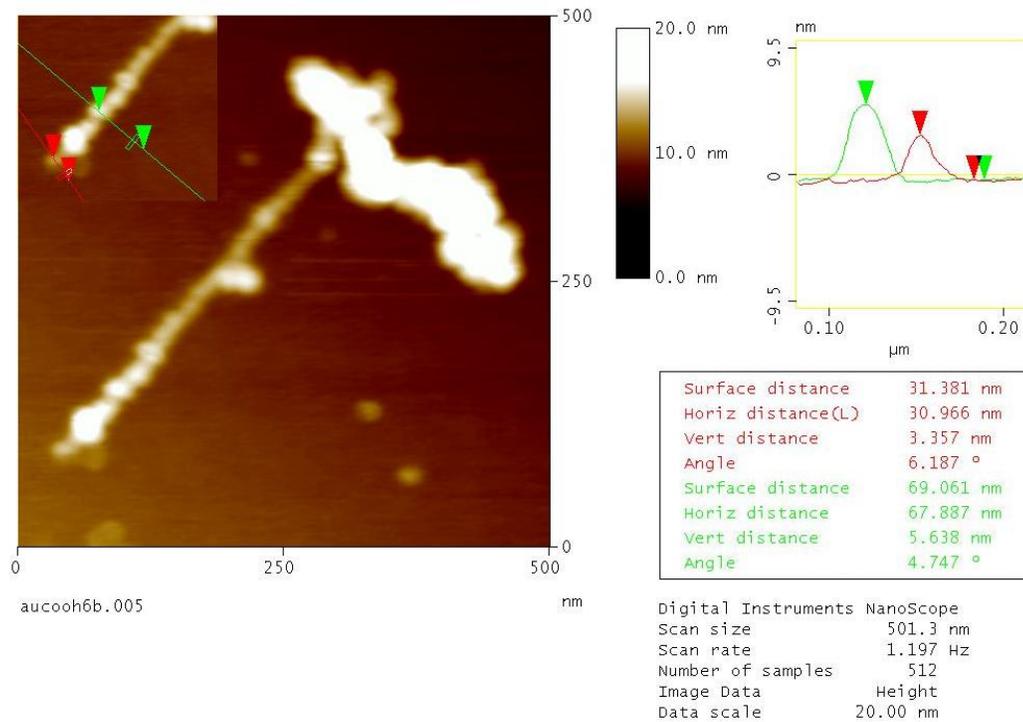


Figura 4-15: AFM dos NTC decorados com ouro

A espectroscopia Raman mostra que os NTC funcionalizados com ouro não possuem RBM. Na banda G pode ser observado alargamento e na banda D há um aumento fazendo com que estas duas se unissem, esta característica pode sinalizar a amorfização da amostra e mudanças superficiais dos NTC pela adição de nanopartículas na parede dos NTC.

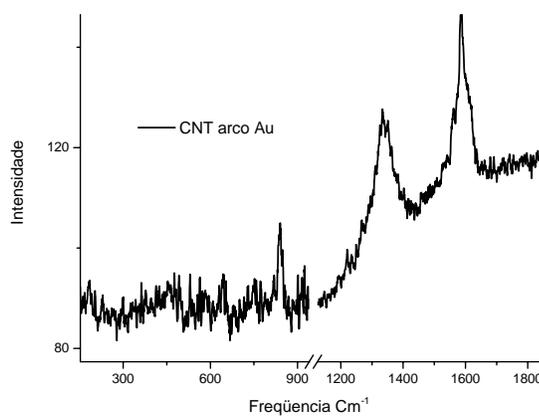


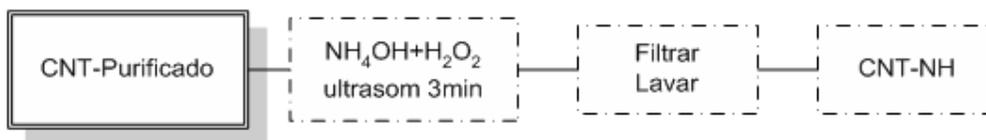
Figura 4-16: Espectroscopia Raman dos NTC decorados com ouro.

Pesquisas na fabricação de nanotubos decorados com nanopartículas metálicas vêm sendo realizadas, e estas exibem propriedades catalíticas existentes somente quando possuem dimensões inferiores a ~ 2 nm. Nanopartículas de ouro e platina podem crescer em nanotubos funcionalizados com grupos carboxílicos⁶ através dos sais de HAuCl_4 e HPtCl_6 respectivamente. Estes materiais podem ser aplicados como catalisadores, dispositivos eletrônicos, sensores de gás, marcadores biológicos e veículos radioterápicos^{7,8,9,10} e como agente de funcionalização conjugada para fosfonatos contendo tiol.

Outra promissora funcionalização para usos biológicos é a amônia ora por sua fácil execução, ora pela funcionalidade do grupo NH adsorvido na superfície dos NTC. Na próxima seção será descrita as principais características desta funcionalização.

4.5. Hidróxido de amônia

A funcionalização com hidróxido de amônia (NH_4OH) é um método fácil e rápido para dispersão de NTC em água. Este método é original e nos possibilitou redigir um artigo que será em breve publicado. O procedimento para a funcionalização com NH_4OH é muito simples: o pó de NTPS purificado é disperso em uma solução de NH_4OH e ultrasonificador por 2-3 minutos. Depois disso, a solução é seca. Os NTC funcionalizados podem ser dissolvidos novamente em água, formando uma solução que é estável por mais de seis meses sem significante precipitação de material. Como esquematizado abaixo:



A adsorção deste tipo de molécula sobre o NTC ainda não é totalmente conhecida. Jing Lu¹¹ diz que as interações destas moléculas com os NTC dependem de sua estrutura eletrônica e que devido a grande interação dos NTC metálicos com a molécula de NH_3 , as ligações são mais fortes nestes do que em NTC semimetálicos quando, comparados a tubos de mesmos diâmetros. Outro dado observado pelo autor é que as ligações com hidrogênio dominam em relação às ligações com nitrogênio nos NTC.

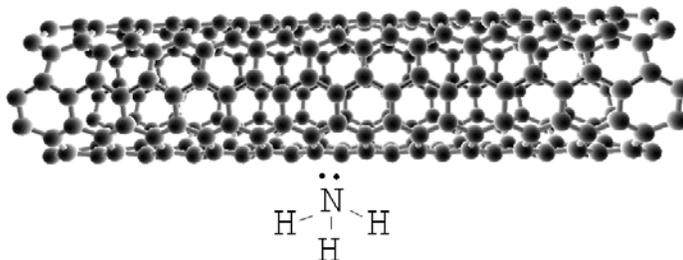


Figura 4-17: NTC funcionalizado com amônia

A figura 4-18 mostra fotos de soluções preparadas com NTC antes e após sua funcionalização com amônia onde a figura 4-18a mostra os NTC antes de funcionalizar, a figura 4-18b mostra os NTC funcionalizados com amônia e a figura 4-18c mostra os NTC desfuncionalizados. Todas as soluções estão estáveis há aproximadamente 6 meses e não há indício de precipitação considerável nos NTC funcionalizados com amônia. Na figura 4-18 (c) pode ser notado que os NTC estão precipitados, isto ocorre após os nanotubos funcionalizados sofrerem aquecimento à 150°C. Este fenômeno pode ser explicado pela reversibilidade de algumas funcionalizações químicas, isto é os grupos funcionais são extraídos dos NTC por energia térmica. E assim os NTC não podem ser mais suspensos em água. Este teste foi realizado para verificar se a ligação entre os NTC e a amônia é covalente ou não covalente, se a ligação fosse covalente ela iria precisar de temperaturas mais elevadas para retirar os grupos funcionais dos NTC.



Figura 4-18: NTC em água a) purificado, b) funcionalizado com amônia, c) o anterior com tratamento térmico à 150°C.

De acordo com as imagens de AFM para esta amostra (figura 4-19) pode-se concluir que os NTC funcionalizados com amônia apresentam comprimento de aproximadamente 3 μm . Uma característica importante em nosso processo é que este tipo de funcionalização não cria defeitos nas paredes dos NTC. A funcionalização

não é oxidativa o suficiente para haver picotamento por ocorrer em temperatura ambiente com reação com reagentes com concentrações não estequiométricas.

As análises de microscopia de força atômica apresentam imagens típicas de NTC sobre substrato, esta indica que os NTC funcionalizados com amônia (NH_3 -NTC), não conseguem formar uma suspensão de nanotubos isolados, eles se apresentam em pequenos feixes de 4,5 nm de diâmetro, que corresponde a feixes de dois ou três nanotubos.

A dispersão NH_3 -NTC em água é em torno de 0,4 mg/ml. O método simples sendo sempre possível obter uma alta solubilidade comparada a outros métodos como o de carboxilação que está em torno de 0,5 mg/ml. Esta funcionalização é de grande interesse para aplicações biológicas uma vez que os NH_3 -NTC permanecem em solução estável em tampões e em água.

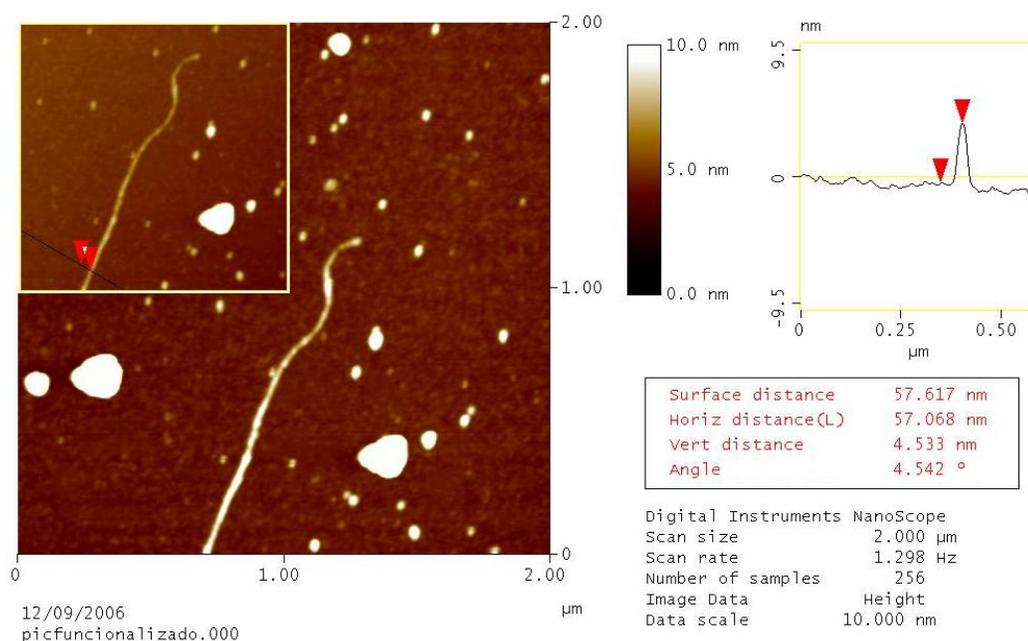


Figura 4-19: AFM de NTC funcionalizado com hidróxido de amônia.

Os espectros Raman antes e depois da funcionalização com amônia não apresentam diferenças significativas. O fator de qualidade variou em torno de 3% pelo pequeno aumento na banda D.

O espectro de infravermelho dos NTC funcionalizados com amônia (figura 4-20) mostra vibrações referentes aos modos de vibração da molécula NH_3 .

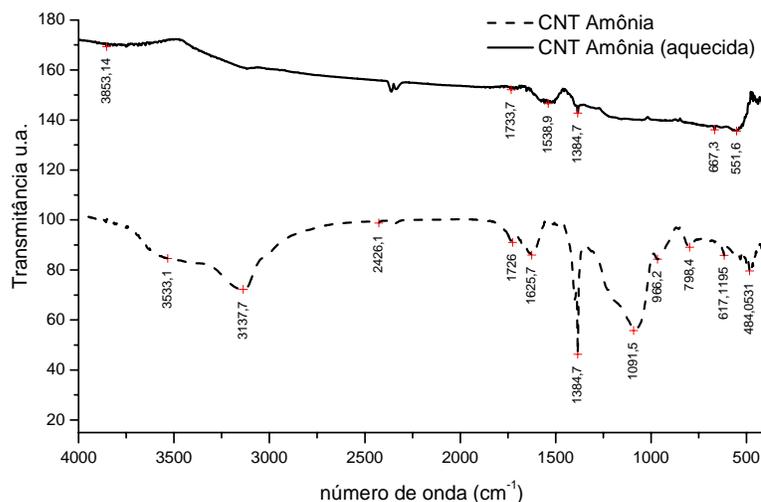


Figura 4-20: Espectroscopia IR NTC amônia e após tratamento térmico.

Os picos em torno de 2900 cm^{-1} são atribuídos ao grupo C-H, e os picos 1090 cm^{-1} do estiramento do C-O. Os picos $\sim 3137\text{ cm}^{-1}$ e $\sim 3447\text{ cm}^{-1}$ referentes a deformação assimétrica ν_1 e ν_3 da molécula NH_3 . O pico $\sim 1630\text{ cm}^{-1}$ refere-se a modo deformação ν_2 , e o pico em 1384 cm^{-1} refere-se ao modo *umbrella* ν_4 da amônia.

A Tabela 4-1 compara o resultado obtido pelos NTC adsorvidos por gás amônia e por solução. Estes dados foram retirados de um trabalho experimental realizado por Ellison et al.¹² onde foi realizado a adsorção de NH_3 em NTPS. Neste trabalho, o autor relata a interação de molécula de NH_3 na fase gasosa com os nanotubos de carbono à temperatura ambiente. Este experimento não parte do mesmo esquema de funcionalização, mas, ele pode mostrar como ocorrem as interações do gás NH_3 com os NTC purificados. O seu experimento consistia em colocar os NTC em atmosfera rica em NH_3 à temperatura ambiente e simultaneamente fazer medidas de espectroscopia na região do infravermelho.

A posição dos picos obtidos na funcionalização via solução é consistente com as adsorções do gás NH_3 . Os picos são similares ao gás a menos do modo sombrinha. No entanto, as frequências observadas em nosso caso foram deslocadas quando comparado à fase gasosa deste gás adsorvido nos NTC.

Tabela 4-1: Frequências de vibração do IR da molécula de amônia

	NTC (NH ₄ OH)	NTC (gas ads) ¹²	Fase gasosa ¹²	C60 ¹²	Benzeno ¹²
ν ₃ (estiramento assimétrico)	3367	3318,3249	3414	3354	3145
ν ₁ (estiramento assimétrico)	2925	3205, 3156	3337	3336	3222
ν ₂ (deformação)	1604	1618	1627	1616	1728
ν ₄ (<i>umbrella</i>)	1363(?)	1248	968, 932	1132	1282

O tipo de ligação química entre os NTC e o grupo funcional é um questionamento por vezes de difícil solução. No caso da amônia há um forte indício de que as moléculas de amônia estão adsorvidas na parede dos NTC sendo, portanto uma ligação não covalente, uma vez que o processo de funcionalização é reversível a baixa temperatura. Isto nos dá uma noção que a ligação entre o grupo funcional e os NTC ocorre com poucos eVs, o que pode ser considerado como uma interação de Van der Waals. Os espectros de Infravermelho após aquecimento não mostram os modos de vibração correspondentes à amônia.

As moléculas de amônia, como foram discutidas anteriormente, deve a sua adsorção ao tipo de tubo, em nosso caso provavelmente a molécula de NH₃ interage com a superfície do NTC através do H uma vez que o modo *umbrella* encontra-se deslocado da vibração normal deste modo como indicado na Tabela 4-1.

4.6. L-alanina

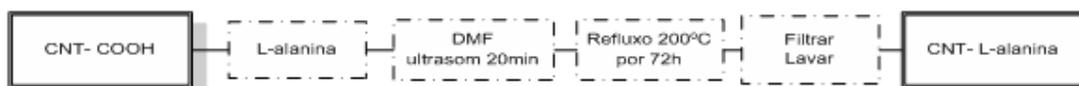
A L-alanina é um aminoácido neutro que forma parte do código genético. Estas são encontradas em altas concentrações no tecido muscular, sendo o aminoácido mais usado na construção de proteínas por meio de ligações peptídicas. Nos músculos, a alanina é convertida em glicose e ajuda a sintetizar açúcares podendo controlar o nível de glicose no sangue em pessoas com hipoglicemia.

A alanina é usada como fonte de energia em músculos, cérebro e sistema nervoso central, sendo capaz de estimular a produção de anticorpos e de reduzir o nível de colesterol. A presença deste aminoácido em NTC pode ser muito importante para controle de funcionalidades musculares por serem capazes de ultrapassar as membranas celulares.

A funcionalização de NTC com aminoácidos é também importante para a inclusão dos NTC em meios biológicos e sua aplicação está sendo implementada principalmente em transfecção celular. Os aminoácidos mais utilizados para biofuncionalizações são a biotina e a streptavidina e tem sua aplicação vinculada a ligações de medicamentos a estes aminoácidos, fazendo-os capaz de entrar nas células, fato que não ocorre sem a presença dos NTC.

A funcionalização de NTC com L-alanina é uma funcionalização inédita. A mesma é realizada por refluxo de 500 mg de NTC-COOH suspensos em 100 ml de DMF com 250 mg de L-alanina. Esta mistura é aquecida à 180°C sob agitação constante por 72h. Depois deste período, o balão volumétrico, onde é feito o refluxo é deixado em repouso para precipitar os NTC e o DMF, agora com tom terra (marrom avermelhado ou amarelado), é removido e o material precipitado é levado ao sistema de filtragem PTFE com filtros com poros de 0.45 μm . Os NTC são lavados por várias vezes, primeiro com álcool (pelo menos 50 ml) e posteriormente com água deionizada até que o pH esteja em torno de 7. A completa eliminação da L-alanina livre é feita através desta lavagem com água deionizada, uma vez que a alanina é solúvel em água. Finalmente o material é removido do filtro e seco à temperatura inferior a 60°C por aproximadamente 72h.

Este processo pode ser sistematizado desta forma:



A alanina provavelmente se organiza estruturalmente pela adsorção através dos átomos de hidrogênio do grupo amino existente na molécula.

Os NTC funcionalizados com L-alanina podem ser suspensos em água com utilização ultra-som para uma suspensão homogênea. A solubilidade dos NTC está diretamente ligada ao grupo funcional adicionado a ele. Entre todas as funcionalizações realizadas e relatadas neste trabalho a L-alanina é o melhor dispersante, com uma concentração de saturação de 0,8 mg/ml.

No espectro infravermelho podem ser visualizados os modos de vibração do grupo funcional. A figura 4-21a mostra o espectro dos nanotubos carboxilados onde o pico em $\sim 1720\text{ cm}^{-1}$ indicam o estiramento C=O de grupos carboxílicos, o pico em $\sim 1380\text{ cm}^{-1}$ indica deformação C-H ou modos fônons dos NTC. Os espectros mostrados nas figura 4-21 (c) e (b) ilustram os espectros dos nanotubos

funcionalizado com L-alanina e cristais de L-alanina respectivamente. Quando comparados, verifica-se que houve o deslocamento de nos picos que se referem aos modos de vibração de estiramento e deformação do N-H. Antes da reação de funcionalização com L-alanina, os picos indicavam o estiramento NH e a deformação NH em 3436 cm^{-1} e 1620 cm^{-1} respectivamente. Depois da reação, o espectro indica os picos correspondentes em 3422 cm^{-1} e 1618 cm^{-1} . Estes resultados podem indicar que a funcionalização com a molécula da L-alanina causada pelo refluxo com DMF provavelmente se conecta aos NTC através do grupo amina¹³.

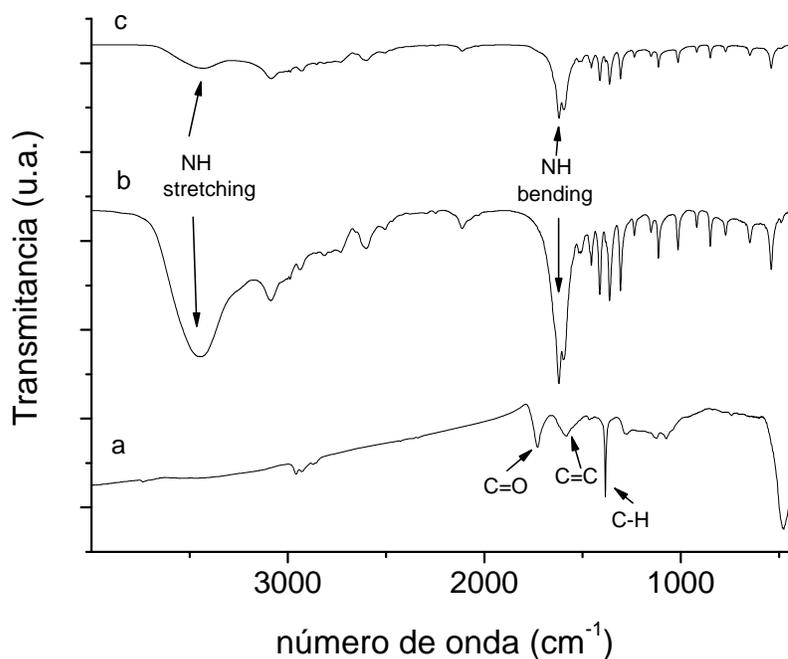


Figura 4-21: Espectroscopia IR da a) NTC carboxilados, b) L-alanina e c) NTC com L-Alanina

Quando comparados os espectros Raman do nanotubos carbono com os NTC funcionalizados com L-alanina verifica-se que não houve mudanças significativas entre os espectros. Os espectros permanecem semelhantes sem deslocamentos ou alargamento de linha. Os resultados obtidos por IR indicam com certeza a presença da L-alanina, porém não é possível inferir como é a interação da molécula de L-alanina com os NTC ou se existe somente uma mistura física entre os dois materiais com a existência de L-alanina livre nos NTC. Quando há interação química ocorrem

deslocamentos significativos dos picos ou mesmo o surgimento ou desaparecimento de um pico nos espectros de IR.

No caso da L-alanina, a microscopia de força atômica mostra que os nanotubos se organizam em pequenos feixes de 3 a 6 NTC após preparação da amostra. Estes feixes podem ser originados na secagem do substrato quando o solvente se evapora. Durante a secagem é possível observar o agrupamento dos nanotubos pela aglomeração da solução negra sobre o substrato.

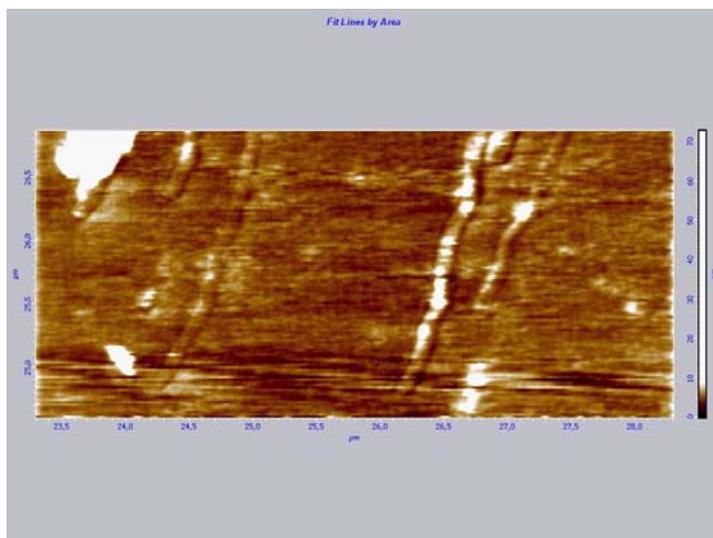


Figura 4-22: AFM de nanotubos funcionalizados com L-alanina.

Após o procedimento de funcionalização foi observada por microscopia eletrônica de varredura que os NTC se organizam em feixes e em forma de pequenos novelos de difícil visualização a baixas resoluções. Só é possível distingui-los nas extremidades da amostra ou em partes dela onde há alturas variadas formando uma espécie de fenda.

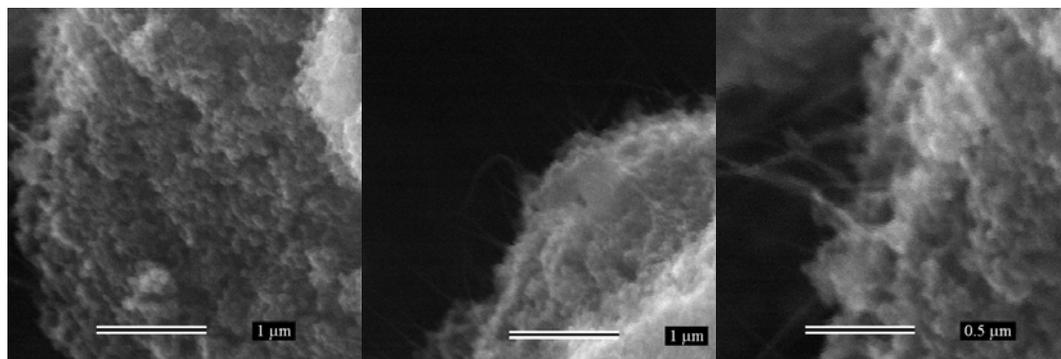


Figura 4-23: MEV de NTC funcionalizados com L-alanina.

É importante salientar que a funcionalização com L-alanina não é factível com nanotubos somente purificados, ela depende de um grupo funcional como a carboxila para interagir quimicamente e preferencialmente pela parte amina da molécula da L-alanina. Este resultado foi comprovado com cálculos teóricos realizados na Universidade Federal do Ceará, pelo Professor Valder Nogueira Freire e sua equipe. Ilustrados pela figura 4-24.

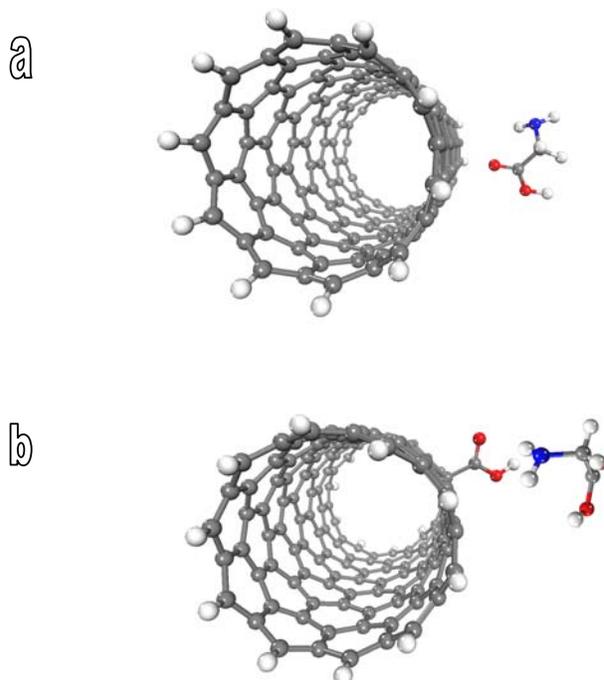


Figura 4-24: Foto de parte da simulação da interação entre a) NTC e L-alanina e b) NTC-COOH e L-alanina

Esta simulação indica que a atração da L-alanina pela carboxila é intensa e ocorre pela fração amina da molécula. O mesmo não ocorre com os NTC purificados onde a molécula de L-alanina não interage com o tubo. Com estes resultados podemos concluir que a alanina está ligada a carboxila dos NTC-COOH e que não existe interação direta entre os NTC e a L-alanina.

Finalmente, embora o mecanismo preciso de união dos grupos funcionais às paredes dos NTC não esteja completamente entendido, está claro que a presença de da alanina associada aos NTC inibem sua aglomeração, e permitem sua dissolução relativamente alta em água. Os limites de solubilidade obtidos são maiores do que a solubilidade dos NTC-COOH, este é um outro indicio da interação entre estes dois materiais.

4.7. *Nanotubos de carbono- RNA INF24*

As funcionalizações com seqüências de aminoácidos formando DNA, RNA e fragmentos destes vêm sendo amplamente estudadas. O DNA, por exemplo, tem sido utilizado em sensores de glicose¹⁴ e transporte intracelular¹⁵.

O RNA.INF24 é um oligonucleotídeo sintetizado(5`-ATG AGT GCT TCA TCG CAG CAG CAG-3` (Inf24 S)) capaz de inibir a germinação de fungos do feijão. Para que ele atue na inibição de proliferação é necessário injetá-lo dentro das células do fungo. A funcionalização dos NTC com este oligonucleotídeo possibilita a um processo de autoinjeção deste inibidor de germinação nos fungos. O processo de autoinjeção é similar ao de transfecção celular, isto é, o oligonucleotídeo atravessa a membrana celular, porém neste caso, não à mudança funcional da célula.

A funcionalização ocorre de forma similar a dos DNA ou RNA onde a seqüência é enrolada ao NTC¹⁶. A microscopia de força atômica mostrou que o fragmento de DNA funcionalizou os NTC, enrolando-se nele. Na figura 4-25 podemos verificar que várias fitas de DNA se enrolaram aos NTC ora pelo ângulo de enrolamento ora pela topografia que se apresenta com uma variação sinuosa em relação à altura dos NTC. Esta variação está em torno de 0,7nm altura entre o DNA e os NTC. O diâmetro total dos NTC funcionalizados é aproximadamente 3,6 nm, acreditamos que esta imagem é uma das poucas senão a única imagem que mostra claramente o enrolamento do seguimento de DNA sobre os NTC.

Esta funcionalização foi realizada com a colaboração do professor Ari Corrêa e seu aluno de Doutorado Leonardo Rodrigues, sendo que o estudo da função biológica deste material em fungos de feijão faz parte de sua tese.

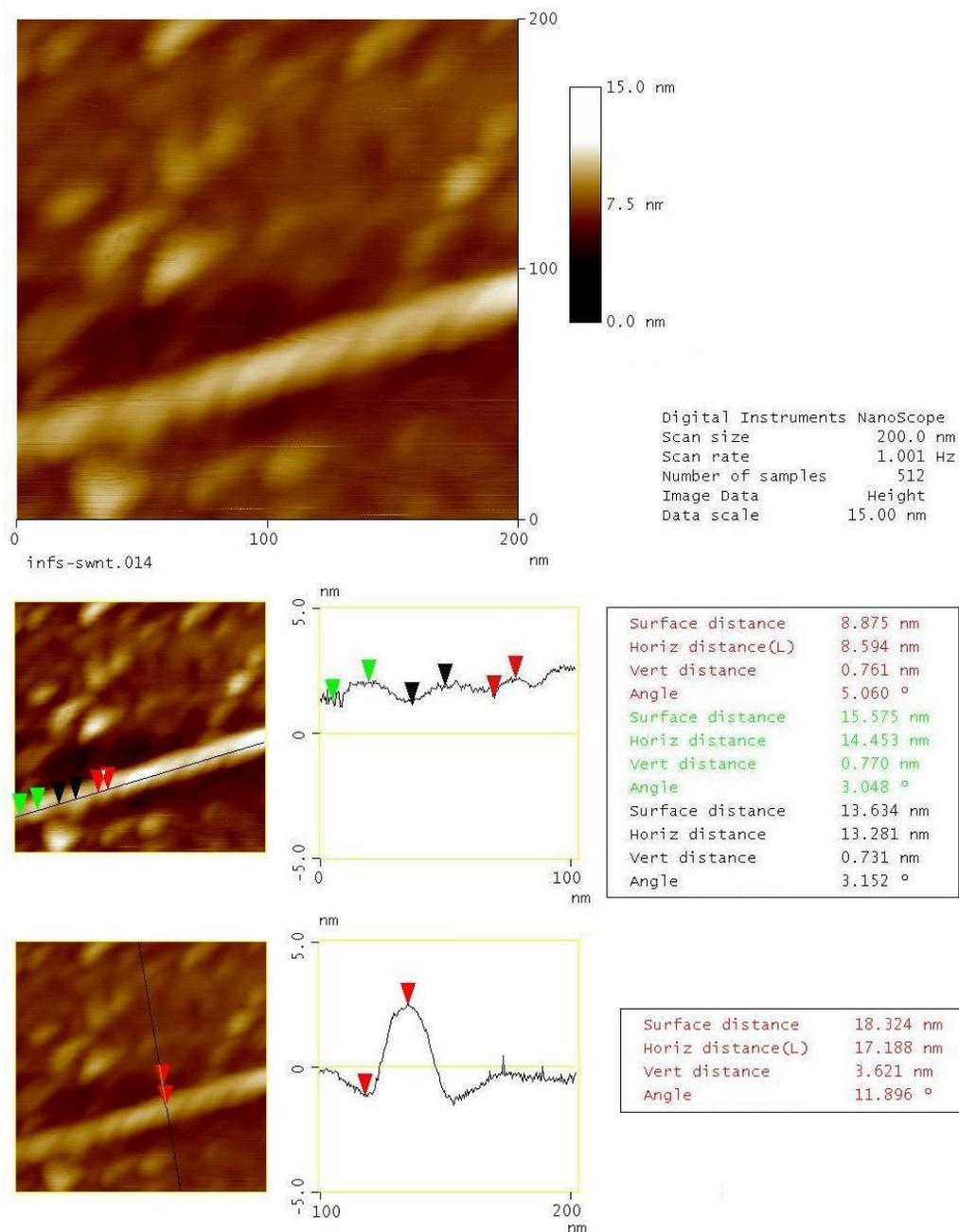


Figura 4-25: AFM NTC funcionalizados com oligonucléicos.

Na espectroscopia Raman não é possível observar modos vibracionais a baixas frequências e às altas frequências a banda D e a banda G tiveram a intensidade decrescida, a linha de base deslocada e a largura aumentou consideravelmente. Este sinal foi adquirido de NTC incluso na célula após autoinjeção.

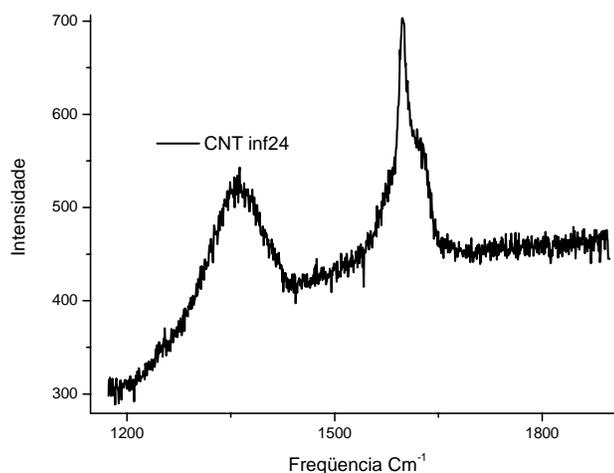


Figura 4-26: Espectro Raman dos CNT funcionalizados com o oligonucléico Inf24.

Na espectroscopia na região do infravermelho podemos observar dois espectros: o espectro do inf s 24 e o espectro dos NTC-COOH funcionalizados com o inf s 24. Na figura 4-27 podemos ver três bandas na região 1000-1700 cm^{-1} , com o pico em 1105 cm^{-1} , correspondendo à ligação C-O, vários picos na faixa de 1621-1673 cm^{-1} , correspondendo à ligação C=C e a banda em 1357-1421 cm^{-1} , indicando a presença de grupos C=O ou vibrações C-H deformação no plano. A presença de um pico em 2931 cm^{-1} é característico de vibrações de estiramentos O-H.

No espectro dos oligonucleotídeo inf s 24, os picos em 3196-3330 cm^{-1} , correspondem ao grupo hidroxila (estiramento O-H). Picos em 2880-2950 cm^{-1} correspondem a vibrações C-H simétrico/assimétrico (sym/asym) para o grupo metil (-CH₃). Absorção na região de 1677-1720 cm^{-1} indica a presença de grupo carbonila (C=O), embora o pico em 1658 cm^{-1} corresponda a vibrações do tipo C=C. As bandas 1550-1648 cm^{-1} correspondem à curva N-H presente no grupamento amina primária e secundária ou estiramento C=C-N.

As vibrações na região 1500-1571 cm^{-1} , usualmente indicam um anel aromático. Absorções nas regiões de 1440-1490 cm^{-1} e 1369-1390 cm^{-1} correspondem, respectivamente, a vibrações C-H assimétrica e curva simétrica do grupo metil (-CH₃). As vibrações nas regiões 1236-1344 cm^{-1} e 782-829 cm^{-1} correspondem ao estiramento P=O fosfatos orgânicos e a ligações P-O-C. Os picos em 1222-1224 cm^{-1} correspondem ao estiramento C-O. Absorção em 1089 cm^{-1} corresponde a vibrações C-O para álcool secundário, e em 1020-1062 cm^{-1}

corresponde ao estiramento C-H e amina primária. As absorções nas regiões 871-973 cm^{-1} , 838-856 cm^{-1} e 667-734 cm^{-1} correspondem a C-H deformação fora do plano. E a região entre 667-734 cm^{-1} e 838-856 cm^{-1} corresponde a C-H fora do plano de curvatura de um anel aromático.

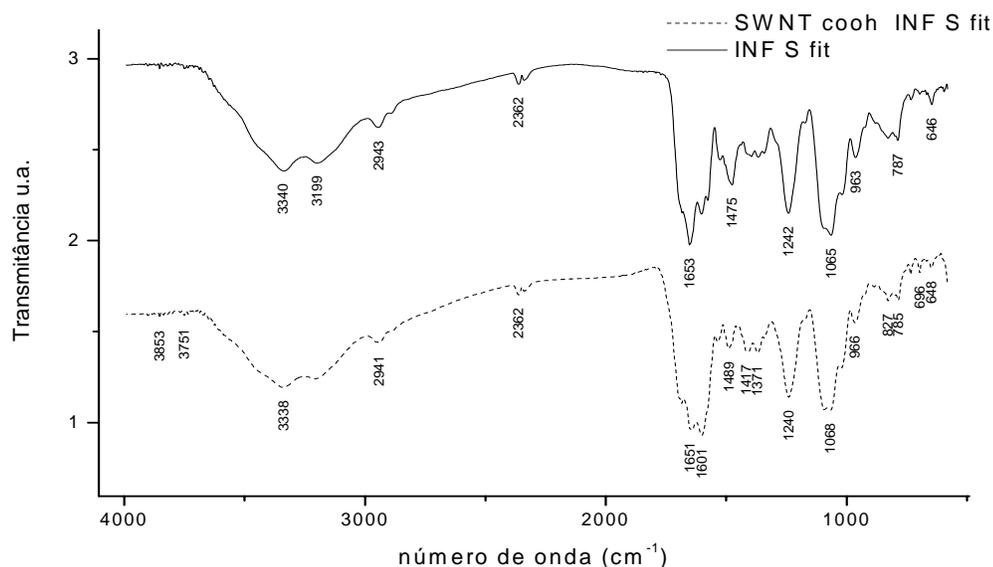


Figura 4-27: Espectroscopia IR NTC INF

Comparando os dois espectros verificamos que houve um aumento na transmitância relativa ao modo de vibração N-H em 1600 cm^{-1} e um pequeno deslocamento nas vibrações nos modos referentes a C-H assimétricas em 1440-1490 cm^{-1} e 1369-1390 cm^{-1} , indicando a interação entre as moléculas.

Este método também é inédito do laboratório de nanomateriais e evidência que, mais do que nunca, devem-se procurar métodos de baixo custo, simples e que não apresentem grande periculosidade, por mexer com ácidos fortes em altas temperaturas. Este trabalho foi executado graças à colaboração com o Professor Ari Correa, que estuda o desenvolvimento e proliferação de fungos do feijão a fim de eliminá-los.

Em conclusão, a funcionalização com oligonucleotídios é viável e capaz de promover a autoinjeção em membranas celulares de fungos causadores da ferrugem de feijão.

4.8. Polissacarídeos

A mais recente funcionalização realizada neste trabalho não esta diretamente ligada a aplicações biológicas. Os agentes funcionalizadores neste caso são os polissacarídeos goma arábica e de cajueiro. A goma arábica já foi relatada na literatura com um ótimo dispersante de NTC. Como ambas as gomas são semelhantes estruturalmente, então realizamos um trabalho utilizando várias gomas como agente funcionalizante de NTC, No momento esta sendo elaborado um documento de patente para depósito no INPI da funcionalização dos NTC com a goma de cajueiro, matéria prima tipicamente brasileira. Este trabalho contou com a colaboração do Professor Valter, da UFC.

Esta dispersão é de suma importância para aplicações de NTC, uma vez que a combinação da propriedade físicas destes com as dos polímeros abrem um campo de estudos e aplicações em direção a uma nova geração materiais inteligentes.

As gomas são conhecidas como substâncias químicas de elevado peso molecular, hidrofílicas, com propriedades coloidais, produzindo, em solventes, suspensões altamente viscosas, com funções espessantes, gelificantes, emulsificantes, estabilizantes e aglutinantes¹⁷. A goma de cajueiro substitui a goma arábica para aplicações como cola de papéis, nas indústrias farmacêuticas como revestimento ou aglomerante de pastilhas, para uso em qualquer tipo de animal por ser inócua à saúde. Também podendo apresentar-se como poderosa cola de madeira quando misturada à água com ação fungicida e inseticida. A goma de cajueiro é também utilizada na indústria alimentícia, como na fabricação de sorvete, onde atua como emulsificante evitando a cristalização da cauda de açúcar e seu derretimento rápido, na fabricação de cerveja, onde é utilizada para estabilização da espuma.

Essas modificações orgânicas englobam longas cadeias de alquilas, polímeros, reações de radicais, entre outras, que possibilitam a obtenção de nanotubos funcionalizados. Estas ligações podem ser do tipo covalente ou Van der Walls, eventualmente resultando em uma boa dispersão em vários solventes.

A funcionalização com a goma é feita por meio de mistura soluto solvente. Primeiro é feita uma solução da goma com o solvente que pode ser água, glicerina, álcoois em geral. O nanotubo de carbono purificado é misturado à solução anterior na concentração desejada. A concentração em uma solução de NTC na solução pode

variar de zero a 100 vezes em relação à massa da goma. A solução é feita com a mistura de todos os reagentes em temperatura ambiente com variação de 18 à 40°C em agitação constante por meio de agitadores magnéticos, ultra-som ou agitação mecânica. A forma de agitação influencia na homogeneização da solução, sendo que o meio mais eficiente é o ultra-som. O tempo de agitação normalmente utilizado para a funcionalização é 30 min. Após o término do intervalo de agitação, a solução é colocada em repouso por um tempo de no mínimo de 6h para que precipite a goma e NTC. A precipitação ocorrerá somente se a solução estiver saturada. Outra forma de retirar os resíduos é via centrifugação. A solução é levada a centrifuga à 2000 RPM por 30 min, onde duas fases se distinguem. Uma delas é a suspensão e outra o resíduo, permanecendo então uma solução suspensa homogênea de concentração não definida.

O armazenamento destes nanotubos funcionalizados não necessita de cuidados especiais como ficar em atmosfera inerte ou em dessecadores. Estes podem ser guardados de forma seca ou em solução, em recipientes fechados. Para o armazenamento dos NTC funcionalizados com gomas em forma seca, a solução preparada deve ser colocada em estufa com temperatura em torno de 60°C para secagem lenta, de outra forma eles aglomeram e se tornam difíceis de ressolubilizar. As funcionalizações podem ser identificadas por espectroscopia na região do infravermelho. Os polissacarídeos de uma maneira geral não são de fácil identificação principalmente se não sabe a sua origem e o método de preparação passo a passo. Já é conhecido que existe uma banda bem evidente em 1740 cm^{-1} usualmente identificada como ligação dupla C=O atribuída a grupos carboxílicos¹⁸ Em gomas de vegetais esta banda corresponde a alguns ácidos glucurônicos presente nas moléculas.

Existe em comum alguns troncos que apresentam ácido urônicos (monômeros) e nestes podem ser observados também picos distintos em 3600 até 3200 cm^{-1} , e de 1300 até 1000 cm^{-1} .

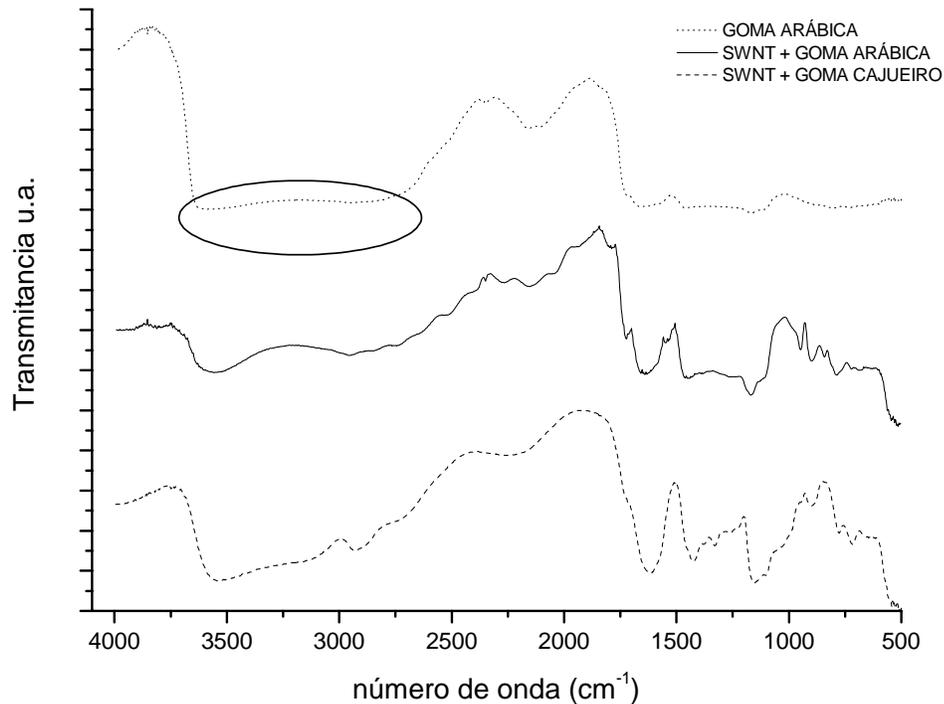


Figura 4-28: IR de polissacarídeos, goma arábica, NTC funcionalizado com goma arábica e com goma de cajueiro.

A análise por espectroscopia Raman mostra que os NTC funcionalizados com goma arábica não apresentam RBM. No espectro em alta frequência é observado um alargamento na banda G e aumento na banda D. Comparando estes dados com do IR é possível afirmar que houve funcionalização. O artigo de solubilização de NTC com goma arábica¹⁹ diz que os nanotubos são envolvidos um a um pelo polissacarídeo fazendo uma solução de alta dispersão.

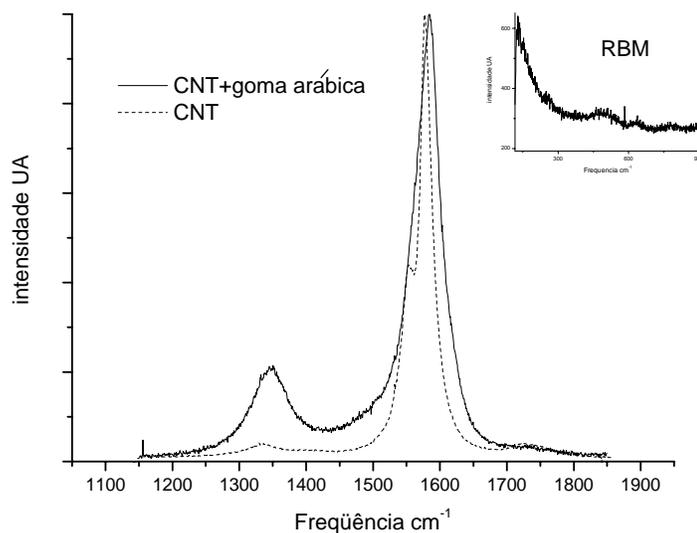


Figura 4-29: Espectro Raman de NTC e NTC funcionalizado com goma Arábica

Para efeito de comparação a solubilidade de NTC foi medida para diversas gomas como a arábica e a de cajueiro com e sem carboximetilação e a dextrana, gomas estas utilizadas na Universidade do Ceará. Podemos observar que as gomas associadas aos NTC têm solubilidade em média 9% maior do que as gomas puras (figura 4-30). Sendo que esta variação para a goma arábica, dextrana, goma de cajueiro carbomexilada e goma de cajueiro são respectivamente 18,16,12 e 5%.

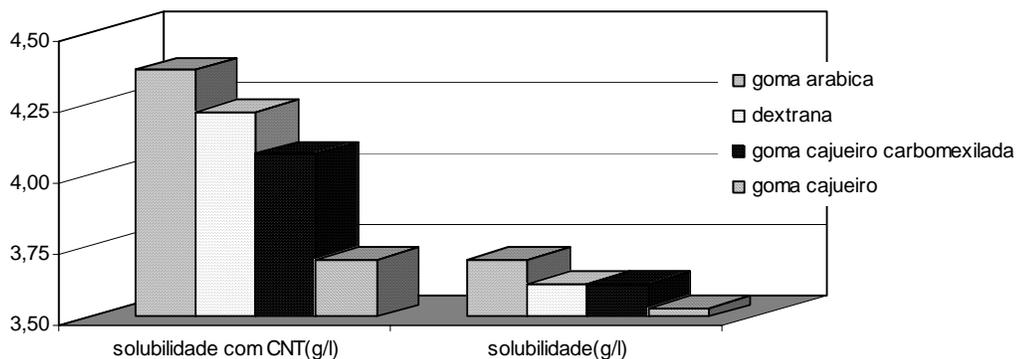


Figura 4-30: Gráfico comparativo de solubilidade entre polissacarídeos com 5% de NTC

Quando há variação da quantidade de NTC na goma arábica para funcionalização, a solubilidade também sofrer variação. A figura 4-31 mostra duas colunas de solubilidade, onde a primeira corresponde à massa de goma mais NTC e a segunda o quanto de material ficou solúvel em água. Percebemos que quanto maior a quantidade de NTC menor a solubilidade. Provavelmente isto ocorre devido à separação de materiais insolúveis da goma arábica ou a formação de aglomerados mais densos que se precipitam.

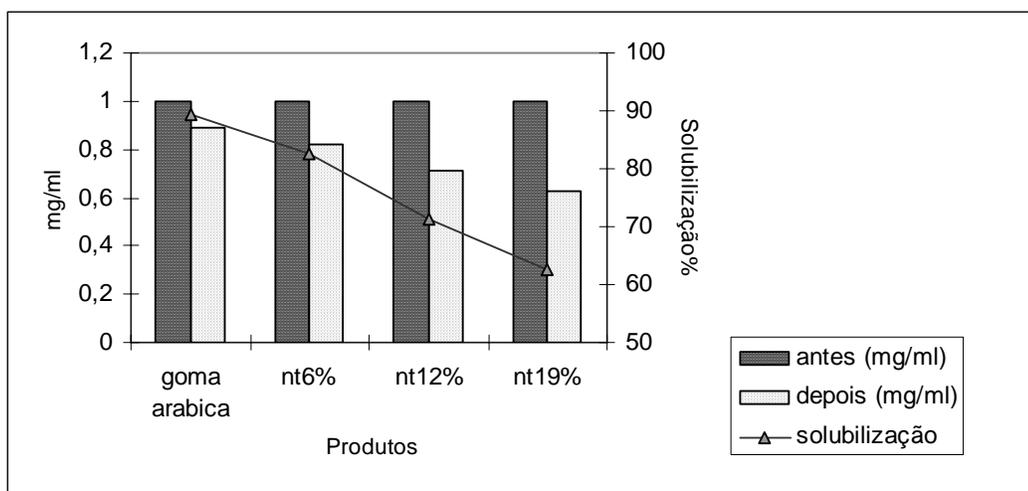


Figura 4-31: Gráfico comparativo de solubilidade de goma arábica com quantidade diferenciada de NTC.

Com estes resultados verifica-se que os polissacarídeos são de uma forma geral bons dispersores de NTC, onde a mistura destes materiais pode causar interferência na solubilidade. Quando são feitos filmes desta mistura, eles têm grande resistência à abrasão, não mesurada em nossos estudos. A goma de cajueiro carboximetilada, (processo realizado pela equipe do professor Valder da UFPE) tem solubilidade em torno de 6% menor do que na goma arábica e a goma de cajueiro primitiva é em torno de 13% menos solúvel do que a goma arábica. Entre as gomas de cajueiro esta diferença está em torno de 7%, com isto, verifica-se que o processo de carboximetilada é de fundamental importância na utilização da goma de cajueiro como dispersante de NTC.

Assim como foi realizada a medida de solubilidade das funcionalizações com gomas, também foram realizadas estas medidas para cada uma das funcionalizações realizadas. Como está descrito na próxima seção.

4.9. Solubilidade de nanotubos de carbono funcionalizados em solução aquosa.

A solubilidade dos NTC com várias funcionalizações foi calculada utilizando um método de secagem a baixa temperatura, utilizado para estipular concentração de sólidos em solventes líquidos. Para realizar este procedimento é necessária uma balança de grande precisão, cadinhos de cerâmica por reterem menos umidade e as soluções supersaturadas de NTC.

Cada solução foi feita com 10 mg de NTC por 1 ml de água. A solução foi agitada em ultra-som por 20 min e deixada em repouso por um período de 8-10h para que não houvesse influência da supersaturação nos resultados. O sobrenadante destas soluções, denominada solução saturada, foram retirados e medidos volumetricamente, e colocados nos cadinhos cerâmicos tratados termicamente. O tratamento térmico dado aos cadinhos é necessário para eliminar vestígios de umidade do mesmo. Para a secagem alguns procedimentos devem ser seguidos:

1. Devem ser utilizados recipientes de vidro ou cerâmica; estes recipientes devem ser colocados em estufa à 120°C, vazios, por 12h. e depois deste período colocados em dessecadores até atingir temperatura ambiente. Eles deverão ser pesados e suas massas anotadas.

2. Um volume conhecido de solução deve ser colocado nestes recipientes que deverão ser novamente levados para a estufa à 60°C.

3. Quando secos a temperatura da estufa, estes devem ser elevada novamente a 100°C por 4h para garantir umidade próxima de zero.

4. Os recipientes devem ser novamente pesados e suas massas anotadas.

5. As massas do cadinho são comparadas antes e depois da secagem e a diferença de massa corresponde à quantidade de soluto no solvente. No caso nosso soluto são os NTC funcionalizados.

Para a utilização dos nanotubos funcionalizados, geralmente a concentração da solução é de suma importância. Esta pode ser definida secando a solução cuja preparação foi descrita anteriormente. Este método é útil para saber a concentração de solutos em solventes de quais quer solução, além de indicar a solubilidade máxima em solventes. A solubilidade é obtida seguindo os passos acima de preparação da solução sem utilização de centrifuga. O armazenamento dos NTC

funcionalizados deve ser em ambiente seco e para tal devem ser colocados em estufa com temperatura em torno de 40°C para secagem lenta. De outra forma, eles aglomeram e se tornam difíceis de serem solubilizados.

Segue um gráfico com as principais funcionalizações.

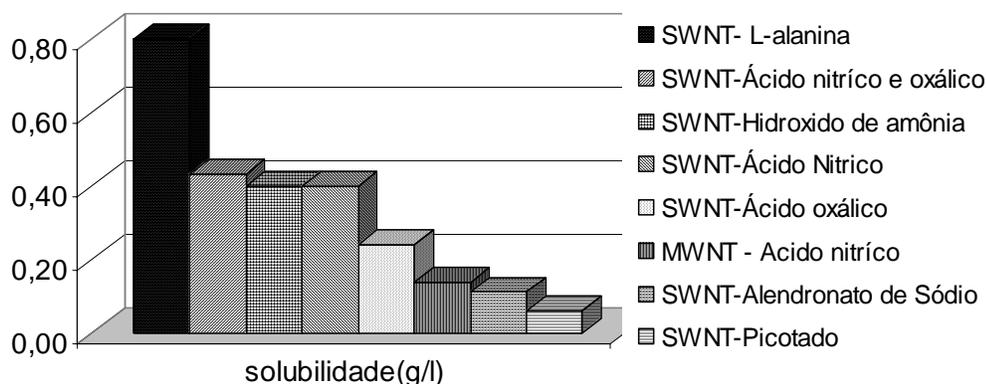


Figura 4-32: Gráfico de comparação de solubilidade entre diversos NTC.

Entre os NTC funcionalizados solúveis em água podemos verificar que a maior solubilidade corresponde ao nanotubos funcionalizado com L-alanina. Os nanotubos funcionalizados com ácido oxálico com diferentes métodos se diferenciam pelo poder de solubilização de forma considerável uma vez que os nanotubos utilizando ácido nítrico durante sua solubilização são 80% mais solúveis que os que utilizam apenas ácido oxálico. A funcionalização com hidróxido de amônia também se diferencia por ter uma grande solubilidade comparada às demais funcionalizações de método químicos mais sofisticados como o de carboxilação.

As principais diferenças que podem ocorrer entre estas funcionalizações são: a polaridade do grupo funcional, o tamanho da molécula que interage com os NTC, o tipo de ligação (covalente, ou não-covalente), o número de grupos funcionais nos NTC.

Porém, o mais importante para cada uma destas funcionalizações não é o quanto elas são solúveis e sim as funções que podem exercer na formação de novos materiais ou aplicações.

Referências bibliográficas

- 1 E.B. Barros et al.. *Carbon*; **43**: 2495–2500(2005)
- 2 Kim U. J., et al.. *Journal Of The American Chemical Societ*; **127** (44): 15437-15445 (2005)
- 3 Coates, John Interpretation of Infrared Spectra, A practical Approach, Encyclopedia of Analytical Chemical John Wiley & Sons LTD, Chichester, 2000
- 4 Zhao B., et al.. *Chem. Mater*; **17**: 3235-3241 (2005).
- 5 Michell J. Sienko, Robert A. Plane, Quimica2 edição São Paulo Editora Nacional 1968
- 6 Hu H., et al.. *J. Phys. Chem. B*; **107**: 13838-13842 (2003)
- 7 Bin Xue B., et al.. *J. Mater. Chem*; **11**: 2378 – 2381 (2001)
- 8 Jiang L., et al.. *Carbon*; **41**: 2923–2929 (2003)
- 9 Chen Z., et al.. *J. AM. CHEM. SOC*; **128**: 10568-10571(2006).
- 10 Satishkumary B.C., et al.. *J. Phys. D: Appl. Phys*; **29**: 3173–3176 (1996).
- 11 Jing L., et al.. *Chemical Physics Letters*; **405**: 90–92 (2005)
- 12 Ellison M. D., et al...*J. Phys. Chem. B*; **108**: 7938-7943 (2004).
- 13 Georgakilas V., et al.. *J. AM. CHEM. SOC*;. **124** (5): 9 (2002).
- 14 Lin Y., et al.. *Nano Lett*; **4** (2):191-5 (2004)
- 15 Klumpp C., *Biochimica et Biophysica Acta*; **1758**: 404 – 412 (2006)
- 16 Ma Y., Shah R. AliS. R., et al. *J. Phys. Chem. B*; **110**: 16359-16365 (2006)
- 17 TOWLE & WHISTLER (1973), (<http://www.scielo.br/scielo.php/>)
- 18 Bernd H.,t. The book and Paper group annual volume 1991. Investigation of Some 12th Century Chinese Papers University of California CA 94804.
- 19 Bandyopadhyaya R., et al.. *Nano Lett*; Vol. **2**(1): 25-28 (2002)

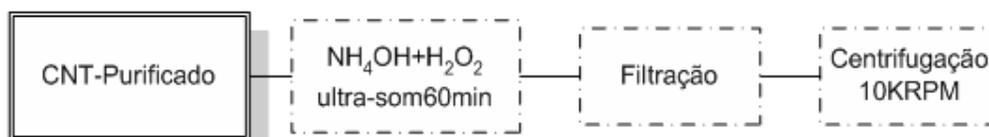
5. Nanotubos de carbono curtos.

O NTC tem sido alvo de muitos estudos e aplicações práticas, mas seu comprimento de vários micros apresenta uma desvantagem em se tratando de aplicações biológicas. Na busca por novos tipos de transportadores moleculares, pesquisas mostraram a habilidade dos NTC de penetrar em células de mamíferos¹, revelando serem ótimos agentes carreadores, principalmente quando em menor comprimento, o que facilita sua penetração nas células.

Os primeiros indícios de picotamento dos nanotubos foram observados em amostras que sofreram processos de purificação em meio fortemente oxidante². Partindo deste pressuposto, mostraremos a investigação da ocorrência de picotamento nos NTC através de processos químicos adotados, mais brandos.

O procedimento de corte dos nanotubos de carbono foi realizado a fim de verificar a variação do comprimento dos nanotubos de carbono quando expostos a determinados ambientes oxidantes.

Os nanotubos de carbono anteriormente purificados foram submetidos ao seguinte procedimento:



NTC sintetizados por arco elétrico e previamente purificados são misturados a uma solução de $\text{H}_2\text{O}_2:\text{NH}_4\text{OH}$ 10:1, ultra-sonificados por 1h e então filtrados para se eliminar os reagentes. O processo de picotamento foi feito misturando-se 50 mg de NTPS purificados a 50 ml de H_2O_2 e 5 ml de NH_4OH em temperatura ambiente. A mistura é então ultra-sonificada por 30 min e 1h a fim de se estabelecer uma relação entre o tempo de sonificação e o comprimento dos tubos. Depois de ultra-sonificada, a mistura foi filtrada através de poros de 200 nm e lavada completamente com água destilada. Os nanotubos picotados foram secos na estufa a 65°C . Através desse processo, os NTC além de picotados, se mostram fracamente funcionalizados com amônia.

Através de análises físicas pode-se concluir que os NTC apresentam pequenos comprimentos quando comparados aos NTC purificados. De acordo com a figura 5-1

estas amostras apresentam comprimento médio de 200 nm, como pode ser visto na e possuem distância vertical de 1,2 nm como mostrado na inserção desta figura.

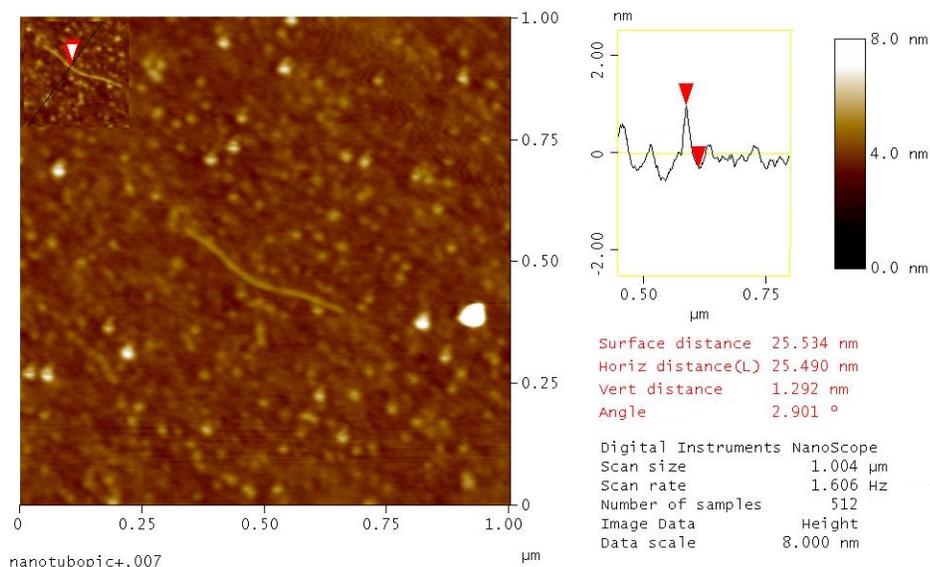
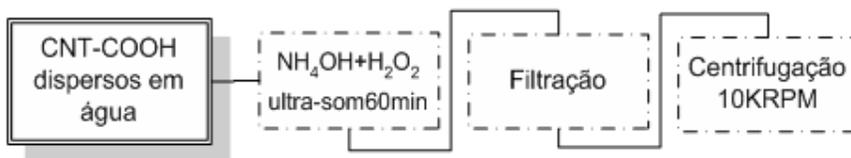


Figura 5-1: Imagem de AFM de NTC-COOH picotado

A funcionalização destes NTC picotados com amônia é realizada com os mesmos reagentes usados para o picotamento, seguindo o seguinte procedimento: 30 mg destes NTC são misturados a 30ml de NH_4OH e 3 ml de H_2O_2 e ultra-sonificados por 15 min. A mistura é então filtrada e lavada completamente com água destilada. Feito isso, os NTC ficam funcionalizados e podem ser facilmente dispersos em água.

Uma variante do processo de picotamento é a utilização de NTC já funcionalizados, por exemplo, os nanotubos funcionalizados com carboxila. Estes nanotubos além de ficarem altamente dispersos em água, provavelmente apresentam sítios de defeitos estruturais. Essas características possibilitam o aumento da reatividade do hidróxido de amônia, fazendo com que o nanotubo tenha um picotamento mais eficiente. O processo de picotamento não altera a característica funcional inicial dos nanotubos de carbono desde que o agente picotador não tenha afinidade química com o grupo funcional. Para realizar o picotamento devem ser seguidos os mesmos procedimentos descritos anteriormente, como está esquematizado abaixo.



Através da imagem de AFM, ilustrada pela figura 5-2 foi possível distinguir que o tamanho médio dos NTC-COOH picotados e sua altura são 50 nm e 1,4 nm respectivamente como pode ser visto na inserção desta imagem e na análise de perfil topográfico.

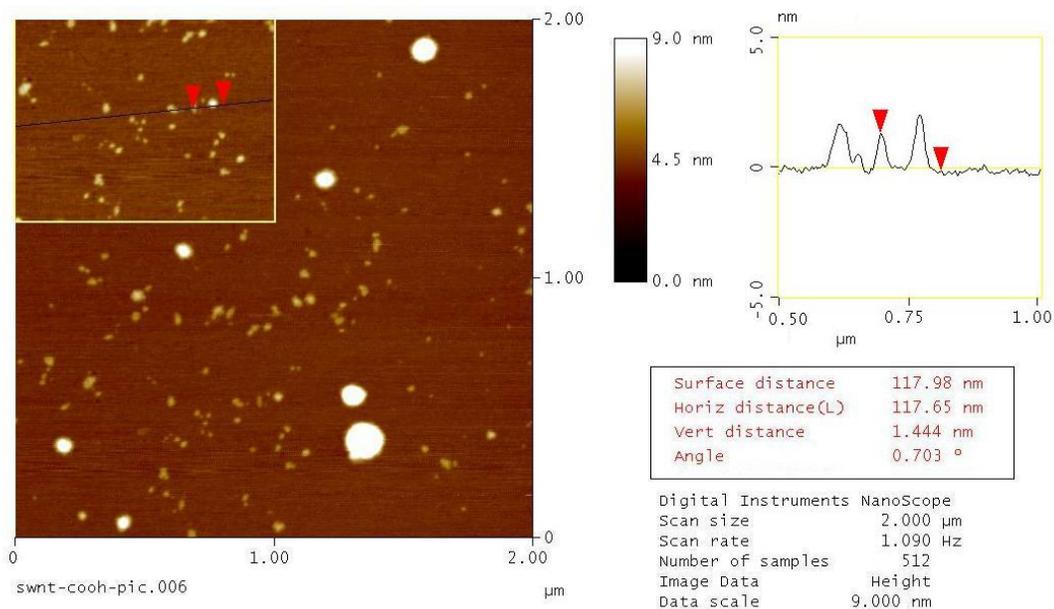


Figura 5-2: Imagem de AFM de NTC-COOH picotado

A diferença entre os tamanhos médios obtidos com o processo de picotamento para NTC funcionalizados e não funcionalizados deve-se, principalmente, ao fato de que os NTC funcionalizados apresentam alta dispersão e defeitos estruturais. Uma vez dispersos em água, os NTC funcionalizados ficam praticamente isolados na solução, apresentando maior contato com o agente oxidante.

Através da espectroscopia Raman dos NTC carboxilados e não funcionalizados, ilustrado pela figura 5-3, observa-se que após o picotamento dos NTC há uma alteração na intensidade da banda D de desordem, localizada a 1350 cm^{-1} , devido à indução de defeitos estruturais ou abertura da extremidade dos NTC. No entanto, permanecem inalteradas as vibrações características do RBM dos NTC, localizado a frequências abaixo de 300 cm^{-1} e ao Modo tangencial de vibração, correspondente as ligações C-C. Neste último, não é possível observar alargamento,

que indica grande integridade estrutural dos tubos, apesar da adição de defeitos indicados pela intensificação da banda D. Este resultado comprova que os NTC curtos apresentam boa qualidade estrutural. E no espectro dos NTC-COOH picotados há uma grande alteração na intensidade da banda D, e não é possível observar o RBM nestes NTC.

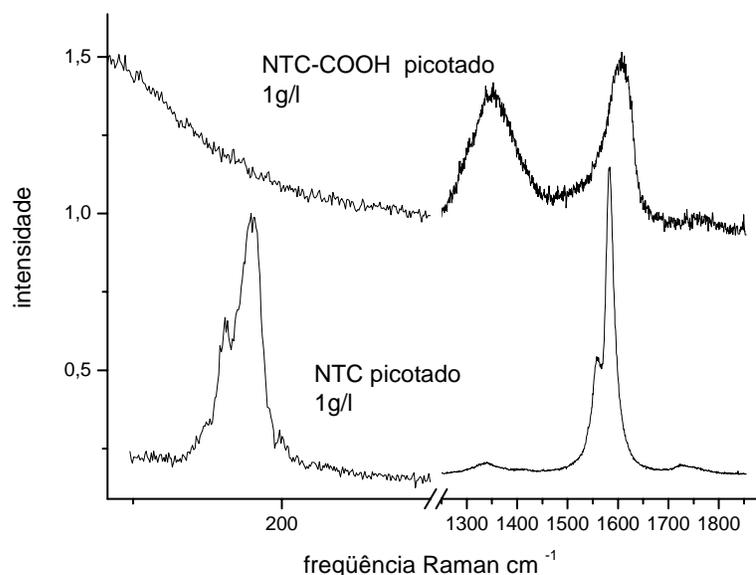


Figura 5-3: Espectroscopia Raman NTC picotados Espectros Raman: NTC Carboxilado picotado. e NTC picotado não-funcionalizado. As medidas foram feitas no pó de NTC

Comparando os espectros dos dois NTC picotados, verificamos que ocorre um grande aumento da banda D dos NTC carboxilados quando comparados aos NTC não funcionalizados. Isso se deve ao fato de que os NTC-COOH picotados são obtidos com menor comprimento que os demais.

Para melhor caracterização destes materiais foram realizadas análises de espectroscopia na região do infravermelho. Onde foi possível identificar as funcionalizações nos NTC após processo de picotamento. Nos NTC picotados, pode-se observar dos modos vibracionais dos grupos funcionais, como, por exemplo, os estiramentos -CO ($\sim 1100\text{cm}^{-1}$), -COOH ($\sim 1730\text{cm}^{-1}$), estiramento do C-H (2900cm^{-1}) e -OH ($\sim 3300\text{-}3500\text{cm}^{-1}$), deformação assimétrica ν_1 e ν_3 da molécula NH_3 (~ 3137 , $\sim 3510\text{-}3380\text{cm}^{-1}$ e modo deformação ν_2 ($\sim 1650\text{-}1500\text{cm}^{-1}$) e o pico em 1384cm^{-1} refere-se ao modo umbela ν_4 . Nos NTC carboxilados picotados pode-se

observar os modos vibracionais dos grupos funcionais, como por exemplo estiramentos -CO ($\sim 1100\text{ cm}^{-1}$), -COOH ($\sim 1730\text{ cm}^{-1}$). Nos NTC picotados funcionalizados em relação aos NTC submetidos apenas ao processo de purificação pode-se perceber o deslocamento do pico referente ao -OH ($\sim 3300\text{-}3500\text{ cm}^{-1}$) e a variação de intensidade dos picos -OH ($\sim 1740\text{ cm}^{-1}$) e do modo *umbrella* NH_3 ($\sim 1400\text{-}1300\text{ cm}^{-1}$).

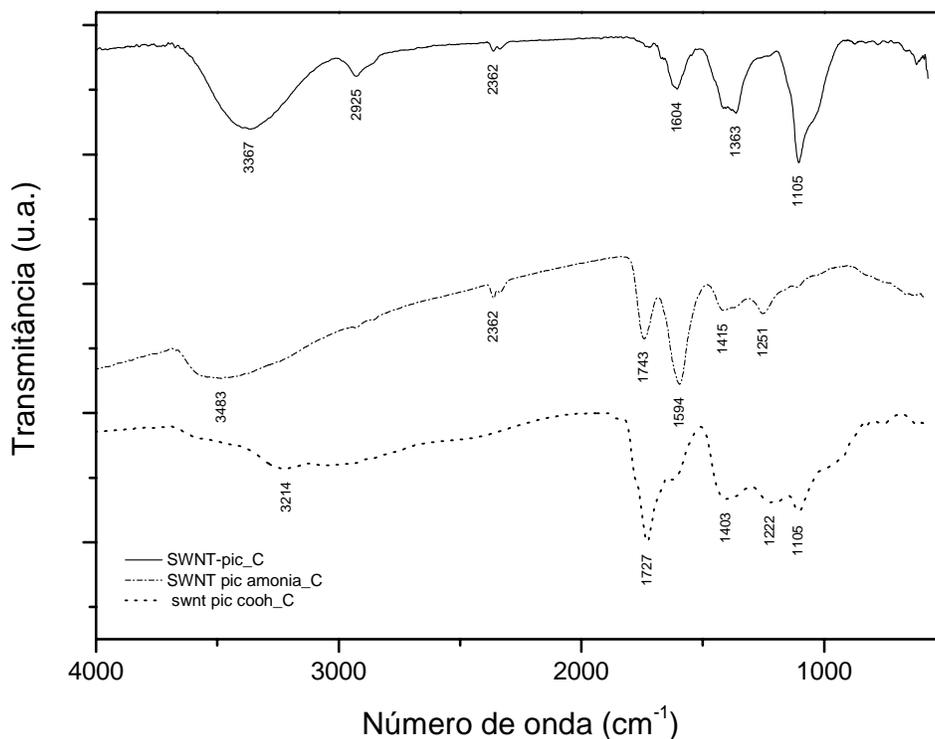


Figura 5-4: Espectroscopia IR NTC picotados

Através destes espectros verificamos que os NTC se funcionalizam durante o picotamento, porém como são pouco solúveis devem possuir poucas moléculas adsorvidas, quando estes NTC passam pelo processo de funcionalização com amônia, outras moléculas se adsorvem proporcionando aos NTC maior poder de solubilização. Os NTC-COOH que foram picotados apresentaram-se com comprimento na ordem de 50nm e estão funcionalizados principalmente com carboxila e são altamente solúveis em água. Estes NTC são ideais para aplicações

biológicas, por serem curtos e facilmente reagirem com medicamentos sendo possível efetuar transportes de substâncias para dentro da célula, ou promover a transfecção celular. Um exemplo de transfecção será relatado nas próximas seções.

A mudança na morfologia dos feixes de nanotubos após o procedimento de picotamento foi observada por Microscopia Eletrônica de Varredura. Os NTC maiores se organizam em feixes (figura 5-5a), enquanto os NTC picotados não funcionalizados se aglomeram na solução aquosa. Os NTC com menor comprimento, quando não funcionalizados, devem interagir mais fortemente uns com os outros por interação de Van der Waals, uma vez que, quando picotados, apresentam maior quantidade de extremidades hidrofóbicas para o mesmo volume de nanotubos. Em consequência disso, há uma intensificação das interações entre os NTC. Os NTC picotados também são capazes de se entrelaçarem como foi possível observar durante a centrifugação dos nanotubos não funcionalizados. Na figura 5-5 b e c estes fios são visualizados, sendo bastante resistentes à tração, porém não foi possível medir o valor desta, devido às dimensões do mesmo. Geralmente, estes fios têm de 0.8 a 1.2 cm de comprimento e são formados durante a centrifugação com rotações de 7 kRPM com duração de 30 a 45 min em tubos FALCON de 15 cm. Em NTC picotados carboxilados isso não foi visto, uma vez que os nanotubos apresentam aderidos à sua superfície grupos funcionais que lhes conferem alta solubilidade em água.

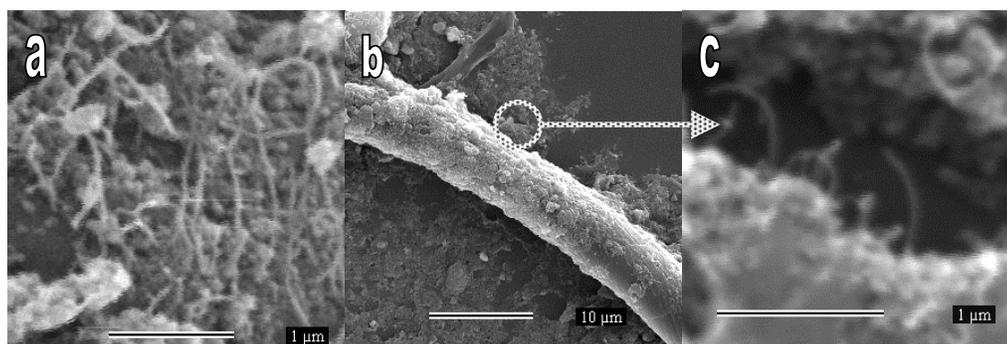


Figura 5-5: MEV a) nanotubos picotados, b) fio de NTC obtido por centrifugação, c) ampliação de b.

A funcionalização dos NTC picotados pode ser realizada em qualquer ordem, isto é, ele pode ser picotado e posteriormente funcionalizado ou vice versa. A não ser em casos que o grupo funcional reaja com quaisquer reagentes utilizados para o picotamento. Um problema às vezes encontrado nestas amostras são resíduos que

podem permanecer após o picotamento, sempre é mais fácil retirar impurezas dos NTC longos, pois eles ficam sobre o filtro do sistema de lavagem.

Em síntese, é possível picotar NTC funcionalizados ou não com ataques químicos brandos. Os NTC purificados após serem picotados apresentam-se com grupos funcionais adsorvidos sobre sua superfície, os quais podem ser retirados por tratamento térmico à temperatura de 180°C por se tratarem de NH₃ como já foi discutido no capítulo sobre funcionalizações. Esses NTC após picotados também podem sofrer processos de funcionalização, porém devem ser evitados ataques muito oxidativos para evitar eliminação completa desses NTC. Em alguns casos, a funcionalização pode ajudar no processo de picotamento, como é o caso dos NTC-COOH, os quais apresentam comprimentos menores que os NTC purificados picotados e podem ser solubilizados mais facilmente, possibilitando sua utilização em aplicações biológicas.

Referências bibliográficas

1 Cherukuri P., et al.. *PNAS*; vol. **103** (50): 18882 -86 (2006).

2 Liu J., *SCIENCE*; **280**: 22 (1998)

6. Compósito de NTC e colágeno

Os compósitos, como já foi dito, são uma agregação de dois materiais diferentes para a formação de um terceiro material distinto dos primeiros, podendo ser mais resistente a impactos, tração, abrasões, ataque químico, entre outros. Os compósitos sintetizados com matrizes reforçadas com NTC, como epóxi, termoplásticos, gels, poli(metil metacrilato) (PMMA), poly acrilontrila (PAN) e alguns outros polímeros, têm suas características estruturais alteradas. Quando iniciamos este estudo, nenhum artigo ou patente sobre compósitos de colágeno e NTC havia sido divulgado. O primeiro e único artigo encontrado que divulgava esta mistura foi realizado em Nova York por Rebecca A. MacDonald em 2005¹. Este trabalho mostra a síntese de um compósito de NTC e colágeno como matriz de gel tridimensional para cultura de células. Em resumo, é mostrado que os NTPS-COOH são facilmente incorporados a matrizes de colágeno tipo I e que a presença dos NTC na matriz não afeta, significativamente, a compactação do gel, a viabilidade celular, ou a proliferação de células. Os autores discutem em a possibilidade da criação dos compósitos de colágeno e NTC para o uso em suportes para engenharia de tecido, bem como outras aplicações biomédicas e, ocasionalmente, em aplicações não biológicas. Mostram ainda uma possível interação entre o colágeno e os nanotubos baseados nas propriedades intrínsecas do colágeno, mostrando que as células produtoras de matrizes de colágeno podem ser promotoras diretas de gelificação e compactação, oferecendo possibilidade de produzir material com alinhamento e anisotropia, inclusive dos NTC. Porém neste trabalho não foi realizado nenhum experimento ligado a aplicações biológicas de osteointegração ou outras ligadas à engenharia de tecido.

Nosso trabalho de biomineralização de matrizes para reconstituição óssea foi baseado no trabalho de Bin Zhao e colaboradores⁴, já citado no capítulo de funcionalização. Neste trabalho, os autores mostram a possibilidade de crescer hidroxiapatita sobre nano estruturas de carbono e comentam que para uma aplicação mais real de reconstituição óssea, se faz necessário acrescentar uma matriz. Baseados neste fato, criamos o compósito com os nanotubos funcionalizados onde seria possível crescer estruturas similares a ossos, dando um importante passo no

desenvolvimento de biomateriais. Esse biocompósito além de induzir a osteogênese, também teria suas propriedades melhoradas pelos CNT.

Os nossos primeiros experimentos com compósitos de colágeno e NTC foram feitos através da solubilização do Colágeno tipo I originário de cartilagem ovina cedidos pela Universidade do Ceará, em colaboração com o professor Júlio Góes.

A solubilização do colágeno tipo I é feita por meio de ácido acético para quebra das ligações entre as hélices do colágeno e posterior diluição em água. Quando o colágeno é solubilizado, seu pH deve ser elevado até que esteja entre 6.5 e 7. Em solução básica, o colágeno possui pré-disposição a encadear, induzindo assim uma transformação sol-gel, tornando-se um gel.

O NTC suspenso, funcionalizado com COOH ou grupo fosfato (-P) é acrescentado à solução de colágeno e levado em ultra-som por 10 min. Posteriormente, parte da solução deve ser evaporada e o restante passa por um processo de liofilização. O processo de liofilização deste material compósito consiste de um congelamento em nitrogênio líquido, seguido de uma lenta etapa de retirada de solvente por sublimação assistida por vácuo.

Uma seqüência de compósitos de colágeno: NTC foi sintetizada com a utilização de diferentes concentrações de NTC em colágeno. A figura 6-1 mostra o um compósito com 4% de NTC.

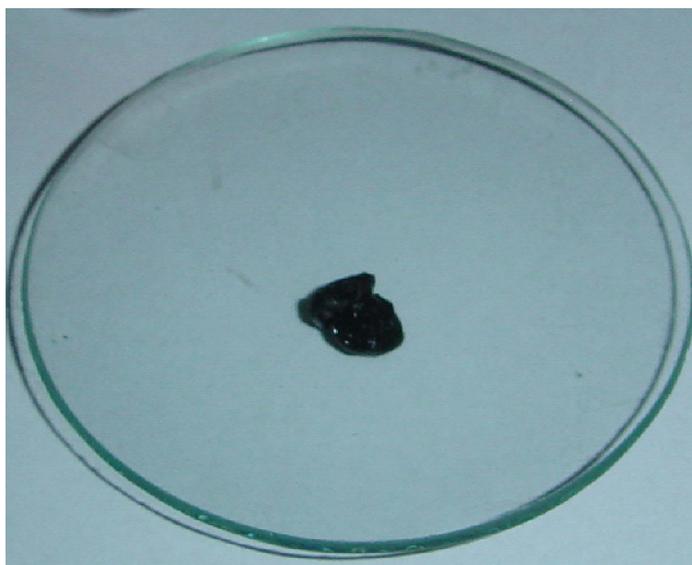


Figura 6-1: Compósito Colágeno: NTC fabricado no laboratório

Depois de sua obtenção, foram feitas medidas de resistência mecânica destes compósitos para verificar a possibilidade de construção de estruturas corporais artificiais utilizando este material. Também realizamos experimentos em colaboração com os professores do ICB e Odontologia e medidas de resistência térmica e molhabilidade, através das quais podemos conhecer características estruturais deste compósito de NTC e colágeno, que serão mostrados na próxima seção.

Os NTC, antes de serem incorporados ao colágeno, foram funcionalizados com grupos fosfonatos e carboxilas para estudo de biomineralização de HAp. Este procedimento visa aplicações de NTC em formações ósseas; uma vez que, os NTC funcionalizados que possuem carga negativa atraem cátions de cálcio e formam agregados de HAp².

6.1. Extração do colágeno e produção do compósito

O colágeno usado para a fabricação do biocompósito aqui estudado é do tipo I. O colágeno tipo I é fibrilar, insolúvel em solução fisiológica e é formado por três cadeias polipeptídicas que se organizam em uma conformação tripla hélice. De uma forma geral, a solução de colágeno tipo I é adquirida a partir de tendões de animais. Os tendões extraídos são imersos em ácido acético 4% com agitação constante durante 3 dias e então a solução é centrifugada. A parte precipitada é descartada e a solução restante chamada de suspensão é misturada a uma solução salina de NaCl 7% massa/volume sob agitação e novamente centrifugada. Desta vez, a parte precipitada é reservada e a solução e suspensão é descartada. O material precipitado deve ser disperso novamente em solução aquosa de ácido acético 0,5 M com concentração variando na faixa de 2-5 mg/ml. A extração deve finalizar, preferencialmente, com solução aquosa de colágeno a 3 M. Esta solução aquosa, provinda da extração, é rica em colágeno tipo I e será usada para a incorporação dos NTC. Para purificar esta solução de colágeno, esta última é colocada em membrana de diálise com porosidade de dezenas de nm, submersa em solução fisiológica com meio 199, que contém principalmente antibactericida, antibióticos e tampão fosfato. A diálise é feita por 48h sob agitação constante, sendo responsável pela excreção de aminoácidos e cadeias polipeptídicas muito pequenas que não farão parte do entrelaçamento final. Esta etapa foi feita somente em uma de nossas extrações e fisicamente não ofereceu

diferença significativa no compósito. A solução aquosa de NTC dispersos é preparada através da adição de grupos químicos às paredes e extremidades dos NTC, como já descrito no capítulo sobre funcionalizações.

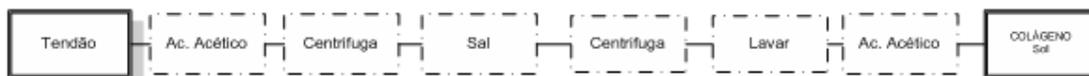
O biocompósito é basicamente uma mistura de colágeno com NTPS ou NTPM funcionalizados ou não, homogeneamente dispersos nesta matriz de colágeno, em forma seca ou na forma hidrogelatinosa. O processo de fabricação do biocompósito de colágeno e NTC cria um suporte tridimensional, onde podem ser controladas, através da proporção entre os dois reagentes básicos, as características e propriedades físicas, como por exemplo a molhabilidade.

O biocompósito colágeno-NTC é preparado a partir de solução de colágeno e de uma solução de NTC dispersos. As soluções aquosas de colágeno nas concentrações de 2-5 mg/ml permitem uma boa incorporação de NTC, com alto grau de homogeneidade na dispersão em matriz de colágeno. Deve-se sempre enfatizar que a dispersão dos NTC em solventes é fundamental para promover a distribuição homogênea dos NTC na solução aquosa de colágeno, de modo a produzir um compósito com grande homogeneidade de mistura. Os NTC ainda permitem uma gama imensa de funcionalizações químicas que podem possibilitar a criação de variações deste biocompósito, com funções bioquímicas específicas, como hipoteticamente, a indução de processos de inibição ou aumento das reações inflamatórias na rejeição, ou indução de formação de tecido celular, processos de biomineralização óssea e suporte de crescimento celular.

Na produção deste compósito é necessário que a quantidade de NTC, dispersos em água ou em outro solvente, seja previamente preparada e com concentração conhecida, assim como a solução aquosa de colágeno, de modo a controlar a razão entre os NTC e o colágeno na fabricação do compósito. A mistura das duas soluções deve ser assistida por agitação mecânica ou ultra-sonificação até atingir um alto grau de homogeneidade. O tempo de agitação pode variar dependendo da concentração e viscosidade das soluções usadas na mistura.

O compósito é preparado a partir das duas soluções acima descritas, previamente preparadas. Uma solução denominada solução 1, constituída de uma dispersão de fibras de colágeno em meio aquoso, foi preparada pela mistura de colágeno com água destilada ou deionizada por um período de tempo suficiente para formar uma mistura homogênea. O pH da solução é ajustado para um nível entre 2-4

através da adição de ácido acético de modo a garantir uma boa dispersão aquosa do colágeno a temperatura 4°C evitando sua degradação. Como esquematizado abaixo:

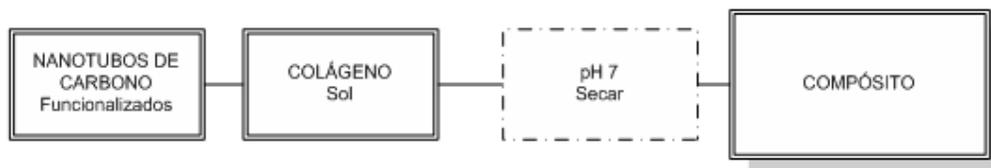


Uma solução denominada solução 2, constituída de uma dispersão aquosa de NTC deve ter o pH ajustado na faixa de 2-4 com adição de ácido acético à temperatura ambiente, com concentração previamente conhecida. Como esquematizado abaixo:



As soluções 1 e 2 são então misturadas lentamente sob agitação mecânica ou assistida por ultra-sonificação formando a base do compósito. O grau de homogeneidade é feito por simples inspeção visual e a mistura é considerada homogênea quando não apresenta aglomerados de carbono.

Esta última mistura, denominada solução 3, é então levada a pH básico com a utilização de hidróxido de sódio 0,4 M e submetida a um processo de retirada do solvente por processo de secagem em estufa com temperaturas que não excedem 60°C e posteriormente submetida a um processo de liofilização.

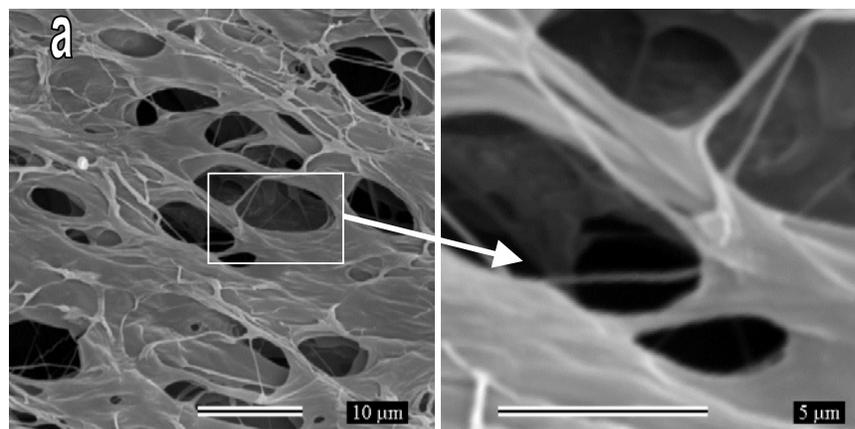


No processo de fabricação do compósito pode-se incluir, antes da etapa de liofilização, etapas adicionais de adição de agentes funcionais ativos e ou agentes biologicamente ativos, tanto no colágeno quanto nos NTC. Quando houver necessidade de inclusão de células, estas devem ser colocadas no compósito; neste caso, o processo de liofilização deve ser feito antes da colocação das células, ao contrário elas morreriam.

O compósito geralmente é feito utilizando uma concentração pré-definida de NTC e uma referência do colágeno sem NTC. Para efeito de comparação, a seguir, vamos mostrar as principais diferenças entre o colágeno e o compósito contendo NTC-COOH com concentração de 4% massa:massa.

Em primeiro lugar, podemos verificar a mudança na característica estrutural do material através do MEV. As micrografias que estão na figura 6-2a ilustram o colágeno produzido com tendões de ovelhas (sem NTC) e a figura 6-2b ilustra este mesmo colágeno com NTC-COOH; a figura 6-2c ilustra o colágeno produzido com caudas de ratos sem NTC e a figura 6-2d ilustra este mesmo colágeno com NTC-COOH.

Nesta figura observa-se uma maior estruturação do colágeno com aumento na orientação das fibras de colágeno (figura 6-2a e c) e diminuição da porosidade do compósito (figura 6-2b e d), as imagens à direita mostram uma pequena ampliação destas estruturas, evidenciando estas características morfológicas gerais. Esta estruturação é similar ao crosslinked³, produzido por ligação cruzada através de pontes de aldeídos, onde as fibras de colágeno são tratadas com glutaldeído, por exemplo, tornando-se uma fibra de maior estabilidade devido às ligações e entrelaçamentos entre fibras do colágeno. Podemos observar que colágenos de matérias primas diferenciadas não se diferem com relação as suas características morfológicas, isto é, o colágeno puro possui alto grau de porosidade; em contra partida, com o aumento do material reforço (NTC), os poros diminuem e a estruturação aumenta.



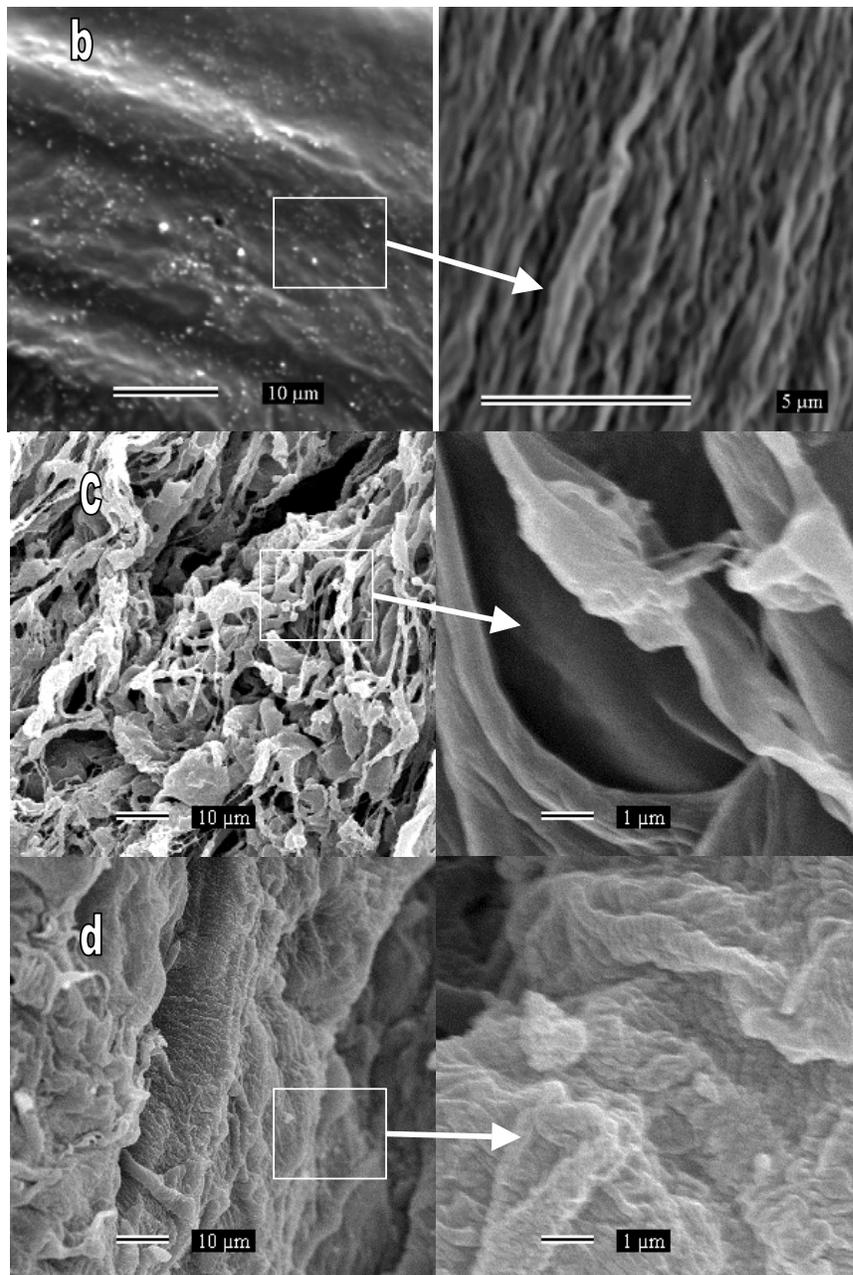


Figura 6-2: Micrografias da estrutura morfológica de colágeno produzidos de a) tendões de ovelha, b) e o compósito originado deste colágeno, c) colágeno produzidos de caudas de rato e d) compósito originado este colágeno, e respectivas ampliações.

A característica principal desse biocompósito é a construção de estruturas com morfologia distinta pela proporção de mistura de seus dois constituintes básicos. Quanto maior a quantidade de NTC acrescentada ao colágeno, maior a estruturação do material e é possível notar grande alteração do tamanho dos poros, sendo que estes diminuem com o aumento da concentração de NTC. Esse biocompósito é

altamente poroso, com esqueleto tridimensional na ordem de grandeza de estruturas celulares, de tal forma que as células, se agregadas ao compósito, podem alcançar o centro do mesmo, bem como, passarem de uma extremidade a outra, podendo promover uma reconstituição celular e íntima integração à matriz hospedeira. Além disso, como os NTC estão na faixa de dimensões típicas das moléculas de colágeno, em escala nanométrica, é possível um alto grau de entrelaçamento entre estas duas nano estruturas. O controle do entrelaçamento entre colágeno e nanotubos de carbono através de ligações químicas ou pela variação da quantidade de cada material na mistura pode permitir ainda um controle das propriedades físico-químicas deste biocompósito, além de permitir o controle adicional de sua porosidade, que é importante para o crescimento celular como também, da sua velocidade de degradação quando implantado.

Verificando esta diferenciação estrutural, necessitávamos confirmar a integridade das fibras de colágeno. Isto foi possível através da análise de espectros no infravermelho destas moléculas. A integridade da molécula de colágeno é comprovada pela existência da tripla hélice, que é dada pela razão igual a 1 entre as intensidades das bandas $1235/1450\text{ cm}^{-1}$, referentes a aminas ii e iii. Tanto no colágeno quanto no compósito a razão entre estas duas bandas estão em torno de 0,9, o que indica a existência da tripla hélice nas estruturas formadas. Todas as medidas foram feitas após a liofilização, confirmando que este processo não degrada as estruturas moleculares nem do colágeno, nem do compósito. Verificando o restante do espectro vemos que a análise dos compósitos por espectroscopia na região do infravermelho (FTIR) representada pela figura 6-3 mostra os modos vibracionais das proteínas presentes na estrutura do colágeno⁴. As frequências de vibração das bandas referentes à amida A do estiramento NH- ($\sim 3328.64, 3327.65$ e 3334.59 cm^{-1}), amida I ($1637.81, 1657$ e 1640 cm^{-1}), C=O (1667 cm^{-1}), amida II ($1548.84, 1554.80$ e 1549.16 cm^{-1}), estiramento C-N e N-H $\sim 1550\text{ cm}^{-1}$, amida III ($1241.17, 1238.33$ e 1239.48 cm^{-1}), amida ii e iii ($\sim 1450, 1402, 1350, 1250\text{ cm}^{-1}$).

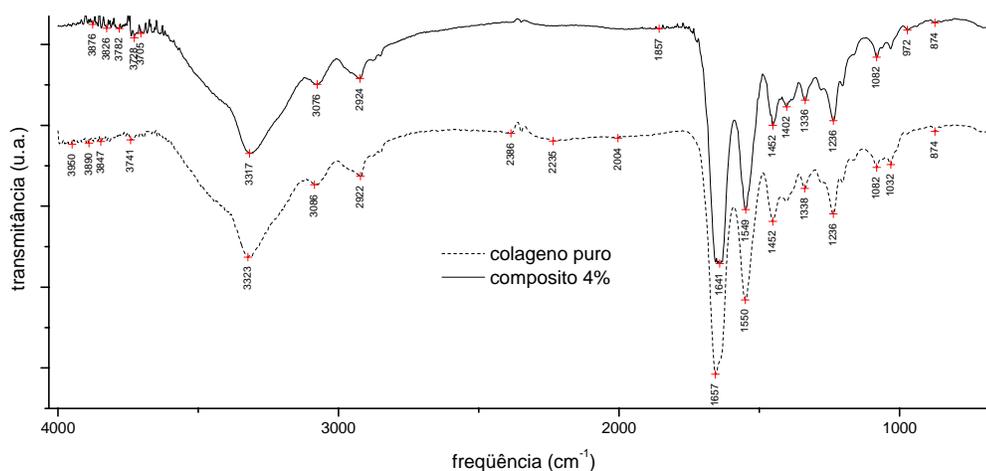


Figura 6-3: Espectro IR do composto de colágeno com NTC

Verificamos também a integridade dos NTC na matriz de colágeno através da espectroscopia Raman do composto no espectro mostrado na figura 6-4, que apresenta algumas características vibracionais referentes ao modo vibracional do carbono. Entretanto, não conseguimos observar o modo de respiração radial devido à interação dos NTC com o colágeno, como mostrado na inserção no canto superior esquerdo da figura 6-4. O fator de qualidade está em torno de 0,56, a banda G sofre alargamento e há aumento na banda D, mostrando a interferência da interação do colágeno sobre os nanotubos de carbono.

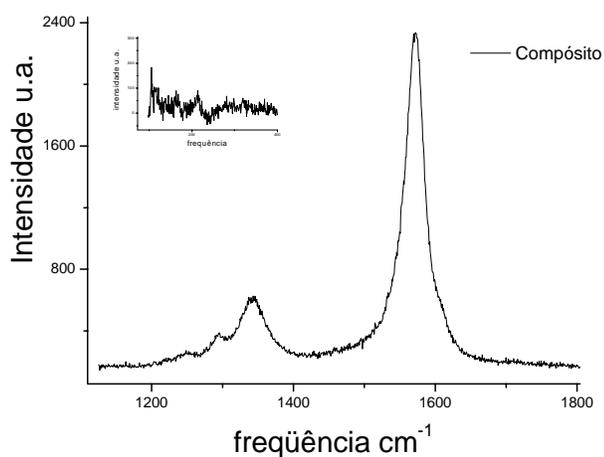


Figura 6-4: Espectro Raman do composto de colágeno com NTC

Estas duas técnicas mostram que a estrutura do colágeno para elaboração do compósito permanece íntegra e que não há nos espectros de infravermelho o aumento no número ou intensidade das vibrações devido à ligação do NTC com o colágeno, o que pode indicar que eles não interagem através de ligações químicas fortes, como as covalentes.

Este compósito, como pode ser visto, é um biomaterial nanoestruturado. Porém, a capacidade de substituir estruturas biológicas em fraturas ósseas, implantes biodegradáveis, reparo de cartilagens e tendões, ou como agente de transporte de fármacos depende de outras características, como por exemplo, sua resistência mecânica e térmica, seu poder de adsorver líquidos e o tempo de degradação em solução fisiológica. Estes fatores foram analisados e serão mostrados a seguir para três tipos de colágeno: Colágeno extraído de caudas de rato, tendão de carneiro e tendão bovino comercial da Aldrich ® (liofilizado).

6.2. Análise térmica

Sabendo que houve estruturação das matrizes pelo material reforço, e que esta estruturação e a origem do colágeno podem interferir na temperatura de degradação térmica⁴ dos mesmos, foram feitas análises de Termogravimetria (TG) dos materiais liofilizados.

Normalmente, as primeiras transições térmicas ou degradação dos colágenos ocorrem em temperaturas entre 40 e 100°C, com máxima perda de massa em 64°C para tendões bovinos nativos⁵ e pele de boi⁴. Nessa temperatura ocorre a eliminação de água das proteínas (desnaturação). Em inferência a estes resultados, verificamos a variação da resistência térmica através de medidas de termogravimetria para os nossos colágenos. A figura 6-5a mostra duas curvas de TG relativas ao colágeno de cauda de rato sem NTC e deste colágeno com 4% de NTC; a figura 6-5b mostra duas curvas de TG relativas ao colágeno de tendão de carneiro com 0,2% de NTC e deste colágeno com 4% de NTC.

Podemos observar que a incorporação de 4% de NTC na matriz de colágeno aumenta a temperatura de degradação térmica dos colágenos em torno de 25,7% para o colágeno sintetizado a partir de caudas e em torno de 71,8% no colágeno sintetizado a partir de tendões.

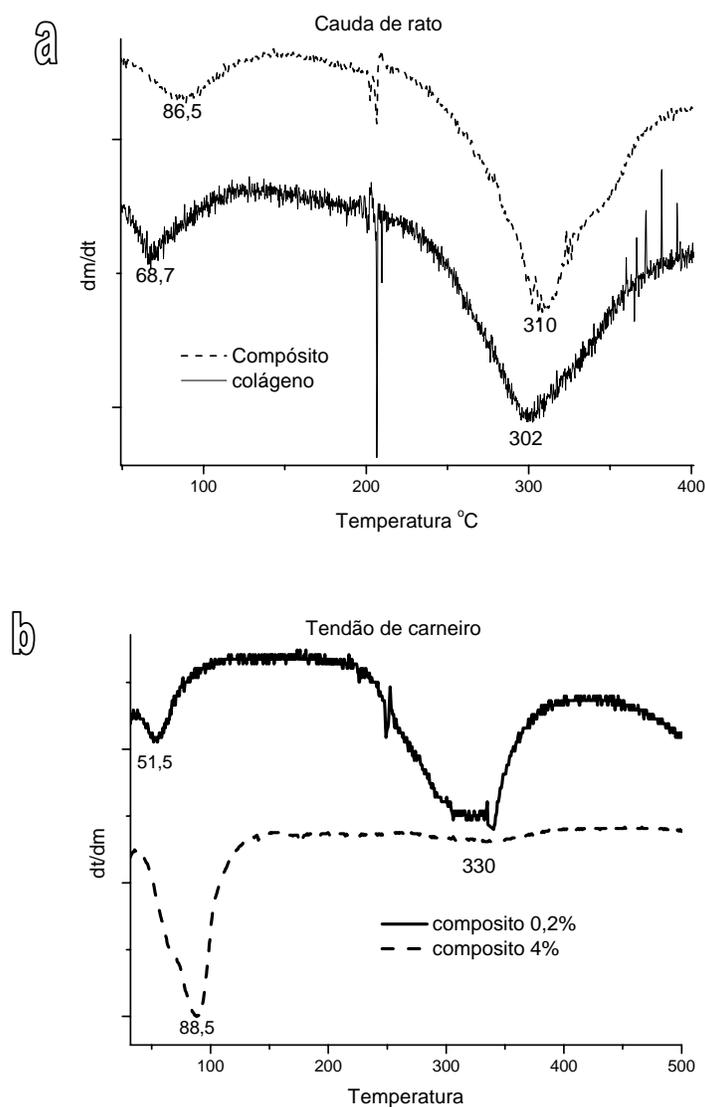


Figura 6-5: Análise térmica de estruturas de compósito e colágeno a) de cauda de rato e b) de tendão de carneiro.

Estes resultados obtidos não foram repetidos para colágeno sintetizado a partir de colágeno de tendões de boi comercial, os quais já vinham liofilizados e tinham que sofrer processo de solubilização. Podemos verificar que a variação na temperatura de degradação pode estar ligada à integridade da tripla hélice na estrutura do colágeno e/ou à estruturação do colágeno que é mais difícil de desnaturar, mas fica claro que a presença dos NTC na matriz causa uma maior estruturação e aumento da temperatura de degradação. O compósito por ter a

temperatura de degradação mais alta do que o colágeno indica maior estruturação da matriz de colágeno, promovendo a ele mudanças na capacidade de estabilização em ambiente fisiológico.

6.3. Ensaio de Tração

As propriedades mecânicas constituem uma das características mais importantes dos compósitos, visto que suas aplicações se baseiam principalmente no comportamento destas propriedades.

No ensaio de tração uniaxial, realizado no departamento de metalurgia da UFMG, com a colaboração do professor Hermam, o corpo é deformado por alongamento, até o momento em que se rompe. Os ensaios de tração permitem conhecer como os materiais reagem aos esforços de tração, quais os limites de tração que suportam e a partir de que momento os mesmos se rompem. A tensão na ruptura e a elongação foram obtidas diretamente da curva, e o módulo elástico foi calculado como a tangente da parte linear da curva tensão *versus* elongação.

O colágeno tem uma excelente compatibilidade biológica e química, mas não resiste mecanicamente a condições típicas recorrentes à aplicação clínica.

O desenvolvimento deste compósito requer claramente o entendimento das propriedades mecânicas da reconstituição deste compósito e os dados acima podem, portanto, capacitar o desenvolvimento e o melhoramento das propriedades deste compósito. Baseado nos testes mecânicos realizados por Shanmugasundaram⁴, os experimentos foram realizados com velocidade constante de deslocamento de 5 mm/min entre as pinças fixas nas extremidades das amostras. A figura 6-6 ilustra as curvas de tensão de ruptura em função da deformação obtida pelo teste de tração do compósito de colágeno com NTC e colágeno puro. Observa-se que ambas as curvas são típicas de materiais poliméricos flexíveis e pouco resistentes.

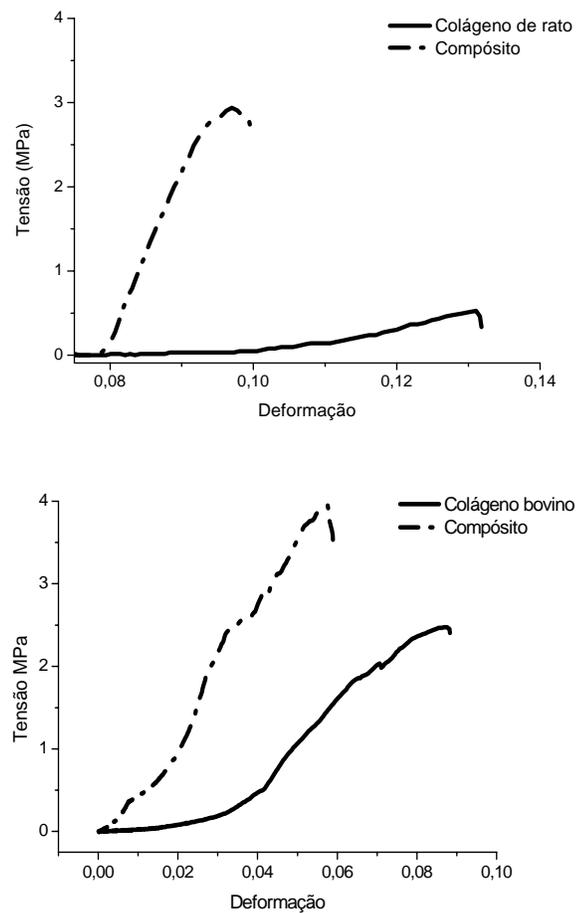


Figura 6-6: Exemplo das curvas de tensão versus elongação de filmes colágeno e compósito.

Os valores das propriedades mecânicas obtidas nos testes de tração estão apresentados na Tabela 6-1. Nesta tabela podem ser observados valores menores de tensão na ruptura e módulo elástico do colágeno do que no compósito; isto é, esse compósito produziu filmes mais resistentes e mais rígidos que o do colágeno puro. Comparados a outros polímeros, como PLLA e PAN, os compósitos são menos resistentes a tração. Nestes polímeros, os NTC agem de forma diferenciada; no PAN, o NTC torna a matriz mais frágil e no PLLA, o NTC deixa o compósito mais resistente, assim como no colágeno. Apesar de serem menos resistentes mecanicamente do que os polímeros, os compósitos de colágeno possuem características que os diferencia, isto é, eles apresentam características semelhantes ao organismo, por ser o colágeno uma molécula constituinte de todo os órgãos do

corpo humano. Assim, o interesse em substituir os compósitos já utilizados em implantes pelo compósito de colágeno: NTC, reside no fato de poder ser implantado com menos risco de rejeição, além de ter a possibilidade de ser absorvido no local implantado e regenerado simultaneamente pelo organismo.

Tabela 6-1 Tensão na ruptura (MPa), e módulo elástico (MPa) para colágenos, compósitos e outras matrizes poliméricas.

Materiais	tensão (MPa)	módulo elasticidade (MPa)
PLLA (Poly(L-lactic acid)) ⁶	5,73	44,38
PLLA+ 1% NTPS	5,90	154,77
PLLA + Poly ϵ -L lisine	6,98	53,37
PLLA+ Poly ϵ -L lisine +1% NTPS	8,93	124,03
PAN (polyacrylonitrile) ⁷	8,90	230,00
PAN+ 1% NTPS	12,40	0,65
PAN+ 3% NTPS	7,00	0,37
PAN+ 5% NTPS	5,50	0,27
Colágeno - cauda de rato	0,53	15,53
Colágeno - tendão bovino	2,42	46,67
Compósito - cauda de rato	3,13	101
Compósito - tendão bovino	3,11	101,43

Os filmes produzidos com colágeno de rato foram menos resistentes do que os bovinos, sendo que o aumento da tensão é substancial, em torno de 83% menor nos colágenos extraído de tendão de rato que nos compósitos e em torno de 22% menor nos colágenos extraído de tendão bovino que nos compósitos. Este fato é comprovado também pela análise termogravimétrica, mostrada na figura 6-5. Por comparação, vemos que o valor da tensão de ruptura na amostragem de compósitos é menor nos compósitos produzidos com tendões bovinos do que com caudas de rato. como pode ser visto na distribuição ilustrada pela figura 6-7. Possivelmente, esta diferença de comportamento pode ser explicada pela estruturação provocada pelo processo de produção do compósito, tanto no compósito produzido por colágeno de tendão bovino quanto no colágeno de tendão rato.

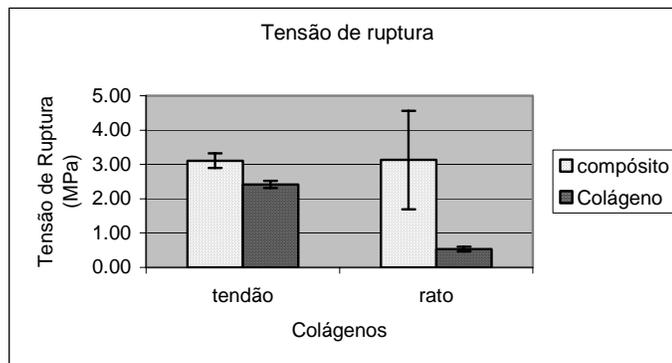


Figura 6-7: Distribuição de tensão de ruptura para duas amostragens de colágeno.

De uma forma geral, podemos dizer que o colágeno tem resistência mecânica menor que o compósito independentemente da fonte de colágeno devido à estruturação provocada pelos NTC. Os compósitos se apresentam sempre com maior homogeneidade estrutural que o colágeno não importando sua origem.

O presente trabalho mostra que o colágeno combinado com NTC constitui uma estrutura similar a um suporte celular, oferecendo um gel polimerizante e fatores de interligamento referente a funções celulares. Houve um aumento de propriedades mecânicas e térmicas resultantes da síntese do material, uma vez que o compósito tem características parecidas com as dos compósitos já utilizados, com a vantagem de ser um biocompósito feito a partir de moléculas protéicas formadoras do próprio organismo.

6.4. Hidratação dos compósitos

A hidrofiliabilidade das matrizes tem grande importância em procedimentos terapêuticos, uma vez que, a taxa de absorção de solução afeta a liberação de medicamentos, que podem ser adicionados ao compósito para melhorar a cicatrização, para manter o nível de hormônios no organismo, para aniquilar uma infecção com a incorporação de antibióticos, entre outras postologias possíveis. A hidratação do material depende de sua porosidade e afeta a área superficial da matriz pela difusão de líquido, com isto, matrizes com diferentes taxas de hidratação podem resultar em diferentes cinéticas de liberação de drogas.

Neste experimento foi determinada a quantidade de tampão absorvido pelas amostras de colágeno e de compósitos. As amostras foram preparadas de duas formas diferentes, uma amostragem é composta de biocompósitos liofilizados os quais são suportes tridimensionais; e a outra amostragem é composta destes mesmos biocompósitos não liofilizado, seco em estufa com temperatura constante de 45°C os quais são filmes bidimensionais. As amostras liofilizadas se dividem em outros dois grupos, um feito com NTC-COOH e outro feito com NTC fosfonado. Cada amostra preparada tinha em torno de 5 mm de diâmetro.

As amostras com massas de 5 a 25 mg foram colocadas em tampão fosfato pH 7,2 e permaneceram imersas por tempo determinado entre 15 e 24h e novamente pesadas. O tampão foi preparado adicionando 5,2 g de fosfato de sódio monobásico NaH_2PO_4 e 23 g de fosfato de sódio dibásico Na_2HPO_4 em 900 ml de água destilada. Em seguida ajustou o pH com NaOH para 7,4 e completou o volume para 1 litro com água destilada, e a solução foi armazenada em geladeira.

Após as amostras terem sido retiradas do tampão, elas foram colocadas sobre papel toalha para retirar o excesso de água superficial e estabelecer um padrão para coleta de dados.

A quantidade de tampão absorvida foi calculada pela seguinte equação:

$$\% \text{água} = \frac{m_m - m_s}{m_m} \times 100.$$

Onde m_m e m_s são a massa dos compósitos e colágenos molhados e secos respectivamente.

A figura 6-8 mostra a capacidade de hidratação por tampão PBS pelas amostras. Pode-se observar que a partir de 15 min de exposição das amostras o percentual de hidratação já ultrapassa um pouco mais de 50% nos filmes e mais de 85% nos compósitos liofilizados. Foi possível perceber que a incorporação de NTC alterou a capacidade de hidratação dos compósitos. Pode-se observar que a partir de 60 minutos de imersão a percentagem de líquido absorvido é praticamente constante. No colágeno liofilizado, a adsorção aquosa aumenta sutilmente com o aumento de tempo de imersão. Os compósitos com nanotubos carboxilados tem um poder de adsorção 6,5% maior do que o colágeno e o compósito com bifosfanato 2,2% menor que o colágeno. Nos filmes, o comportamento é inverso, o filme de compósito é mais

absorvedor de líquido do que o colágeno, porém com o tempo de imersão o poder da absorção é menor para o compósito.

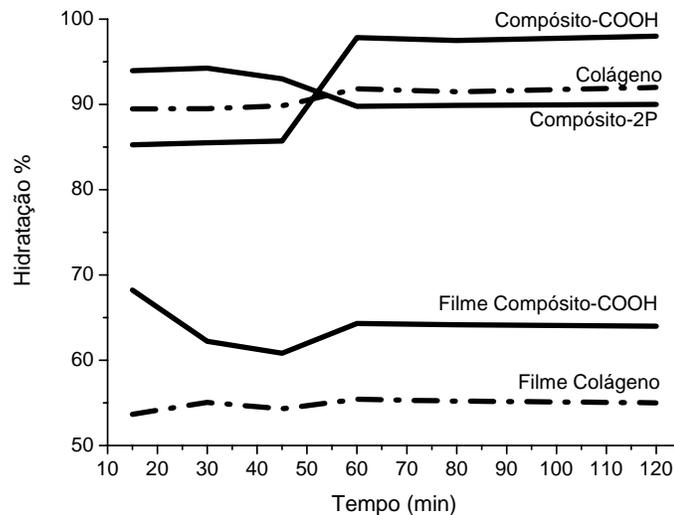


Figura 6-8: Comparativo entre a hidratação de colágeno e compósito em forma de filme e de suporte 3D.

Além da diferenciação na molhabilidade, o compósito tem densidade diferente da matriz de colágeno, como pode ser visto na figura 6-9. A incorporação de nanotubos ao colágeno causa um aumento da densidade. Uma das hipóteses para este fato é o maior emaranhamento das fibras de colágeno. Infelizmente não foi possível mensurar a diferença entre a densidade destes dois materiais.



Figura 6-9: Imagem para comparação de densidade qualitativa

Outra característica analisada (do compósito feito com NTC-COOH) foi o seu tempo de solubilização. Esta característica é importante para mensurar a estabilidade do material em um implante, por exemplo. A solubilidade foi realizada, adicionando

3 ml de tampão fosfato em 0,345 mg colágeno liofilizado. Estes materiais foram incubados à temperatura ambiente que variou entre 21-36°C.

A figura 6-10 ilustra dois pontos do experimento. O primeiro antes da solução fisiológica ser adicionada ao colágeno e aos compósitos, e um segundo na semana em que o material finalizou sua solubilização.

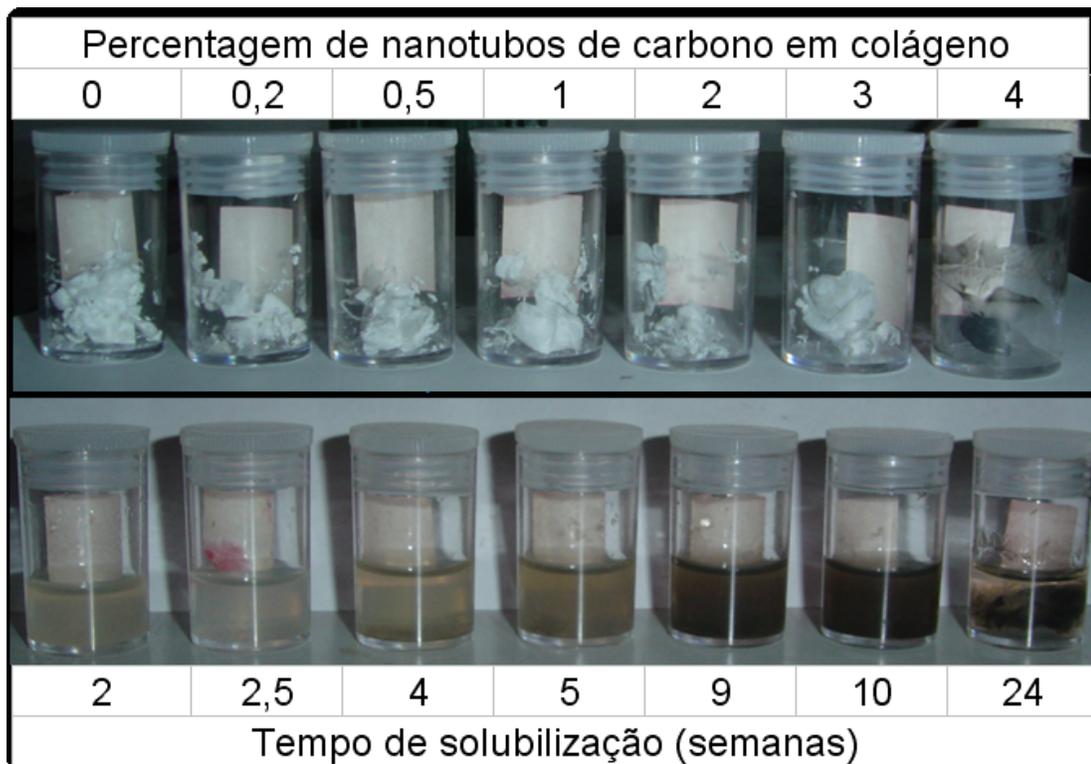


Figura 6-10: Solubilização de compósitos com diferentes concentrações de nanotubos de carbono

Podemos observar que quanto maior a quantidade de NTC na matriz maior o tempo de solubilização. Enquanto o colágeno sem NTC solubilizou em uma semana, o compósito com 4% de NTC permanece inerte a mais de 6 meses. Fazendo uma interligação entre estes últimos experimentos relatados a respeito dos compósitos, podemos concluir que os NTC agem como reforço na matriz de colágeno proporcionado a ele, maior temperatura de desnaturação passando de 50°C no colágeno para 85°C no compósito; proporciona maior resistência mecânica tornando o compósito pelo menos duas vezes mais resistente do que o colágeno; e proporciona uma maior densidade ao compósito do que ao colágeno puro;

A variação de massa de NTC colocado no compósito e pode inferir no tempo de solubilização do material em ambiente fisiológico e pode ser um promissor agente de carregamento de drogas devido à sua molhabilidade.

Estas características promovem ao compósito uma vasta gama de aplicações raramente encontradas em um único compósito conhecido.

6.5. Hipóteses de interações

Como os NTC possuem grande resistência e tem forma quase unidimensional e de dimensões semelhantes ao das cadeias tríplexes do colágeno, a exposição de moléculas de colágeno da hélice tripla aberta em solução aquosa aos NTC dispersos pode induzir interações. Algumas formas de ligação entre o colágeno e os NTC podem ser especuladas uma vez que, não há indícios de como ocorrem estas interações. Quando a matriz recebe o material de reforço, ocorre um contacto íntimo entre eles e pode haver adesão. Um número de diferentes tipos de adesão pode ser formado, ou seja, para uma certa combinação de materiais, um mecanismo de adesão pode ocorrer, como adesões mecânica, eletrostática, química e por interdifusão. Os tipos de adesão dependem de alguns fatores como a presença de impurezas ou adição de agentes de acoplamento.

De uma forma resumida, alguns mecanismos de adesão entre os constituintes de um compósito são os seguintes⁸:

1- Adesão mecânica: consiste em uma adesão de intertravamento ou chaveamento mecânico das duas superfícies. Este tipo de adesão é o tipo mais eficaz, quando a força é aplicada paralelamente à interface, aumentando consideravelmente a tensão ao cisalhamento. Em muitos casos, a adesão mecânica não ocorre sem a ajuda de algum outro mecanismo de adesão.

2- Adesão eletrostática: adesão ocorre entre a matriz e o material de reforço quando as superfícies são carregadas negativa e positivamente. Isto promove uma atração eletrostática entre os componentes do compósito que dependerá da diferença de carga de suas superfícies. Esta interação eletrostática é baixa e é eficaz apenas quando as distâncias são pequenas na ordem de distâncias interatômicas.

3- Adesão química: a adesão química é formada por adesão entre grupos químicos sobre as superfícies do compósito. Este tipo de adesão depende do número de adesão por área e do tipo da adesão.

4- Adesão por interdifusão: os átomos ou moléculas de dois componentes do compósito podem interdifundir na interface para promover a adesão conhecida como interdifusão.

5- Adsorção e molhamento: o molhamento eficiente da carga pelo polímero remove o ar incluso e cobre todas as protuberâncias da fibra

Na mistura de um material reforço (fibrosa ou não) com uma matriz polimérica deve ocorrer uma boa interação reforço-polímero, que pode ser medida através do ensaio de resistência à tração. Caso esta propriedade seja superior à do polímero puro, significa que a matriz polimérica transferiu parte das tensões para a fase dispersa desde que este seja mais resistente que a matriz. Esta transferência de tensões acontece através da região de contato entre o polímero e o material reforço, chamada de interface, sendo o resultado da deformação elástica longitudinal entre material reforço e a matriz e do contato por fricção entre os componentes.

De acordo com este entendimento, a interface assume papel decisivo nas propriedades mecânicas do material final, de modo que uma boa adesão resulta em boas propriedades mecânicas. Esta adesão está relacionada com as propriedades químicas do material reforço, bem como com as conformações moleculares e constituição química da matriz e, caso esta adesão não seja perfeita, surgirão inevitavelmente vazios na região interfacial, provocando a fragilização do material.

Normalmente a fratura de um compósito ocorre devido à quebra da interface polímero/ material reforço e não devido à quebra de um dos componentes. A conclusão mais óbvia é que quanto menor o tamanho das fibras maior o número de extremidades para uma mesma concentração e diâmetro, resultando em propriedades mecânicas inferiores. Desta forma, o aumento no comprimento da fibra aumenta a eficiência do reforço. Compósitos fibrosos são altamente anisotrópicos, podendo apresentar propriedades muito diferentes conforme a direção da solicitação da carga. A presença de fibras restringe a deformação da matriz. Por fim, as propriedades de um compósito com material reforço fibroso dependerão fundamentalmente dos seguintes fatores:

- razão de comprimento/espessura
- fração volumétrica presente na matriz- orientação (anisotropia)
- resistência da interface (adesão com a matriz polimérica)

Estudos sobre o desempenho de materiais compósitos reforçados com fibras mostram que a razão de aspecto crítica, ou o comprimento crítico das fibras depende da fração volumétrica destas nos compósitos. Em baixa fração volumétrica ou teor de fibras na matriz, as fibras influenciam pouco a resistência do compósito que é denominada pela matriz. Acima de uma fração crítica a resistência dos compósitos aumenta com o teor de fibras na matriz. Em geral, quanto maior a razão de aspecto menor a fração volumétrica crítica ou teor crítico^{9,10}.

Sabendo como são as possíveis ligações entre matriz e reforço podemos por hipótese dizer que a formação da matriz, colágeno, com NTC funcionalizados, ocorre por adesão eletrostática, entrelaçamento nas fibras ou simples mistura. Estas interações estão ilustradas na figura 6-11

Inicialmente, os dois materiais se apresentam isolados, com o processo de mistura, duas situações se manifestam, a primeira é a interação entre as moléculas de colágeno e os NTC e a segunda a simples mistura desses elementos: Na primeira opção mais três possibilidades surgem: (a) os nanotubos interagem com o colágeno superficialmente por uma atração fraca em parte ou toda a sua superfície; (b) os nanotubos fazem parte da formação de tripla hélice se encaixando entre elas; (c) o colágeno se enrola em torno do NTC.

Como os NTC que possuem dimensões semelhantes ao das cadeias triplas do colágeno, provavelmente a exposição de moléculas de colágeno em estado sol com NTC dispersos pode induzir um enrolamento estérico.

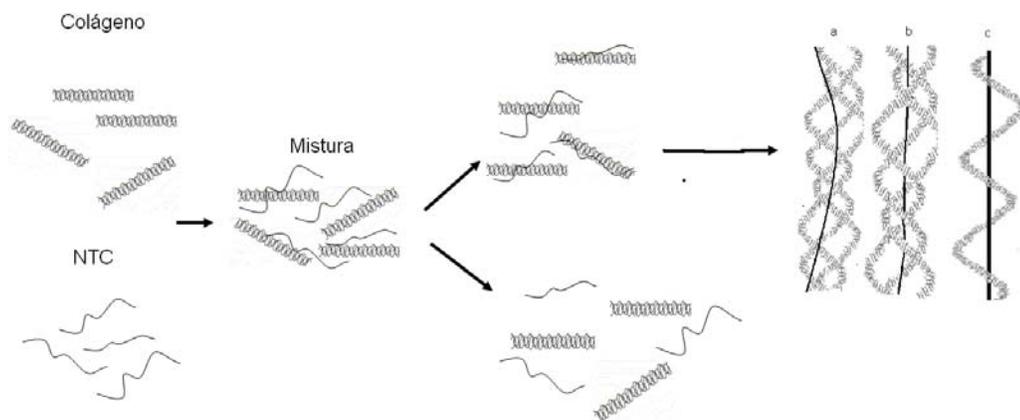


Figura 6-11: Possibilidades de arranjos de colágeno em NTC.

Outras formas para a ligação podem ser proporcionadas pela exposição de moléculas de colágeno em estado sol com NTC dispersos promovendo interações químicas nas terminações funcionais nos NTC com as terminações protéicas do colágeno facilitando a ligação química entre elas como ilustrado na figura 6-12.

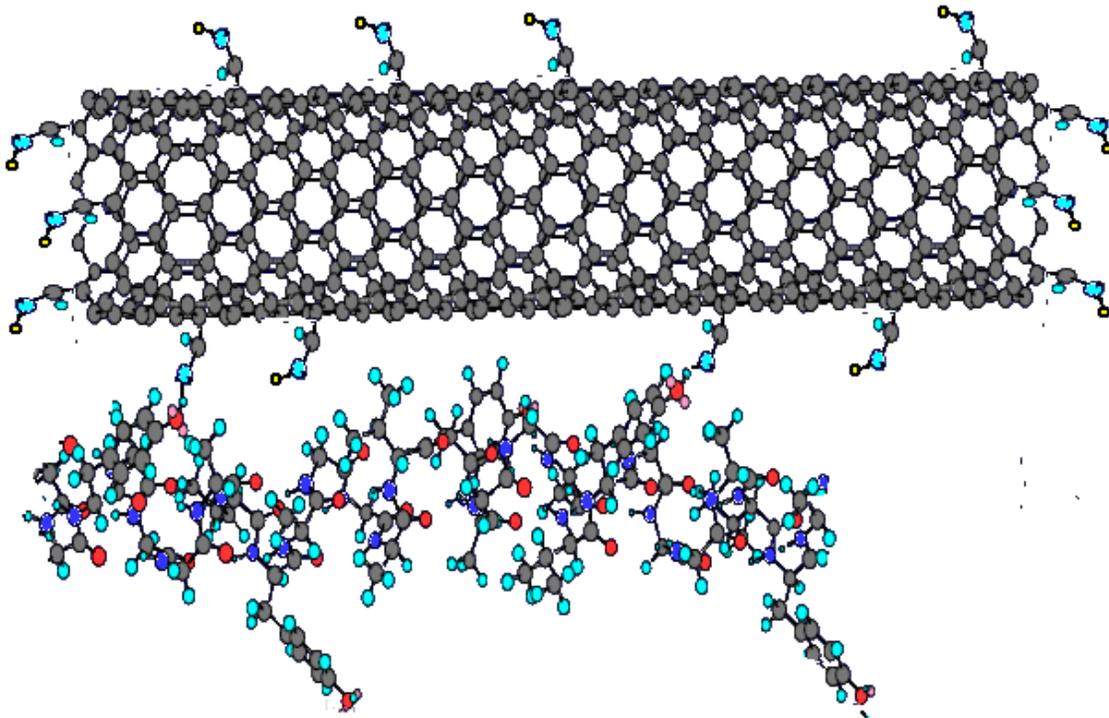


Figura 6-12: Fragmento de uma hélice do colágeno (seqüência de proteínas) ligada ao NTC¹¹.

O comportamento de reforço do colágeno, aumentando a resistência e a tração de ruptura e a estabilidade térmica do colágeno, indica que existe uma adesão eficiente na interface colágeno NTC, que pode ser proveniente da interação do colágeno com os dos NTC, via enrolamento ou ligação química. Estas características promovem ao compósito possibilidade de permanecer estável no organismo e promover regeneração de tecidos, por exemplo.

Referências bibliográficas

- 1 MacDonald R A., et al.. *J Biomed Mater Res* ; **74**(A): 489–496, (2005)
- 2 Zhao B., et. all. *Chem. Matter*; **17**: 3235-3241 (2005)
- 3 Angele P. , et al. *Biomaterials*; **25**: 2831–2841(2004)
- 4 Shanmugasundaram N. et al.. *Journal of biomaterials applications*; **18**: 247-264 (2004)
- 5 Lacerda C., et al. . *Quimica Nova*; **21**(3): (1998),
- 6 Shairali Shiva Rao Electrospun PLLA/SWNT Nanocomposite Fibril for Cartilage Regeneration Drexel University June 2004
- 7 Hoa Le Lam Electrospinning of Single Wall Carbon Nanotube Reinforced Aligned Fibrils and Yarns Drexel University October 2004
- 8 Levy Neto, Flaminio et. al. *Compósito estruturais: ciência e tecnologia* 1ed são Paulo Edgard Blücher, cap 5 2006
- 9 Lozzi Marco a. et al.. *Polimeros: Ciencia e tecnologia*; **4**(2): 93-98 (2004)
- 10 Medeiros J. K. , et al. *Polimeros: Ciencia e tecnologia*; **9**: 136-141 (1999)
- 11 <http://128.200.94.85/papers/NanotubesAndBiology.pdf> em 02/09/2005

7. Mineralização de nanoestruturas

A mineralização dos tecidos vem sendo estudada vastamente desde 1959 quando Glimcler¹ propôs a teoria de mineralização por deposição de mineral. O autor diz que a mineralização ocorre pela interação entre a fase mineral do fluido extracelular e os componentes orgânicos da matriz. Entre estes componentes estão as fibrilas colágenas cujas matrizes orgânicas são formadas principalmente por colágeno, como é o exemplo da dentina, do osso e da cartilagem. Nestes tecidos, a mineralização ocorre pela precipitação de fosfatos de cálcio nos componentes fibrilares e não fibrilares das matrizes orgânicas. Sendo este processo independente de qualquer outra participação celular e dirigida apenas por parâmetros físico-químicos. Os sais minerais derivados dos íons cálcio e fosfato presentes no fluido extracelular são depositados seletivamente nas denominadas matrizes "mineralizáveis" desses tecidos. Na cartilagem, no osso e na dentina a deposição inicial de mineral é caracterizada pela aparição de depósitos de fosfatos de cálcio (hidroxiapatita) em associação com uma população de corpos envolvidos por membrana, as vesículas da matriz. As vesículas da matriz são corpos arredondados envolvidos por membrana que estão presentes no espaço extracelular das matrizes de colágeno que se calcificam. Elas derivam das células formadoras desses tecidos, aparecem logo após a deposição do colágeno e rapidamente adquirem inclusões com aparência de cristais, contendo cálcio e fosfato em diversas espécies denominadas hidroxiapatita. A maneira que o processo de mineralização se difunde das vesículas para o colágeno é um assunto bastante controverso. Os estudos realizados sobre a compartimentalização da matriz orgânica do osso em desenvolvimento sugerem a existência de duas fases durante o processo inicial de mineralização, a saber: uma primeira, vesicular, onde as vesículas da matriz desempenhariam um papel na nucleação inicial; e uma segunda, fibrilar, onde as fibras de colágeno, em associação, provavelmente, com outras moléculas da matriz, forneceriam os locais para a continuação do processo. Uma vez que já é conhecido que o colágeno e moléculas associadas a eles (fosfoproteínas), por exemplo, são capazes de fornecer a geometria estereoquímica tridimensional e a distribuição de cargas elétricas necessária para a nucleação da apatita².

Na linha dos implantes, os diversos biomateriais utilizados clinicamente induzem diferentes respostas do tecido e, em função do tipo de interface tecido-implante desenvolvido, podem ser classificados em bioinertes ou bioativos. A incorporação do grupo de fosfatos de cálcio, ao qual pertence a HAp, à superfície de implantes metálicos e materiais cerâmicos bioativos são altamente difundidos.³ A HAp, por exemplo, é considerada um material osteocondutor por acelerar a formação de osso novo ao redor do implante e, com isso, reduzir o tempo de cicatrização, diminuindo, conseqüentemente, o tempo total de tratamento. O uso dos recobrimentos de HAp, sobre implantes metálicos, permite associar a resposta biológica favorável destes materiais às excelentes propriedades mecânicas dos metais normalmente utilizados em implantes odontológicos. Outra prática comum é utilizar em implantes raspas de ossos, retiradas do próprio paciente. Para esta extração, o paciente deve se sujeitar a uma cirurgia extra. Os fosfatos de cálcio, em especial a hidroxiapatita $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$, favorecem o crescimento ósseo para os locais em que ela se encontra, estabelecendo ligações de natureza química entre a hidroxiapatita e o tecido ósseo (bioativo), permitindo a proliferação de fibroblastos, osteoblastos e outras células ósseas, sendo que as células não distinguem entre a hidroxiapatita e a superfície óssea, o que indica a grande similaridade química superficial.

O interesse pela HAp como um biomaterial está então relacionado com o fato desta ser a principal fase mineral encontrada no tecido ósseo e ter alta biocompatibilidade. Suas aplicações estendem-se desde a ortopedia e traumatologia para correções de maxilas, traumatismos coluna cervical, tumores músculo-esqueléticos entre outras. Na odontologia, em casos de doenças periodontais, implantes dentários e preenchimento de ósseos. O colágeno pode ser usado como arcabouço de HAp por ser um agente de união biocompatível e reabsorvível, responsável pela prevenção da migração das partículas de HAp, até sua incorporação no tecido. O biomaterial sempre deve permitir um crescimento sustentado do osso vizinho na sua superfície, promovendo contato direto osso:material para ocorrer o fenômeno da osteointegração. Neste fenômeno ocorre uma conexão direta e funcional do osso, estruturado e vivo, com a superfície de um implante, submetido à carga funcional, sem a interposição de tecido fibroso³.

Sabendo destes argumentos, começamos a estudar a formação da HAp sobre os materiais por nós estudados, isto é NTC, colágeno e compósitos. Para verificar se

com uma pequena concentração íons Ca^{2+} em contato com o compósito seria possível obter mineralização utilizando o metabolismo do próprio corpo para sintetizar a HAp foi primeiro realizado um teste in-vitro onde foi utilizada uma solução tampão com concentração de íons Ca^{2+} similar a encontrada no sangue.

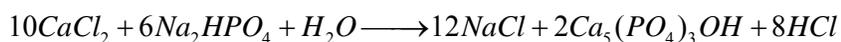
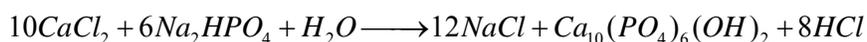
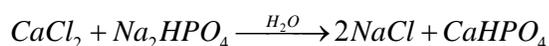
É importante saber que a concentração de Ca^{2+} no sangue é, normalmente de 10 mg/dl, o que corresponde à uma solução com concentração de 25 mM. Destes, 40% são representados por Ca^{2+} ligado a proteínas plasmáticas e 60% são ultrafiltráveis. Uma porção de 10% dos componentes ultrafiltráveis está complexada com ânions (por exemplo, sulfato fosfato e citrato) e a outra porção de 50% representa Ca^{2+} livre, ionizados. Esta última é a única forma de Ca^{2+} biologicamente ativa. Com isto, para simularmos o organismo precisamos de uma solução com no máximo 12,5 mM de íons cálcio. O organismo humano é munido de íons de Ca^{2+} circulante e íons fosfato ativo nos tecidos mineralizáveis onde a interação destas estruturas com o fluido sanguíneo, nos implantes, poderá promover a osteoindução devido aos íons circulantes. Na maioria dos trabalhos já realizados até hoje, a HAp sintetizada para produção de compósitos implantáveis são feitas a partir de altas concentrações de substâncias ricas em íons de fosfatos e de cálcio^{4,5}. Porém, alguns trabalhos recentes, mostram a possibilidade de promover a mineralização com baixas concentrações destes íons em substratos ou soluções, como foi mostrado por Haddon e colaboradores⁶ Neste trabalho, os autores mostram uma deposição mineral de 455 nm em 7 dias e uma deposição de 1,8 μm em 14 dias.

Nesta etapa do trabalho, nos baseamos nos procedimentos realizados por Haddon no artigo citado acima utilizando no lugar dos NTC-PABS os NTC-COOH e uma solução com concentração molar abaixo da fisiológica para verificar a incorporação de fosfato de cálcio nos NTC. Como é necessária uma matriz de ancoramento deste material para implantes, fizemos o experimento também no colágeno e no compósito, onde estes compósitos foram sintetizados com NTC-COOH. Estes experimentos foram realizados para verificar a viabilidade de aplicação em recuperação de falhas ósseas em seres vivos. O comportamento destes materiais como matriz de formação mineral será relatado na próxima seção, e é um trabalho inédito.

7.1. Teste *in vitro*

O desenvolvimento de biomateriais que imitam os ossos tem tido enfoque estratégico no crescimento de cristais de HAp em condições fisiológicas. No entanto, alguns fatores afetam a mineralização como: os meios de controle desse processo e a razão molar da reação, que tem importância primária. Nós investigamos a síntese de HAp usando solução fisiológica de íons Ca^{+2} e P^+ .

As deposições foram efetuadas misturando simultaneamente soluções 5 mM de Na_2HPO_4 e 10 mM de CaCl_2 e imergindo os material nesta solução. As seguintes reações podem ocorrer sobre os materiais:



Antes de realizarmos os experimentos de mineralização sobre os materiais nanoestruturados, com concentração fisiológica, foram feitas duas deposições comparativas sobre substrato de silício. Na primeira, o substrato ficaria imerso em solução com concentração fisiológica, usando as soluções descritas acima; e no segundo ficaria imerso em solução com alta concentração molar (usando soluções 5 M de Na_2HPO_4 e 10 M de CaCl_2), sempre mantendo a proporção entre elas na mistura.

Neste experimento, podemos observar o processo de mineralização sobre substratos de silício. No substrato exposto a solução com baixa concentração não houve mineralização. Na pela figura 7-1a podemos ver três fragmentos, um número desprezível em relação ao outro substrato exposto a solução com altas concentração houve uma espessa mineralização, como ilustrado na figura 7-1b. Esta diferenciação da formação particulada de cristais de HAp entre os dois substratos demonstra que em condições fisiológicas não há formação de HAp.

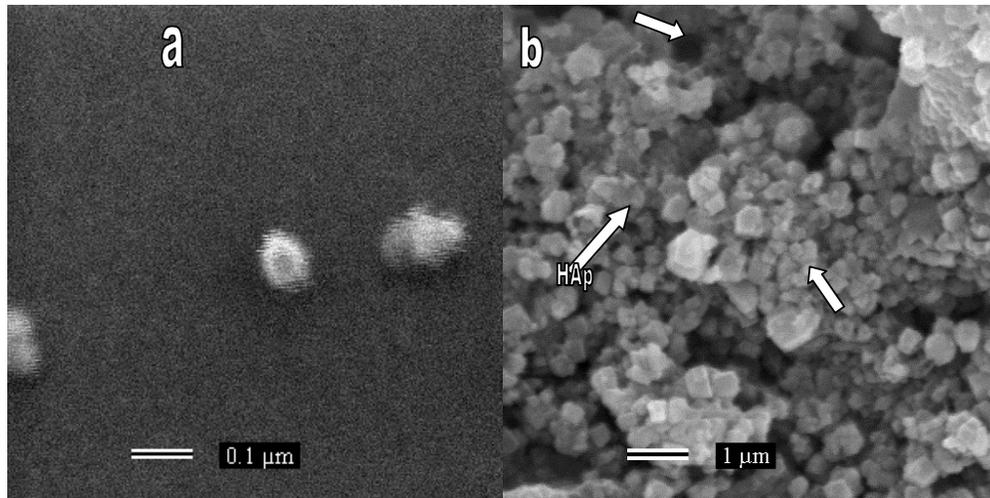


Figura 7-1: Imagens comparativas de HAp sobre substrato de Si, mostrando a mineralização a) solução fisiológica b) solução molar.

Desta forma, este resultado indica que a mineralização sobre substratos imersos em solução com concentração fisiológica deve ocorrer assistida por superfície com imperfeições ou necessita de grupos químicos para se ligar. Para comprovar este argumento, realizamos um estudo sistemático do processo de mineralização sobre os materiais nanoestruturados (colágeno, compósito e NTC), seguindo o seguinte procedimento: cada amostra foi colocada dentro da solução fisiológica de Ca e P. Decorrido uma semana parte da amostra era retirada e analisada, até o tempo máximo de 6 semanas.

A partir da primeira semana já era possível identificar precipitados sobre a superfície dos materiais. Estes precipitados podem ser observados na figura 7-2 (a) e (b) que correspondem a NTC depositado em um substrato e biocompósito, respectivamente com exposição à solução fisiológica por 1 semana. Nestas imagens podemos perceber uma pequena porção de material com forma granular. Na figura 7-2 (c) e (d), corresponde a estes mesmos materiais expostos a solução por um período de 4 semanas. Nestas imagens podem ser observados o recobrimento do material exposto, no caso do compósito não é mais possível perceber a presença da matriz, e nos NTC grande parte de sua superfície foi recoberta. Foram colocadas setas nas imagens para ficar mais fácil de identificar as partículas precipitadas.

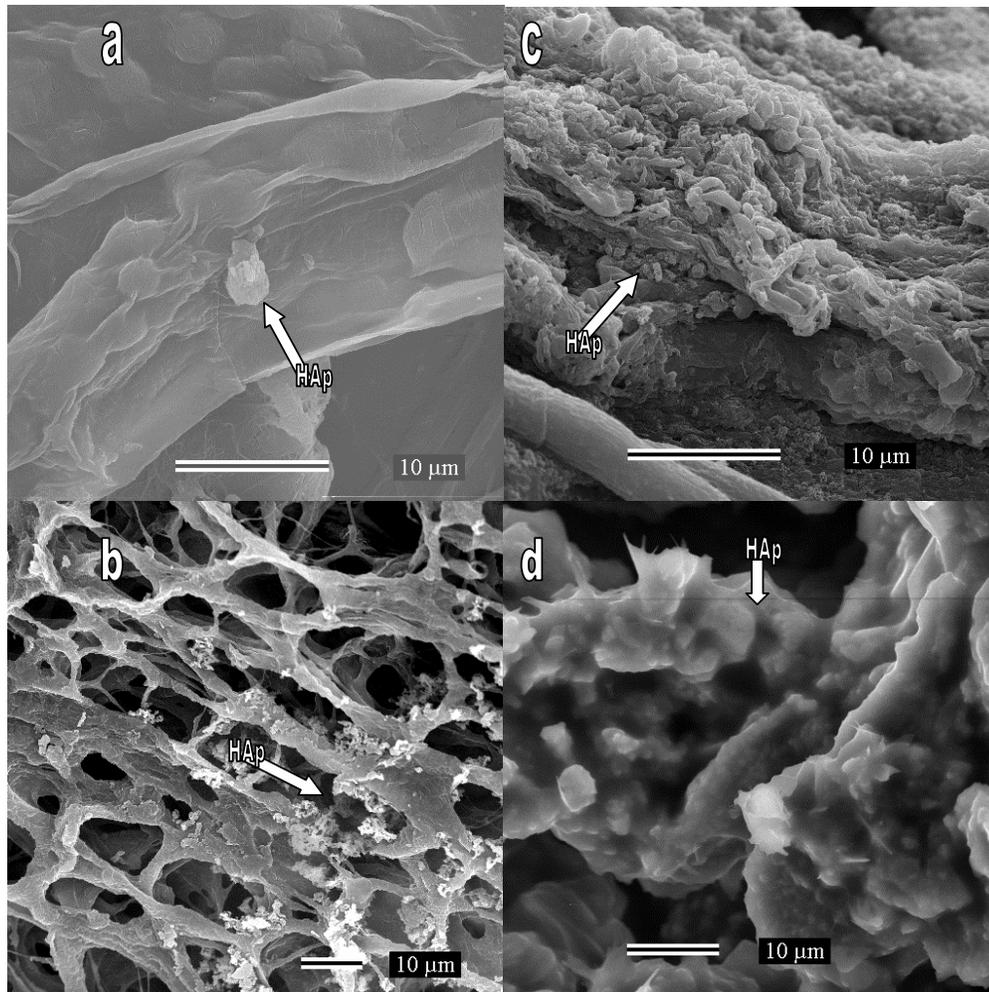


Figura 7-2: Materiais expostos a solução fisiológica de Ca^{2+} e PO_4^{3-} A) NTC, B) Compósito expostos por 1 semana e C) Nanotubo de carbono e D) compósito expostos por 4 semanas.

Podemos então verificar que para ambas as amostras houve um aumento massivo de partículas depositadas sobre a superfície do substrato em solução fisiológica, o que demonstra que a presença de uma superfície nanoestruturadas induz a formação de cristais de HAp.

Através de técnicas como espectroscopia de raios-X podemos verificar que as partículas formadas nos dois casos são basicamente compostas de $\text{CaH}(\text{PO}_4)$, $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3(\text{OH})$ e $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$. A figura 7-3, mostra um difratogramas típico de hidroxiapatita, obtido de amostras produzidas em nosso laboratório.

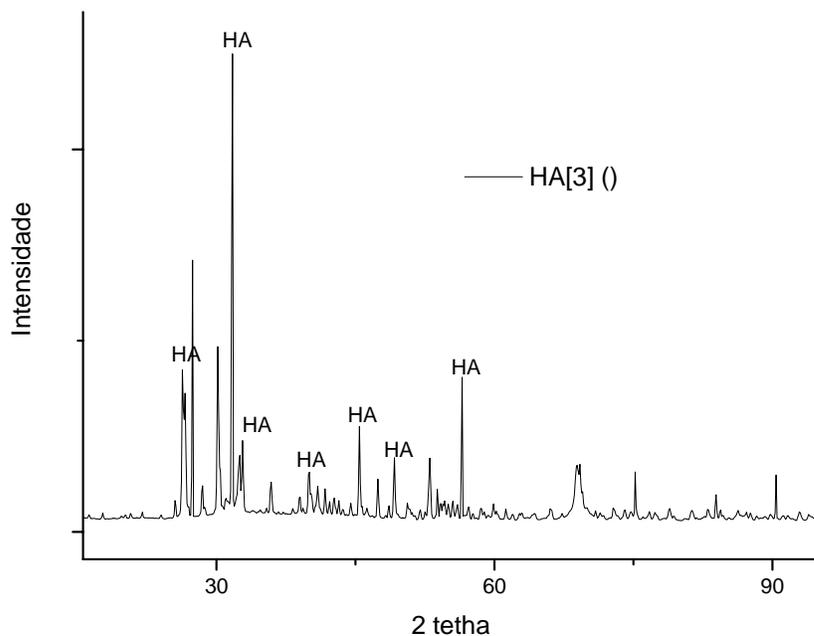


Figura 7-3: Espectro de Raios-X de HAp sobre substrato amorfo com solução molar.

O estudo sistemático do processo de mineralização foi iniciado com amostras de NTC-COOH. Durante o processo de mineralização foi possível observar o quadro evolutivo da indução da precipitação das partículas de HAp sobre a matriz de NTC. A figura 7-4 mostra a evolução temporal desta mineralização. A partir de 4 semanas existe um recobrimento sobre as fibras de carbono. Estas se tornam mais estruturadas em 6 semanas. Nas imagens de duas semanas as partículas podem ser vistas somente com grande aumento, como na figura 7-2a. Em 3 semanas é possível visualizar vários pontos de precipitação das partículas de HAp. É válido lembrar que essa indução foi feita em condições fisiológicas.

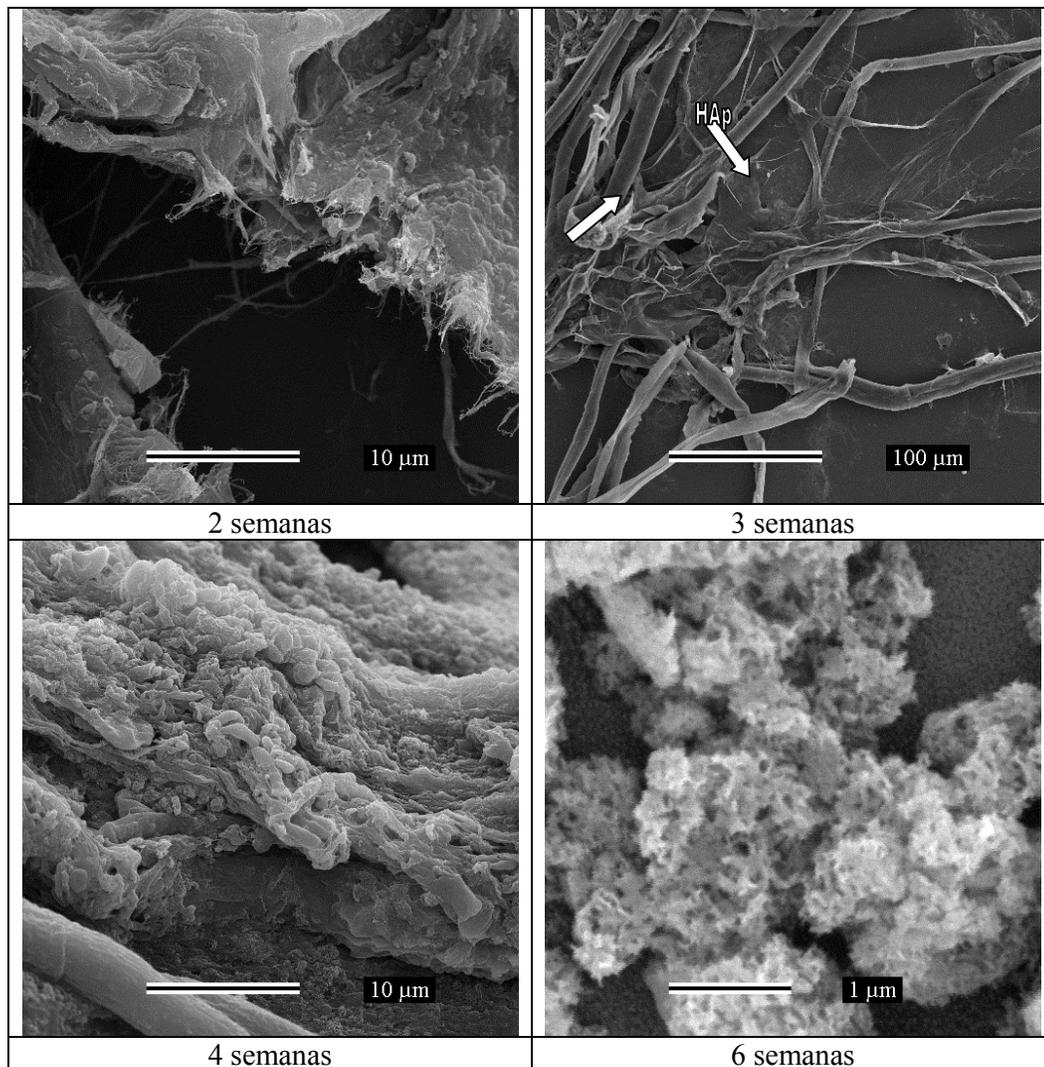


Figura 7-4: Mineralização sobre NTC-COOH

Estas deposições formam uma estrutura cristalina de HAp como pode ser confirmada nas análises de raios $-X$ ilustrada pela figura 7-5 que indicam fases de $CaH(PO_4)$, $Ca_5(PO_4)_3(OH)$ e $Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$, esta última estrutura é denominada Hidroxiapatita.

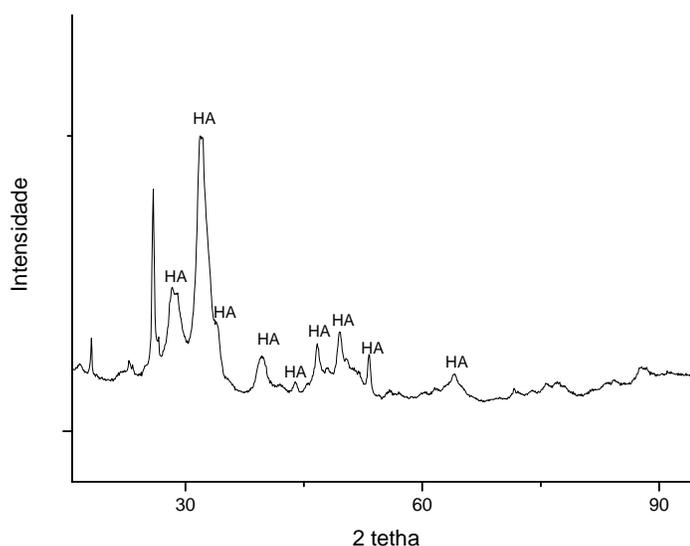


Figura 7-5: Difração de raio-X sobre NTC

As bandas largas no difratograma de raio-X indicam que a nucleação acontece de forma heterogênea formando partículas que posteriormente se agregam gerando estruturas policristalinas. Esta deposição ocorre provavelmente por um processo de interação química entre as carboxilas terminais do NTC e a HAp, que será discutida mais adiante.

Após o processo de mineralização é de fundamental importância a limpeza da amostra para retirada de resíduos e a purificação do material para evitar contaminações e falsos resultados. A extração de impurezas residuais como sal, $NaCl$, e ácido, HCl , deve ser feita por lavagem. Como o sal e o ácido não estão adsorvidos na superfície dos NTC, eles se diluem na água e são eliminados da matriz. Para confirmar a inexistência de ácidos livres, sempre deve ser conferido o pH da solução de lavagem, onde ao final do processo é necessário que ela esteja neutra.

No trabalho realizado por Haddon, ele relata um experimento de mineralização com NTC funcionalizados em soluções e substratos. Ele mostra que as cargas positivas atraem o íons de Ca^{2+} e são um precursor de crescimento auto organizado, formando largas camadas de HAp sobre os filmes de NTC funcionalizados⁶. Os nossos resultados podem ser comparados ao dele, porque ambos promovem a formação de HAp auto-organizada sobre matrizes nanoestruturadas.

Durante os experimentos foi observado que a agitação da solução interfere na formação de HAp. Quando a solução contendo NTC está sob agitação a HAp cresce de forma particulada, e quando a solução permanece estática é formada uma espécie de filme sobre o NTC com largas placas. Como mostrado na figura 7-6 as setas mostram na figura 7-6a as placas de HAp e na figura 7-6b as partículas de HAp.

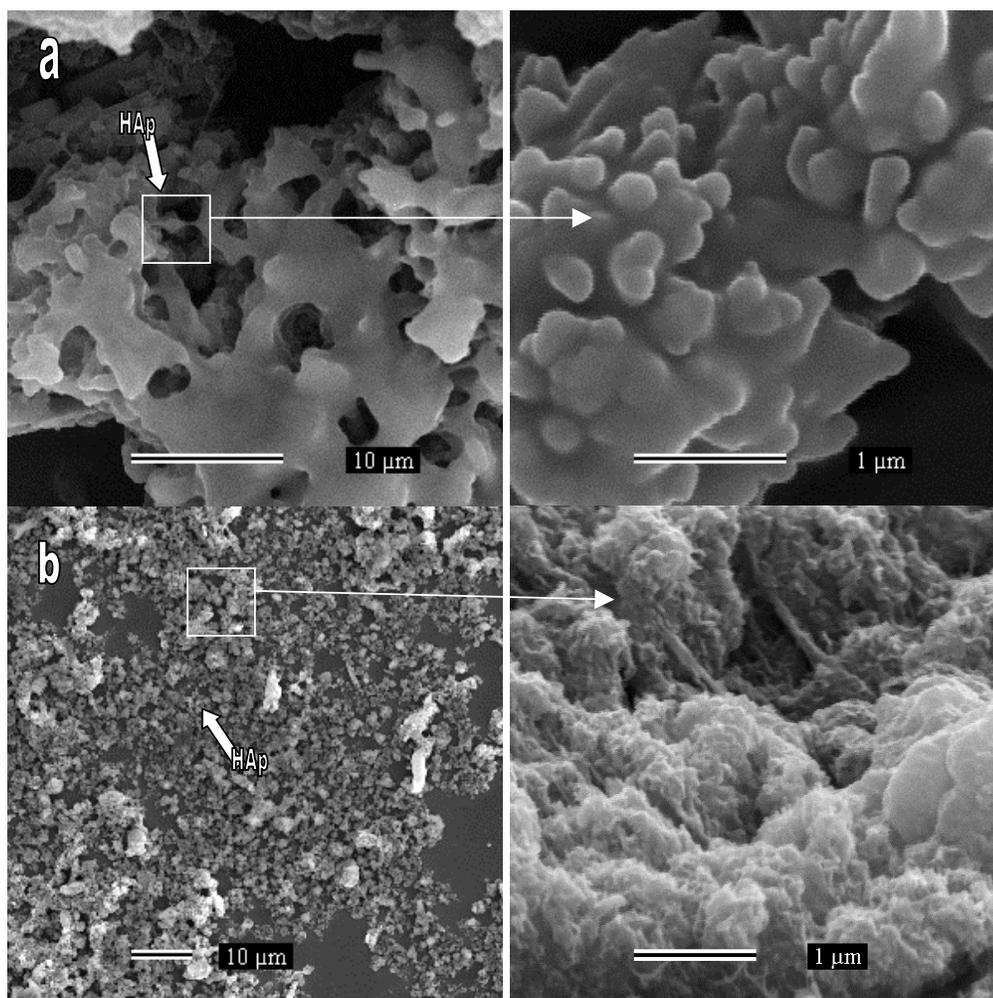


Figura 7-6: Comparação de formação de HAp sobre substrato de Si linha a) sem agitação e linha b) sob agitação com as respectivas ampliações.

Nas duas situações, acima descritas, são formados cristais de $CaH(PO_4)$, $Ca_5(PO_4)_3(OH)$ e $Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$ com estrutura mais particulada do que as estruturas formadas pela mineralização feita sob agitação.

Podemos concluir desta primeira parte da mineralização que os NTC são ótimas matrizes indutoras de cristalização de HAp, mesmo em soluções fisiológicas,

estes resultados viabilizam a aplicabilidade dos NTC em compósitos para proliferação óssea, e conseqüentemente aplicação em seres vivo.

Como já foi mostrado, o NTC promove, ao compósito, resistência mecânica, térmica entre outras. Além disto, o colágeno pode ser usado como arcabouço de partículas por ele ser um agente de união responsável pela prevenção da migração dessas partículas, até sua incorporação. Usualmente, a matriz de colágeno é utilizada como suporte mineral, onde a HAp é agregada em sua estrutura com o objetivo de substituir a próteses cerâmicas atualmente utilizadas devido as ótimas qualidades desse material.

Visando a aplicabilidade do compósito desenvolvido durante nossos estudos foi repetido o processo de mineralização utilizando como matriz os compósitos e colágeno. Felizmente, neste caso, também foi possível observar a precipitação de partículas de HAp sobre as matrizes como foi observado na figura 7-2 favorecendo nosso estudos.

O estudo sistemático do processo de mineralização do biocompósito foi iniciado de forma similar ao dos NTC já relatados. A única diferença entre os dois métodos foi a utilização de uma amostra para cada tempo de deposição. Este procedimento foi realizado para que não houvesse interferência nas medidas pela fragmentação da amostra.

Durante a primeira semana foi possível identificar nas micrografias partículas precipitadas de HAp sobre o compósito, porém elas não são encontradas nas matrizes de colágeno, como pode ser observado na figura 7-7a e b. As amostras de colágeno necessitam um tempo mais prolongado para que a HAp comece a precipitar sobre a matriz. Em quatro semanas, o compósito e o colágeno se apresentam totalmente mineralizados, igualando a cristalização das duas matrizes. Como pode ser observado na figura 7-7c e d é possível visualizar ainda a formação de alguns cristais sobre as matrizes de compósito.

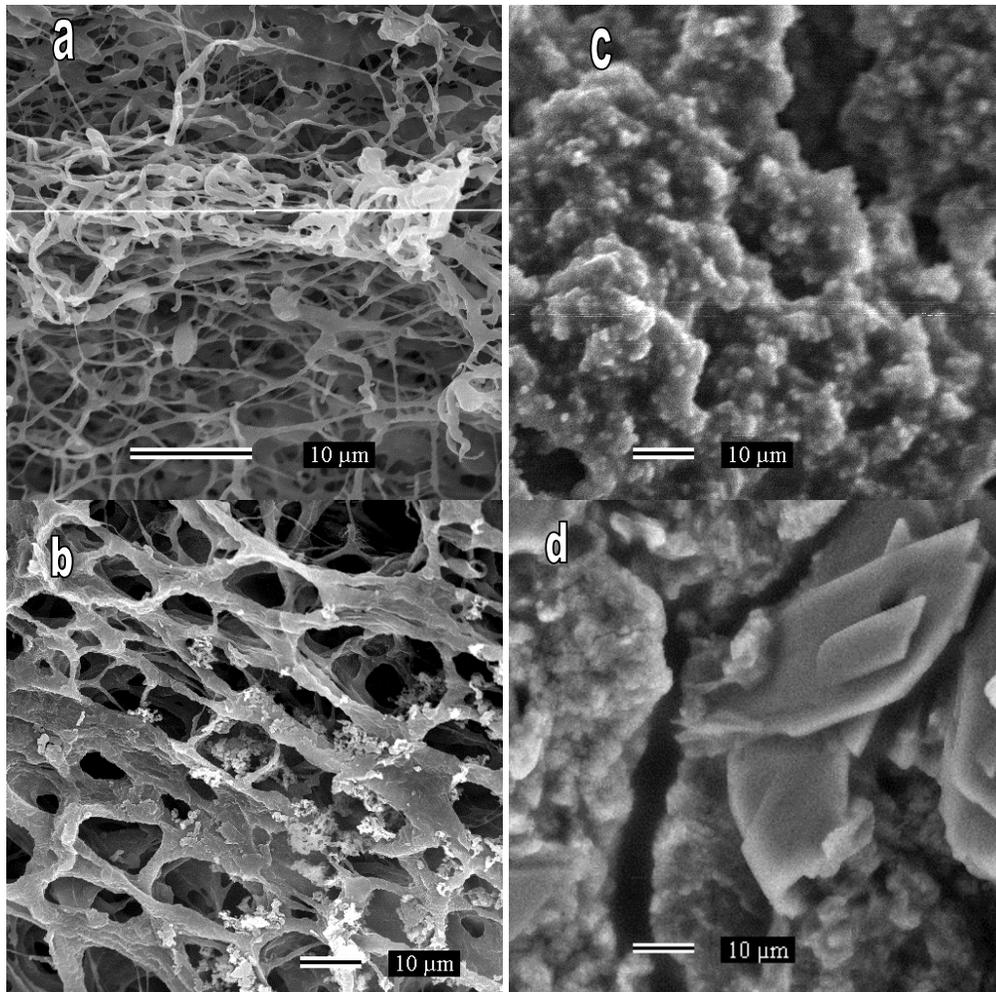


Figura 7-7: Comparação morfológica de HAp em a) colágeno imerso por 1semana e c) colágeno imerso há 4 semanas e b) compósito imerso a 1semana d) compósito imerso por 1semanas

Na primeira semana de deposição foi feita uma análise elementar do compósito e do colágeno, onde em ambas as matrizes foi possível identificar a presença de cálcio e fósforo. As análises de raios-X, realizadas nas amostras com período de deposição de 4 semanas, confirmam a formação de estruturas de HAp tanto na matriz de colágeno quanto na de compósito. Sendo que todas as duas são compostas por HAp, no colágeno a fase predominante é a $Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$ e no compósito foi possível identificar as fases $Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$ e $Ca_5(PO_4)_3(OH)$ da HAp e o $CaH(PO_4)$ como pode ser observado na difração de raios -X mostrado na figura 7-8 (a) e (b).

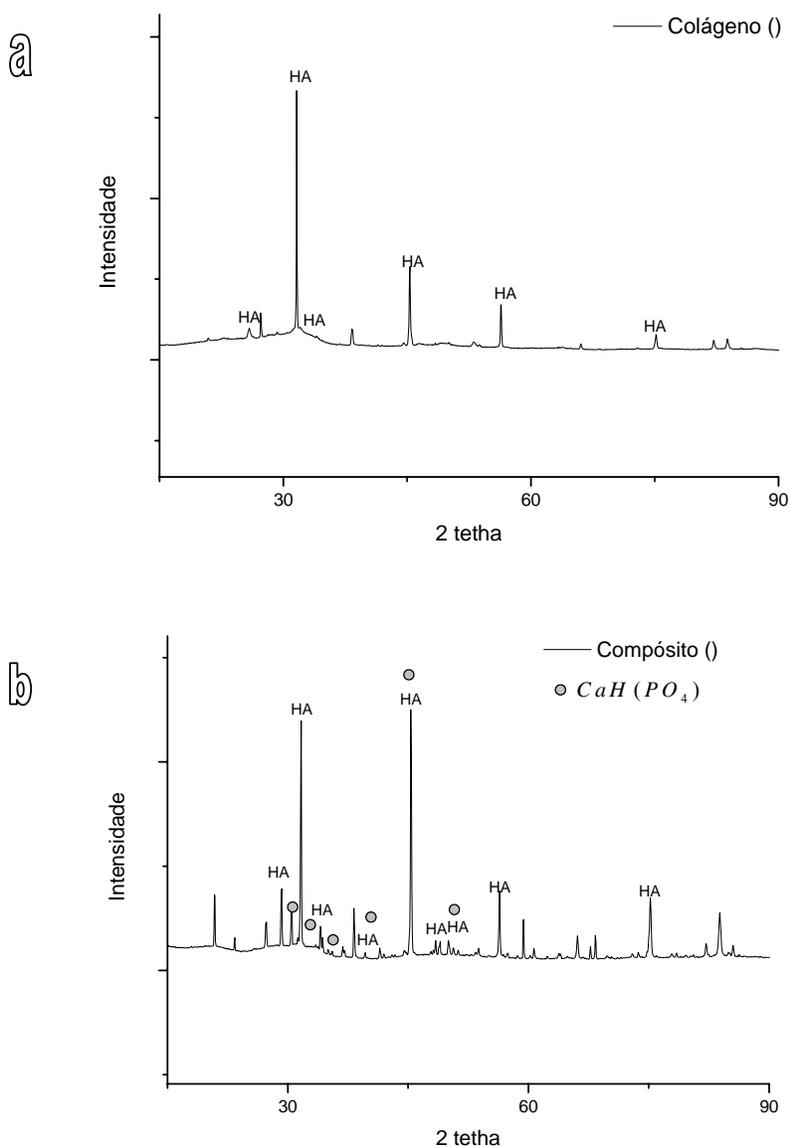


Figura 7-8: Difração de raio-X das matrizes de a)colágeno e b) compósito.

As amostras de colágeno e compósito mineralizados foram submetidas à espectroscopia na região do infravermelho (FTIR) representada pela figura 7-9. A análise deste espectro mostra que os picos referentes aos modos vibracionais das proteínas presentes na estrutura do colágeno diminuíram ou se extinguíram e novos modos de vibração foram visualizados. São encontradas nos espectros picos referentes as frequências de vibração de estiramento CH (~ 2962 e ~ 2902 cm^{-1}), amida ii e iii frequência de vibração ($\sim 1450, 1402, 1350, 1250$ cm^{-1}), vibração de

grupo funcional PO_4 , ($\sim 1093\text{-}1080\text{ cm}^{-1}$), estiramento íons fosfatos PO_4^{3-} $\sim 1006\text{ - }1050\text{ cm}^{-1}$ e $\sim 659\text{ cm}^{-1}$, P-O-C em torno de 1050 cm^{-1} . A vibração referente a OH^- da ligação P-OH estão em $\sim 870\text{ cm}^{-1}$, as do HPO_4 $\sim 1150\text{ cm}^{-1}$ e a vibração assimétrica do PO_4 $\sim 1107\text{ cm}^{-1}$.

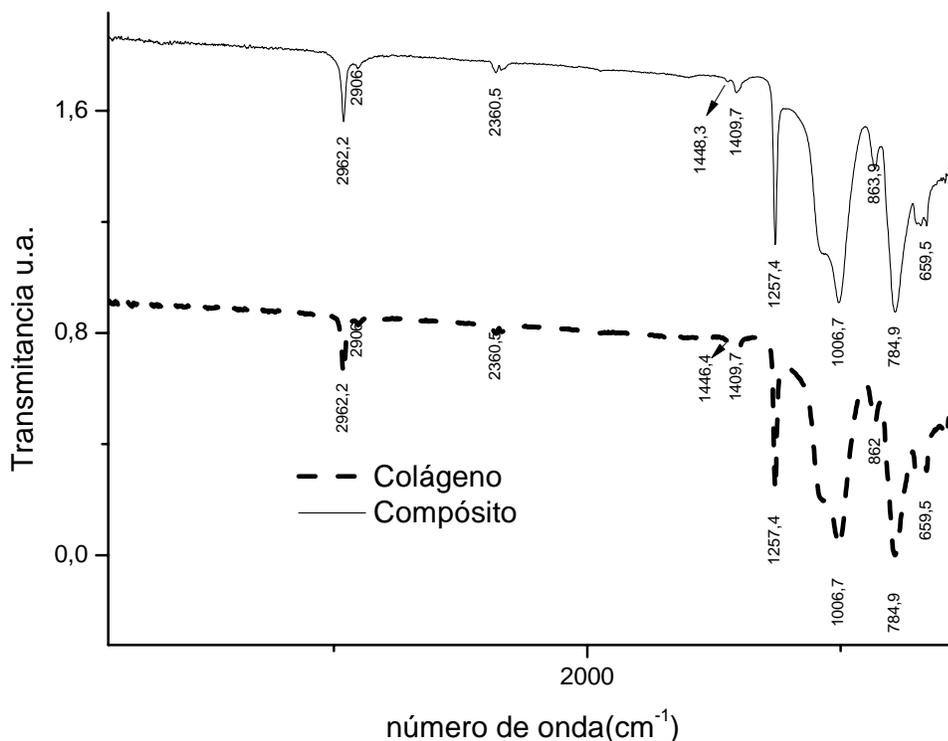


Figura 7-9: Espectro na região do infravermelho para estrutura do colágeno e do compósito.

A característica fundamental da HAp em espectros de infravermelho são as bandas do PO_4 constituídas pela deformação ν_2 O-P-O em 475 cm^{-1} , deformação assimétrica ν_4 em 576 cm^{-1} não visíveis neste espectro e modos de deformação simétrica ν_4 em $\sim 605\text{ cm}^{-1}$ e deformação ν_1 P-O em $\sim 975\text{ cm}^{-1}$ e deformação ν_3 P-O em $\sim 1086\text{ cm}^{-1}$ e grupos OH em $\sim 630\text{ cm}^{-1}$.

Como as principais vibrações do fosfato estão presentes nos espectros das amostras de colágeno e compósito após mineralização fica comprovado a presença de fosfatos nas matrizes, como mostrado no difratogramas de raio-X. Devido às interações do colágeno e dos NTC com a HAp não é possível confirmar o

entrelaçamento da tripla hélice do colágeno após a mineralização, porém a imersão do colágeno ou do compósito, em solução com pH neutro, não influencia na estruturação do colágeno no que diz respeito ao entrelaçamento da tripla hélice. Esta afirmação foi comprovada por testes de solubilidade, similar ao apresentado na seção anterior. As amostras permanecem íntegras na solução de mineralização por um período de 4 meses.

Em síntese, o compósito de colágeno: NTC com HAp (similar aos ossos de seres vivos) pode ser sintetizado a partir do sistema auto organizado entre as superfícies de compósito e da solução promotora de HAp em solução fisiológica. O resultados obtidos pela imersão dos materiais na solução composta de íons cálcio e fosfato promovem a indução de HAp e mostram que há uma deposição heterogênea sobre as nano estruturas tanto dos NTC quanto dos compósitos. Estes, possivelmente, poderão ser utilizados para implantes em estruturas ósseas para promover a osteointegração.

A interação das estruturas de colágeno e HAp pode ser explicada, geralmente por análise de espectroscopia na região do IR. Essa interação entre o colágeno e a HAp foi mostrada no trabalho de Masanori Kikuchi e colaboradores⁸. Neste trabalho, os autores colocam a interação interfacial como responsável pela ligação do colágeno com a HAp. É assumido que a orientação dos cristais de HAp são automaticamente determinados pelas características estruturais da própria HAp. Esta orientação é coordenada pelos íons de Ca^{2+} da HAp em conformação a molécula de colágeno. De acordo com a estrutura do HAp, o Ca^{2+} aparece como o ponto de orientação de crescimento de sua estrutura cristalina. As coordenadas de Ca são perpendiculares a um eixo de crescimento de HAp, e conseqüentemente, a interação do Ca com grupos carboxílicos dissociados da superfície do colágeno é permitida. Apesar dos grupos carboxílicos poderem girar livremente por serem terminações molecular, quando o segundo Ca^{2+} interage com ele se orienta perpendicularmente a molécula do colágeno Este mecanismo pode ser visualizado na figura 7-10.

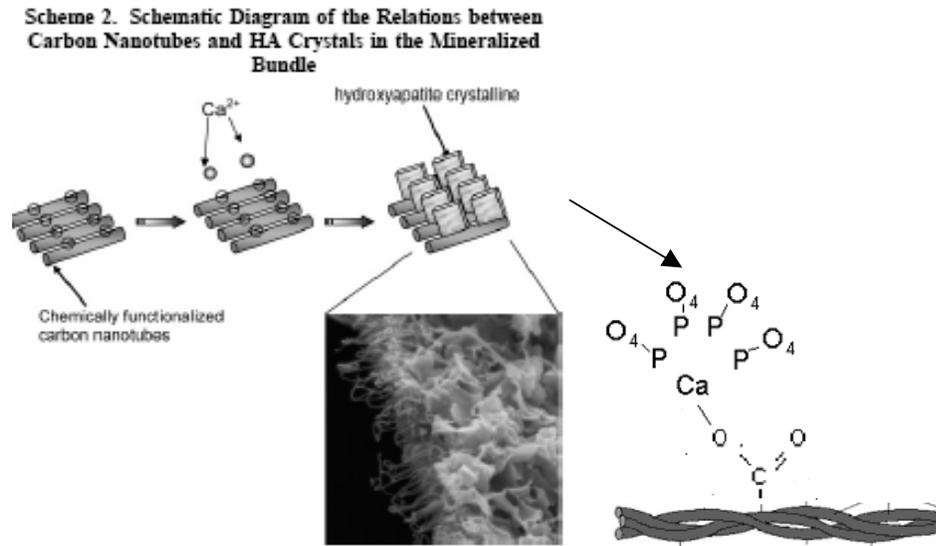


Figura 7-10: Desenho esquemático da relação entre a interface do composto de HAp e Colágeno⁸.

O mesmo procedimento deve ocorrer também com os feixes de NTC carboxilados, isto é, o Ca interage com a carboxila que esta ligada ao NTC. Outra interação possível é a nucleação heterogênea, onde a nucleação primária é iniciada por partículas suspensas de substâncias, que não o soluto, uma vez que partículas sólidas estão invariavelmente presentes. O mecanismo da nucleação primária se dá por adsorção do soluto nas superfícies das partículas sólidas. Neste caso a teoria de nucleação nuclear clássica não consegue descrever a formação cristalina, pois, ela ocorre em escala atômica. Isto é, o tamanho da molécula responsável pela primeira interação é um átomo. Sendo assim as partículas estáveis crescem em forma de cristais como esquematizado na figura 7-11 sobre os NTC.

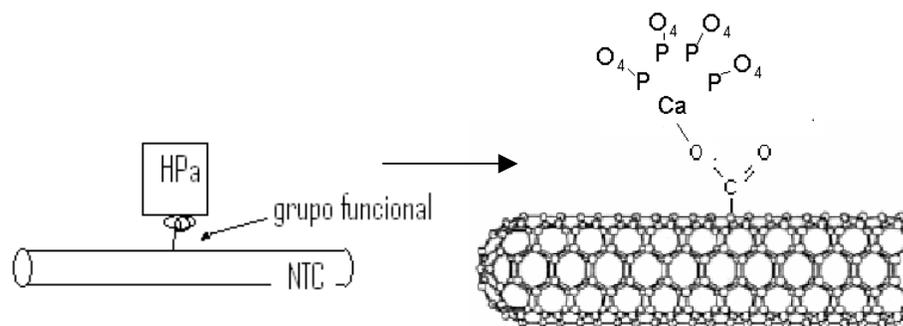


Figura 7-11: Desenho esquemático da relação entre a interface do NTC e da HAp.

Portanto, no que se diz respeito ao crescimento de HAp sobre colágeno, ocorre uma interação entre os íons Ca e as carboxilas presentes na superfície do colágeno e a partir desta interação, os íons fosfatos são atraídos por estes primeiros e ligam-se quimicamente formando então cristais de HAp. Quanto aos NTC, o mesmo processo pode ocorrer, pois é sabido que a curvatura da estrutura do NTC também influencia na interação de moléculas ou grupos funcionais que entram em contato com os mesmos.

Durante a mineralização, todas as amostras testadas foram excelentes matrizes de deposição mineral, entretanto, podemos destacar para aplicações em testes biológicos, o compósito por suas características estruturais e mecânicas. Dentro do organismo, a porosidade da matriz vai deixar passar de uma extremidade à outra o fluido corporal necessário para os processos de regeneração de tecidos, osteointegração, ósseo indução, entre outros. Como os testes *in vitro* foram realizados em solução fisiológica, a baixa concentração de Ca e P, possivelmente, dentro do organismo ocorrerão comportamento similar ao que diz respeito à mineralização. Basta saber se o material será rejeitado, possivelmente isto não vai ocorrer, pois todos as matérias primas para síntese do compósito são comprovadamente biocompatíveis o que o diferencia dos demais compósitos utilizados para implantes nos dias de hoje.

7.2. *Teste in vivo*

O compósito de colágeno e nanotubos de carbono é um avanço tecnológico por possuir uma superfície quimicamente ativa que interage com o organismo, e que busca nele fatores de crescimento que aceleram a osteogênese e a produção de uma interface entre implante e osso, isto é, uma osteointegração mais rápida.

A superfície hidrofílica do compósito, junto aos grupos funcionais adsorvidos a elas, aumenta processo de osteointegração, por serem estas, as características de materiais osteocondutores. Os grupos funcionais ativos como hidroxilas, carboxilas e fosfonatos, quando entram em contato com o sangue resultam em uma interação forte que inicia a adesão de plaquetas para formação de coágulos e a interação com íons de cálcio, liberados por enzimas.

O nosso teste *in vivo* foi realizado na Clínica Veterinária Professor Israel, localizada na Rua Piauí, nº. 1567, bairro Funcionários na cidade de Belo Horizonte

em Minas Gerais pelo veterinário Luiz Fernando Ferreira em um experimento piloto. Foi feito um implante em um cachorro, de pequeno porte, que tinha sofrido um acidente que provocou uma fratura com perda óssea, irrecuperável sem o uso de um implante. Durante a cirurgia foi utilizado um pino de titânio para que o espaço entre as extremidades ósseas fosse mantido, uma vez que o compósito não é auto suportável, e envolto a este pino foi colocado o compósito feito com colágeno e NTC funcionalizados com grupos fosfato (CNT-P). Este compósito, durante o procedimento entrou em contato com o líquido medular. Nos implantes, para regeneração óssea, sempre devem ser feitas intervenções que permitam a exposição da medula óssea. Esta medula tem uma vascularização importante, rica em osteoblastos e células mesenquimais que provoca osteogênese, osteoindução e osteocondução perfeita. Durante a cirurgia, quando o implante é colocado sua propriedade hidrofílica logo pode ser observada, uma vez que o implante atrai o sangue diretamente para os poros do compósito. Devido a sua porosidade, o compósito apresenta maior área superficial comparado a outros materiais implantáveis como titânio e hidroxiapatita cristalina.

A figura 7-12 mostra alguns passos da cirurgia por fotos, que ilustram o compósito antes de ser implantado (figura 7-12a), a distância entre as extremidades ósseas (figura 7-12b) e o compósito já adicionado em torno do pino de titânio (figura 7-12c).

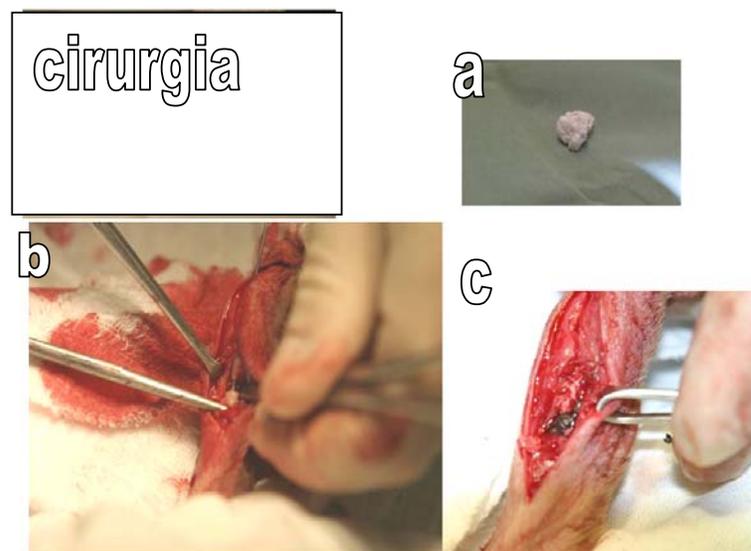
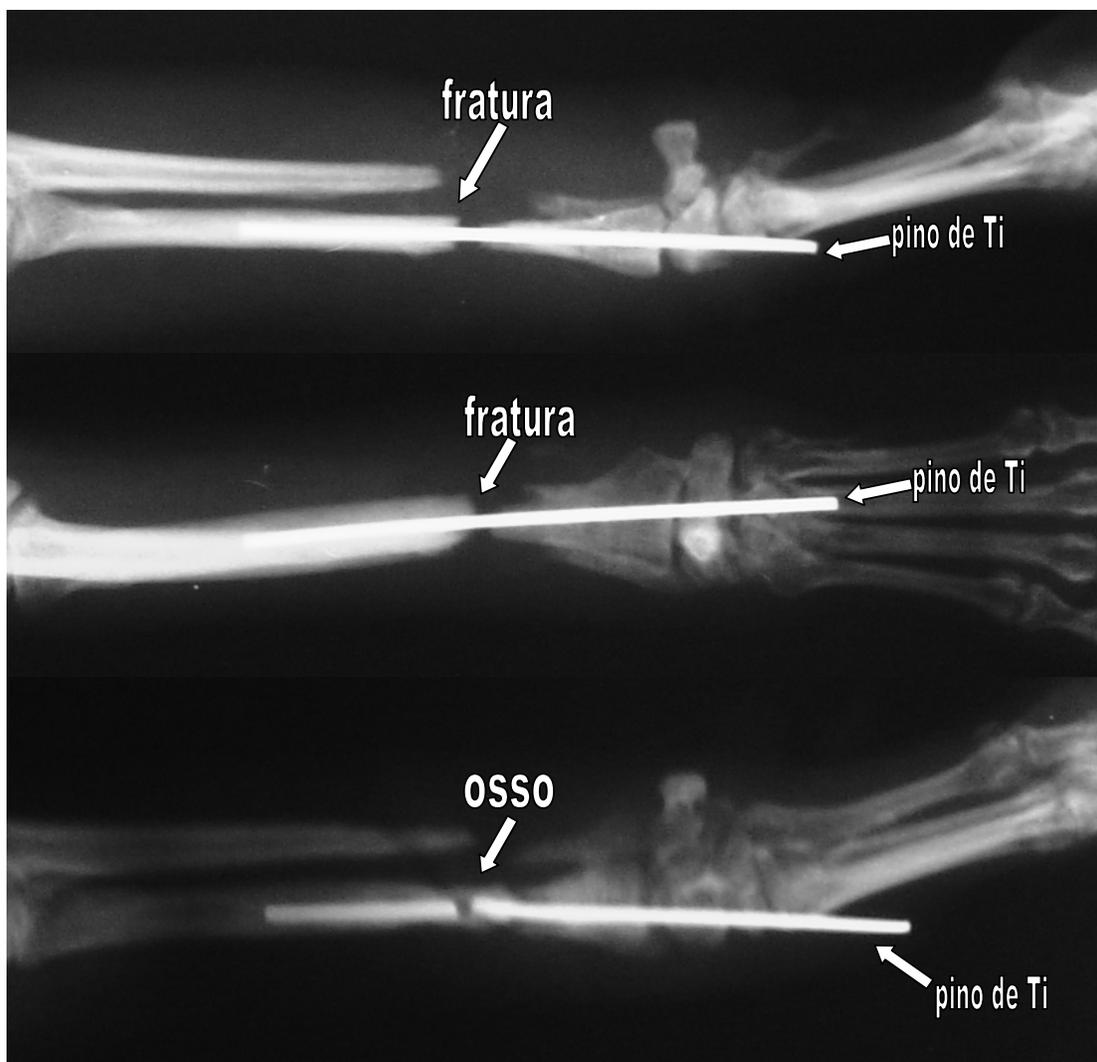


Figura 7-12: Passos da cirurgia em fêmur de cão.

Este tratamento foi acompanhado radiograficamente durante 1 mês e confirma a eficiência da mineralização. O compósito, transparente a raio-X, não aparece nas primeiras radiografias, como pode ser visualizado na figura 7-13a, onde é possível verificar a disposição fratura óssea e a distância entre as extremidades dos ossos sustentada por pino de titânio. Em 1 mês, a fratura decresceu significativamente, a área, antes sem preenchimento, agora está rádio-opaca, como pode ser observado na figura 7-13b. Podemos também observar nesta figura, que o pino de Ti está rompido, pois no meio do tratamento o cachorro sofreu nova lesão, e foi imobilizado até a finalização deste período. Este fato prejudicou a análise do restabelecimento ósseo, porém é possível observar que ocorreu mineralização no local da lesão.



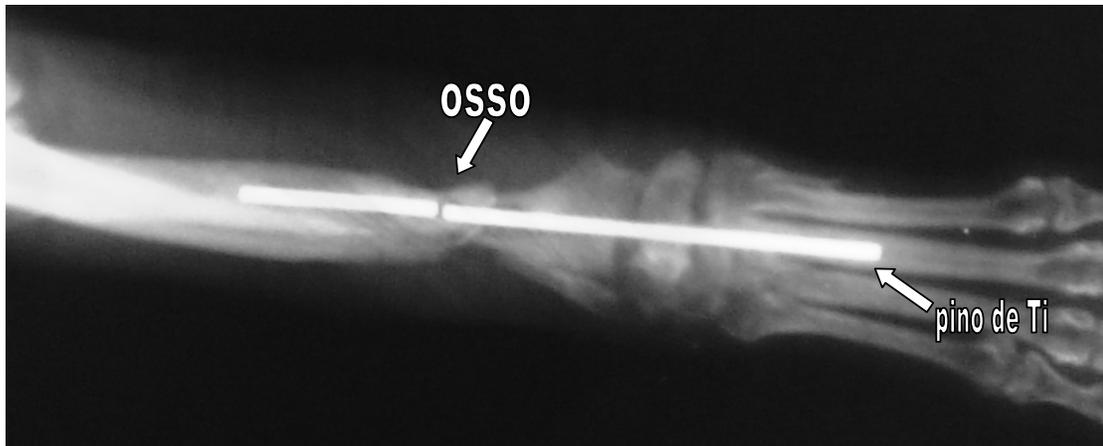


Figura 7-13: Radiografias para acompanhamento de reestruturação óssea. a e b primeiro dia, c e d trinta dias após a cirurgia.

A utilização do compósito com NTC-P como matriz de deposição se mostrou eficiente no teste piloto, o restabelecimento do paciente foi em média duas vezes mais rápido do que com implantes de ossos moídos e promoveu a osteointegração, o que não ocorreu em implantes como os de titânio. Para este caso, somente o implante metálico não seria capaz de promover a osteointegração devido à distância entre as extremidades dos ossos. Nos casos em que uma lesão ocorre com perda de segmento ósseo ou ocorre uma lesão séria que necessitam remoção óssea, não há possibilidade de reparação por não haver formação do calo, sem o preenchimento adequado.

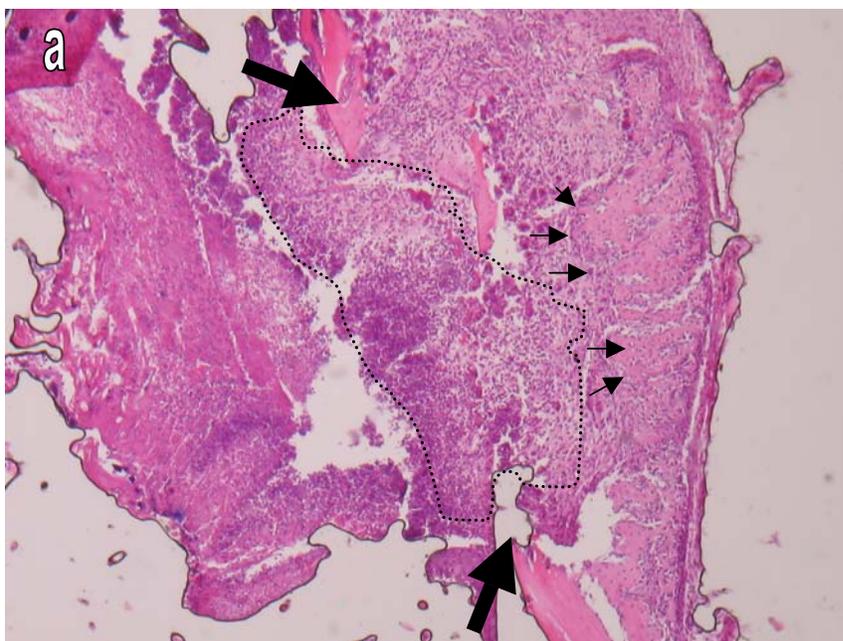
As características distintas do compósito, isto é, sua propriedade superficial quimioativada pelos grupos funcionais adsorvidos em sua superfície, e sua grande área superficial proporciona adsorção direta de proteína. No contato inicial com o sangue, que forma uma densa camada de proteína, as plaquetas aderem a esta superfície e são ativadas. A ligação contínua e acumulativa destas plaquetas é essencial para a integração do implante junto com a formação de matriz não mineralizada e mineralizada, assegurando a estabilidade óssea do implante sua cicatrização rápida.

Através deste teste piloto podemos concluir que o compósito proporciona a mineralização da matriz dentro do organismo. Podemos observar que a hidrofiliabilidade do material ajuda na conexão entre as extremidades da fratura, fazendo com que o sangue medular tenha uma passagem direta de uma extremidade a outra, possibilitando assim o contato do compósito com o Ca presente no sangue e a posterior mineralização do mesmo. Nada se pode concluir sobre a função do NTC-P

no compósito com relação a mineralização. Porém é importante enfatizar que o compósito não provocou reações inflamatórias prejudiciais e pode ser considerado biocompatível e osteoindutor.

Novos experimentos estão sendo realizados no ICB com colaboração da professora Tarcila. Nestes experimentos foram feitos implantes em calvária de ratos para estudar o efeito do compósito e sua mineralização dentro do organismo e verificar a osteointegração e possíveis reações inflamatórias devido ao contato do compósito com os tecidos do organismo vivo.

A observação de tecidos no microscópio óptico é feita por lâminas de tecidos, como os órgãos são grandes, é necessário que este tecido seja submetido a cortes finíssimos, passando por diversas etapas como desmineralização, e processamento do material com embutimento em parafina que, por fim, geram lâminas com preparados histológicos permanentes. É também comum a utilização de corantes que destacam determinadas partes das células. Essas lâminas então podem ser finalmente observadas ao microscópio óptico. A análise histológica das amostras, onde foi feito o implante em falhas ósseas evidenciou no primeiro período de sacrifício, tecido ósseo com grande quantidade de área de inflamação. Como podem ser vistas na figura 7-14.



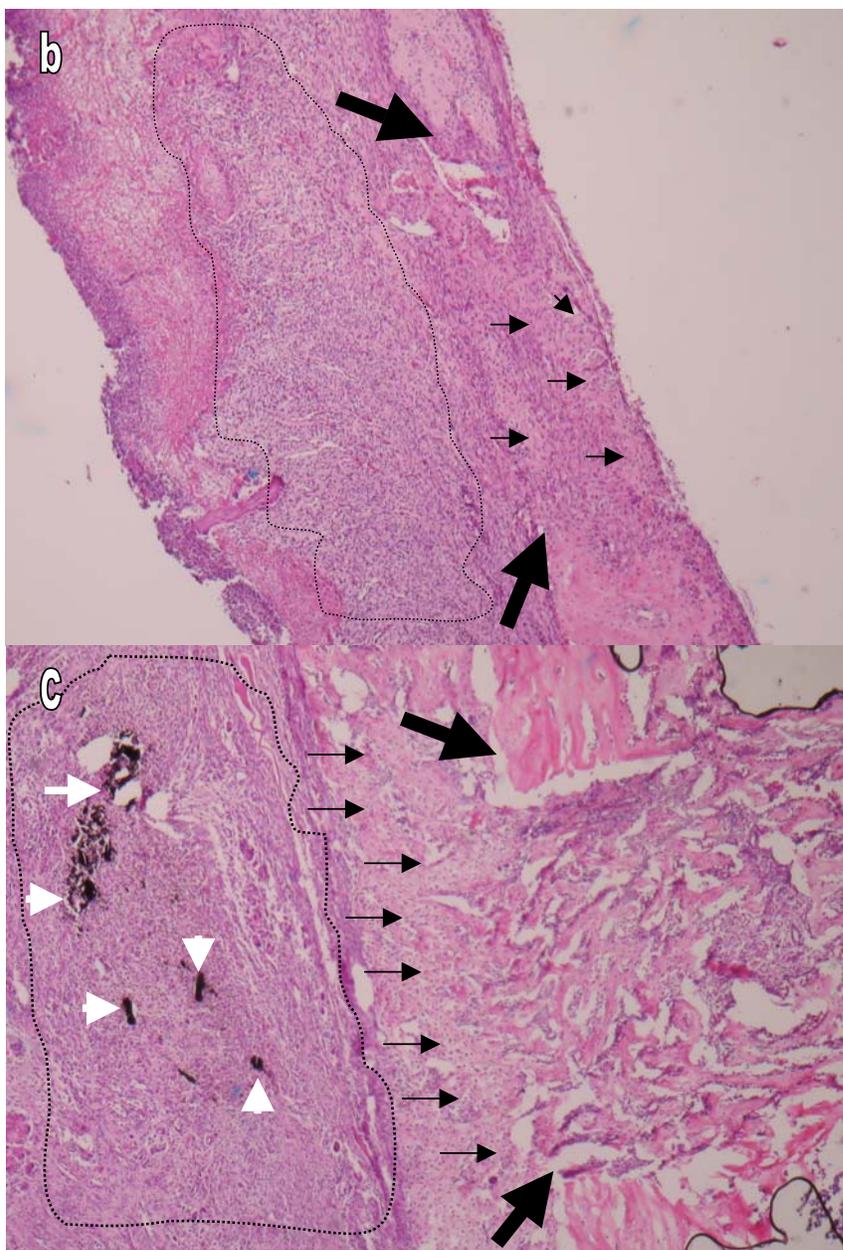


Figura 7-14: Fotomicrografias das regiões implantadas com a) controle b) colágeno c) compósito COOH - As setas menores indicam a área de ossificação, as setas maiores indicam os limites do defeito ósseo, As setas brancas indicam o colágeno:nanotubo carboxilado, a área delimitada indica o tecido conjuntivo com intenso infiltrado inflamatório.

O resultado da histologia da implantação dos nanotubos em defeitos ósseos na calvária de ratos, em inferência aos dados preliminares, apresenta um problema em relação ao tempo no qual o material permaneceu implantado, uma vez que em a

avaliação em um período apresenta grandes áreas de inflamação. O ideal seria avaliar o mesmo procedimento em período mais posterior quando a ossificação estaria mais avançada e haveria menos inflamação.

A impressão é que a área de inflamação e também a área de formação óssea aumentam com a colocação do nanotubo. No controle tem também área considerável de ossificação, mas a formação parece mais desorganizada e menor que nos outros grupos.

Referências bibliográficas

- 1 Glimcher m.j, et al.. *Reviews of modern physics*; **31**(2): 359-393 (1959)
- 2 Christoffersen J, et al.. *Anatomical Record*; **230** (4): 435-450 (1991)
- 3 Almeida J. M. A., et al..*Revista Brasileira de Engenharia Biomédica*; **18**(3): 133-139 (2002)
- 4 Ikoma S.Y.T., et al.. *Materials letter*; **60**: 999-1002 (2006)
- 5 Murugan R. et al.. *Applied physics letter*; **88**: 193124 (2006)
- 6 Zhao B., et al.. *Chem. Mater*; **17**: 3235-3241 (2005)
- 7 S. Kannan, A. F. Lemos, et al.. *Chem. Mater*; **18**: 2181-2186 (2006),
- 8 Kikuchi M., et al.. *Review Composites Science and Technology*; **64**: 819–825(2004)

8. Conclusão

Neste trabalho, estudamos a incorporação de NTC em matrizes de colágeno para a obtenção de um biocompósito para reparação óssea. O primeiro passo para a obtenção deste compósito é a extração do colágeno e a síntese de NTC em larga escala.

Para a síntese dos NTC foram estudados diversos catalisadores suportados em matrizes cerâmicas, entre eles o que mais se destacou pela produção de grandes quantidades de NTC por deposição química da fase vapor foi o catalisador de Fe:Mo/MgO. Este catalisador é um material multifásico que após processo de calcinação a temperaturas na faixa de 500 à 750°C é composto pelas fases $Fe_{1-x}Mg_xO$ e $MgFe_2O_4$. Na faixa de temperatura acima descrita este catalisador produz NTPM. Em temperaturas na faixa de 775 a 900°C observamos que a fase sólida $Fe_{1-x}Mg_xO$ se decompõe em MgO, $MgFe_2O_4$ e $Fe_{1-x}Mo_xO_y$ gerando nanopartículas de Fe com diâmetro menores que 20 nm. Nesta faixa de temperatura são produzidos NTPS. O processo de produção de NTC via CVD possui grande eficiência para produção de NTPS ou NTPM. Este processo permite gerar até 5,0 g de CNT os quais após processos de purificação resulta em no mínimo 2,5 g de nanotubos de carbono com pureza de 96%. Nesta tese, NTPS foram sintetizados via arco elétrico utilizando catalisadores de C/Ni/Y e C/Co/Ni. Os NTC gerados neste processo apresentam se em feixes, com diâmetro de aproximadamente 1,4 nm e com baixo conteúdo de carbono amorfo como impureza majoritária que após processos de purificação atinge índice de pureza de até 99% .

Os NTC sintetizados no laboratório foram submetidos a vários processos de funcionalização química visando aplicações biológicas específicas.

Todas as funcionalizações demonstraram grande eficiência de solubilização dos NTC, cuja solubilidade variou entre 0,1 a 0,8 mg/ml, sendo os de maior solubilidade os NTC-L-alanina e os de menor os NTC fosfonados. Os processos de funcionalização com alto poder oxidativo deixam os NTC mais curtos e fracamente funcionalizados. Estes NTC picotados podem ser funcionalizados com biomoléculas e foi demonstrado que estes são eficientes carreadores intracelulares.

O processo de extração de colágeno de tendões da cauda de ratos resultou em um gel de colágeno e água constituído de arranjo em tripla hélice com uma concentração entre 2 e 5 mg/ml.

O compósito aqui desenvolvido foi obtido pela mistura simples entre colágeno e NTC diluído em água que após processo de secagem por liofilização se torna um biomaterial nanoestruturado. Verificamos que, quanto maior a quantidade de NTC acrescentada ao colágeno, maior a estruturação do material. Foi possível notar grande alteração do tamanho dos poros, sendo que estes diminuem com o aumento da concentração de NTC. Podemos concluir que os NTC agem como reforço na matriz de colágeno proporcionado a ele, maior temperatura de desnaturação passando de 50°C no colágeno para 85°C no compósito; proporciona maior resistência mecânica tornando o compósito pelo menos duas vezes mais resistente do que o colágeno. Observamos também que uma maior concentração de NTC no compósito aumenta a estabilidade deste em meio aquoso.

Experimentos de mineralização mostraram que a imersão dos NTC, colágeno e biocompósitos em solução composta de íons cálcio e fosfato promovem uma indução seletiva de formação de HAp sobre estes novos arranjos fibrilares. Sendo que a partir de uma semana já é possível observar pequenas formações cristalinas sobre estes materiais e em quatro semanas, eles se apresentam com as fibras totalmente cobertas com HAp.

Estudos de toxicidade e biocompatibilidade apresentaram resultados que qualificam os NTC e os compósitos para utilização em aplicações biológicas. Testes *in vivo* mostraram que o compósito com NTC-P se mineralizam dentro do organismo, não provocando reações inflamatórias prejudiciais, porém não é possível concluir se ocorre osteointegração no implante. A osteoindução em implantes de colágeno e compósito na calvária de ratos segue aparentemente a seguinte ordem de formação óssea: Controle < colágeno < compósito. A análise histológica de secção da calvária apresentou uma extensa área de inflamação para todos os implantes este resultado indicou apenas que a biomineralização foi maior implantes com NTC.

O biocompósito colágeno: NTC foi capaz de promover a osteoindução e mineralização de estruturas extra e intracorpóreas.

A. Anexo

1. Caracterizações utilizadas

Diversas técnicas foram utilizadas para a caracterização das amostras obtidas, conforme descrito a seguir:

1.1. Microscopia de força atômica.

Utilizou-se microscópio Nanoscope IV (Veeco) do Laboratório de Nanoscopia do Depto. de Física da UFMG para a realização de imagens microscopia de força atômica no modo intermitente (*tapping mode*). Esta técnica foi utilizada para a caracterização rápida e direta das amostras de NTC depositados sobre substratos, incluindo a análise estatística do seu diâmetro e comprimento.

Preparação das amostras:

Para preparar as amostras deve ser feita uma solução aquosa de nanotubos funcionalizados com baixa concentração centrifugada à 7000 RPM durante 30 min. (a solução deve ficar com aspecto acinzentado).

Os substratos devem ser tratados para ficarem hidrofílicos, para isto é utilizada uma solução de aminopropildisilane 0,1 M, em substratos previamente limpos com banho de acetona e álcool isopropílico, cada um com duração de 5-10 min em ultra-som. Os substratos devem ficar imersos na solução amina por 5 min e secos com um sopro de gás inerte. Os substratos de silício ou mica que foram recobertos com amina e os que não foram utilizados no momento devem ser lavados com álcool isopropílico, quando forem utilizados. Para isto, os substratos devem ficar mergulhados por aproximadamente 5 min e depois disso devem ser secos por um sopro de gás inerte. A amostra deve ser preparada imergindo o substrato na solução de NTC por 20 minutos e posteriormente mergulhados em água deionizada para lavar. Logo após, os substratos com nanotubos devem ser secos em estufa à 120°C por 30 min. Outra forma de se preparar as amostras é colocar gotas da solução de NTC sobre o substrato e secá-los em estufa a 120°C por 30 min. As amostras de nanotubos curtos foram preparadas dispersando-os em água por ultra-sonificação por aproximadamente 30 minutos. A solução foi então ultracentrifugada por 5 minutos a

13.900 rpm e o sobrenadante depositado sobre mica clivada e seca à estufa a 70°C por 12 horas. As imagens de AFM foram feitas no modo contato intermitente.

1.2. Microscopia eletrônica de varredura.

A Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) foi utilizada rotineiramente para a obtenção de imagens das amostras produzidas, principalmente das amostras de nanotubos sintetizados sobre suporte de óxido. Em geral, para facilitar a visualização, as amostras eram recobertas com uma fina camada de ouro (~20 nm) usada para aumentar o contraste. Utilizou-se o modo de elétrons secundários, com a energia do feixe incidente variando de 15 a 30 kV. O MEV foi feito em um equipamento JEOL 840 A.

Preparação das amostras:

Em suporte apropriado devem ser coladas fitas dupla-face de carbono ou outro material condutor, e colocado sobre elas um pouco de NTC. Em algumas amostras é necessário colocar sobre a amostra uma camada de ouro para melhorar o contraste. Esta camada deve ser fina o suficiente para não promover interferência na topografia da amostra. Geralmente é colocada uma camada de alguns angstroms (Å).

1.3. Espectroscopia Raman

A espectroscopia Raman foi utilizada para a rápida identificação da qualidade das amostras de NTC. Um espectro típico de uma amostra de NTC possui em geral duas bandas bem características: a banda G, centrada em cerca de 1580-1590 cm^{-1} , associada a modos de vibração tangencial da grafite, e a banda D centrada em cerca de 1530 cm^{-1} , associada a defeitos e/ou desordem. A análise da forma, posição e intensidade relativa destas bandas permite a identificação da presença de NTPU e/ou NTPM bem como o grau de impureza (carbono amorfo) e/ou defeitos nas amostras. Além disso, o espectro Raman de NTPU apresenta um modo de vibração radial na região de 100 a 400 cm^{-1} . A energia deste modo é inversamente proporcional ao diâmetro dos nanotubos, o que permite a estimativa do diâmetro dos mesmos. O espectro Raman foi obtido usando laser de argônio com comprimento de onda 514 nm em um espectrômetro com três grades de reflexão (DILORXY) ver anexo o detalhamento sobre a técnica.

Preparação das amostras:

Uma porção dos NTC deve ser colocada sobre uma lâmina de micrografia, de tal forma que a superfície superior tenha seções planas. Para isto, pode-se utilizar uma outra lâmina para prensar, fazendo uma espécie de sanduíche e retirá-la logo em seguida. De outra forma, pode ser feita uma solução saturada com álcool isopropílico e pingar gotas sobre a lâmina, deixar secar e fazer as medidas.

1.4. Análise termogravimétrica

As técnicas de análise termo-gravimétrica (TG), e análise térmica diferencial (DTA) também foram utilizadas para a caracterização das amostras de NTC. Estas técnicas (TG e DTA) permitem quantificar as formas de carbono presentes nas amostras e impurezas. Na técnica de termogravimetria (TG) as curvas de aquecimento variam de 20 a 800°C, com uma taxa de 10°C/min, em atmosfera de ar seco.

Preparação das amostras:

Devem ser pesadas de 0,5 a 3 mg de NTC e colocados dentro de cadinhos de alumina apropriados para o equipamento.

1.5. Espectroscopia na infravermelho (modo transmissão).

A Espectroscopia de Infravermelho foi utilizada para a rápida identificação das funcionalizações em amostras de NTC. Os espectros de infravermelho foram obtido pelo espectrômetro FTIR da marca Nicolet-Nexus 470 equipado com um microscópio, fonte de SiC, divisor de feixe KBr e detector MCT. As amostras foram medidas no intervalo de frequência de (400-4000) cm^{-1} , com resolução espectral de 4 cm^{-1} e 64 scanners.

Preparação das amostras:

Devem ser pesados 150 mg de KBr e 10 μg de NTC e macerados em um pilão com temperatura maior que a ambiente $\sim 45^\circ\text{C}$ para não haver adsorção de água até obter mistura homogênea. Esta mistura deverá ser prensada em um pastilhador com pressão de $\sim 5\text{ATM}$. Deve-se tomar cuidado para que a pastilha tenha a mesma espessura em toda a secção e que não tenha manchas brancas ou negras, isto é, as pastilhas devem ser totalmente transparentes a luz visível ou ter um aspecto um pouco acinzentado.

Também pode ser utilizado substrato de silício intrínseco <111>, transparente aos raios infravermelhos. Para isto, o substrato deve ser limpo com acetona para desengordurar e álcool isopropílico para tirar outros resíduos, ambos com banho em ultra-som de 5-10 min, e secos com um sopro de gás inerte.

A utilização do substrato para preparação da amostra é dada da seguinte forma:

O substrato é colocado sobre uma chapa aquecedora com temperatura de ~150°C e sobre ele uma gota de solução de NTC previamente preparada. Podem ser colocadas no mesmo substrato várias amostras. Porém, deve-se tomar cuidado com contaminações cruzadas, que podem ocorrer caso sejam usados o mesmo conta gota ou a mesma ponteira de micropipeta para diferentes funcionalizações sem a lavagem apropriada, ou se no substrato for colocada uma gota sobre a outra ou elas se interceptarem. A contaminação também pode ocorrer durante a suspensão quando forem utilizados recipientes plásticos, de poliacrilato ou outros que soltam resíduos quando ultra-sonificados.

1.6. Microscopia eletrônica de transmissão

A Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET) foi feita em amostras diversas de NTC para verificar sua morfologia. O MET foi realizado no Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (LNLS-Brazil) com 300 kV HRMET (JEM 3010 URP).

Preparação das amostras:

As amostras para análise foram preparadas pela professora Karla Balzuweit e pelo professor André S. Ferlauto do Departamento de Física da UFMG através de ultra-sonificação colocando o nanotubo de carbono em etanol e colocando algumas gotas da solução em uma grade de carbono de “lacey” comercial.

1.7. Preparação de amostra para medida de solubilidade.

Deve ser feita uma solução supersaturada de NTC agitando em ultra-som por meia hora ou até que a solução esteja bem dispersa. O recipiente onde a solução foi ultra-sonificada deve ficar em repouso por 8h aproximadamente. A solução deve ser retirada sem que os nanotubos precipitados ressuspendam. A solução deve ser quantizada para estabelecer o percentual entre soluto e solvente. Os detalhes da medida foram descritos no capítulo referente à funcionalização.

B. Anexo

1. Toxicidade

A utilização de NTC em aplicações biológicas tem sido objeto de estudo de vários grupos de pesquisa, onde em qualquer uma delas sua funcionalização é crucial. Existem basicamente quatro áreas onde os NTC podem ser utilizados de forma relevante na engenharia de tecidos. Como marcador de células, comportamento sensitivo de células, amplificador de atividade celular, matriz de crescimento de tecidos.

Os NTC quando colocados em compósitos os modificam fazendo com que a resistência à tensão deste seja substancialmente aumentada. Esta característica viabiliza seu uso em implantes in vivo, como matriz reparadora de músculos, ossos e outros tecidos. Os NTC também são propensos a formação de hidroxiapatita (HAp), o principal componente dos ossos. Os nanotubos funcionalizados podem auxiliar o colágeno durante a mineralização dos tecidos, favorecendo a cristalização de HAp sobre o implante e restaurando o tecido ósseo. Por isso, é importante explorar este assunto completamente tanto em relação à sua estrutura quanto aos efeitos tóxicos deste novo material em relação aos seres vivos.

Nós começamos ilustrando o uso potencial dos nanotubos em dispersões e a sua posterior utilização em compósitos de colágeno e NTC. Porém, o manuseio deste material é de suma importância e os trabalhos relacionado ao sistema respiratório realizados por Julie Muller¹ et.al. intitulado: *Respiratory toxidade of carbon nanotubos: How worried should we be?* mostra que é possível determinar partículas inaladas dentro do pulmão, principais aquelas indutoras de toxicidade. Os primeiros estudos realizados examinaram a toxidade respiratória de NTC em cobaias. Os resultados indicam que a presença de NTC nos pulmões pode exercer uma toxicidade séria, manifestada entre as cobaias, como reação inflamatória e fibrótica. Estes estudos mostram que em prol da saúde humana devem ser usadas medidas preventivas e protetoras estritas. O estudo de H. Grubek-Jaworska e colaboradores em *Preliminary results on the pathogenic effects of intratracheal exposure to one-dimensional nanocarbons*² também mostra que a inalações de nanotubos pode causar uma resposta inflamatória do pulmão. A exposição a soluções contendo NTC

administradas no tecido do pulmão causou pneumonia em todas as cobaias vindo comprovar o primeiro estudo aqui citado.

Nas áreas biomédicas os NTC apresentam um outro grande desafio, a biocompatibilidade³. Para os nanotubos serem usados com sucesso para implantes biomédicos, biosensores, transporte de drogas e vacinas é necessário conhecer sua compatibilidade biológica. Diversos biomateriais compostos de carbono tem demonstrado excelente biocompatibilidade e grandes vantagens em aplicações em dispositivos biomédicos. Entretanto, no caso dos NTC e fullerenos, tem sido agregada uma alta toxicidade em testes in vivo³. Porém, poucos estudos foram realizados até o momento nestes tópicos e os trabalhos já existentes mostram-se não conclusivos e até mesmo contraditórios. É interessante notar que, segundo alguns trabalhos preliminares, os nanotubos puros apresentam toxicidade in vivo e in vitro, enquanto os NTC quimicamente funcionalizados apresentam uma boa compatibilidade biológica³. A citotoxicidade do NTPS é observada, geralmente, através de teste com macrófago alveolar (AM) após uma exposição de 6 h in vitro. A citotoxicidade aumenta com o aumento de dose de NTPS. A citotoxicidade segue aparentemente uma ordem da seqüência em uma base maciça: NTPS > NTPM 10 > quartzo > C60. Os nanomateriais de carbono com estruturas geométricas diferentes exibem uma citotoxicidade e uma bioatividade completamente diferentes in vitro, embora não possam exatamente ser refletidos na comparação da toxicidade in vivo.

Por outro lado no trabalho de Singh R e colaboradores⁴ foi verificado que os NTC não apresentam toxicidade e não permanecem retidos no sistema sanguíneo. O autor diz que a maioria das aplicações clínicas possíveis indica a compatibilidade dos NTC, porém ainda existem aspectos a serem explorados. Neste trabalho, o autor mostra que os CNT solúveis em água funcionalizadas com um radiotraçador aplicados em uma via intravenosa não ficaram confinados em nenhum órgão do corpo (fígado) sendo excretado por via urinária em um período (meia vida) de três horas, o que evidencia um potencial uso clínico dos NTC em aplicações terapêuticas e de diagnósticos.

O trabalho de J. Chłopek a et. al⁵ mostra testes celulares que foram realizados para estudar o biocompatibilidade dos NTPM. A viabilidade dos fibroblastos, dos osteoblastos e das concentrações do osteocálcio em culturas de osteoblastos na presença dos nanotubos foi examinado, bem como, o grau de estimulação das células,

baseado na quantidade de tipo de radicais livres liberado do colágeno e do oxigênio. O aumento da viabilidade das células examinadas no contato com os nanotubos provocou um aumento ligeiro da formação do colágeno e a redução de indução de radicais livres. Estes resultados mostram que os NTC têm uma boa biocompatibilidade.

Os NTC têm sido utilizados, também, como carreador de substâncias para dentro da célula na transfecção celular. Para exercer esta função várias proteínas adsorvem aos NTC espontaneamente e são transportadas para dentro das células com os NTC funcionalizados, como em um transporte via fagocitose. Estando dentro da célula, os conjugados de proteína-nanotubos podem atuar no citoplasma das células e executar funções biológicas. A resposta desta função é geralmente evidenciadas pela indução da apoptoses por NTC transportados do citocromo C.

Nossos NTC passaram por alguns testes biológicos. Neles foram verificadas a biocompatibilidade, a transfecção celular, transporte de oligonucleotídeo para inibição de apressórios, entre outros. Estes testes foram realizados em colaboração com os pesquisadores do Departamento de biologia e tornaram-se objeto de estudo de outros alunos e originarão duas dissertações, uma no Departamento de Morfologia, outra no Departamento de Fisiologia e uma tese no Departamento de Morfologia.

1.1. Efeito da adição de nanotubos na viabilidade celular em uma cultura de macrófagos murinos.

A toxicidade dos NTC foi estudada com a utilização da técnica de avaliação da viabilidade celular por MTT (*3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide*). O MTT é utilizado como indicador da viabilidade celular através de sua redução dependente do metabolismo mitocondrial, gerando cristais de Formazan no interior das células.

Para este ensaio são utilizados camundongos com 12 semanas os quais são inoculados com solução de tioglicolato de sódio para estimular a migração de macrófagos para a cavidade peritoneal, de onde são retirados, diluídos em meio de cultura, centrifugados e ressuspensos em meio de cultura com concentração 2×10^6 células por mL. A seguir, estas células são distribuídas em placas de ensaio com 96 poços e levados à estufa para a adesão das células. Após um tempo mínimo de 3 horas, as placas foram lavadas duas vezes com meio de cultura para remoção de

células mortas ou não aderentes. Depois desta etapa, o meio cultura é adicionado nos poços com concentrações variadas NTC, uma parte dos poços e preenchida sem a presença de NTC como forma de controle. Estas placas preparadas são incubadas em estufa de CO₂ por 24 e 48h, depois deste período as placas são novamente lavadas com meio de cultura e preenchidas com solução de MTT diluído em meio de cultura. A placa é novamente incubada durante 4h, durante este período as células vivas metabolizam o MTT formando cristais de Formazan no interior das mesmas.

Para medir a viabilidade celular, a solução de MTT em meio de cultura é retirada dos poços e uma solução de duodecilsulfato de sódio (SDS) a 10 % em dimetilformamida e água (1:1) é usada para lavar os poços, lisar as células e dissolver os cristais de Formazan. As soluções obtidas com a lavagem dos poços são passadas para uma nova placa e levada a um leitor de ELISA (Emax, Molecular Devices) a 540 nm. Este leitor verifica comparativamente a concentração de Formazan proveniente dos poços incubados somente com os meios de cultura (controle) e dos poços que foram incubados com NTC. Quanto maior a quantidade de Formazan maior a sobrevivência das células isto é maior a viabilidade celular. A figura B-1 mostra histogramas de sobrevivência de células para NTPS e NTC purificados e funcionalizados. A diferença entre o meio e o veículo e a adição de antibióticos.

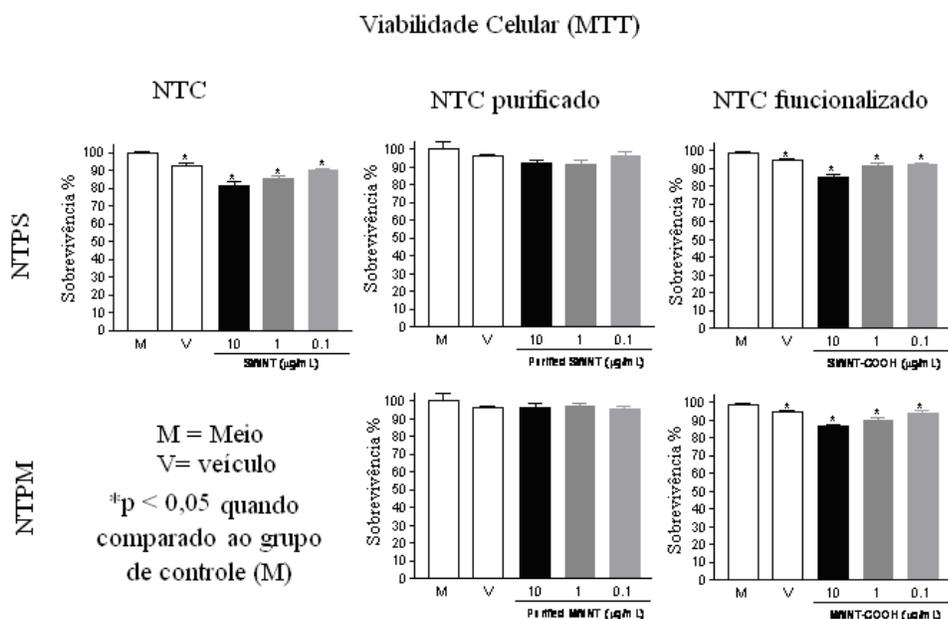


Figura B-1: Viabilidade celular.

Estes dados mostram que a toxicidade dos NTPM é muito parecida com a dos NTPS quando funcionalizados. Quando são comparados os NTPS e os NTPM purificados verifica-se que os NTPM são menos tóxicos que os NTPS e que os CNT purificados também são menos tóxicos que os NTC funcionalizados.

Os gráficos de viabilidade de macrófagos peritoneais cultivados com os esses nanotubos (figura B-1) mostram que a toxicidade dos NTC é dose dependente e estes são tóxicos nas doses mais altas.

O método MTT, apesar de ser o método mais utilizado para medir a viabilidade celular, não é o melhor método de medir sobrevivência de células em contato com NTC. Os NTC interagem com o sal tetrazolium e esta interferência não afeta a reação enzimática, mas mascara a solubilidade do Formazan⁶. Portanto, este resultado dá uma estimativa qualitativa da viabilidade, mas não pode ser o único meio de certificação desta viabilidade.

1.2. O efeito dos nanotubos de carbono em soluções para proliferação de osteoblastos e produção de fosfatase alcalina

Para verificar o efeito dos NTC em soluções para proliferação de osteoblastos e produção de fosfatase alcalina são utilizados osteoblastos isolados de calvária de ratos Wistar recém nascidos. Estas células são colocadas em contato com os NTC em placas com 96 poços e são incubados por 72 horas em estufa de CO₂. Para efeito de comparação cada 3 poços recebem 10 mg/l de NTC em meio de cultura e três poços são preenchidos sem a presença de NTC (controle). Após este período é possível analisar a viabilidade celular e a capacidade de separação de colágeno e fosfatase alcalina via MTT.

No histograma mostrado na figura B-2, podemos observar que a formação de fosfatase alcalina em culturas de osteoblastos foi menor do que o controle para NTC funcionalizados com ácido nítrico e sulfúrico e para os NTPS-COOH. As demais amostras de NTC funcionalizados apresentaram produção similar ao meio de controle, indicando que as células não perdem suas funções metabólicas quando entraram em contato com os NTC.

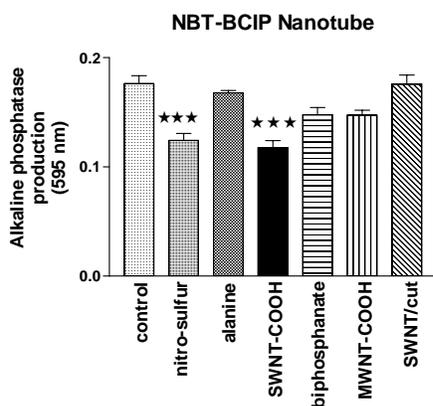


Figura B-2: Produção de fosfatase alcalina em culturas contendo NTC

A proliferação de osteoblastos foi verificada via MTT. No histograma ilustrado pela figura B-3 podemos observar que os osteoblastos proliferaram em soluções contendo diferentes tipos de NTC funcionalizados sem grandes diferenciações quando comparado com a proliferação em meio fisiológico de controle. No entanto, a proliferação de osteoblastos é um pouco maior nos NTPS-picotados. Este resultado indica que a viabilidade celular não foi alterada na presença de nenhum dos NTC funcionalizados e houve uma alta proliferação de osteoblastos na presença de NTC.

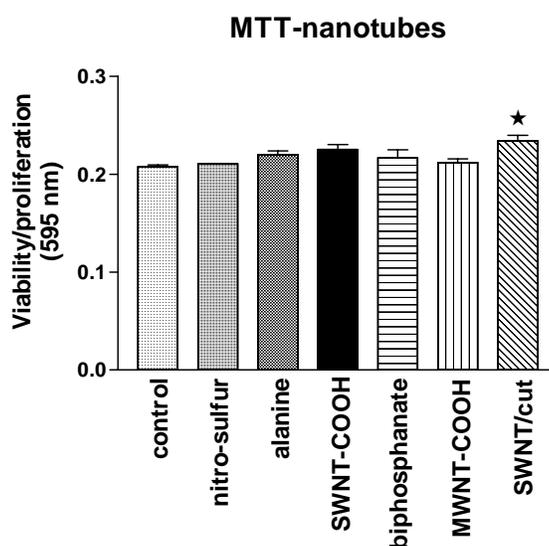


Figura B-3: Proliferação de osteoblastos

No histograma da capacidade de secreção de colágeno em meio de cultura mostrado no figura B-4, verificamos que os osteoblastos na presença de NTC têm uma produção de colágeno mais alta do que o controle para os NTPM

funcionalizados com carboxila, sendo que os demais NTC tem uma produção de colágeno similar ao meio de cultura.

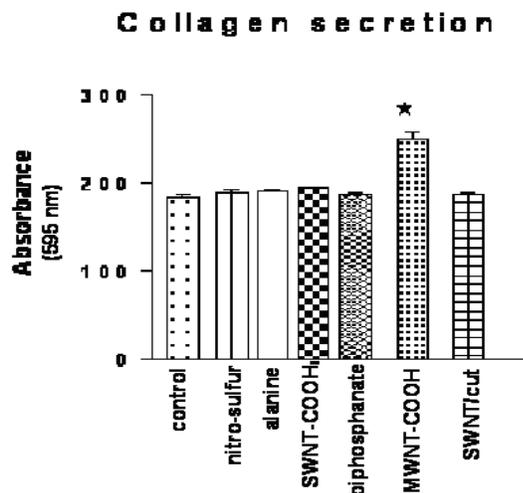


Figura B-4: Secreção de colágeno.

Podemos concluir através estes resultados que os osteoblastos na presença dos NTC mostram uma alta proliferação de colágeno quando comparado ao controle. Além disto, os NTC não afetam produção de fosfatase alcalina de modo drástico. Com isto, os NTC podem ser considerados não tóxicos a proliferação de osteoblastos, uma vez que estas células proliferam em soluções contendo NTC funcionalizados.

1.3. Cultura de osteoblastos

Um experimento piloto, de proliferação de osteoblastos sobre colágeno e compósitos, foi realizado pela professora Tarcila do Departamento de Odontologia. Para realização deste experimento foram utilizadas 4 amostras e um controle. Os materiais foram colocados em placas com 24 poços. Três poços foram separados pra proliferação de osteoblastos usando somente meio de cultura, e os demais poços foram distribuídos entre as quatro amostras (colágeno, compósito COOH, compósito fosfonado e compósito com NTC picotados). Este teste nos dá uma visão geral, mas não é conclusivo devido a parâmetros que ainda não tinham sido estabelecidos para realização da cultura de osteoblastos sobre compósitos.

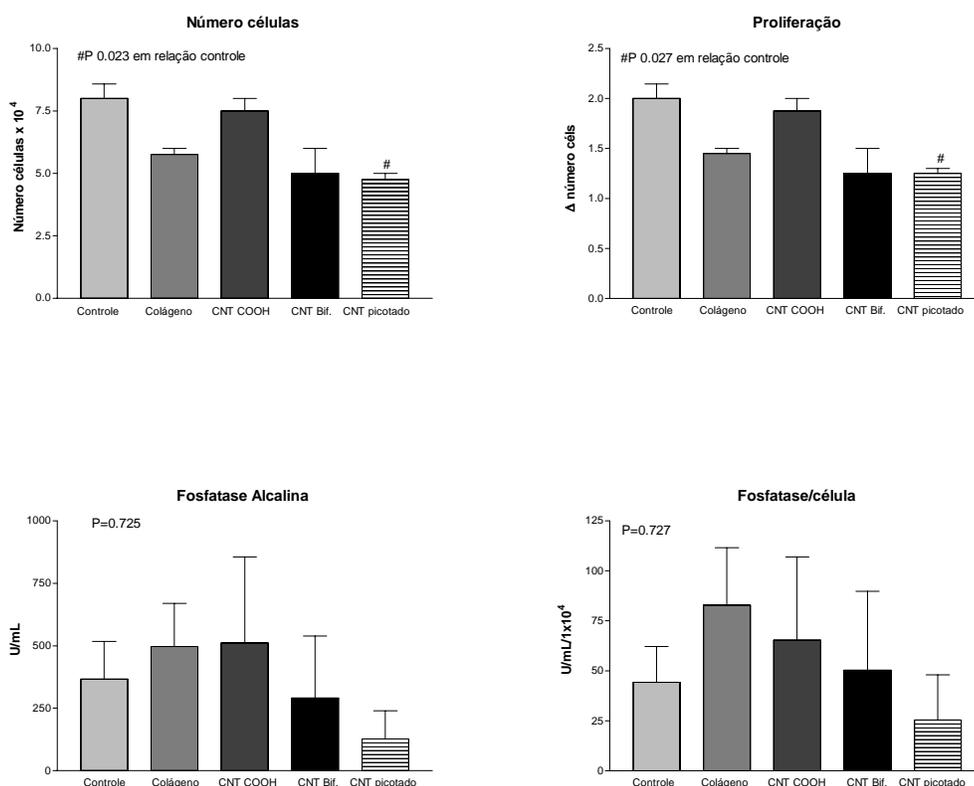


Figura B-5: Histogramas de proliferação celular e produção de fosfatase alcalina por osteoblastos.

Nestes resultados podemos observar que o número de células de todos os compósitos foram inferiores ao do controle e o nível de produção de fosfatase alcalina foi superior ao controle. Isto indica que houve uma mudança no metabolismo celular fazendo com que poucas células produzissem uma quantidade excessiva de fosfatase alcalina. Como a fosfatase alcalina esta envolvida no processo de calcificação óssea, esta alteração pode auxiliar na reparação óssea quando este material é implantado.

1.4. Transfecção de nanotubos de carbono funcionalizados com si-RNA1

O experimento de transfecção celular foi realizado pela mestrandia Marina Ladeira do Departamento de Fisiologia do ICB sob orientação da Professora Silvia Carolina. Neste experimento visa a formação do RNAs em ~22 fragmentos de nucleotídeos pelo RNA que ativam uma seqüência específica de RNAi. Esses pequenos RNAs são usados como guia na seleção e clivagem de mRNA

complementar através de sua incorporação ao complexo efetor do RNAi, denominada RISC^{7,8} para pesquisas biológicas e para terapias benéficas⁹.

Para que esse processo ocorra, é necessário que o RNAi penetre dentro da célula de maneira eficaz, sem alterar a viabilidade celular e isto só é possível através de agentes de transfecção. Diversos pesquisadores sugerem que NTC podem penetrar dentro das células de mamíferos e carrear consigo diversas moléculas biológicas, entre elas peptídeos, proteínas e ácidos nucleicos, sem causar citotoxicidade aparente¹⁰. Deste modo, o objetivo do presente trabalho é verificar se NTC são eficientes no carregamento intracelular de siRNA em células de mamíferos sem causar citotoxicidade celular.

Para a preparação do experimento foram preparadas soluções com 0,25 mg de NTC picotados suspensos em 1 mL de água milliQ. A suspensão foi sonificada durante três horas e posteriormente centrifugada á 13.000 RPM durante 15 minutos a fim de remover impurezas e grandes aglomerados de NTC que se agregam como sedimento. O Complexo siRNA – NTC foi preparado utilizando 50 nM e 100nM de siRNA para InsP₃ R (Receptor de Inositol 1,4,5 tri-fosfato) e foram adicionados á 100 µL da solução de NTC. O complexo foi sonificado durante 30 minutos.

O InsP₃R é um canal de cálcio que libera cálcio intracelular em resposta ao InsP₃. Essa sinalização de cálcio é utilizada em diversos processos em resposta á hormônios, fatores de crescimento e neurotransmissores, assim como em variados sistemas sensoriais de vertebrados, como olfato, paladar e visão.

Para realização da transfecção celular foram cultivadas células Sk-Hep 1 em meio de cultura e colocadas em placas de cultura de seis poços, A estes poços foram adicionados 100 µL do complexo siRNA – NTC e posteriormente as células foram encubadas durante 48h em estufa a 37°C em estufa de CO₂.

As células SK-Hep 1 são células imortalizadas, retiradas de um adenocarcinoma de fígado isolado de um humano caucasiana do sexo masculino, idade 52 anos.

A eficiência da transfecção foi analisada pela técnica de Imunofluorescência. Esta técnica consiste na detecção da reação de antígenos com anticorpos utilizando uma substância fluorescente ligada a um anticorpo anti-imunoglobulina especifica para a espécie do soro, que revela a reação.

Geralmente a substância utilizada é a fluoresceína ao anticorpo anti-imunoglobulina. Quando colocamos o soro em contato com o antígeno, caso existam anticorpos contra aquele antígeno, haverá a ligação. Quando adicionamos o anticorpo anti-imunoglobulina ligado à fluoresceína, este irá se ligar aos anticorpos. Caso a reação seja positiva, aparecerá uma reação brilhante do antígeno; caso seja negativa, os anticorpos ligados à anti-imunoglobulina serão lavados, não aparecendo fluorescência.

As análises IMF consiste em fixação das células, incubação com anticorpo primário (anti- InsP₃ RII) e, incubação com anticorpo secundário. As células foram analisadas em microscopia de confocal. A figura B-6 mostra que a quantidade de proteína dentro da célula indicada pela escala abaixo da figura.

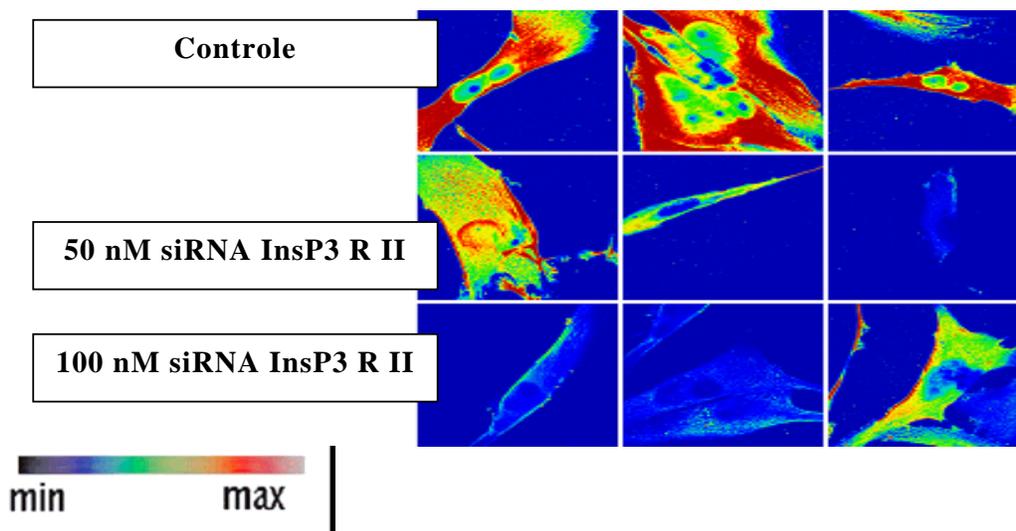


Figura B-6: IMF em células SK-Hep 1 para InsP₃ R III. NTC Picotado adicionados á diferentes concentrações de siRNA funcionam como um eficiente agente de transfecção.

Este resultado indica que os NTC picotados funcionam como eficiente agente de transfecção, sendo que quanto maior a concentração de sRNA transfectada, menor a quantidade de proteína intracelular, o que é demonstrado pela diminuição da fluorescência. Quanto menos proteína existir dentro da célula menor a reação antígeno anticorpo. A redução de proteína é causada pela fragmentação do mRNA e pela inibição da síntese protéica para células tratadas com siRNA.

1.5. Novo método de transporte em células usando nanotecnologia: Transporte SWNT cobertos por inf-24 em germinados tubos de Uromyces appendiculatus

O experimento de transporte de NTC funcionalizados com inf-24 em Fungos patogênicos de feijão foi realizado pelo Doutorando Leonardo Rodrigues sob orientação do Professor Ari Corrêa. Os fungos invadem seus hospedeiros após desenvolver uma série de estruturas especializadas de infecção, tais com a formação de apressório, um dos estágios cruciais no processo de infecção de muitas ferrugens¹¹. O gene Inf-24 é importante durante o desenvolvimento do apressório e estudos prévios demonstraram que microinjeção de oligonucleotídeos anti-senso inibem o desenvolvimento do apressório in *Uromyces*¹². Em geral, a adição de oligonucleotídeos diretamente nos meios de cultura não resultam em uma eficiente atividade biológica. Provavelmente os oligonucleotídeos são rapidamente degradados no soro in vitro, em fluidos biológicos em vivo e pela maioria das células por meio de clivagem por exonucleases.

Nós apresentamos aqui resultados de um novo método no qual os NTPS funcionalizados com inf-24 foram transportados pra dentro do tubo germinativo de *Uromyces appendiculatus*.

Para a preparação do experimento os NTPS, não funcionalizados foram misturados em 5,0 mL de água deionizada (ddH₂O) em ultra-som por 30 min. Aliquotas de 100 µl foi distribuída em tubos eppendorf e centrifugados a 10.000 rpm por 15 min. No tubo eppendorf foram adicionados 1.0 mL de 50 nM de oligonucleotídeos, agitado por 30 minutos em temperatura ambiente e centrifugado a 10.000 rpm por 15 min a 4°C. O sobrenadante foi coletado e transferido para outro tubo eppendorf contendo nanotubos de carbono e o procedimento foi repetido. Os tubos contendo NTPS funcionalizados com Inf-24 (NTPS-Inf-24) foram armazenados em um tubo e agitados em ultra-som por 30 min em temperatura ambiente e centrifugados a 10.000 rpm por 15 min a 4°C. O sobrenadante foi coletado em tubo eppendorf e alíquotas de 50, 25, 12.5 e 6.25 % (v/v) foram distribuídas em tubos, o volume foi completado para 1.0 mL e mantido a 4°C.

O transporte dos NTPS-Inf-24 em tubos germinados foi realizado utilizando uredosporos tratados com vapores de β-ionona, substância que inibe o sitio de ligação do auto inibidor de germinação da ferrugem. Este foi disperso sobre uma

membrana de poliestireno com topografia indutiva (com ranhuras de 0,5 μm) e humidificado com ddH₂O. Depois de seco, sobre a membrana foi aplicado 100 μl de NTPS-Inf-24 em concentrações de 50, 25, 12,5, 6,25 % (v/v) e incubado a 18°C por 5h. Foram utilizados para controle ddH₂O, NTC sem oligonucleotídeos e oligonucleotídeos Inf24S e Inf24RC. As membranas foram fixadas com paraformaldeído 4% e Glutaraldeído 2.5% em PBS e analisadas em Fotomicroscópio Olympus BX-41, onde foi contado o número de apressórios formados em 100 tubos germinados.

Tubos germinativos de urediniosporos de controle cresceram sobre substrato plástico e iniciaram a formação de apressório seguindo contato com topografia induzida como já foi apresentado anteriormente (Corrêa Jr.). Além disso, a eficiência da indução do apressório pelas ranhuras foi baixa (50%), talvez graças às profundidades irregulares da ranhura. Urediniosporos germinados tratados com diferentes soluções de nanotubos de carbono crescidos sobre substrato plástico mostraram eficiente desenvolvimento de apressório de 60% e 47%, respectivamente, SWNT e SWNT COOH, não apresentando diferença significativa entre esses e o controle, demonstrando que aqui não há toxicidade para células fúngicas como pode ser observado na figura B-7.

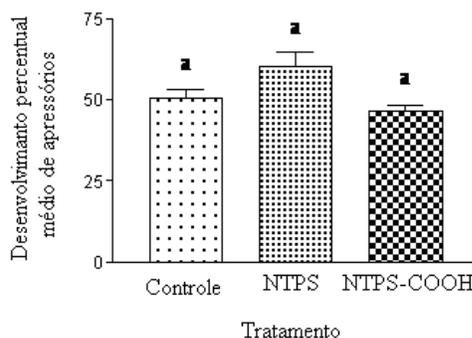


Figura B-7: Desenvolvimento percentual de apressórios em diferentes CNT.

Urediniospore germinados tratados com solução de Senso e anti-senso Inf-24 25 pM crescidos sobre substrato plástico desenvolveram apressório (dados não mostrados), apesar de que na solução de Oligonucleotídeos Inf-24 50 pM houve redução na formação do apressório, provavelmente graças à presença de resíduos de sódio da síntese. Oligonucleotídeos Senso Inf-24-SWNT não inibiu a formação do apressório em *U. appendiculatus* em nenhuma dose usada e o valor percentual médio

do tratamento não apresenta diferença significativa como pode ser observado na figura B-8.

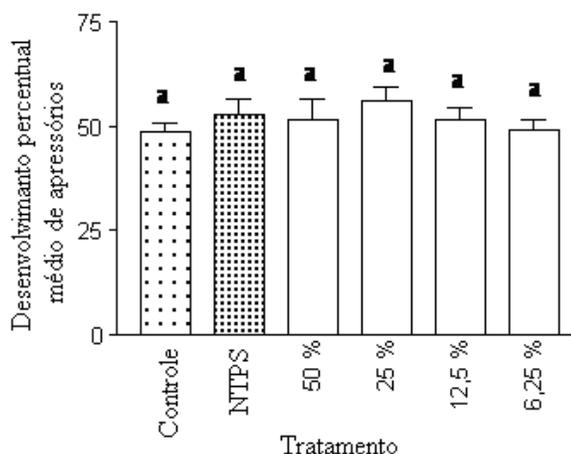


Figura B-8: Desenvolvimento percentual de apressórios em *U appendiculatus* tratados com NTC funcionalizados com inf24 s em diferentes concentrações.

Entretanto, foi observada uma resposta dose-dependente no tratamento com Inf24RC-SWNT nas doses usada figura e o valor percentual médio apresentam significativa diferença entre eles, controle e SWNT ($P < 0.05$). O conjugado SWNT-Oligonucleotídeo anti-senso Inf-24 na concentração de 6.25% (v/v) não inibe a formação do apressório e não teve significativa diferença entre ele e o controle, SWNT e Inf24S-SWNT. O conjugado Inf24RC-SWNT inibiu significativamente o desenvolvimento do apressório somente nas doses de 12.5, 25 e 50% (v/v) (figura B-9).

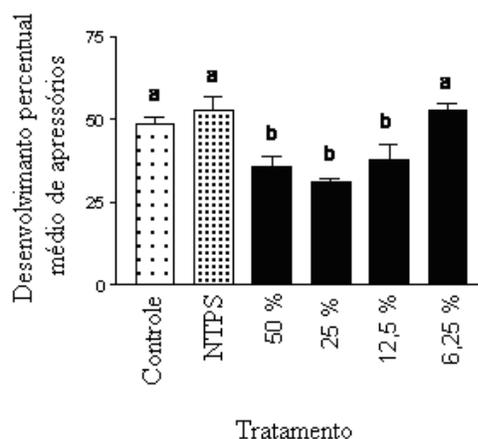


Figura B-9: Desenvolvimento percentual de apressórios em *U appendiculatus* tratados com NTC funcionalizados com inf-24 RC em diferentes concentrações.

Em síntese, o contato entre o urediniospore germinado e um substrato inerte indutivo provoca formação do apressório. Claramente, o conjugado Inf-24S-NTPS não teve efeito sobre a formação do apressório nos tubos germinados de *U. appendiculatus*, em concordância com Barja¹², quando microinjetando o inf-24 não se obteve efeito sobre o crescimento do germinados ou reação para o sinal indutivo para o desenvolvimento do apressório. O NTPS funcionalizado com o oligonucleotídeos anti-senso inf-24 causou efeito sobre o desenvolvimento do apressório, mostrando que o gene anti-senso forma bloco uma mudança morfológica que é induzida in *U. appendiculatus* quando injetada em uma célula fúngicas.

Este é o primeiro trabalho no qual foi mostrado que o NTPS-Inf-24 anti-senso sintetizados são transportados para dentro de células fúngicas e impedem uma mudança morfológica indutiva.

Em síntese, todos estes experimentos demonstram que os NTC produzidos no nosso laboratório não interferem na sobrevivência celular, uma vez que sua toxicidade é baixa além de serem bons agentes carreadores de RNA ou oligonucleotídeos.

Referências bibliográficas

- 1 Muller J, et al..*CARBON*; **44** (6): 1048-1056
- 2 Grubek-Jaworska H, et al.. *CARBON*; **44** (6): 1057-1063 (2006)
- 3 S. K. Smart, et al. *Carbon*; **44**: 1034 (2006)
- 4 Singh R, et al..*Proceedings Of The National Academy Of Sciences Of The United States Of America*; **103** (9): 3357-3362 (2006)
- 5 J. Chlopet, et al. *Carbon*; **44**: 1106 (2006)
- 6 Wörle-Knirsch, J.M. et al.. *Nanoletters*; **6**(6): 1261-1268 (2006)
- 7 Hannon, G.J. *Nature*; **418**: 244-251 (2002).
- 8 Sharp, P.A. *Genes.Dev*; **13**: 139-141 (1999).
- 9 Troy, C.M. *Neurosci*; **24**: 10040-6 (2004)
- 10 Dai, H. et al.. *J. Am. Chem. Soc*; **126**: 6850-6851 (2004)
- 11 Mendgen, K. et al. *Trends Plant. Sci*; **7**: 352-356 (2002).
- 12 Barja, F.; Corrêa Jr., et al..*Mycol.Res*; **102** (12): 1513-1518 (1998)