



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DA NATUREZA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA DE MATERIAIS

MARIA EDUARDA COLAÇO MESQUITA DA SILVA

**SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DE ÓXIDO DE GRAFENO E SEUS
COMPÓSITOS POLIMÉRICOS PARA REVESTIMENTOS ANTIBACTERIANOS EM
SUPERFÍCIES METÁLICAS DE TITÂNIO**

Recife

2024

MARIA EDUARDA COLAÇO MESQUITA DA SILVA

**SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DE ÓXIDO DE GRAFENO E SEUS
COMPÓSITOS POLIMÉRICOS PARA REVESTIMENTOS ANTIBACTERIANOS EM
SUPERFÍCIES METÁLICAS DE TITÂNIO**

Dissertação apresentada ao Programa de
Pós-Graduação em Ciência de Materiais
da Universidade Federal de Pernambuco,
como requisito parcial para obtenção do
título de mestre em ciência de materiais.
Área de concentração: Biomateriais.

Orientador (a): Giovanna Machado

Coorientador (a): Luzia Rejane Lisboa Santos e Rayane Cristine Santos da Silva

Recife

2024

.Catalogação de Publicação na Fonte. UFPE - Biblioteca Central

Silva, Maria Eduarda Colaço Mesquita da.

Síntese e caracterização de Óxido de grafeno e seus compósitos poliméricos para revestimentos antibacterianos em superfícies metálicas de titânio / Maria Eduarda Colaço Mesquita da Silva. - Recife, 2024.

65 f.: il.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Ciências Exatas e da Natureza, Programa de Pós-Graduação em Ciência de Materiais, 2024.

Orientação: Giovanna Machado.

Coorientação: Luzia Rejane Lisboa Santos.

Coorientação: Rayane Cristine Santos da Silva.

Inclui referências, anexos e apêndice.

1. Óxido de grafeno; 2. Revestimento; 3. Inibição de biofilmes. I. Machado, Giovanna. II. Santos, Luzia Rejane Lisboa. III. Silva, Rayane Cristine Santos da. IV. Título.

UFPE-Biblioteca Central

MARIA EDUARDA COLAÇO MESQUITA DA SILVA

**Síntese e caracterização de óxido de grafeno e seus compósitos poliméricos
para revestimentos antibacterianos em superfícies metálicas de titânio**

Dissertação apresentada ao Programa de
Pós-Graduação em Ciência de Materiais
da Universidade Federal de Pernambuco,
como requisito parcial para a obtenção do
título de Mestra em Ciência de Materiais.

Aprovada em: 29/05/2024

BANCA EXAMINADORA

Prof^a. Dr^a. Giovanna Machado (Orientadora)
Centro de Tecnologias Estratégicas do Nordeste



Documento assinado digitalmente
BEATE SAEGERSSER SANTOS
Data: 03/06/2024 21:58:20-0300
Verifique em <https://validar.itl.gov.br>

Prof^a. Dr^a. Beate Saegesser Santos (Examinadora Interna)
Universidade Federal de Pernambuco



Documento assinado digitalmente
CELIA MACHADO RONCONI
Data: 29/05/2024 21:29:29-0300
Verifique em <https://validar.itl.gov.br>

Prof^a. Dr^a. Célia Machado Ronconi (Examinadora Externa)
Universidade Federal Fluminense

AGRADECIMENTOS

Nesses dois anos de muito aprendizado, desafios, esforço e empenho, gostaria de expressar minha sincera gratidão a todas as pessoas que tornaram possível a conclusão desta dissertação. Agradeço primeiramente a Deus, aos meus pais, Sebastião e Ednalva e meu irmão Anderson por serem minha base e apoiarem todas as minhas escolhas e ideias. Gostaria de agradecer a minha orientadora Giovanna Machado pela oportunidade, todo o suporte e insights valiosos ao longo deste processo. As minhas coorientadoras Luzia e Rayane por todo o aprendizado que foi fundamental para o desenvolvimento deste trabalho.

Sou grata à minha família pelo apoio emocional e incentivo constante. Às minhas avós, Maria dos Anjos e Maria de Melo, aos meus tios e primos, suas palavras de encorajamento foram uma fonte de força durante os momentos desafiadores.

Agradeço a compreensão dos meus amigos Brena, Bruna, Larissa, Janyne, Thayssa, Jeann, Ítalo, Wagner e Alicia, que estiveram ao meu lado durante este ciclo, nos momentos bons e nas dificuldades, me proporcionando um ambiente leve.

Gostaria de agradecer ao CETENE, onde desenvolvi minha pesquisa. Aos pesquisadores que fazem parte do grupo da nanotecnologia por sempre se mostrarem dispostos a ajudar e tirar dúvidas. A todos os pesquisadores, servidores e profissionais que foram nos últimos dois anos fonte de aprendizado, apoio e amizade.

Por fim, gostaria de expressar minha gratidão a todas as fontes de inspiração, autores, pesquisadores e instituições cujo trabalho serviu como base para este estudo.

“Às vezes temos que fazer o trabalho mesmo que ainda não vejamos um vislumbre no horizonte de que isso realmente será possível.” (Angela Y. Davis).

RESUMO

A formação de biofilmes é reconhecida como a principal causa de infecções resistentes, incentivando o desenvolvimento de abordagens inovadoras na área da saúde. Estruturas antimicrobianas, como o grafeno, oferecem vantagens como baixa toxicidade, capacidade de superar resistência bacteriana e custos reduzidos. Este estudo teve como objetivo principal desenvolver e avaliar as propriedades biológicas do óxido de grafeno (GO) aplicado em placas de titânio previamente submetidas a ataque químico. Os revestimentos foram compostos por polimetilmetacrilato (PMMA) e óxido de grafeno (GO), sendo testados diferentes parâmetros de esfoliação do GO e estratégias de integração com o PMMA. O GO150w foi sintetizado a partir de grafite natural pelo método de Hummers-Offeman modificado. Variações na síntese e parâmetros de sonicação permitiram a obtenção de óxidos de grafeno com propriedades distintas. As amostras de GO foram testadas quanto à capacidade de inibir biofilmes bacterianos em diferentes concentrações. A amostra GO150w apresentou uma inibição de 56% do biofilme de *Escherichia coli* nas concentrações mais altas, mas problemas de solubilidade foram observados após 24 horas. A amostra GO7Kw teve resultados insatisfatórios, com maior crescimento bacteriano na menor concentração e apenas 30% de inibição nas concentrações mais altas. Já a amostra de GONaNO₃ obteve uma inibição da formação do biofilme frente a bactéria *S. aureus* de cerca de 53% na concentração de 1,0 mg/mL e cerca de 59% na concentração de 0,5 mg/mL. Para a bactéria *E. coli* foi possível observar uma inibição da formação de biofilme de cerca de 43% na concentração de 1,0 mg/mL e de 46% em 0,5 mg/mL, mostrando-se promissora como agente antimicrobiano para aplicações biomédicas. Após o óxido de grafeno foi inserido e PMMA para revestir placas de titânio previamente tratadas.

Palavras-chave: óxido de grafeno, titânio, inibição de biofilme.

ABSTRACT

The formation of biofilms is recognized as the main cause of resistant infections, encouraging the development of innovative approaches in healthcare. Antimicrobial structures, such as graphene, offer advantages such as low toxicity, the ability to overcome bacterial resistance, and reduced costs. This study aimed to develop and evaluate the biological properties of graphene oxide (GO) applied to titanium plates previously subjected to chemical etching. The coatings were composed of polymethylmethacrylate (PMMA) and graphene oxide (GO), with different GO exfoliation parameters and strategies for integration with PMMA being tested. GO150w was synthesized from natural graphite using the modified Hummers-Offeman method. Variations in synthesis and sonication parameters allowed for the production of graphene oxides with distinct properties. The GO samples were tested for their ability to inhibit bacterial biofilms at different concentrations. The GO150w sample showed a 56% inhibition of *Escherichia coli* biofilm at higher concentrations, but solubility issues were observed after 24 hours. The GO7Kw sample had unsatisfactory results, with greater bacterial growth at the lowest concentration and only 30% inhibition at the highest concentrations. Meanwhile, the GONaNO₃ sample achieved approximately 53% inhibition of *S. aureus* biofilm formation at a concentration of 1.0 mg/mL and around 59% at a concentration of 0.5 mg/mL. For *E. coli*, biofilm formation inhibition was observed at around 43% at a concentration of 1.0 mg/mL and 46% at 0.5 mg/mL, showing promise as an antimicrobial agent for biomedical applications. Afterward, graphene oxide was incorporated into PMMA to coat titanium plates that had been previously treated.

Keywords: graphene oxide, titanium, biofilm inhibition.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1	(A) Síntese de óxido de grafeno por oxidação química usando métodos de Brodie, Staudenmaier e Hummer; (B) Rota de síntese de do óxido de grafeno a partir de grafite	17
Figura 2	Mecanismo proposto para os efeitos do óxido de grafeno em formação de biofilme.	19
Figura 3	Mecanismo de formação de biofilme.	20
Figura 4	Fluxograma das etapas de oxidação e esfoliação dos GOs envolvidos no trabalho.	22
Figura 5	Placas de titânio após ataque químico e após limpeza.	24
Figura 6	Rota de síntese do Poli metil metacrilato (PMMA).	25
Figura 7	Esquema representativo do processo de deposição dos revestimentos por blade-coating.	26
Figura 8	Espectros Raman dos óxidos de grafeno GO150w, GO7Kw e GONaNO ₃	30
Figura 9	Espectros de FTIR dos óxidos de grafeno GO150w e GO7Kw.	31
Figura 10	Padrões de difração dos óxidos de grafeno GO150w, GO7Kw e GONaNO ₃ .	32
Figura 11	Curvas de termogravimetria (1) e termogravimetria diferencial (2) dos óxidos de grafeno GO150w, GO7Kw e GONaNO ₃ .	33
Figura 12	Imagem de MEV em sequência: (A e B) GO150w nas magnificações 40kx e 80kx, respectivamente; (C e D) GO7Kw nas magnificações 40kx e 60kx, respectivamente;	34
Figura 13	Imagem de MET em sequência: (A e B) GO7Kw; (C e D) GONaNO ₃ ;	35
Figura 14	Gráficos representando as concentrações de crescimento de biofilme nas amostras de GO150w, GO7Kw e GO NaNO ₃ .	37
Figura 15	Teste de avaliação de morte bacteriana do GONaNO ₃ . (1) Teste com a bactéria <i>S. aureus</i> (2) teste com a bactéria <i>E. coli</i> .	38
Figura 16	Avaliação física das amostras de PMMA em placas de petri e em eppendorfs de 2 mL.	39

Figura 17	Espectro de infravermelho da amostra de PMMA feita pelo método KBR.	40
Figura 18	Espectro de infravermelho das amostras PMMA com GO sintetizado diretamente no MMA e PMMA com GO sintetizado após o final da síntese, feitas por ATR e convertidas de absorbância para transmitância.	41
Figura 19	Reologia do PMMA em função da temperatura.	42
Figura 20	Reologia do PMMA e PMMA/GO.	43
Figura 21	Imagem de microscopia eletrônica de varredura de placa de titânio com ataque químico (A e B) e placa de titânio revestida com PMMA/GO (C e D)	44

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 –	Variação da concentração de MMA e BPO para preparo do PMMA.	26
Tabela 2 –	ζ -potencial médio [mV] em triplicata dos GOs.	36
Tabela 3 –	Diâmetro hidrodinâmico em triplicata dos GOs.	36
Tabela 4 –	Avaliação física das amostras de MMA.	42

Sumário

1. Introdução	11
2. Objetivo	13
3. Revisão de Literatura	14
3.1 Dispositivos médicos	14
3.2 Poli Metacrilato de metila (PMMA)	15
3.3 Óxido de grafeno	16
3.4 Biofilmes bacterianos	19
4. Materiais e métodos	21
4.1 Materiais	21
4.2 Métodos de síntese	21
4.2.1 Síntese do óxido de grafeno (GO150W)	22
4.2.2 Síntese do óxido de grafeno (GO7K)	23
4.2.3 Síntese do óxido de grafeno (GONaNO3)	23
4.3 Revestimentos PMMA/GO	24
4.3.1 Limpeza das placas de titânio	24
4.3.2 Ataque químico	24
4.3.3 Recristalização do peróxido de benzoíla	25
4.3.4 Síntese do PMMA	25
4.3.5 Proposta de adição do GO ao PMMA	26
4.3.6 Deposição dos revestimentos	26
4.4 Métodos de caracterização	27
4.4.1 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)	27
4.4.2 Espectroscopia RAMAN	27
4.4.3 Espectroscopia na região do FTIR	27
4.4.4 Difração de raio-X	27
4.4.5 Análise térmica	28
4.4.6 Propriedades reológicas	28
4.4.7 Avaliação atividade antibiofilme	28
5. Resultados e discussão	29
4.1 Caracterizações físico-química dos óxidos de grafeno obtidos	29
4.2 Potencial zeta	35
4.3 Testes anti-biofilme	36
4.3.1 Avaliação atividade antibiofilme do GO	36
4.4 Testes físicos das variações do PMMA	38
4.5 Análise de composição química do PMMA	39
6. Conclusão	44

Referências	47
ANEXO A - Óxido de grafeno reduzido	55
<i>Obtenção de óxido de grafeno reduzido (rGO)</i>	55
<i>Caracterização físico-química do rGO</i>	55
<i>Avaliação atividade antimicrobiana por disco difusão do rGO</i>	56
ANEXO B – Deconvolução do RAMAN das amostras de GO	60
Apêndice - Histórico escolar	62

1. INTRODUÇÃO

As infecções bacterianas são a causa de diversos problemas na área da saúde pública, já que o uso indevido de antibióticos está diretamente ligado com o aumento da resistência desses microrganismos, transformando o combate dessas infecções em uma tarefa difícil (KUMAR et al. 2019). Grande parte das infecções que acometem os seres humanos são devido à formação de biofilmes por microrganismos. Wu et al. (2023) e Styková et al. (2022), afirmam que a formação de biofilme acrescenta uma vantagem de 1500 vezes na resistência da cepa, frente a antibióticos, antifúngicos, desinfetantes e ao sistema imunológico do hospedeiro.

A nanomedicina é uma área da nanotecnologia que visa avanços na saúde por meio de nanomateriais e nanopartículas, como forma de combater bactérias, transportar medicamentos/genes ou realizar diagnósticos moleculares. Um exemplo desse avanço na química de materiais e biologia molecular é a eficácia do óxido de grafeno contra *S. aureus*. Segundo Saeed et al. (2023), testes realizados em laboratório sugerem que o composto pode ser submetido a testes em animais vivos para determinar seu potencial como parte do tratamento para mastite bovina. Outra aplicação de biomateriais na área da saúde são os dispositivos médicos, também chamados de implantes. Os implantes de titânio são amplamente utilizados na ortodontia e na ortopedia devido à sua biocompatibilidade e propriedades físico-químicas.

Reyes et al. (1977) fizeram a primeira adaptação de um implante de titânio para o ouvido, possibilitando a audição por meio de ondas sonoras levadas diretamente para a cóclea. No entanto, Ming et al. (2023) e Xu et al. (2024) descrevem que, devido à bioinércia do titânio, que resulta em pouca interação com os tecidos biológicos, podem existir pequenos espaços propícios ao desenvolvimento de biofilmes, dificultando a cicatrização do tecido ao redor do implante. Hakim et al. (2024) explicam que dispositivos médicos metálicos, como os feitos de titânio, são frequentemente revestidos com polímeros e funcionalizados com materiais que previnam infecções associadas. Nesse contexto, materiais poliméricos são amplamente aplicados em dispositivos médicos, embora enfrentam desafios persistentes, como o aumento substancial de bactérias e a formação de biofilmes, que resultam em riscos de infecção (Tran e Webster, 2013). Atualmente, o método mais empregado para mitigar os danos causados por infecções

relacionadas à aderência de biofilmes é o revestimento de superfícies com materiais antimicrobianos.

Destaca-se também a aplicação de biomateriais na área da saúde. Neste caso, os implantes de titânio foram consolidados na ortodontia e na ortopedia por sua biocompatibilidade e propriedades físico-químicas. Reyes et al. (1977) fizeram a primeira adaptação de um implante de titânio para o ouvido, possibilitando a audição por meio de ondas sonoras levadas diretamente para a cóclea. Porém, Ming et al. (2023) e Xu et al. (2024), descrevem que devido a bioinércia do titânio, ação em que o material tem pouca interação com os tecidos biológicos, podem existir pequenos espaços propícios ao desenvolvimento de biofilmes, dificultando a cicatrização do tecido ao redor do implante. Hakim et al. (2024) explica que os dispositivos médicos metálicos, como os de titânio, são popularmente revestidos com polímeros e funcionalizados com materiais que previnam infecções associadas. Nesse contexto, materiais poliméricos são amplamente aplicados em dispositivos médicos, embora enfrentem desafios persistentes, como o aumento substancial de bactérias e a formação de biofilmes, que resultam em riscos de infecção (Tran e Webster, 2013). Atualmente, o método mais empregado para mitigar os danos causados por infecções relacionadas à aderência bacteriana em implantes, consiste no revestimento do material, a fim de criar uma superfície que impeça a fixação dos microrganismos. O polimetilmetacrilato (PMMA) é um polímero sintético utilizado no campo da biomedicina para confecções de diversos dispositivos, como cimentos ósseos, implantes, reconstrução mandibular, lentes intraoculares, e outros, devido às suas notáveis características de propriedades ópticas, resistência ao impacto, elasticidade e biocompatibilidade. Estudos recentes, como o de Amirabad et al. (2022), destacam que a modificação da superfície do PMMA com moléculas bioativas pode ser uma estratégia eficaz para controlar a adesão bacteriana. Ao favorecer a ligação das bactérias aos grupos funcionais das substâncias adicionadas, essa técnica pode ajudar a prevenir a colonização bacteriana indesejada em dispositivos médicos e outros materiais sensíveis à contaminação.

O interesse na família do grafeno na área biomédica se deve às suas propriedades em estudos para desenvolvimento de testes diagnósticos, seu uso como veículo de entrega de medicamentos e às suas propriedades antimicrobianas, que o tornam uma opção adequada para a aplicação na biomedicina (CASTILLO et al., 2013; SHANG et al., 2019). A variante oxidada do grafeno, o óxido de grafeno

(GO), apresenta grupos funcionais como carbonila, ácido carboxílico e hidroxila, que permitem a sua interação com bactérias (SAEED, et al. 2023). A atividade antimicrobiana do óxido de grafeno está relacionada a fatores físicos e químicos, como o estresse oxidativo induzido pela presença abundante de grupos funcionais de oxigênio. Esses grupos funcionais interagem com as bactérias, restringindo a entrada de nutrientes e causando danos à membrana celular. Além disso, as bordas do óxido de grafeno perfuram a membrana bacteriana, contribuindo para a lesão e inibição do crescimento bacteriano. Saeed, et al. (2023) observaram também que para a atividade antibiofilme, o GO possui bordas afiadas em suas folhas, que são capazes de romper a estrutura da matriz de Exopolissacarídeos (EPS), uma substância polimérica extracelular produzida por certos microorganismos, presentes na estrutura do biofilme. Além disso, as interações de hidrogênio, força Van der Waals, interações eletrostáticas e interações π - π , presentes no GO desestabilizam as estruturas dos EPS.

2. Objetivo

Este trabalho busca desenvolver e analisar as propriedades biológicas do óxido de grafeno (GO) e criar um revestimento combinado de poli metil-metacrilato (PMMA) e óxido de grafeno. Para alcançar esse objetivo, foram realizados testes que exploraram diferentes parâmetros de esfoliação do GO, além de estratégias diversas para sua integração ao PMMA. A pesquisa incluiu análises morfológicas e físico-químicas dos materiais, complementadas por uma avaliação das propriedades antimicrobianas, a fim de verificar a eficácia e o potencial de aplicação do revestimento produzido.

3. Revisão de Literatura

3.1 Dispositivos médicos

Os dispositivos médicos, por se tratar de materiais expostos diretamente aos tecidos do corpo humano não devem causar danos adicionais à saúde e permitir a execução das atividades rotineiras, por isso é de extrema importância a utilização de materiais biocompatíveis na sua confecção para evitar uma resposta imunológica do corpo (WANG et al. 2019). Segundo a agência nacional de vigilância sanitária (ANVISA), por meio da RDC nº751/2022:

“Dispositivos médicos são todos os instrumentos, aparelhos, equipamentos, implantes, dispositivos de diagnóstico in vitro, software e materiais destinados a serem utilizados para diagnósticos, prevenção, monitoramento, tratamento, recuperação de lesão ou deficiência, substituição anatômica ou de processos fisiológicos e patológicos e fornecimento de informações por exames, os quais a ação independem de meios farmacológicos, imunológicos ou metabólicos.”

Existem diferentes classificações para esses dispositivos como para diagnósticos e monitoramento, terapêutico ativo, de uso único, implantável, invasivo e para diagnósticos *in vitro*, que vão desde bisturís até próteses.

Biomateriais como metais e suas ligas, polímeros, cerâmicas e materiais naturais, são estudados e aplicados em campos diversos da área médica. Uma dessas aplicações são os implantes, que consistem em restaurar uma parte que antes estaria danificada no corpo humano (KAUR e SINGH, 2019). Tzortzis et al. (2015) mencionam que a osseointegração de implantes dentários foi inicialmente documentada por Branemark et al. (1952). Posteriormente, vinte e cinco anos depois, Reyes et al. (1977) realizaram a primeira adaptação do implante Branemark como um dispositivo auditivo, possibilitando que as vibrações sonoras alcançassem a cóclea, a parte anterior do labirinto localizada no canal auditivo interno.

Segundo Baltatu et al. (2023), o titânio e suas ligas são materiais confiáveis para implantes médicos que permanecem por longos períodos no corpo, apresentando respostas favoráveis em trabalhos vistos na literatura, devido a sua resistência e biocompatibilidade. Neste sentido, o titânio tem sido um material extensamente estudado para diversas aplicações devido a sua resistência à

corrosão e à altas temperaturas. Uma característica importante deste material é a formação de uma camada de óxido na sua superfície (TiO_2) que o protege da corrosão em meio aquoso. Esta propriedade tem recebido atenção para a indústria biomédica compensando o custo na produção (FANTON et al. 2022). No campo médico, o titânio é bastante utilizado devido a sua biocompatibilidade e menor risco de reações alérgicas. Sypniewska e Szkodo (2022) destacam a importância da rugosidade da superfície do titânio para facilitar a osseointegração, fenômeno pelo qual o osso natural se liga firmemente a um implante artificial, formando uma conexão estrutural e funcional sólida ao longo do tempo. Esse fenômeno é importante para o sucesso de muitos dispositivos médicos implantáveis, como próteses dentárias, implantes ortopédicos e dispositivos de fixação óssea. Dependendo do local onde o implante é inserido, diferentes níveis de rugosidade podem ser necessários para promover uma fixação óssea ideal. Uma superfície mais rugosa pode proporcionar uma área de superfície maior para que as células ósseas se fixem, facilitando assim o processo de osseointegração. Essa personalização da rugosidade da superfície do titânio é essencial para garantir o sucesso a longo prazo do implante e a estabilidade do dispositivo no corpo humano. Porém, essas superfícies podem ser suscetíveis à colonização por bactérias e formação de biofilmes. Um dos meios usados para contornar esse problema é o revestimento dos materiais com propriedades antimicrobianas (ESTEVES, et al. 2022).

3.2 Poli Metacrilato de Metila (PMMA)

Há aproximadamente cinquenta anos, materiais poliméricos têm sido empregados na produção de implantes devido às suas vantagens em termos de biocompatibilidade, resistência à corrosão e propriedades químicas e mecânicas (PUNSET, et al. 2022). O Polimetilmetacrilato (PMMA) é um polímero bioinerte, hidrofóbico e que não é degradado biologicamente. O PMMA, é comumente utilizado para fabricação de próteses, cimento ósseo, próteses faciais, entre outros, por atender a maioria das exigências para confecção de dispositivos médicos (CAMARGO et al. 2021). Harb et al. (2020), afirmam que o PMMA como revestimento de titânio ajuda na ação anticorrosiva do titânio e melhora a questão da durabilidade do implante, ou seja, a vida útil do dispositivo pode ser maior do que a do material sem revestimento.

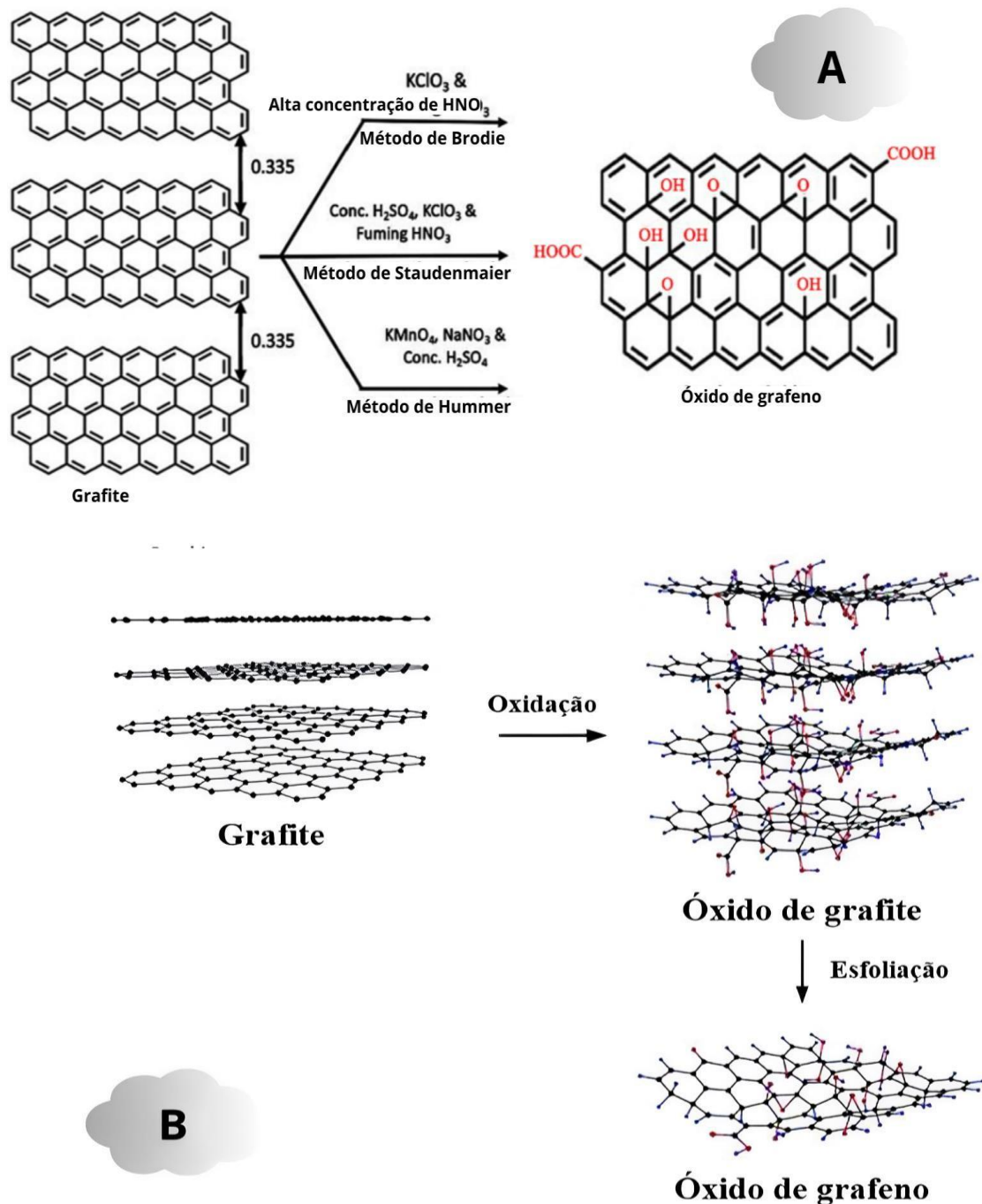
O PMMA é produzido por meio da polimerização do éster de ácido metacrílico, que é formado pela reação entre o ácido metacrílico e o éster de metanol. O polimetilmetacrilato (PMMA) apresenta grupos funcionais, como o grupo alifático central $\text{CH}_2\text{-C}$, que está ligado aos grupos laterais CH_3 (metila) e $\text{CH}_3\text{-O-CO}$ (éster) (RAHMAN, et al., 2020). Shridhar et al. (2016) apresentam a utilização do PMMA como cimento ósseo para fraturas vertebrais, procedimento que envolve a injeção do PMMA no corpo vertebral para estabilização mecânica da fratura. Punset et al. (2022) avaliaram as melhorias promovidas no PMMA ao ser associado com óxido de grafeno, visando uma melhoria nas propriedades mecânicas e biológicas, para evitar complicações recorrentes nos tecidos implantados. Foi visto, por esses autores, que a adição do GO ao PMMA promove uma redução na taxa de desgaste do dispositivo, aumento na elasticidade do material e resistência à compressão.

3.3 Óxido de grafeno (GO)

Nos últimos anos, pesquisas com a família do grafeno têm ocupado a linha de frente no setor biomédico, com ênfase no desenvolvimento da sua síntese (Mandal, et al. 2022). O óxido de grafeno é a forma derivada do grafite, possuindo grupos carboxílicos (-COOH), carbonila (-C=O) e hidroxila (OH) em sua estrutura. Esses grupos facilitam interações com microorganismos, induzindo, por exemplo, a morte bacteriana sem a necessidade de um processo intracelular (Kumar, et al. 2019). Existem três rotas principais para obtenção de óxido de grafeno, a primeira foi sugerida por Brodie em (1859), em que são usados ácido nítrico (HNO_3), ácido sulfúrico (H_2SO_4) e tricloreto de fósforo (PCl_3), como agentes desidratantes. Quarenta anos após Brodie, Staudenmaier promoveu uma maior acidez da mistura com ácido sulfúrico concentrado (H_2SO_4) combinado com ácido nítrico (HNO_3), seguido da adição de cloreto em multi alíquotas de solução de clorato de potássio (KClO_3) durante a reação. Por fim, Hummers-Offeman propuseram uma abordagem alternativa, onde o grafite é submetido a uma reação com uma mistura de permanganato de potássio (KMnO_4) e ácido sulfúrico concentrado (H_2SO_4), resultando na oxidação. Os três métodos de sínteses estão ilustrados na Figura 1 A. O método Hummers-Offeman é o mais utilizado, já que se trata de uma reação que pode ser feita em larga escala, onde o óxido de grafite pode ser revertido a óxido de grafeno por meio de esfoliação em ultrassom de ponteira (Figura 1B) (Brisebois e

Siaj, 2020). O GO exibe boa estabilidade coloidal e grande área de superfície, resultando em uma capacidade de carga elevada. A presença de grupos funcionais bem definidos, ricos em oxigênio, também atribuem uma melhor hidrofilia do material (BELLIER et al, 2022).

Figura 1 – (A) Síntese de óxido de grafeno por oxidação química usando métodos de Brodie, Staudenmaier e Hummer; (B) Rota de síntese de do óxido de grafeno a partir de grafite.



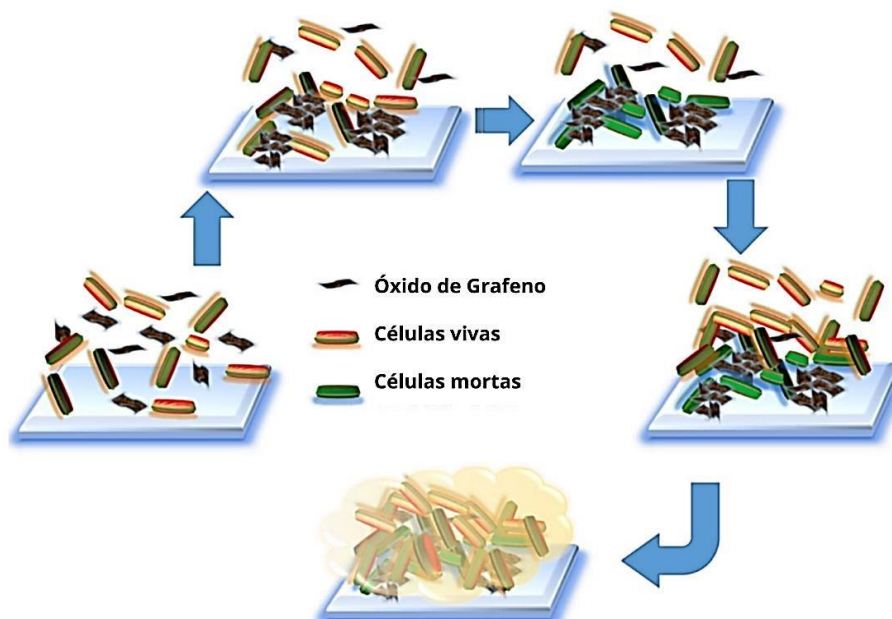
Fonte: Adaptado de Adetayo et al. (2019) e Borges (2020).

A literatura apresenta diversos experimentos bacterianos com óxido de grafeno, apresentando dois diferentes tipos de mecanismos de inibição bacteriana, no primeiro é a inibição do desenvolvimento dos microorganismo, chamado de agentes bacteriostáticos e o segundo meio é pelo combate do patógeno já presentes no meio em que o GO será aplicado, chamado de agente antibacteriano. Krishnamoorthy, et al. (2012) investigaram a interação do GO frente às bactérias *Escherichia coli* e *Streptococcus iniae*, alcançando valores EC_{50} de inibição de 38µg/mL e 29µg/mL, respectivamente, valores considerados bons para atividade antimicrobiana em revestimentos, sendo superiores ao de titânio. Nesse estudo, foi usado o método de contagem de colônias que confirmou a ação bactericida, inibindo o crescimento do microrganismo. Já Olczak et al. (2023) descreveram o teste antibacteriano de curto prazo, testando as amostras de 10 a 60 minutos, tendo as amostras de 10 e 30 minutos os resultados mais relevantes frente a *E. coli*. No experimento foi observado que o GO demonstra seu poder bacteriostático nas amostras menos concentradas, mas apresentando o maior potencial de mortalidade nas amostras mais concentradas, chegando a 70% de inibição.

Yang et al. (2023) sondaram a associação do titânio (Ti) com o GO, frente às bactérias *E. coli* e *S. aureus*, observando que no teste com o substrato de Ti apresentou uma grande quantidade de colônias, indicando a falta de atividade antimicrobiana. Após a combinação com o GO, observou-se a diminuição da quantidade de colônias presentes, indicando a atividade de aproximadamente 82,8%, frente a *E. coli* e 49,3%, frente a *S. aureus*.

Song et al. (2018) descrevem o possível mecanismo pelo qual o óxido de grafeno afeta as bactérias. Eles explicam que, devido à capacidade adaptativa das bactérias, estas tendem a se agrupar para formar biofilme, no entanto, a presença de GO interrompe esse processo, resultando na inibição ou morte das células bacterianas devido ao estresse na membrana e ao estresse oxidativo induzido pelo GO, conforme mostrado na Figura 2.

Figura 2 – Mecanismo proposto para os efeitos do óxido de grafeno em formação de biofilme.



Fonte: Adaptado de Song et al. (2018).

3.4 Biofilmes bacterianos

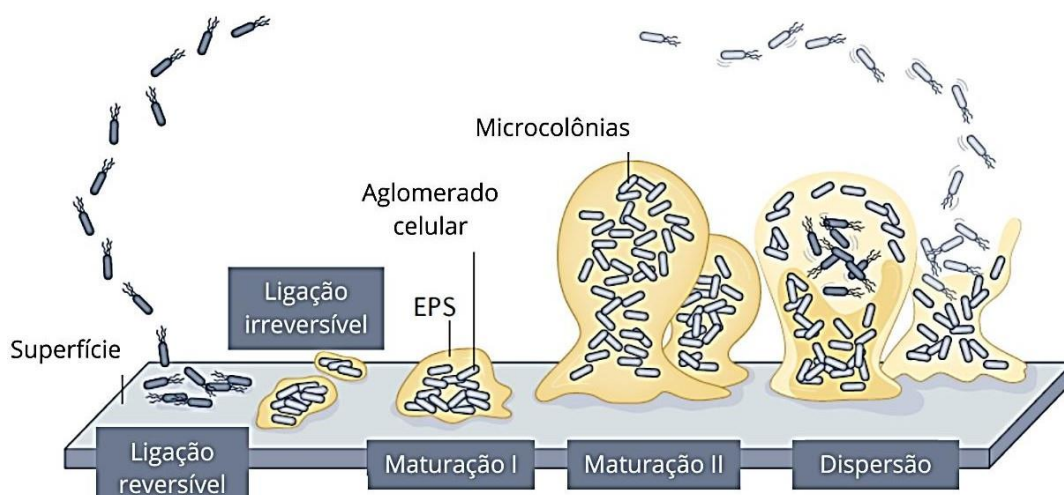
As bactérias são classificadas pelos microbiologistas como apresentando duas formas de vida, são elas a forma de vida independente conhecida como planctônica e a formação de agregados microbianos, conhecidos como biofilme (SAUER et al. 2022).

Nos últimos anos, pesquisas sobre dispositivos médicos mais biocompatíveis com o corpo humano têm crescido consideravelmente, impulsionado pela necessidade de reparar partes do corpo humano que foram perdidas ou danificadas (CHEN et al., 2020). Após a implantação de dispositivos médicos no corpo humano, ocorre um processo inflamatório natural, no qual o local onde o dispositivo foi implantado é invadido por células responsáveis pela reparação tecidual. Essas células aderem ao implante, o que é uma resposta benéfica, facilitando o processo de osseointegração, ou seja, a integração do dispositivo com o tecido ósseo circundante (CHEN et al., 2020). Mas essas não são as únicas células que podem surgir no dispositivo implantado. Joseph et al. (2016) afirmam que 17 milhões de novas infecções por biofilmes surgem todos os anos, já Gheorghe et al. (2021) ressaltam que esse tipo de infecção é um problema para pacientes que implantaram materiais exógenos.

Ao se aderir nos dispositivos médicos, as bactérias secretam uma matriz tridimensional e organizada, o qual confere resistência a agentes microbianos Figura 3. A ação antibiofilme é uma atividade diferenciada da morte direta do microorganismo, Di Somma et al, (2020) explicam que a concentração inibitória de biofilme (MBIC) precisa ser menor que a concentração inibitória mínima (MIC), para o material ser considerado antibiofilme. Quando o MBIC é menor que o MIC, é indicado que o material tem capacidade de inibir o biofilme em concentrações mais baixas do que necessárias para matar a bactéria diretamente.

Armbruster e Parsek (2028) observaram as etapas da adesão bacteriana e formação do biofilme. No primeiro estágio, conhecido como fase de adesão reversível, as células aderem inicialmente de maneira frouxa, após um tempo, as células se acoplam planas à superfície de forma irreversível, onde se multiplicam e começam a produzir componentes da matriz extracelular (biofilme), formando pequenos aglomerados bacterianos (microcolônias), no qual esse aglomerado passa a se multiplicar envolto na matriz.

Figura 3 – Mecanismo de formação de biofilme onde o microorganismo se adere ao substrato em uma ligação reversível, perde seu flagelo e libera sua matriz extracelular, formando microcolônias que após sua maturação dispersão novos microrganismos no meio.



Fonte: Adaptado de Sauer et al. (2022).

4. Materiais e métodos

Neste tópico, detalham-se os procedimentos experimentais empregados na síntese, caracterização e avaliação das amostras de óxido de grafeno (GO) e PMMA. Desde a preparação dos materiais iniciais até os métodos de análise utilizados para investigar as propriedades físico-químicas e o desempenho antimicrobiano do GO, cada etapa é minuciosamente descrita. São apresentados os materiais empregados, os equipamentos utilizados em cada fase experimental, as técnicas de caracterização adotadas e os protocolos específicos para os testes de atividade antibiofilme. Essa descrição abrangente dos procedimentos e métodos é fundamental para garantir a consistência dos resultados e estabelecer uma base sólida para a interpretação dos dados obtidos ao longo deste estudo.

4.1 Materiais

Placa de titânio (Grau 2); Peróxido de Benzoíla (Dinâmica, 75%) (BPO); Metacrilato de metila (Sigma, 99%) (MMA); Tetraidrofurano (Merk, 99%) (THF); Grafite (Sigma, 99%); Permanganato de potássio (Neon, 100%) (KMnO_4); Ácido sulfúrico (Dinâmica, 95%) (H_2SO_4); Água ultrapura (Milli-Q); Peróxido de hidrogênio (Vetec, 30%) (H_2O_2); Borohidreto de sódio (Neon) (NaBH_4); Ácido clorídrico (Dinâmica, 36,5%-38%) (HCl);

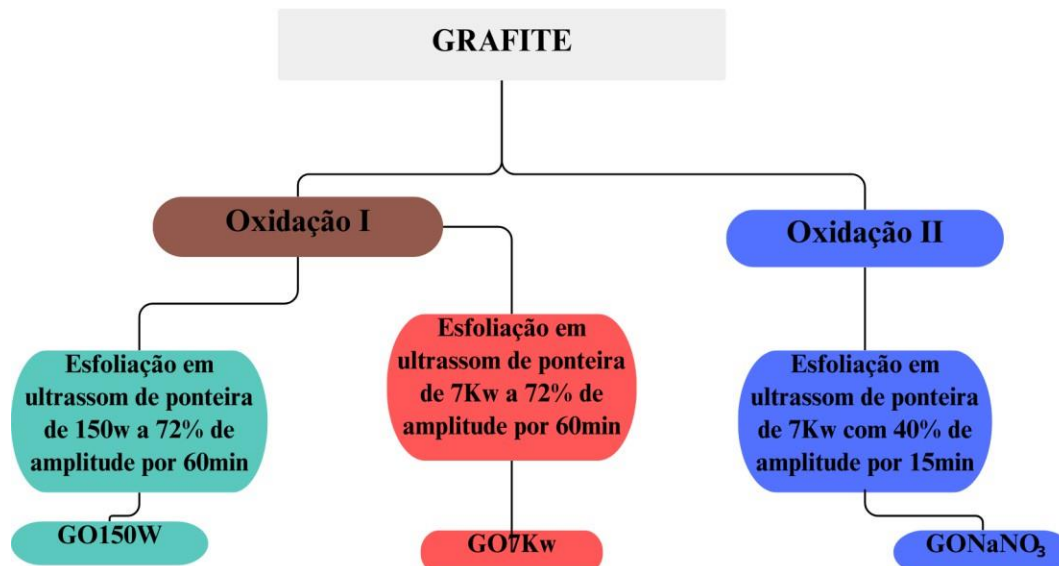
4.2 Métodos de síntese

Variação dos parâmetros para obtenção do GO

No sentido de aprimorar a metodologia de oxidação do grafite, dois procedimentos foram avaliados. Na primeira abordagem, denominada oxidação I, utilizaram-se grafite, permanganato de potássio, ácido sulfúrico, peróxido de hidrogênio e ácido clorídrico em concentrações especificadas nos parágrafos subsequentes (item 3.2.1 e 3.2.2). Na segunda abordagem, chamada oxidação II, com o propósito de aperfeiçoar o processo oxidativo e alcançar um GO com maior quantidade de grupos funcionais, foi incluída uma etapa adicional com nitrato de sódio, conforme estabelecido por Mehl et al. (2014) e descrito no item 3.2.3. O

esquema dos três óxidos de grafeno obtidos, juntamente com os procedimentos de oxidação e esfoliação correspondentes, está presente na Figura 4.

Figura 4 – Fluxograma das etapas de oxidação e esfoliação dos GOs envolvidos no trabalho.



Fonte: A autora (2024).

4.2.1 Síntese de óxido de grafeno (GO150w)

O óxido de grafeno foi obtido a partir do grafite natural seguido do método de Hummers-Offeman modificado (MINITHA et al., 2017). Foram pesados 2,0 g de grafite e 6,0 g de permanganato de potássio. Em seguida, o grafite foi adicionado em um balão de fundo chato de 500 mL, previamente resfriado em banho de gelo sob agitação constante até atingir $\sim 10^{\circ}\text{C}$, seguido pela adição de 60 mL de ácido sulfúrico concentrado. Posteriormente, o permanganato de potássio foi adicionado lentamente durante 20 minutos. Finalizada a adição do KMnO_4 , a mistura foi retirada do banho de gelo e deixada sob agitação magnética à temperatura ambiente durante 24 horas. Após este período, foram adicionados lentamente 90 mL de água durante 10 minutos, sendo observado um aumento de temperatura. Em seguida, foi adicionado 280 mL de água e 20 mL de peróxido de hidrogênio, sob agitação vigorosa. Após, foi adicionado 1,0 mL de ácido clorídrico (3,0% V/V) para a remoção das impurezas. Ao final da síntese foi obtido um precipitado marrom amarelado, que é característico do óxido de grafite. O precipitado foi lavado e centrifugado em uma velocidade de 5000 rpm por 15 minutos, o sobrenadante foi descartado e uma nova

alíquota de água ultrapura foi adicionada até atingir o pH entre 5,0 e 6,0, monitorado com fita de pH. Após esse processo, o óxido de grafite foi levado para o ultrassom de ponteira de com potência de 150 W com 72% de amplitude por 60min, onde foi esfoliado e transformado em óxido de grafeno. O precipitado final foi liofilizado à -50 °C, com vácuo inferior a 300µmHg por 24 horas.

4.2.2 Síntese do óxido de grafeno (GO7KW)

Foram realizados testes com a sonda ultrassônica de 7000 W, com amplitude de 72% durante em 60 minutos, utilizando amostras sintetizadas pelo método de oxidação I, o mesmo utilizado no GO150W.

4.2.3 Síntese do óxido de grafeno (GONaNO₃)

Para realizar a oxidação do grafite (Sigma, 99%), primeiro um balão de 500 mL foi resfriado em um banho de gelo. Nele, foram adicionados 46 mL de ácido sulfúrico (H₂SO₄ (98%)), 2,0 g de grafite e 1,0 g de nitrato de sódio (NaNO₃), e a mistura foi agitada por 15 minutos. Após, 6,0g de permanganato de potássio foram adicionados lentamente. A adição de permanganato provocou a formação de óxido de manganês (Mn₂O₇), que se tornou verde ao entrar em contato com o ácido sulfúrico, cor característica da oxidação elevada do manganês. Passados 180 minutos, 92 mL de água deionizada foram cuidadosamente adicionados, seguidos por 280 mL de água (~100°C). Para neutralizar o excesso de agente oxidante, foram adicionados 10 mL de solução aquosa de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) (30% V/V - 1), que atua como agente redutor do manganês. O sólido resultante foi lavado com 500 mL de ácido clorídrico (10% V/V -1) para remover íons de sulfato e, em seguida, centrifugado e lavado com água deionizada até que o pH ficasse neutro. Finalmente, o material foi seco em uma estufa a 60°C por 24 horas. A esfoliação foi realizada em amostras com concentração de 1mg/mL de óxido de grafite em água deionizada, com sonda de 700 W a 40% de amplitude em 15 minutos.

4.3 Revestimentos PMMA/GO

4.3.1 Limpeza das placas de titânio

As placas de titânio foram inicialmente acondicionadas em um béquer com acetona P.A. e colocadas em um banho ultrassônico por 10 minutos, para garantir a remoção completa de todas as impurezas. Em seguida, as placas foram enxaguadas com água destilada para eliminar quaisquer resíduos de acetona. Após esse processo, as placas foram imersas em etanol 10% e submetidas a um banho ultrassônico por mais 15 minutos. Posteriormente, foram novamente enxaguadas com água destilada em um banho ultrassônico por 15 minutos adicionais. Por fim, as placas foram secas com um secador a frio.

4.3.2 Ataque químico

O ataque químico nas placas de titânio teve como objetivo adquirir uma superfície mais rugosa para deposição dos revestimentos. As placas de Ti, previamente limpas, foram imersas por 1 minuto em 50mL de solução contendo 7,7 mL de ácido nítrico 65% (HNO_3) e 1,1 mL de ácido fluorídrico 45% (HF). Após, as placas foram retiradas e lavadas com água destilada em banho ultrassônico por 15 minutos e secas com secador.

Figura 5 – Placas de titânio após ataque químico e após limpeza.



Pós ataque químico



Pós limpeza

Fonte: A autora (2024).

4.3.3 Recristalização do Peroxido de benzoíla

O peróxido de benzoíla (BPO) passou por um processo de purificação visando remover impurezas e garantir uma polimerização mais eficiente. O BPO foi dissolvido em acetona e filtrado através de papel filtro, sendo posteriormente seco à temperatura ambiente por um dia. Esse procedimento foi essencial para assegurar a qualidade e a consistência do BPO, contribuindo assim para resultados mais confiáveis na polimerização.

4.3.4 Síntese do PMMA

O MMA foi previamente destilado para remoção de reagentes residuais. A síntese do PMMA foi realizada com base no método descrito por Carvalho *et al.* (2013). Neste processo, o monômero MMA foi copolimerizado por meio de uma reação de polimerização radical, utilizando o peróxido de benzoíla (BPO) como iniciador térmico (Figura 6). Inicialmente, foram adicionados 4,8 mL do monômero MMA ao becker sob agitação, juntamente com 0,1 g de BPO, após homogeneização, foi adicionado 4 mL de etanol, a reação foi mantida sob agitação por 3 horas, após esse período, foi adicionado 1,2 mL de etanol. Foram realizados testes variando as concentrações de MMA e BPO da amostra para adquirir um material mais transparente e resistente. Na Tabela 1 são apresentadas as variações.

Figura 6 - Rota de síntese do Poli metil metacrilato (PMMA).



Fonte: A autora (2024).

Tabela 1 – Variação da concentração de MMA e BPO para preparo do PMMA.

Reagente	Amostra 1	Amostra 2	Amostra 3	Amostra 4
MMA	3,2 mL	3,2 mL	2,4 mL	2,4 mL
BPO	0,07g	0,15g	0,05g	0,11g
ETOH	1,8 mL	1,8 mL	2,6 mL	2,6 mL

Fonte: A autora (2024).

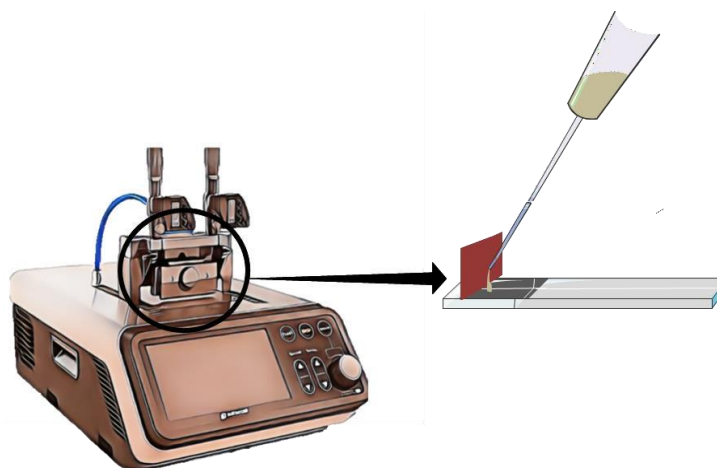
4.3.5 Proposta de adição do GO ao PMMA

Os revestimentos foram formados pela adição do GO previamente diluído em 1,2 mL de etanol, levado a banho ultrassônico com potência de 540 W por 15 minutos e adicionado à solução de PMMA sob agitação magnética por 1 minuto.

4.3.6 Deposição dos revestimentos

Os filmes foram depositados utilizando o método de *blade-coating*, empregando o equipamento *Blade coater* BCC-02. Este equipamento oferece a possibilidade de selecionar a lâmina responsável por controlar a espessura do filme depositado e garantir a uniformidade da camada. O método consiste na aplicação do revestimento entre o substrato e a lâmina, onde é formado um menisco que é arrastado pela superfície, formando o revestimento (Figura 7). Inicialmente foi utilizada a lâmina, com velocidade de 3mm/s e distância de 0,15mm entre o substrato e a lâmina de arraste. Foram adicionados 200µL da solução contendo PMMA/GO em placas de titânio previamente cortadas em tamanho 1,0x1,0 cm.

Figura 7 – Esquema representativo do processo de deposição dos revestimentos por *blade-coating*.



Fonte: A autora (2024)

4.4 Métodos de caracterização

4.4.1 Microscopia eletrônica de Varredura (MEV)

A análise de MEV foi utilizada para investigação morfológica da superfície das estruturas sintetizadas do óxido de grafeno e das chapas de titânio. Essa análise foi realizada no microscópio FEI modelo quanta 200FEG, localizado no Laboratório de Microscopia e Microanálise (LAMICRO) do CETENE.

4.4.2 Espectroscopia RAMAN

A análise de RAMAN foi realizada com a finalidade de identificar a composição química presente nas amostras a partir do espalhamento inelástico da radiação incidente. Essa análise foi realizada no microscópio confocal WITEC Alpha 300 Raman (WITEC, Ulm, Germany) em comprimento de onda de 532 nm, pertencente ao Laboratório de Microscopia e Microanálise (LAMICRO) do CETENE. Foi feita a deconvolução dos espectros de cada amostra de GO pelo programa origin na região entre 1133 e 1700 cm^{-1} , pela equação Gaussiana, após a deconvolução foi calculada a razão de intensidade entre as bandas D e G, I_D/I_G , que estima a quantidade de defeito nas amostras.

4.4.3 Espectroscopia na região do infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)

Todas as amostras de óxido de grafeno e PMMA foram analisadas por FTIR para identificação das ligações químicas presentes nos materiais. As análises foram realizadas em um espectrômetro Vertex 70 (Bruker Optics, GER) com varredura de 400 cm^{-1} a 4000 cm^{-1} , 16 scans e resolução de 4 cm^{-1} .

4.4.4 Difração de raios-X (DRX)

Para a análise por DRX foi utilizado equipamento Shimadzu modelo XRD-7000L com radiação $\text{CuK}\alpha$ (1,5406 Å), utilizando ângulo 2 theta, varrendo de 10° a 80°, a uma taxa de 1°/min. Os difratogramas obtidos foram analisados para observar as fases cristalinas presentes nas amostras no óxido de grafeno e óxido de grafeno reduzido.

4.4.5 Análise Térmica

As curvas termogravimétricas (TG) foram obtidas em analisador térmico simultâneo (STA, Simultaneous Thermal Analyzer) STA 449 F3 Jupiter (NETZSCH, Germany), em atmosfera de Nitrogênio com velocidade de 50 mL/min e taxa de aquecimentos de 10°C/min.

4.4.6 Propriedades reológicas

Para a análise reológica do PMMA e do PMMA/GO foi utilizado o reômetro Anton Paar MCR 501, utilizando a geometria DG 26, com distância de 0,001 a temperatura de 50°C. Foram realizados ensaios de tensão de cisalhamento e viscosidade aplicando taxa de cisalhamento em triplicata.

4.4.7 Avaliação atividade antibiofilme

Para este teste foi empregado o protocolo de Trentin e colaboradores (2011), utilizando cristal violeta em placas de microtitulação estéreis de poliestireno de fundo chato. Foram testadas concentrações de 1,0 mg/mL, 0,5 mg/mL e 0,1 mg/mL de óxido de grafeno. Aos poços das microplacas foram adicionados 80 µL da suspensão bacteriana, 80 µL das soluções testes e 40µL de meio BHI caldo. Um controle substituindo o volume de solução de teste por água foi realizado. Após incubação a 37 °C por 24 h, o conteúdo dos poços foi removido e os mesmos lavados três vezes com solução salina a fim de remover as células não aderidas. As bactérias aderidas foram termofixadas em estufa a 60 °C por 1 h. A camada de biofilme formado foi corada com cristal violeta a 0,1% (V/V) por 15 min a temperatura ambiente, em seguida o corante foi descartado e lavado com água até que restasse apenas o que estava impregnado no biofilme. O corante ligado foi solubilizado com etanol 99,5% e após 30 min a absorbância foi medida a 570 nm. Para avaliar a formação de biofilme o controle foi considerado como 100%. Valores superiores ou menores a 100% representam estimulação ou inibição, respectivamente, da formação de biofilme em comparação com o controle.

5. Resultados e discussão

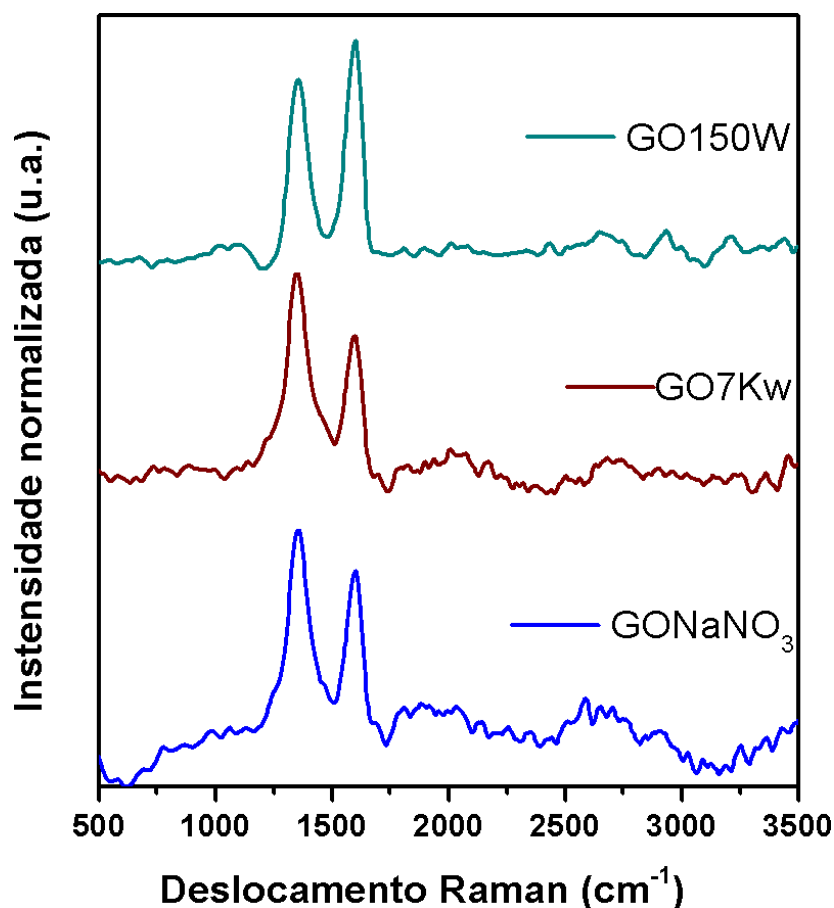
Foram feitas análises detalhadas das características físico-químicas e do desempenho antimicrobiano das amostras de óxido de grafeno. Foram obtidos resultados a partir de técnicas de caracterização, como espectroscopia Raman, espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier (FTIR), difração de raios-X (DRX), termogravimetria (TGA), microscopia eletrônica de varredura (MEV), potencial zeta. Além disso, são discutidos os testes de atividade antibiofilme realizados com as amostras de GO em diferentes concentrações, fornecendo uma visão abrangente do potencial do GO como agente antimicrobiano. Os resultados dessas análises servem para entender as propriedades físicas e químicas do GO, bem como sua eficácia em aplicações antimicrobianas, fornecendo insights valiosos para o desenvolvimento futuro de materiais bioativos e revestimentos. Foram feitos testes iniciais com óxido de grafeno reduzido para avaliar a atividade antimicrobiana vista na literatura, os resultados constam no Anexo A.

5.1 Caracterização físico-química dos óxidos de grafeno obtidos

A técnica Raman é bastante utilizada para a caracterização de materiais compostos por carbono, permitindo a obtenção de informações como número de camadas, tensão, dopagem e, no caso de materiais não organizados, oferece dados qualitativos sobre o grau de desordem (BOUŠA et al., 2013). Na Figura 8, podemos observar o espectro Raman dos três óxidos de grafeno previamente identificados. Nas amostras de GO é comum a presença de bandas D e G, as quais indicam a presença de defeito no material carbonáceo, estas bandas podem ser identificadas aproximadamente em 1350 e 1580 cm^{-1} , respectivamente, as quais são representativas das características estruturais e da desordem presentes no óxido de grafeno (GO) (SUREKHA et al. 2020 e KHALIL et al. 2019). É possível observar nos gráficos que a banda D no GO150w apresenta uma intensidade menor que a banda G, diferente do apresentado nos gráficos referente ao GO7Kw e o GO NaNO_3 . A banda D representa desordem em materiais cristalinos, evidenciando a oxidação do grafite precursor, que apresenta apenas a banda G. Portanto, as amostras de GO7Kw e GO NaNO_3 apresentam maior defeito cristalino e, conseqüentemente, maior oxidação. Foram calculadas as relações de intensidade entre as bandas D e

G (I_D/I_G) das três amostras, obtendo os seguintes valores: 0,82 (<1) na amostra GO150w; 1,30 (>1) para a amostra GO7K; e 1,17 (>1) para a amostra GONaNO₃., como detalhados no gráfico (Figura B1) e tabela (B1) detalhados no Anexo B. Segundo Toledo *et al.* (2017), um maior I_D/I_G tem como característica uma maior intensidade da banda D em relação a banda G, o que indica que o material possui um grau de desordem maior. Esse valor também sugere que o tamanho médio dos domínios sp², que são as regiões onde os átomos de carbono estão ligados por hibridização sp² (formando estruturas planas como grafeno ou anéis aromáticos), é menor em relação a amostra que apresenta a relação I_D/I_G mais baixa.

Figura 8 – Espectros Raman dos óxidos de grafeno GO150w, GO7Kw e GONaNO₃.

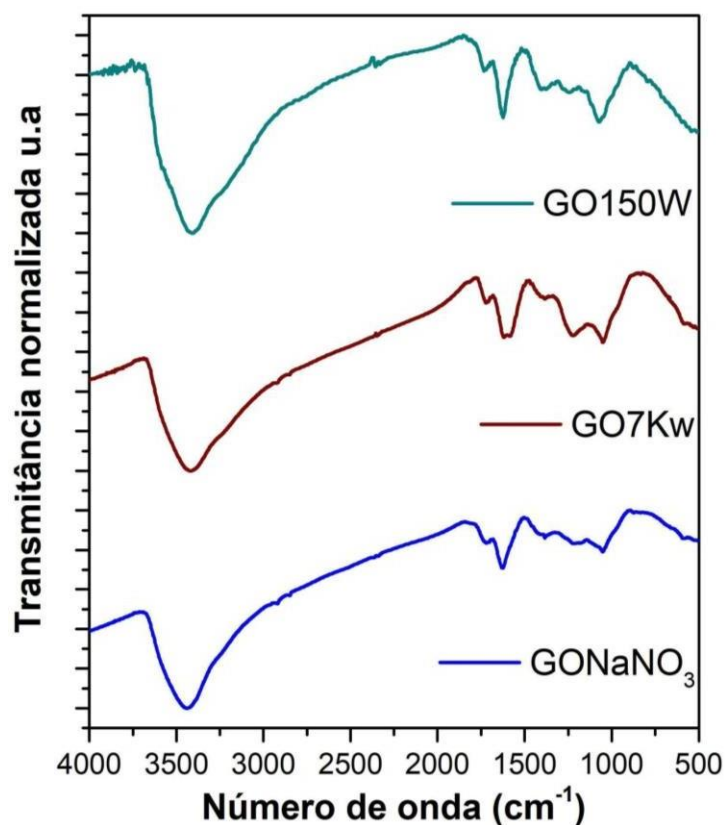


Fonte: A autora (2024)

O FTIR foi utilizado para determinar os grupos funcionais encontrados nas amostras de óxido de grafeno (Figura 9). Al-Gaashani *et al.* (2019), relatam que a banda próxima a 3417 cm⁻¹ apresenta alongamento O-H do grupo carboxílico

(COOH), enquanto a ligação observada em 2327 cm^{-1} é atribuída a C-H, encontrados no GO. As elevações encontradas aproximadamente em 1730 e 1626 cm^{-1} representam carboxila/carbonila (C=O) e grupos aromático (C=C), respectivamente, esses grupos não são encontrados no grafite, principal matéria prima para produção das amostras, o que significa que a etapa de oxidação adicionou os grupos funcionais epóxi e hidroxilas característicos para o óxido de grafeno (FANIYI et al., 2019). No GO15OW é possível observar o alongamento O-H em 3407 cm^{-1} ; a C-H em 2345 cm^{-1} . As elevações ocorreram em 1611 cm^{-1} , representando grupos C=C e 1735 cm^{-1} grupos C=O, esses grupos são característicos do óxido de grafeno. Para a amostra de GO7K é observado um leve deslocamento da banda O-H para 3412 . as demais bandas são encontradas nos mesmos números de ondas da primeira amostra, sendo C-H em 2345 cm^{-1} , C=O em 1712 cm^{-1} e C=C em 1611 cm^{-1} . Já na amostra GONaNO₃ é possível observar leves deslocamentos na maioria das bandas, onde O-H se apresenta em 3436 cm^{-1} C-H em 2345 cm^{-1} ; C=O em 1729 cm^{-1} e C-H em 1622 cm^{-1} .

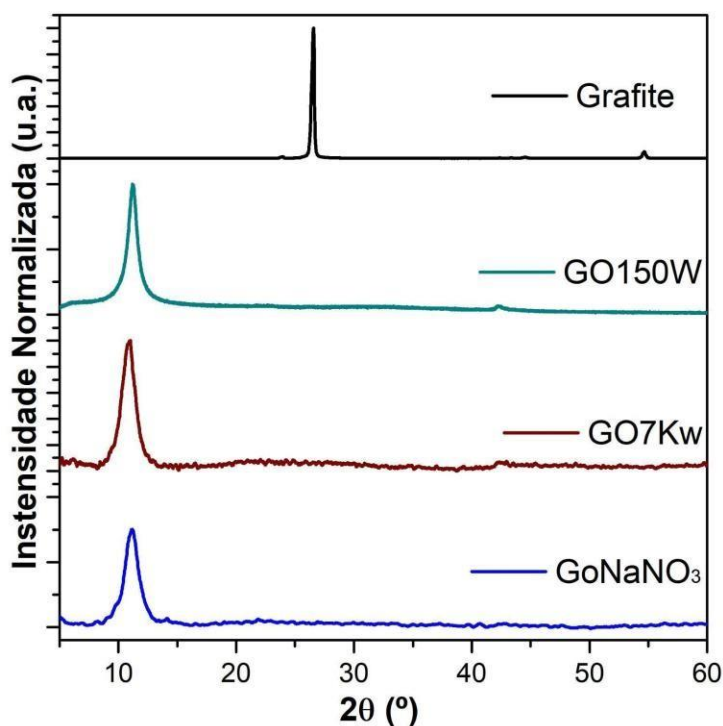
Figura 9 – Espectros de FTIR dos óxidos de grafeno GO150w, GO7Kw e GONaNO₃.



Fonte: A autora (2024)

A análise de DRX é importante para fornecer evidências da oxidação e modificação cristalina do grafite inicial para o óxido de grafeno (PÉREZ et al., 2019). Na Figura 10, é possível observar a presença de um pico em 10° (2θ), que se refere ao plano cristalográfico interplanar (001) do óxido de grafeno com espaçamento de 8,4 Å, característico para demonstrar que o processo de oxidação do grafite precursor foi efetivo (VELASCO-HERNÁNDEZ et al., 2020; CORSO et al., 2019). As três amostras apresentam essa característica. A amostra GO7Kw apresenta a menor intensidade do pico em 10° , enquanto a amostra GO150w apresenta a maior intensidade. Foi calculado a quantidade de folhas segundo a lei de Bragg onde o GO150w apresentou 11 folhas, o GO7kw apresentou também 11 folhas e o GONaNO₃ apresentou 8 folhas, portanto a amostra GONaNO₃ tem a menor quantidade de folhas, que pode significar uma maior área de superfície exposta do material, o que aumenta a capacidade de interação com os microrganismos.

Figura 10 – Padrões de difração dos óxidos de grafeno GO150w, GO7Kw e GONaNO₃.

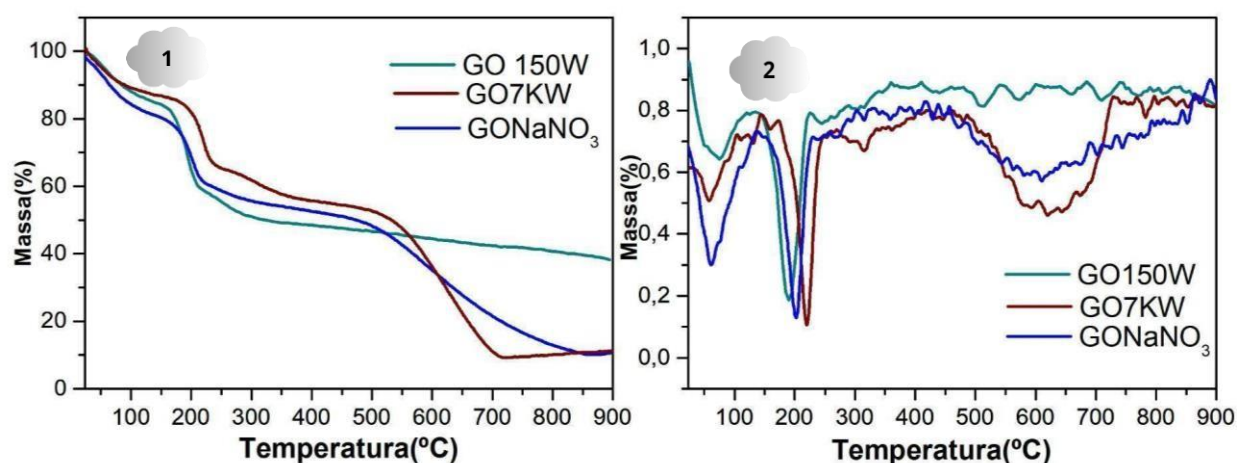


Fonte: A autora (2024)

FARIVAR et al., (2021), enfatizam a importância do TGA como método para combater o “falso grafeno”, já que TGA e DTG podem mostrar os eventos de perda de massa característicos de decomposição de água, grupos funcionais de oxigênio

e pirólise oxidativa da estrutura do carbono. Segundo Najafi e Rajabi (2015) o óxido de grafeno apresenta uma estabilidade térmica considerada boa, mas ao atingir a temperatura de 200°C, é possível observar uma queda de estabilidade, isso se dá pela perda dos grupos funcionais contendo oxigênio ligados às suas folhas. Na Figura 11 é possível notar a queda característica da perda de água em 100°C, em torno de 158°C acontece a perda de grupos funcionais menos estáveis, a partir de 178°C é notada a perda de todos os grupos funcionais. A partir de 400°C é notável a decomposição do material, tendo pequenas variações indicando a presença de moléculas instáveis de carbono que formam CO e CO₂ (SHARMA et al., 2017).

Figura 11 – Curvas de Termogravimetria (1) e Termogravimetria diferencial (2) dos óxidos de grafeno GO150w, GO7Kw e GONaNO₃.

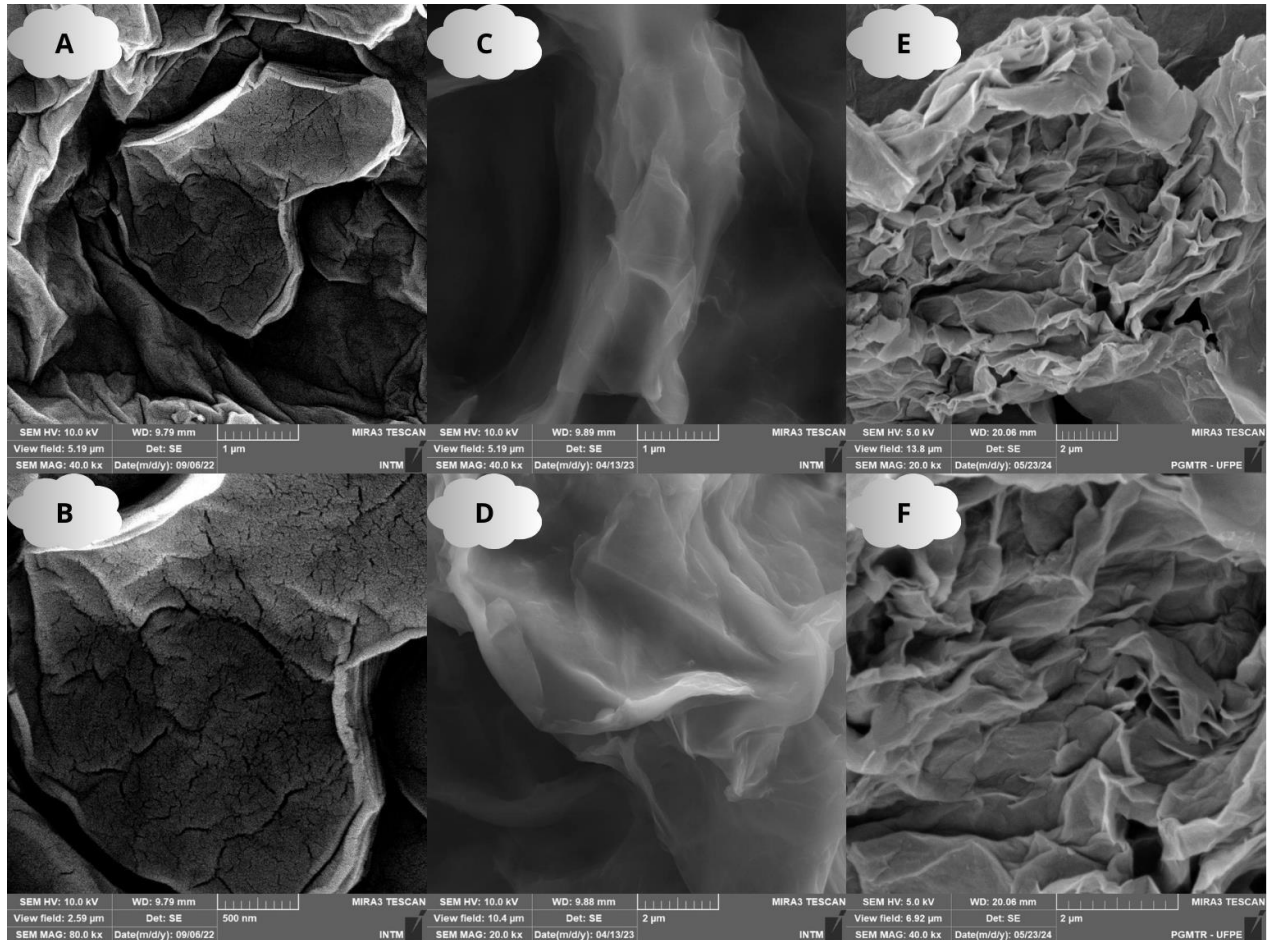


Fonte: A autora (2024)

A Microscopia Eletrônica de varredura (MEV) é um método bastante utilizado para caracterização de estruturas de grafeno e seu óxido, permitindo ver a superfície morfológica das folhas (ADETAYO; RUNSEWE, 2019). Nas imagens de MEV do GO150W (Figura 12 A e B), é possível observar folhas mais alongadas e rugosas, passando um aspecto de folhas dobradas e empilhadas. Na imagem do GO7Kw (Figura 12 C e D) é possível observar um aspecto mais liso, sendo observadas as bordas da folha e uma leve rugosidade no interior, parecidas com dobras. As superfícies mais lisas do GO7K favorecem na formação de filmes finos essenciais para revestimentos mais homogêneos, mas essa característica pode reduzir a interação direta das folhas com as células bacterianas, diminuindo a eficácia antimicrobiana. Os microrganismos patogênicos têm um tamanho médio de 1µm. Já

a superfície mais rugosa do GO150w oferece um efeito de barreira e potencializa a interação direta com bactérias, resultando em danos mecânicos.

Figura 12 – Imagem de MEV em sequência: (A e B) GO150w nas magnificações 40kx e 80kx, respectivamente; (C e D) GO7Kw nas magnificações 40kx e 60kx, respectivamente; (E e F) GONaNO₃ nas magnificações 40kx e 60kx, respectivamente.

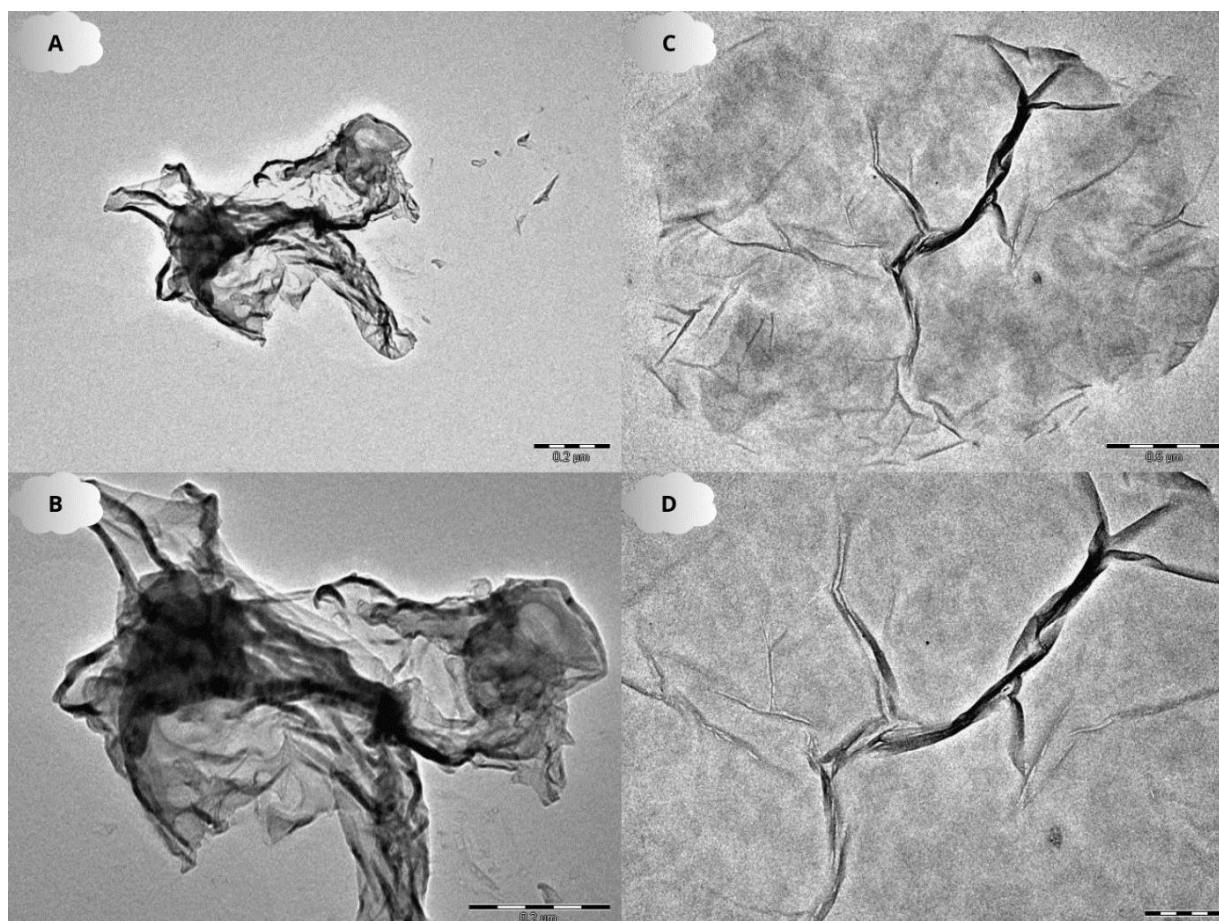


Fonte: A autora (2024)

O tamanho das folhas foi determinado por meio da microscopia eletrônica de transmissão (Figura 13), resultando em um tamanho médio de 0,3 μ m para a amostra de GO7kW e uma média de 3,9 μ m do GONaNO₃. Brisebois e Siaj (2020), definiram que existem três faixas de tamanho para o GO: grandes (> 20 μ m), médias (2-20 μ m) e pequenas (< 2 μ m). Conforme observado por Ravikumar et al. (2022), o tamanho das folhas de GO desempenha um papel importante na interação com as bactérias, uma vez que folhas menores demonstram maior eficácia na indução da morte

bacteriana por meio do estresse oxidativo, enquanto folhas maiores tendem a ser mais bacteriostáticas.

Figura 13 – Imagem de MET em sequência: (A e B) GO7Kw 18kx e 20kx, respectivamente; (C e D) GONaNO₃ 18kx e 20kx, respectivamente



Fonte: A autora (2024)

5.2 Potencial Zeta

A análise dos resultados do ζ -potencial médio para as três amostras de óxido de grafeno revela um padrão consistente de carga elétrica negativa nas partículas em suspensão. Na amostra GO150W, a média do ζ -potencial foi $-0,03 \pm 0,0001$ mV enquanto na GO7KW foi $-33,87 \pm 0,15$ mV, e na GONaNO₃ foi $-28,26 \pm 0,10$ mV. O potencial zeta do GO em água geralmente varia entre -30mV a -60mV, esses valores negativos indicam repulsão eletrostática entre as partículas, contribuindo para a estabilidade das suspensões. Os resultados mostram uma tendência baixa a

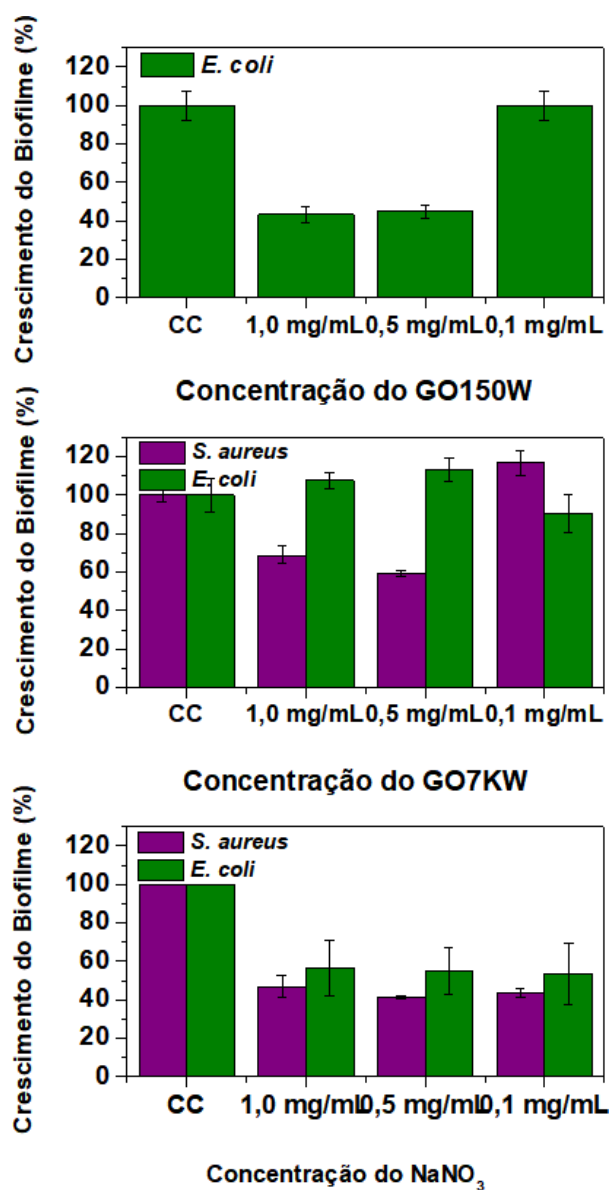
aglomeração, com o GO7KW e GONaNO₃ apresentando valores indicando uma maior estabilidade em comparação com ao GO150W.

5.3 Testes anti-biofilme

5.3.1 Avaliação atividade antibiofilme do óxido de grafeno (GO)

As amostras sintetizadas de óxido de grafeno foram testadas quanto a sua capacidade de inibir a formação de biofilmes bacterianos. As concentrações utilizadas de GO foram 1,0 mg/mL, 0,5 mg/mL e 0,1 mg/mL, conforme detalhado na Figura 13. Na amostra de GO150W é possível observar inibição para *Escherichia coli* de $56,7 \pm 6,06\%$ na concentração de 1,0 mg/mL e $55,3 \pm 4,12\%$ na concentração de 0,5 mg/mL, a concentração de 0,1 mg/mL não apresentou resultados significativos, resultado relacionado a sua quantidade de grupos carboxílicos e hidroxilas que aumentam a reatividade superficial e a capacidade de interação com membranas bacterianas. Porém, durante o desenvolvimento do teste foi observado que a solução de grafeno havia decantado após 24h, apresentando baixa estabilidade em meio aquoso, o que poderia induzir a erros de reprodutibilidade e confiabilidade dos resultados. A amostra de GO 7Kw apresentou resultados não satisfatórios, com pouca ou nenhuma atividade antibiofilme frente às bactérias testadas, tendo como principal relação a menor quantidade de grupos funcionais ativou a uma distribuição menos eficiente desses grupos na superfície e bordas de suas folhas. Na amostra de GONaNO₃ é possível observar uma maior inibição da formação do biofilme frente a bactéria *Staphylococcus aureus* de $53,1 \pm 5,8\%$ na concentração de 1,0 mg/mL e cerca de $58,9 \pm 0,9\%$ na concentração de 0,5 mg/mL. Na inibição de biofilmes formados pela bactéria *E. coli* foi possível observar redução de $43,4 \pm 14,3\%$ na concentração de 1,0 mg/mL e $44,9 \pm 12,1\%$ em 0,5 mg/mL, destacando uma configuração otimizada dos seus grupos funcionais em sua superfície e bordas, causando danos oxidativos e rupturas da membrana bacteriana, resultando em uma inibição maior do biofilme. Dessa forma o GO NaNO₃ apresentou o melhor resultado microbiológico, sendo o material escolhido para dar prosseguimento às etapas de revestimento das superfícies de titânio com PMMA e GO que serão apresentadas.

Figura 14 – Gráficos representando as concentrações de crescimento de biofilme nas amostras de GO150w, GO7Kw e GONaNO₃.

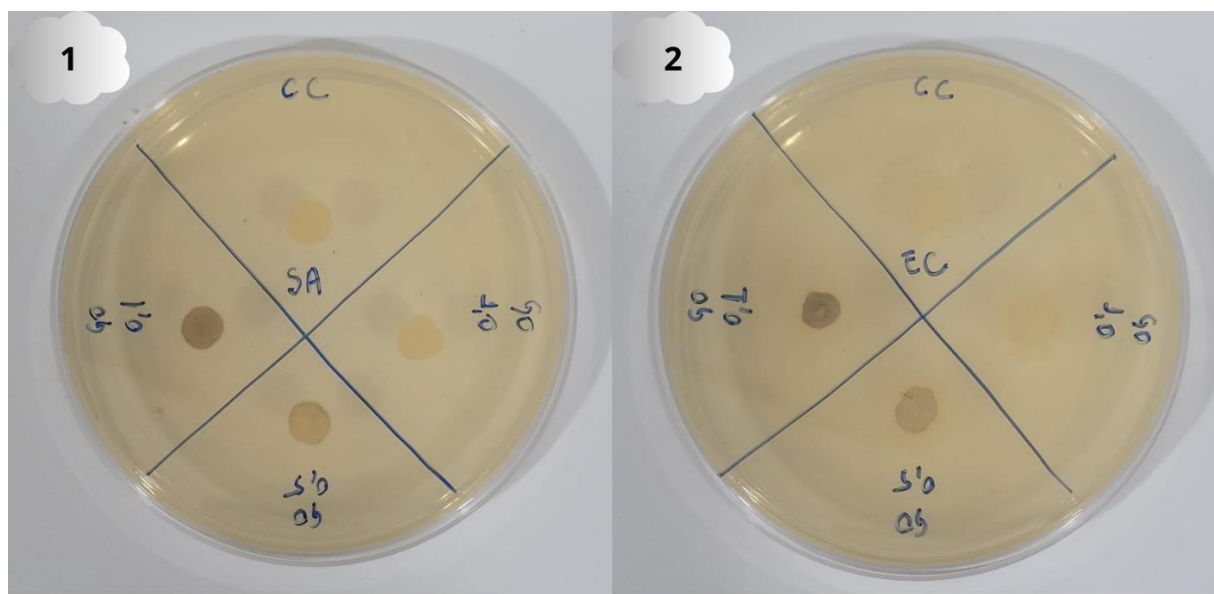


Fonte: A autora (2024)

O teste de avaliação de morte bacteriana revelou que o óxido de GONaNO₃ apresenta a capacidade de reduzir a formação de biofilme bacteriano, porém não resulta na morte direta das bactérias. Em outras palavras, o óxido de grafeno demonstrou eficácia em inibir o crescimento do biofilme formado pelas bactérias, mas não foi capaz de eliminar completamente as bactérias presentes no meio. Embora os grupos funcionais possam gerar espécies reativas de oxigenio que danificam a matriz do biofilme, a quantidade gerada pode não ser suficiente para causar a morte do microorganismo. Os grupos funcionais podem se ligar à

membrana bacteriana causando estresse oxidativo e impedindo a adesão, mas sem penetrar ou causar danos fatais à bactéria.

Figura 15 – Teste de avaliação de morte bacteriana do GONaNO₃. (1) Teste com a bactéria *S. aureus* (2) teste com a bactéria *E. coli*.



Fonte: A autora (2024)

5.4 Testes físicos das variações do PMMA

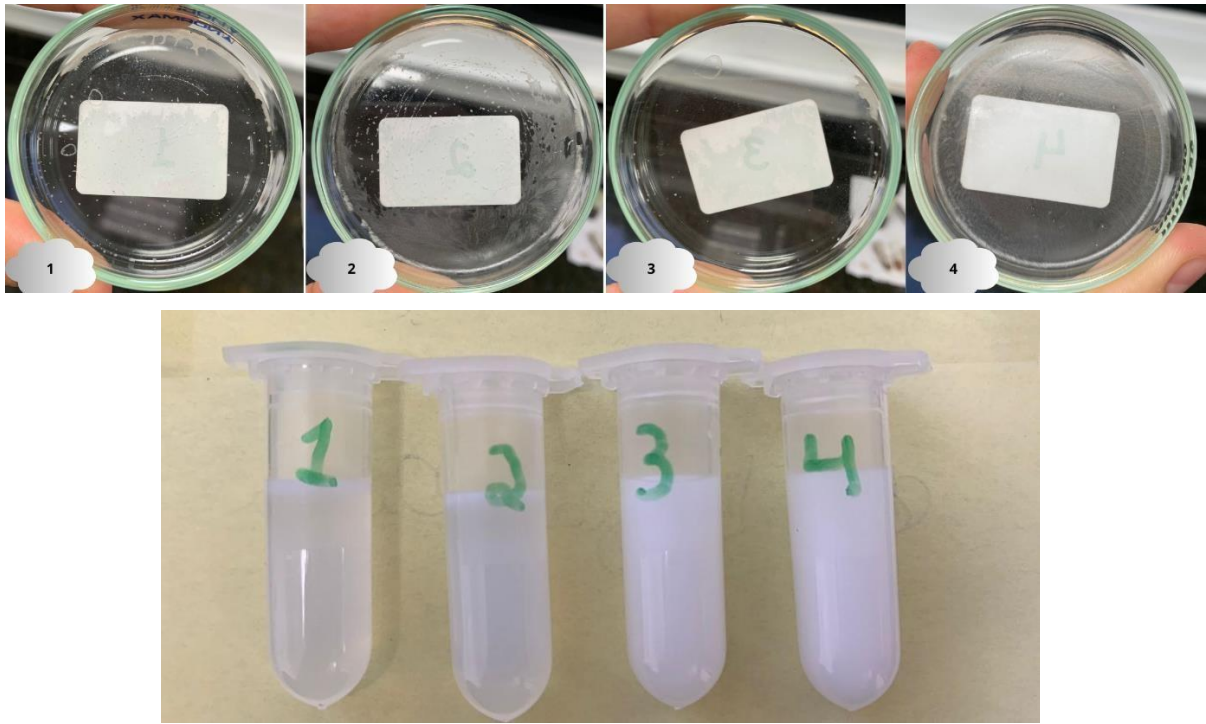
Foram realizadas análises reológicas, de infravermelho e de microscopia eletrônica de varredura (MEV) para examinar os revestimentos de PMMA, além da avaliação de diversas concentrações de reagente para a síntese do polímero. As amostras sintetizadas foram avaliadas de forma qualitativa, quanto às suas características de rigidez, flexibilidade, opacidade, transparência e adesão (tabela2, Figura 16). De maneira geral, a amostra 3 apresentou características mais desejáveis para as aplicações como alta adesão, transparência e flexibilidade e foi a síntese escolhida para realizar os revestimentos.

Tabela 2 – Avaliação física qualitativa das amostras de PMMA.

Característica	Amostra 1	Amostra 2	Amostra 3	Amostra 4
Rigidez	Alta	Alta	Média	Baixa
Flexibilidade	Baixa	Baixa	Média	Alta
Opacidade	Baixa	Baixa	Média	Alta
Transparência	Alta	Alta	Média	Baixa
Aderência	Média	Média/Baixa	Alta	Baixa

Fonte: A autora (2024).

Figura 16 – Avaliação física qualitativa das amostras de PMMA em placas de Petri e eppendorfs.



Fonte: A autora (2024).

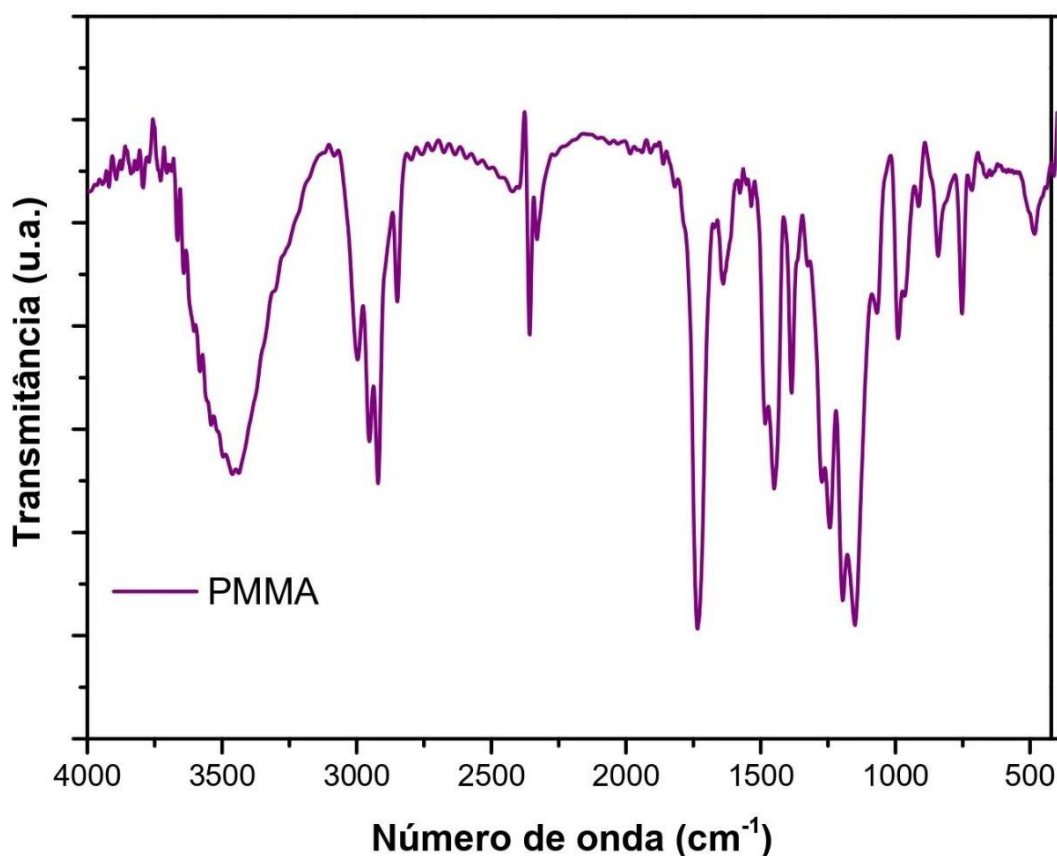
5.5 Análise de composição química do PMMA

Foram avaliados dois tipos de compósitos: PMMA puro e PMMA com óxido de grafeno (GO) inserido de duas maneiras distintas. A fim de otimizar a dispersão do GO no PMMA, na primeira abordagem, o GO foi misturado diretamente ao metacrilato de metila (MMA) e a síntese foi realizada imediatamente em seguida (MMA/GO). Na segunda abordagem, o GO foi adicionado ao etanol após a mistura

de MMA com peróxido de benzoíla (BPO) (ETOH/GO), após 3h de síntese e deixado sob agitação por 3 minutos.

No espectro de FTIR do polímero é possível observar bandas características do metacrilato, como a carbonila (C=O), localizada em 1730 cm^{-1} , e em 1630 cm^{-1} atribuída ao grupo C=C. Segundo Namouchi e colaboradores (2009), as vibrações presentes em 1140 , 1190 cm^{-1} e 1240 , 1265 cm^{-1} correspondem ao estiramento de C-O da função éster presente na estrutura do PMMA. Também é possível observar as absorções em torno de 1440 e 1480 cm^{-1} , que representam as vibrações assimétricas de flexão das ligações (C-CH₃) e (C-CH₂).

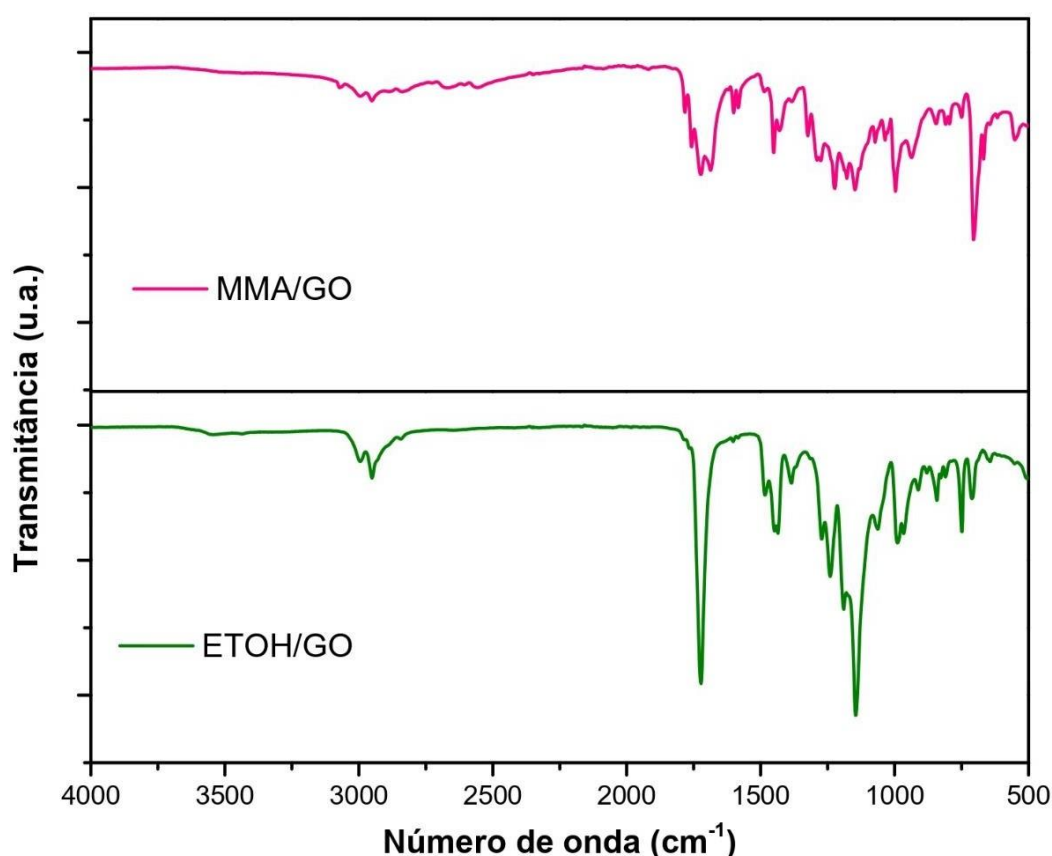
Figura 17 – Espectro de infravermelho da amostra de PMMA feita pelo método KBR.



Fonte: A autora (2024)

No gráfico do ETOH/GO, é observável a presença de grupos carboxílicos em torno de 1720 cm^{-1} referente a C=O e 1132 cm^{-1} referente ao estiramento C-O, identificado no processo de polimerização do PMMA, banda não encontrada na amostra MMA/GO. O MMA/GO apresenta a banda referente a C=O em 1715 cm^{-1} e a banda referente a C=C em 1589 cm^{-1} . A amostra de MMA/GO não apresenta a bandas referente ao estiramento C-O, característica do PMMA, o que significa que o óxido de grafeno alterou a estrutura do polímero. Por isso, o material ETOH/GO apresentou resultados mais favoráveis de polimerização do MMA e inserção do GO comparado ao MMA, que demonstrou a perda de bandas significativas para o material.

Figura 18 – Espectro de infravermelho das amostras PMMA com GO sintetizado diretamente no MMA e PMMA com GO sintetizado após o final da síntese, feitas por ATR e convertidas de absorbância para transmitância.

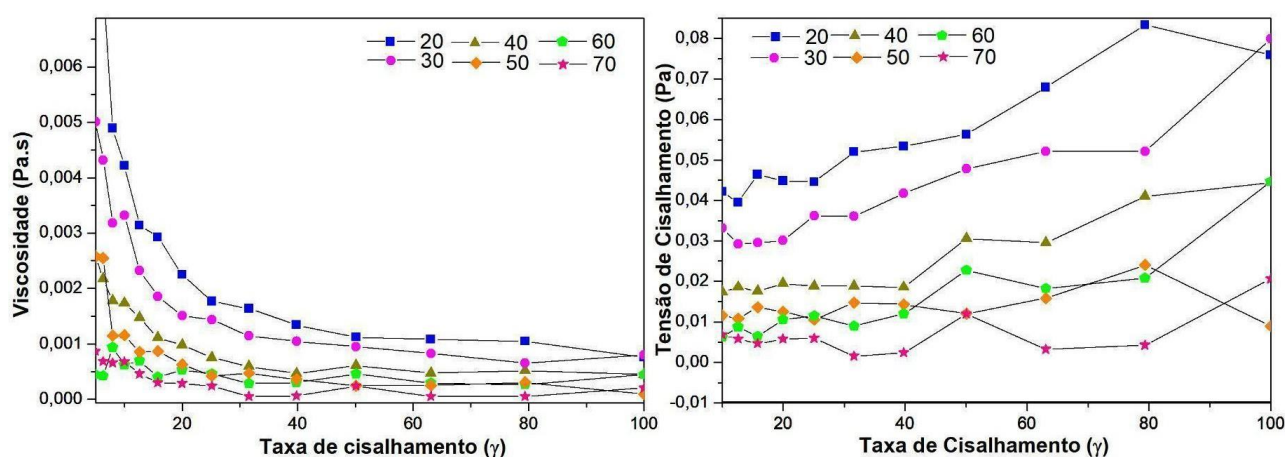


Fonte: A autora (2024)

A reologia estuda as deformações de materiais provocadas pela aplicação de uma tensão (IICIKOVA, et al. 2023). A análise reológica do PMMA em temperaturas

variadas proporciona a compreensão de sua resposta ao fluxo e elasticidade, como mostrado na Figura 18, a viscosidade do PMMA diminui à medida que a temperatura aumenta, devido à redução das forças intermoleculares que mantêm sua estrutura organizada. A relação entre a taxa de cisalhamento e a tensão de cisalhamento revela diferentes regimes de comportamento, com o aumento da temperatura, a viscosidade do PMMA diminui, o que amplia a faixa na qual ele exibe comportamento pseudoplástico em temperaturas até 50°C, em temperaturas acima de 60°C ele adquire um comportamento newtoniano, já que as cadeias poliméricas ganham mobilidade e a resistência ao fluxo diminui (SATO e CUNHA, 2007). Adicionalmente, nota-se que o PMMA pode exibir um comportamento não newtoniano, a viscosidade varia com a taxa de deformação ou tensão de cisalhamento aplicada, cujas características são influenciadas por alterações na estrutura molecular e por transições de fase. Essa análise foi fundamental para determinar a temperatura em que seriam investigadas as diferenças entre o PMMA puro e o PMMA/GO, levando à escolha da temperatura de 50°C, já que ela apresenta uma viscosidade mais constante.

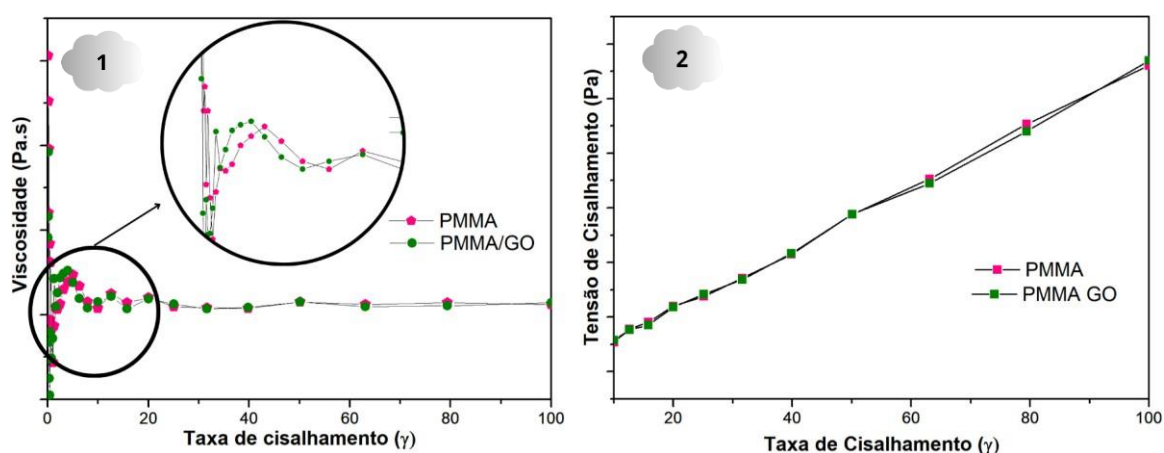
Figura 19 – Reologia do PMMA em função da variação da temperatura (20°C à 70°C).



Fonte: A autora (2024)

Foram realizados ensaios de tensão de cisalhamento e viscosidade aplicando taxa de cisalhamento, em triplicata. Na Figura 19 é possível observar uma leve variação de viscosidade entre o PMMA e o PMMA/GO. No entanto, a adição do GO não influenciou significativamente o comportamento reológico do PMMA. Na Figura 19 é possível observar um comportamento Newtoniano, exibindo a diminuição da resistência do fluido fazendo com que a viscosidade se torne menos dependente da taxa de cisalhamento.

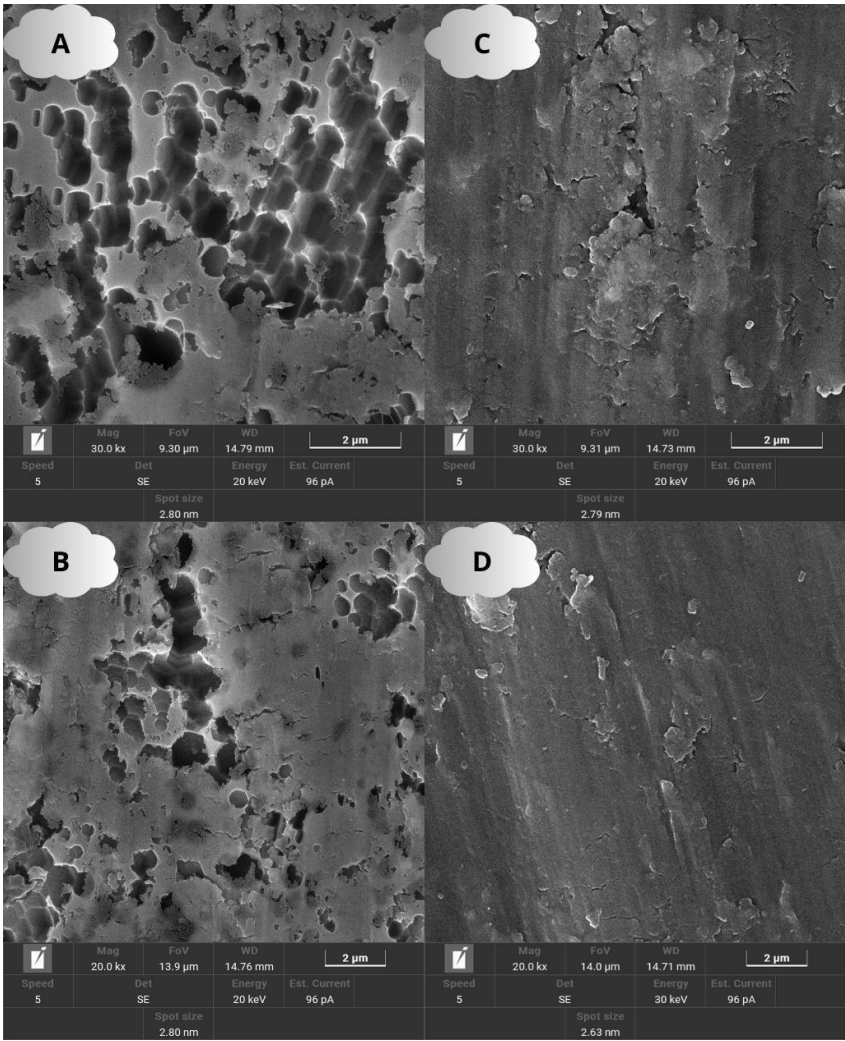
Figura 20 – Reologia do PMMA em função da viscosidade (1) e tensão de cisalhamento (2).



Fonte – A autora (2024).

Foram realizadas imagens de microscopia eletrônica de varredura da placa de titânio após ataque químico (Figura 17 A e B) e da placa de titânio revestida com PMMA/GO (Figura 17 C e D). É perceptível a presença de defeitos na superfície da placa após o ataque químico, os quais foram completamente cobertos pelo revestimento.

Figura 21 – Imagem de microscopia eletrônica de varredura de placa de titânio com ataque químico nas figuras A (30kx) e B (20kx) e placa de titânio revestida com PMMA/GO nas figuras C (30kx) e D (20kx).



Fonte – A autora (2024).

Em conclusão, os resultados obtidos através da caracterização físico-química dos óxidos de grafeno e dos testes de aplicação dos revestimentos de PMMA destacam o potencial desses materiais para a aplicações em dispositivos médicos.

6. Conclusão

A caracterização das amostras de óxido de grafeno (GO150w, GO7Kw e GONaNO₃) por meio de técnicas analíticas variadas revelou diferenças significativas em suas estruturas e composições químicas. A análise de espectroscopia Raman destacou variações nas intensidades das bandas D e G, indicando diferentes níveis de defeitos estruturais e cristalinos. O FTIR corroborou essas observações ao identificar grupos funcionais (carboxílicos, epóxi e hidroxilas), esses presentes na estrutura do óxido de grafeno.

A difração de raios X (DRX) confirmou a efetividade da oxidação do grafite precursor, apresentando picos característicos do óxido de grafeno e evidenciando diferenças na quantidade de folhas obtidas entre as amostras. A análise termogravimétrica (TGA) apontou variações na estabilidade térmica e na decomposição dos grupos funcionais conforme a temperatura aumentava, com GO7Kw e GONaNO₃ apresentando maior perda de massa, refletindo sua maior oxidação.

As imagens obtidas por microscopia eletrônica de varredura (MEV) e transmissão (MET) revelaram diferenças morfológicas e de tamanho das folhas de GO. O GO7Kw mostrou superfícies mais lisas e menores tamanhos de folha, enquanto o GO150w exibiu uma superfície mais rugosa. Esse perfil morfológico correlaciona-se com os resultados dos testes antimicrobianos, que demonstraram que GO150w tem uma eficácia notável na inibição de biofilmes de *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*, mesmo em concentrações relativamente baixas.

Esses achados destacam o potencial do óxido de grafeno como material promissor para aplicações biomédicas, especialmente devido à sua atividade antibiofilme. A otimização do método de síntese resultou em um material com bom nível de oxidação e grupos funcionais bem definidos, características que favoreceram uma ação antibiofilme mais eficiente. Embora os revestimentos em placas metálicas feitos por *blade coating* tenham gerado filmes ainda não completamente homogêneos — com presença de aglomerados de GO em algumas regiões da superfície —, esses resultados representam um avanço na utilização de

GO em dispositivos biomédicos, com possibilidade de aprimoramentos futuros na técnica de revestimento para melhorar a uniformidade do filme.

Perspectivas

Como perspectiva, é importante visar a diminuição do tamanho das folhas do GO e promover avaliações microbiológicas do revestimento PMMA/GO nas placas de titânio, as quais as amostras já estão preparadas. Os testes antibiofilme indicaram que GONaNO_3 é mais eficaz contra a formação de biofilmes bacterianos, sugerindo seu potencial para revestimentos antimicrobianos em dispositivos médicos e superfícies hospitalares. No entanto, melhorias são necessárias para aumentar a capacidade bactericida direta, como a diminuição do tamanho das folhas do GO e sua rugosidade. A morfologia das folhas de grafeno influencia sua interação com células bacterianas, assim como seu tamanho. São necessários testes microbiológicos com as placas revestidas com PMMA/GO adquiridas por meio da deposição por blade coating. Além disso, é importante a otimização da deposição do revestimento nas placas de titânio para a obtenção de um revestimento mais homogêneo.

REFERÊNCIAS

ADETAYO, A.; RUNSEWE, D. Synthesis and fabrication of graphene and graphene oxide: A review. **Open Journal of Composite Materials**, v. 09, n. 02, p. 207–229, 2019.

AL-GAASHANI, R. et al. XPS and structural studies of high quality graphene oxide and reduced graphene oxide prepared by different chemical oxidation methods. **Ceramics international**, v. 45, n. 11, p. 14439–14448, 2019.

AMIRABAD, L. M. et al. Preparation and characterization of TiO₂-coated polymerization of methyl methacrylate (PMMA) for biomedical applications: In vitro study. **Asia-Pacific journal of chemical engineering**, v. 17, n. 3, 2022.

ARMBRUSTER, C. R.; PARSEK, M. R. New insight into the early stages of biofilm formation. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 115, n. 17, p. 4317–4319, 2018.

BALTATU, M. S. et al. Research progress of titanium-based alloys for medical devices. **Biomedicines**, v. 11, n. 11, p. 2997, 2023.

BELLIER, N. et al. Recent biomedical advancements in graphene oxide- and reduced graphene oxide-based nanocomposite nanocarriers. **Biomaterials research**, v. 26, n. 1, 2022.

BOUŠA, M. et al. *In situ* Raman spectroelectrochemistry of graphene oxide: <I>In situ</i> Raman spectroelectrochemistry of graphene oxide. **Physica status solidi. B, Basic research**, v. 250, n. 12, p. 2662–2667, 2013.

BRÅNEMARK, P. I. et al. Osseointegrated implants in the treatment of the edentulous jaw. Experience from a 10-year period. **Scandinavian journal of plastic and reconstructive surgery. Supplementum**, v. 16, p. 1–132, 1977.

BRISEBOIS, P. P.; SIAJ, M. Harvesting graphene oxide – years 1859 to 2019: a review of its structure, synthesis, properties and exfoliation. **Journal of materials chemistry. C, Materials for optical and electronic devices**, v. 8, n. 5, p. 1517–1547, 2020.

CAMARGO, E. R. et al. Bioactive response of PMMA coating obtained by electrospinning on ISO5832-9 and Ti6Al4V biomaterials. **Surface & coatings technology**, v. 412, n. 127033, p. 127033, 2021.

CASTILLO, J. J. et al. Detection of cancer cells using a peptidenanotube–folic acid modified graphene electrode. **The Analyst**, v. 138, n. 4, p. 1026–1031, 2013.

CHEN, Y.-F.; GOODHEART, C.; RUA, D. The body's cellular and molecular response to protein-coated medical device implants: A review focused on fibronectin and BMP proteins. **International journal of molecular sciences**, v. 21, n. 22, p. 8853, 2020.

CORSO, M. et al. Graphene oxide synthesis for composite material preparation. **Revista Ibero-Americana de Ciências Ambientais**, v. 10, n. 1, p. 157–166, 2019.

DI SOMMA, A. et al. Antimicrobial and antibiofilm peptides. **Biomolecules**, v. 10, n. 4, p. 652, 2020.

ESTEVEES, G. M. et al. Antimicrobial and antibiofilm coating of dental implants—past and new perspectives. **Antibiotics (Basel, Switzerland)**, v. 11, n. 2, p. 235, 2022.

FANIYI, I. O. et al. The comparative analyses of reduced graphene oxide (RGO) prepared via green, mild and chemical approaches. **SN applied sciences**, v. 1, n. 10, 2019.

FANTON, L. et al. Proliferation of osteoblast precursor cells on the surface of TiO₂ nanowires anodically grown on a β -type biomedical titanium alloy. **Scientific reports**, v. 12, n. 1, 2022.

FARIVAR, F. et al. Thermogravimetric analysis (TGA) of graphene materials: Effect of particle size of graphene, graphene oxide and graphite on thermal parameters. **C – Journal of Carbon Research**, v. 7, n. 2, p. 41, 2021.

GHEORGHE, D. C. et al. Preventing biofilm formation and development on ear, nose and throat medical devices. **Biomedicines**, v. 9, n. 8, p. 1025, 2021.

HAKIM, L. K. et al. The current applications of nano and biomaterials in drug delivery of dental implant. **BMC oral health**, v. 24, n. 1, 2024.

HARB, S. V. et al. Hydroxyapatite and β -TCP modified PMMA-TiO₂ and PMMA-ZrO₂ coatings for bioactive corrosion protection of Ti6Al4V implants. **Materials science & engineering. C, Materials for biological applications**, v. 116, n. 111149, p. 111149, 2020.

ILCIKOVA, M. et al. Influence of PMMA brushes grafted from GO on rheological properties of PMMA/SAN immiscible blend in shear and elongation flow. **Polymer**, v. 279, n. 126015, p. 126015, 2023.

JOSEPH, R. et al. Cationic pillararenes potently inhibit biofilm formation without affecting bacterial growth and viability. **Journal of the American Chemical Society**, v. 138, n. 3, p. 754–757, 2016.

KAUR, M.; SINGH, K. Review on titanium and titanium based alloys as biomaterials for orthopaedic applications. **Materials science & engineering. C, Materials for biological applications**, v. 102, p. 844–862, 2019.

KRISHNAMOORTHY, K. et al. Antibacterial activity of graphene oxide nanosheets. **Science of advanced materials**, v. 4, n. 11, p. 1111–1117, 2012.

KUMAR, P. et al. Antibacterial properties of graphene-based nanomaterials. **Nanomaterials (Basel, Switzerland)**, v. 9, n. 5, p. 737, 2019.

MANDAL, P.; GHOSH, S. K.; GREWAL, H. S. Graphene oxide coated aluminium as an efficient antibacterial surface. **Environmental technology & innovation**, v. 28, n. 102591, p. 102591, 2022.

MING, X. et al. Micro-arc oxidation in titanium and its alloys: Development and potential of implants. **Coatings**, v. 13, n. 12, p. 2064, 2023.

MINITHA et al. Adsorption behaviour of reduced graphene oxide towards cationic and anionic dyes: Co-action of electrostatic and $\pi - \pi$ interactions. **Materials chemistry and physics**, v. 194, p. 243–252, 2017.

NAJAFI, F.; RAJABI, M. Thermal gravity analysis for the study of stability of graphene oxide–glycine nanocomposites. **International nano letters**, v. 5, n. 4, p. 187–190, 2015.

OLCZAK, K.; JAKUBOWSKI, W.; SZYMAŃSKI, W. Bactericidal activity of graphene oxide tests for selected microorganisms. **Materials**, v. 16, n. 11, p. 4199, 2023.

PÉREZ, A. N. et al. Graphene oxide with the addition of different values of Ag nanoparticles. **Journal of physics. Conference series**, v. 1221, n. 1, p. 012013, 2019.

PUNSET, M. et al. Mechanical characterization of dental prostheses manufactured with PMMA–graphene composites. **Materials**, v. 15, n. 15, p. 5391, 2022.

RAHMAN, F. et al. A review of polymethyl methacrylate (PMMA) as a versatile lithographic resist – With emphasis on UV exposure. **Microelectronic engineering**, v. 224, n. 111238, p. 111238, 2020.

SAEED, S. I. et al. Antimicrobial activities of graphene oxide against biofilm and intracellular *Staphylococcus aureus* isolated from bovine mastitis. **BMC veterinary research**, v. 19, n. 1, 2023.

SATO, A. C. K.; CUNHA, R. L. DA. Influência da temperatura no comportamento reológico da polpa de jabuticaba. **Food Science and Technology**, v. 27, n. 4, p. 890–896, 2007.

SAUER, K. et al. The biofilm life cycle: expanding the conceptual model of biofilm formation. **Nature reviews. Microbiology**, v. 20, n. 10, p. 608–620, 2022.

SHANG, L. et al. Graphene and graphene oxide for tissue engineering and regeneration. Em: **Theranostic Bionanomaterials**. [s.l.] Elsevier, 2019. p. 165–185.

SHARMA, R.; MAHTO, V.; VUTHALURU, H. Synthesis of PMMA/modified graphene oxide nanocomposite pour point depressant and its effect on the flow properties of Indian waxy crude oil. **Fuel (London, England)**, v. 235, p. 1245–1259, 2019.

SHRIDHAR, P. et al. A review of PMMA bone cement and intra-cardiac embolism. **Materials**, v. 9, n. 10, p. 821, 2016.

SONG, C. et al. Influences of graphene oxide on biofilm formation of gram-negative and gram-positive bacteria. **Environmental science and pollution research international**, v. 25, n. 3, p. 2853–2860, 2018.

STYKOVÁ, E. et al. Antibiofilm Activity of Weissella spp. and Bacillus coagulans Isolated from Equine Skin against Staphylococcus aureus. **Life (Basel, Switzerland)**, v. 12, n. 12, p. 2135, 2022.

SUREKHA, G. et al. FTIR, Raman and XRD analysis of graphene oxide films prepared by modified Hummers method. **Journal of physics. Conference series**, v. 1495, n. 1, p. 012012, 2020.

SYPNIEWSKA, J.; SZKODO, M. Influence of laser modification on the surface character of biomaterials: Titanium and its alloys—A review. **Coatings**, v. 12, n. 10, p. 1371, 2022.

TRAN, P. A.; WEBSTER, T. J. Antimicrobial selenium nanoparticle coatings on polymeric medical devices. **Nanotechnology**, v. 24, n. 15, p. 155101, 2013.

TZORTZIS, S. et al. A ten-year review of soft tissue reactions around percutaneous titanium implants for auricular prosthesis. **The Laryngoscope**, v. 125, n. 8, p. 1934–1939, 2015.

VELASCO-HERNÁNDEZ, A. et al. Synthesis and characterization of graphene oxide - TiO₂ thin films by sol-gel for photocatalytic applications. **Materials science in semiconductor processing**, v. 114, n. 105082, p. 105082, 2020.

WANG, L. et al. Bio-multifunctional smart wearable sensors for medical devices. **Advanced intelligent systems (Weinheim an der Bergstrasse, Germany)**, v. 1, n. 5, 2019.

WU, X. et al. Antibacterial and antibiofilm efficacy of the preferred fractions and compounds from *Euphorbia humifusa* (herba euphorbiae humifusae) against *Staphylococcus aureus*. **Journal of ethnopharmacology**, v. 306, n. 116177, p. 116177, 2023.

XU, T. et al. Near-infrared II light-assisted Cu-containing porous TiO₂ coating for combating implant-associated infection. **Colloids and surfaces. B, Biointerfaces**, v. 234, n. 113744, p. 113744, 2024.

YANG, F. et al. Fabrication of graphene oxide/copper synergistic antibacterial coating for medical titanium substrate. **Journal of colloid and interface science**, v. 638, p. 1–13, 2023.

ANEXO A – ÓXIDO DE GRAFENO REDUZIDO

A redução do óxido de grafeno foi feita devido a relatos na literatura da eficiência do material frente a testes microbiológicos. Ao reduzir o óxido de grafeno, os grupos funcionais de oxigênio presentes na sua estrutura são removidos ou reduzidos, resultando em um material com propriedades mais semelhantes ao grafeno puro.

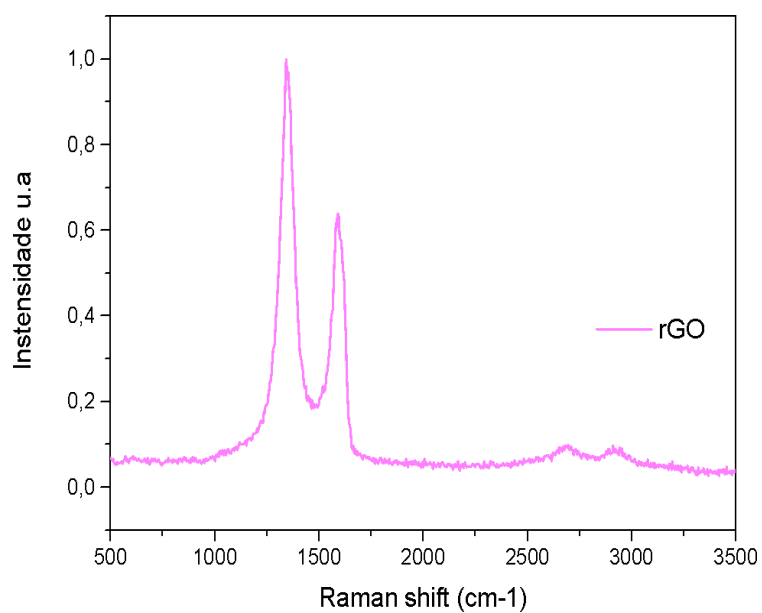
Obtenção de óxido de grafeno reduzido (rGO)

Foi pesado 1,0 g do óxido de grafeno, preparado anteriormente, e colocado em um béquer de 500 mL com 30 mL de água destilada. Em seguida, foi colocado em um banho de ultrassom por 1h. A essa dispersão foi adicionado 20 mL de solução de borohidreto de sódio (30%) e foi colocado em uma chapa de agitação. Quando a temperatura de 80 ° C foi atingida, foi mantida a agitação durante 1h. Logo depois, foi lavada sucessivas vezes com água destilada até neutralizar o pH. Por fim, foi seco em estufa a 80° C por 8h.

Caracterização físico-química do rGO

A técnica Raman é amplamente empregada na caracterização de materiais carbonáceos, destacando-se pela capacidade de fornecer informações cruciais, como o número de camadas, tensão, dopagem e, especialmente, no caso de materiais desordenados, oferecer dados qualitativos sobre o grau de desordem (BOUŠA et al., 2013). No óxido de grafeno reduzido (rGO), a presença das bandas D, G e 2D é comum. No entanto, é notável que na amostra de rGO, a intensidade da banda D é geralmente menor em comparação com o observado no precursor de óxido de grafeno. Isso se deve ao fato de que durante a redução do GO para rGO, ocorre a diminuição dos grupos funcionais, resultando conseqüentemente em menos defeitos estruturais.

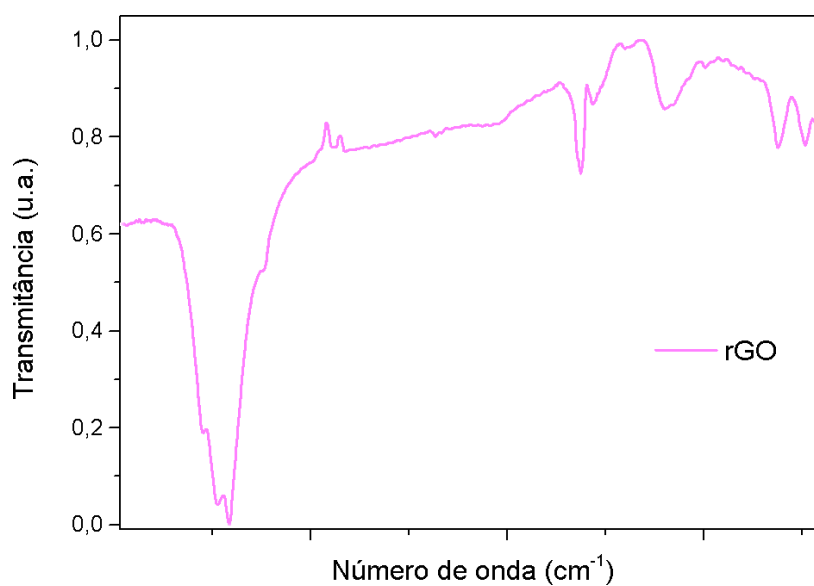
Figura A1 – Espectros Raman do óxido de grafeno reduzido



Fonte: A autora (2024)

Diferente do GO, no FTIR do rGO é possível observar a diminuição dos grupos funcionais, tratando-se de um indicio que o GO foi esfoliado corretamente e, portanto, reduzido.

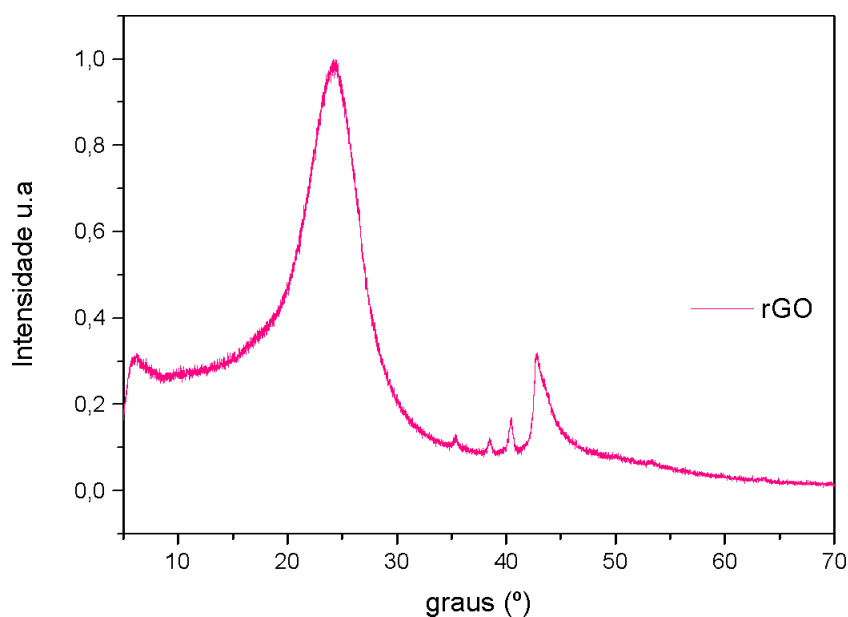
Figura A2 – Espectro de infravermelho do rGO.



Fonte: A autora (2024)

O principal pico de difração de raio x do óxido de grafeno reduzido é observado em torno de um ângulo de difração 2θ de aproximadamente 25° , indicativo da sobreposição das camadas de grafeno. Esse pico reflete o espaçamento interplanar do característico da estrutura cristalina do grafeno. Na figura 18 é possível observar esse pico característico, comprovando a identidade da amostra.

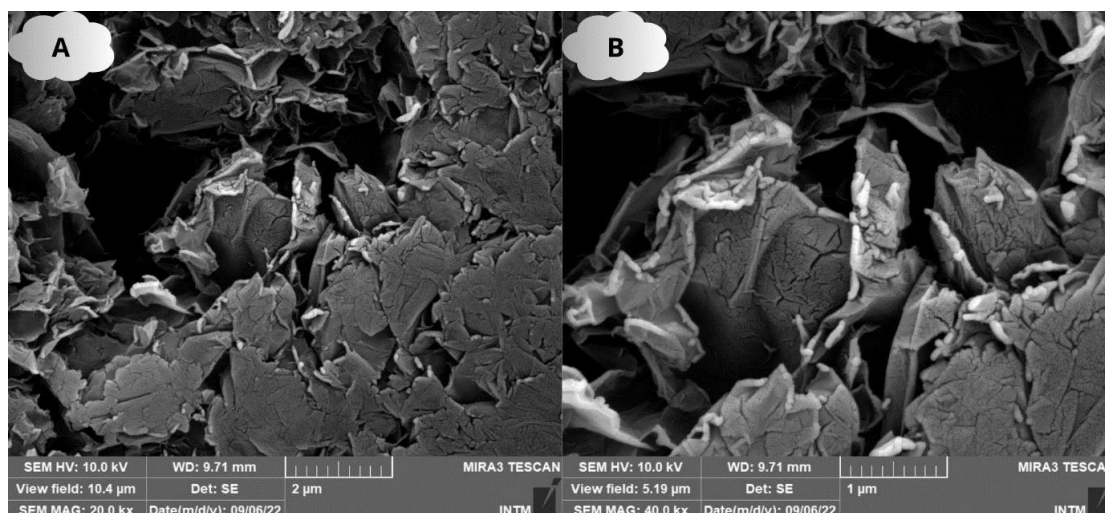
Figura A3 – Difração de raio x do rGO.



Fonte: A autora (2024)

Nas imagens de MEV do rGO é visto folhas menores que as de GO e mais próximas umas às outras. Em magnificações maiores, é possível observar rugosidades nas folhas dos materiais, assim como visto por Kusiak-Nejman et al. (2020) que enfatiza as várias camadas empilhadas do óxido de grafeno reduzido. As imagens de MEV comprovam a oxidação do grafeno e sua redução (ABASZADE, 2022).

Figura A4– Imagem de MEV em sequência: (A) rGO mg: 20kx e (B) rGO mg: 40kx.



Fonte: A autora (2024)

Avaliação atividade antimicrobiana por disco difusão do rGO

Para avaliar o potencial antimicrobiano do óxido de grafeno reduzido (rGO) foi realizado um teste de difusão em meio frente *Staphylococcus epidermidis*, uma vez que o rGO não dispersa em água e não pode ser disperso em solventes tóxicos. Para este teste um disco de rGO foi obtido através da prensagem do material. Placas de Petri contendo meio BHI Ágar foram semeadas com uma suspensão bacteriana em escala de turbidez de 1 McFarland e o disco de rGO colocado na superfície do meio. O material foi incubado em estufa a 37°C para permitir o crescimento bacteriano. Após 24h foi observado que não houve formação de halo de inibição do crescimento bacteriano, ou seja, o rGO não foi eficaz para inibir o crescimento bacteriano nesta metodologia testada. Dessa forma, como o rGO não está entre os objetivos do projeto, foi decidido não continuar utilizando esse material nos próximos testes.

Figura A5 – Teste de formação de halo de inibição do rGO frente a cepa de *Staphylococcus epidermidis*.

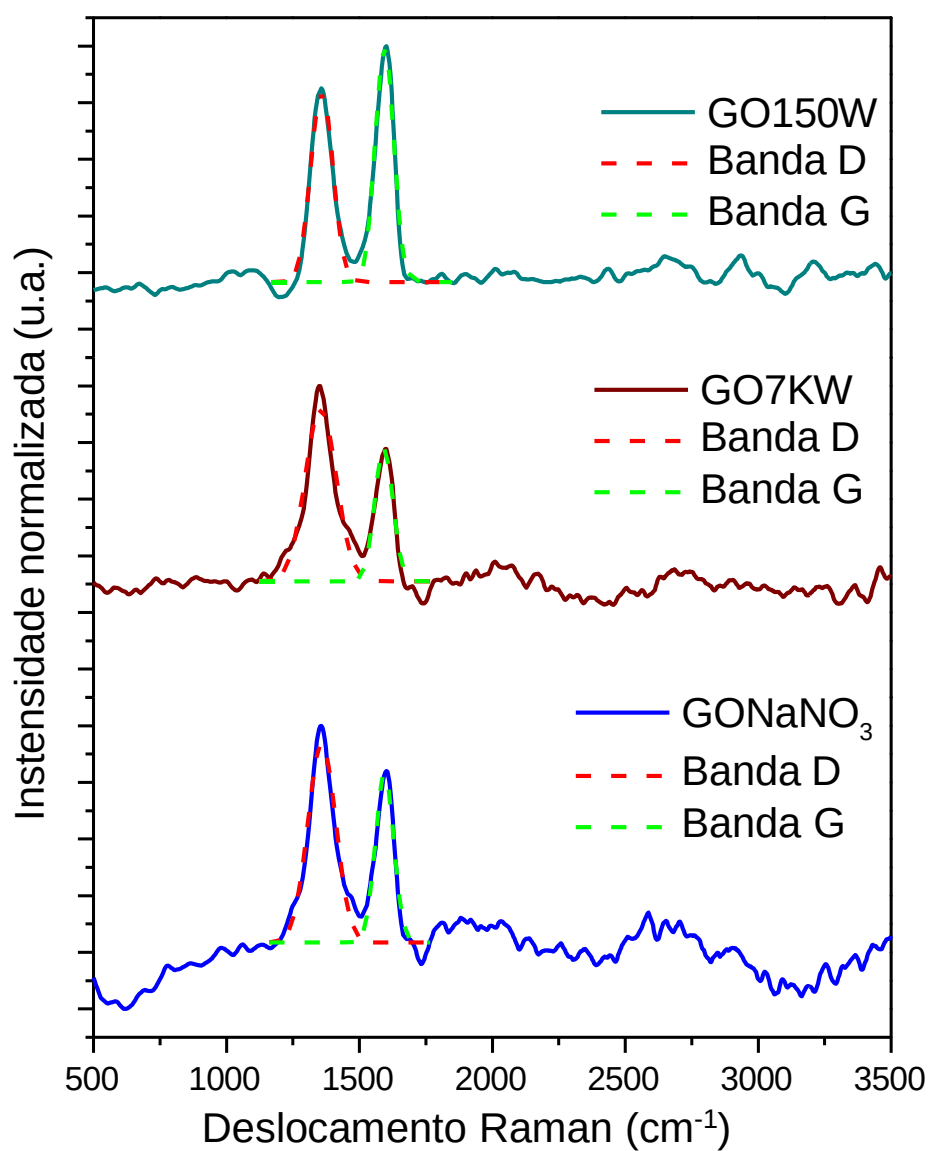


Fonte: A autora (2023)

De maneira geral, o rGO foi avaliado por meio de um ensaio de difusão, por não conseguir a dispersão sem utilização de solventes não tóxicos, no entanto, não demonstrou qualquer zona de inibição. Devido à sua falta de dispersão em meio aquoso e à ausência de resultados significativos de inibição, optou-se por interromper o estudo com o rGO.

ANEXO B – Deconvolução dos espectros RAMAN das amostras de GO

Figura B1 – Deconvolução dos espectros Raman dos óxidos de grafeno GO150w, GO7Kw e GONaNO₃.



Fonte: A autora (2024)

Tabela B1 –Intensidades e relação das bandas D e G dos óxidos de grafeno GO150w, GO7Kw e GONaNO₃.

Amostra	Banda	Área (A)	Altura (Height)	I _D /I _G (Altura)	I _D /I _G (Área)
GO150W	D	70,11063	0,67851	0,8200	0,9699
	G	72,27924	0,82726		
GO7K	D	89,54763	0,60979	1,3063	2,2172
	G	40,36970	0,46688		
GONaNO ₃	D	92,52146	0,70149	1,1769	1,7946
	G	51,57359	0,59602		

Fonte: A autora (2024)

Apêndice - Histórico Escolar



SIGAA - Sistema Integrado de Gestão de Atividades Acadêmicas
UFPE - UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
PROPG

Av. Prof. Moraes Rego, 1235 - Cidade Universitária, Recife - PE

Histórico Escolar - Emitido em: 22/05/2024 às 21:34

Dados Pessoais

Nome: **MARIA EDUARDA COLAÇO MESQUITA DA SILVA** Matrícula: **20221004887**
Data de Nascimento: **23/09/1998** Local de Nascimento: **NÃO INFORMADO/PE**
Nome do Pai:
Nome da Mãe: **Ednalva Maria Colaço Mesquita da Silva**

Dados do Vínculo do Discente

Programa: **PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA DE MATERIAIS - CCEN** Índices Acadêmicos
Nível: **MESTRADO** CR: **3.03**
Curso: **CIÊNCIA DE MATERIAIS** (Índice de Coeficiente de Rendimento: 0.0 - 4.0)
Currículo: **CMAM04** Status: **ATIVO**
Área de Concentração: **MATERIAIS NÃO METÁLICOS**
Linha de Pesquisa: **NANO E BIOMATERIAIS**
Orientador: **GIOVANNA MACHADO**
Forma de Ingresso: **SELEÇÃO DE PÓS-GRADUAÇÃO**
Mês/Ano Inicial: **MAR/2022** Mês Atual: **27º**
Trancamentos: **0 meses** Prazo para Conclusão (Padrão / **MAI/2024**)
Prorrogações: **3 meses**
Tipo Saída:
Mês/Ano de Saída: Data da Defesa:

Disciplinas e Atividades Cursadas/Cursando

Início	Fim	Componente Curricular	Turma	CH	C	Freq %	Nota	Situação
04/2022	05/2022	CF942 MICROBIOLOGIA Dra. MONICA CAMELO PESSOA DE AZEVEDO ALBUQUERQUE (10h), Dra. EULALIA CAMELO PESSOA DE AZEVEDO XIMENES (50h)	01	60	4	100,0	B	APROVADO
03/2022	--	MTR900 INTRODUÇÃO A CIENCIA DE MATERIAIS Dr. ARMANDO JUAN NAVARRO VAZQUEZ (60h)	01	60	4	100,0	-	MATRICULADO
03/2022	--	MTR916 COLOQUIOS 1 Dra. GLORIA MARIA VINHAS (30h)	01	30	2	100,0	-	CANCELADO
03/2022	--	MTR916 COLOQUIOS 1 Dra. GLORIA MARIA VINHAS (30h)	02	30	2	100,0	-	MATRICULADO
04/2022	07/2022	MTR980 TÓPICOS EM CIENCIA DE MATERIAIS I - NANOMATERIAIS EM BIOMEDICINA: FUNDAMENTOS E APLICAÇÕES Dra. MARIA GORETI CARVALHO PEREIRA (60h)	03	60	4	100,0	B	APROVADO
03/2022	07/2022	MTR982 TÓPICOS EM CIENCIA DE MATERIAIS II - MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA, SEGUNDAS E QUARTAS FEIRAS DE 12 A 14 H. Dr. EDUARDO PADRON HERNANDEZ (30h), Dr. GIOVANNA MACHADO (30h)	01	60	4	100,0	B	APROVADO
11/2022	--	DCB1027 NANOBIOLOGIA APLICADA A TERAPIA GÊNICA, MEDICAMENTOS E VACINAS Dra. NEREIDE STELA SANTOS MAGALHAES (45h)	01	45	3	100,0	-	CANCELADO
07/2022	12/2022	MTR904 PREPARAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE MATERIAIS I Dr. EDUARDO PADRON HERNANDEZ (30h), Dra. BEATE SAEGESSER SANTOS (30h)	01	60	4	100,0	A	APROVADO
07/2022	11/2022	MTR908 ESTUDO DIRIGIDO 1 Dr. GIOVANNA MACHADO (60h)	03	60	4	100,0	C	APROVADO
07/2022	10/2022	MTR912 SEMINÁRIOS DA PÓS-GRADUAÇÃO 1 Dr. GIOVANNA MACHADO (30h)	04	30	2	100,0	C	APROVADO
05/2023	07/2023	CF960 CULTURA DE CELULAS APLICADA A PESQUISA E DESENVOLVIMENTO DE FÁRMACOS Dr. JORGE LUIZ SILVEIRA SONEGO (18h), Dra. TERESINHA GONCALVES DA SILVA (29h)	02	45	3	100,0	A	APROVADO
03/2023	--	MTR898 DISSERTAÇÃO DE MESTRADO	--	0	0	--	--	MATRICULADO