



Ministério da  
**Ciência, Tecnologia  
e Inovação**



## **PURIFICAÇÃO E FUNCIONALIZAÇÃO DE NANOTUBOS DE CARBONO**

Relatório de Iniciação Científica sobre  
a avaliação citotóxica das fibras de  
carbono, fibras de carbono com silício  
e fibras de carbono com silício e  
nanotubo de carbono para aplicações  
biológicas.

**Gislene Rodrigues da Silva**

INPE  
São José dos Campos  
Versão: 2012-07-15

# **PURIFICAÇÃO E FUNCIONALIZAÇÃO DE NANOTUBOS DE CARBONO**

Gislene Rodrigues da Silva (INPE, Bolsista PIBIC/CNPq)  
E-mail: girsiva@univap.br

Evaldo José Corat (LAS/INPE, Orientador)  
E-mail: corat@las.inpe.br

Co-orientadores  
Dr. Anderson de Oliveira Lobo (UNIVAP)

Julho/2012

## AGRADECIMENTOS

Agradeço:

Primeiramente a Deus, por me dar capacidade para o desenvolvimento deste trabalho.

A minha família, pelo incentivo e pela compreensão durante todo o desenvolvimento da minha vida acadêmica e por me darem total apoio durante todas as etapas cumpridas até o presente momento.

A meu namorado Alexandre Pereira da Silva, pelos sentimentos de amor, amizade, compreensão e companheirismo.

A meu orientador prof. Dr. Evaldo José Corat e meu co-orientador: Dr. Anderson de Oliveira Lobo, pela dedicação, conhecimento passado e por sempre me apoiar e acreditar de forma efetiva para o desenvolvimento desse trabalho desde o início de minha Iniciação científica.

Ao Laboratório de Dinâmica de Comportamento Celulares do Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento - IP&D, da Universidade do Vale do Paraíba, pela liberação da utilização do laboratório.

Aos professores, funcionários e bolsistas do INPE e UNIVAP, pelo conhecimento compartilhado dia após dia.

Especiais agradecimentos ao Vagner Eduardo Caetano Marques, pelo crescimento dos nanotubos de carbono; aos meus amigos e companheiras Idália Aparecida Waltrick de Brito Siqueira, Beatriz de Campos Ramos e Nelly Leite, Felipe que, de uma maneira ou de outra, contribuíram para o meu desenvolvimento, compartilhando dificuldades e vitórias neste período.

As minhas amigas-irmãs Letícia Correa Fontana, Juliana Guerra e Priscila Lima pela paciência em casa com minhas crises de estresse.

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

## RESUMO

Este trabalho foi iniciado em julho de 2012 com o objetivo de estudar a formação de camadas de SiO<sub>2</sub> sobre fibras de carbono e ainda a formação de camadas de SiC mediante tratamento térmico a altas temperaturas, entre 1400 - 1800°C para melhorar a adesão entre a camada de sílica e a fibra de carbono. O trabalho atual tem como objetivo avaliar as fibras de carbono puras, fibras de carbonos com o silício e as fibras com silício e nanotubo de carbono, para aplicações biológicas através de testes de citotoxicidade. As fibras de carbono tem elevada elasticidade e resistência mecânica tornando o interessante para o nosso estudo. O nanotubo de carbono preserva as propriedades biológicas e permitir o extenso crescimento, espalhamento e adesão de células, além de possuírem excelente biocompatibilidade celular. A utilização deste dois materiais juntos forma um material mais resistente e elastico tornando-o interessante para aplicações biológicas por aguentar intensas atividades. O teste realizado foi o LDH total e o liberado, onde as células foram semeadas em placas de 24 poços numa concentração de  $1 \times 10^6$  cel/ml por poço no período de tempo de 24 horas para adesão. Após foi colocado sobre as células as amostras e incubadas por 24 e 48 horas. Todos os testes foram realizados em triplicata. Podemos observar com os testes LDH que os materiais até presente estudo apresentou-se tóxico para as células. Tornando assim inviável a utilização dos materiais para aplicações biológicas.

## SUMÁRIO

<b>1- INTRODUÇÃO .....</b>	<b>7</b>
<b>2- REVISÃO DA LITERATURA .....</b>	<b>8</b>
<b>2.1. Nanotubos de Carbono e Nanofilamentos .....</b>	<b>8</b>
2.1.1. <i>Nanotubos de Carbono de Parede Simples (SWCNT).....</i>	<i>9</i>
2.1.2. <i>Nanotubos de Carbono de Parede Múltipla (MWCNT).....</i>	<i>11</i>
2.1.3. <i>Síntese de Nanotubos de Carbono .....</i>	<i>12</i>
2.1.4. <i>Nanotubos de carbono: aspectos gerais .....</i>	<i>14</i>
2.1.5. <i>Lactato Desidrogenase (LDH).....</i>	<i>15</i>
<b>3 – DESENVOLVIMENTO .....</b>	<b>16</b>
<b>3.1. Materiais e Métodos .....</b>	<b>16</b>
3.1.1. <i>Descrição do processo de produção da Camada de SiO<sub>2</sub> .....</i>	<i>16</i>
3.1.2 <i>Tratamento térmico realizado em Forno Especial de Grafite – Modelo FG 2000/V para formação de SiC ou Si<sub>3</sub>N<sub>4</sub>.....</i>	<i>17</i>
3.1.3 <i>Ensaio Biológicos .....</i>	<i>18</i>
3.1.4 <i>Cultura de Células de L929 .....</i>	<i>18</i>
3.1.5 <i>Plaqueamento.....</i>	<i>19</i>
3.1.6 <i>Análise de LDH Total e Liberado .....</i>	<i>19</i>
3.1.7 <i>Análise Estatística.....</i>	<i>20</i>
<b>4- RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>20</b>
<b>5- DIFICULDADES ENCONTRADAS.....</b>	<b>22</b>
<b>6- CONCLUSÃO .....</b>	<b>22</b>
<b>7- ETAPAS FUTURAS.....</b>	<b>22</b>
<b>8- TRABALHOS EM COLABORAÇÃO.....</b>	<b>22</b>
<b>9- ARTIGOS COMPLETOS PUBLICADOS EM PERIÓDICOS .....</b>	<b>23</b>

<b>10- RESUMOS PUBLICADOS EM ANAIS DE CONGRESSOS.....</b>	<b>23</b>
<b>11- PRÊMIOS.....</b>	<b>24</b>
<b>12- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>24</b>

# 1- INTRODUÇÃO

As fibras de carbono tem elevada resistência mecânica, elasticidade e peso muito baixo. Apresentam 90 a 95 % de carbono elementar em sua composição elementar em sua composição tornando o interessante para o nosso estudo.

Nanotubos de carbonos (CNT) são estruturas tubulares formadas por arranjos hexagonais de carbono, podendo ser classificados em dois tipos: nanotubos de carbono de paredes simples (SWCNT) e nanotubos de carbono de paredes múltiplas (MWCNT) [1,2,3,4,5,6]. Os MWCNTs são de particular interesse na medicina regenerativa por preservar as propriedades biológicas e permitirem o extenso crescimento, espalhamento e adesão de células, além de possuírem excelente biocompatibilidade celular [7]. A utilização deste dois materiais juntos forma um material mais resistente e elastico tornando-o interessante para aplicações biológicas por aguentar intensas atividades.

Os fibroblastos são células jovens encontrados no tecido conjuntivo. Células fixas e alongadas, fusiformes, rica em prolongamentos citoplasmáticos. São responsáveis pela manutenção da estrutura dos tecidos conjuntivos, produzindo todos os tipos de fibras proteicas. [8,9,10]

Desidrogenase Láctica (LDH) é uma enzima encontrada em quase todos os tecidos do nosso organismo. Liberada quando estas células estão danificadas ou destruídas.[9]

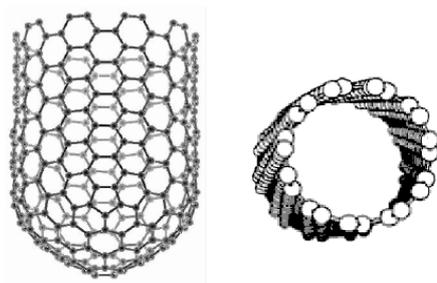
O presente trabalho tem como objetivo avaliar as fibras de carbono puras, fibras de carbonos com o silício e as fibras com silício e nanotubo de carbono, para aplicações biológicas através do teste de citotoxicidade no período de incubação de 24 e 48 horas.

## 2- REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1. Nanotubos de Carbono e Nanofilamentos

Em 1991, o microscopista Sumio Iijima, da NEC Corporation-Japão, estudava o material depositado no catodo durante evaporação voltaica para síntese de fulerenos. Foi então que ele observou que a região central do depósito do catodo continha uma variedade de estruturas gráficas fechadas, incluindo nanopartículas e nanotubos de carbono (CNT) que não tinham sido observados anteriormente [12]. Em seguida, Thomas Ebbesen e Pulickel Ajayan, do mesmo laboratório, mostraram como os nanotubos poderiam ser obtidos em grandes quantidades, simplesmente pela variação das condições de evaporação a arco voltaico. Esses fatos pavimentaram a explosão de pesquisas nas propriedades físico-químicas de CNTs em todos os laboratórios mundiais. As “agulhas” inicialmente obtidas apresentavam comprimento de até 1 mm, consistindo de tubos concêntricos fechados em uma das extremidades ou camadas de grafites enroladas. Foi constatado que o menor tubo apresentava 2,2 nm de diâmetro, que correspondia aproximadamente a um anel de 30 átomos de carbonos hexagonais [13]. Algumas dessas agulhas consistiam de somente dois tubos fechados na extremidade, enquanto outros continham mais de 50. A separação entre os tubos era de 0,34 nm, que é correspondente à separação interlamelar entre as camadas de grafite. Os nanotubos de carbono são estruturas semelhantes ao fulereno, que consistem de cilindros de grafeno fechados nas extremidades por anéis pentagonais. A figura 2.1 mostra exemplos típicos da estrutura dos CNT.

Em geral, existem dois tipos de CNTs: os CNT de parede simples (SWCNT) e os CNT de múltiplas paredes (VACNT).



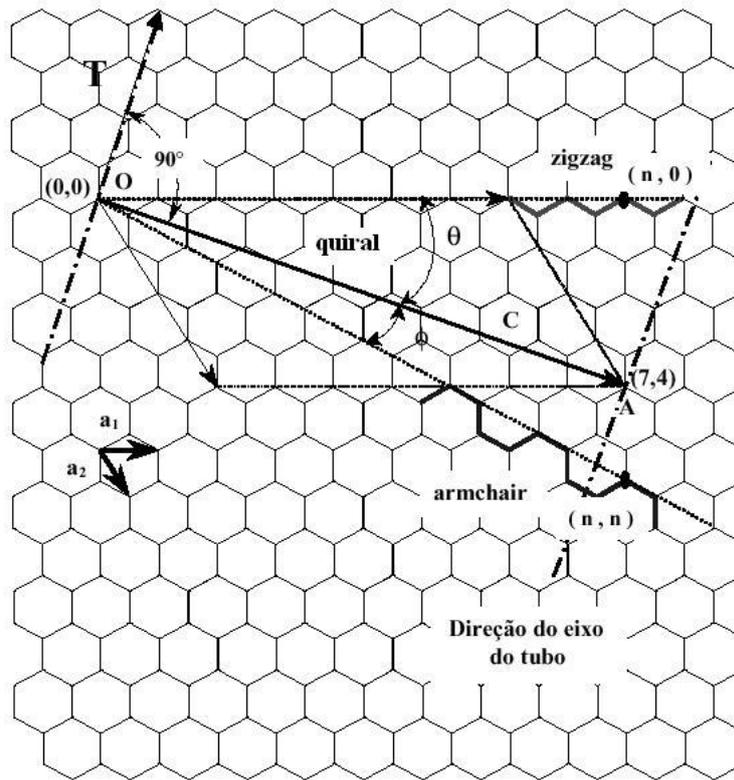
**Figura 2.1:** Exemplos típicos de estruturas de CNT [13].

### 2.1.1. Nanotubos de Carbono de Parede Simples (SWCNT)

Uma maneira simples de representar os SWCNT é considerar uma camada simples de grafite (ou grafeno) e enrolá-la até formar um cilindro. Uma camada simples de grafite está constituída por átomos de carbono formando uma rede hexagonal, com ligações simples e duplas, sendo a distância entre dois átomos mais próximos da ordem de 0,14 nm. Na grafite, as ligações entre camadas são do tipo Van der Waals, sendo a distância entre elas da ordem de 0,34 nm. Como é mostrado na figura 2.2, os SWCNT podem ser construídos enrolando uma folha grafite de tal modo que dois sítios coincidam cristalograficamente. Enrolando a folha da grafite na direção do vetor chiral C, forma-se um cilindro, onde os pontos com coordenadas (0,0) e (7,4) coincidem (ou seja, os sítios O e A são equivalentes). Neste caso, é formado um CNT chiral com  $n=7$  e  $m=4$ . A direção do vetor chiral C pode estar definida em relação à direção de dois vetores correspondentes aos CNTs zigzag (ângulo  $\theta$ , ou em relação à direção dos vetores correspondentes aos CNTs armchair (ângulo  $\Phi=30^\circ-\theta$ ). Em qualquer um dos casos, o ângulo é denominado chiral. Na maioria dos trabalhos relatados na literatura, é utilizado o ângulo  $\theta$ . Portanto,  $\theta = 0^\circ$  para os CNTs zigzag,  $\theta = 30^\circ$  para CNTs armchair e  $0^\circ < \theta < 30^\circ$  para CNTs chiral. O vetor C que define a direção de enrolamento, denominado vetor “chiral”, define a posição dos dois sítios, e é especificado por um par de números inteiros (n,m):

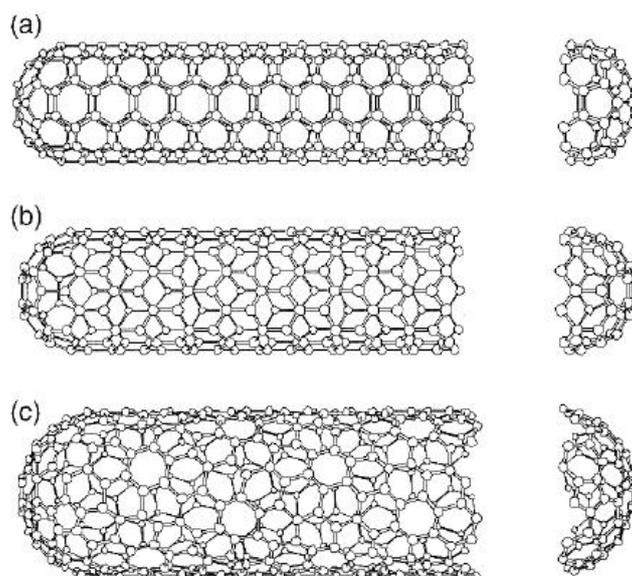
$$\vec{C} = n\vec{a}_1 + m\vec{a}_2; \quad (\text{Equação 2.1})$$

onde  $\vec{a}_1$  e  $\vec{a}_2$  são os vetores unitários da rede hexagonal da folha de grafite. Quando  $n=m$ , são formados os CNTs armchair; quando  $m = 0$ , são formados os CNTs zigzag, e, quando  $n \neq m \neq 0$  são formados os CNTs chiral.



**Figura 2.2:** Representação esquemática da construção de um SWCNT. Adaptado de [13].

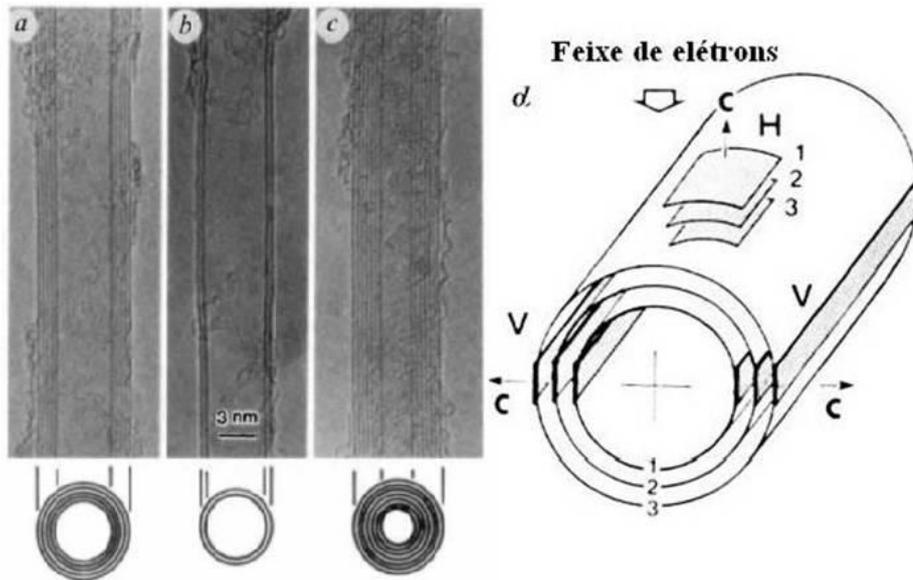
Na figura 2.3, são mostrados, esquematicamente, exemplos dos três tipos de CNTs mencionados anteriormente. Na figura 2.3a, o CNT é do tipo armchair com índices (5,5). Na figura 2.3b, o CNT é do tipo zigzag com índices (9,0). Considerando que seus diâmetros são aproximadamente iguais ao diâmetro de uma molécula C60, seus extremos são formados por dois hemisférios obtidos ao cortar esta molécula na direção perpendicular ao seu eixo de simetria C5, para o primeiro caso; e na direção normal ao eixo de simetria C3, no segundo caso. Na figura 2.3c, é mostrado um nanotubo chiral. Em geral, para CNTs armchair, zigzag ou chiral com diâmetros maiores, existe uma grande variedade para seu extremo tipo “hemisfério”, pois os fulerenos correspondentes apresentam um grande número de isômeros.



**Figura 2.3:** Estruturas geométricas de SWCNT. (a) CNT armchair (5,5), (b) CNT zigzag (9,0) e (c) CNT chiral (10,5). Adaptado da referência [13].

### 2.1.2. Nanotubos de Carbono de Parede Múltipla (MWCNT)

Os CNT constituídos por duas ou mais camadas simples de cilindros coaxiais (obtidos enrolando folhas de grafite), fechados nos seus extremos também com “hemisférios” de fulerenos, os que em geral, apresentam defeitos (presença de pentágonos não isolados e heptágonos), são conhecidos como CNT de paredes múltipla (MWCNT). A distância de separação entre camadas é da ordem de 0,34 nm (3-5% maior que o espaçamento entre as camadas da grafite de aproximadamente 0,339 nm). Na maioria dos casos, a relação comprimento/diâmetro atinge valores entre 100 e 1000 e, portanto, podem ser considerados como sistemas unidimensionais. Na figura 2.4 são mostradas as primeiras observações de MWCNT [14].



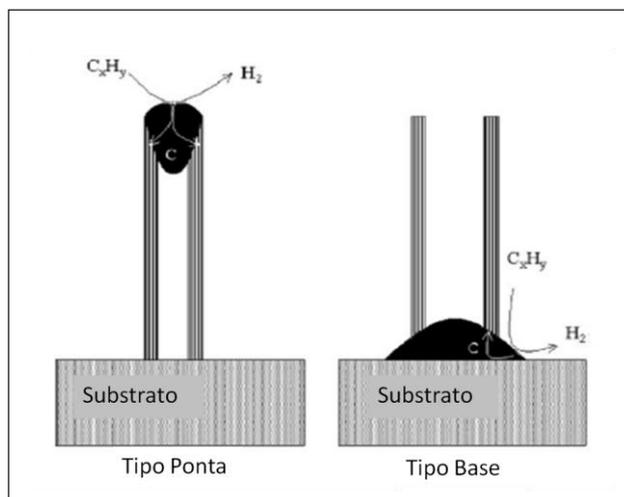
**Figura 2.4:** Observações de MWCNT com  $N$  tubos coaxiais e vários diâmetros internos,  $d_i$  e externos,  $d_e$ . (a)  $N = 5$ ,  $d_i = 6,7$  nm, (b)  $N = 2$ ,  $d_e = 5,5$  nm e (c)  $N = 7$ ,  $d_i = 2,3$  nm  $d_e = 6,5$  nm. Adaptado de [14].

### 2.1.3. Síntese de Nanotubos de Carbono

O grande segredo do crescimento dos CNT é uma boa preparação das partículas catalisadoras, que devem possuir diâmetros nanométricos e estar distribuídas uniformemente sobre o substrato [15].

Na figura 2.5 pode-se verificar o desenho esquemático dos mecanismos de crescimentos propostos, tais como “tipo ponta” e “tipo raiz”, para interpretar o crescimento dos CNT. No modelo “tipo ponta”, considera-se que o hidrocarboneto se decompõe sobre a parte superior da superfície de uma partícula metálica para formar átomos de carbono e hidrogênio e, em seguida, os átomos de carbono se difundem através dela, ou sobre sua superfície, até que finalmente se depositam sobre a superfície inferior, formando os CNT. As partículas ficam nas pontas dos CNT durante o crescimento. No modelo “tipo raiz”, um hidrocarboneto é decomposto sobre a superfície lateral da partícula metálica, e os átomos de carbono difundem-se através delas, formando os CNT na parte superior da superfície do metal. Neste caso, a partícula metálica permanece como um suporte para os CNT [15]. Chen e colaboradores [16] observam que a partícula pode se dividir em duas, e uma parte

delas fica no substrato e a outra na ponta. Os diferentes tipos de mecanismos de crescimento são dependentes das interações entre as partículas metálicas e a superfície do substrato. Quando a interação é fraca, as partículas metálicas podem se separar do substrato e, conseqüentemente, são levadas para as pontas dos CNT, caso contrário, as partículas permanecem fixas ao substrato [16].



**Figura 2.5:** Esquema do tipo de crescimento dos CNT durante a síntese [16].

Os métodos de preparação mais utilizados na obtenção de CNT são: descarga por arco, ablação por laser e CVD. Métodos de descarga por arco e ablação por laser são baseados na condensação de átomos de carbonos gerados pela evaporação (sublimação) de carbono a partir de um precursor sólido, geralmente grafite de alta pureza. As temperaturas de evaporação envolvidas em tais processos aproximam-se da temperatura de fusão da grafite, de 3000 a 4000°C [15-16].

O método CVD vem sendo largamente aplicado na obtenção de CNT. O processo envolve a reação de decomposição de um vapor ou gás precursor contendo átomos de carbono, geralmente um hidrocarboneto, na presença de um catalisador metálico. A técnica CVD pode envolver apenas processos térmicos ou utilizar plasma (PECVD) [17]. Os CNT são nucleados e crescidos pelos átomos de carbono advindos da decomposição do precursor, onde o papel das reações com a superfície do substrato é de extrema relevância. Catalisadores são usualmente preparados sobre um substrato utilizando uma das quatro técnicas: (i) sol-gel [18], (ii) impregnação [19], (iii) metalo-orgânico CVD [20] ou (iv) métodos de co-precipitação [21]. As variantes mais comumente encontradas na literatura são: CVD térmico [22], PECVD [23, 24], HipCO (High pressure CO disproportionation) [25] e leito fluidizado [21]. Esta última é a mais eficiente para o processo de escalonamento industrial. Em particular, a técnica de MWCVD é eficiente para a produção de VACNT com elevado grau de pureza, sendo

livre da presença de carbonos amorfos e partículas metálicas fora dos CNT [26]. O método MWCVD tem como característica a produção de VACNT, verticalmente alinhados. O controle do diâmetro, comprimento, estrutura e densidade de tubos por área é facilmente obtido por essa técnica.

Lee e colaboradores [27] prepararam e cresceram MWCNT verticalmente alinhados (VACNT) sobre SiO<sub>2</sub>, gerado pela oxidação de um substrato de Si tipo p, com níquel metálico como catalisador, por CVD térmico. Foi utilizado acetileno como fonte de carbono e a temperatura foram mantidas entre 850 e 950 °C. Essas amostras apresentaram tubos com diâmetros externos menores e o número de paredes diminuiu nas pontas.

Técnicas de PECVD têm sido utilizadas para o crescimento de SWCNT e VACNT, atraindo grande atenção pela sua produtividade em massa, alta uniformidade e bom alinhamento dos tubos. Choi e colaboradores [28] usaram MWCVD para o crescimento de filmes finos de diamantes nanocristalinos e CNT sobre substratos de silício, dependendo dos parâmetros experimentais estabelecidos, tais como concentração de gás metano-hidrogênio, temperatura, tempo e forma de tratamento do substrato.

Outros métodos de deposição também são encontrados na literatura: pirólise plástica [29], síntese por chama [30], síntese líquida de hidrocarbonetos [31], forno solar [32], eletrólise [33], moagem de grafite [34, 35] e tocha por plasma [36].

#### **2.1.4. Nanotubos de carbono: aspectos gerais**

Pesquisas envolvendo nanotecnologia vêm sendo amplamente apoiadas por organizações governamentais e privadas em vários países ao redor do mundo, com investimentos bilionários, principalmente no Japão e E.U.A. [37]. Muitas aplicações práticas envolvendo CNT têm sido reportadas em diversas áreas de conhecimento, tais como sensores químicos [38], materiais emissores de campo [39], dispositivos eletrônicos [40], ânodo em baterias de íons de lítio [41], super-capacitores [42] e armazenamento de hidrogênio [43]. Grandes expectativas vêm sendo aplicadas no desenvolvimento de compósitos poliméricos baseados em CNT, já que esses podem ser usados como reforços em materiais estruturais, para fins aeronáuticos e aeroespaciais. Na engenharia de tecidos surge também grande interesse na utilização dos CNT, onde provavelmente terá sucesso como compósito por apresentar similaridades a componentes naturais do tecido (MEC) [44-46].

Sabendo-se dessas aplicações, muitas companhias buscam a produção de CNT em escala industrial [47]. Dados econômicos atuais mostram que a produção de CNT foi estimada em 36500 toneladas/ano, sendo considerada como um alto investimento se comparados a outras fontes de carbono [48]. Os CNT podem ser comercializados em forma de pó ou suportados por um substrato [49-50] ou mesmo, dispersos em líquidos para serem misturados em uma matriz polimérica [51-52]. Quando os CNT se encontram suportados por um substrato são chamados de filmes. Os filmes podem possuir diversas construções com diferentes geometrias, produzidas por técnicas convencionais ou litográficas.

Os custos dos CNT podem variar de acordo com os processos que foram necessários após a sua obtenção: como crescidos, purificados ou funcionalizados, com comprimentos e diâmetros definidos, e distribuição dos tubos. Algumas aplicações requerem um alto grau de pureza, ou seja, um processo de purificação extremamente eficiente, com a remoção completa de todas as partículas metálicas e carbono amorfo, utilizando-se ácidos minerais e tratamento térmico [53]. Funcionalizações são essenciais para manter dispersões homogêneas em matrizes poliméricas [54] e reconhecimento de certas substâncias específicas (quando usadas como biosensores) [55]. A molhabilidade também tem um papel muito importante, podendo afetar na incorporação de grupos funcionais ou ainda nas interações células/materiais [56].

Muitas iniciativas para estabelecer protocolos para a nanometrologia vêm sendo implantadas em diversos países, por institutos de medidas metrológicas, incluindo o INMETRO no Brasil. Em particular, o National Institute of Standard Technology (NIST, Instituto Norte Americano de Padronização e Tecnologia), publicou um manual detalhado para realização de medidas essenciais envolvendo CNT [57]. Obviamente, dependendo da aplicação dos CNT, seriam necessários dados adicionais, tais como: medidas de resistividade elétrica, força mecânica ou condutividade térmica, por exemplo. Para aplicações biológicas, recomenda-se que seja realizada uma avaliação completa das características das amostras estudadas, uma vez que os tipos de CNT (VACNT ou SWCNT), disposições (filmes, em pó, etc), métodos de produção de seus catalisadores, purificação ou funcionalização, podem influenciar nos resultados. Em qualquer futura aplicação para o desenvolvimento de biomateriais, a garantia de qualidade é primordial, pois vidas humanas estarão envolvidas.

## **2.2. Lactato Desidrogenase (LDH)**

Lactato Desidrogenase é uma enzima que se encontra em quase todos os tecidos do nosso organismo.[11]

O ensaio de Lactato Desidrogenase é um meio de medir o número de células através do total de lactato desidrogenase citoplasmática (LDH) ou pela integridade da membrana como uma função da quantidade de LDH citoplasmático liberado no meio [58].

O ensaio é baseado na redução de NAD de LDH. Quando as células são lisadas antes do ensaio do meio, um aumento ou diminuição no resultado do número de células proporciona uma mudança quantidade de substrato convertido. Indicando o grau de inibição do crescimento celular (citotoxicidade) causada pelo material.[58]

### **3 – DESENVOLVIMENTO**

No relatório anterior, foi avaliado todo o processo de produção de CNTs cânfora/ferroceno sobre estes revestimentos para evitar danos nas propriedades mecânicas originais da fibra de carbono.

O presente trabalho tem como objetivo avaliar a citotoxicidade das amostras de fibras de carbono (FC), FC com silício e FC com carbono para aplicações biológicas.

#### **3.1. Materiais e Métodos**

##### **3.1.1. Descrição do processo de produção da Camada de SiO<sub>2</sub>**

O processo de produção da camada de SiO<sub>2</sub> é constituído por 3 etapas, denominadas pelas letras de A até C. Uma descrição de cada etapa está a seguir.

A) Preparação do Substrato – Nesta etapa, tiras do tecido de carbono são cortadas e postas dentro do reator.

B) Retirada de "Sizing" – Esse pré-tratamento é realizado com as amostras já dispostas no reator, onde se aplica um vácuo inicial chegando a 10-2 Torr, e depois um fluxo de gás de arraste 1.5L/min de N<sub>2</sub> (poderia ser Ar) a 1atm. Para esse método, parâmetros que influenciam são: temperatura e tempo.

C) Deposição de SiO<sub>2</sub> – Nos trabalhos iniciais optamos apenas por uma impregnação das amostras a partir do TEOS puro, e um aquecimento gradual para formação do filme. Depois foi parametrizada para o próprio reator, onde o TEOS líquido é colocado

na câmara para ser evaporado. Essa etapa é feita logo depois de B, mantendo alguns parâmetros. Para esse método, parâmetros que influenciam são: pressão de trabalho, temperatura de trabalho, temperatura de evaporação, fluxo de arraste e tempo de deposição.

O reator utilizado para deposição de sílica consiste em um tubo de quartzo acoplado a um forno operando entre 700 e 850°C, conforme a Fig 3.1. O TEOS é evaporado numa pré-câmara a 140°C e inserido na região de pirólise arrastado por um fluxo de N<sub>2</sub> a 1,5LPM, durante 5 min.

Este reator é também utilizado para depositar os VACNTs. Para isto, uma mistura de cânfora/ferroceno (16%) é colocada na pré-câmara de evaporação a 200°C, a qual serve como fonte de carbono e catalisador para o crescimento dos VACNTs, mas nesta primeira fase do trabalho nos dedicamos apenas ao estudo da intercâmara de SiO<sub>2</sub> e sua transformação a temperaturas mais elevadas.



**Figura 3.1** – Forno para o processo de deposição da camada de SiO<sub>2</sub> e produção de CNTs.

### **3.1.2 Tratamento térmico realizado em Forno Especial de Grafite – Modelo FG 2000/V para formação de SiC ou Si<sub>3</sub>N<sub>4</sub>**

As amostras de fibra de carbono com TEOS pirolisadas foram tratadas termicamente a 1450 °C, com uma taxa de aquecimento de 5 °C/ min, tempo de permanência de

120min, tanto em atmosfera inerte de Nitrogênio como em Argônio, com um fluxo de 6L/min.

**Figura 3.2** – Forno Especial de Grafite – FG 2000V

### **3.1.3 Ensaio Biológicos**

Tendo em vista a perspectiva futura em aplicações biológicas in vivo das fibras de carbono, torna-se necessário estudos de biocompatibilidade in vitro.

As amostras cortadas e colocadas com cola super bonder (BIC) para evitar que as amostras se desfizessem durante o processo de incubação e após secas foram colocadas por 24 horas para esterilização em fluxo laminar sob radiações ultravioleta (UV). Posteriormente foram realizados o teste de LDH.

### **3.1.4 Cultura de Células de L929**

Células de tecido conjuntivo de camundongo, designada L929, adquiridas no Laboratório de Cultura de Células Adolfo Lutz foram cultivadas, em garrafas de cultura de células de 25 cm<sup>3</sup> em Meio MEM, suplementado com 10% de soro fetal bovino e 1% de antibiótico antimicótico, incubados em estufa (modelo 3110 Forma Scientific), em atmosfera controlada de CO<sub>2</sub> a 5% e temperatura a 37°C para obter a população ideal para os experimentos. As células de L929 foram replicadas a partir da contagem inicial e o meio de cultura foi substituído a cada 48 horas, para melhores condições de proliferação e viabilidade celular. Os testes de cultura de células foram desenvolvidos no Laboratório de Dinâmica de Comportamento Celulares do IP&D da UNIVAP, supervisionados pela Prof<sup>a</sup> Dra. Cristina Pacheco-Soares.

### **3.1.5 Plaqueamento**

As células L929 foram tripsinizadas por 3 minutos e centrifugadas por 5 minutos para separação das células, em seguida serem resuspendidas em Meio MEM (Gibco),

suplementado com 10% de soro fetal bovino e 1% de antibiótico antimicótico. O volume de 10 µl foi aplicado à Câmara de Neubauer e levado a contagem das células de HOB no microscópio invertido (marca Olympus CK 40) e para determinação da concentração de  $1,0 \times 10^6$  cel/ml. Para o teste de citotoxicidade as células foram semeadas em duas placas de 24 poços e incubados por 24 horas.

As amostras foram divididas em 3 grupos: Fibras de Carbono puros, Fibras de Carbono com Silício e Fibras de Carbono com NTC, controle positivo para citotoxicidade (fragmentos de luva de látex) e controle negativo (papel de filtro). Após o tempo de 24 horas de incubação das células na placa, foram retiradas as 2 placas e em poços individuais foi colocado as amostras e incubadas em estufa a 37°C com 5% de CO<sub>2</sub> no período de 24 e 48 horas. Todos os testes serem realizados em triplicata.

### **3.1.6 Análise de LDH Total e Liberado**

A dosagem de reagentes a placa com a cultura de células deve ser deixada em incubação na ausência de luz. Para a leitura do LDH, utilizou-se o Kit da Sigma Aldrich (TOX-7).

Foi retirado o meio da placa após os tempos de incubação e colocados em uma nova placa para fazer o teste de LDH Liberado.

Os poços da placa com as amostras foram lavadas e colocaram-se 100 µl (1/10vol.) de Solução de Lise em cada poço das placas, deixando –as incubadas por um período de 45 minutos. Após o período de incubação foram retirados a solução de Lise e colocado 100 µl do corante deixando incubadas por um período de 30 a 40 minutos. Após este período foram acrescentados 50 µl de HCL em cada poço para que a reação fosse interrompida e mantidas sob agitação por 10 minutos para posterior leitura dos resultados. As medidas foram feitas utilizando o Leitor de microplacas (Synergy HT Multi-Detection, marca Bio-Tek, Winooski, VT) na absorvância de 490 nm.

### **3.1.7 Análise Estatística**

Para realizar a análise estatística, foram obtidos três leituras diferentes, com N = 3, e expressos como a média. As diferenças estatísticas serão analisados por Two-way Anova

usando o GraphPad Prisma programa ®. A população dos grupos foram analisada com distribuição normal independente para cada experiência. Valores de P inferiores a 0,005 ( $P < 0,005$ ) foram considerados como indicadores de diferenças estatísticas dos grupos.

## 4- RESULTADOS E DISCUSSÃO

O Gráfico 1 apresenta os valores obtidos através de absorbância do teste de LDH Total realizado das amostras de FC, FC + silício e FC+NTC nos tempos de 24 e 48 horas.

EMBED Prism5.Document

Gráfico 1 – LDH Total

Os resultados mostram que as amostras das estudadas apresentaram –se tóxicas para a células L929 (DECKER,1988), pois apresentaram um valor muito alto comparando com o controle positivo no tempo de 48 horas.

O Gráfico 2 apresenta os valores de absorbância do LDH Liberado onde é avaliado se o LDH foi liberado no meio de cultura que estava o material e a célula, possibilitando assim avaliar a citotoxicidade dos materiais, nos períodos de incubação.

EMBED Prism5.Document

Gráfico 2 – LDH Liberado

Os valores de LDH Liberado das amostras em estudo apresentarem bem próximas com o resultado do controle positivo, podemos dizer que as amostras utilizadas até o presente momento apresentaram-se tóxicas para as células.

Zhang et al, 2010[59] apresentou no seu estudo que a contração de silício pode interferir na citotoxicidade do material, causando assim a morte das células.

Santos, 2006 mostra em seu trabalho que a fibra de carbono é biocompatível e junto com outros materiais ela ajuda na resistência, evitando a sua destruição com facilidade, sendo utilizada em estudo para reparo dentários.[60]

O silício é um material biocompatível já comprovado em estudos [61, 62], possibilitando assim que nosso estudo não em vão.

Estudos comprovam que os materiais que utilizamos neste estudo são biocompatíveis, mas não foi encontrado estudos que tivesse utilizados esses materiais em conjunto tornando assim um obstáculo em nosso caminho na padronização da produção das amostras para aplicações biológicas.

## **5- DIFICULDADES ENCONTRADAS**

Durante o período do trabalho tivemos muitos obstáculos:

Manutenção das células : muitas contaminações dos materiais e células, equipamentos com problemas, perda de muito material devido as contaminações dificultando a continuação dos testes.

Produção das amostras: problemas com o equipamento fazendo com que atrasasse a produção das amostras.

Teste de LDH: aprendizagem da técnica

## **6- CONCLUSÃO**

Podemos concluir até o presente momento com este trabalho que as amostras utilizadas apresentaram-se tóxicas as células, mas para confirmação faz se necessário a utilização de outros teste com MTT ou até mesmo mudança no processo de produção.

## **7- ETAPAS FUTURAS**

- Realização de novos testes de citotoxicidade como o MTT
- Realização de teste de adesão MEV e MF

## **8- TRABALHOS EM COLABORAÇÃO**

a) Foram mantidas e cultivadas células de L929 para os alunos do programa de pós-graduação em Engenharia Biomédica:

1) Ciliana Antero Guimarães da Silva Oliveira. Caracterização biológica dos filmes de carbono-tipo diamante contendo nanopartículas de ouro incorporadas em sua estrutura para aplicações biomédicas. Início: 2011. Tese (Doutorado em Engenharia Biomédica) - Universidade do Vale do Paraíba, Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior. (Orientador).

2) Idália Aparecida Waltrick de Brito Siqueira. PROCESSO DE OSSEOINTEGRAÇÃO POR BIOFILMES EM RATAS OVARIETOMIZADAS: UM ESTUDO POR TÉCNICAS ESPECTROSCÓPICAS. Início: 2012. Tese (Doutorado em Engenharia Biomédica) - Universidade do Vale do Paraíba, Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior.

b) Foram também realizados trabalhos em parceria com outras universidades, tais como: UNIFESP e USP. Onde foram realizados ensaios de biocompatibilidade in vitro das amostras enviadas. Segue abaixo descrito os pesquisadores responsáveis pelas amostras estudadas:

1) Profa. Dra. Eliria Maria de Jesus Agnolon Pallone. USP. Amostras em forma de pastilhas de fosfato de cálcio.

2) Profa. Dra. Eliandra de Sousa Trichês. UNIFESP. Amostras de cerâmicas porosas

## 9- ARTIGOS COMPLETOS PUBLICADOS EM PERIÓDICOS

NEVES, M. F. ; HYPERLINK "<http://lattes.cnpq.br/8605141883488358>" \o "Clique para visualizar o currículo" \t "\_blank" SILVA, G. R. ; BRAZIL, T.R. ; HYPERLINK "<http://lattes.cnpq.br/1649098213102710>" \o "Clique para visualizar o currículo" \t "\_blank" MARCIANO, F. R. ; HYPERLINK "<http://lattes.cnpq.br/9091470548988255>" \t "\_blank" PACHECO-SOARES, C. ; LOBO, A. O. . Calcification in vitro of biomineralized nanohydroxyapatite/superohydrophilic vertically aligned multiwalled carbon nanotube scaffolds. Materials Research (São Carlos. Impresso) INCLUDEPICTURE "<http://buscatextual.cnpq.br/buscatextual/images/curriculo/jcr.gif>" \\* MERGEFORMATINET , v. 16, p. 614-618, 2013.

## 10- RESUMOS PUBLICADOS EM ANAIS DE CONGRESSOS

Anderson Oliveira Lobo, Vladimir Jesus Trava-Airoldi, Ciliana Antero Guimarães da Silva Oliveira, Gislene Rodrigues Silva, Laís Souza Vieira, Marina Fernandes Stein, Leandro José Raniero, Newton Soares Silva, Fernanda Roberta Marciano. Citotoxicity study of gold-incorporated diamond-like carbon films. In: XII Encontro da SBPMat em Campos do Jordão, 2013.

NEVES, M.S.; SILVA,G.R.;BRAZIL, T.R.; MARCIANO,F.R.; LOBO,A.O.. "In vitro biomineralization of a novel nanohydroxyapatite/superhydrophilic vertically aligned multi-walled carbon nanotubes nanocomposites". In: Annual World Conference on Carbon 2013.

HYPERLINK "<http://lattes.cnpq.br/8605141883488358>" \t "\_blank" SILVA, G. R. ; HYPERLINK "<http://lattes.cnpq.br/8605141883488358>" \t "\_blank" MARSI, T.C.O. ; BRAZIL, T.R. ; HYPERLINK "<http://lattes.cnpq.br/0560039556461253>" \t "\_blank" \o "Clique para visualizar o currículo" CORAT, E. J. ; HYPERLINK "<http://lattes.cnpq.br/9091470548988255>" \t "\_blank" PACHECO-SOARES, C. ; HYPERLINK "<http://lattes.cnpq.br/1649098213102710>" \t "\_blank" MARCIANO, F. R. ; LOBO, A. O. . CALCIFICAÇÃO DE OSTEOLASTOS CULTIVADOS SOBRE NANOTUBOS DE CARBONO SUPERHIDROFÍLICOS E NANOHIĐROXIAPATITA. In: XI – Congresso de Saúde e Qualidade de Vida Cone Leste Paulista.Livro de resumos, 2012. v. 1. p. 1-5.

## 11- PRÊMIOS

1º Lugar na apresentação do trabalho: "Calcificação de osteoblastos cultivados sobre nanotubos de carbono superhidrofílicos e nanohidroxiapatita" no XI Congresso de Saúde e Qualidade de Vida, Universidade do Vale do Paraíba.

## 12- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

[1] BARBOSA, G.M. Avaliação dos efeitos de nanotubos de carbono de parede múltipla carboxilados em células do sistema imunológico – Santa Maria, 2010.50f. : il. Dissertação (Mestrado em Nanociências) – Centro Universitário Franciscano, 2010.

[2] FILHO, A. G. S.; Fagan, S.B. Funcionalização de nanotubos de carbono Quim. Nova, Vol. 30, No. 7, 1695-1703, 2007

[3] HERBST, M. H.; Macêdo, M. I. F.; Rocco, A. M. Tecnologia dos nanotubos de carbono: tendências e perspectivas de uma área multidisciplinar Quim. Nova 2004, 27, 986.

[4] LOBO, A.O. Obtenção de super-hidrofilicidade em nanotubos de carbono alinhados e sua aplicação como nanobiomaterial - São José dos - Campos, 2011. 208f. Tese de doutorado – Curso de Engenharia Aeronáutica e Mecânica – Área de Física e Química dos Materiais Aeroespaciais - Instituto Tecnológico de Aeronáutica, 2011.

[5] OLIVEIRA, V.; Pereira, M.M.; Brandão, H.M.; Brandão, M. A. F.; Gattaz, W. F.; Raposo, N.R.B. Nanotubos de carbono aplicados as neurociências: perspectivas e desafios. Rev Psiquiatr. 2011;38(5):201-6

[6] PEREIRA, P.C.D. Biocompatibilidade e principais aplicações dos nanotubos de carbono – Belo Horizonte, 2009. Monografia do título de Especialista em Microbiologia - Universidade Federal de Minas Gerais, 2009.

[7] MENDES, R. M.; Silva, G.A.B.; Caliar, M.V.; Silva, E.E.; Ladeira, L.O.; Ferreira, A.J. Effects of single wall carbon nanotubes and its functionalization with sodium hyaluronate on bone repair. Life Sciences 87 (2010) 215–222

[8] JUNQUEIRA, L. C. Uchôa; CARNEIRO, José. Histologia básica. 11. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008

[9] Fibroblastos. Disponível: [HYPERLINK "http://www.unigranrio.br/atlas-morfologia-comparada/interna3.html"](http://www.unigranrio.br/atlas-morfologia-comparada/interna3.html) acesso dia 05/07/2013" <http://www.unigranrio.br/atlas-morfologia-comparada/interna3.html> acesso dia 05/07/2013 .

[10] Fibroblastos. Disponível: [HYPERLINK "http://www.reumatoguia.com.br/interna.php?cat=22&id=146&menu=22"](http://www.reumatoguia.com.br/interna.php?cat=22&id=146&menu=22) <http://www.reumatoguia.com.br/interna.php?cat=22&id=146&menu=22> acesso dia 05/07/2013.

[11] DECKER, T., and Lohmann-Matthes, ML, A quick and simple method for the quantification of lactate dehydrogenase release in measurements of cellular cytotoxicity and tumor necrosis factor (TNF) activity. J. Immunol. Methods, 15,61-69 (1988)

- [12] IIJIMA, S. Helical microtubules of graphitic carbon. *Nature*, v. 354, p. 56-58, 1991.
- [13] EBBESEN, T.W.; AJAYAN, P.M. Large-scale synthesis of carbon nanotubes. *Nature*, v. 358, p. 220-222, 1992.
- [14] DRESSELHAUS, M. S.; DRESSELHAUS, G.; CHARLIER, JC; HERNÁNDEZ, E. Electronic, thermal and mechanical properties of carbon nanotubes. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London series A-Mathematical Physical and Engineering Sciences*, v. 362, n. 1823, p. 2065-2098, 2004.
- [15] XU, X; PACEY, P. D. Interactions between acetylene and carbon nanotubes at 893 and 1019 K. *Carbon*, v. 39, p. 1835-1847, 2001.
- [16] CHEN, X.; WANG, R.; XU, J.; YU D. TEM investigation on the growth mechanism of carbon nanotubes synthesized by hot-filament chemical vapor deposition. *Micron*, v. 35, p. 455-460, 2004.
- [17] MEYYAPPAN, M.; DELZEIT, L.; CASSELL. A.; HASH, D. Carbon nanotube growth by PECVD: a review. *Journal Plasma Sources Science and Technology*, v. 12, p. 205-216, 2003.
- [18] SUH, D. J.; PARK, T. J.; KIM, J. H. Fast sol-gel synthetic route to high surface area alumina aerogels. *Chemical Materials*, v. 9, n. 9, p. 1903-1905, 1997.
- [19] IVANOV, V.; NAGY, J. B.; LAMBIN, PH.; LUCAS, A.; ZHANG, X. B.; ZHANG, X. F.; BERNAERTS, D.; VAN TENDELOO, G.; AMELINCKX, S.; VAN LANDUYT, J. The study of carbon nanotubes produced by catalytic method. *Chemical Physics Letters*, v. 223, n. 4, p. 329-335, 1994.
- [20] XU, C.; ZHU, J. One-step preparation of highly dispersed metal-supported catalysts by fluidized-bed MOCVD for carbon nanotube synthesis. *Nanotechnology*, v. 11, p. 1671-1681, 2004.
- [21] SCHWARZ, J. A.; CONTESCU, C.; CONTESCU, A. Methods for preparation of catalytic materials. **Chemical Reviews**, v. 95, n. 3, p. 477-510, 1995.
- [22] HERNADI, K. Production of nanotubes by the catalytic decomposition of different carbon-containing compounds. *Applied Catalysis A: General*, v. 199, n. 2, p. 245-255, 1999.

- [23] ZHANG, Q. YOON, S.F.; AHN, J.; GAN, B.; RUSLI.; YU, M.-B. Carbon films with high density nanotubes produced using microwave plasma assisted CVD. *Journal of Physics Chemistry Solids*, v. 61, p. 1179–83, 2000.
- [24] CHOI, Y.C.; BAE, D.J.; LEE, Y.H.; LEE, B.S.;HAN, I.T.;CHOI, W.B.; LEE, N.S.; JONG MIN KIM, J.M. Low temperature synthesis of carbon nanotubes by microwave plasma-enhanced chemical vapor deposition. *Synthetic Metals*, v. 108, p. 159-163, 2000.
- [25] DAI, H.; RINZLER, A.G.; NIKOLAEV, P.; THESS, A.; COLBERT, D.T.; SMALLEY, R.E. Single-wall nanotubes produced by metal-catalyzed disproportionation of carbon monoxide. *Chemical Physics Letters*, v. 260, n. 3-4, p. 471-475, 1996.
- [26] ANTUNES, E. F.; LOBO, A. O.; CORAT, E. J.; TRAVA-AIROLDI, V. J. Influence of diameter in the Raman spectra of aligned multi-walled carbon nanotubes. *Carbon*, v. 45, p. 913-921, 2007.
- [27] LEE, C. J., PARK, J., KANG, S. Y., LEE, J. H. Growth and field electron emission of vertically aligned multiwalled carbon nanotubes. *Chemical Physics Letters*, v. 326, p. 175-180, 2000.
- [28] CHOI, Y. C.; JAE BAE, D.J.; LEE, Y.H.; LEE, B.S. Growth of carbon nanotubes by microwave plasma-enhanced chemical vapor deposition at low temperature. *Journal of Vacuum Science and Technology A*, v. 18, p. 1864-1868, 2000.
- [29] CHUNG, Y. H.; JOU, S. Carbon nanotubes from catalytic pyrolysis of polypropylene. *Materials Chemistry of Physics*, v. 92, n. 1, p. 256-259, 2005.
- [30] NAKAZAWA, S.; YOKOMORI, T.; MIZOMOTO, M. Flame synthesis of carbon nanotubes in a wall stagnation flow. *Chemical Physics Letters*, v. 403, p. 158-162, 2005.
- [31] ZHANG, Y. F.; GAMO, M.N. ; XIAO, C.Y.; ANDO, T. Liquid phase synthesis of carbon nanotubes. *Physica B*, v. 323, p. 293-295, 2002.
- [32] PARADISE, M.; GOSWAMI, T. Carbon nanotubes: production and industrial applications. *Materials & Design*, v. 28, p. 1477-1489, 2007.
- [33] CHEN, Y.; CHADDERTON, L.T.; WILLIAMS, J.S.; GERALD J.F. Solid-state formation of carbon and boron nitride nanotubes. *Journal of Metastable and Nanocrystalline Materials*, v. 343, p. 63-67, 2000.

- [34] AWASTHI, K.; KAMALAKARAN, R.; SINGH, A.K.; SRIVASTAVA, O.N. Ball-milled carbon and hydrogen storage. *International Journal of Hydrogen Engineering*, v. 27, p. 424-432, 2002.
- [35] AMIROV, R.H.; ASINOVSKY, E.I.; ISAKAEV, E.K.; KISELEV, V.I. Thermal plasma torch for synthesis of carbon nanotubes. **High Temperature Material Processes**, v. 10, n. 2, p. 197-205, 2006.
- [36] ZHOU, W.; WANG, Z. L.(eds). *Scanning microscopy for nanotechnology: techniques and applications*. New York: Springer, 2007. 522 p. ISBN: 978-0-387-33325-0.
- [37] HOUSE OF COMMONS SCIENCE AND TECHNOLOGY COMMITTEE. Too little too late? Government investment in nanotechnology. London, mar. 2004. v.1. Disponível em: <http://www.publications.parliament.uk/pa/cm200304/cmselect/cmsctech/56/56.pdf>. Acesso em: 05/07/2012.
- [38] SINHA, N.; MA, J. Z.; YEOW, J. T. W. Carbon nanotube-based sensors. **Journal of Nanoscience and Nanotechnology**, v. 6, n. 3, p. 573-590, 2006.
- [39] XU, N. S.; HUQ, S. E. Novel cold cathode materials and applications. **Materials Science & Engineering R-Reports**, v. 48, p. 47-189, 2005.
- [40] TERRONES, M. Carbon nanotubes: synthesis and properties, electronic devices and other emerging applications. **International Materials Reviews**, v. 49, p. 325-377, 2004.
- [41] LIU, H. K.; WANG, G.X., GUO, Z.; WANG, J.; KONSTANTINOV, K. Nanomaterials for lithium-ion rechargeable batteries. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*, v. 6, p. 1-15, 2006.
- [42] ISOBE, H. TANAKA, T.; MAEDA, R.; NOIRI, E.; SOLIN, N.; YUDASAKA, M.; IJIMA, S.; NAKAMURA E. Preparation, purification, characterization, and cytotoxicity assessment of water-soluble, transition-metal-free carbon nanotube aggregates. *Angew Chemical International*, v. 45, n. 40, p. 6676-6680, 2006.
- [43] WRONSKI, Z. S. Materials for rechargeable batteries and clean hydrogen energy sources. **International Materials Reviews**, v. 46, p.1-49, 2001.

- [44] THOSTENSON, E. T.; REN, Z. F.; CHOU, T. W. Advances in the science and technology of carbon nanotubes and their composites: a review. **Composites Science and Technology**, v. 61, n.13, p.1899-1912, 2004.
- [45] NJUGUNA, B.; PIELICHOWSKI, K. Polymer nanocomposites for aerospace applications: properties. **Advanced Engineering Materials**, v. 5, n. 11, p. 769-778, 2003.
- [46] MONIRUZZAMAN, M.; WINEY, K. I. Polymer nanocomposites containing carbon nanotubes. **Macromolecules**, v. 39, p. 5194-5205, 2006.
- [47] THAYER, A. M. Carbon Nanotubes by the metric ton. *Chemical and Engineering News: Business*, v. 85, n. 46, p. 29-36, 2007.
- [48] DAI, L.; PATIL, A.; GONG, X.; GUO, Z.; LIU, L.; YONG, L.; ZHU, D. Aligned Nanotubes. *Chemical Physics Chemistry*, v. 4, p. 1150-1169, 2003.
- [49] MELECHKO, A.V.; MERKULOV, V.I.; MCKNIGHT, T.E. Vertically aligned carbon nanofibers and related structures: Controlled synthesis and directed assembly. *Journal of Applied Physics*, v. 97, p. 0413011-04130139, 2005.
- [50] HUCZKO, A. Synthesis of aligned carbon nanotubes. **Applied Physics A-Materials Science & Processing**, v. 74, n. 5, p. 617-638, 2002.
- [51] FU, K. F.; SUN, Y. P. Dispersion and solubilization of carbon nanotubes. **Journal of Nanoscience and Nanotechnology**, v. 3, n. 5, p. 351-364, 2003.
- [52] VAISMAN, L.; WAGNER, H. D.; MAROM, G. The role of surfactants in dispersion of carbon nanotubes. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 128, p. 37-46, 2006.
- [53] ANDREW, R.; JACQUES, D.; QIAN, D.; DICKEY, E.C. Purification and structural annealing of multiwalled carbon nanotubes at graphitization temperatures. *Carbon*, v. 39, n. 11, p. 1681-1687, 2001.
- [54] SINNOTT, S. B. Chemical functionalization of carbon nanotubes. **Journal of Nanoscience and Nanotechnology**, v. 2, n. 2, p.113-123, 2002.
- [55] YE, J. S.; SHEU, F. S. Functionalization of CNTs: new routes towards the development of novel electrochemical sensors. **Current Nanoscience**, v. 2, n. 4, p. 319-327, 2006.

[56] LIU, H.; ZHAI, J.; JIANG, L. Wetting and anti-wetting on aligned carbon nanotubes films. *Soft Materials*, v. 2, p. 811-821, 2006.

[57] HONG, Y. C.; SHIN, D.H.; CHO, S.C.; UHM, H.S. Surface transformation of carbon nanotube powder into super-hydrophobic and measurement of wettability. *Chemical Physics Letters*, v. 427, n. 4-6, p. 390-393, 2006.

[58] Kit In Vitro Toxology Assay Kit, Lactic Dehydrogenase based, Sigma-Aldrich

[59] Zhang, Y.; Hu, L.; Yu, D.; Gao, C.. Influence of silica particle internalization on adhesion and migration of human dermal fibroblasts. *Biomaterials*, v. 31, p. 8465 e 8474, 2010

[60] Santos, A.L. Desenvolvimento de cimento de fosfato de cálcio reforçado por fibras para uso na área médico-odontológica, Campinas, 2002. Tese Doutorado – Engenharia de Mecânica – Universidade Estadual de Campinas, 2002.

[61] Elfick, A.P.D.; Downes, A. R.; Mouras, R.. Development of tip-enhanced optical spectroscopy for biological applications: a review. *Anal Bioanal Chem* v. 396, p.45–52, 2010

[62] Bal, B.S.; Rahamanb, M.N. Orthopedic applications of silicon nitride ceramics. *Acta Biomaterialia* v. 8, p. 2889–2898, 2012.