

# INTERAÇÃO DA HIDROXIAPATITA NANOMÉTRICA NA SUPERFÍCIE DO GRAFENO\*

Camila Cristine Lopes<sup>1</sup>  
Wagner Anacleto Pinheiro<sup>2</sup>  
Daniel Navarro da Rocha<sup>3</sup>  
Jheison Lopes dos Santos<sup>4</sup>  
Marcelo Henrique Prado da Silva<sup>5</sup>

## Resumo

Este trabalho objetivou produzir nanocompósitos de hidroxiapatita (HA) com óxido de grafeno (GO), a fim de investigar a interação entre tais materiais. Os nanocompósitos de hidroxiapatita-grafeno foram produzidos com adição de 0,5%, 1,0% e 1,5% em peso de GO à HA. Para avaliar a interação físico-química entre as superfícies destes materiais, foram realizadas análises de espectroscopia Raman e espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (FTIR). A análise por Raman indicou que a adição de GO não afetou a banda característica da HA, sendo observadas as bandas D e G do óxido de grafeno. Além disso, o aumento da adição de GO levou a uma variação das intensidades das bandas D e G e nos valores de deslocamento no espectro Raman. Estes resultados sugerem uma possível transformação estrutural da HA-GO. Os resultados de FTIR indicaram que o aumento da adição do GO levou à ampliação da banda associada à água adsorvida, dada a natureza higroscópica do óxido de grafeno. A ausência da banda relacionada ao grupo carbonila do GO indicou a influência das nanopartículas de HA em sua superfície.

**Palavras-chave:** Hidroxiapatita; Grafeno; Óxido de grafeno; Nanocompósitos.

## INTERACTION OF NANOMETRIC HYDROXYAPATITE ON THE GRAPHENE SURFACE

### Abstract

This work aimed to produce hydroxyapatite (HA) nanocomposites with graphene oxide (GO), in order to investigate the interaction between these materials. The hydroxyapatite-graphene nanocomposites were produced with addition of 0.5wt%, 1.0wt% and 1.5wt% of GO in the HA. To evaluate the physical-chemical interaction between the surfaces of these materials, Raman spectroscopy and Fourier transformation on infrared spectroscopy (FTIR) were performed. The Raman analysis indicated that the addition of GO did not affect the characteristic band of HA, with the D and G bands of graphene oxide being observed. Furthermore, the increase in GO addition yielded in a variation of the intensities of the D and G bands and the Raman spectrum shift values. These results suggest a possible structural transformation of HA-GO. The results of FTIR indicated that the increase of the addition of the GO led to the expansion of the band associated to the adsorbed water, given the hygroscopic nature of the graphene oxide. The absence of the band related to the GO carbonyl group indicated the influence of the HA nanoparticles on their surface.

**Keywords:** Hydroxyapatite; Graphene; Graphene oxide; Nanocomposites.

<sup>1</sup> Engenharia de Materiais, Mestre, Doutoranda, Engenharia Mecânica e de Materiais, Instituto Militar de Engenharia, Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brasil.

<sup>2</sup> Engenharia Metalúrgica, Doutor, Professor, Engenharia Mecânica e de Materiais, Instituto Militar de Engenharia, Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brasil.

- <sup>3</sup> *Odontologia, Doutor, Pesquisador, Engenharia Mecânica e de Materiais, Instituto Militar de Engenharia, Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brasil.*
- <sup>4</sup> *Física, Doutor, Pesquisador Pós-Doutoral, Engenharia Mecânica e de Materiais, Instituto Militar de Engenharia, Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brasil.*
- <sup>5</sup> *Engenharia Metalúrgica e de Materiais, Doutor, Professor, Engenharia Mecânica e de Materiais, Instituto Militar de Engenharia, Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brasil.*

## 1 INTRODUÇÃO

Com o aumento da expectativa de vida da população mundial, as doenças crônicas se tornaram a principal causa da redução da qualidade de vida nos dias atuais. Dentre as doenças crônicas, a osteoporose é caracterizada por ser uma doença esquelética sistêmica que ocasiona uma diminuição da massa óssea e alteração na estrutura óssea, aumentando drasticamente o risco de fraturas [1]. A regeneração das fraturas resultantes da osteoporose permanece como um desafio clínico na área médica.

As estratégias atuais para a fabricação de enxertos ósseos incluem a utilização de enxertos autógenos, alógenos, xenógenos e aloplásticos (ou sintéticos). Entretanto, os enxertos autógenos, alógenos e xenógenos apresentam limitações, tais quais: trauma adicional para o paciente, possibilitando a morbidade, dor ou perda de função temporária do local doador, propriedades mecânicas, risco de rejeição do hospedeiro e elevado potencial de transmissão patogênica [2, 3]. Para suprir essas limitações, o desenvolvimento de biomateriais sintéticos, para os possíveis substitutos dos enxertos autógenos, alógenos e xenógenos, vem ganhando cada vez mais aceitação no mercado. Atualmente, os enxertos aloplásticos ou sintéticos são encontrados em diversas formas e tamanhos, apresentam alta disponibilidade, são facilmente manuseados, ausentes de contaminação, e a sua utilização diminui o tempo cirúrgico do paciente [4]. O projeto de um enxerto ósseo sintético ideal deve apresentar características como: alta biocompatibilidade, bioatividade, bioreabsorção controlada, combinação das propriedades osteocondutoras e osteoindutoras, além de ser estruturalmente semelhante ao tecido ósseo e ser economicamente viável. Dos produtos sintéticos para reparo e/ou substituição óssea disponíveis no mercado, destacam-se os fosfatos de cálcio e os vidros bioativos.

A evolução científica e tecnológica dos biomateriais pode ser representada por quatro gerações, interpretadas de forma conceitual e não cronológica, fundamentada nas propriedades dos materiais envolvidos e na resposta tecidual [5,6]. A primeira geração de materiais não foi desenvolvida especificamente para o uso médico, provocando uma resposta mínima ao tecido hospedeiro, e é conhecida pelos materiais bioinertes [2,7]. A segunda geração de materiais é caracterizada pelos materiais bioativos, cuja função é estabelecer uma forte ligação química na interface tecido/superfície do biomaterial [2,6]. Já a terceira geração de biomateriais foi projetada para estimular as respostas celulares a nível molecular, e os conceitos de bioatividade e biodegradabilidade passaram a ser combinados [6,8]. Uma forte mudança na interação dos biomateriais marcou o início da quarta geração de biomateriais e, conseqüentemente, o início das pesquisas na área da engenharia de tecidos e da medicina regenerativa. Esta geração é caracterizada pelo desenvolvimento de materiais com a capacidade de interagir com os sistemas biológicos, controlar o microambiente e conduzir o comportamento celular na direção desejada. As propriedades são otimizadas pela presença de células, fatores de crescimento e proteínas morfogenéticas ósseas (BMPs) [2].

Diante disso, a descoberta de um material revolucionário vem atraindo cientistas de diversas áreas por suas propriedades excepcionais e inúmeras possibilidades de uso. O grafeno é uma folha plana de átomos de carbono dispostos em uma estrutura cristalina hexagonal e bidimensional. Além das propriedades mecânicas, elétricas e condutoras que o grafeno possui, estudos vêm demonstrando a capacidade deste material em promover respostas celulares, induzindo a osteogênese com resultados similares às BMPs [9,10]. A combinação adequada das propriedades bioativas e

ostecondutoras da hidroxiapatita com as propriedades osteoindutoras do grafeno tem o potencial de superar as limitações existentes nos atuais produtos aloplásticos/sintéticos.

O estudo de nanocompósitos de hidroxiapatita (HA) e óxido de grafeno (GO) possibilita o desenvolvimento de novos biomateriais com propriedades mecânicas e biológicas mais atrativas do que aquelas da hidroxiapatita pura. No presente trabalho, nanocompósitos de hidroxiapatita-grafeno foram produzidos e a influência físico-química da adição de 0,5%, 1,0% e 1,5% em peso de GO à HA foi avaliada.

## 2 DESENVOLVIMENTO

### 2.1 Materiais e Métodos

#### 2.1.1 Hidroxiapatita e sua síntese

A hidroxiapatita utilizada neste trabalho foi obtida pela rota de precipitação em meio aquoso. Tal método consiste na preparação de soluções aquosas com os precursores dos íons cálcio e fosfato, através do controle da temperatura, concentração e pH da solução [11-13].

Primeiramente, uma solução de 1 M ácido láctico ( $C_3H_6O_3$ , pureza 85,5%, Vetec) foi adicionada a uma suspensão de 0,5 M hidróxido de cálcio ( $Ca(OH)_2$ , pureza 96%, Merck). Após 30 minutos, adicionou-se lentamente à mistura uma solução de 0,3 M ácido orto-fosfórico ( $H_3PO_4$ , pureza 85%, Merck), a uma taxa de 8 ml/min. Ao final desta etapa, a solução obtida apresentou um aspecto translúcido e estável, chamada de solução precursora. Após 24 horas do preparo da solução precursora, sempre em agitação, uma solução de 1M hidróxido de potássio (KOH, pureza 99,9%, Merck) foi adicionada para induzir a precipitação da hidroxiapatita através do ajuste do pH, a fim de alcançar o valor de 12. O precipitado resultante foi envelhecido por 24 horas e filtrado em sistema de vácuo, utilizando-se abundantemente água ultrapura (pH entre 5 e 6, obtida através de um equipamento de osmose reversa da marca Quimis, modelo Q842-210) para a retirada do KOH em excesso. Nesta etapa, foi obtido o pH=7 no líquido filtrado e, na sequência, o material foi encaminhado para secagem na estufa, a 50°C por 48 horas. Com os pós já secos, foram desaglomerados com o auxílio de um almofariz e um pistilo.

#### 2.1.2 Óxido de grafeno e sua produção

Como fonte de carbonos, foi utilizado o grafite Graflake 99550, fornecido pela empresa Nacional de Grafite, com granulometria média superior a 300  $\mu m$  (+50 mesh – abertura 0,297 mm), conforme especificações do fornecedor. Sua produção se deu pela esfoliação em fase líquida por rota química, utilizando o método de Hummers e Offeman [14] e modificado por Rourke *et al.* [15].

Para a primeira etapa, de intercalação, foram adicionados 10,00 g de grafite, 7,60 g de nitrato de sódio ( $NaNO_3$ , PA, Vetec) e 348,70 ml de ácido sulfúrico ( $H_2SO_4$ , pureza 98,8%, B'Herzog) em um balão volumétrico de fundo redondo. Após 2 horas de agitação, inseriu-se 49,50 g de permanganato de potássio ( $KMnO_4$ , pureza 93,3%, Vetec) para início da próxima etapa, a de oxidação. Por ser uma reação exotérmica, a adição foi realizada de forma fracionada (12 partes a cada 10 min), e utilizando um banho de gelo para evitar o superaquecimento. Após a última adição de  $KMnO_4$ , o tempo de oxidação é de 7 dias com base no estudo de FARIA *et al.* [16].

A etapa de esfoliação foi iniciada com o preparo e gotejamento de 1210 ml de uma solução contendo  $\text{H}_2\text{SO}_4$  diluída a 5% vol. por 1 hora. A mistura foi mantida sob agitação durante o período de 3 horas, sendo então adicionada uma solução contendo 33 g de peróxido de hidrogênio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ , pureza 32%, Vetec) a 30 volumes (corresponde a 9% vol.). Para remover o excesso de reagentes durante o processo, foram adicionados 1000 ml de uma solução diluída contendo  $\text{H}_2\text{O}_2$  a 3% vol. e  $\text{H}_2\text{SO}_4$  a 0,5% vol., mantendo em agitação por 12 horas. A mistura resultante foi submetida à centrifugação (Hettich Centrifugen rotina 420R) a 9300 rpm por 30 min, para descarte do sobrenadante e sedimentação do material viscoso. Em seguida, adicionou-se à mistura 1000 ml da solução  $\text{H}_2\text{O}_2$  a 3%vol. para completa lavagem e eliminação dos reagentes.

Após a adição da solução  $\text{H}_2\text{O}_2$  a 3%vol. e  $\text{H}_2\text{SO}_4$  a 0,5%vol., foram realizadas 13 centrifugações, como também outras 5 lavagens com água ultrapura. Ao final desta etapa, realizou-se a filtração a vácuo das dispersões obtidas para eliminação de particulados de grafite não oxidado, com o auxílio de um funil de Büchner, kitassato, bomba de vácuo e tela polimérica de silk screen (GG PET plus 100T, Global) com abertura de 100 mesh (149  $\mu\text{m}$ ).

### **2.1.3 Produção de Nanocompósitos de Hidroxiapatita-Grafeno**

A primeira etapa de produção dos nanocompósitos consistiu na mistura entre a hidroxiapatita e óxido de grafeno. A mistura constituiu-se pela adição dos pós de HA em um becker contendo GO, sendo posteriormente submetida à agitação mecânica, por 1 hora, em agitador mecânico (Fisatom, modelo 713). Na sequência, as misturas foram filtradas a vácuo com o auxílio de funil de Buchner, kitassato, bomba de vácuo e papel de filtro qualitativo para eliminação do excesso de água. O material foi seco em estufa, com temperatura controlada em torno de 50 °C, por 48 horas. Após a obtenção dos pós secos, estes foram desaglomerados com o auxílio de um almofariz e um pistilo. Os nanocompósitos serão produzidos contendo frações em peso de 0,5%, 1,0% e 1,5% de GO.

### **2.1.4 Espectroscopia Raman**

A espectroscopia Raman tornou-se uma das técnicas mais importantes para caracterização do grafeno e seus derivados. Trata-se de uma técnica não destrutiva capaz de identificar a impressão digital do material pela análise das bandas D e G, situadas em torno de 1360 e 1560  $\text{cm}^{-1}$ , respectivamente [17]. Além disso, a técnica possibilita avaliar a quantidade de camadas de grafeno, identificar subprodutos indesejados, defeitos estruturais, grupos funcionais e modificações químicas durante a produção do grafeno [18].

As análises foram realizadas no Laboratório de Revestimentos Protetores e Materiais Nanoestruturados da Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro (PUC-Rio), utilizando um espectrômetro NT-MDT NTEGRA com comprimento de onda de laser de 473 nm, faixa de varredura entre 500 e 3250  $\text{cm}^{-1}$  e tempo de radiação de 100 s.

### **2.1.5 Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR)**

A espectroscopia FTIR é uma técnica que tem por base as mudanças de estados energéticos vibracionais, evidenciando então a presença de grupos funcionais na estrutura da amostra. A amostra é exposta à uma radiação infravermelha e é comparada com a radiação transmitida na sua ausência, registrada na forma de

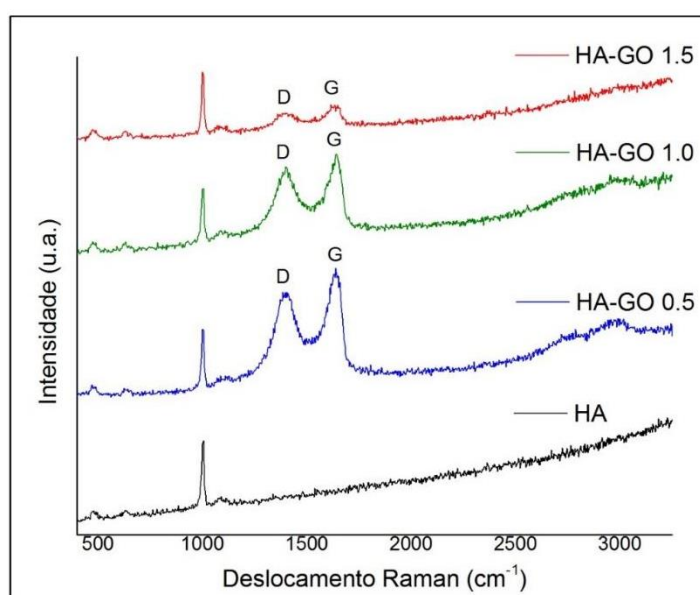
bandas de absorção. A absorção dessa radiação corresponde à frequência de vibrações das moléculas que compõem o material [17].

As análises foram realizadas no Centro Brasileiro de Pesquisas Físicas (CBPF) pelo espectrofotômetro FT-IR Prestige-21 da Shimadzu, obtidos na faixa de número de ondas entre 4000 e 400  $\text{cm}^{-1}$  e na resolução de 4  $\text{cm}^{-1}$ . As amostras serão preparadas sob a forma de pastilhas transparentes com a razão em peso amostra/KBr de 1:100.

## 2.2 Resultados e Discussão

### 2.2.1 Espectroscopia Raman

As análises por Raman das amostras de HA, HA-GO 0,5%, HA-GO 1,0% e HA-GO 1,5% são mostradas na Figura 1. O espectro Raman evidencia uma banda muito característica em 1001,53  $\text{cm}^{-1}$ , para a amostra de HA, que corresponde ao modo simétrico do grupo  $\text{PO}_4$  tetraédrico (ligação P – O). Foram observadas outras duas bandas, em 1090,95 e 1114,00  $\text{cm}^{-1}$ , atribuídos ao alongamento antissimétrico do grupo  $\text{PO}_4$  (ligação P – O). Além disso, outras duas bandas observadas, em 628,75 e 479,21  $\text{cm}^{-1}$ , são relacionados ao modo de flexão triplamente e duplamente degenerada do grupo  $\text{PO}_4$  (ligação O – P – O), respectivamente. Todas estas bandas identificadas foram também atribuídas a modos vibracionais do grupo fosfato em outros trabalhos e podem ser observadas na Tabela 1 [20-22].



**Figura 1.** Espectro Raman evidenciando as bandas características da HA, HA-GO 0,5%, HA-GO 1,0% e HA-GO 1,5%.

**Tabela 1.** Bandas do espectro Raman observados para a HA

BANDA ( $\text{cm}^{-1}$ )	DESCRIÇÃO
1004,85	Modo de alongamento simétrico do grupo $\text{PO}_4$ tetraédrico (ligação P – O).
1090,95; 1114,00	Modo triplo de alongamento assimétrico degenerado do grupo $\text{PO}_4$ grupo (ligação P – O).
628,75 479,21	Modo de flexão triplamente degenerada do grupo $\text{PO}_4$ (Ligação O – P – O)

Para as amostras de nanocompósitos de HA-GO, a banda característica da HA não sofreu alteração, mantendo a sua localização em  $1001,53 \text{ cm}^{-1}$ . Porém, como mostrado na Figura 1, as bandas típicas do GO, que correspondem à banda D e G, respectivamente, sofreram alteração nos nanocompósitos de HA-GO para:  $1402,51$  e  $1639,20 \text{ cm}^{-1}$  (HA-GO 0,5%);  $1399,31$  e  $1642,31 \text{ cm}^{-1}$  (HA-GO 1,0%); e,  $1389,72$  e  $1648,55 \text{ cm}^{-1}$  (HA-GO 1,5%). Os picos do espectro Raman das bandas D e G e a relação  $I_D/I_G$ , para o GO e para os nanocompósitos HA-GO, estão listados na Tabela 2.

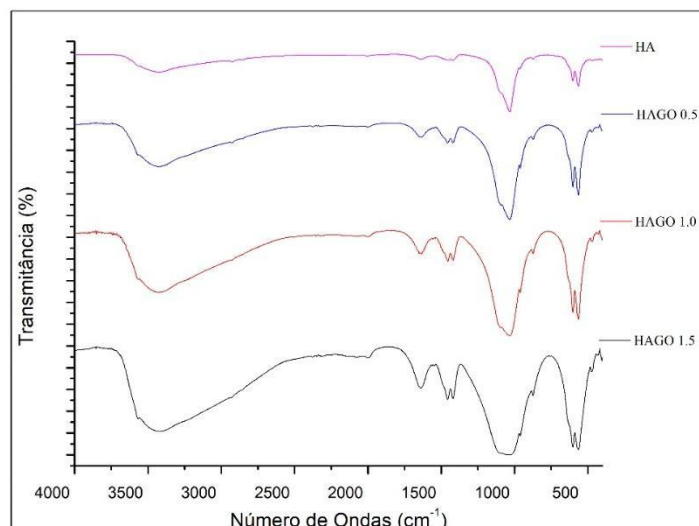
Nota-se que, para os nanocompósitos HA-GO, o aumento da adição de 0,5% para 1,5%, em peso de GO levou a uma variação nas intensidades das bandas D e G e nos valores de deslocamento no espectro Raman. A relação  $I_D/I_G$ , que se refere a densidade de defeitos presentes no nanocompósito HA-GO, foi menor ao comparar ao GO, que apresentou  $I_D/I_G = 1,03$ . Para os nanocompósitos HA-GO contendo 0,5, 1,0 e 1,5%, em peso, de GO, a razão  $I_D/I_G$  foi de 0,902, 0,944 e 0,943, respectivamente. Este resultado implica em um grande número de domínios  $sp^2$  e defeitos estruturais da rede do grafeno [23]. Assim, como relatado por Gong *et al.*, [24], acredita-se que a variação nos valores das bandas D e G, bem como a menor intensidade  $I_D/I_G$ , implicam em uma interação entre a hidroxiapatita nanométrica na superfície do grafeno, bem como uma possível transformação estrutural da HA-GO.

**Tabela 2.** Picos do espectro Raman das bandas D e G e a relação  $I_D/I_G$  observados para o GO e para os nanocompósitos HA-GO

AMOSTRA	BANDA D	BANDA G	$I_D/I_G$
GO	1358,95	1587,30	1,03
HA-GO 0,5%	1402,51	1639,20	0,902
HA-GO 1,0%	1399,31	1642,31	0,944
HA-GO 1,5%	1389,72	1648,55	0,943

### 2.2.2 Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR)

A Figura 2 representa os espectros FTIR das amostras de HA, HA-GO 0,5%, HA-GO 1,0% e HA-GO 1,5%. O espectro da HA mostra as bandas de absorção características em  $1034 \text{ cm}^{-1}$ ,  $1091 \text{ cm}^{-1}$  e  $962 \text{ cm}^{-1}$  atribuídas ao alongamento e flexão do grupo  $PO_4^{3-}$ . A banda larga entre  $3750-2500 \text{ cm}^{-1}$  pode ser atribuída à água adsorvida na HA, enquanto que a banda em  $1639 \text{ cm}^{-1}$  é característica do modo vibracional em torno do O-H-O (Tabela 3). É observado que, devido ao aumento da adição de 0,5% para 1,5% de GO no nanocompósito HA-GO, ocorreu um aumento na banda atribuída à água adsorvida, já que o GO é um material higroscópico.



**Figura 2.** Espectros FTIR característicos da HA, HA-GO 0,5%, HA-GO 1,0% e HA-GO 1,5%.

**Tabela 3.** Bandas do espectro FTIR observados para a HA

BANDA (cm <sup>-1</sup> )	DESCRIÇÃO
3750-2500	Modo de estiramento da ligação –OH devido à presença de água adsorvida em sua superfície (ligação OH)
1639	Modo vibracional em torno do O-H-O.
1091; 1034; 962	Modo de flexão do grupo PO <sub>4</sub> <sup>-3</sup> .

Em relação aos espectros por FTIR dos nanocompósitos HA-GO (Tabela 4), a ausência da banda de absorção em 1720-1740 cm<sup>-1</sup>, relacionada aos grupos carbonila do GO, indicam a influência das nanopartículas de HA na superfície das folhas de GO [24]. Este resultado possivelmente ocorre através da ligação da hidroxila da HA com o grupo funcional superficial do GO [24]. Ainda pode ser verificado um alargamento da banda de fosfato nos nanocompósitos de HA-GO, em 1091 cm<sup>-1</sup>, devido à presença da banda, em 1160 cm<sup>-1</sup>, relacionado ao aumento da adição de GO.

**Tabela 4.** Banda do espectro FTIR observados para os nanocompósitos HA-GO

BANDA (cm <sup>-1</sup> )	DESCRIÇÃO
3750-2500	Modo de estiramento da ligação –OH devido à presença de água adsorvida em sua superfície (ligação OH)
1639	Modo vibracional em torno do O-H-O.
1091; 1034; 962	Modo de flexão do grupo PO <sub>4</sub> <sup>-3</sup> .
1091	Modo de alongamento simétrico do grupo – COOH (ligação C – O)

### 3 CONCLUSÃO

Este trabalho teve por objetivo investigar a interação físico-química entre a hidroxiapatita em escala nanométrica com o grafeno. As principais conclusões que evidenciaram a interação físico-química da hidroxiapatita nanométrica com a superfície do grafeno foram:



O aumento da adição de 0,5% para 1,5%, em peso de GO levou a uma variação nas intensidades das bandas D e G e nos valores de deslocamento no espectro Raman. A ausência da banda de absorção em  $1720\text{-}1740\text{ cm}^{-1}$ , relacionada aos grupos carbonila do GO, que indicou a influência das nanopartículas de HA na superfície das folhas de GO.

## Agradecimentos

Os autores agradecem à CAPES pelo fomento, à PUC-Rio pela realização das análises de FTIR, e ao INT pelo auxílio com a centrífuga na produção de GO.

## REFERÊNCIAS

- 1 Hernlund E, Svedbom A, Ivergård M, Compston J, Cooper C, Stenmark J, *et al.* Osteoporosis in the European Union: medical management, epidemiology and economic burden. A report prepared in collaboration with the International Osteoporosis Foundation (IOF) and the European Federation of Pharmaceutical Industry Associations (EFPIA). *Arch Osteoporos.* 2013;8:1-125.
- 2 Ratner B, Hoffman A, Schoen F, Lemon J. *Biomaterials science: an introduction to materials in medicine.* 3ª ed. EUA: Elsevier; 2013.
- 3 Melek LN. Tissue engineering in oral and maxillofacial reconstruction. *Science Direct.* 2015;12:1-13.
- 4 Potter JK, Ellis E. Biomaterials for Reconstruction of the Internal Orbit. *J Oral Maxillofac Surg.* 2004;10:1280-1297.
- 5 Attaf B. *Advances in Composite Materials for Medicine and Nanotechnology.* Croácia: InTech; 2011.
- 6 Navarro M, Michiardi A, Castaño O, Planell JA. Biomaterials in orthopaedics. *J. R. Soc. Interface.* 2008;5:1137–1158.
- 7 Hench LL. Biomaterials. *Science.* 1980;208:826–831.
- 8 Hench LL, Polak JM. Third-Generation Biomedical Materials. *Science.* 2002;295:1014–1017.
- 9 Nayak TR, Andersen H, Makam VS, Khaw C, Bae S, Xu X. Graphene for Controlled and Accelerated Osteogenic Differentiation of Human Mesenchymal Stem Cells. *ACSNano.* 2011;5:4670–4678.
- 10 Nair M, Nancy D, Krishnan AG, Anjusree GS, Vadukumpully S, Nair SV. Graphene oxide nanoflakes incorporated gelatin–hydroxyapatite scaffolds enhance osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells. *Nanotechnology.* 2015;26:1–10.
- 11 Navarro da Rocha D, Gobbo LA, Prado da Silva, MH. Production and Characterization of Niobate Apatite. *J. Mater. Res. Technol.* 2013;2:24–29.
- 12 Navarro da Rocha D, Cruz LRO, Campos JB, Marçal RLSB, Mijares DQ, Coelho PG, Prado da Silva MH. Mg substituted apatite coating from alkali conversion of acidic calcium phosphate. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl.* 2017; 70:408-417
- 13 Navarro da Rocha D, Prado da Silva MH, Campos JB, Marçal RLSB, Mijares DQ, Coelho PG, Cruz LRO. Kinetics of conversion of brushite coatings to hydroxyapatite in alkaline solution; *J. Mater. Res. Technol.* 2018; <https://doi.org/10.1016/j.jmrt.2018.02.002>
- 14 Hummers WS, Offeman RE. Preparation of Graphitic Oxide. *J. Am. Chem. Soc.* 1958;8:1330-1339.
- 15 Rourke JP, Pandey PA, Moore JJ, Bates M, Kinloch IA, Young RJ, Wilson NR. The Real Graphene Oxide Revealed: Stripping the Oxidative Debris from the Graphene-like Sheets. *Angew. Chem. Int. Ed.* 2011;50:3173–3177.

- 16 Faria GS, Lima AM, Brandão LP, Costa AP, Nardecchia S, Ribeiro, AA. Produção e caracterização de óxido de grafeno e óxido de grafeno reduzido com diferentes tempos de oxidação. *Revista Matéria*. 2017;22:1–9.
- 17 Ferrari AC. Raman spectroscopy of graphene and graphite: Disorder, electron–phonon coupling, doping and nonadiabatic effects. *Solid State Communications*. 2007;143:47–57.
- 18 Ferrari AC, Basko DM. Raman spectroscopy as a versatile tool for studying the properties of graphene. *Nature Nanotechnology*. 2013;8:235–246.
- 19 Thomas S, Thomas R, Zachariah A, Mishra R. *Spectroscopic Methods for Nanomaterials Characterization*. 2ª Ed. Cambridge: Elsevier; 2017.
- 20 Koutsopoulos S. Synthesis and characterization of hydroxyapatite crystals: A review study on the analytical methods. *J Biomed Mater Res*. 2002;62:600–612.
- 21 Yilmaz B, Elvis Z Raman Spectroscopy Investigation of Nano Hydroxyapatite Doped with Yttrium and Fluoride Ions. *J. Spectroscopy Letters*. 2013;47:24-29.
- 22 Nosenko VV, Yaremko AM, Dzhagan VM, Vorona IP, Romanyuk YA, Zatovsky IV. Nature of some features in Raman spectra of hydroxyapatite-containing materials. *J. Raman Spectroscopy*. 2016;47:726–730.
- 23 Baradaran S, Moghaddam E, Basirun WJ, Mehrali M, Sookhakian M, Hamdi M, et al. Mechanical properties and biomedical applications of a nanotube hydroxyapatite-reduced graphene oxide composite. *Carbon*. 2014;69:32–42.
- 24 Gong M, Zhao Q, Dai L, Li Y, Jiang T. Fabrication and Friction Coefficient of Graphene Oxide Reinforced Hydroxyapatite Composite. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*. 2018;18:1893–1900.