



Universidade de Brasília
Instituto de Ciências Biológicas
Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal

Defesa de tese de Doutorado

**METODOLOGIA INOVADORA PARA MODIFICAÇÃO DE PRÓTESE DE
CAVIDADE GLENOIDE EM POLIETILENO DE ULTRA ALTO PESO MOLECULAR
COM ÓXIDO DE GRAFENO**

Thyago José Arruda Pacheco

Orientador: Prof. Dr. João Paulo Figueiró Longo

Brasília-DF

2025

Thyago José Arruda Pacheco

**METODOLOGIA INOVADORA PARA MODIFICAÇÃO DE PRÓTESE DE
CAVIDADE GLENOIDE EM POLIETILENO DE ULTRA ALTO PESO MOLECULAR
COM ÓXIDO DE GRAFENO**

Defesa de doutorado apresentada ao
Programa de Pós-graduação em Biologia Animal da
Universidade de Brasília, como parte integrante dos
requisitos para obtenção do título de Doutor.

Orientador: Prof. Dr. João Paulo Figueiró Longo

Brasília-DF

2025

Dedico este trabalho a Deus, à Ana e a todos os familiares que sempre me deram suporte

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer à Universidade de Brasília que me acolheu durante esses mais de 10 anos, oferecendo-me diversas oportunidades para o meu crescimento intelectual e pessoal.

À minha mãe, Divina Kelly, pelo imenso amor e por ter tido a coragem de encarar a vida e nos dar um belo exemplo do sentido real de vencer na vida, apesar de inúmeras dificuldades.

Ao meu Pai, Chico, que sempre demonstrou todo o carinho do mundo por mais que estivesse doente e debilitado, nos dando amor e ensinando a amar.

Aos meus irmãos, Diego e Vyctor, por estarem presentes em minha vida e saber que posso contar com vocês sempre que precisar.

À minha namorada, Ana, por sua maravilha como pessoa e por me ensinar a ser uma versão melhor de mim mesmo. E à toda a sua família, que sempre me apoiou.

Aos meus Tios Graça e Alvimar, pelo imenso apoio que sempre concederam a mim e à minha família, serei eternamente grato por tudo.

À comunidade católica da UnB, por ter sempre me acolhido e fazer do anfiteatro 6 às 12h15 um oásis no meio do deserto.

À Santa maria, esperança nossa, sede da sabedoria.

A todos os meus tios, primos, amigos, todos aqueles que de alguma forma estiveram presentes em minha vida me ajudando de alguma maneira.

Ao meu primo Rafael (in memorian), por ter sido sempre uma ótima pessoa e nos deixar o seu exemplo.

A todos aqueles que me ajudaram de alguma forma me ensinando algo ou com empréstimos de materiais, dicas ou trabalho.

Ao pesquisador Sergio Moya e ao seu Aluno Ahmed Subrati do CIC BiomaGune, Espanha, pela amizade, gentileza, colaboração na realização de alguns experimentos e por todas as dicas que me deram sobre San Sebastián e outros locais.

Ao Prof. Dr. João Paulo Figueiró, meu orientador, por aceitar a me orientar neste doutorado e pelo seu exemplo que arrasta como humano e empreendedor. Obrigado pelo seu sim e pela ajuda que pacientemente me concedeu.

Aos professores Ricardo, Filipe, Marcos, Marcio, Karen, Jaqueline, Jorlândio, Patrícia, Luís, Laíse, Mônica e outros por todas as conversas, conselhos, ajuda, carona e trabalho.

Às agências FINEP, CAPES, DPG, FAPDF, FINATEC, CNPq, por todo o suporte financeiro que me deram para a realização desse trabalho de doutorado.

Deo omnis gloria!

RESUMO

Polímeros biocompatíveis, tais como o polietileno de alto peso molecular (UHMWPE) são amplamente utilizados em próteses de alta resistência. Esse material pode ser empregado em diferentes tipos de próteses articulares devido a sua alta resistência mecânica, como na região temporomandibular (ATM). Todavia, com o tempo, ele pode apresentar desgaste por abrasão, gerando fragmentos de polietileno que são depositados no ambiente articular, recrutando fibroblastos e macrófagos, ocasionando a perda do implante. Por isso, inúmeras iniciativas têm sido propostas como o intuito de aumentar o tempo de vida útil desses materiais. Nosso trabalho teve como objetivo o enriquecimento do UHMWPE com óxido de grafeno (GO) em uma prótese ATM, a fim de aumentar a vida útil e garantir melhores propriedades mecânicas e antimicrobianas da prótese. O novo método inovador consiste na incorporação do GO via termo-pensagem no UHMWPE e sem solventes. Os resultados de caracterização mostraram que o GO foi incorporado com sucesso no material de UHMWPE, apresentou uma resistência maior da prótese de UHMWPE incorporada com GO, além de baixa toxicidade e certa capacidade antimicrobiana. Além disso, por ser considerado um processo inovador, o método utilizado para a incorporação do GO no UHMWPE foi depositado como patente de invenção junto ao Instituto Nacional de Propriedade Industrial. Portanto, o GO aprimorou as propriedades do UHMWPE, mostrando-se promissor para a indústria de próteses, com potencial para reduzir custos e melhorar o bem-estar dos pacientes.

Palavras-chave: Articulação; Artrose; Implante; Mandíbula; Osteoartrite; Termo-prensagem; UHMWPE.

ABSTRACT

Biocompatible polymers such as ultra-high molecular weight polyethylene (UHMWPE) are widely used in high-strength prosthetics. This material can be used in different types of joint prostheses due to its high mechanical resistance, such as temporomandibular region (TMJ) prostheses. However, over time, it may wear due to abrasion, generating polyethylene fragments that are deposited in the joint environment, recruiting fibroblasts and macrophages, causing the loss of the implant. Our work aimed to enrich UHMWPE with graphene oxide (GO) in an ATM prosthesis, to increase the useful life and guarantee better mechanical and antimicrobial properties of the prosthesis. The new innovative method consists of incorporating GO via thermo-pressing into UHMWPE and without solvents. Therefore, numerous initiatives have been proposed with the aim of increasing the useful life of these materials. The characterization results showed that GO was successfully incorporated into the UHMWPE material, showed greater resistance of the UHMWPE prosthesis incorporated with GO, in addition to low toxicity and certain antimicrobial capacity. Furthermore, as it is considered an innovative process, the method used to incorporate GO into UHMWPE was filed as a patent application with the National Institute of Industrial Property. Therefore, GO has improved the properties of UHMWPE, showing promise for the prosthetics industry, with the potential to reduce costs for and improve the well-being of patients.

Keywords: Arthrosis; Implant; Jaw; Joint; Osteoarthritis; Thermo-pressing; UHMWPE.

Lista de Figuras

Figura 1- Monômero de polietileno.	2
Figura 2 - Prótese temporomandibular de UHWMPE (cavidade glenoide) com o aparato de titânio. Foto de CPMH digital, Brasília-DF.....	2

Lista de Tabelas

Tabela 1 - Discriminação de reagentes utilizados para a produção do meio Ágar Mueller Hinton	7
--	---

Lista de Abreviações

AFM – Microscopia de força atômica

AUC – Área sob a curva

ATCC - *American Type Culture Collection*

ATM – articulação temporomandibular

AUC – Área sob a curva

CAM – Medida do Ângulo de contato

CCL-5 - Essa é a designação dada pela *American Type Culture Collection* (ATCC) a L132

CFU - Unidade Formadora de Colônia

DMEM - *Dulbecco's Modified Eagle's Medium*

DSC - Calorimetria Exploratória Diferencial

EDS - Espectroscopia de Energia Dispersiva

L132 – Fibroblastos Humanos

MEV – Microscopia de varredura

mg- Miligramas

MHB - caldo Mueller-Hinton

mL – Mililitros

GO - óxido de grafeno

RAMAN - espectroscopia Raman

RAW 264.7 - uma linhagem celular de macrófagos que foi estabelecida a partir de um tumor em um camundongo macho induzido com o vírus da leucemia murina Abelson.

RealTime-Glo™ - Teste da Promega para avaliar viabilidade das células

SFB – Soro Fetal Bovino

TEM – Microscopia eletrônica de transmissão

TGA - Análise Termogravimétrica

TIB-71 - Essa é a designação dada pela *American Type Culture Collection* (ATCC) a RAW 264.7

UHMWPE - ultra high molecular weight polyethylene

UHMWPE-GO - ultra-high molecular weight polyethylene com óxido de grafeno

UnB – Universidade de Brasília

WT - peso

XPS - Espectroscopia de Fotoelétrons por Raios-X

XRD – Difração de raios-x

SUMÁRIO

1	Introdução	1
1.1	Prótese de polietileno.....	1
1.2	UHMWPE como prótese articular	2
1.3	Prótese de UHMWPE com GO.....	4
1.4	Métodos disponíveis.....	4
2	Objetivos.....	5
2.1	Objetivo geral.....	5
2.2	Objetivos específicos	5
3	Material e métodos.....	6
3.1.1	Manutenção das Células RAW 264.7.....	6
3.1.2	Manutenção das células de <i>Candida sp</i>	6
3.1.3	Manutenção das células L132	7
3.2	Procedimentos experimentais <i>in vitro</i>	7
3.2.1	Plaqueamento	7
3.2.2	Teste de viabilidade celular em tempo real (RAW 264.7).....	8
3.2.3	Teste de viabilidade celular em tempo real	8
3.3	Síntese do GO.....	8
3.4	Fabricação das próteses	9
3.5	Procedimentos para caracterização	10
3.6	Teste estatístico	13
4	Resultados	14
4.1	Documento do rascunho do manuscrito a ser submetido.....	14
4.2	Documento do material suplementar a ser submetido	39
4.3	Documento da patente.....	58
5	Conclusão	78
6	Referências bibliográficas	79
7	Principais atividades acadêmicas desenvolvidas durante o DOUTORADO.....	84

1 INTRODUÇÃO

1.1 Prótese de polietileno

A população global está envelhecendo e, com isso, os problemas de saúde surgindo [1]. A osteoartrite, por exemplo, doença articular que causa o desgaste da cartilagem e ossos, promove alterações nas articulações e pode fazer com que as pessoas precisem de fazer uma substituição da articulação com o uso de próteses [2]. Ademais, fraturas em regiões articulares também podem levar à intervenção com o uso de implantes como é o caso de próteses da Articulação Temporomandibular (ATM) [3].

Próteses produzidas com polímeros biocompatíveis, como o polietileno, são utilizadas na sua forma de alto peso molecular (UHMWPE) em próteses ATM na cavidade glenoide [3, 4]. Esses componentes podem ser utilizados em diversos tipos de próteses articulares, mas sua aplicação como próteses em substituição à porção articular, tem se destacado devido à sua grande procura [5, 6]. Este material possui boas propriedades mecânicas, porém, com o passar do tempo, desgasta-se por abrasão, gerando fragmentos de polietileno que se depositam no ambiente articular. As partículas artificiais liberadas na membrana intersticial do osso/prótese acionam fibroblastos e macrófagos na região do implante, resultando na osteólise [7].

Esses fragmentos, por sua vez, são capazes de gerar algumas lesões de corpo estranho, com potencial de gerar necrose asséptica na região. Nestes casos, a substituição da prótese pode ser necessária, causando grandes prejuízos tanto do ponto de vista da saúde do paciente como do ponto de vista do sistema de saúde como um todo. Portanto, inúmeras iniciativas têm sido propostas com o objetivo de aumentar a vida útil desses materiais. Dentro das iniciativas propostas, tem sido sugerida a incorporação de nanomateriais, como o óxido de grafeno (GO), para aumentar a resistência e durabilidade dessas próteses articulares [8]. No âmbito desta iniciativa, o enriquecimento do UHMWPE com o GO tem como objetivo específico aumentar a vida útil e garantir melhores propriedades mecânicas e antimicrobianas da prótese [9, 10].

1.2 UHMWPE como prótese articular

O UHMWPE é um polímero de milhões de monômeros de etileno e com peso molecular de 2-6 milhões de gramas por mol (Figura 1). Devido a alta resistência desse material, ele é usado em coletes à prova de bala, pranchas de *snowboard* ou outros materiais que exigem alta resistência [11-13].

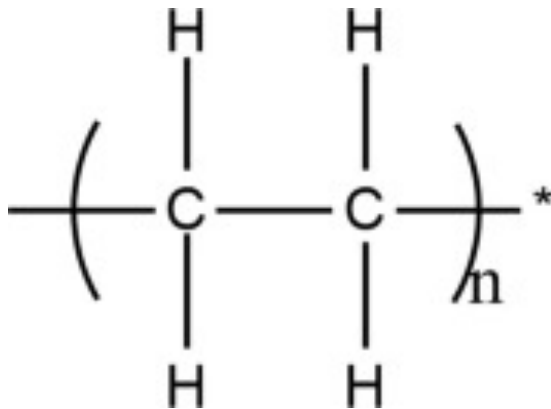


Figura 1- Monômero de polietileno.

Na área da medicina, o UHMWPE já é usado comercialmente para próteses articulares, como na região do acetábulo ou na ATM juntamente com antioxidantes como a vitamina E (Figura 2).

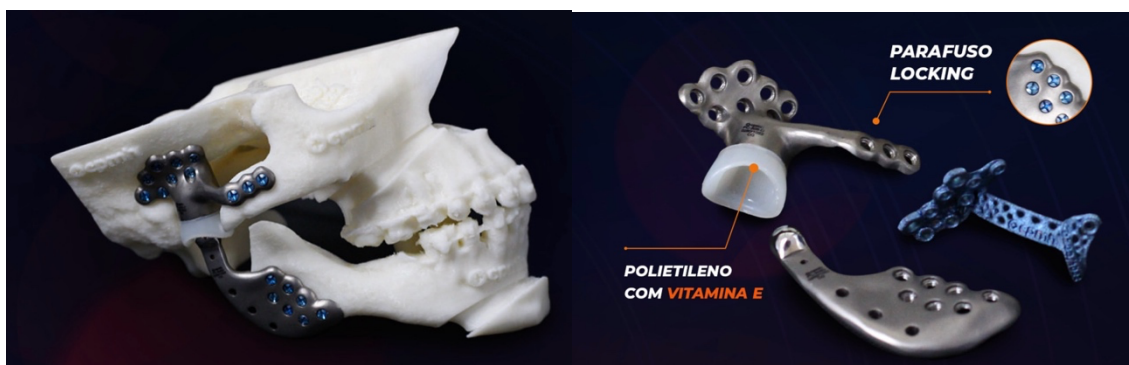


Figura 2 - Prótese temporomandibular de UHMWPE (cavidade glenoide) com o aparato de titânio. Foto de CPMH digital, Brasília-DF.

Apesar do seu uso ser aprovado para seres humanos, o uso por longo tempo dessas próteses articulares pode gerar pequenos defeitos na estrutura polimérica do material, gerando fragmentos que podem ser lesivos à funcionalidade da articulação [7]. Em termos gerais, esses pequenos fragmentos gerados podem dar início à processos de inflamação crônica e um estresse oxidativo constante que acabam por gerar prejuízos à funcionalidade da articulação [14]. Nesse sentido, existe uma procura muita grande por parte da indústria e da comunidade científica para tentar minimizar ou talvez solucionar estes problemas.

Frente a esses desafios, diferentes estratégias tecnológicas vem sendo empregadas para minimizar esses desafios. Para o problema do estresse oxidativo de longo prazo, uma das estratégias é incorporar materiais antioxidantes, como a vitamina E, na prótese de UHMWPE como forma de minimizar este estresse oxidativo [10, 14].

Entretanto, o desgaste por abrasão ainda é um grande problema para o sistema de saúde e para os pacientes, uma vez que a sistema de saúde pode ter um custo maior com substituição recorrente de próteses desgastadas e, os implantados, no caso de falha da prótese, devem passar novamente pelo processo cirúrgico para a substituição do implante [5, 14].

Além disso, essas próteses podem sofrer contaminação como por estafilococcus, streptococcus e fungos [15]. Dessa forma, alternativas que melhore as propriedades do material, com alguma atividade antimicrobiana, podem aumentar o tempo de vida útil desse material [15, 16].

Portanto, estratégias que visem reduzir o desgaste dessas próteses e garantir propriedades antimicrobiológicas são amplamente estudadas para a redução de custos com o sistema de saúde e melhor bem-estar do paciente. Diferentes abordagens, tais como a modificação da composição polimérica com nanocompósitos, tem sido proposta [17]. O nosso grupo de pesquisa possui certa expertise no desenvolvimento e melhoramento dessa forma de material, otimizando assim as propriedades biomecânicas desse tipo de prótese. Dentre as possibilidades de nanomateriais a serem utilizadas, os nanocompósitos de GO têm se destacado como um material de custo acessível e propriedades interessantes para a necessidade apresentada como atividade antimicrobiológica e aperfeiçoamento de propriedades mecânicas [8, 9, 18].

1.3 Prótese de UHMWPE com GO

A incorporação de materiais em outros é uma estratégia que pode ser utilizada para criar materiais com novas características. Isso permite a criação de materiais inovadores e personalizados para os pacientes. A incorporação do GO, um material biocompatível, no UHMWPE é uma estratégia que visa reduzir a abrasão, garantindo melhores propriedades mecânicas. Além disso, o GO revestindo o material pode reduzir a degradação oxidativa do polímero de UHMWPE, além de apresentar certa atividade antimicrobiana, evitando a contaminação da prótese, apoptose e, conseqüentemente, a perda do implante [8, 18, 19]. Portanto, o GO pode ser um importante nanocompósito para aperfeiçoar próteses de UHMWPE, melhorando as propriedades mecânicas, além de novas características ao material da prótese como possível efeito antioxidante e antimicrobiológico.

1.4 Métodos disponíveis

Os métodos atuais para incorporar GO ao UHMWPE usam diferentes matérias-primas, solventes tóxicos [20] ou várias etapas que aumentam o custo de produção da prótese [21]. O pedido de patente CN 107446221A, por exemplo, por um lado, usa diclorobenzeno, que pode resíduos tóxicos mesmo depois que o composto foi removido. A patente US 2019 0211478, por outro lado, usa pasta de grafeno, fibra de vidro, óleo e UHMWPE como base e esses materiais são processados fisicamente, misturando-os em alta velocidade, terminando com uma técnica para produzir fios (*gel-spun*) e várias etapas que aumentam o custo e tempo de produção da prótese. Nosso trabalho visa a produção da prótese de UHMWPE da região glenóide da ATM, mas com GO e utilizando apenas uma etapa para a produção da nova prótese de UHMWPE-GO: apenas a adição de GO (1% wt.). Ao utilizar apenas uma etapa, sem solvente, é esperado, além de um processo inovador, reduzir custos da incorporação do GO ao UHMWPE

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Investigar os efeitos da incorporação do GO em UHMWPE da região glenóide de prótese de ATM, avaliando o potencial de melhorar as propriedades biomecânicas e investigar a toxicidade desse material em meios biológicos e atividade antimicrobiana. O intuito é contribuir para o desenvolvimento de materiais mais duráveis e com novas propriedades para a futura aplicação clínica.

2.2 Objetivos específicos

- Incorporar o GO no material de UHMWPE;
- Avaliar o GO e UHMWPE com testes de caracterização;
- Analisar o efeito dos pós de UHMWPE e GO em meios biológicos *in vitro*;
- Realizar teste mecânico com a prótese convencional e a modificada com GO.

3 MATERIAL E MÉTODOS

Foram realizados experimentos de caracterização, ensaio mecânico e *in vitro* com macrófagos RAW 264.7, fibroblastos humanos L132, *Candida albicans*, *Candida Tropicalis*, *Candida glabrata* e *Candida parapsilosis* para avaliação de efeito biológico.

3.1.1 Manutenção das Células RAW 264.7

A linhagem celular RAW 264.7 (ATCC® TIB-71™), derivada de macrófagos murinos foi mantida em meio de cultivo *Dulbecco's Modified Eagle's Medium* (DMEM) suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB), 1% de penicilina e estreptomicina e mantida em incubadora úmida a 37°C com 5% de CO₂. Quando atingiam confluência, eram realizados repiques a fim de garantir a manutenção das células. Para isso foram desprendidas da garrafa por ação mecânica através de um *Cell Scrapper*. As células foram mantidas até atingirem um número suficiente para os experimentos *in vitro*, e a quantidade de células desejadas, $2 \cdot 10^4$, foi estimada por meio de contagem utilizando câmara de *Neubauer* com o método de exclusão por azul de tripan para estabelecer o número de células viáveis. Os procedimentos de descongelamento, substituição de meio de cultura e repique foram realizados em fluxo laminar previamente esterilizado juntamente com os demais materiais utilizados no cultivo celular, tudo seguindo o *datasheet* para a RAW 264.7 (ATCC® TIB-71™).

3.1.2 Manutenção das células de *Candida sp*

Para os testes com a *Candida tropicalis* foi utilizado o meio Ágar Mueller Hinton. Após o cultivo das células, foi coletado uma colônia isolada, adicionada em meio líquido, colocado sob agitação a 37°C e colocado sob desafio.

As quantidades em massa ou concentração dos reagentes utilizados para produção do meio de cultivo de *Candida* estão dispostas na tabela 1 para uma melhor visualização.

Tabela 1 - Discriminação de reagentes utilizados para a produção do meio Ágar Mueller Hinton

Reagentes utilizados	Quantidade (g)
Extrato de carne bovina	2
Hidrolisado ácido de caseína	17,5
Amido	1,5
Ágar	18
pH final de 7,3	-

As células foram cultivadas durante 48 h a 37 °C em caldo Mueller-Hinton (MHB). O MHB foi comprado à Kasvi (Roseto degli Abruzzi, Terano, Itália) e as estirpes de *Candida tropicalis*, *C. albicans*, *C. parapsilosis* e *C. glabrata* foram doadas pela Prof. Patricia Albuquerque (Universidade de Brasília, Brasil).

3.1.3 Manutenção das células L132

Cultura de L132: Os fibroblastos humanos (linha celular L132; ATCC® CCL-5™, Manassas, VA, EUA) foram cultivados em meio *Dulbecco's modified eagle's* - alto teor de glucose (DMEM High; Gibco, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EUA), suplementado com 10% v/v de soro fetal bovino (SFB; Gibco), 1% v/v de solução de penicilina (10 000 U/mL)-estreptomicina (10 000 µg/mL) (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA). As células foram semeadas a uma densidade de 3×10^5 células por prótese e incubadas a 37 °C numa atmosfera humidificada contendo 5% de CO₂ durante 48 horas para permitir a adesão à superfície.

3.2 Procedimentos experimentais *in vitro*

3.2.1 Plaqueamento

Células RAW 264.7 foram cultivadas em garrafas de 75 cm² até chegarem a 70% de confluência, desprendidas por ação mecânica através do *Cell Scraper*, e estimado o número de células pela câmara de *Neubauer* com azul de tripan. Foram então plaqueadas 20.000 células por poço em placa de 24 poços contendo meio DMEM suplementado com 10% de soro fetal bovino e 1% de penicilina e estreptomicina e aguardado 24h.

3.2.2 Teste de viabilidade celular em tempo real (RAW 264.7)

O Protocolo de ensaio da Promega para o *RealTime-Glo™ MT Cell Viability Assay* foi executado exatamente como informado para testar a viabilidade das células RAW 264.7 em diferentes concentrações de pó de GO ou de UHWMPE. Após os testes iniciais, foi definido uma concentração de 600 µg/mL para os testes. Os pós estavam ou dispersos em álcool, ou dispersos em meio de cultivo DMEN. Esse teste foi escolhido como preferência, ao invés do MTT, devido ao GO ser da cor preta e prejudicar a absorbância. O *RealTime-Glo™ MT Cell Viability* permite a avaliação da luminescência de Células viáveis que reduzem o pró-substrato para gerar um substrato para a luciferase NanoLuc®, portanto a cor preta do GO não prejudica esse experimento. Todos os testes foram realizados em triplicatas. Logo, esse teste foi realizado a fim de verificar a viabilidade de células de macrófagos murinos em desafio com os pós usados na fabricação da prótese industrial e com o pó de GO.

3.2.3 Teste de viabilidade celular em tempo real

O Protocolo de ensaio da Promega para o *BacTiter-Glo™ Microbial Cell Viability Assay* foi executado exatamente como informado para testar a viabilidade das células de *Candida sp.* O teste é capaz de quantificar o ATP de células viáveis por luminescência, teste que ameniza o erro da cor preta do GO. As concentrações foram as mesmas do teste com macrófagos, mas com duas concentrações a mais 24 mg/mL em meio e 48 mg/mL em meio, as duas concentrações com os melhores resultados do plaqueamento das leveduras junto com os pós (dados preliminares não apresentados aqui). Todos os testes foram realizados em triplicatas.

3.3 Síntese do GO

O GO foi produzido por esfoliação de óxido de grafite, que foi obtido de acordo com o método descrito por Sun e Fujitsu [22]. Em primeiro lugar, a grafite foi aquecida num micro-ondas de cozinha para expandir os flocos de grafite. O aquecimento foi mantido até que a grafite deixasse de fazer faíscas, gerando um aumento de dez vezes no seu volume. No passo seguinte, 5 g de grafite expandida e 15 g de permanganato de potássio foram colocados num copo de borossilicato de 1,0 L e misturados manualmente com um bastão de vidro até se obter um pó homogêneo. O

copo foi então colocado num banho de gelo e foram adicionados 100 mL de ácido sulfúrico. A mistura foi agitada mecanicamente a 500 rpm utilizando uma hélice de Teflon até se formar uma pasta líquida. O banho de gelo foi removido e a agitação mecânica continuou até se formar um bolo tipo espuma. Subsequentemente, foram adicionados lentamente 400 mL de água deionizada sob agitação mecânica, transferidos para uma placa de aquecimento e aquecidos a 90 °C durante 1 h sob agitação mecânica. Finalmente, foram adicionados 10 mL de peróxido de hidrogénio a 30%, e a mistura foi deixada a arrefecer à temperatura ambiente. O óxido de grafite foi purificado por ciclos sucessivos de lavagem com água deionizada, decantação e descarte do sobrenadante até atingir um pH de cerca de 5.

Após a síntese do óxido de grafite, o GO foi obtido por esfoliação em água deionizada com um disruptor ultrassónico (40 kHz, 150 W, modo pulsado, 2h). A suspensão de GO foi centrifugada para remover eventuais agregados e depois dialisada em água com membrana de celulose com um limite de 12000 g/mol. A diálise decorreu durante sete dias, mudando a água diariamente para remover iões e eventuais subprodutos da síntese.

A suspensão de GO foi liofilizada em um liofilizador de bancada Terroni, modelo LSE 3000B (São Carlos, Brasil). O GO foi obtido como flocos finos moídos em um almofariz de porcelana e peneirados para obter um tamanho de partícula inferior a 212 µm.

3.4 Fabricação das próteses

O UHMWPE incorporado com a vitamina E industrialmente, foi misturado manualmente com o pó GO peneirado (1 wt.%). A mistura foi transferida para um molde de aço inoxidável e mantida sob pressão a frio a 10 MPa. O molde cheio foi então colocado no forno a 205 °C e 5 MPa de pressão. Finalmente, o molde foi retirado do forno e mantido à temperatura ambiente sob 10 MPa (número de patente BR10202400456). As próteses de UHMWPE simples sem GO foram também produzidas através de um procedimento idêntico e utilizadas como controle.

3.5 Procedimentos para caracterização

Microscopia eletrónica de varrimento (MEV): Os ensaios de MEV foram efectuados num JEOL SEM JSM-IT800HL (Tóquio, Japão) equipado com um sistema de espectroscopia de raios X por dispersão de energia (EDS), ULTIM EXTREME SEM, com o software AZTEC da OXFORD INSTRUMENTS PLC & SUBSIDIARIES (Abingdon, Reino Unido). As amostras foram suportadas em fita de carbono de dupla face (Ted Pella Inc., EUA). A obtenção de imagens de pós de UHMWPE e GO, bem como de próteses de UHMWPE e UHMWPE-GO, foi efectuada com uma tensão de aceleração de 1,5 kV e uma distância de trabalho de 4,3 mm. Os dados do SEM foram processados utilizando o ImageJ. Para efetuar a análise EDS, foi utilizado o modo de desaceleração do feixe (feixe suave) a uma distância de trabalho de 7,0 mm com uma polarização do espécime aplicada de 2 kV (E_{bias}) e uma tensão de aceleração aplicada ou energia do canhão de 4 kV (E_{gun}), de modo a obter um landing energy ($E_{landing}$) de 2 kV, $E_{landing} = E_{gun} - E_{bias}$ [23].

Microscopia eletrónica de transmissão (TEM): Para os estudos de TEM de alta resolução (HR-TEM), o GO foi disperso em etanol. Antes de se proceder ao drop casting em grelhas de Cu de carbono rendilhado (Ted Pella Inc., EUA), a dispersão foi sujeita a uma sonicação suave até se tornar homogénea. A grelha foi deixada a secar em condições ambientais antes do ensaio. As experiências HR-TEM foram realizadas num microscópio eletrónico JEOL JEM-2100F UHR a 200 kV (Tóquio, Japão). Os dados HR-TEM foram processados utilizando o ImageJ. Sendo assim, os experimentos de microscopia foram realizados a fim de observar a morfologia desses pós, além de analisar, microscopicamente, as próteses produzidas.

Medição do ângulo de contacto (CAM): A molhabilidade das próteses foi investigada por um sistema CAM de água estática (DSA 100, Krüss, Alemanha), utilizando um método de gota séssil. Foi utilizado um volume de gota de 2 μ L para cada medição. Os resultados apresentados são médias para múltiplos de cada amostra. Portanto, o experimento de ângulo de contato teve por objetivo avaliar propriedades hidrofóbicas e hidrofílicas das próteses.

Espectroscopia de fotoelétrons excitados por raios X (XPS): Os XPS foram registados utilizando o espectrómetro de energia PHI XPS VersaProbe III (Chanhassen, MN, EUA) equipado com uma fonte de radiação monocromática de 1486,6 eV Al-K α . Foi utilizada uma fonte de raios X focalizada com um tamanho de feixe de raios X de 100 μ m, potência de 25 W e energia de feixe eletrónico de 15 kV. A neutralização da carga foi possível através da utilização de um método complementar de neutralização da carga de feixe duplo. Os dados XPS obtidos a partir de pós de UHMWPE e GO, bem como de próteses de UHMWPE e UHMWPE-GO, foram processados utilizando o XPSPEAK41. Assim sendo, o XPS foi realizado com o objetivo de determinar quais elementos estão presentes na superfície dos materiais.

Difração de raios X (XRD): As medições de XRD das próteses UHMWPE e UHMWPE-GO foram realizadas num difratómetro de raios X PANalytical Empyrean (Malvern, Reino Unido) com um tubo de cobre, a funcionar a 40 kV e 45 mA. As amostras foram analisadas à temperatura ambiente na gama angular de 5-70° e 0,026 passos s⁻¹. Foi utilizada uma disposição ótica geométrica de Bragg-Brentano. A função Pearson VII foi aplicada para simular e ajustar os padrões de XRD. Para estimar a percentagem de cristalinidade das próteses, foi utilizado o programa AMORPH [24] foi utilizada numa janela de 2 θ de 10° a 40°. Portanto, o XRD foi realizado para avaliar fases cristalinas do material.

Espectroscopia Raman: Os espectros Raman foram adquiridos utilizando um sistema de microscopia Raman inVia Renishaw (Wotton-under-Edge, Reino Unido). Foi utilizada uma linha de laser de 532 nm (potência de 1,29 mW no palco) com uma lente objetiva de 50 $\times$ L, uma grelha de 1800 linhas mm⁻¹, uma extensão e um detetor de matriz CCD de 1024. O tempo de integração foi de 1 s (5% da potência máxima) e cada espectro foi a média linear de cinco espectros distintos recolhidos nas regiões remotas de cada amostra. Os espectros foram analisados com o OriginLab. Todas as bandas foram simuladas utilizando funções Lorentzianas, exceto a banda D", que foi simulada utilizando uma função Gaussiana de acordo com o método descrito em [25]. Os mapas Raman foram adquiridos utilizando um sistema de microscopia Raman inVia Renishaw. Foi utilizada uma linha laser de 532 nm (potência de 1,29 mW no

palco) com uma lente objetiva de 50×L, uma grelha de 600 linhas mm⁻¹, um tipo de varrimento de grelha estática e um detetor de matriz CCD de 1024. Foram adquiridos mapas de 57 x 57 µm para superfícies lisas e irregulares de UHMWPE-GO com tamanhos de passo de 3 e 20 pontos ao longo das direcções X e Y. O tempo de integração foi de 2 s (5% da potência máxima). O software WiRETM 4.4, ligado ao instrumento, foi utilizado para gerar mapas de intensidade integrada para o UHMWPE e o GO dentro das janelas de deslocação Raman de 2790-2980 cm⁻¹ e 900-1900 cm⁻¹, respectivamente. A espectroscopia RAMAN foi feita para avaliar informações sobre a estrutura química, composição e propriedades dos materiais dos pós e próteses.

Calorimetria Exploratória Diferencia (DSC): As medições DSC das próteses de UHMWPE e UHMWPE-GO foram efectuadas num DSC-60 Shimadzu (Quioto, Japão) para estimar a percentagem de cristalinidade (X_c). Aproximadamente 5 mg de amostras foram colocadas em recipientes de alumínio para cada ensaio. Os passos utilizados para a análise foram os seguintes: Primeiro, arrefecimento da temperatura ambiente para -30 °C e mantendo durante 3 min; segundo, aquecimento de -30 °C a 230 °C e mantendo durante 3 min; terceiro, arrefecimento de 230 °C a -30 °C e mantendo durante 3 min; quarto, aquecimento de -30 °C a 230 °C e mantendo durante 3 min; quinto, arrefecimento de 230 °C a -30 °C. Todos os passos foram efetuados à mesma velocidade de 5 °C min⁻¹ e sob N₂ a 200 mL min⁻¹. O DSC foi realizado a fim de medir a diferença de fluxo de calor na amostra e para verificar o grau de cristalinidade.

Análise termogravimétrica (TGA): A estabilidade térmica das próteses UHMWPE e UHMWPE-GO, bem como dos pós precursores, foi determinada por TGA utilizando um termoanalizador Discovery TGA Q500 (New Castle, DE, EUA). As amostras foram colocadas em recipientes de Pt e aquecidas desde a temperatura ambiente até 800 °C a uma taxa de 5 °C min⁻¹ sob N₂ a 20 mL min⁻¹. O teste foi realizado para avaliar a variação de massa de uma amostra em função da temperatura.

Ensaio mecânico: Foi utilizada uma máquina de ensaios universal, Shimadzu AG-IC 100kN (Quioto, Japão), equipada com um êmbolo esférico de 10 mm de diâmetro, para registrar as curvas de força vs. deslocamento. As medições foram efectuadas a uma velocidade de deslocamento de 5 mm min⁻¹ à temperatura ambiente (25 °C). As amostras foram pressionadas até serem esmagadas para determinar a força máxima das próteses. O teste, portanto, foi realizado para avaliar propriedades mecânicas da prótese com GO, comparado com o material comercial de UHMWPE.

Microscópio de força atômica (AFM): As superfícies das amostras das próteses foram analisadas ao ar utilizando um Nanosurf FlexAFM (Argóvia(AG), Suíça), onde foi aplicada uma carga através da ponta de silicone (TAP 150 Al-G, Budget Sensors) com uma constante de força de 5 N m⁻¹ e uma frequência de ressonância na gama de 150 kHz. Os dados de AFM foram analisados utilizando o software Gwyddion.

3.6 Teste estatístico

Foram testadas para distribuição normal com o teste de Shapiro-Wilk. Para resultados significativos o teste estatístico teste t e ONE-WAY ANOVA usados para realizar as comparações entre os grupos. Foi considerado o valor de confiabilidade de 95%, sendo o $p < 0,05$ estatisticamente significativo. A representação gráfica dos resultados foi realizada usando o software GraphPad versão 7.0.

4 RESULTADOS

4.1 Documento do rascunho do manuscrito a ser submetido

O documento abaixo representa o manuscrito em revisão que será publicado em uma revista científica internacional. Participaram desse paper pesquisadores do Brasil e da Espanha, das instituições CPMH digital (Brasil), Universidade de Brasília (Brasil) e CICbiomaGUNE (Espanha).

Autores: Ahmed Subrati¹, Thyago José Arruda Pacheco², Ítalo Azevedo Costa³, Victor Mello², John Fredy Ricardo Marroquin⁴, Ludmila Alvin Gomes Pinho⁵, Ariane Pandolfo Silveira², Jorlandio Francisco Felix⁴, Marcílio Sérgio Soares da Cunha⁵, Marcio José Poças-Fonseca², Sonia Nair Bão², Rander Avelar⁶, Leonardo Giordano Paterno³, João Paulo Figueiró Longo², Sergio Moya¹

1 – Centro de Investigación Cooperativa en Biomateriales (CIC BiomaGUNE), 20009 Donostia-San Sebastián, Guipúzcoa, Spain;

2- Institute of Biological Sciences, University of Brasilia, Brasilia 70910-900, Brazil;

3- Polymer and Nanomaterials Research Laboratory, Chemistry Institute, University of Brasilia, Brasilia, DF 70910-900, Brazil;

4- Institute of Physics, University of Brasília, Brasília, 70910-900, Brazil;

5- Laboratory of Food, Drug and Cosmetics (LTMAC), School of Health Sciences, University of Brasília, Brasília, DF, 70910-900, Brazil;

6- CPMH Digital, Brasília, DF, 71200-260, Brazil.

Abstract

Although ultra-high-molecular-weight polyethylene (UHMWPE) is commonly used for prosthetic devices in arthroplasty, it is also prone to abrasion and wear. This wear can ultimately result in prosthesis fracture and the release of particles that may trigger aseptic necrosis and activate the immune system. Graphene oxide (GO) incorporated into UHMWPE has been proven to be an effective strategy for improving the mechanical and biological properties of this commercial material. We aimed to incorporate graphene oxide into UHMWPE using an innovative method without toxic solvents and characterize this new UHMWPE-GO material in terms of its physicochemical and antimicrobial properties. The results showed that UHMWPE-GO, compared with traditional UHMWPE prostheses, improved mechanical properties, thermal stability, biocompatibility, and increased adhesion in human fibroblasts in culture conditions. Therefore, our work has produced a new material for arthroplasty prostheses, offering improved performance and good biocompatibility.

Introduction

Joint arthroplasties have been using ultra-high-molecular-weight polyethylene (UHMWPE) since the 1960s due to its outstanding wear resistance and improved mechanical properties [26]. This material is suitable for various types of joint prostheses, notably jaw and hip replacements [27]. Despite UHMWPE's efficient mechanical properties, its abrasion over time results in the generation of polyethylene fragments that can accumulate within the joint environment [14].

The release of these artificial particles into the interstitial membrane of the bone joint activates fibroblasts and macrophages in the vicinity of the implant, leading to osteolysis that occurs under aseptic conditions [7]. Moreover, these fragments can elicit foreign body responses, potentially causing aseptic necrosis in the affected area [16]. In such cases, prosthetic replacement may become necessary, negatively impacting both the patient and the healthcare system [16, 26]. The increasing life expectancy of the population has also contributed to the need for increasing replacements each year [26, 28]. In response to this challenge, researchers, in collaboration with industry partners, are exploring innovations to enhance the mechanical properties of these prostheses, thereby extending their lifespan [28].

*Among these initiatives, incorporating nanomaterials into prosthetic devices has emerged as an effective strategy to enhance these medical implants' mechanical and physicochemical properties [29]. Indeed, various types of nanomaterials, such as silica (SiO_2) nanoparticles and fibers composed of *p*-phenylene terephthalamide, have been shown to improve the mechanical properties of UHMWPE [30-32]. Furthermore, graphite nanoplatelets, carbon nanotubes, hydroxyapatite, nanosized calcium silicate (CaSiO_3), and several other approaches have also been proposed in the literature [33, 34].*

Particularly, graphene oxide (GO) emerges as a promising nanomaterial due to its biocompatibility and capacity to enhance joint prostheses' mechanical strength and durability. For example, a previous study demonstrated the incorporation of up to 1.0 wt.% GO into UHMWPE increased its microhardness by approximately 22% and reduced the wear rate by about 55% [35]. In fact, the incorporation of GO nanosheets into UHMWPE has been demonstrated to modulate the

mechanical and resistance properties to, extend the lifespan of the prostheses [36-38]. Additionally, the electrical properties of reduced GO open interesting perspectives in the development of smart medical devices [39]. In this scenario, a challenge still remains to be overcome regarding the high hydrophilicity of GO, which makes its insertion into UHMWPE matrices difficult, and some processes use toxic solvents to better disperse the GO in the UHMWPE.

Thus, we aimed to develop an alternative method for incorporating GO into UHMWPE, focusing on industrial scalability and ease of production. The proposed innovative method consists of converting GO to reduced graphene oxide (RGO) in a solvent-free process easily inserted into UHMWPE, resulting in prostheses with better mechanical properties. This research involved a comprehensive strategy, encompassing material characterization and initial pre-clinical in vitro investigations.

2. Experimental

2.1 Materials

Graphene: Expandable graphite (flake size $>300\ \mu\text{m}$), sulfuric acid 98%, potassium permanganate 99%, hydrochloric acid 37%, and hydrogen peroxide 30% were purchased from Sigma-Aldrich (San Luis, MO, USA) and used as received. UHMWPE enriched with vitamin E (GUR 1020-E natural, $\text{mw} = 3.5 \times 10^6\ \text{g mol}^{-1}$) was obtained from Celanese (São Paulo, Brazil). Deionized water was used in all steps of GO preparation.

RAW 264.7 cell culture: The cells were cultured using Dulbecco's modified eagle's medium (Gibco, Waltham, MA, USA), supplemented with 10% v/v fetal bovine serum (Gibco), in addition to 1% v/v penicillin solution and streptomycin at concentration 1,000 U/mL (Invitrogen, Grand Island, NY, USA). The cells were kept in an oven at 5% CO_2 , 37 °C, and 95% humidity. RAW 264.7 was purchased from American Type Culture Collection (ATCC), Sigma-Aldrich (Switzerland).

Candida sp. culture: Cells were cultured for 48 h at 37 °C in Mueller-Hinton broth (MHB). MHB were purchased from Kasvi (Roseto degli Abruzzi, Teramo, Italy) and *Candida tropicalis*, *C. albicans*, *C. parapsilosis* and *C. glabrata* strains were donated by Prof. Patricia Albuquerque (University of Brasília, Brazil).

L132 culture: Human fibroblasts (L132 cell line; ATCC® CCL-5™, Manassas, VA, USA) were cultured in Dulbecco's Modified Eagle Medium - High Glucose (DMEM High; Gibco, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA), supplemented with 10% v/v fetal bovine serum (FBS; Gibco), 1% v/v penicillin (10,000 U/mL)–streptomycin (10,000 µg/mL) solution (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). Cells were seeded at a density of 3×10^5 cells per prosthesis and incubated at 37 °C in a humidified atmosphere containing 5% CO₂ for 48 hours to allow adhesion to the surface.

2.2 Synthesis of GO

GO was produced by exfoliation of graphite oxide, which was obtained according to the method described by Sun and Fujetsu [22]. Firstly, graphite was heated in a kitchen microwave (10 min and 800 W) to expand the graphite flakes. The heating was maintained until the graphite stopped sparking, generating a tenfold increase in its volume. In the next step, 5 g of expanded graphite and 15 g of potassium permanganate were placed in a 1.0 L borosilicate beaker and manually mixed with a glass rod until a homogenous powder was obtained. The beaker was then set within an ice bath, and 100 mL of sulfuric acid was added. The mixture was mechanically stirred at 500 rpm using a Teflon helix until a liquid paste was formed. The ice bath was removed, and mechanical stirring continued until a foam-like cake was formed. Subsequently, 400 mL of deionized water was slowly added under mechanical stirring, transferred to a hot plate, and heated to 90 °C for 1 h under mechanical stirring. Finally, 10 mL of hydrogen peroxide 30% was added, and the mixture was left to cool down at room temperature. The graphitic oxide was purified by successive cycles of rinsing with deionized water, decantation, and discard of the supernatant until it reached a pH of around 5.

After the graphite oxide synthesis, GO was obtained by exfoliation in deionized water with an ultrasonic disruptor (40 kHz, 150 W, pulsed mode, 2h). The GO suspension was centrifuged to remove eventual aggregates and then dialyzed in water with cellulose membrane with a 12000 g/mol cutoff. The dialysis was run for seven days, changing the water daily to remove ions and eventual by-products of synthesis.

The GO suspension was freeze-dried in a benchtop lyophilizer Terroni, model LSE 3000B (São Carlos, Brazil). The GO was obtained as thin flakes ground in a porcelain mortar and sieved to obtain a particle size of less than 212 μm .

2.3 Fabrication of prostheses

UHMWPE and vitamin E were manually mixed with the sieved GO powder (1 wt.%). The mixture was transferred to a stainless-steel cast and kept cold pressed under 10 MPa. The filled cast was then placed in the oven at 205 °C and 5 MPa pressure. Finally, the cast was removed from the oven and kept at room temperature under 10 MPa (patent number BR10202400456). Plain UHMWPE prostheses without GO were also produced by an identical procedure and used as a control (Figure 1).



Fig 1: UHMWPE and UHMWPE-GO prostheses

2.4 Characterization

Scanning electron microscopy (SEM): SEM assays were conducted on a JEOL SEM JSM-IT800HL (Tokyo, Japan) equipped with an energy dispersive X-ray spectroscopy (EDS) system, ULTIM EXTREME SEM, with AZTEC software from OXFORD INSTRUMENTS PLC & SUBSIDIARIES (Abingdon, UK). Samples were supported on double-sided carbon tape (Ted Pella Inc., USA). Imaging of UHMWPE and GO powders, as well as prostheses of UHMWPE and UHMWPE-GO, was carried out at an accelerating voltage of 1.5

kV and a working distance of 4.3 mm. SEM data were processed using ImageJ. To conduct EDS analysis, the beam deceleration mode (gentle beam) was utilized at a working distance of 7.0 mm with an applied specimen bias of 2 kV (E_{bias}) and an applied accelerating voltage or gun energy of 4 kV (E_{gun}) in order to achieve a landing energy ($E_{landing}$) of 2 kV, $E_{landing} = E_{gun} - E_{bias}$ [23].

Transmission electron microscopy (TEM): For the high-resolution TEM (HR-TEM) studies, the GO was dispersed in ethanol. Before drop casting on lacey carbon Cu grids (Ted Pella Inc., USA), the dispersion was subjected to soft sonication until it became homogeneous. The grid was left to dry under ambient conditions before the test. HR-TEM experiments were conducted on a JEOL JEM-2100F UHR electron microscope at 200 kV (Tokyo, Japan). HR-TEM data were processed using ImageJ.

Contact angle measurement (CAM): The wettability of the prostheses was investigated by a static water CAM system (DSA 100, Krüss, Germany) utilizing a sessile-drop method. A droplet volume of 2 μ L was used for each measurement. The results reported are averaged for multiples of each sample.

X-ray photoelectron spectra (XPS): XPS were recorded using the PHI XPS VersaProbe III energy spectrometer (Chanhassen, MN, USA) equipped with a monochromatic 1486.6 eV Al-K α radiation source. A focused X-ray source with an X-ray beam size of 100 μ m, 25 W power, and 15 kV e-beam energy was used. Charge neutralization was possible by using a complementary dual beam charge neutralization method. XPS data obtained from UHMWPE and GO powders, as well as prostheses of UHMWPE and UHMWPE-GO, were processed using XPSPEAK41.

X-ray diffraction (XRD): XRD measurements of UHMWPE and UHMWPE-GO prostheses were conducted on a PANalytical Empyrean X-ray diffractometer (Malvern, UK) featuring a copper tube, operating at 40 kV and 45 mA. Samples were scanned at room temperature within the angular range of 5–70° and 0.026 steps s^{-1} . A Bragg-Brentano geometric optical arrangement was used. Pearson VII function was

applied to simulate and fit the XRD patterns. To estimate percent crystallinity in prostheses, AMORPH [24] was utilized within a 2θ window from 10° to 40° .

RAMAN: Raman spectra were acquired using an inVia Renishaw Raman microscopy system (Wotton-under-Edge, UK). A 532 nm laser line (1.29 mW power on stage) was used with 50 $\times$ L objective lens, 1800 lines mm⁻¹ grating, extended, and 1024 CCD array detector. Integration time was 1 s (5% of the maximum power), and each spectrum was the linear average of five distinct spectra collected from the remote regions of each sample. Spectra were analyzed using OriginLab. All bands were simulated using Lorentzian functions apart from the D" band, which was simulated using a Gaussian function following the method outlined in [25]. Raman maps were acquired using an inVia Renishaw Raman microscopy system. A 532 nm laser line (1.29 mW power on stage) was used with 50 $\times$ L objective lens, 600 lines mm⁻¹ grating, static grating scan type, and 1024 CCD array detector. Maps of 57 x 57 μm were acquired for UHMWPE-GO smooth and irregular surfaces with step sizes of 3 and 20 points along X and Y directions. Integration time was 2 s (5% of the maximum power). The WiRE™ 4.4 software, attached to the instrument, was used to generate integrated intensity maps for UHMWPE and GO within Raman shift windows of 2790-2980 cm⁻¹ and 900-1900 cm⁻¹, respectively.

Differential scanning calorimetry (DSC): DSC measurements of the prostheses of UHMWPE and UHMWPE-GO were conducted on a DSC-60 Shimadzu (Kyoto, Japan) to estimate the percent crystallinity (X_c). Approximately 5 mg of samples were filled in aluminium pans for each run. The steps used for analysis were as follows: First, cooling from room temperature to -30°C and holding for 3 min; second, heating from -30°C to 230°C and holding for 3 min; third, cooling from 230°C to -30°C and holding for 3 min; fourth, heating from -30°C to 230°C and holding for 3 min; fifth, cooling from 230°C to -30°C . All steps were performed at the same rate of 5°C min^{-1} and under N_2 at 200 mL min^{-1} .

Thermogravimetric analysis (TGA): The thermal stability of UHMWPE and UHMWPE-GO prostheses, as well as precursor powders, was determined by the TGA using a Discovery TGA Q500 thermoanalyzer

(New Castle, DE, USA). Samples were filled in Pt pans and heated from room temperature to 800 °C at a rate of 5 °C min⁻¹ under N₂ at 20 mL min⁻¹.

Mechanical test: A universal testing machine, Shimadzu AG-IC 100kN (Kyoto, Japan), provided with a 10 mm diameter sphere plunger, was employed to record force vs. displacement curves. Measurements were conducted at 5 mm min⁻¹ displacement speed at room temperature (25 °C). The samples were pressed until crushed to determine the maximum force of prostheses.

Atomic force microscope (AFM): The sample surfaces of the prostheses were analyzed in air using a Nanosurf FlexAFM (Argovia(AG), Switzerland), where a load was applied through the silicon tip (TAP 150 Al-G, Budget Sensors) featuring a force constant of 5 N m⁻¹ and a resonance frequency within the range of 150 kHz. AFM data were analyzed using Gwyddion software.

The RealTime-Glo™ macrophage viability assay (RAW 264.7): When the cells reached a confluence of 2 x 10⁴ cells, they were plated into wells of a 24-well plate. Different concentrations of GO powder and UHMWPE powders in macrophage murine cells (RAW 264.7) were tested. For the viability test, the Promega RealTime-Glo™ MT Cell Viability assay kit was used, and the luminescence of viable cells was evaluated using Varioskan™ LUX (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA). The assay procedure includes introducing NanoLuc® luciferase and a cell-permeable prosubstrate into cultured cells.

Candida species Viability Assay: Previously to the experiments, graphene and UHMWPE were exposed to 70% ethanol for 24 h for sterilization. In 96-well polystyrene plates, about 10⁴ yeasts per well were cultured at 37 °C in Mueller-Hinton broth (MHB, Kasvi (Roseto degli Abruzzi, Terano, Italy) in control conditions (only broth or 70% ethanol in broth), only with graphene (0.6 mg/mL), only with UHMWPE (0.6 mg/mL), 24 mg/mL graphene + UHMWPE or 48 mg/mL graphene + UHMWPE. The BacTiter-Glo™ kit from Promega (Madison, USA) was employed to evaluate Candida spp. viability after 24 h growth. The

amount of ATP, as an indicator of viable cells, was determined by luminescence reading over time (Varioskan TM LUX, Thermo Scientific, Singapore).

Determination of *C. tropicalis* colony forming units (CFU): an isolated colony was cultured in MHB (Kasvi) at 37 °C for 24 h in an orbital shaker (150 rpm). The 10⁴ cells were spread onto Mueller-Hinton agar (Kasvi) plates containing different concentrations of GO or UHMWPE powders. Plates were then incubated at 37 °C for 48 h and CFU were counted for each experimental condition. Additionally, about 10⁴ *C. tropicalis* yeasts were spread onto MHA plates where UHMWPE or GO-UHMWPE prostheses were placed in the center. Plates were then incubated at 37 °C for 48 h.

Confocal microscopy: Human fibroblasts (L132 cell line) were cultured in a DMEM high medium, with a cell density of 300,000 cells per prosthesis. Following cell seeding, the prostheses were incubated for 48 hours for surface adhesion. After incubation, adhered cells were fixed with 4% paraformaldehyde (Electron Microscopy Sciences, Hatfield, PA, USA) in phosphate-buffered saline (PBS; pH 7.4; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) for 20 minutes at room temperature. Samples were then washed three times with PBS for 20 minutes each. Cell membranes were permeabilized with 0.1% Triton X-100 (Sigma-Aldrich) in PBS for 20 minutes. For cytoskeletal labeling, cells were incubated with Phalloidin conjugated to Alexa Fluor® 488 (5 units per well; Thermo Fisher Scientific) for 20 minutes in the dark, followed by three 20-minute PBS washes. Nuclear staining was performed using 100 µL of DAPI solution (500nm; Thermo Fisher Scientific) for 5 minutes, followed by three additional PBS washes. Coverslips were mounted using ProLongTM Gold Antifade Mountant (Thermo Fisher Scientific), and samples were imaged using a TCS SP5 laser scanning confocal microscope (Leica Microsystems, Wetzlar, Germany).

Results and Discussions

Morphological and chemical characterization

The morphologies of the micro- and nano-structures of UHMWPE and GO powders, the precursors for UHMWPE and UHMWPE-GO prostheses, are shown in Figure 2a-h. The UHMWPE beads (Fig. 2a-b), with an average size of $87.6 \pm 4.6 \mu\text{m}$, exhibit an irregular, rounded shape. Their surfaces feature valleys densely populated with threads or tethers of UHMWPE. Such structures, known as fibrillar bundles, connect lamellar noduli, which have an average size of $952 \pm 31 \text{ nm}$ [40].

The GO powder is very flaky in nature and has a very thin and fluffy morphology (Fig. 2c-e). Our results estimate GO flake size by SEM with percentile values D10, D50, and D90 of 0.20, 0.38, and 1.19 μm , respectively. (Fig. S1). The high-resolution TEM images of GO (Fig. 2f-g) reveal a thin segment of a flake that exhibits the intrinsic hexagonal array electron diffraction pattern (Fig. 2h) of Bernal graphene material [25], revealing an interlayer spacing for the (002) family of planes of 2.11 Å [41]. GO powder exhibits an X-ray diffraction signal around 2θ of 11.0° , corresponding to the interlayer spacing of 8.03 Å (Fig S1). GO crystallite thickness was 11.1 nm (~ 15 layers) [42], confirming defective oxygen functionalities such as hydroxyls, epoxides, ethers, carbonyls, carboxyls, lactones, and lactols. These functional groups exhibit steric hindrance, expanding interlayer spaces in GO while preserving some sp^2 domains' percolation [42].

We further investigated the surface morphology of both UHMWPE and UHMWPE-GO prostheses using SEM (Fig. 2i-l). Both materials exhibited a combination of smooth and irregular sections. The smooth sections in both prostheses displayed shallow perikymata and abrasion defects (Fig. 2i,k). However, the irregular sections differed between them. UHMWPE prostheses were characterized by pits (Fig. 2j), while UHMWPE-GO prostheses exhibited humps (Fig. 2l) [43], which is also corroborated by SEM/EDS elemental maps shown in Fig. S2 and Fig. S4, respectively. Elemental analysis via SEM/EDS of fragments of both prostheses was carried out, as shown in Fig. S2. The carbon-to-oxygen atomic ratio (C/O) was 98.0 and 40.3 for UHMWPE prostheses and UHMWPE-GO prostheses,

respectively (Fig. S3). UHMWPE and GO precursor powders were also analysed via SEM/EDS (Fig. S4), and C/O values of 624 and 2.9 were found, respectively (Fig. S5). To enhance our understanding of the surface characteristics, we employed AFM to examine the prostheses, as shown in Fig. S6. Interestingly, the average roughness of the UHMWPE prostheses was measured at 37.14 nm, compared to 32.16 nm for the UHMWPE-GO prostheses. These values represent the average roughness across various sections of the surfaces, highlighting the effect of incorporating GO sheets into the composite material. This incorporation reduces surface irregularities, which can otherwise harbor bacteria and facilitate their growth and colonization [43].

Prostheses of UHMWPE and UHMWPE-GO exhibit market hydrophobicity with contact angles of $93.50 \pm 0.30^\circ$ and $94.93 \pm 0.98^\circ$, respectively, as shown in Fig. S7. The estimated contact angle is slightly larger for UHMWPE-GO, which can be explained by the dispersibility issues of GO sheets within the prostheses or surface roughness factors. This finding suggests the successful incorporation of hydrophobic graphene sheets in the composite material. The hydrophobicity of GO is caused by the reduction of the oxygen content of the original GO powder due to the high temperature applied during thermopressing in the fabrication process of the UHMWPE-GO prostheses. This hypothesis is confirmed by Raman and XPS measurements, as shown below.

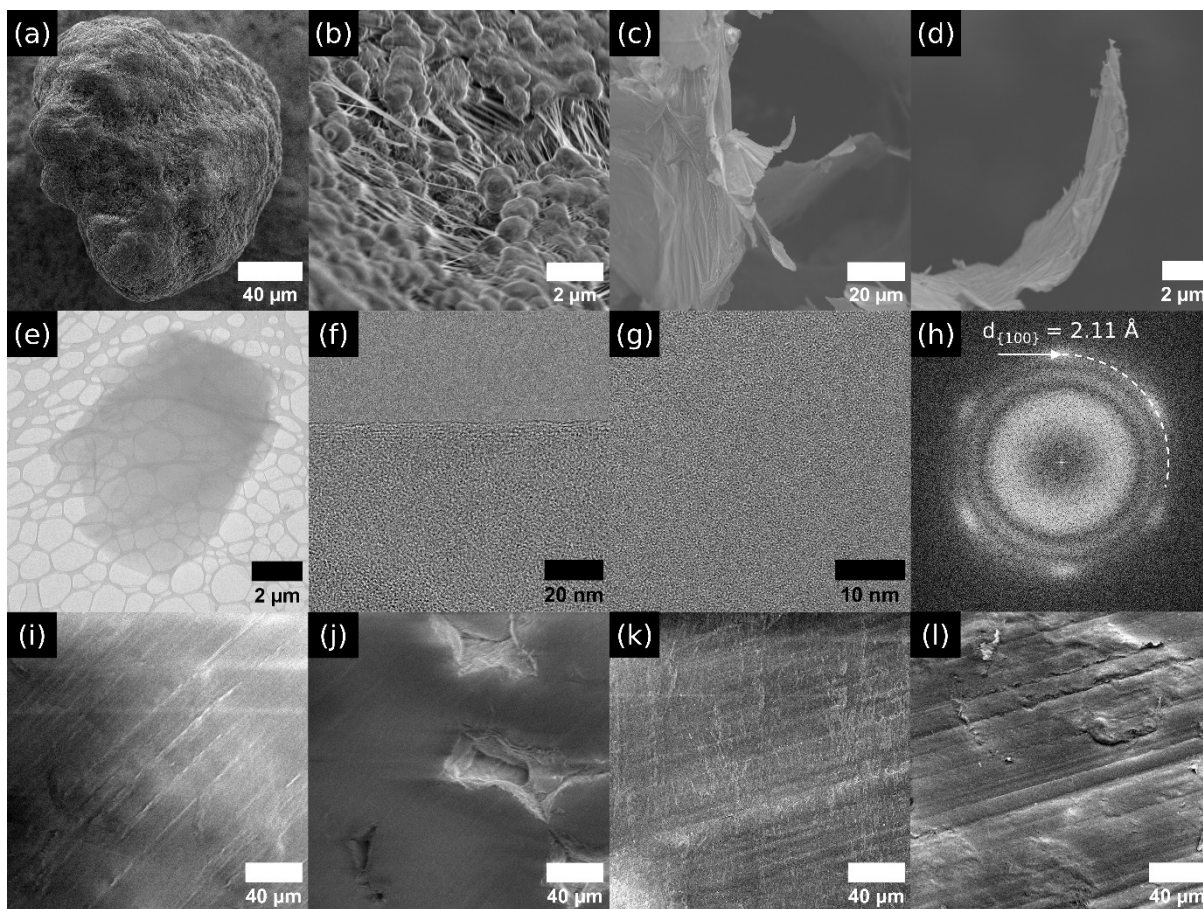


Fig. 2 Electron microscopy of UHMWPE and GO powders and their prostheses showing morphological differences: (a) SEM image of UHMWPE bead, (b) close-up SEM image of the surface of the bead revealing micro-sized structure, (c) SEM image of GO thin flakes, (d) close-up SEM image of the GO flake, (e) low-resolution TEM image of a GO flake, (f) high-resolution TEM image of edge of thin flake, (g) high-resolution TEM image of bulk region of thin flake exhibiting discernible electron diffraction pattern of graphene (h). SEM images of smooth (i) and irregular (j) surfaces of the UHMWPE prostheses. SEM images of smooth (k) and irregular (l) surfaces of the UHMWPE-GO prostheses.

The high-resolution C 1s XPS deconvolution results of UHMWPE, GO, UHMWPE prostheses and UHMWPE-GO prostheses are shown in Figure 3(a-d) and summarized in Table S1. Spectra were deconvoluted into one to six components: C=C (in graphitic domains), C–C (in hexagonal sp^3 lattice or saturated carbons), C–O (in hydroxyl and epoxy groups), C=O (in carbonyl groups), COO (in carboxyl

and lactone/lactol groups), π - π^* (graphitic transitions) [25, 42, 44]. The powder of UHMWPE has two distinct components, C–C and C–O, which are attributed to the PE macromolecules and vitamin E, respectively. The GO powder has the abovementioned components and exhibits the lowest carbon-to-oxygen atomic ratio of 2.4, which suggests a high oxidation extent due to the abundance of oxygen groups such as hydroxyl, epoxy, carbonyl, carboxyl, and lactone/lactol. The UHMWPE prostheses depict a single C–C component with an absent C–O component. This result can be explained by the plasticizing effect of vitamin E, wherein the plasticizing agent finely disperses and firmly latches within the PE macromolecules, providing enhanced extrudability [45], as observed in Figure S8. The UHMWPE-GO prostheses C 1s spectrum reveals the presence of most innate UHMWPE and GO components with an anticipated substantial decrease of the C=C and C–O components with a predominance of the C–C component related to the thermopressing process. It is worth mentioning the possibility of overlap of the C–C components arising from UHMWPE and GO, as well as the C–O components originating from both GO and vitamin E.

The XRD patterns of UHMWPE and UHMWPE-GO prostheses are shown in Figure 3(e-f). Two intense diffraction peaks, namely (110) and (200), are identified, corresponding to the orthorhombic crystal structure of UHMWPE [40, 46]. From these two peaks, the lattice parameters a and b have been determined to be 7.33 Å and 4.90 Å, respectively. A peak around 2θ of 40.08° corresponds to the (011) plane, from which it was possible to estimate lattice parameter c to be 2.53 Å. No discernible variations are observed in terms of the lattice parameters. However, the AMORPH [24] analysis, shown as insets in Figure 3(e-f), has revealed an interesting difference. The amorphous content is 45.73±0.68% in UHMWPE and 37.57±0.51% in UHMWPE-GO. Despite the low amount of GO fed into the thermopressing process (1 wt.% relative to UHMWPE) to produce the prostheses, the effect is drastic in terms of the crystallinity of final prostheses UHMWPE-GO. GO is certainly enhancing the crystallinity of the prostheses. The transverse crystallite size (D_{110}) and longitudinal crystallite size (D_{002}) were calculated following Equation below [40]:

$D_{hkl} = \frac{0.89 \lambda}{FWHM \cos \theta}$ (Equation 1), where λ is the Cu K α radiation of 1.54 Å, FWHM is the full-width-at-half-maximum of the diffraction signal of plane (hkl) in unit radians, and θ is the diffraction angle in unit radians.

D_{110} and D_{200} of the UHMWPE prostheses were estimated to be 14.2 nm and 13.5 nm, respectively. The UHMWPE-GO prostheses D_{110} and D_{200} were 18.7 nm and 16.3 nm, respectively. The increase in transverse (preferential) and longitudinal crystallite sizes substantiate the AMORPH and DSC estimates of percent crystallinity, where the UHMWPE-GO prostheses are consistently found to be ca. 8% more crystalline than the UHMWPE prostheses. This finding informs about the ability of incorporated GO to favorably orient and graft PE macromolecules in the UHMWPE-GO prostheses owing to strong adhesion between nanofiller GO and PE matrix [47]. Another notable difference is the intensity ratio between the (110) and (200) planes, $I_{(110)}/I_{(200)}$, which is found to be 3.14 and 4.46 for the UHMWPE and UHMWPE-GO prostheses, respectively. This discernible difference indicates that GO influences textural changes to facilitate the rearrangement of fibrils into fold crystals [40]. Additional information can be deduced when comparing the values of D_{110} and D_{200} of prostheses to those of original UHMWPE powder (54.52% crystallinity - AMORPH determined as shown in Fig. S9). D_{110} and D_{200} of original UHMWPE powder were estimated to be 17.2 nm and 13.3 nm. On the one hand, the UHMWPE prostheses fabrication does not affect the D_{200} but discernibly reduces the D_{110} . On the other hand, fabrication of the UHMWPE-GO prostheses increases both D_{110} and D_{200} . The $I_{(110)}/I_{(200)}$ of the UHMWPE powder was found to be 3.70, higher than that of UHMWPE prostheses and lower than that of UHMWPE-GO prostheses.

Figure S10 shows the DSC curves of prostheses of UHMWPE and UHMWPE-GO in which the melting peak is around 135 °C. Percent crystallinity (X_c) was estimated by the following equation [48]:

$$X_c = \frac{\Delta H_{m,i}}{\Delta H_{m,0}} \times 100 \quad (\text{Equation 2}), \text{ where } \Delta H_{m,i} \text{ and } \Delta H_{m,0} \text{ are the melting enthalpy of the sample and the fully}$$

crystalline polyethylene (293.0 J/g), respectively [48]. Surprisingly, the estimated crystalline content by

DSC corroborated the XRD data as shown in Table 1. A consistent difference of 8% between both prostheses is maintained, with UHMWPE exhibiting the most amorphous content.

Table 1. Summary of crystallinity (in percentage) of the prostheses by XRD and DSC.

Prostheses	Crystalline content (%)	
	XRD	DSC
UHMWPE	54.27	57.05
UHMWPE-GO	62.43	64.95

Figure 3(g) shows the Raman spectra of the surfaces of UHMWPE and UHMWPE-GO prostheses. Both spectra exhibit strong bands characteristic of UHMWPE [49]. It is interesting to note that the characteristic peaks of graphene, namely the D and G bands [50], were not evident in the spectrum of the UHMWPE-GO prostheses but were strong when a defective region on the surface was probed, as shown in Fig. S11. It seems as if, on the one hand, graphene layers are frozen and unable to breathe (Raman vibrations) in intact surfaces, and on the other hand, the layers can breathe in those microscale defective regions recurring on surfaces of UHMWPE-GO prostheses. The most intense bands found around 2848 cm^{-1} and 2881 cm^{-1} are attributed to the symmetric and asymmetric stretching vibrations modes of CH_2 groups, respectively [49]. The bands found around 1295 and 1305 cm^{-1} are attributed to the CH_2 twisting vibrations of CH_2 groups adopting trans conformations (populating both crystalline and non-crystalline domains) and gauche conformations (solely making up the non-crystalline domains), respectively [48]. Remarkably, the deconvolution of both bands, shown as insets in Figure 3(g), allows to estimate the content of trans conformers through the integrated intensity relation presented in the Equation below [49, 51].

$$\text{UHMWPE trans conformer content (\%)} = \frac{A_{1295}}{A_{1295} + A_{1305}} \times 100 \quad (\text{Equation 3})$$

Estimated 59% and 78% trans-conforming PE macromolecules, respectively, make up the UHMWPE and UHMWPE-GO prostheses. The 19% increase in the more energetically stable conformation comes

with incorporating GO into the UHMWPE blend. In fact, an expected trait as fillers can increase the content of groups assuming the trans conformation [49].

Analysis of Raman spectra of GO before and after incorporation into the UHMWPE matrix can inform about the structural changes brought to GO sheets and probable transformations caused by the interactions between GO and UHMWPE during the extrusion process (Fig. S11). Figure 3(h) presents the Raman spectra of GO before and after the extrusion process (GO after extrusion and shaping was Raman-visible through microscale defects in the surface of UHMWPE-GO prostheses - see Raman maps in Fig. S12). The spectra were deconvoluted into 6 bands: D^* , D , D'' , G , D' , and M . Table S2 summarizes the deconvolution results. The D^* band is attributed to C–C and C=C stretching vibrations in polyene-like disordered graphitic structures [52-54]. The D band is induced by disorder, activated by the intervalley scattering process, is caused by the emergence of defects, and is dependent on edge structure [55]. The D'' band is ascribed to amorphous phases in graphene oxide and depends on crystallite size [54, 56]. Alternatively, out-of-plane deformations caused by mixed vibrational modes of sp^2 carbons in proximity to defects originate in the D'' band [57]. The G band is the graphitic band originating from the in-plane C=C stretching vibrational mode [25]. The D' band is induced by disorder, activated by the intravalley scattering process, is caused by the emergence of defects, and is not dependent on edge structure [55]. The M band, sensitive to interlayer forces and typically hard to discern, is attributed to the out-of-plane layer-breathing vibration mode [58]. Carbonyl/carboxyl/lactone stretching mode serves as another attribution for the M band [57]. The peak integrated intensity ratio between the D band and the G band (I_D/I_G) is an excellent descriptor of defect density [59], from which one can estimate the crystallite width (L_a) [42]. Interestingly, the peak integrated intensity ratio between the D band and the D' band ($I_D/I_{D'}$) can help identify the nature of defects [59]. GO has an I_D/I_G of 3.23 (L_a of 6.0 nm), while GO in the UHMWPE-GO prostheses has an I_D/I_G of 3.12 (L_a of 6.2 nm). Reduction of GO; loss of some of the oxygen groups, is the main contributing factor to the decrease in the I_D/I_G . The $I_D/I_{D'}$ for GO is 8.02, whereas it is 11.34 for GO in the UHMWPE-

GO prostheses. From these values, one can anticipate the predominance of vacancy-like defects in pristine powder GO and the predominance of sp^3 -hybridization defects in GO of the UHMWPE-GO prostheses [59]. While reduction of GO is inevitable due to the high-temperature extrusion process, PE macromolecules grafting onto GO sheets is a very suggestive attribution for the discernible increase in the $I_D/I_{D'}$ for the UHMWPE-GO prostheses.

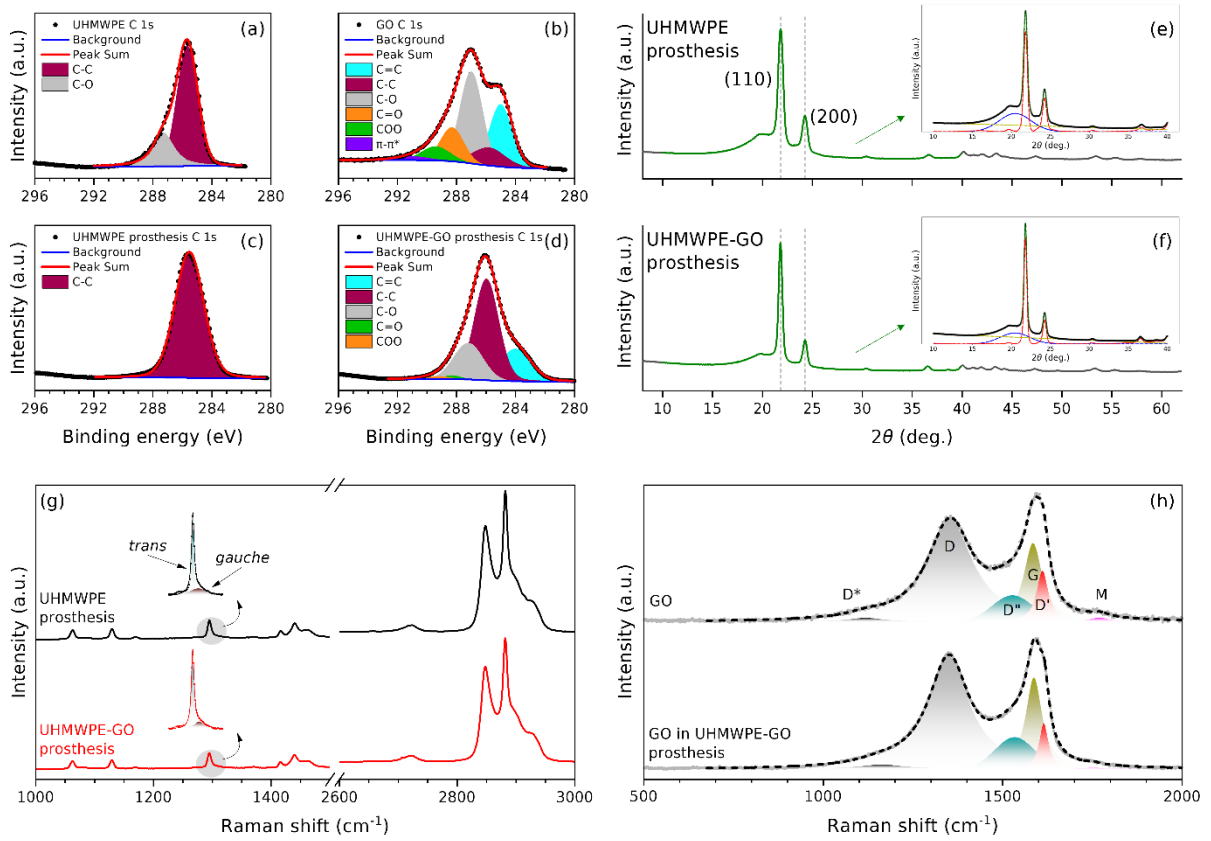


Fig. 3 C 1s XPS of (a) UHMWPE powder, (b) GO powder, (c) UHMWPE prostheses, and (d) UHMWPE-GO prostheses. XRD of (e) UHMWPE prostheses and (f) UHMWPE-GO prostheses. Green part of the diffraction pattern is input into AMORPH [24] for quantification of amorphous and crystalline phases. Insets show AMORPH [24] analysis of corresponding XRD patterns showing: a broad amorphous component in blue, crystalline component in red, linear background in yellow, model sum in green, and raw input diffraction data as black translucent circles. (g) Raman spectra of UHMWPE and UHMWPE-GO prostheses with inset showing the trans-gauche deconvolution. (h) Deconvolution of Raman spectra of GO powder as well as GO probed in UHMWPE-GO prostheses defect.

Thermal and mechanical stability characterization (TGA, mechanical test, AFM)

TGA curves of the UHMWPE powder, UHMWPE prostheses, and UHMWPE-GO prosthesis show slight differences in onset temperature of thermal decomposition, i.e., 420 °C, 423 °C, and 428 °C, respectively (Fig. 4a). The incorporation of GO enhances the thermal stability of the prostheses and this can be through the grafting capability, evidenced by Raman spectroscopy. TGA curves of GO reveals four discernible thermal mass loss stages. The first stage, extending from 30 °C to 195 °C and involving ~12% mass loss, is related to dehydration. Second stage (195 - 232 °C), third stage (232 - 525 °C), and fourth stage (525 - 637 °C) are attributed to thermal decomposition of oxygen functionalities of GO with respective mass losses of ~20%, ~12%, and ~38% [25, 50]. The difference between those stages is the types of functional groups undergoing thermal decomposition as well as their degree of clustering. Indeed, the more clustered they are, the faster they decompose and the steeper is the TGA curve [42, 60]. Notably, the remaining carbon mass of GO is ~15% of the initial mass, whereas the remaining carbon masses of UHMWPE powder, UHMWPE prostheses, and UHMWPE-GO prostheses are ~2.9%, ~0.3%, and ~0.0%, of their respective initial hydrocarbon masses. GO oxygen-functionality mass loss is estimated to be 69.8 wt.%, determined by the method outlined in [61], reflecting a high degree of oxidation.

The force-displacement curves for the UHMWPE and UHMWPE-GO prostheses are shown in Figure 4b1. These curves consist of elastic and plastic regions leading up to a maximum force, which marks the failure point or the onset of crack propagation [62-65]. The maximum force for the UHMWPE-GO prostheses is 0.57% higher than that of the UHMWPE prostheses (used as the reference hereafter), indicating greater strength. The area under the curve up to the failure point is the crack initiation

energy, which is 8.95% lower in the UHMWPE-GO prostheses at 7165 J/g. Specific energy is calculated by dividing the estimated area by the initial mass of the prostheses. The area from the failure point to the final fracture point, representing the crack propagation energy, is 37.98% lower in the UHMWPE-GO prostheses at 497 J/g. The compressive stiffness of the UHMWPE-GO prostheses is 12.96% higher, while the yield point is 6.99% lower, estimated based on changes in curvature. Interestingly, the elastic region shrinks in the UHMWPE-GO prostheses while the plastic deformation region expands. A detailed analysis of the specimens beyond the failure point reveals notable variations (Fig. 4b2). Crack propagation, a stress dissipation process in the UHMWPE-GO prostheses, is brief and immediately followed by the considerable emergence of stress concentration zones [64]. Fracture initiation occurs with characteristic crack coalescence, which is comparatively rapid in the UHMWPE-GO prostheses, leading to the final fracture [64]. The force at maximum displacement is 32.29% higher in the UHMWPE-GO prostheses at 4248.9 N. Possibly, micro-scale dents in the prostheses, observed by Raman microscopy and SEM, act as crack propagation centers. Images of the experimental setup for force-displacement measurement are shown in Figure S13. To further understand the adhesive nature of the prosthesis's surfaces, AFM was used to probe the work of adhesion through analysis of the approach-retraction curves, as depicted in Figure 4c. The work of adhesion for the UHMWPE prostheses was estimated to be 2.82×10^{-15} J, while the UHMWPE-GO prostheses exhibited more than a twofold increase at 6.17×10^{-15} J. The increased work of adhesion in the UHMWPE-GO prostheses may enhance the bone/prostheses interface adhesion. We hypothesize that this improved adhesion could lead to better integration and stability of the prostheses to the biological tissues, such as bones, connective tissue, and cartilages.

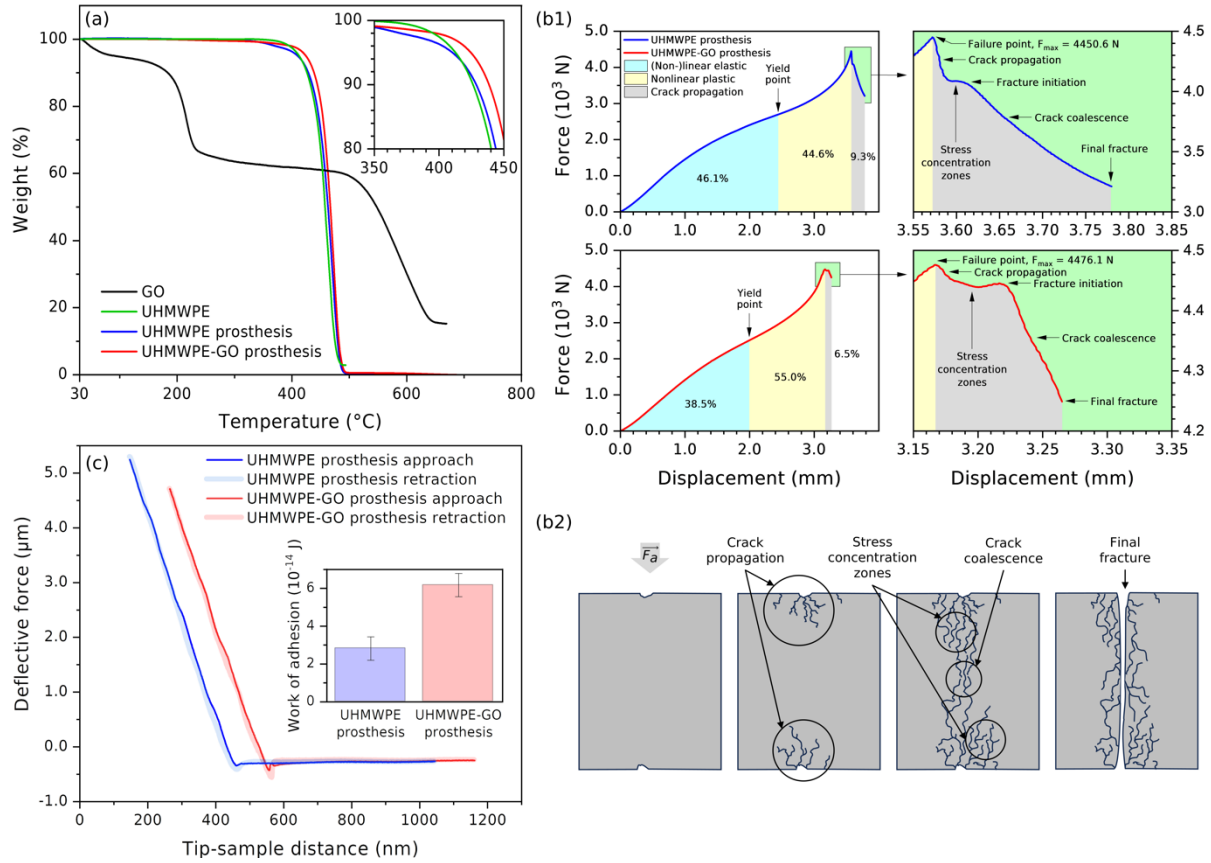


Fig. 4 (a) TGA curves of the UHMWPE powder, GO powder, UHMWPE prostheses, and UHMWPE-GO prostheses with inset showing a close-up view of the onset of thermal decomposition, (b1) force-displacement curves of UHMWPE and UHMWPE-GO prostheses with zoomed-in view of the green outlined apexes of curves, (b2) schematic illustration of fracture development in prostheses to the point of final fracture, and (c) AFM contact mode measurement of the UHMWPE and UHMWPE-GO prostheses with inset showing the work of adhesion.

Cell/Surface Interaction

Finally, the new prostheses interacting with mammalian cells were performed following physical-chemical and mechanical characterization. For this purpose, we designed a methodology in which human fibroblasts (L132 cell line) were cultured on the prosthesis surface. The protocol involved seeding the cells onto the prostheses at a density of 300,000 cells per prostheses. After seeding, the prostheses were incubated for 48 hours to facilitate surface adhesion. Subsequently, the adhered cells were

prepared for confocal microscopy analysis, with cytoskeleton staining using Phalloidin-Alexa Fluor 488 (green fluorescence) and nuclear staining using DAPI (blue fluorescence).

In terms of results, as shown in Figure 5, the cells exhibited distinct morphological characteristics depending on the surface they were cultured on. The fibroblast L132 cell line demonstrated more robust growth on the graphene-based prostheses, UHMWPE-GO (Fig. 5a-b), compared to reduced growth on the UHMWPE prostheses. In fact, earlier studies showed that reduced graphene oxide can improve biocompatibility [20, 66]. These findings also suggest enhanced cell adhesion and good biocompatibility with the UHMWPE-GO (fig. S14), as previously documented with mesenchymal cells and silicon substrate [67, 68]. Furthermore, the cytoskeleton morphology of cells on the graphene-modified prostheses exhibited a more organized structure, indicating that this surface enhances cell interaction, adhesion and could be beneficial for implants [29, 69].

For this point, cell adhesion improvement is a promising result since it indicates that the UHMWPE-GO appear to have been surfaces that facilitated the adhesion of these cells derived from human fibroblasts, as previous shown in UHMWPE reinforced with carbon [29]. Regarding cell biology, the cytoskeleton plays a crucial role in cell adhesion by providing structural support and facilitating the transmission of mechanical signals between the cell and its extracellular environment [70]. Organized cytoskeletal structures, such as actin filaments, contribute to the formation and stabilization of focal adhesions, specialized sites where cells attach to the substrate [71]. These focal adhesions not only anchor the cell but also regulate cell movement, shape, and signaling pathways [72]. Proper cytoskeletal organization is therefore, essential for robust cell adhesion, influencing cell behavior and interaction with the surrounding environment [72, 73]. Work by previous groups has already found good cell proliferation and adhesion on material containing graphene [5, 74, 75]. In addition, the wear reduction rate can be achieved by increasing adhesion forces and hydrophobicity, results found in our study [5]. Graphene is also known to have good conductivity, and cells can benefit [76]. Better growth here in the UHMWPE-GO prosthesis may also have been better because of this conductivity and

previous studies showed this with graphene [77-79]. Although graphene shows better proliferation and adhesion of fibroblasts, this mechanism does not seem to apply to *candida sp* (fig. S15-S17), showing antiproliferative activity in other cells, as demonstrated by other studies [29, 79, 80].

Candida species are the main responsible for fungal nosocomial infections that can evolve into sepsis, particularly in intensive care units [81]. The ability to form biofilms on catheters and prosthesis represents a major threat to public health [82]. Although *C. albicans* is the most frequent sepsis causing agent, non-*albicans* species represent an increasing menace [83, 84]. In the context of the growing selection of isolates that are tolerant or resistant to antifungal drugs, and the lack of new therapeutic agents, the research on alternative materials or compositions that minimize or prevent the proliferation of biofilm-forming microbes is highly envisaged for the manufacturing of prosthesis and other medical devices. [85, 86].

Our data indicate the combination of graphene and UHMWPE efficiently impaired *C. tropicalis* cell viability, proliferation and surface colonization. Regarding viability tests, graphene in 70% ethanol inhibited *C. tropicalis* cell viability to the same extent that ethanol alone. Nonetheless, a more pronounced inhibition was achieved when the mixture of graphene and UHMWPE at 48 mg/mL was present in the culture broth. For *C. parapsilosis* yeasts, the detected inhibitory effects were only due to the presence of 70% ethanol. *C. albicans* and *C. glabrata* viabilities were mostly impacted by graphene alone (sup Fig. 13X).

Since *C. tropicalis* was the only species whose cell viability was affected by the mixture of graphene and UHMWPE, we proceeded with the following tests only with it. The 12 mg/mL graphene concentration did not impact *C. tropicalis* number of colonies. On the other hand, increasing concentrations of UHMWPE provoked a significant reduction in the number of colonies (Fig. S16). In addition, the UHMWPE-GO increased the contact angle, consequently increasing the hydrophobicity, which in turn may have increased the antifungal effect [87]. These results are impactful, due to the increasing data

on the morbidity and mortality rates associated to this fungus, as recently reviewed by Keighley et al. (2024) [84].

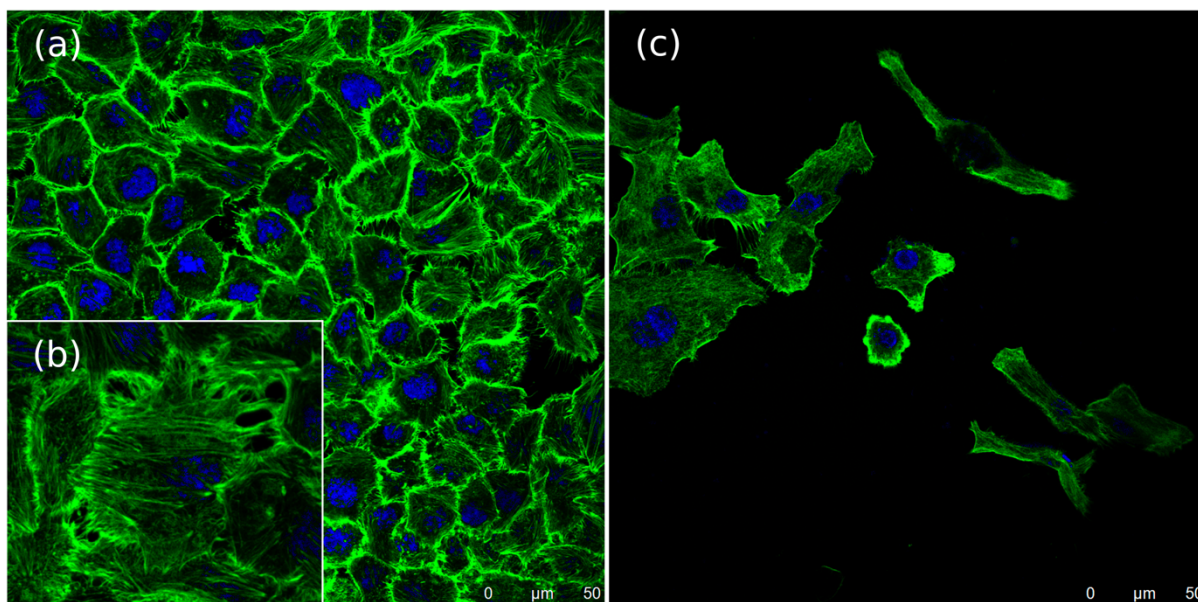


Fig. 5 (a) Confocal images showing F132 cell in UHMWPE-GO prostheses with inset close-up view (b) and F132 cell in UHMWPE prostheses (c).

Future studies should verify the stability of this UHMWPE-GO prosthesis production process and the effect over time on an implanted person, respecting regulatory aspects such as ISO 10993.

Conclusion

Based on our extensive research and experimental analysis, we successfully developed a novel protocol for incorporating GO into UHMWPE to engineer a new medical prosthetic material. Through comprehensive characterization, we have demonstrated that the UHMWPE-GO composite exhibits significant improvements in both physicalchemical and biological properties, compared to conventional UHMWPE. The integration of GO not only enhances the mechanical and thermal stability of the prostheses but also improves its surface properties, including reduced roughness and increased hydrophobicity. This suggests a successful integration of graphene hydrophobic nature into the composite material. Importantly, the UHMWPE-GO prostheses demonstrated superior interactions

with mammalian cells, as human blasts exhibited enhanced adhesion and cytoskeleton organization on the graphene-modified surfaces. These findings indicate the prostheses' potential for better cell adhesion and biocompatibility, crucial traits for effective integration into biological systems such as bone, connective tissue, and cartilage. Together, these results underscore the promise of UHMWPE-GO prostheses in medical applications, offering improved performance and biocompatibility.

4.2 Documento do material suplementar a ser submetido

Os experimentos abaixo foram realizados para avaliar o tamanho dos pós de GO e a cristalinidade do material do GO e UHMWPE.

TEXT S1: The GO powder is very flaky in nature and has a very thin and fluffy morphology (Fig. 2c-e). Our results estimate GO flake size by SEM with percentile values D10, D50, and D90 of 0.20, 0.38, and 1.19 μm , respectively. (Fig. S1). GO powder exhibits an X-ray diffraction signal around 2θ of 11.0° , corresponding to the interlayer spacing of $8.03 \text{ \AA}$ (Fig S1).

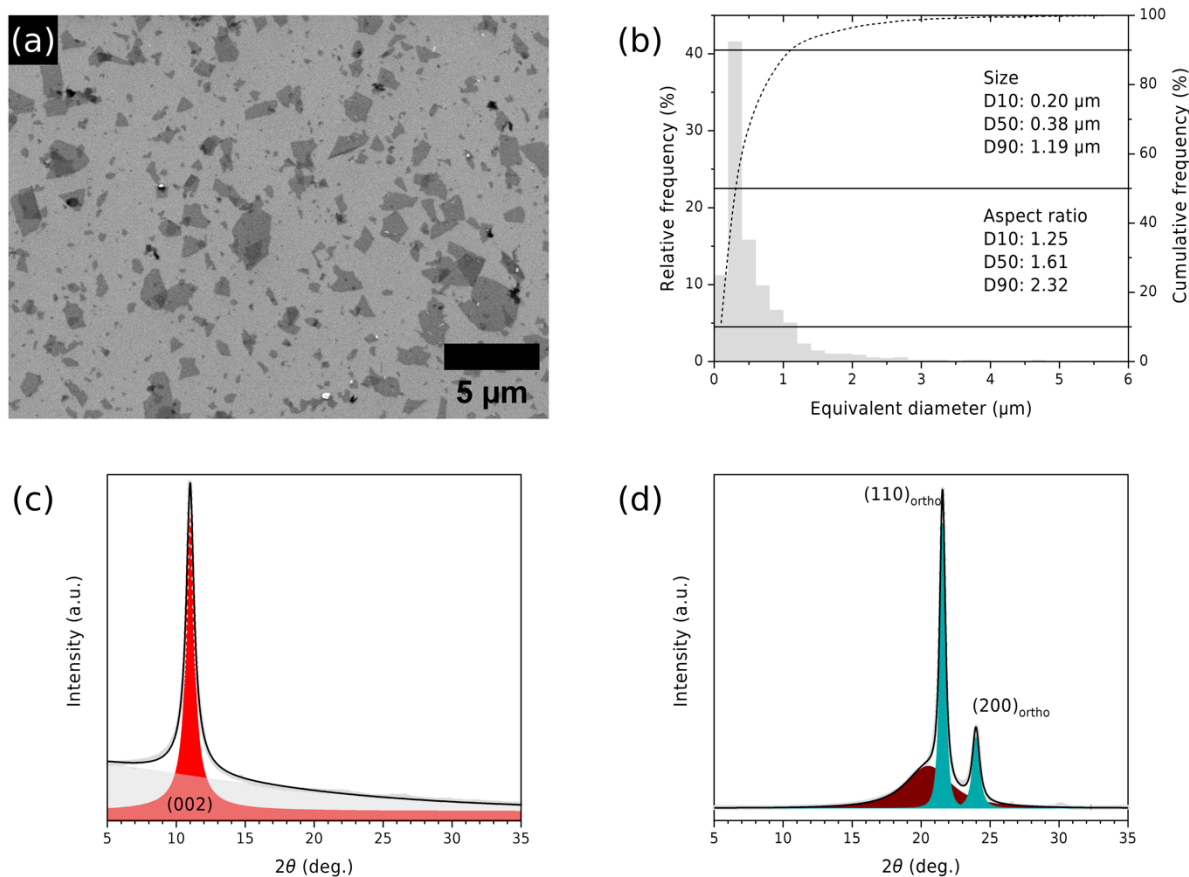


Figure S1. Characterization of powders GO and UHMWPE: (a) SEM image of GO sheets on a Si wafer chip, (b) size distribution of GO sheets with summarized statistical analysis of size and aspect ratio of sheets, (c) XRD pattern of GO powder, and (d) XRD pattern of UHMWPE powder and associated AMORPH analysis and deconvolution.

Os experimentos abaixo (Figura S2 e S3) foram realizados para avaliar a composição elementar das próteses.

TEXT S2: Elemental analysis via SEM/EDS of fragments of both prostheses was carried out, as shown in

Fig. S2

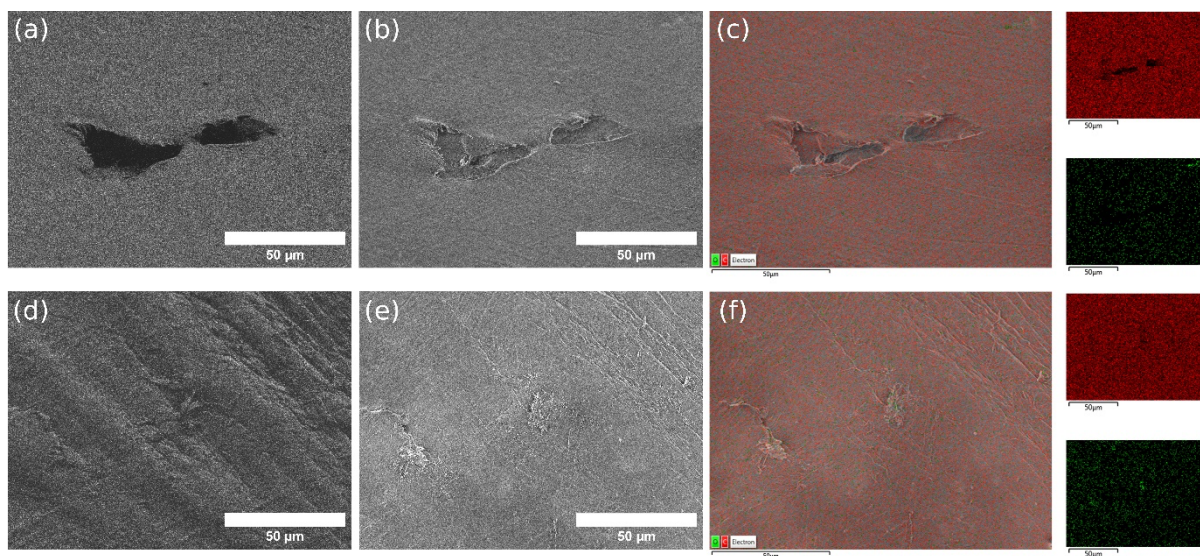


Figure S2. UHMWPE prosthesis SEM/EDS analysis: (a) secondary electron detector (SED) image, (b) backscattered electron detector image (BED), and (c) EDS C/O elemental layered image with corresponding C and O elemental maps shown as insets. UHMWPE-GO prosthesis SEM/EDS analysis: (a) SED image, (b) BED image, and (c) EDS C/O elemental layered image with corresponding C and O elemental maps shown as insets.

TEXT S3: Elemental analysis via SEM/EDS of fragments of both prostheses was carried out and the carbon-to-oxygen atomic ratio (C/O) was 98.0 and 40.3 for UHMWPE prostheses and UHMWPE-GO prostheses, respectively as showing in Fig. S3.

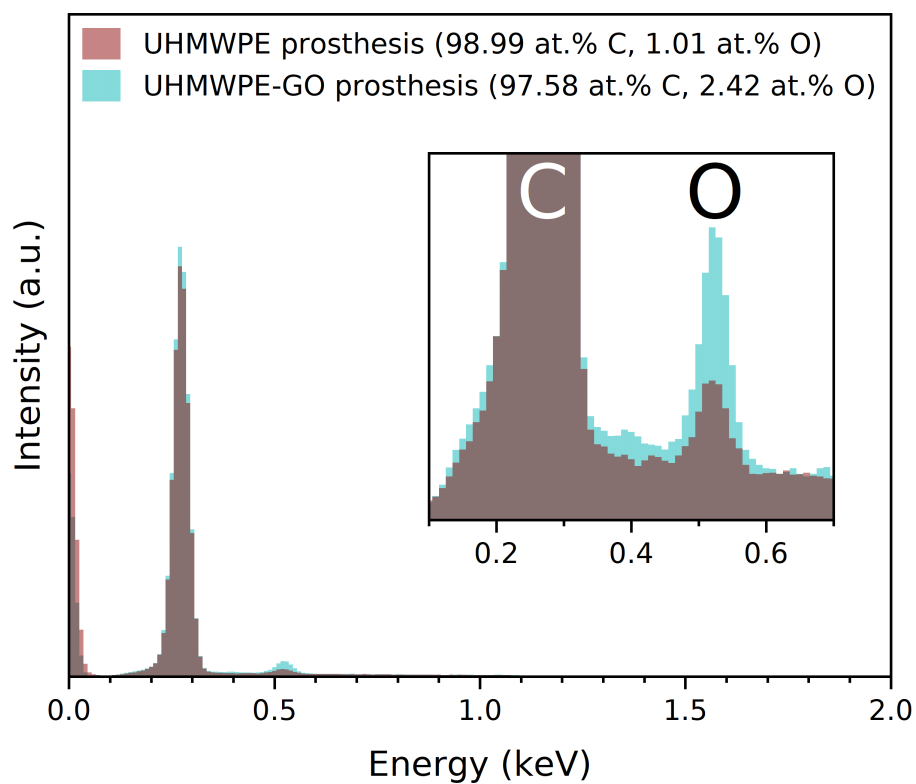


Figure S3. Energy dispersive X-ray spectra of UHMWPE prosthesis (teal) and UHMWPE-GO prosthesis (wine).

Os experimentos abaixo (Figura S4 e S5) foram realizados para avaliar a composição elementar dos pós.

TEXT S4: UHMWPE and GO precursor powders were also analysed via SEM/EDS as showing in Fig. S4.

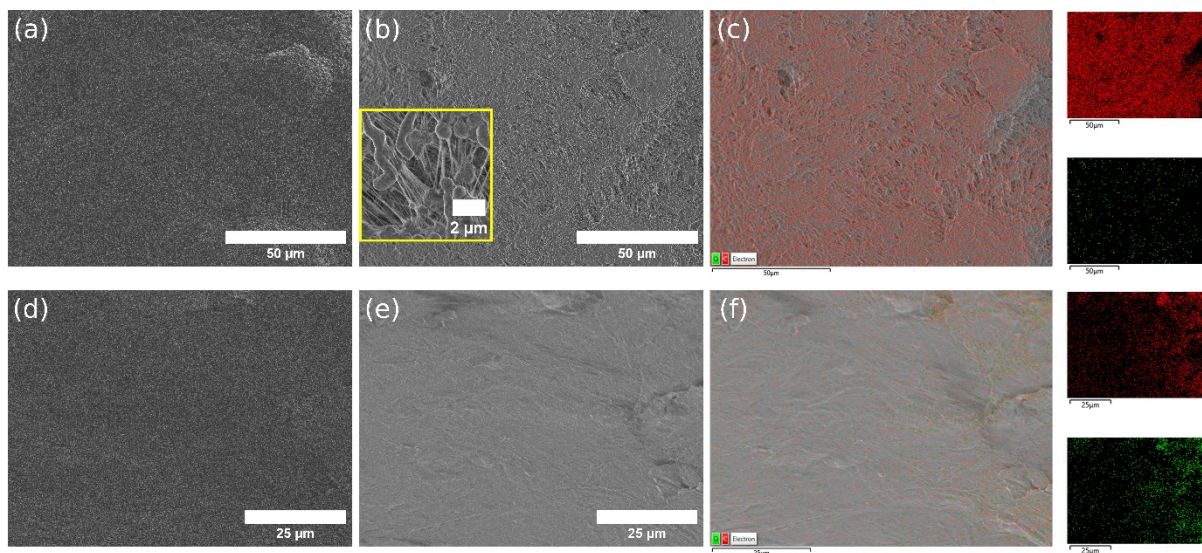


Figure S4. UHMWPE powder SEM/EDS analysis: (a) SED image, (b) BED image with yellow-outlined inset showing the network of fibrillar bundles and lamellar noduli, and (c) EDS C/O elemental layered image with corresponding C and O elemental maps shown as insets. GO powder SEM/EDS analysis: (a) SED image, (b) BED image, and (c) EDS C/O elemental layered image with corresponding C and O elemental maps shown as insets.

TEXT S5: UHMWPE and GO precursor powders were also analysed via SEM/EDS and C/O values of 624 and 2.9 were found, as showing in Fig. S5.

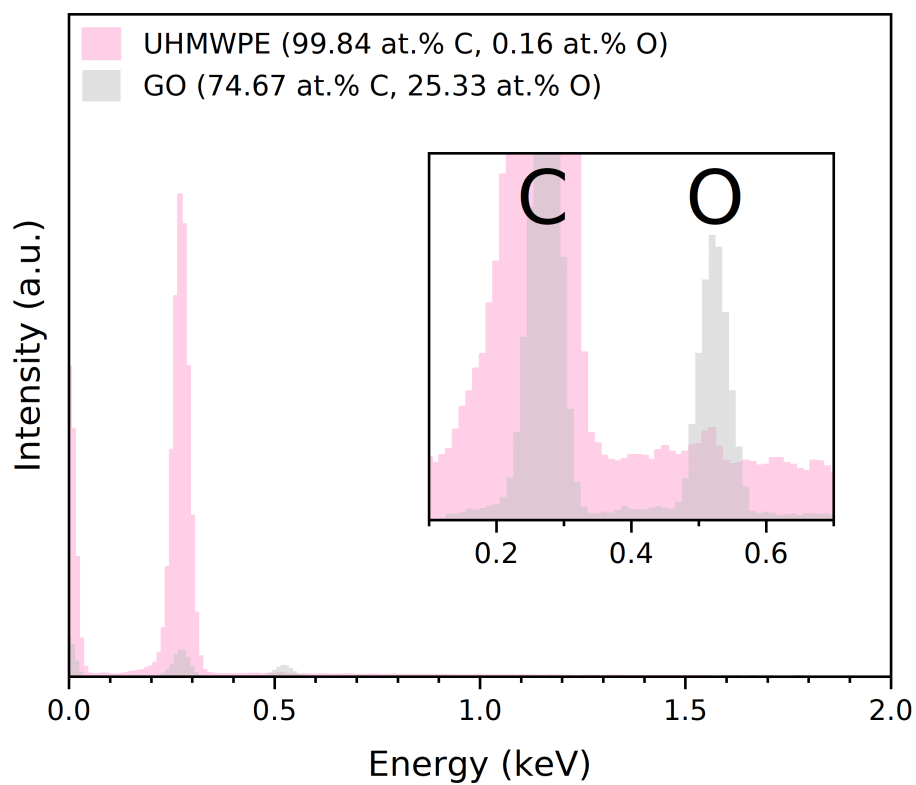


Figure S5. Energy dispersive X-ray spectra of UHMWPE powder (light pink) and GO powder (light grey).

Os experimentos abaixo foram realizados para avaliar a superfície das próteses.

TEXT S6: To enhance our understanding of the surface characteristics, we employed AFM to examine the prostheses, as shown in Fig. S6

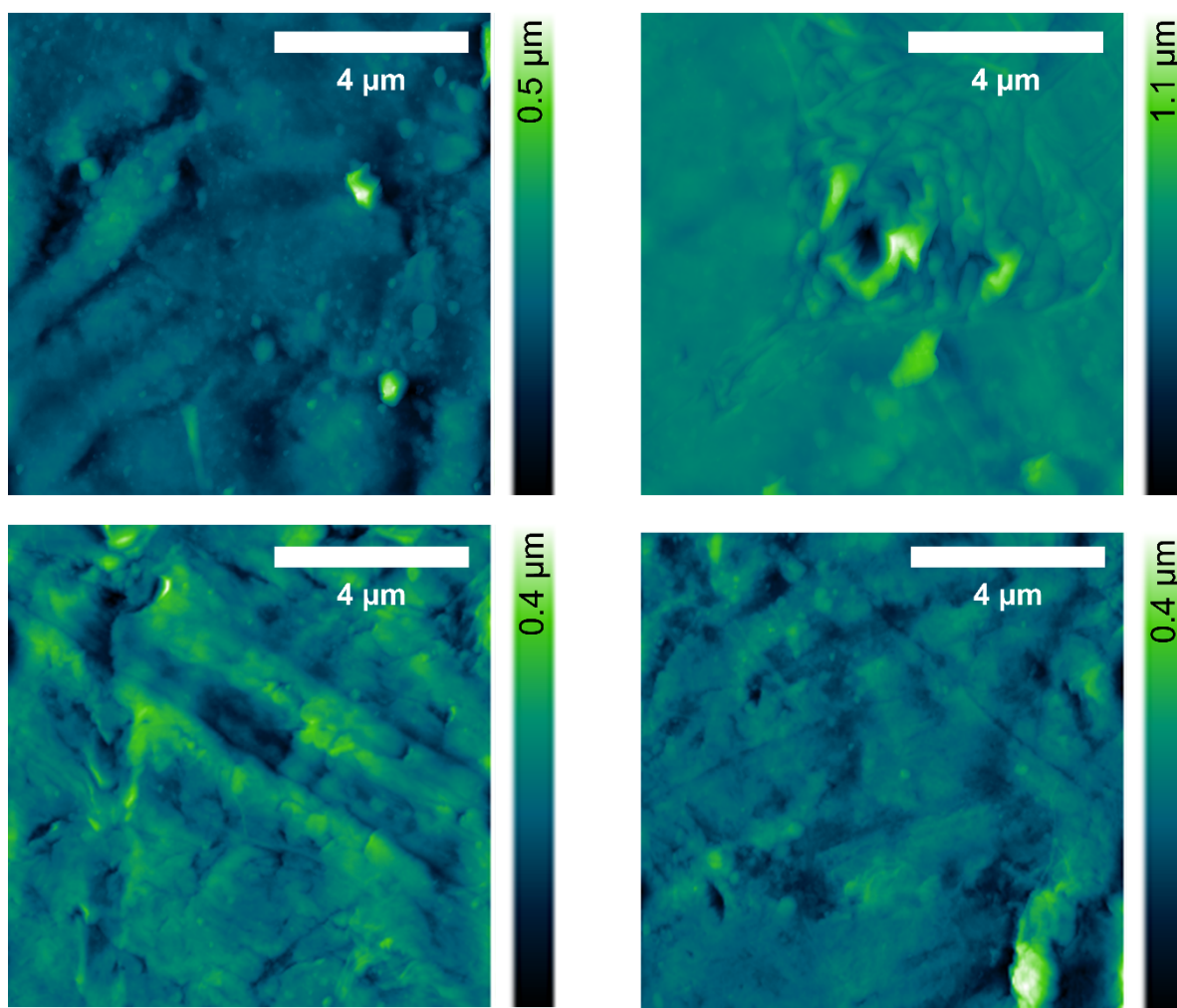


Figure S6. AFM images of the UHMWPE prosthesis (top) and the UHMWPE-GO prosthesis (bottom) showing smooth (left) and irregular (right) topographical sections.

Os experimentos abaixo foram realizados para avaliar a hidrofobicidade das próteses.

TEXT S7: Prostheses of UHMWPE and UHMWPE-GO exhibit market hydrophobicity with contact angles of $93.50 \pm 0.30^\circ$ and $94.93 \pm 0.98^\circ$, respectively, as shown in Fig. S7

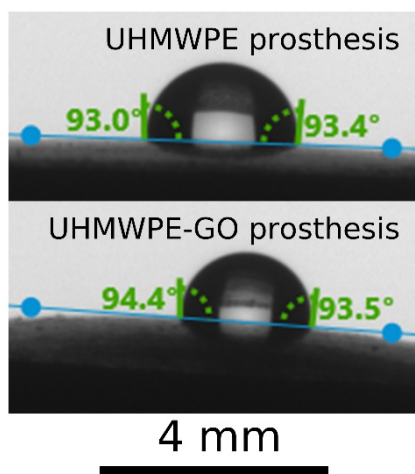


Figure S7. The contact angle measurements of the UHMWPE and UHMWPE-GO prostheses.

A tabela abaixo mostra os componentes em detalhes encontrados na XPS.

TEXT table S1: The high-resolution C 1s XPS deconvolution results of UHMWPE, GO, UHMWPE prostheses and UHMWPE-GO prostheses (Figure 3 a-d) are summarized in Table S1

Table S1. Summary of the deconvolution of C 1s X-ray photoelectron spectra of UHMWPE prosthesis, UHMWPE powder, GO powder, and UHMWPE-GO prosthesis. B.E.: binding energy and at.-%: atomic percentage.

Components	UHMWPE		UHMWPE		GO		UHMWPE-GO	
	prosthesis						prosthesis	
	<i>B.E.</i>	<i>Content</i>	<i>B.E.</i>	<i>Content</i>	<i>B.E.</i>	<i>Content</i>	<i>B.E.</i>	<i>Content</i>
	(eV)	(at.%)	(eV)	(at.%)	(eV)	(at.%)	(eV)	(at.%)
C=C	-	-	-	-	285.0	27.1	284.0	20.8
C-C	285.5	100.0	285.7	71.6	285.8	11.2	286.0	54.2
C-O	-	-	287.3	28.4	287.0	37.9	287.2	22.1
C=O	-	-	-	-	288.3	14.4	288.3	1.3
COO	-	-	-	-	289.4	7.2	289.4	1.6
$\pi-\pi$	-	-	-	-	291.0	2.2	-	-
Total C (at.%)	98.5		97.4		71.0		95.7	
Total O (at.%)	1.5		2.6		29.0		4.3	
C/O (at.%/at.%)	64.6		37.2		2.4		22.0	

A figura abaixo hipotetiza o motivo do padrão dos componentes na XPS ter alterado do pó de UHMWPE para a prótese de UHMWPE.

TEXT S8: The UHMWPE prostheses depict a single C–C component with an absent C–O component (Fig. 3 a-d). This result can be explained by the plasticizing effect of vitamin E, wherein the plasticizing agent finely disperses and firmly latches within the PE macromolecules, providing enhanced extrudability [45], as observed in Figure S8.

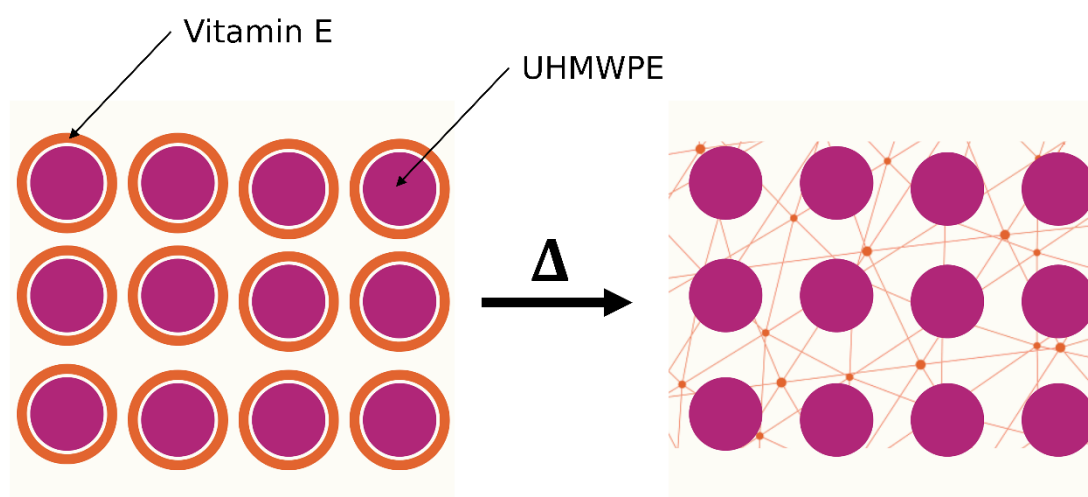


Figure S8. The plasticizing effect of vitamin E in the extrusion process of the UHMWPE-GO prosthesis.

A figura abaixo mostra como estaria os cristais ortorrômnicos na prótese de UHMWPE e UHMWPE-GO a partir dos dados de XRD.

TEXT S9: Deconvolution of XRD patterns (figure 3 e-f) showing 54.52% crystallinity - AMORPH determined as shown in Fig. S9

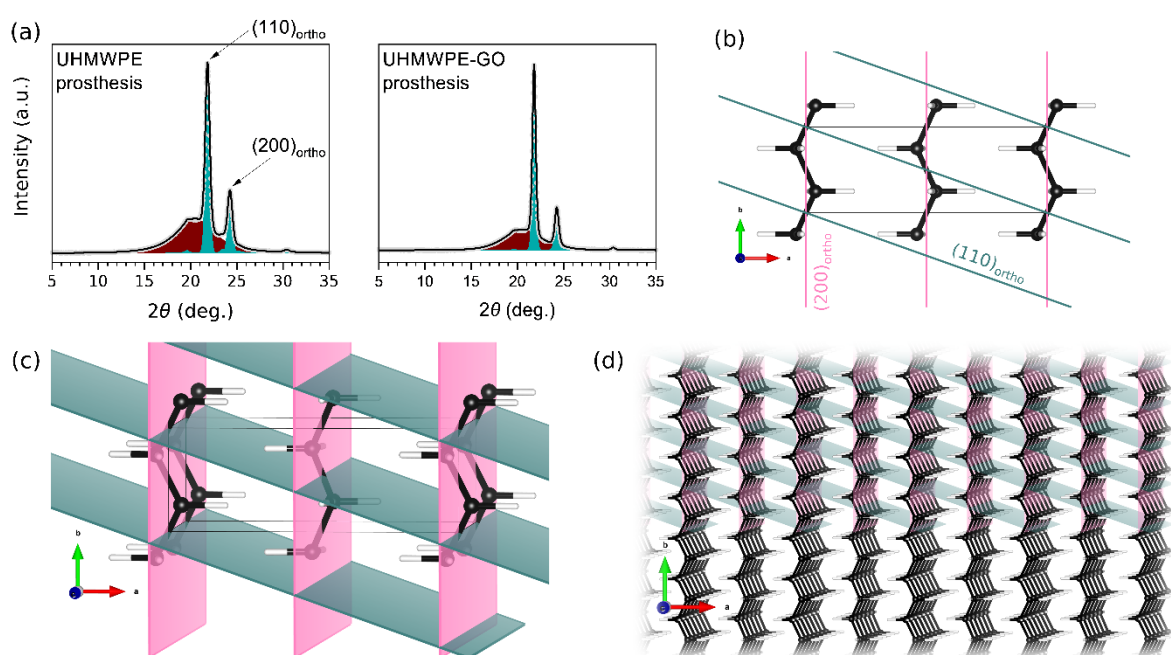


Figure S9. (a) Deconvolution of the XRD patterns of the UHMWPE and UHMWPE-GO prostheses. The crystalline and amorphous domains are represented in colors teal and wine, respectively. The orthorhombic peaks (110) and (200) were used to estimate the transverse crystallite size (D_{110}) and longitudinal crystallite size (D_{200}) from 2θ position and width information. (b) Unit cell of polyethylene (data retrieved from the Materials Project for H_2C , mp-985782, from database version v2023.11.1) depicting the orthorhombic planes (110) and (200) in teal and pink, respectively. (c) The unit cell viewed in (b) but in another projection allowing a better view of the planes. (d) An expanded structure to

illuminate the periodicity in the orthorhombic crystalline phases in the UHMWPE and UHMWPE-GO prostheses.

O experimento abaixo foi realizado para mostrar a estabilidade térmica das próteses, além da cristalinidade.

TEXT S10: DSC estimates of percent crystallinity, where the UHMWPE-GO prostheses are consistently found to be ca. 8% more crystalline than the UHMWPE prostheses. Figure S10 shows the DSC curves of prostheses of UHMWPE and UHMWPE-GO in which the melting peak is around 135 °C.

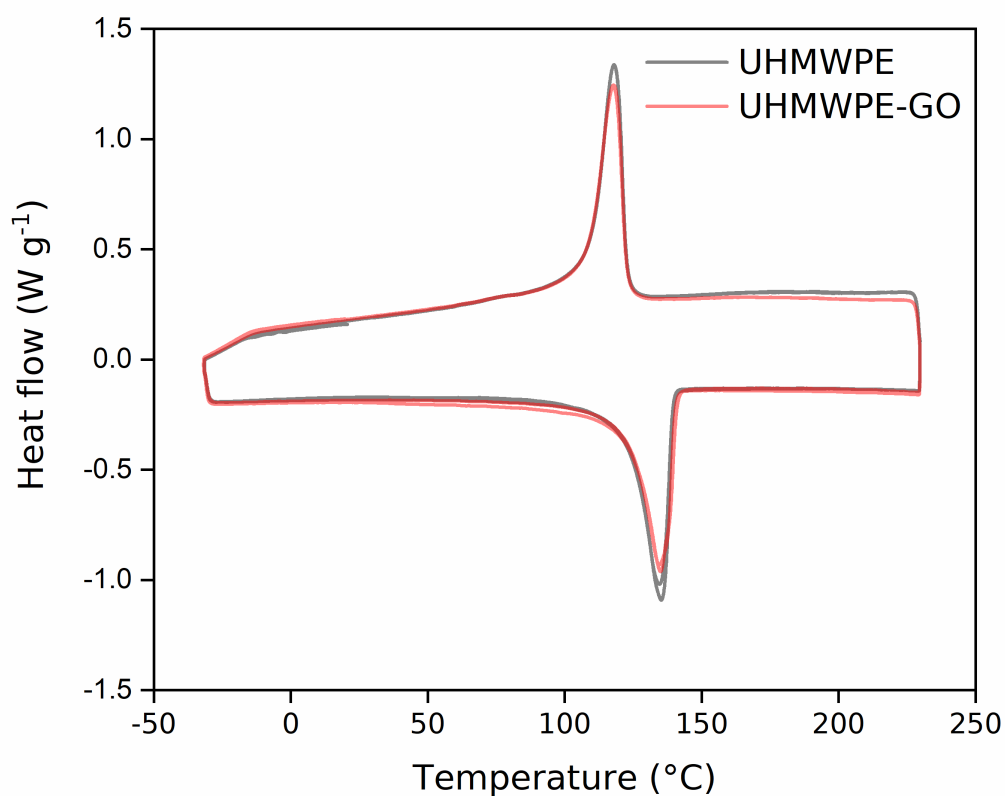


Figure S10. DSC curves of UHMWPE and UHMWPE-GO prostheses. Exothermic down.

O experimento abaixo mostra o experimento de *RAMAN* na superfície regular e irregular das próteses.

TEXT S11: Raman Spectra, where graphene layers are frozen and unable to breathe (Raman vibrations) in intact surfaces, and on the other hand, the layers can breathe in those microscale defective regions recurring on surfaces of UHMWPE-GO prostheses. The most intense bands found around 2848 cm^{-1} and 2881 cm^{-1} are attributed to the symmetric and asymmetric stretching vibrations modes of CH_2 groups, respectively.

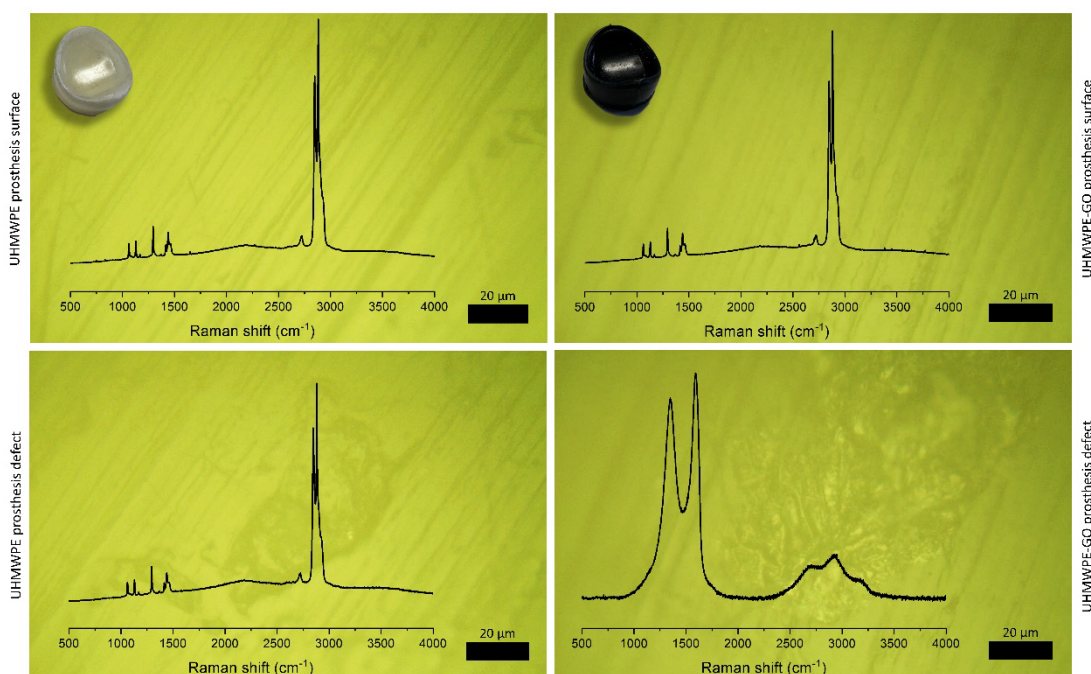


Figure S11. Raman spectra of (top) surfaces of UHMWPE and UHMWPE-GO prostheses and (bottom) defects depicting the strong dependence of GO characteristic bands emergence on surface topography.

O experimento abaixo foi realizado para mostrar o grafeno identificado no RAMAN nas superfícies irregulares.

TEXT S12: Raman maps of the smooth and defective surfaces of the UHMWPE-GO prosthesis. GO after extrusion and shaping was Raman-visible through microscale defects in the surface of UHMWPE-GO prostheses.

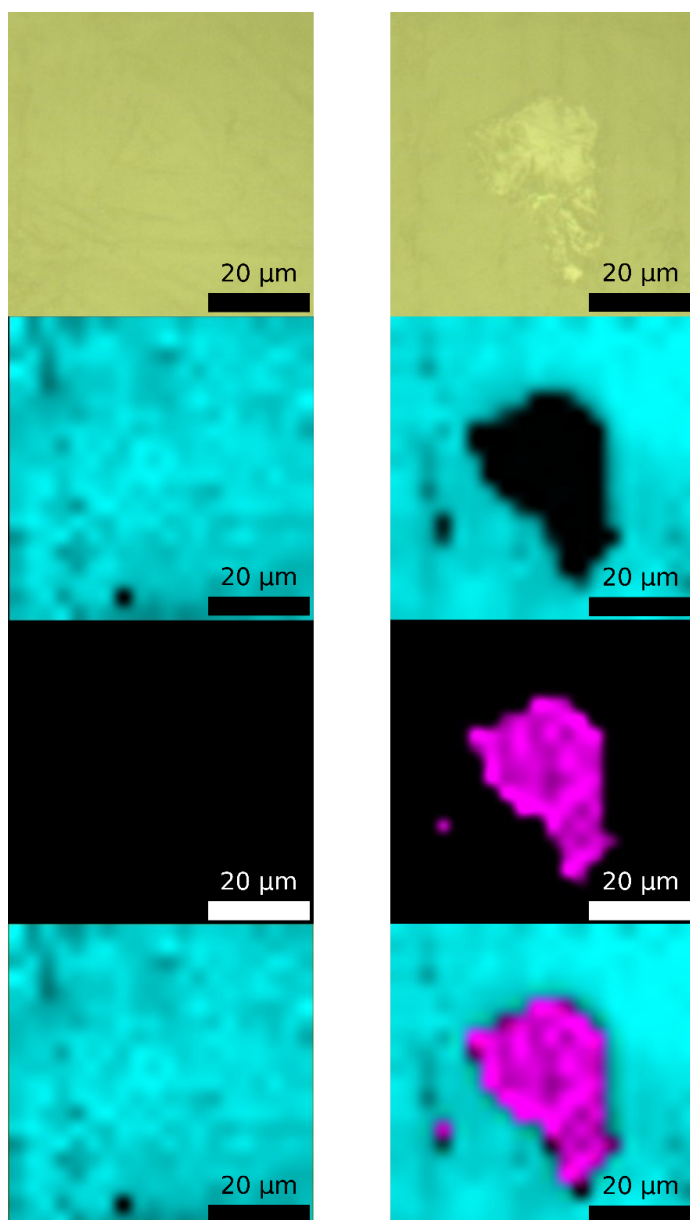


Figure S12. Raman maps of the smooth (left) and defective (right) surfaces of the UHMWPE-GO prosthesis. From top to bottom: surface image, UHMWPE signal map (2790-2980 cm^{-1}) in cyan, GO signal map (900-1900 cm^{-1}) in magenta, and overlay image.

A tabela abaixo mostra com mais detalhes os resultados da RAMAN a partir da deconvolução do gráfico.

TEXT table S2: The Raman spectra were deconvoluted into 6 bands: D, D, D'', G, D', and M. Table S2 summarizes the deconvolution results. The D* band is attributed to C–C and C=C stretching vibrations in polyene-like disordered graphitic structures*

Table S2. Summary of the deconvolution of Raman spectra obtained for GO powder and GO in the UHMWPE-GO prosthesis. FWHM: full-width-half-maximum.

Sample		Band					
		D*	D	D''	G	D'	M
GO	<i>Intensity</i>	99	2577	569	2001	1307	103
	<i>FWHM (cm⁻¹)</i>	61	78	134	31	19	34
	<i>Area (cm⁻¹)</i>	18924	631932	95215	195658	78800	10975
	<i>Center (cm⁻¹)</i>	1119	1354	1529	1586	1612	1771
GO in UHMWPE-GO prosthesis	<i>Intensity</i>	96	2500	600	2037	1021	41
	<i>FWHM (cm⁻¹)</i>	76	70	129	28	15	18
	<i>Area (cm⁻¹)</i>	22714	553023	96665	177316	48769	2318
	<i>Center (cm⁻¹)</i>	1164	1350	1534	1588	1616	1754

O experimento abaixo mostra como foi realizado o teste mecânico.

TEXT S13: Images of the experimental setup for force-displacement measurement are shown in Figure S13.

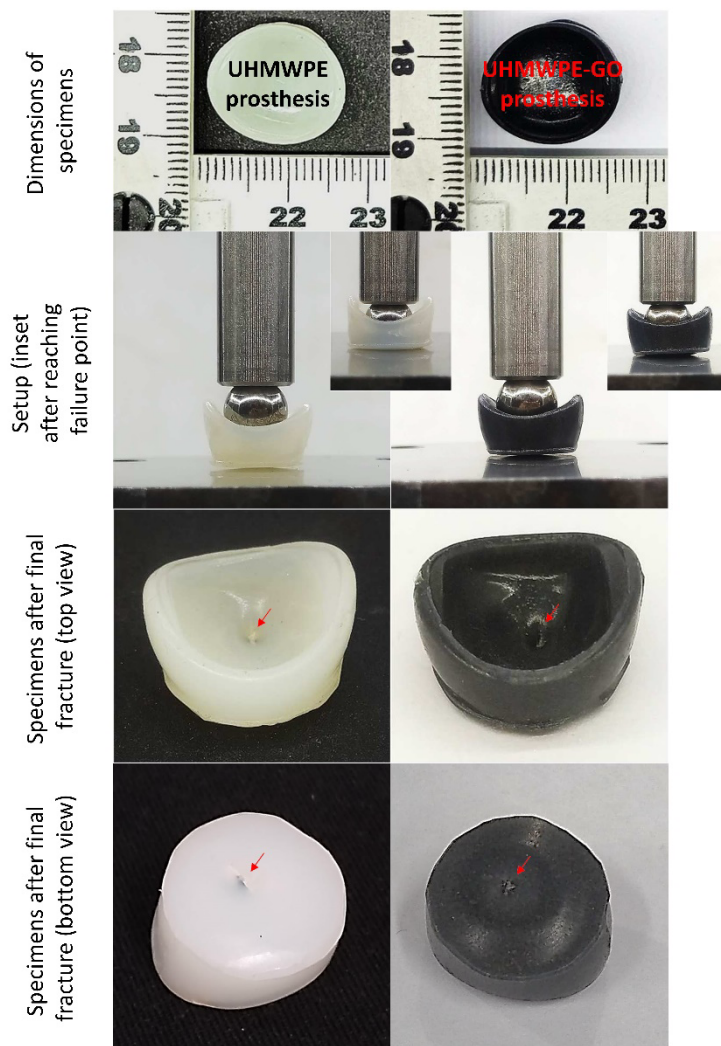


Figure S13. Photographs of the UHMWPE and UHMWPE-GO prostheses and experimental setup for the force-displacement measurements.

O experimento abaixo mostra o resultado de viabilidade celular em macrófagos murinos.

TEXT S14: biocompatibility of UHMWPE and GO powders in RAW 264.7 culture cells.

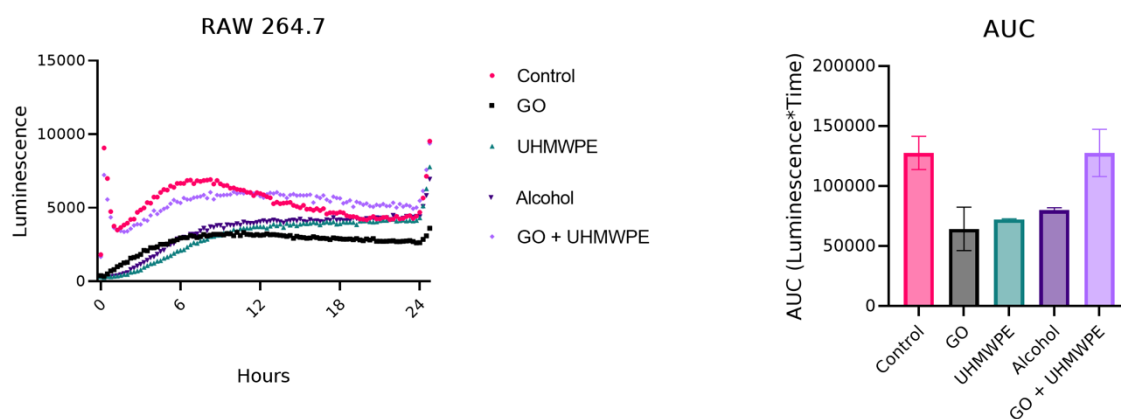


Figure S14. Biocompatibility of the UHMWPE and GO powders in RAW 264.7

O experimento abaixo mostra o resultado de viabilidade celular em leveduras.

TEXT S15: Cell viability of UHMWPE and GO powders in *Candida tropicalis*, *Candida parapsilosis*, *Candida Albicans* and *Candida glabrata*.

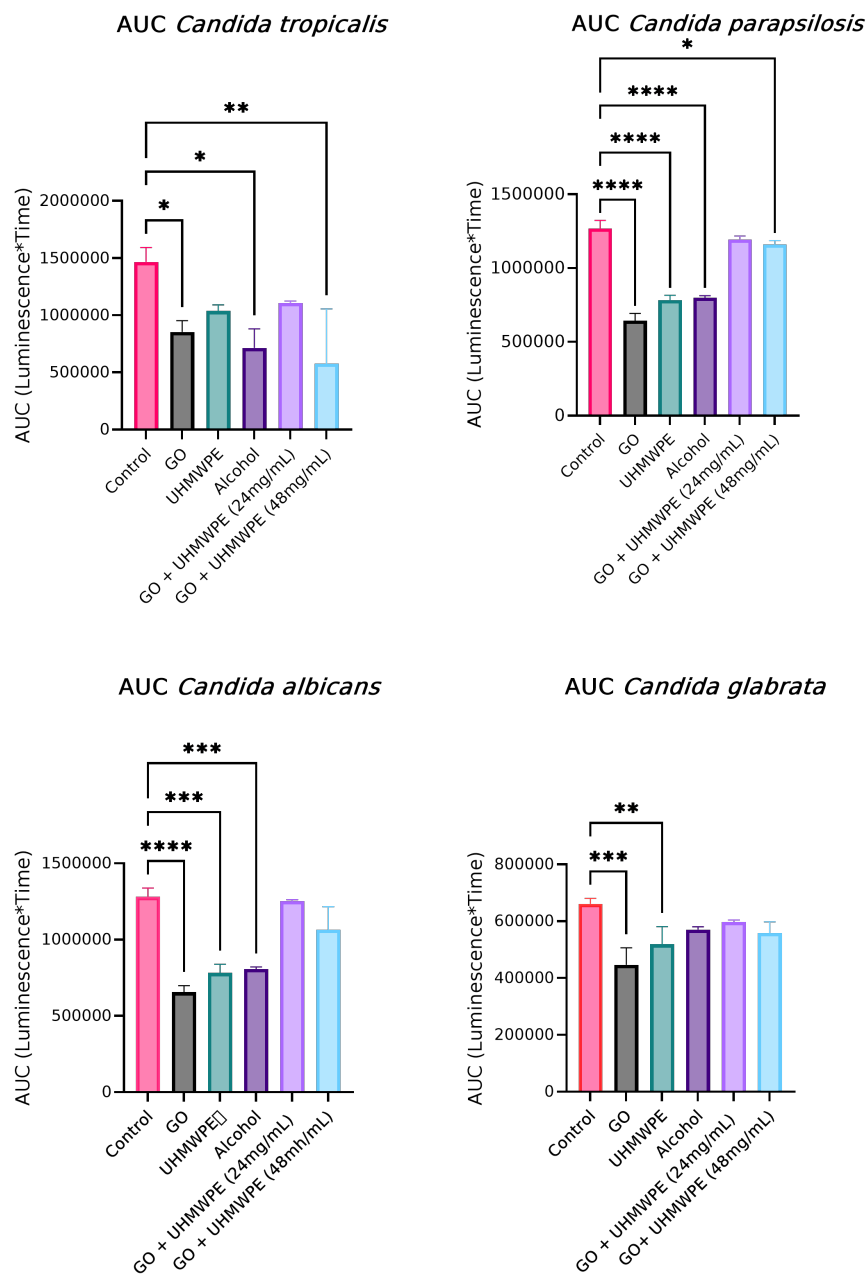


Figure S15. Cell viability assessment for *C. tropicalis*, *C. albicans*, *C. parapsilosis* or *C. glabrata* in the presence of graphene, UHMWPE or of a mixture of them.

O experimento abaixo mostra o resultado de contagem de colônias de *Candida tropicalis* com diferentes concentrações dos pós.

TEXT S16: Colony forming units counting for *C. tropicalis* grown on MHA plates supplemented with different concentrations of UHMWPE or 12 mg/mL graphene

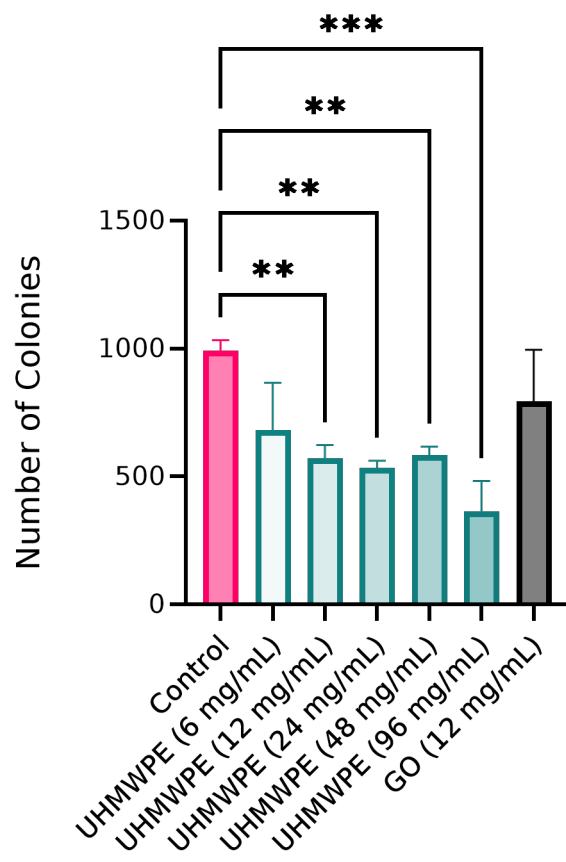


Figure S16. Colony forming units counting for *C. tropicalis* grown on MHA plates supplemented with different concentrations of UHMWPE or 12 mg/mL graphene.

O experimento abaixo mostra o resultado das próteses sendo desafiadas em culturas com *Candida tropicalis*.

TEXT S17: *C. tropicalis* grown on MHA plates (90 mm) containing a UHMWPE or a graphene-UHMWPE prosthesis in the center.

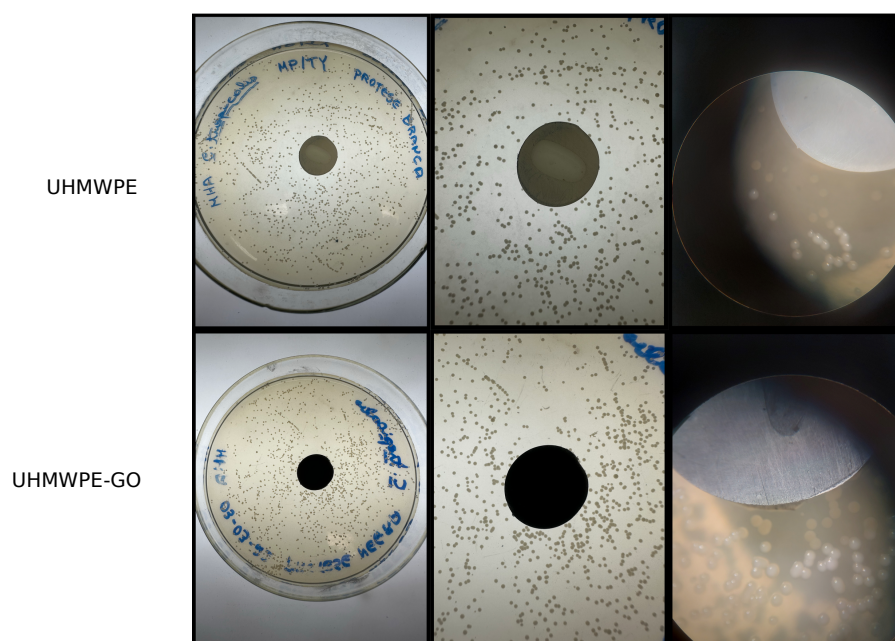


Figure S17. *C. tropicalis* grown on MHA plates (90 mm) containing a UHMWPE or a graphene-UHMWPE prosthesis in the center.

4.3 Documento da patente

Foi depositada uma patente e o documento pode ser lido integralmente na próxima página. A inovação consiste na produção do GO e incorporação ao polímero UHMWPE sem a adição de solventes tóxicos e de uma forma mais rápida e eficiente. A tecnologia teve como titulares a Universidade de Brasília e a empresa CPMH digital, além de inventores das duas instituições, conforme o documento abaixo. A patente foi depositada no dia 07/03/2024 sob o número: BR 10 2024 004569 6. Entretanto, conforme a Lei da Propriedade Industrial 9.279 (1996), a tecnologia apenas ficará pública após 18 meses do depósito.

A patente é composta pelo resumo, relatório descritivo, figuras (sem texto) e quadro reivindicatório. Segue, nas próximas páginas, a tecnologia protegida sem os dados pessoais dos inventores e no formato publicado, mas ainda não disponível.

Titulares: FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE DE BRASILIA (CNPJ 00038174000143) e COMÉRCIO E INDÚSTRIA DE PRODUTOS MÉDICO-HOSPITALARES E ODONTOLÓGICOS (CNPJ 13532259000125).

Inventores:, Thyago José Arruda Pacheco¹, Ítalo Azevedo Costa², Marcílio Sérgio Soares da Cunha³, Marcio José Poças-Fonseca², Sonia Nair Bão¹, Rander Avelar⁴, Leonardo Giordano Paterno², Ricardo Bentes De Azevedo¹, João Paulo Figueiró Longo¹,

1- Institute of Biological Sciences, University of Brasília, Brasília 70910-900, Brazil;

2- Polymer and Nanomaterials Research Laboratory, Chemistry Institute, University of Brasília, Brasília, DF 70910-900, Brazil;

3- Laboratory of Food, Drug and Cosmetics (LTMAC), School of Health Sciences, University of Brasília, Brasília, DF, 70910-900, Brazil;

4- CPMH Digital, Brasília, DF, 71200-260, Brazil.

RESUMO

PROCESSO DE PRODUÇÃO LIVRE DE SOLVENTES DE PRÓTESE ARTICULAR COMPOSTA DE POLIETILENO DE ALTA MASSA MOLAR MODIFICADO COM ÓXIDO DE GRAFENO POR TERMOPRENSAGEM E USO

A presente invenção situa-se no campo dos dispositivos médicos e consiste em um novo processo de produção de superfície articular composta de polietileno de alta massa molar (UHMWPE) incorporado com óxido de grafeno, sem a utilização de solventes tóxicos. O processo consiste em modificar a temperatura e pressão e usar uma quantidade específica de óxido de grafeno (1% m/m). O novo processo permite a produção de novos materiais e próteses articulares de uma forma mais rápida, com novas características ao material, como resistência maior, desempenho clínico superior e redução de custos.

PROCESSO DE PRODUÇÃO LIVRE DE SOLVENTES DE PRÓTESE ARTICULAR COMPOSTA DE POLIETILENO DE ALTA MASSA MOLAR MODIFICADO COM ÓXIDO DE GRAFENO POR TERMOPRENSAGEM E USO

CAMPO DA INVENÇÃO

[001] A presente invenção encontra-se no âmbito dos dispositivos médicos e concentra-se no aprimoramento do processo de produção da superfície articular de próteses feitas de polietileno de ultra alta massa molar (UHMWPE) modificadas com óxido de grafeno. Essas modificações resultaram em melhorias significativas no processo de fabricação, permitindo a bem-sucedida incorporação do óxido de grafeno. Além disso, essas modificações estão associadas a propriedades antimicrobianas aprimoradas, maior resistência mecânica e eliminação do uso de solventes tóxicos, graças à adoção do método de termoprensagem.

ESTADO DA TÉCNICA

[002] A área da medicina tem impulsionado o desenvolvimento de uma ampla gama de dispositivos médicos, todos destinados a melhorar a qualidade de vida dos pacientes. Com o aumento da longevidade, há uma demanda crescente por próteses articulares, cuja fabricação frequentemente emprega técnicas de polimerização. Entre os materiais utilizados, o polietileno de ultra alta massa molar (UHMWPE) se destaca pela sua notável resistência e compatibilidade com o corpo humano, sendo amplamente aplicado nessas próteses. No entanto, um desafio significativo reside em estender a vida útil desses implantes fabricados com este material (HUSSAIN, M., et al.

Polymers, v. 12, p. 323, **2020.**; ZHENG, J. et al. *Journal of Translational Medicine*, v. 17, p. 1-10, **2019.**).

[003] Apesar da biocompatibilidade e alta resistência do UHMWPE, a prótese pode sofrer contaminação e o paciente pode perder o implante. Ademais, após certo tempo do implante, pode haver desgaste do material e as partículas de UHMWPE serem liberadas. A presença de partículas artificiais de desgaste na interface entre o osso e a prótese estimula uma resposta biológica na região dos implantes, levando à ativação de macrófagos e fibroblastos e, conseqüentemente, resultando em osteólise ou perda da prótese (LI, X., et al. *Journal of Nanobiotechnology*, v. 20, p. 301, **2022**). Portanto, iniciativas para aumentar a vida útil das próteses, aumentando a resistência mecânica ou garantindo propriedades antimicrobianas têm sido um grande desafio.

[004] Neste contexto, o óxido de grafeno é um nanomaterial que pode ser incorporado na prótese com o objetivo de aumentar a atividade antimicrobiana por contato e aumentar a sua resistência mecânica (AATI, S., et al. *Dental Materials*, v. 38, p. 1921-1933, **2022**; AZIZI-LALABADI, M., et al. *Advances in Colloid and Interface Science*, v. 284, p. 102250, **2020**; PERREAULT, F., et al. *ACS Nano*, v. 9, p. 7226-7236, 2015). Entretanto, a incorporação do óxido grafeno no UHMWPE tem sido um desafio, uma vez que o UHMWPE é hidrofóbico e o óxido de grafeno é hidrofílico, criando um aspecto de incompatibilidade entre os dois materiais. Essa incorporação geralmente é feita com solventes orgânicos tóxicos, que podem gerar resíduos e induzir toxicidade ao objeto protético (PANG, W., et al.

RSC advances, v. 7, p. 55536-55546, **2017**; PANG, W., et al. *Applied Surface Science*, v. 434, p. 273-282, **2018**).

[005] No pedido de patente US 2019 0211478, é produzida uma fibra de UHMWPE utilizando como base pasta de grafeno, fibra de vidro, óleo e UHMWPE, cujo processo consiste na mistura física com alta rotação dos materiais, finalizado com técnica para produção de fios (*gel-spun*). Em comparação, a presente invenção se difere pela utilização de óxido de grafeno em pó como material de partida e pela não utilização de fibra de vidro e nem óleo, além do emprego de UHMWPE com vitamina E. O produto final também é diferente, pois enquanto no referido documento patentário são produzidas fibras, que demandam um processamento adicional, a presente invenção permite que as próteses sejam produzidas em uma única etapa, diretamente no formato do implante. Isso diminui o custo de produção do implante.

[006] A patente WO 2016 153925 também apresenta semelhanças, mas faz a descrição da síntese do UHMWPE com um antioxidante para melhorar as propriedades, cujo antioxidante utilizado é a vitamina E. Em contraste, a presente invenção se diferencia por além de utilizar o UHMWPE com vitamina E citado na patente, adiciona o óxido de grafeno, produzindo um novo material com propriedades melhoradas, como maior resistência à compressão, biocompatibilidade e atividade antimicrobiana.

[007] Ademais, a patente CN107446221A, embora apresente semelhanças com a presente tecnologia, se diferencia na proporção de óxido de grafeno e UHMWPE, sendo o caso da presente invenção de 1% de massa de óxido de grafeno para 99% de UHMWPE com vitamina E. Os inventores da patente CN

107446221A não utilizam UHMWPE com vitamina E; ademais, na presente invenção não é empregado o solvente o-diclorobenzeno, que pode possuir caráter tóxico, e não demanda o emprego do ultrassom para a mistura dos componentes do material, portanto diminuindo o tempo e o consumo de energia para o seu preparo.

[008] Na literatura não patentária, o estudo feito por Chen e colaboradores (2012) descreve a obtenção de um compósito produzido pela solubilização dos dois materiais (óxido de grafeno e UHMWPE) em etanol (CHEN, Y., et al. *European Polymer Journal*, v. 48, p. 1026-1033, **2012**). O etanol é removido por evaporação em banho de óleo e o sólido obtido é termoprensado. No entanto, na síntese da presente invenção, foram empregados os pós dos dois materiais, não necessitando da utilização do etanol ou qualquer outro solvente, nem do gasto de energia para dispersar o material e evaporar o etanol residual. Outrossim, na presente invenção foi utilizado grafite expandido enquanto no artigo citado foi utilizado grafite normal.

[009] Em um outro estudo de Chen e colaboradores (2021), os autores sintetizaram o óxido de grafeno utilizando como material precursor grafite em pó (CHEN, X., et al. *Polymers*, v. 13, p. 482, **2021**), enquanto no presente invento foi empregado grafite expandido, cuja vantagem é acelerar o processo e aumentar o rendimento da síntese. Ainda, no artigo, a síntese é finalizada após atingir pH 7, enquanto na presente invenção, o óxido de grafeno é dialisado por 7 dias com membrana de diálise com corte de massa molar típico de 12.000 g/mol. Esse processo eleva a pureza do óxido de grafeno, removendo o excesso de íons e outros subprodutos

que podem, eventualmente, atribuir toxicidade ao produto final. Outro processo não descrito pelo artigo é a esfoliação ultrassônica. Esse processo assegura a separação entre as camadas do óxido de grafite, convertendo o material para óxido de grafeno. É importante destacar que a produção do óxido de grafeno em pó na presente invenção é realizada por processo de liofilização e não por forno a vácuo (*vacuum oven*).

[010] Ainda, na fabricação do compósito descrita no artigo supracitado, os autores empregaram NaCl e etanol, além de UHMWPE e óxido de grafeno. Isso implica em etapas adicionais, como a mistura prévia do óxido de grafeno com NaCl e evaporação do etanol. A presente invenção prescinde da realização dessas etapas, tornando o processo mais rápido, livre de solventes, com menor consumo de reagentes químicos e, portanto, mais barato e menos tóxico. Por fim, o UHMWPE de partida utilizado na síntese da presente tecnologia é diferente do utilizado no artigo. No artigo é utilizado UHMWPE, enquanto na síntese do presente invento é utilizado UHMWPE com vitamina E.

[011] Isto posto, o estado da técnica não prevê ou sugere o desenvolvimento de um método de obtenção de superfície articular de próteses sem a utilização de solventes de qualquer natureza. Resultando na produção da superfície articular com formulações granuladas de UHMWPE e aditivadas com o nanomaterial de óxido de grafeno.

DESCRIÇÃO SUCINTA DAS FIGURAS

[012] A invenção poderá ser mais bem compreendida com base nas **Figuras** de **1** a **8**, cuja descrição segue abaixo:

[013] A **Figura 1** apresenta a prótese da articulação temporomandibular (ATM) de polietileno com vitamina E (UHMWPE) (A) com o aparato de titânio em que se encaixa em sua forma convencional e o "locking" de parafuso (B).

[014] A **Figura 2** apresenta a prótese de UHMWPE e a prótese de UHMWPE com a incorporação de óxido de grafeno (preta).

[015] A **Figura 3** apresenta a microscopia eletrônica de varredura evidenciando que o óxido de grafeno foi incorporado na prótese (B). "A" se refere à prótese somente com UHMWPE e "B" à UHMWPE incorporada com óxido de grafeno.

[016] A **Figura 4** apresenta a microscopia eletrônica de varredura evidenciando as folhas de grafeno na prótese de UHMWPE (B). "A" se refere à prótese somente com UHMWPE e "B" à UHMWPE incorporada com óxido de grafeno.

[017] A **Figura 5** apresenta a espectroscopia de energia dispersiva de raios-X evidenciando a composição elementar da prótese e incorporação do grafeno com o elemento oxigênio (B).

[018] A **Figura 6** apresenta o teste de citotoxicidade em macrófagos RAW 264.7 desafiados com os pós de óxido de grafeno e UHMWPE. Sem efeito estatístico significativo.

[019] A **Figura 7** apresenta o teste antimicrobiano dos pós de óxido de grafeno e UHMWPE em cultura de *Candida tropicalis*. ASC significa área sob a curva.

[020] A **Figura 8** apresenta o teste mecânico (curvas de força x deslocamento) da prótese de UHMWPE com vitamina E e da prótese com UHMWPE com vitamina E modificada com óxido de grafeno. Em vermelho está representado a prótese de UHMWPE, e em verde a prótese com UHMWPE com vitamina E modificada com óxido de grafeno.

DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

[021] Em sua única modalidade, a presente tecnologia se refere a um novo método de produção de superfície articular de próteses feitas de polietileno de alta massa molar (UHMWPE) modificadas com óxido de grafeno.

[022] Na nova tecnologia, a fabricação da prótese exige apenas dois materiais em pós, o óxido de grafeno e UHMWPE com vitamina E. O óxido de grafeno, na proporção de 1% (%m/m), foi incorporado ao UHMWPE com vitamina E por meio da prensagem a frio em molde apropriado (tipo macho e fêmea), sob pressão de 10 MPa, seguido de aquecimento em forno na temperatura de 205°C e pressão de 5 MPa e, finalmente, removido o molde do forno e mantendo a pressão de 10 MPa. Ao final desse processo, o molde é aberto e a nova prótese de UHMWPE com vitamina E incorporada com óxido de grafeno é produzida. O óxido de grafeno foi produzido após esfoliação do óxido de grafite, este produzido segundo o método descrito por Sun e Fujetsu (SUN e FUJETSU. *Materials Letters*, v. 109, p. 207, **2013**). Após a síntese, o óxido de grafite é transformado em óxido de grafeno por meio da esfoliação em água com um disruptor ultrassônico (40 kHz, 150 W, modo pulsado). Em seguida, a suspensão de óxido de grafeno é centrifugada e, depois, dialisada com membrana de celulose regenerada, com corte de massa molar de 12000 g/mol, visando à remoção dos íons e eventuais subprodutos da síntese.

[023] Para a transformação do óxido de grafeno em suspensão em óxido de grafeno em pó, a suspensão é congelada e, posteriormente, liofilizada. O sólido obtido é transformado em pó fino (granulometria menor que 212 µm)

utilizando uma peneira de aço inox malha 65 TY. Os dois materiais são misturados e homogeneizados por agitador do tipo vórtex. Entretanto, ao incorporar esse óxido de grafeno (polar) ao polímero de UHMWPE (apolar) comumente são usados solventes tóxicos. Nessa nova tecnologia o óxido de grafeno foi incorporado no UHMWPE com vitamina E sem a adição de qualquer solvente, isto é, a seco, através do processo de termoprensagem com os dois pós, produzindo uma nova superfície articular com propriedades melhoradas. A mesma tecnologia pode ser usada para incorporar o óxido de grafeno sem solvente em diversos tipos de próteses, como próteses articulares para o quadril, joelho, ombro dentre outras.

[024] A forma alternativa de incorporação do óxido de grafeno no polietileno tem como principais vantagens industriais: (I) dispensa o uso de solventes, o que cria uma vantagem industrial importante, pois prescinde da etapa de remoção destes solventes; (II) por usar um método totalmente livre de solventes, o processo de escalonamento industrial também é otimizado, minimizando não somente a contaminação química, mas também a contaminação microbiana; além disso, (III) o método apresentado neste pedido de patente utiliza a mesma metodologia para produção dos objetos protéticos, o que facilita a incorporação da metodologia industrial nas plantas industriais disponíveis no momento.

[025] Nesse novo método, o óxido de grafeno foi incorporado ao UHMWPE sem a utilização de solventes de qualquer natureza. Com isso, foi possível a produção da superfície articular por termoprensagem com formulações granuladas de UHMWPE e aditivadas com o nanomaterial de

óxido de grafeno. Os resultados mostraram um melhoramento do processo de fabricação e melhorias na resposta mecânica.

MELHOR EXECUÇÃO DA INVENÇÃO

[026] A obtenção da superfície articular de próteses pode ser descrita pelas seguintes etapas:

- A. Síntese do óxido de grafite a partir de grafite expandido pelo método descrito por Sun e Fujetsu (SUN e FUJETSU. *Materials Letters*, v. 109, p. 207, **2013**);
- B. Esfoliação do óxido de grafite para óxido de grafeno em processador ultrassônico (2h, modo pulsado, 150 W);
- C. Centrifugação da suspensão de óxido de grafeno a 8000 rpm por 30 min.;
- D. Purificação do óxido de grafeno por diálise, utilizando membrana de celulose regenerada, corte de massa molar 12.000 g/mol, e água destilada como meio dialisante. Troca da água dialisada diariamente, por 7 dias;
- E. Liofilização da suspensão dialisada de óxido de grafeno por 7 dias;
- F. Peneiramento do óxido de grafeno sólido em peneira de aço inox malha 65 TY;
- G. Pesagem de 0,05 g de óxido de grafeno em pó;
- H. Pesagem de 4,95 g de UHMWPE com vitamina E;
- I. Mistura mecânica dos dois materiais em tubo falcon 50 mL com agitador Vortex por 2 min.;
- J. Prensagem a frio com pressão de 10 Mpa;

K. Aquecimento da mistura até a temperatura de 205°C.

EXEMPLOS DE CONCRETIZAÇÕES DA INVENÇÃO

[027] São apresentados aqui exemplos de aplicação, a fim de ilustrar mais detalhadamente determinadas modalidades da invenção. É importante destacar que a presente invenção não se limita aos exemplos citados, podendo ser utilizada em todas as aplicações descritas ou em quaisquer outras variações equivalentes.

Exemplo 1: obtenção do óxido de grafeno e incorporação com o polímero de UHMWPE com vitamina E

[028] O óxido de grafeno foi produzido a partir da esfoliação ultrassônica de óxido de grafite, este produzido pelo método descrito por Sun e Fujetsu (SUN e FUJETSU. *Materials Letters*, v. 109, p. 207, **2013**). Após a síntese, o óxido de grafite é transformado em óxido de grafeno por meio da esfoliação em água com um disruptor ultrassônico (40 kHz, 150 W, modo pulsado). Em seguida, a suspensão de óxido de grafeno é centrifugada e, depois, dialisada com membrana de celulose regenerada, com corte de massa molar de 12000 g/mol, visando à remoção dos íons e eventuais subprodutos da síntese. Após a síntese convencional, o óxido de grafeno é submetido ao processo de diálise com membrana visando a remoção dos íons em excesso.

[029] Para a transformação do óxido de grafeno em suspensão em óxido de grafeno no formato de pó, o material é congelado e posteriormente liofilizado. O sólido é transformado em pó utilizando uma peneira granulométrica, gerando um pó fino de óxido de grafeno. O óxido de grafeno, na proporção de 1% (%m/m), foi incorporado no UHMWPE com

vitamina E através da prensagem a frio com pressão de 10 MPa, depois levado ao forno sob temperatura de 205°C e 5 MPa, e então tirado do forno e mantendo a pressão de 10 MPa. Ao final desse processo a nova prótese, de UHMWPE com vitamina E incorporada com óxido de grafeno, é produzida, conforme mostra a Figura 2, sendo a Figura 1 a prótese montada no aparato de titânio em sua forma convencional.

Exemplo 2: Morfologia da prótese de UHMWPE, com vitamina E, com e sem óxido de grafeno

[030] A morfologia da prótese com UHMWPE e com UHMWPE e óxido de grafeno foi analisada por microscopia eletrônica de varredura. Antes da análise, parte da prótese foi colocada em um suporte composto por liga metálica de zinco e cobre revestidos com ouro. A microscopia mostrou as folhas de óxido de grafeno incorporadas na prótese, conforme as Figuras 3 e 4.

Exemplo 3: Análise da composição da prótese

[031] Juntamente com a microscopia eletrônica de varredura, foi realizado o teste espectroscopia de raios X por energia dispersiva, detectando a composição majoritária de carbono na prótese de UHMWPE com vitamina E, e de carbono e oxigênio na prótese de UHMWPE com vitamina E e óxido de grafeno incorporado, conforme mostra a Figura 5.

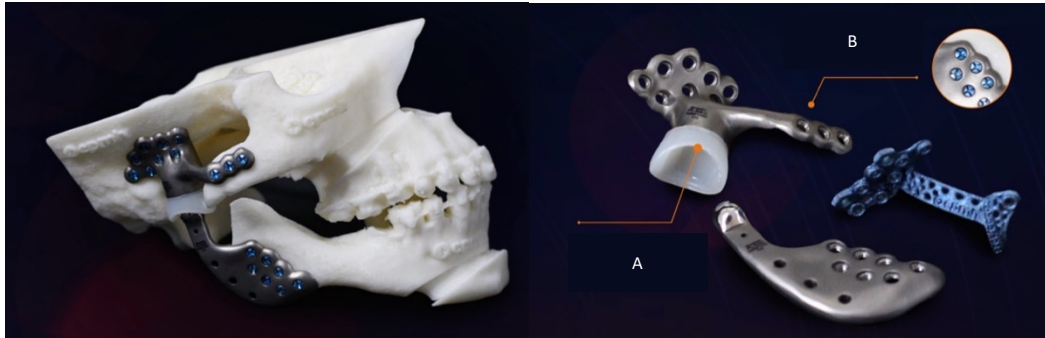
Exemplo 4: Teste de viabilidade celular

[032] Para os ensaios de viabilidade celular foram utilizadas linhagens de macrófagos murinos RAW 264.7 e realizado o teste de 3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-di-fenil brometo de tetrazolina (MTT) e ATP em tempo real. As células

foram cultivadas utilizando meio DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium, Gibco, EUA), suplementado com 10% v,v de soro bovino fetal (SBF) (Gibco, EUA), além de 1% v,v, de solução de penicilina/estreptomicina (1.000 U/mL) (Invitrogen, Grand Island, NY). As células foram mantidas em estufa a 5% de CO₂, 37°C e 95% de umidade. Quando as células atingiram a confluência de 2×10^4 células elas foram plaqueadas em poços de placa de 24 poços. O desafio consistiu em colocar diferentes concentrações de pó de óxido de grafeno e UHMWPE com vitamina E nas células de macrófago. O teste de MTT avaliou a absorbância da amostra, enquanto o teste de ATP em tempo real avaliou a fluorescência de células viáveis que liberam ATP. Ambos os testes, MTT e ATP em tempo real, não mostraram alteração significativa de viabilidade em baixas concentrações, conforme as Figuras 6 e 7.

Exemplo 5: Teste mecânico

[033] Foi realizado um ensaio de compressão com as próteses de UHMWPE com vitamina E e a prótese de UHMWPE com vitamina E e óxido de grafeno 1% (m/m). Uma esfera de 10 mm de diâmetro foi pressionada nas duas próteses até o esmagamento. O ensaio mostrou que a prótese branca sofreu deformação maior que a amostra contendo óxido de grafeno, conforme mostra a Figura 8.

FIGURAS**Figura 1****Figura 2**

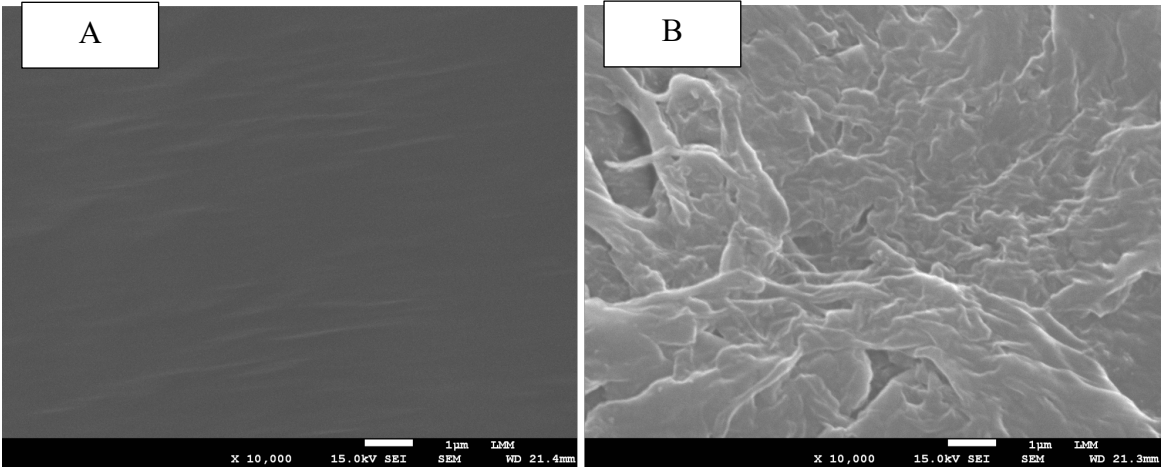


Figura 3

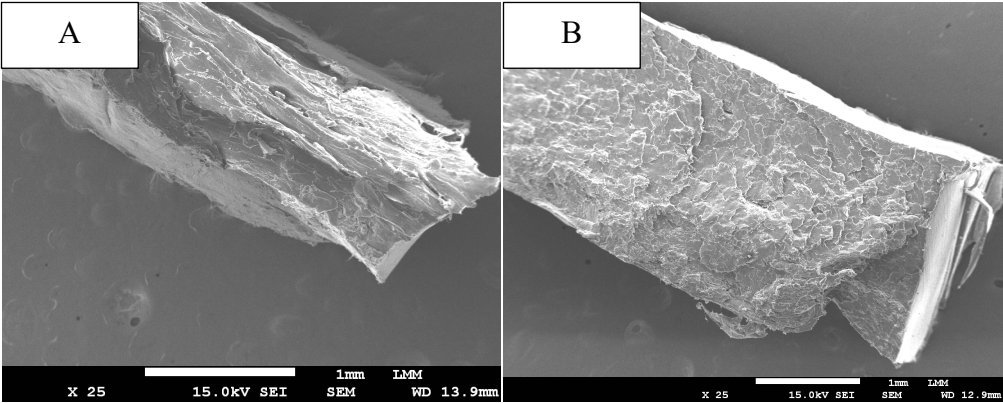


Figura 4

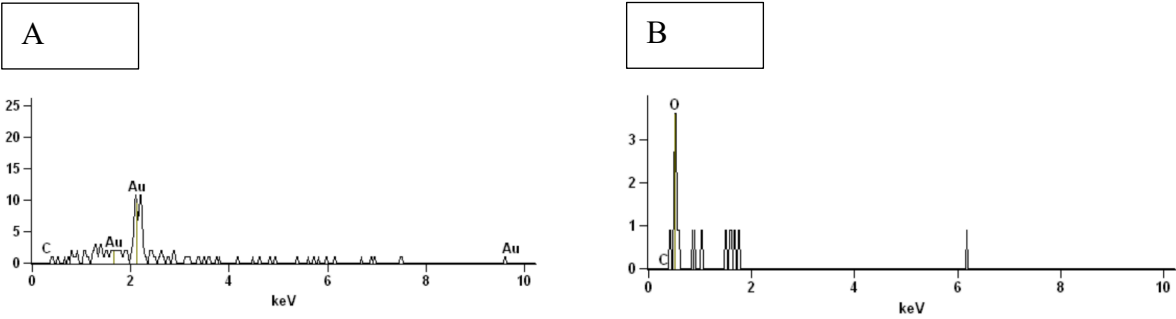


Figura 5

Viabilidade celular em tempo real (RAW 264.7)

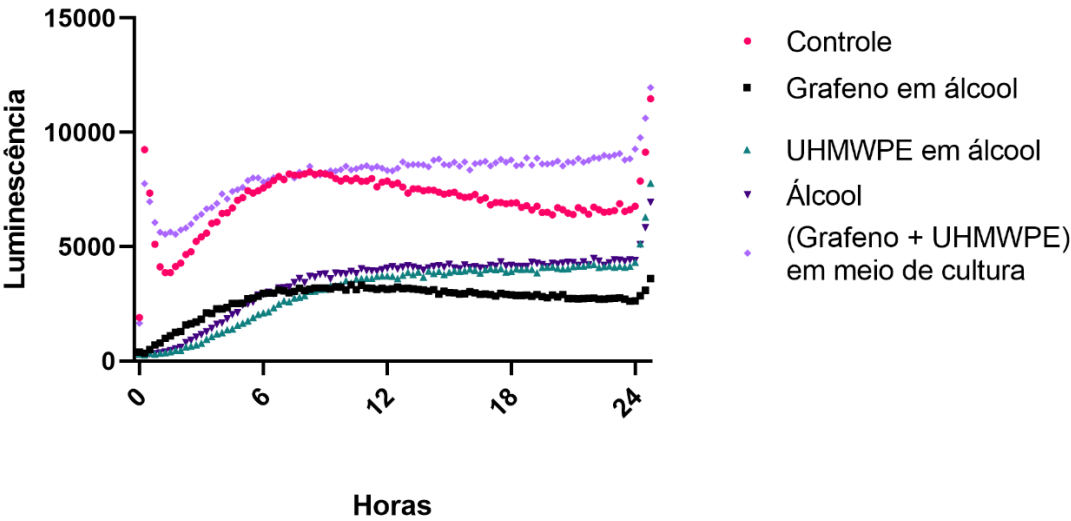


Figura 6

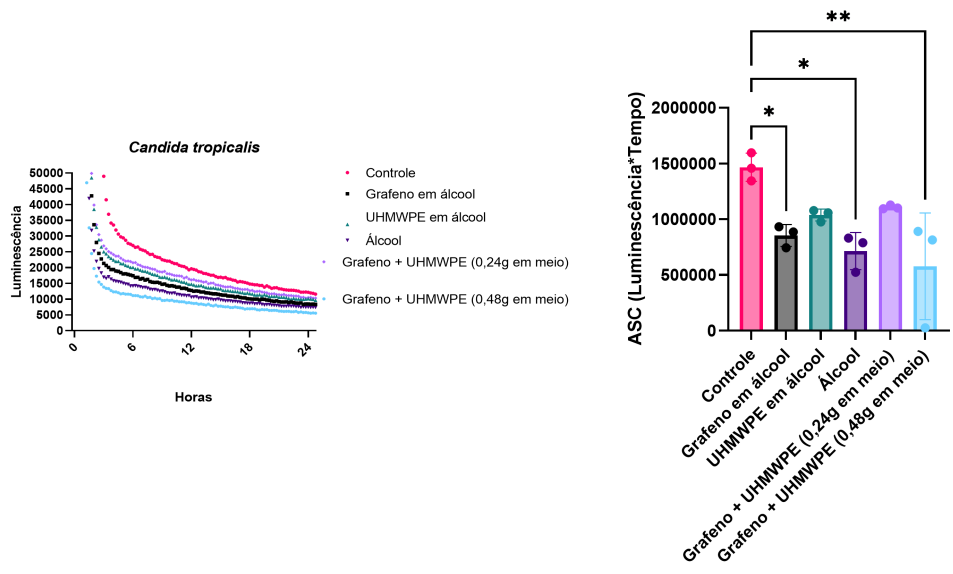


Figura 7

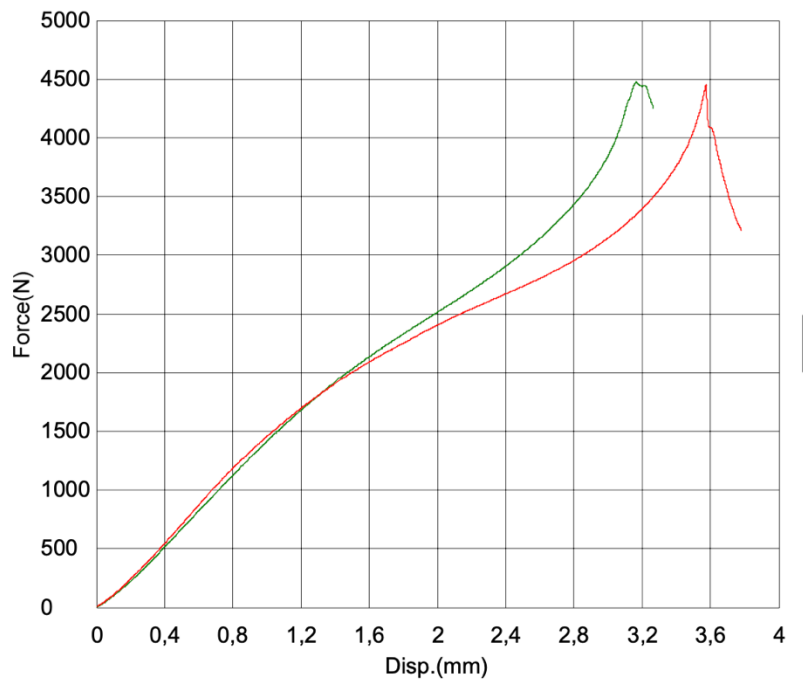


Figura 8

REIVINDICAÇÕES

1. PROCESSO DE PRODUÇÃO DE SUPERFÍCIE ARTICULAR DE PRÓTESES FEITAS DE POLIETILENO DE ALTA MASSA MOLAR (UHMWPE) MODIFICADAS COM ÓXIDO DE GRAFENO **caracterizado por** incorporar 1% (m/m) de óxido de grafeno a malha de polietileno de alta massa molar (UHMWPE) com vitamina E por meio da modificação da temperatura e pressão, a seco, da mistura dos pós de UHMWPE com vitamina E e de óxido de grafeno, excluindo o emprego de solventes tóxicos, e por meio das seguintes etapas:

- A. Síntese do óxido de grafite a partir de grafite expandido;
- B. Esfoliação do óxido de grafite para óxido de grafeno em processador ultrassônico (2h, modo pulsado, 150 W);
- C. Centrifugação da suspensão de óxido de grafeno a 8000 rpm por 30 min.;
- D. Purificação do óxido de grafeno por diálise, utilizando membrana de celulose regenerada, corte de massa molar 12.000 g/mol, e água destilada como meio dialisante, trocando-se a água dialisada diariamente, por 7 dias;
- E. Liofilização da suspensão dialisada de óxido de grafeno por 7 dias;
- F. Peneiramento do óxido de grafeno sólido em peneira de aço inox malha 65 TY;
- G. Pesagem de óxido de grafeno em pó e de UHMWPE com vitamina E na proporção de 1% (m/m);

- H. Mistura mecânica dos dois materiais em tubo falcon 50 mL com agitador Vortex por 2 min.;
- I. Prensagem a frio com pressão de 10 MPa;
- J. Aquecimento da mistura até a temperatura de 205°C.
- K. USO DE PRÓTESE ARTICULAR COMPOSTA DE POLIETILENO DE ALTO PESO MOLECULAR MODIFICADO COM ÓXIDO DE GRAFENO POR TERMOPRENSAGEM **caracterizado por** poder ser aplicado como próteses articulares em diversas articulações tais como quadril, joelho, ombro entre outras, apresentando atividade antimicrobiana e menor toxicidade por não empregar qualquer tipo de solvente.

5 CONCLUSÃO

A prótese de UHMWPE com GO foi produzida com sucesso. Por causa do seu processo de produção ser considerado inovador, foi depositado uma patente pelo NUPITEC junto ao INPI. Dentro dos objetivos e hipóteses apresentadas nessa tese, podemos concluir que:

1. Os experimentos *in vitro* mostram que os pós não apresentam toxicidade relevante, com as concentrações utilizadas, para os macrófagos RAW 264.7, mas podem apresentar toxicidade para a *Candida tropicalis*, dependendo da concentração;
2. A nova prótese com novas características foi produzida com sucesso;
3. A prótese com GO e UHMWPE mostrou ser mais resistente que a prótese de UHMWPE disponível comercialmente;
4. Prótese de UHMWPE-GO aumentou a proliferação dos fibroblastos Humanos (L132)

Portanto, modificando a prótese comercial de UHMWPE, incorporando GO, foi possível produzir uma prótese com características antimicrobianas e com uma resistência maior. Esses resultados indicam o potencial das próteses para uma melhor adesão celular e biocompatibilidade, características cruciais para uma integração efetiva em sistemas biológicos como o osso, o tecido conjuntivo e a cartilagem. Em conjunto, esses resultados são promissores com próteses UHMWPE-GO em aplicações médicas, oferecendo um melhor desempenho e biocompatibilidade. Estudos futuros devem avaliar a UHMWPE-GO com o aparato de titânio em próteses articulares e seguindo a ISO 10993.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Ismail, Z., et al., *The impact of population ageing: A review*. Iranian journal of public health, 2021. **50**(12): p. 2451.
2. Ghouri, A., et al., *The relationship between meniscal pathologies, cartilage loss, joint replacement and pain in knee osteoarthritis: a systematic review*. Osteoarthritis and Cartilage, 2022. **30**(10): p. 1287-1327.
3. Niezen, E., et al., *Temporomandibular joint prosthesis as treatment option for mandibular condyle fractures: a systematic review and meta-analysis*. International journal of oral and maxillofacial surgery, 2023. **52**(1): p. 88-97.
4. Puértolas, J. and S. Kurtz, *Evaluation of carbon nanotubes and graphene as reinforcements for UHMWPE-based composites in arthroplastic applications: A review*. Journal of the mechanical behavior of biomedical materials, 2014. **39**: p. 129-145.
5. Sharma, V., et al., *Six decades of UHMWPE in reconstructive surgery*. International Materials Reviews, 2023. **68**(1): p. 46-81.
6. Slouf, M., et al., *European Database of Explanted UHMWPE Liners from Total Joint Replacements: Correlations among Polymer Modifications, Structure, Oxidation, Mechanical Properties and Lifetime In Vivo*. Polymers, 2023. **15**(3): p. 568.
7. Li, X., et al., *Photoluminescent carbon dots (PCDs) from sour apple: A biocompatible nanomaterial for preventing UHMWPE wear-particle induced osteolysis via modulating Chemerin/ChemR23 and SIRT1 signaling pathway and its bioimaging application*. Journal of Nanobiotechnology, 2022. **20**(1): p. 301.
8. Amurin, L.G., et al., *Multifunctionality in ultra high molecular weight polyethylene nanocomposites with reduced graphene oxide: Hardness, impact and tribological properties*. Polymer, 2022. **240**: p. 124475.
9. Azizi-Lalabadi, M., et al., *Carbon nanomaterials against pathogens; the antimicrobial activity of carbon nanotubes, graphene/graphene oxide, fullerenes, and their nanocomposites*. Advances in Colloid and Interface Science, 2020. **284**: p. 102250.
10. Pang, W., et al., *Graphene oxide enhanced, radiation cross-linked, vitamin E stabilized oxidation resistant UHMWPE with high hardness and tensile properties*. RSC advances, 2017. **7**(87): p. 55536-55546.
11. Lanfranconi, M., A. Vázquez, and V. Alvarez, *Modification of snowboard base material and its effect over the adhesion to epoxy/glass fibre core*. Sports Engineering, 2012. **15**: p. 189-195.
12. Cao, M., et al., *Effect of the temperature on ballistic performance of UHMWPE laminate with limited thickness*. Composite Structures, 2021. **277**: p. 114638.
13. Liu, Z., et al., *Mechanism of boron carbide particles improving the wear resistance of UHMWPE: Structure-property relationship*. Polymer, 2022. **245**: p. 124733.
14. Gürgen, S., *Wear behavior of UHMWPE composites under oxidative effect*. Polymer Degradation and Stability, 2022. **199**: p. 109912.
15. Perni, S., B. Bojan, and P. Prokopovich, *A retrospective study of risk factors, causative micro-organisms and healthcare resources consumption associated with prosthetic joint infections (PJI) using the Clinical Practice Research Datalink (CPRD) Aurum database*. PLoS One, 2023. **18**(3): p. e0282709.

16. Hasegawa, M., et al., *Ultra-high-molecular-weight polyethylene in hip and knee arthroplasties*. Materials, 2023. **16**(6): p. 2140.
17. Tai, Z., et al., *Tribological behavior of UHMWPE reinforced with graphene oxide nanosheets*. Tribology Letters, 2012. **46**: p. 55-63.
18. Qiu, Y., et al., *Antioxidant chemistry of graphene-based materials and its role in oxidation protection technology*. Nanoscale, 2014. **6**(20): p. 11744-11755.
19. Pang, W., et al., *Investigation of tribological properties of graphene oxide reinforced ultrahigh molecular weight polyethylene under artificial seawater lubricating condition*. Applied Surface Science, 2018. **434**: p. 273-282.
20. Chen, Y., et al., *Preparation, mechanical properties and biocompatibility of graphene oxide/ultrahigh molecular weight polyethylene composites*. European Polymer Journal, 2012. **48**(6): p. 1026-1033.
21. Chen, X., et al., *Design and characterization of the surface porous UHMWPE composite reinforced by graphene oxide*. Polymers, 2021. **13**(4): p. 482.
22. Sun, L. and B. Fugetsu, *Mass production of graphene oxide from expanded graphite*. Materials Letters, 2013. **109**: p. 207-210.
23. Edwards, D., et al., *Advantages of Beam Deceleration for Low kV EDS Analysis*. Microscopy and Microanalysis, 2015. **21**(S3): p. 681-682.
24. Rowe, M.C. and B.J. Brewer, *AMORPH: A statistical program for characterizing amorphous materials by X-ray diffraction*. Computers & Geosciences, 2018. **120**: p. 21-31.
25. Subrati, A., et al., *Synthesis and Characterization of Electrochemically-oxidized Amine-functionalized Graphite Framework Materials*. Carbon, 2021. **176**: p. 327-338.
26. Bistolfi, A., et al., *Ultra-high molecular weight polyethylene (UHMWPE) for hip and knee arthroplasty: The present and the future*. Journal of orthopaedics, 2021. **25**: p. 98-106.
27. Patil, N.A., J. Njuguna, and B. Kandasubramanian, *UHMWPE for biomedical applications: Performance and functionalization*. European polymer journal, 2020. **125**: p. 109529.
28. Amarista, F.J., L.G. Mercuri, and D. Perez, *Temporomandibular joint prosthesis revision and/or replacement survey and review of the literature*. Journal of Oral and Maxillofacial Surgery, 2020. **78**(10): p. 1692-1703.
29. Kadhim, T.R., J.K. Oleiwi, and Q.A. Hamad, *Improving the Biological properties of UHMWPE biocomposite for orthopedic applications*. International Journal of Biomaterials, 2023. **2023**(1): p. 4219841.
30. Xu, J., N. Li, and Y. Zhu, *Preparation of fiber core support UHMWPE/SiO₂ composite hollow fiber membrane toward enhancing structure stability and antifouling*. Polymer Engineering & Science, 2022. **62**(2): p. 472-485.
31. Kumar, V., et al., *Design of cost-effective hybrid soft armour panels by strategic replacement of backing layers with a non-ballistic material: A parametric study*. International Journal of Impact Engineering, 2023. **180**: p. 104678.
32. Song, Q., et al., *The structure and properties of polyethylene oxide reinforced poly (metaphenylene isophthalamide) fibers*. Advanced Fiber Materials, 2022: p. 1-12.
33. Danilova, S.N., et al., *UHMWPE/CaSiO₃ nanocomposite: Mechanical and tribological properties*. Polymers, 2021. **13**(4): p. 570.
34. Shiv, J.K., K. Kumar, and S. Jayapalan, *Recent advances in tribological properties of silicon based nanofillers incorporated polymer nanocomposites*. Materials Today: Proceedings, 2023. **92**: p. 1231-1239.

35. Tai, Z., et al., *Tribological Behavior of UHMWPE Reinforced with Graphene Oxide Nanosheets*. Tribology Letters, 2012. **46**(1): p. 55-63.
36. Bhattacharyya, A., S. Chen, and M. Zhu, *Graphene reinforced ultra high molecular weight polyethylene with improved tensile strength and creep resistance properties*. eXPRESS Polymer Letters, 2014. **8**: p. 74.
37. Papageorgiou, D.G., I.A. Kinloch, and R.J. Young, *Mechanical properties of graphene and graphene-based nanocomposites*. Progress in Materials Science, 2017. **90**: p. 75-127.
38. Stürzel, M., et al., *Novel Graphene UHMWPE Nanocomposites Prepared by Polymerization Filling Using Single-Site Catalysts Supported on Functionalized Graphene Nanosheet Dispersions*. Macromolecules, 2012. **45**(17): p. 6878-6887.
39. Alam, F., et al., *Electrical, mechanical and thermal properties of graphene nanoplatelets reinforced UHMWPE nanocomposites*. Materials Science and Engineering: B, 2019. **241**: p. 82-91.
40. Dermeneva, M., et al., *X-Ray analysis of compacted and sintered UHMWPE reactor powders*. Journal of Physics: Conference Series, 2018. **1038**(1): p. 012058.
41. Hassel, O. and H. Mark, *Über die Kristallstruktur des Graphits*. Zeitschrift für Physik, 1924. **25**(1): p. 317-337.
42. Subrati, A., et al., *The impact of oxygen-clustering on the transformation of electrochemically-derived graphite oxide framework*. Carbon, 2024. **217**: p. 118641.
43. Bollen, C.M.L., et al., *The influence of abutment surface roughness on plaque accumulation and peri-implant mucositis*. Clinical Oral Implants Research, 1996. **7**(3): p. 201-211.
44. Biniak, S., et al., *The characterization of activated carbons with oxygen and nitrogen surface groups*. Carbon, 1997. **35**(12): p. 1799-1810.
45. Panin, S.V., et al., *Two-component feedstock based on ultra-high molecular weight polyethylene for additive manufacturing of medical products*. Advanced Industrial and Engineering Polymer Research, 2021. **4**(4): p. 235-250.
46. Nejatbakhsh, S., et al., *Improvement of the Bioactivity of UHMWPE by Two Different Atmospheric Plasma Treatments*. Plasma Chemistry and Plasma Processing, 2021. **41**(1): p. 245-264.
47. Ivan'kova, E., et al., *Morphological Transformation in Polymer Composite Materials Filled with Carbon Nanoparticles: Part 1.—SEM and XRD Investigations*. Materials, 2022. **15**(10).
48. Tao, G., et al., *Exploring the entangled state and molecular weight of UHMWPE on the microstructure and mechanical properties of HDPE/UHMWPE blends*. Journal of Applied Polymer Science, 2021. **138**(30): p. 50741.
49. Prokhorov, K.A., et al., *Raman Spectroscopy of Novel UHMW Polyethylene-Based Nanocomposites with Nanographite and Nanoclay*. Journal of Physics: Conference Series, 2018. **999**(1): p. 012001.
50. Subrati, A., et al., *Developing Hydrophobic Graphene Foam for Oil Spill Cleanup*. Industrial & Engineering Chemistry Research, 2017. **56**(24): p. 6945-6951.
51. Strobl, G.R. and W. Hagedorn, *Raman spectroscopic method for determining the crystallinity of polyethylene*. Journal of Polymer Science: Polymer Physics Edition, 1978. **16**(7): p. 1181-1193.

52. Sze, S.K., et al., *Raman spectroscopic characterization of carbonaceous aerosols*. Atmospheric Environment, 2001. **35**(3): p. 561-568.
53. Sadezky, A., et al., *Raman microspectroscopy of soot and related carbonaceous materials: Spectral analysis and structural information*. Carbon, 2005. **43**(8): p. 1731-1742.
54. Alkhouzaam, A., et al., *Synthesis of graphene oxides particle of high oxidation degree using a modified Hummers method*. Ceramics International, 2020. **46**(15): p. 23997-24007.
55. Jorio, A., et al., *Front Matter*, in *Raman Spectroscopy in Graphene Related Systems*. 2011, Wiley.
56. Vollebregt, S., et al., *Influence of the growth temperature on the first and second-order Raman band ratios and widths of carbon nanotubes and fibers*. Carbon, 2012. **50**(10): p. 3542-3554.
57. Smith, M.W., et al., *Structural analysis of char by Raman spectroscopy: Improving band assignments through computational calculations from first principles*. Carbon, 2016. **100**: p. 678-692.
58. Lui, C.H., et al., *Observation of layer-breathing mode vibrations in few-layer graphene through combination raman scattering*. Nano Letters, 2012. **12**(11): p. 5539-5544.
59. Eckmann, A., et al., *Probing the Nature of Defects in Graphene by Raman Spectroscopy*. Nano Letters, 2012. **12**(8): p. 3925-3930.
60. Kumar, P.V., et al., *New insights into the thermal reduction of graphene oxide: Impact of oxygen clustering*. Carbon, 2016. **100**: p. 90-98.
61. Subrati, A., E. Gutiérrez-Pineda, and S.E. Moya, *To-pack or Not-to-pack: Towards Improved Graphite Electrochemical Oxidation Through Electrode Design*. ChemPlusChem, 2024. **n/a**(n/a): p. e202400265.
62. Najar, A., et al., *Supraphysiologic glucocorticoid administration increased biomechanical bone strength of rats' vertebral body*. Laboratory Animal Research, 2015. **31**(4): p. 180-187.
63. Goharian, A., S.S.R. Koloor, and M.R. Abdullah, *5 - Biomechanical Evaluation Methods*, in *Trauma Plating Systems*, A. Goharian, Editor. 2017, Elsevier. p. 65-87.
64. Hun, D.-A., et al., *Stochastic multiscale modeling of crack propagation in random heterogeneous media*. International Journal for Numerical Methods in Engineering, 2019. **119**(13): p. 1325-1344.
65. Liu, J., et al., *Stress Evolution in Punch-Through Shear Tests: A Numerical Study Based on Discrete Element Method*. Frontiers in Physics, 2020. **8**.
66. Zhang, X.-F. and S. Gurunathan, *Biofabrication of a novel biomolecule-assisted reduced graphene oxide: an excellent biocompatible nanomaterial*. International Journal of Nanomedicine, 2016: p. 6635-6649.
67. Wang, F., et al., *Graphene oxide framework structures and coatings: impact on cell adhesion and pre-vascularization processes for bone grafts*. International journal of molecular sciences, 2022. **23**(6): p. 3379.
68. Jeong, J.-T., et al., *Effect of graphene oxide ratio on the cell adhesion and growth behavior on a graphene oxide-coated silicon substrate*. Scientific reports, 2016. **6**(1): p. 33835.
69. Aryaei, A., A.H. Jayatissa, and A.C. Jayasuriya, *The effect of graphene substrate on osteoblast cell adhesion and proliferation*. Journal of Biomedical Materials Research Part A, 2014. **102**(9): p. 3282-3290.

70. Ohashi, K., S. Fujiwara, and K. Mizuno, *Roles of the cytoskeleton, cell adhesion and rho signalling in mechanosensing and mechanotransduction*. The journal of biochemistry, 2017. **161**(3): p. 245-254.
71. Cronin, N.M. and K.A. DeMali, *Dynamics of the actin cytoskeleton at adhesion complexes*. Biology, 2021. **11**(1): p. 52.
72. Parsons, J.T., A.R. Horwitz, and M.A. Schwartz, *Cell adhesion: integrating cytoskeletal dynamics and cellular tension*. Nature reviews Molecular cell biology, 2010. **11**(9): p. 633-643.
73. Chen, S., et al., *Roles of focal adhesion proteins in skeleton and diseases*. Acta Pharmaceutica Sinica B, 2023. **13**(3): p. 998-1013.
74. Bhusari, S.A., et al., *HDPE/UHMWPE hybrid nanocomposites with surface functionalized graphene oxide towards improved strength and cytocompatibility*. Journal of the Royal Society Interface, 2019. **16**(150): p. 20180273.
75. Mamidi, N., et al., *Cytotoxicity evaluation of unfunctionalized multiwall carbon nanotubes-ultrahigh molecular weight polyethylene nanocomposites*. Journal of Biomedical Materials Research Part A, 2017. **105**(11): p. 3042-3049.
76. Litowczenko, J., et al., *Micro/nano-patterns for enhancing differentiation of human neural stem cells and fabrication of nerve conduits via soft lithography and 3d printing*. Biomaterials Advances, 2023. **154**: p. 213653.
77. Shin, S.R., et al., *Graphene-based materials for tissue engineering*. Advanced drug delivery reviews, 2016. **105**: p. 255-274.
78. Li, N., et al., *Three-dimensional graphene foam as a biocompatible and conductive scaffold for neural stem cells*. Scientific reports, 2013. **3**(1): p. 1604.
79. Ławkowska, K., et al., *Application of graphene in tissue engineering of the nervous system*. International Journal of Molecular Sciences, 2021. **23**(1): p. 33.
80. Shi, L., et al., *The antibacterial applications of graphene and its derivatives*. Small, 2016. **12**(31): p. 4165-4184.
81. Wijaya, M., R. Halleyantoro, and J.F. Kalumpiu, *Biofilm: The invisible culprit in catheter-induced candidemia*. AIMS microbiology, 2023. **9**(3): p. 467.
82. Bouza, E., J. Guinea, and M. Guembe, *The role of antifungals against Candida biofilm in catheter-related candidemia*. Antibiotics, 2014. **4**(1): p. 1-17.
83. Das, K.H., V. Mangayarkarasi, and M. Sen, *Antifungal resistant in non-albicans candida species are emerging as a threat to antenatal women with vulvovaginal candidiasis*. Biomedical and Pharmacology Journal, 2019. **12**(2): p. 1369-1378.
84. Keighley, C., et al., *Candida tropicalis—A systematic review to inform the World Health Organization of a fungal priority pathogens list*. Medical Mycology, 2024. **62**(6): p. myae040.
85. Yong, L.X., et al., *Fungal Attachment-Resistant Polymers for the Additive Manufacture of Medical Devices*. ACS Applied Materials & Interfaces, 2024. **16**(40): p. 54508-54519.
86. Mishra, A., A. Aggarwal, and F. Khan, *Medical device-associated infections caused by biofilm-forming microbial pathogens and controlling strategies*. Antibiotics, 2024. **13**(7): p. 623.
87. Ching, H.A., et al., *Effects of surface coating on reducing friction and wear of orthopaedic implants*. Science and technology of advanced materials, 2014. **15**(1): p. 014402.

7 PRINCIPAIS ATIVIDADES ACADÊMICAS DESENVOLVIDAS DURANTE O DOUTORADO

1. Realização do curso “Assistente de Controle de Qualidade” no SENAI;
2. Realização do curso “How to Submit a Journal Article and Get it Published”, da Karger;
3. Realização do curso “How to Write an Effective Research Paper” da Karger;
4. Realização do curso “Controle Microbiológico Industrial Aplicado Em Processo De Fermentação Etanólica” da UNIOESTE;
5. Realização do curso “COVID-19 Manejo da infecção causada pelo novo coronavírus” da Fundação Oswaldo Cruz, FIOCRUZ, Brasil;
6. Realização do curso “Uso da Propriedade Intelectual em Negócios de Base Tecnológica” do Instituto Nacional da Propriedade Industrial (INPI);
7. Realização do curso “Indicações Geográficas e Marcas Coletivas” do INPI;
8. Realização do curso “Software: como e por que registrar” do INPI;
9. Realização do curso “Curso Geral De Propriedade Intelectual” da Organização Mundial de Propriedade Intelectual (OMPI);
10. Realização do curso “Uso da Propriedade Intelectual em Negócios de Base Tradicional.” do INPI;
11. Realização do curso “Open Innovation” da *Harvard Business School Online*;
12. Realização do curso “Gerenciamento de projetos na prática” da Escola Nacional de Administração Pública (ENAP)
13. Realização do curso “Propriedade Intelectual e os Objetivos de Desenvolvimento Sustentável” da OMPI em parceria com *el Instituto Mexicano de la Propiedad Industrial (IMPI) y la Universidad Autónoma de Nuevo León (UANL)*;
14. Revisor *ad hoc* de artigos científicos da “Springer Nature” e outros;
15. Publicação de artigos e livros nacionais e internacionais durante o doutorado, com destaque para estes:
<http://doi.org/10.2174/0113816128316870240610045550>;
doi.org/10.3390/ph16070943;
<https://doi.org/10.3390/pharmaceutics14010196>;
<https://doi.org/10.3390/nano12101683>; <https://doi.org/10.2217/nnm-2020-0201>.
16. Membro de conselho editorial de livro científico;

17. Apresentação de trabalho em congressos nacionais e internacionais, com destaque para o “CRS 2022 Annual Meeting & Expo”, Montreal, Canada, “8th International Conference on Biomedical Engineering and Applications”, Tóquio, Japão e “8th Annual Nanotechnology Conference”, Viena, Áustria;
18. Visita técnica científica no CICBiomaGUNE em San Sebastián, Espanha, para a realização de experimentos do doutorado;
19. Pesquisador do Centro de Apoio ao Desenvolvimento Científico Tecnológico (CDT) da Universidade de Brasília, auxiliando em processos de proteção de propriedade intelectual junto ao INPI e ao Sistema Eletrônico de Informações (SEI) da UnB;
20. Entrevista dada ao Correio Braziliense:
<https://unbciencia.unb.br/biologicas/742-tecnologia-desenvolvida-na-unb-aprimora-proteses-faciais>.