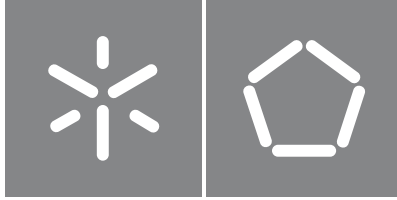




Universidade do Minho
Escola de Engenharia

Susana da Costa Gomes

**Filamentos compósitos de
grafeno/poli(ácido láctico) para impressão
3D de *scaffolds* para regeneração de
ligamentos**



Universidade do Minho

Escola de Engenharia

Susana da Costa Gomes

Filamentos compósitos de grafeno/poli(ácido láctico) para impressão 3D de *scaffolds* para regeneração de ligamentos

Dissertação de Mestrado

Mestrado Integrado em Engenharia de Polímeros

Trabalho efetuado sob a orientação de:

Professora Doutora Maria da Conceição de Jesus Rego Paiva

Professora Doutora Natália Araújo Alves

Despacho RT - 31 /2019 - Anexo 3

DIREITOS DE AUTOR E CONDIÇÕES DE UTILIZAÇÃO DO TRABALHO POR TERCEIROS

Este é um trabalho académico que pode ser utilizado por terceiros desde que respeitadas as regras e boas práticas internacionalmente aceites, no que concerne aos direitos de autor e direitos conexos.

Assim, o presente trabalho pode ser utilizado nos termos previstos na licença abaixo indicada.

Caso o utilizador necessite de permissão para poder fazer um uso do trabalho em condições não previstas no licenciamento indicado, deverá contactar o autor, através do RepositóriUM da Universidade do Minho.



**Atribuição-NãoComercial-Compartilhalgual
CC BY-NC-SA**

<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/>

Agradecimentos

Com a conclusão deste trabalho, só me resta agradecer a todos as pessoas que me ajudaram nesta conquista.

Em primeiro lugar, quero agradecer à professora Conceição Paiva e à professora Natália Alves por toda a disponibilidade e ajuda prestadas ao longo de toda a realização do projeto.

Um enorme agradecimento à Magda, pelo companheirismo, pela aprendizagem, pela ajuda e orientação ao longo desta experiência. Estou muito grata pela tua motivação, empatia e confiança.

Os meus amigos foram sem dúvida uma ajuda imprescindível para concluir esta etapa, e por eles sou eternamente grata e agradeço tudo o que fizeram por mim.

Quero agradecer do fundo do coração aos meus pais e irmã, por todo o apoio e incentivo durante estes 5 anos na universidade, pois sem eles nada disto seria possível.

Despacho RT - 31 /2019 - Anexo 4

DECLARAÇÃO DE INTEGRIDADE

Declaro ter atuado com integridade na elaboração do presente trabalho académico e confirmo que não recorri à prática de plágio nem a qualquer forma de utilização indevida ou falsificação de informações ou resultados em nenhuma das etapas conducente à sua elaboração.

Mais declaro que conheço e que respeitei o Código de Conduta Ética da Universidade do Minho.

Resumo

O ligamento cruzado anterior (LCA) é o ligamento mais frequentemente sujeito a lesões, com difícil recuperação devido à insuficiente vascularização, sendo necessário uma intervenção cirúrgica para recuperar as funções do joelho. As abordagens atuais para o tratamento incluem enxertos, no entanto este tipo de cirurgia apresenta várias limitações tais como a elevada taxa de recorrência e o facto dos tecidos reparados serem mecanicamente inferiores aos tecidos nativos. A engenharia de tecidos pretende resolver estes problemas, produzindo suportes artificiais (*scaffolds*) para regeneração do LCA em condições laboratoriais, com o potencial de transplante e com uma elevada taxa de sucesso.

No presente trabalho foram desenvolvidos filamentos compósitos baseados em poli (ácido láctico) (PLA) e em três tipos de reforço: grafite exfoliada (EG), grafite exfoliada funcionalizada (f-EG) e grafite exfoliada funcionalizada com adição de nanopartículas de prata (f-EG + Ag). A funcionalização da grafite foi efetuada através da reação de cicloadição 1,3-dipolar de um íleto de azometina. As nanopartículas de prata (Ag) foram ancoradas na grafite exfoliada funcionalizada, dado crescerem de forma controlada na presença dos grupos funcionais ligados à EG. Os filamentos nanocompósitos foram produzidos por extrusão, usando uma extrusora de duplo fuso co-rotativo. Os filamentos apresentam 1.75 mm de diâmetro, e foram usados posteriormente para o fabrico de *scaffolds* por impressão 3D, para potencial aplicação na regeneração do LCA. Foram processados diferentes filamentos compósitos: filamento de PLA, filamento de PLA+0,5% EG, filamento de PLA + 0,5% f-EG e filamento com PLA + 0,5% [(f-EG) + Ag]. A morfologia, propriedades térmicas, elétricas e mecânicas de todos os filamentos produzidos foram avaliadas.

As propriedades térmicas dos filamentos produzidos foram melhoradas e a dispersão dos reforços na matriz polimérica foi alcançada, de acordo com os resultados obtidos. Não houve alterações significativas das propriedades elétricas e mecânicas dos filamentos com a adição de grafite exfoliada.

Palavras-chave: Engenharia de Tecidos, LCA, PLA, Grafeno, *Scaffold*

Abstract

The anterior cruciate ligament (ACL) is the ligament most frequently injured, with difficult recovery due to insufficient vascularisation, requiring surgical intervention to restore knee function. Current approaches to treatment include grafts, but this type of surgery has several limitations, such as a high recurrence rate and the fact that repaired tissues are mechanically inferior to native tissues. Tissue engineering aims to solve these problems by producing artificial supports (scaffolds) for ACL regeneration under laboratory conditions, with the potential for transplantation and a high success rate.

In the present work, composite filaments based on poly (lactic acid) (PLA) and on three types of reinforcement were developed: exfoliated graphite (EG), functionalized exfoliated graphite (f-EG) and functionalized exfoliated graphite with addition of silver nanoparticles (f-EG + Ag). The graphite functionalisation was carried out through the 1,3-dipolar cycloaddition reaction of an azomethine ilet. The silver (Ag) nanoparticles were anchored to the exfoliated functionalised graphite as they grew in a controlled manner in the presence of the EG-bound functional groups. The nanocomposite filaments were produced by extrusion, using a co-rotating twin-screw extruder. The filaments are 1.75 mm in diameter and were subsequently used to fabricate scaffolds by 3D printing for potential application in ACL regeneration. Different composite filaments were processed: PLA filament, PLA+0.5% EG filament, PLA + 0.5% f-EG filament and filament with PLA + 0.5% [(f-EG) + Ag]. The morphology, thermal, electrical and mechanical properties of all the produced filaments were evaluated.

The thermal properties of the produced filaments were improved and the dispersion of the reinforcements in the polymeric matrix was achieved, according to the results obtained. There were no significant changes in the electrical and mechanical properties of the filaments with the addition of exfoliated graphite.

Keywords: Tissue engineering, ACL, PLA, Graphene, Scaffold

Índice

Agradecimentos.....	ii
Resumo.....	iv
Abstract.....	v
Índice de Figuras.....	viii
Índice de Tabelas.....	ix
1. Introdução.....	2
1.1. Motivação.....	2
1.2. Esquema da dissertação.....	4
2. Estado de arte.....	6
2.1. Ligamento Cruzado Anterior.....	6
2.2. Scaffolds para a regeneração do ligamento.....	8
2.3. Materiais para a produção de <i>scaffolds</i> para a regeneração de ligamentos.....	10
2.3.1. Poli(ácido láctico).....	10
2.3.2. Grafite.....	13
2.3.3. Exfoliação da grafite.....	14
2.3.4. Grafeno.....	15
2.3.5. Funcionalização do grafeno e derivados.....	17
2.3.6. Decoração do grafeno com nanopartículas de prata.....	19
2.4. Processo de extrusão.....	20
2.5. Fabrico de <i>scaffolds</i> por impressão 3D.....	22
3. Materiais e Métodos.....	25
3.1. Preparação de grafite exfoliada funcionalizada.....	25
3.2. Preparação de grafite exfoliada funcionalizada com adição de nanopartículas de prata.....	26
3.3. Mistura do poliácido láctico com os reforços.....	26
3.4. Produção dos filamentos compósitos.....	27

3.5.	Caracterização dos filamentos	30
3.6.	Impressão 3D	36
4.	Discussão de Resultados.....	39
4.1.	Caracterização estrutural da superfície do poliácido láctico com grafite	39
4.1.1.	Microscopia Eletrônica de Varrimento (SEM)	39
4.2.	Caracterização macroscópica dos filamentos	41
4.3.	Caracterização estrutural dos filamentos.....	42
4.3.1.	Microscopia Ótica	42
4.3.2.	Microscopia Eletrônica de Varrimento (SEM)	45
4.3.3.	Microscopia Raman	46
4.3.4.	Análise Termogravimétrica (TGA)	47
4.3.5.	Calorimetria Diferencial de Varrimento (DSC)	50
4.3.6.	Análise Mecânica Dinâmica (DMA)	52
4.3.7.	Resistividade Elétrica	55
4.4.	Caracterização Macroscópica dos <i>Scaffolds</i>	56
5.	Conclusão.....	60
5.1.	Trabalho futuro.....	61
6.	Referências.....	62

Índice de Figuras

Figura 1: Comparação entre o tratamento clássico e o tratamento de engenharia de tecidos para a regeneração do ligamento. Adaptado de [8].	3
Figura 2: Imagem ilustrativa da rutura do ligamento cruzado anterior. Adaptado de [12].	6
Figura 3: Estrutura química do PLA [17].	10
Figura 4: Isómeros de ácido láctico. a) D-láctico b) D-L-láctico c) L-láctico [26].	11
Figura 5: Principais tipos de polimerização a partir do ácido láctico [27].	11
Figura 6: Estrutura cristalina de grafite indicando a separação das camadas e dos átomos. [34].	13
Figura 7: Ilustração esquemática da exfoliação da grafite para a formação de nanoplaquetas de grafeno. Adaptada de [38].	15
Figura 8: Estrutura ilustrativa do grafeno. [42].	16
Figura 9: Produção de GNP a partir de grafite natural por exfoliação na fase líquida. [46]	16
Figura 10: Representação esquemática ciclo adição dipolar 1,3 [42].	18
Figura 11: Protótipo da extrusora de duplo fuso co-rotativo. [16]	21
Figura 12: Diagrama esquemático do processo FDM. Adaptada de [67].	22
Figura 13: Propriedades físicas do scaffold de PLA em forma de parafuso. (A) Estrutura teórica 3D do scaffold em forma de parafuso. (B) O scaffold de PLA produzido. (C) A imagem SEM da superfície do scaffold de PLA com estrutura ortogonal bem definida. [74]	23
Figura 14: Reação de cicloadição 1,3-dipolar. Adaptado de [42].	25
Figura 15: Mistura do poliácido láctico com os respetivos reforços. a) EG, b) f-EG e c) f-EG + Ag	26
Figura 16: Parafusos duplos co-rotativos da extrusora Rondol Microlab.	28
Figura 17: Extrusora Rondol Microlab utilizada para a produção dos filamentos.	28
Figura 18: Espectros típicos de Raman para uma amostra de grafeno de camada única e grafite utilizando um laser de excitação de 532 nm. Adaptado de [82].	31
Figura 19: Esquema e funcionamento do SEM. Adaptado de [112].	33
Figura 20: Design do scaffold criado através do software numa perspetiva isométrica.	37
Figura 21 : Imagens de SEM da mistura do polímero com os respetivos reforços.	40
Figura 22: Filamentos compósitos: (a) PLA, (b) PLA+0,5% EG e (c) PLA+0,5% [(f-EG) + Ag]	41
Figura 23: Filamento de PLA e PLA + 0,5% EG, à escala macroscópica.	41
Figura 24: Filamento de PLA + 0,5% f-EG e PLA + 0,5% [(f-EG) + Ag], à escala macroscópica.	42
Figura 25: Imagens da microscopia ótica das secções dos filamentos.	43

Figura 26: Imagens de SEM dos filamentos compósitos.	45
Figura 27: Imagens SEM e análise EDS no filamento PLA + 0,5% [(f-EG) + Ag].....	46
Figura 28: Espectro de Raman dos filamentos compósitos e do filamento de PLA.	47
Figura 29: Perda de massa em função da temperatura.	48
Figura 30: Derivada da perda de massa em função da temperatura.	48
Figura 31: Resultados de DSC para (a) 1° aquecimento, (b) arrefecimento e (c) 2° aquecimento.	50
Figura 32: Módulo de armazenamento do PLA e dos filamentos compósitos em função da temperatura, na região da transição vítrea.	52
Figura 33: Fator de amortecimento do PLA e dos filamentos compósitos em função da temperatura, na região da transição vítrea.....	53
Figura 34: Módulo de armazenamento do PLA e dos filamentos compósitos a 37°C.	54
Figura 35: Scaffold de PLA produzido por impressão 3D.	56
Figura 36: Scaffold de PLA + 0,5% EG produzido por impressão 3D.....	57
Figura 37:Scaffold de PLA + 0,5% f-EG produzido por impressão 3D.....	57
Figura 38: Scaffold de PLA + 0,5% [(f-EG) + Ag] produzido por impressão 3D.....	58

Índice de Tabelas

Tabela 1: Diferenças baseadas no sexo nas propriedades estruturais e mecânicas do LCA [14,15].....	7
Tabela 2: Propriedades físicas dos principais polímeros biodegradáveis utilizados em aplicações biomédicas. [23][6]	9
Tabela 3: Propriedades do PLA: T_m (temperatura de fusão), T_g (temperatura de transição vítrea). T . Processo (temperatura de processamento), T_d (Temperatura de degradação) e Pd (Período de degradação a 50% ou 100% de massa perdida) [31]	12
Tabela 4: Propriedades das camadas de grafite paralelo ao plano e perpendicular ao plano (z-axis) [37][38]	14
Tabela 5: Propriedades do grafeno. [42]	17
Tabela 6: Condições de processamento para a produção dos filamentos.	29
Tabela 7: Análise estatística da secção transversal dos filamentos compósitos.....	44
Tabela 8: Temperatura de degradação e temperatura máxima de degradação dos filamentos.....	48
Tabela 9: Percentagem de reforço presente nos filamentos compósitos.....	49

Tabela 10: Propriedades térmicas dos filamentos durante o 1º aquecimento	51
Tabela 11: Propriedades térmicas dos filamentos durante o 2º aquecimento	51
Tabela 12: Valores medidos da resistência elétrica dos filamentos.....	55

Lista de Abreviaturas

A

ABS	Acrilonitrilo Butadieno Estireno
ACL	Anterior Cruciate Ligament
Ag	Prata
AgNPs	Silver Nanoparticles / Nanopartículas de Prata
Au	Ouro

C

CNT	Carbon Nanotubes / Nanotubos de Carbono
-----	---

D

DCA	1,3-Dipolar Cycloaddition Reaction / Reação de Ciclo Adição Dipolar 1,3
DMA	Dynamic Mechanical Analysis / Análise Mecânica Dinâmica
DMF	Dimetilformamida
DSC	Differential Scanning Calorimetry / Calorimetria Diferencial de Varrimento

E

E'	Módulo de Armazenamento
E''	Módulo de Perda
EDS	Energy Dispersive X-Ray Spectroscopy / Espetroscopia de Raios-X por Energia Dispersiva
EG	Grafite Exfoliada
EMA	European Medicines Agency / Agência Europeia do Medicamento
ES	Electrical Stimulation / Estimulação Elétrica

F

FDA	Food and Drug Administration
FDM	Fused Deposition Modeling / Modelação por Deposição do Fundido
f-EG	Grafite Exfoliada Funcionalizada

G

GIC	Graphite Intercalation Compound / Compostos de Intercalação de Grafite
GNP	Graphite Nanoplatelets / Nanoplaquetas de Grafite
GO	Graphene Oxide / Óxido de grafeno

L

LCA	Ligamento cruzado anterior
-----	----------------------------

M

MO	Microscopia Ótica
MPa	Mega Pascal

O

O	Oxigênio
---	----------

P

PCL	Poli (ϵ -caprolactona)
PDLA	Poli (ácido D-láctico)
PDLLA	Poli (ácido D, L-láctico)
PEG	Poli (etilenoglicol)
PGA	Poli (ácido glicólico)
PLA	Poliácido Láctico
PLGA	Poli (ácido(láctico-co-glicólico))
PLLA	Poli (ácido L-láctico)
PVA	Álcool Polivinílico

R

RGO	Reduced Graphene Oxide / Óxido de Grafeno Reduzido
-----	--

S

SEM Scanning Electron Microscopy / Microscópio Eletrônico de Varrimento

T

T_c Temperatura de Cristalização

TE Tissue Engineering / Engenharia de Tecidos

T_f Temperatura de Fusão

T_g Temperatura de Transição Vítrea

TGA Thermogravimetric Analysis / Análise Termogravimétrica

Símbolos

I Intensidade

R Resistência Elétrica

$\tan(\delta)$ Fator de Amortecimento

V Volt

ΔH_c Entalpia de Cristalização

ΔH_f Entalpia de Fusão

\mathcal{X} Grau de Cristalinidade

ΔH_{f0} Entalpia de Fusão Teórica

CAPÍTULO 1

INTRODUÇÃO

1. Introdução

Este capítulo apresenta a motivação do trabalho, assim como o conteúdo de cada capítulo desta dissertação.

1.1. Motivação

Os ligamentos são o tecido conjuntivo fibroso que liga osso a osso [1]. São importantes na transmissão de forças para evitar movimentos excessivos e aumentam a estabilidade das articulações [2,3]. Os ligamentos são frequentemente danificados durante o desporto e atividades rigorosas, e estão entre as lesões mais comuns no corpo, sendo particularmente comuns na população jovem e fisicamente ativa [4,5].

O ligamento cruzado anterior (LCA) é o ligamento intra-articular do joelho mais frequentemente lesionado [6]. A sua rotura pode causar instabilidade significativa, que subseqüentemente leva a lesões noutros ligamentos e ao desenvolvimento de doenças degenerativas das articulações [5].

Devido à cicatrização intrinsecamente fraca e vascularização limitada, as lesões do LCA não cicatrizam e é necessária a intervenção cirúrgica, envolvendo autoenxertos, aloenxertos, e enxertos sintéticos [7]. A estimativa mundial dos jovens fisicamente ativos que necessitam de cirurgia após uma lesão no joelho situa-se entre 17%-61% [8].

Estudos a longo prazo que avaliam as substituições tanto do autoenxerto como do aloenxerto têm tido taxas de sucesso superiores a 90% em termos de restauração da estabilidade do joelho, satisfação do paciente e regresso à atividade atlética plena [6]. Possuem uma boa resistência mecânica inicial e promovem a proliferação celular e o crescimento de novos tecidos [9]. Apesar destes excelentes resultados, complicações graves estão associadas ao uso do tecido do autoenxerto e do aloenxerto. As utilizações de aloenxertos incluem o risco de transmissão de doenças, infeção bacteriana, e a possibilidade de resposta imunogénica desencadeada no hospedeiro [6]. Para além disso, os autoenxertos requerem cirurgia adicional, morbidade do local doador, tempo de recuperação prolongado e dor [9].

A engenharia de tecidos é a aplicação de princípios biológicos, químicos e de engenharia para o desenvolvimento de substitutos para a reparação, substituição ou restauração da função do tecido [9]. As limitações existentes têm suscitado um interesse crescente em engenharia de tecidos para a reconstrução do LCA utilizando *scaffolds* que possam imitar tanto as suas propriedades biológicas como

a durabilidade mecânica dos tecidos nativos [6]. O *scaffold* ideal deve ser poroso, biocompatível, apresentar resistência mecânica suficiente para resistir a tensões mecânicas e degradar-se ao longo do tempo de forma a promover a formação do tecido do ligamento [6,7]. A Figura 1, apresenta um esquema ilustrativo do tratamento clássico e do tratamento de engenharia de tecidos para a regeneração do ligamento.

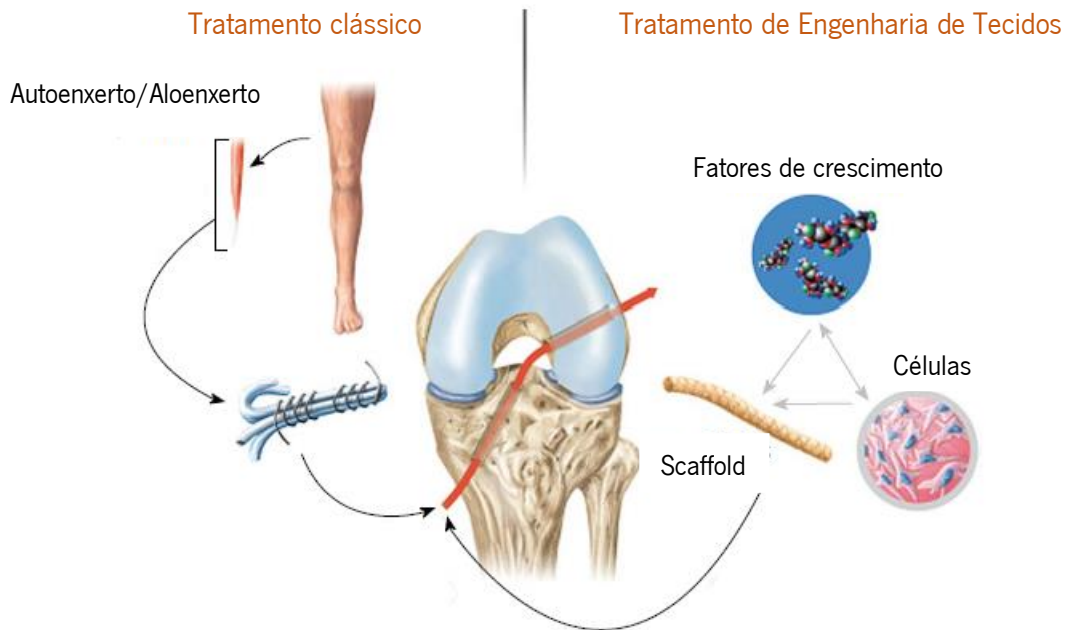


Figura 1: Comparação entre o tratamento clássico e o tratamento de engenharia de tecidos para a regeneração do ligamento. Adaptado de [8].

Vários materiais têm sido considerados para a produção de *scaffolds*, com intuito de regeneração do ligamento [6]. Polímeros naturais biodegradáveis, tais como a seda e o colagénio tipo I são frequentemente utilizados em engenharia de tecidos, no entanto possuem uma resistência mecânica inferior ao tecido nativo [4]. A investigação atual sobre LCA centrou-se na utilização de polímeros biológicos e sintéticos que são biocompatíveis e degradáveis, tais como o poli (ácido glicólico) (PGA), poli (ácido L-láctico) (PLLA), poli (ácido láctico-co-glicólico) (PLGA) e poli (ϵ -caprolactona) (PCL) [6][10]. Embora estes dispositivos sintéticos forneçam inicialmente as funções dos ligamentos que substituem, falham com o tempo porque não podem replicar o comportamento mecânico do ligamento [9].

O presente trabalho foca-se no desenvolvimento de filamentos compósitos baseados em poli (ácido láctico) (PLA) de *grade* médico e grafite exfoliada e funcionalizada pelo processo de extrusão, que possam ser posteriormente utilizados na produção de *scaffolds* para aplicação na regeneração do ligamento.

Espera-se que os compósitos apresentem propriedades mecânicas e térmicas melhoradas e que permitam efeitos elétricos locais que promovam a regeneração de tecidos.

1.2. Esquema da dissertação

Esta dissertação está dividida em cinco capítulos:

O **Capítulo 1** apresenta a motivação e a estrutura da dissertação.

No **Capítulo 2** é apresentada uma revisão geral nas propriedades e função do ligamento cruzado anterior (LCA), assim como os seus possíveis tratamentos em caso de rotura. Os materiais, as suas respetivas propriedades e a sua aplicação na área de biomédica é descrita. O método de impressão 3D para a produção de *scaffolds*, assim como o processamento dos filamentos através de extrusão também são abordadas neste capítulo.

O **Capítulo 3** descreve os materiais e métodos usados na produção da grafite exfoliada funcionalizada, na adição de nanopartículas de prata, no processamento de filamentos através de extrusão e também na produção de *scaffolds* por impressão 3D. Uma breve descrição das técnicas utilizadas para a caracterização dos filamentos também é apresentada.

O **Capítulo 4** reúne os resultados obtidos no âmbito desta dissertação assim como a sua análise.

O **Capítulo 5** foca-se nas principais conclusões e trabalhos futuros.

CAPÍTULO 2

ESTADO DE ARTE

2. Estado de arte

2.1. Ligamento Cruzado Anterior

Os ligamentos são o tecido conjuntivo fibroso que liga osso a osso [1]. Resistem a forças para evitar movimentos excessivos e aumentam a estabilidade das articulações [2]. Os ligamentos são frequentemente danificados durante o desporto e atividades rigorosas, e estão entre as lesões mais comuns no corpo, sendo particularmente comuns na população jovem e fisicamente ativa [4,5].

O ligamento cruzado anterior (LCA) é um dos quatro ligamentos principais do joelho, desempenhando um papel crítico na estabilização da articulação durante as atividades diárias de carga [11]. É o ligamento intra-articular do joelho mais frequentemente lesionado, a sua rutura pode causar instabilidade significativa, que subsequentemente leva a lesões noutros ligamentos e ao desenvolvimento de doenças degenerativas das articulações [5]. A Figura 2 representa a rutura do ligamento cruzado anterior.

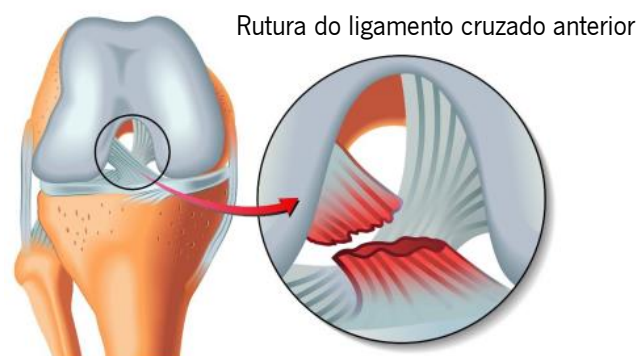


Figura 2: Imagem ilustrativa da rutura do ligamento cruzado anterior. Adaptado de [12].

Devido à cicatrização intrinsecamente fraca e vascularização limitada, o tecido nativo do LCA demonstra uma capacidade limitada de se reparar a si próprio e não cicatriza, sendo necessária a intervenção cirúrgica, envolvendo autoenxertos, aloenxertos, e enxertos sintéticos [7][11]. Porém, estas opções de tratamento não são fiáveis, uma vez que trazem certas complicações para o dador, tais como: tempo cirúrgico prolongado, dor e transmissão de doenças [4].

As desvantagens mencionadas têm suscitado um interesse crescente em engenharia de tecidos para a reconstrução do LCA para gerar estruturas que possam imitar as propriedades dos tecidos nativos [7][13].

Atualmente, a maior incidência de lesão do LCA é nas mulheres na faixa etária dos 14-17 anos (18-21 anos para os homens). Esta é também a população com a atual maior taxa de aumento das lesões do LCA. As diferenças baseadas no sexo nas taxas de lesões LCA estão bem estabelecidas, com as mulheres a sofrerem lesões relacionadas com o desporto 2-7 vezes mais frequentemente do que os homens [11]. Os fatores de risco que explicam o aumento da incidência de lesão do ligamento cruzado anterior em atletas do sexo feminino são geralmente classificados como anatómicos, neuromusculares e hormonais [14]. Hashemi et al. descobriram que os LCA femininos possuíam concentrações mais baixas de fibrilas e menor percentagem de área ocupada por fibrilas de colagénio em comparação com os LCA masculinos [11]. Na Tabela 1 estão representadas as diferenças baseadas no sexo nas propriedades estruturais e mecânicas do LCA.

Tabela 1: Diferenças baseadas no sexo nas propriedades estruturais e mecânicas do LCA [14,15]

	Homem	Mulher
Comprimento (mm)	29.61 ± 2.70	27.04 ± 2.90
Módulo de elasticidade (MPa)	128 ± 35	99 ± 50
Alongamento na rotura (mm)	8.95 ± 2.12	7.48 ± 2.26
Tensão de rotura (%)	30 ± 6	27 ± 8
Força de rotura (N)	1818 ± 699	1266 ± 577
Rigidez (N/mm)	309 ± 89	199 ± 88

Estas diferenças são frequentemente postas em causa pelo aumento da presença de hormonas específicas do sexo, que podem promover um LCA feminino mais instável, sendo a função articular ditada por múltiplos fatores estruturais, mecânicos, geométricos, de resistência e neuromusculares [11].

O *scaffold* é, portanto, um elemento-chave na engenharia de tecidos para a regeneração de ligamentos e os polímeros biodegradáveis são excelentes candidatos devido à sua versatilidade [13]. Para a substituição do LCA, além da biodegradabilidade, o *scaffold* ideal deve ser poroso, biocompatível, apresentar resistência mecânica adequada ao LCA e promover a formação do tecido do ligamento [7].

Além disso, as propriedades elétricas, mecânicas e térmicas do PLA podem ser melhoradas pela incorporação de nanopartículas, como por exemplo, desenvolvendo compósitos de PLA com nanotubos de carbono (CNT) em que são esperadas boas propriedades elétricas, mecânicas e térmicas, mesmo com baixo conteúdo de incorporação [16].

2.2. *Scaffolds* para a regeneração do ligamento

A engenharia de tecidos (TE) é altamente multidisciplinar e recorre a especialistas de medicina, engenharia, ciência dos materiais, genética e das ciências da vida. A TE identifica um procedimento para o qual materiais, células, fatores de crescimento e/ou outras moléculas bioativas, combinados entre si, são combinados num suporte (*scaffold*) implantável cujo papel é promover a reparação e a regeneração do tecido do local do implante, enquanto se degradam [17]. Assim, baseia-se extensivamente na utilização de *scaffolds* porosos 3D para fornecer o ambiente apropriado para a regeneração de tecidos e órgãos. Os materiais, as propriedades mecânicas dos *scaffolds* e a cinética de degradação devem ser adaptados à aplicação específica, para garantir as funções mecânicas necessárias e ser adequada à cinética de formação de novos tecidos [17,18].

Os *scaffolds* são produzidos a partir de uma variedade de biomateriais utilizando várias técnicas de fabrico e têm sido aplicados na regeneração de diferentes tecidos e órgãos do corpo. Independentemente do tipo de tecido, uma série de considerações chave são importantes na conceção de um *scaffold* para utilização na engenharia de tecidos [18]. O *scaffold* estrutural ideal para um enxerto do LCA, deve ser biodegradável, biocompatível, ou seja, causar uma resposta inflamatória mínima, possuir uma resistência mecânica suficiente à do LCA nativo e promover a formação do tecido do ligamento [9]. Isto é, deve manter as propriedades mecânicas ao longo do tempo necessário para que uma reparação funcional ocorra sendo reabsorvido pelo tecido de substituição [19]. Para além disso, devem ter uma estrutura de poros interligados e alta porosidade para assegurar a penetração celular e a difusão adequada de nutrientes e remoção de resíduos de metabolismo celular sem interferência com os órgãos e tecidos circundantes [17,18].

O critério final para os *scaffolds* na engenharia de tecidos, é a escolha do biomaterial a partir do qual o *scaffold* deve ser fabricado [18].

A maioria dos *scaffolds* são produzidos a partir de polímeros naturais ou sintéticos [17]. *Scaffolds* à base de polímeros naturais, tal como, o alginato, o quitosano, o colagénio ou o ácido hialurónico têm sido utilizados na engenharia de tecidos e na medicina regenerativa [19]. Como o colagénio tipo I constitui cerca de 90% do LCA nativo, a utilização de *scaffolds* à base de colagénio tem sido extensivamente investigada [20]. Dunn et al e Bellincampi et al desenvolveram *scaffolds* feitos de fibrilas de colagénio [8]. No entanto, houve uma diminuição da resistência mecânica após 6 semanas, e estes foram

completamente reabsorvidos não conseguindo imitar as propriedades mecânicas do LCA nativo [8]. Apesar de os polímeros naturais possuírem boa biocompatibilidade e baixa citotoxicidade, muitas vezes apresentam desafios em relação à resistência mecânica [17][8].

A utilização de polímeros sintéticos biodegradáveis é promissora na engenharia de tecidos de LCA. Estes polímeros são bastante utilizados em aplicações biomédicas como é o caso do poli (ácido glicólico) (PGA), o poli (ácido láctico) (PLA), ácido poli-L-Láctico (PLLA), poli (ácido(láctico-co-glicólico)) (PLGA) bem como a poli (ϵ -caprolactona) (PCL) [17][21]. Na Tabela 2 estão listados os principais polímeros sintéticos biodegradáveis, usados em diversas aplicações clínicas, e que têm sido propostos como *scaffolds* para LCA [21,22]. Embora os polímeros sintéticos sejam vantajosos devido ao seu fornecimento quase ilimitado com propriedades bem caracterizadas e controláveis, a resistência mecânica e a degradação destes *scaffolds* ainda precisam de ser otimizadas para satisfazer os requisitos do tecido tendinoso ou do ligamento nativo [4].

Tabela 2: Propriedades físicas dos principais polímeros biodegradáveis utilizados em aplicações biomédicas. [23][6]

Polímero	Módulo de Young (GPa)	Tempo Degradação (meses)	Aplicações
PGA	5–7 GPa	6 a 12	Dispositivos médicos Suturas Reparação do menisco
PLLA	2.7 GPa	> 24	Cirurgia Ortopédica
PLGA	1.4–2.8 GPa	1 a 6	Parafusos de interferência Suturas Reconstrução LCA
PCL	0.4–0.6 GPa	> 24	Suturas de revestimento Implantes dentários ortopédicos

Algumas complicações foram ocasionalmente relatadas após a implantação de biomateriais PLA-PGA, geralmente atribuídas à liberação de produtos ácidos durante a degradação do material. No

entanto, a maioria dos estudos clínicos que citam complicações em seres humanos devido a implantes PLA e PGA, relatam apenas reações leves não específicas de corpo estranho [17].

2.3. Materiais para a produção de *scaffolds* para a regeneração de ligamentos

2.3.1. Poli (ácido láctico)

O poli (ácido láctico) (PLA) é um biopolímero promissor devido ao facto de os seus monómeros poderem ser produzidos a partir de matérias-primas renováveis não tóxicas, bem como altamente versátil podendo ser transformado num vasto espectro de produtos [24]. A Figura 3 apresenta a estrutura química do PLA.

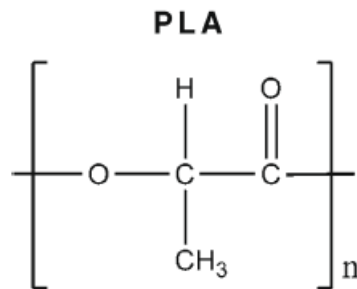


Figura 3: Estrutura química do PLA [17].

De base biológica, o PLA é produzido a partir do ácido láctico, um ácido orgânico que ocorre naturalmente e que pode ser produzido por fermentação de açúcares obtidos de recursos renováveis, como a cana-de-açúcar, milho e batata. Como o ácido láctico é uma molécula quiral (com nos isómeros L e D), o termo "poli(ácido láctico)" refere-se a uma família de polímeros: ácido poli-L-láctico (PLLA), ácido poli-D-láctico (PDLA), e ácido poli-D,L-láctico (PDLLA), representados na Figura 4 [24][25].

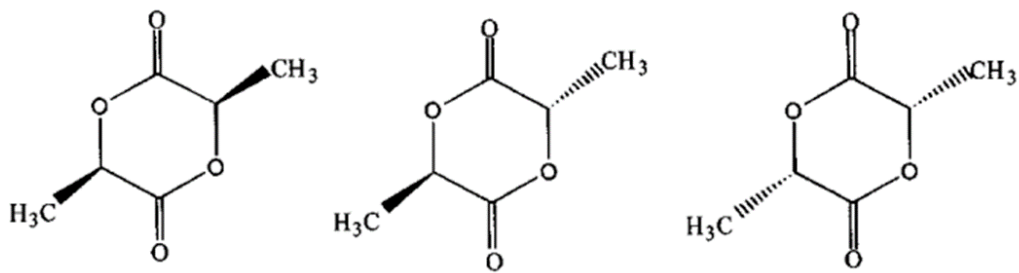


Figura 4: Isômeros de ácido láctico. a) D-lático b) D-L-lático c) L-lático [26].

A sua síntese pode ser efetuada por diferentes processos de polimerização a partir do ácido láctico, tais como a: polimerização por condensação direta, polimerização por abertura de anel e por métodos diretos como desidratação azeotrópica e polimerização enzimática. Atualmente, a policondensação e a polimerização por abertura de anel são as técnicas de produção mais utilizadas industrialmente. A Figura 5 apresenta os principais tipos de polimerização do ácido láctico.

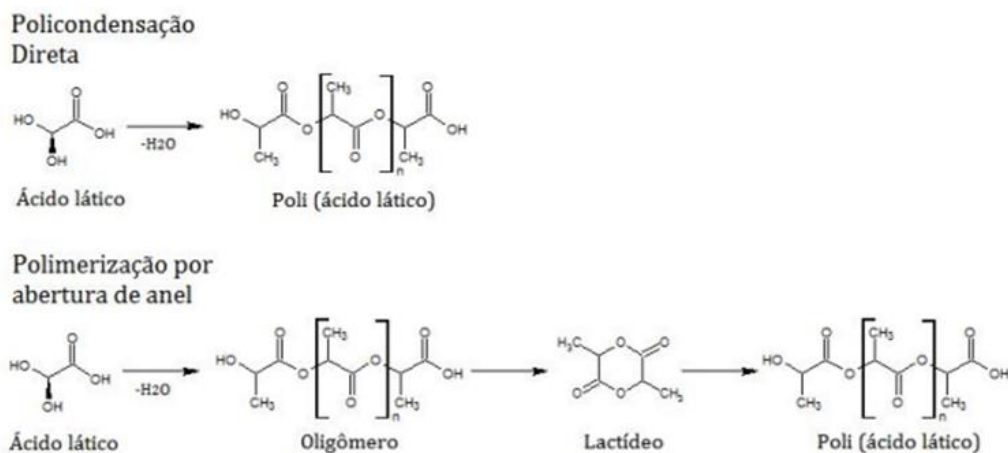


Figura 5: Principais tipos de polimerização a partir do ácido láctico [27].

O primeiro tipo de polimerização indicado na Figura 5, tem como principal vantagem a simplicidade tecnológica e seu baixo custo operacional, produzindo um PLA de menor massa molar. O segundo processo apesar de mais complexo, apresenta um produto final de alta massa molar e é amplamente utilizado pelos maiores produtores de PLA no mercado [25][28].

A biodegradação do PLA é conseguida através da quebra de ligações hidroliticamente instáveis presentes na sua estrutura química. Primeiro, ocorre a cisão aleatória da cadeia não enzimática dos grupos éster, reduzindo a massa molar. Depois, a massa molar é reduzida até que o ácido láctico e os oligómeros de baixa massa molar sejam naturalmente metabolizados por microrganismos para produzir dióxido de carbono e água [25][29]. A Tabela 3, apresenta as propriedades do PLA.

Um ponto-chave do PLA para aplicações médicas é a sua capacidade de não produzir toxicidade ou efeitos cancerígenos no organismo humano, e não metabolizar em produtos tóxicos de degradação [30].

Tabela 3: Propriedades do PLA: T_m (temperatura de fusão), T_g (temperatura de transição vítrea), T (Processo (temperatura de processamento), T_d (Temperatura de degradação) e P_d (Período de degradação a 50% ou 100% de massa perdida) [31]

T_m (°C)	150-175
T_g (°C)	55
Temperatura do Processo (°C)	185-190
T_d (°C)	325-500
P_d 50% (meses)	6-12
P_d 100% (meses)	> 36

O PLA tem amplas aplicações não somente como plástico biodegradável, mas também como material biomédico, devido às suas excelentes propriedades mecânicas, por ser hidrolisável no corpo humano e pela sua biocompatibilidade [4][32]. Assim, é um biomaterial aprovado pelas autoridades responsáveis por regular o mercado dos dispositivos médicos, em particular pela Agência Europeia do Medicamento (EMA) e pela Food and Drug Administration (FDA) nos Estados Unidos da América [33].

2.3.2. Grafite

A grafite é um cristal tridimensional (3D) que consiste na sobreposição de camadas de grafeno de espessura monoatômica, constituídas por átomos de carbono no estado de hibridação sp^2 , ligado covalentemente e formando uma rede hexagonal. Estas camadas estão ligadas entre si por interações de Van der Waals induzidas pelas interações entre os elétrões nas orbitais π deslocalizadas [4][34]. A separação entre planos de grafeno é de 3.35 \AA , enquanto a distância entre os átomos de carbono em cada camada é de $1,42 \text{ \AA}$, como está representado na figura 6 [35].

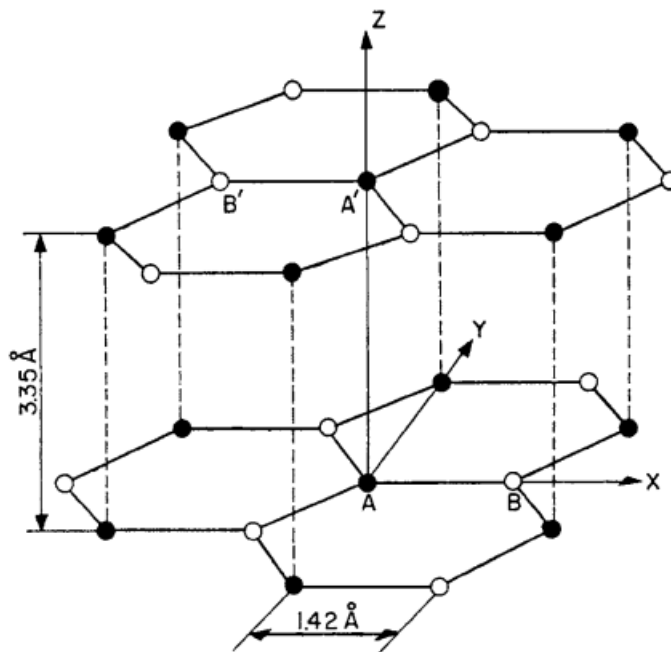


Figura 6: Estrutura cristalina de grafite indicando a separação das camadas e dos átomos. [34]

As propriedades interessantes da grafite devem-se em grande medida, ao facto de se tratar de um material anisotrópico. É um bom condutor elétrico e térmico dentro dos planos de grafeno, e é um mau condutor elétrico e térmico na direção ortogonal a esses planos, devido à maior distância e ligação mais fraca resultante das forças Van der Waals entre as camadas [34][36].

A tabela 4 apresenta as propriedades das camadas de grafite.

Tabela 4: Propriedades das camadas de grafite paralelo ao plano e perpendicular ao plano (z-axis) [37][38]

	Paralelo ao plano	Perpendicular ao plano (z-axis)
Densidade (g.cm ⁻³)	2.26	2.26
Módulo de elasticidade (GPa)	1020	36
Resistividade elétrica (μΩ.cm)	40 – 50	6000
Condutividade Térmica (Wm ⁻¹ K ⁻¹)	2000 – 3000	6 – 10
Coefficiente de Expansão Térmica (1/°C)	-0.5x10 ⁻⁶ – -1x10 ⁻⁶	27x10 ⁻⁶ – 29x10 ⁻⁶
Tensão de rotura (GPa)	96 – 130	34

É um material estratificado e a sua eficiência como reforço num compósito polimérico aumenta quanto menor for a espessura das partículas de grafite e quanto melhor for a sua dispersão em toda a matriz polimérica [38].

2.3.3. Exfoliação da grafite

O processo que resulta na formação de grafite exfoliada (EG) consiste em separar as camadas de carbono, sendo difícil remover toda a interação entre camadas, mas normalmente alcançando a formação de partículas com espessura nanométrica [39]. A exfoliação pode envolver métodos químicos, mecânicos e térmicos, levando à formação de flocos finos a partir de cristais maiores de grafite [4][39]. Os compostos de intercalação de grafite (GIC) são formados pela inserção de camadas atômicas ou moleculares de diferentes espécies químicas entre os planos de grafeno [38]. Envolve tipicamente a intercalação de ácido sulfúrico com a grafite, seguida de aquecimento para decompor em partículas mais pequenas provocando a expansão das camadas e resultando numa grafite expandida com baixa densidade. A EG exhibe propriedades mecânicas, térmicas, elétricas etc. que diferem das da grafite convencional, assim como numerosas aplicações [40][41]. Esta é composta por pilhas de nano folhas que podem variar de 100 a 400 nm e apresenta uma boa afinidade com os compostos orgânicos e polímeros [38].

A Figura 7 apresenta a exfoliação da grafite para a formação de nanoplaquetas de grafeno.

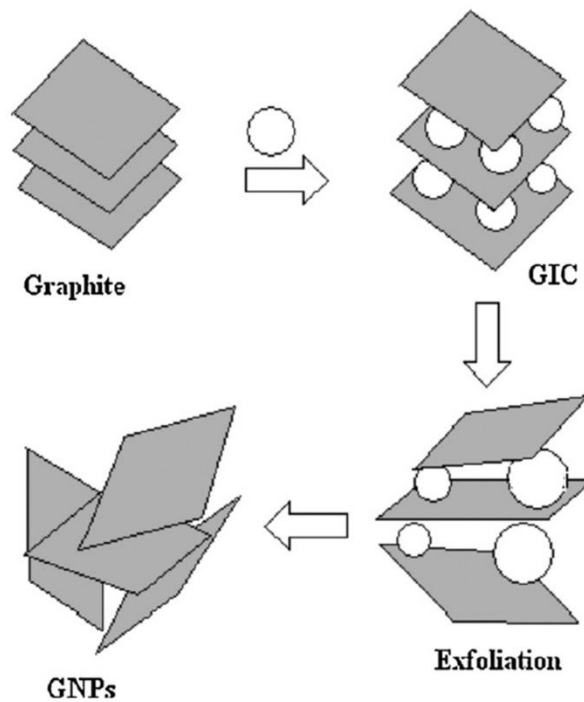


Figura 7: Ilustração esquemática da exfoliação da grafite para a formação de nanoplaquetas de grafeno. Adaptada de [38].

2.3.4. Grafeno

O grafeno tem suscitado um grande interesse em diversas áreas científicas devido às suas excelentes propriedades, tornando-se nos últimos anos num material intensamente estudado [42][43]. Este material surge em 2004, quando um grupo do Centro de Nanotecnologia da Universidade de Manchester, isolou pequenos fragmentos de grafeno a partir de grafite por uma técnica denominada de exfoliação mecânica [42][44].

O grafeno é, portanto, formado por uma camada única de átomos de carbono de espessura nanoatômica, constituído por átomos de carbono com ligações sp^2 , o que significa que estes se encontram fortemente ligados, ordenados numa rede cristalina hexagonal, tal como se pode observar esquematicamente na Figura 8: [42] [45]

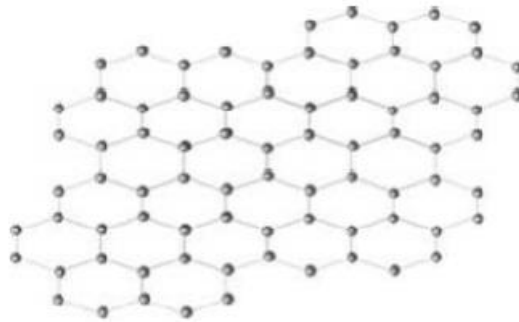


Figura 8: Estrutura ilustrativa do grafeno. [42]

A designação de grafeno foi alargada no decorrer dos anos, uma vez que a família do grafeno pode ser classificada como grafeno de camada única, grafeno de poucas camadas (2-10 camadas), e nanoplaquetas de grafite (GNP). As GNP são compostas por várias camadas de grafeno (mais do que 10) apresentando espessuras na ordem das dezenas de nanômetros, assim estruturalmente estão entre grafeno e grafite podendo a espessura variar de 3.4 nm a 100 nm. A Figura 9 esquematiza uma forma de produção de GNP a partir de grafite natural por exfoliação na fase líquida [46].

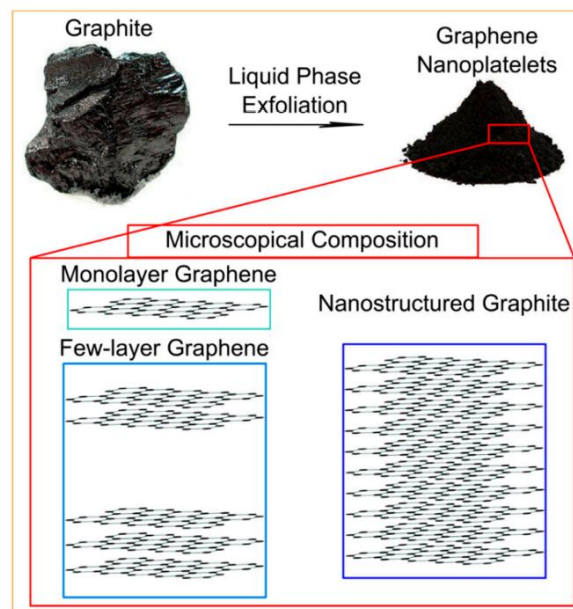


Figura 9: Produção de GNP a partir de grafite natural por exfoliação na fase líquida. [46]

As GNP são um reforço interessante para os nanocompósitos, pois são facilmente incorporadas em matrizes poliméricas, adicionando condutividade elétrica e térmica e melhoram as propriedades mecânicas, tais como a resistência à tração e a dureza superficial [47].

A Tabela 5 demonstra algumas das propriedades do grafeno.

Tabela 5: Propriedades do grafeno. [42]

	Unidade	Grafeno
Mobilidade eletrónica	cm ² V	>15000
Resistividade	Ω.cm	10
Condutividade Térmica	W/mK	(4–5) x10 ³
Área Superficial	m ² g ⁻¹ s ⁻¹	2630
Módulo de Young	TPa	~1

O grafeno é um material transparente, absorvendo apenas 2,3% da luz que incide sobre ele, sendo o melhor material a conduzir corrente elétrica à temperatura ambiente. É a combinação das propriedades de alta resistência, flexibilidade e o potencial para modificação química, que faz com que seja alvo de grande interesse, sendo possível aplicar em diversas áreas, como a indústria nanoeletrónica, automóvel, aeroespacial e medicina [45][48].

2.3.5. Funcionalização do grafeno e derivados

O grafeno e seus derivados apresenta difícil dispersão em alguns solventes orgânicos e em solventes aquosos, devido à hidrofobicidade da sua superfície e à coesão dos aglomerados de nanopartículas, estabilizados pelas forças atrativas de Van der Waals entre camadas [49]. Os métodos mais comuns para promover a dispersão de nanopartículas derivadas da grafite envolvem modificações químicas covalentes e não covalentes. A funcionalização química consiste na modificação da superfície do grafeno através da ligação de grupos funcionais que podem atuar como locais de ancoragem e tem como objetivo melhorar a sua compatibilidade química com uma matriz polimérica, aumentando a adesão [4][43][45][50].

A funcionalização covalente é uma forma muito estudada de funcionalização do grafeno, envolvendo a formação de ligações covalentes entre os átomos de carbono do grafeno ou grafite e pequenas moléculas com estrutura química adequada, polímeros ou biomacromoléculas, alterando a química da superfície de grafeno. A funcionalização não covalente tem como principal vantagem a introdução de funcionalidades químicas à superfície do grafeno por adsorção, sem afetar a ligação química entre átomos de carbono, que deve ser mantida para preservar a condutividade deste material.

A abordagem não covalente é efetuada através de interações intermoleculares tais como forças Van der Waals, interações π - π , interação eletrostática, ligações de hidrogénio ou ligações de coordenação [4][43] [50][51]. No entanto a estabilidade térmica do grafeno funcionalizado pela via não covalente é em geral muito inferior que a do grafeno funcionalizado covalentemente, o que pode ser uma desvantagem conforme a aplicação.

A modificação da superfície do grafeno foi efetuada através da reação de cicloadição 1,3-dipolar (DCA), que foi aceite como uma abordagem interessante e vantajosa para a modificação superficial de materiais de carbono com estrutura baseada em grafeno. Esta reação ocorre através da condensação de um α -aminoácido e de um aldeído formando um intermediário dipolar que reage com ligações duplas C=C da estrutura de grafeno por cicloadição 1,3-dipolar. Esta reação origina a formação de grupos do tipo pirrolidina ligados covalentemente à superfície do grafeno [42]. A pirrolidina pode reagir e melhorar a compatibilidade com matrizes poliméricas durante os processos de mistura em fusão [52]. De acordo com estudos recentes, é utilizado benziloxycarbonilglicina (Z-Gly-OH) como α -aminoácido e paraformaldeído gerando uma espécie intermediária reativa, um dipolo 1,3 que reage com a superfície do CNT gerando uma amina protegida, como está representado na Figura 10.

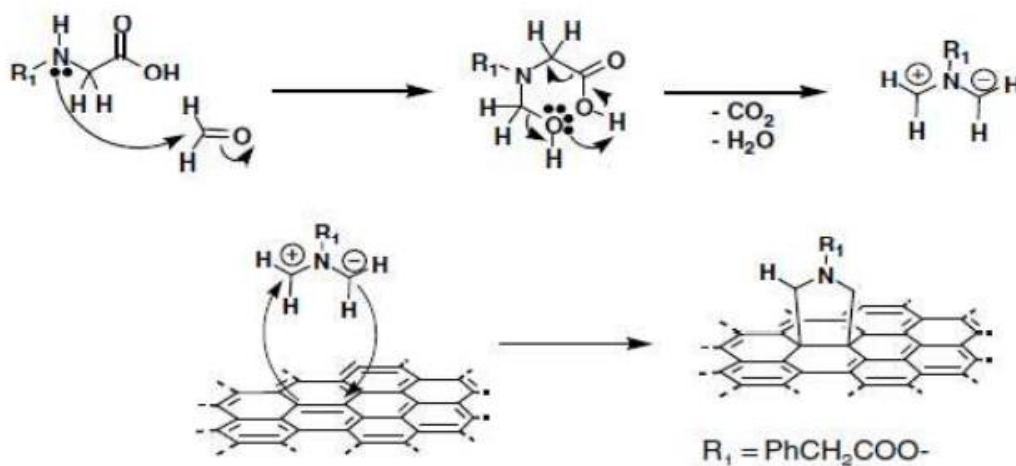


Figura 10: Representação esquemática ciclo adição dipolar 1,3 [42].

A funcionalização do grafeno desperta grande interesse, visto que pode melhorar a solubilidade e a processabilidade, facilitando as interações do material com polímeros orgânicos. Além disso, a funcionalização também permite modificar as características intrínsecas, incluindo propriedades eletrônicas, ampliando assim a sua gama de aplicações [53].

A reação DCA é caracterizada como sendo um processo simples e reprodutível, além de que é vantajosa em relação à oxidação da grafite, a qual é bastante utilizada para obter grafeno funcionalizado pela via oxidativa em grandes quantidades num curto espaço de tempo. No entanto, para a produção de uma quantidade significativa de grafeno, é necessário a adição de ácidos e outros compostos oxidantes para ajudar a exfoliar a grafite nas camadas de grafeno. Estes compostos são tóxicos, afetam a condutividade elétrica do material em consequência da sua oxidação, sendo necessário retirar produtos de oxidação resultantes, exigindo por isso uma reação de redução. Estes processos não são necessários com a reação DCA, uma vez que a estrutura do grafeno funcionalizado não é alterada de forma significativa.

2.3.6. Decoração do grafeno com nanopartículas de prata

A utilização de nanopartículas, particularmente nanopartículas metálicas, encontrou interesse na investigação biomédica, uma vez que apresentam propriedades únicas de pequeno tamanho, grande relação superfície/volume, elevada reatividade relativamente às células vivas, estabilidade a altas temperaturas e translocação para as células, etc. As nanopartículas metálicas mais frequentemente estudadas incluem ouro, prata, óxido de titânio e nanopartículas de ferro [54].

As nanopartículas de prata (AgNPs) exercem a sua atividade bactericida através de um mecanismo em que a sua ligação inicial à superfície celular leva a uma alteração da permeabilidade, seguida da penetração da barreira celular e da libertação intracelular de iões metálicos de prata. Entre as múltiplas aplicações potenciais dos AgNPs, têm sido dirigidos esforços para a sua aplicação em tratamentos de feridas, *scaffolds* de tecido, e vestuário de proteção, devido à sua atividade bacteriana, antifúngica e antiviral [55].

Estudos recentes indicam que um sistema híbrido de grafeno decorado com AgNPs oferece propriedades interessantes. Por um lado, as AgNPs inibem a aglomeração das folhas de grafeno; por

outro lado, as folhas de grafeno atuam como excelente suporte para estabilizar nanopartículas de prata impedindo a aglomeração e facilitando a dispersão. Assim, as folhas híbridas de grafeno com AgNPs uniformemente distribuídas à sua superfície podem apresentar elevada condutividade elétrica e boa atividade antibacteriana. Num outro estudo, as folhas de óxido de grafeno reduzido (RGO) decoradas com prata mostraram elevadas propriedades antibacterianas e elétricas devido aos efeitos sinérgicos da prata e do grafeno [56]. Assim, os AgNPs e/ou GOs adicionados são benéficos para a formação de nanocompósitos de PLA com atividade antimicrobiana [57].

2.4. Processo de extrusão

O processo de extrusão é um método de fabrico versátil, económico e eficiente que pode ser aplicável à escala industrial para a produção de materiais compósitos [58].

O fabrico de nanocompósitos através da incorporação de reforços em polímeros, tais como a grafite exfoliada, origina materiais com novas propriedades mecânicas e funcionais [59]. Este método envolve a fusão do polímero e a mistura aplicando forças de corte intensas, à medida que o material é transportado através do espaço entre os parafusos, que ajudam a dispersar os reforços uniformemente no polímero fundido [4][59]. Os vários parâmetros do processamento, tais como o perfil de temperaturas, a velocidade do parafuso e o débito, determinam a eficiência da dispersão das nanopartículas no material extrudido [60].

No caso dos nanocompósitos baseados em polímeros termoplásticos, a extrusão de duplo fuso é amplamente utilizada, sendo a mistura induzida pelas tensões de corte geradas [58]. Novais et al. usaram uma extrusora de duplo fuso co-rotativo para preparar os compósitos de PLA/nanotubos de carbono (CNT), mostrando o efeito da funcionalização dos CNT e das condições de processamento [4].

A Figura 11 ilustra o protótipo da extrusora de duplo fuso co-rotativo.

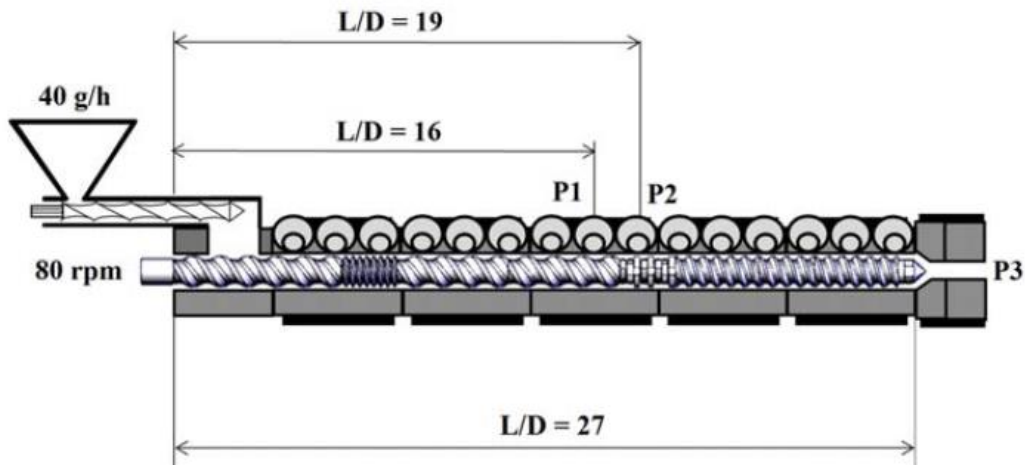


Figura 11: Protótipo da extrusora de duplo fuso co-rotativo. [16]

Um perfil de parafuso contendo um número significativo de elementos de mistura distributivos resulta numa melhor dispersão de CNT numa matriz PLA, em comparação com um equipamento de duplo fuso padrão [4].

Apesar das elevadas temperaturas e pressões de funcionamento, bem como das elevadas taxas de corte, o processamento de polímeros por extrusão é um processo amplamente utilizado na indústria porque é uma operação contínua, rápida, simples e versátil, uma vez que não estão envolvidos solventes durante a preparação do compósito. Cada sistema de polímeros requer a formação de um conjunto especial de condições de processamento, com base na eficiência de processamento e nas propriedades do produto desejado [38][61].

Espera-se que os compósitos resultantes da adição de PLA e grafite exfoliada apresentem propriedades mecânicas, elétricas e térmicas melhoradas, aumentando a sua potencial utilização em aplicações biomédicas, tais como na produção de *scaffolds* para engenharia de tecidos [62].

2.5. Fabrico de *scaffolds* por impressão 3D

A impressão 3D é uma tecnologia revolucionária em crescimento que consiste em conceber estruturas complexas a um baixo custo que não poderiam ser produzidas utilizando métodos de processamento tradicionais [63]. Entre as tecnologias de impressão 3D, a modelação por deposição do fundido (FDM) é a técnica mais utilizada para criar componentes 3D a partir de dados obtidos diretamente do modelo geométrico gerado num sistema CAD [31]. A estrutura 3D é estabelecida através da extrusão do filamento fundido, com um diâmetro adequado para a impressora 3D, numa plataforma de extrusão camada a camada através do bico de impressão [64,65]. Trata-se de um método com baixo custo, alta precisão e geometria personalizada. Um dos pontos fortes da sua utilização é a sua compatibilidade com vários tipos de materiais de polímeros termoplásticos [66,67]. A Figura 12 apresenta um diagrama do processo de FDM.

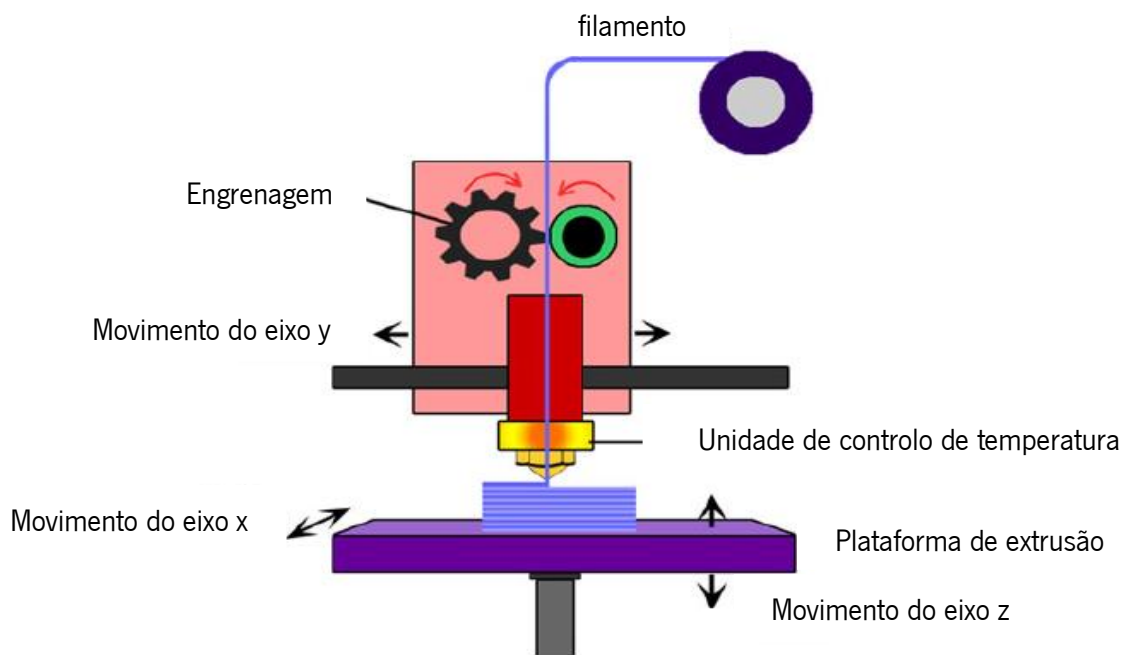


Figura 12: Diagrama esquemático do processo FDM. Adaptada de [67].

A qualidade das peças impressas pode ser controlada alterando os parâmetros de impressão, tais como a espessura da camada, a orientação de impressão, a largura de impressão, o ângulo, a velocidade, diâmetro do bico de impressão, pressão de extrusão, entre outros [66][68].

A impressão 3D permite produzir *scaffolds* porosos para aplicações de engenharia de tecidos, incluindo *scaffolds* para regeneração óssea e implantes personalizados para os pacientes [69][70].

Alguns estudos demonstraram as capacidades da impressão 3D no fabrico de *scaffolds* ósseos, combinando boas propriedades mecânicas e baixa densidade [68][69]. No entanto, a funcionalidade dos *scaffolds* e implantes impressos em 3D é altamente dependente do material. Assim, a seleção do material para os *scaffolds* e implantes impressos tornou-se uma área de investigação proeminente, uma vez que as suas propriedades e comportamento são afetados pelo tipo de técnica de fabrico utilizada [69].

O PLA tem sido extensamente estudado como bio polímero para a fabricação de *scaffolds* ortopédicos devido à sua biodegradabilidade [31]. A figura 13 apresenta um *scaffold* de PLA por impressão 3D para a reconstrução do LCA. Recentemente, houve um aumento de estudos centrados no fabrico de peças 3D por FDM para várias aplicações utilizando um filamento de grafeno/poliácido láctico (PLA) [71][72]. Hye-Been Kim et al produziram *scaffolds* com PLA/CNT por impressão 3D e observaram uma melhoria significativa na resposta mecânica nos compósitos em comparação com os *scaffolds* de PLA [73]. Belaid et al. estudaram tanto as propriedades mecânicas como biológicas dos *scaffolds* e relataram um aumento de 30% no módulo de Young quando 0,3 wt. % GO foi adicionado ao PLA [72].

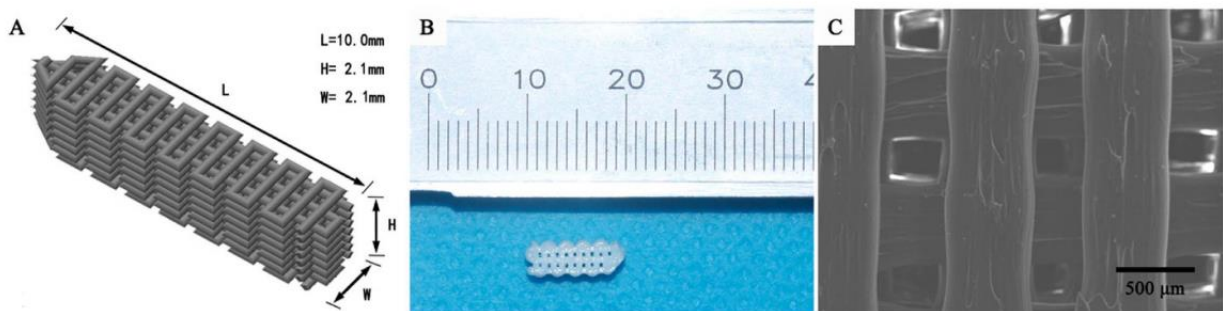


Figura 13: Propriedades físicas do *scaffold* de PLA em forma de parafuso. (A) Estrutura teórica 3D do *scaffold* em forma de parafuso. (B) O *scaffold* de PLA produzido. (C) A imagem SEM da superfície do *scaffold* de PLA com estrutura ortogonal bem definida. [74]

CAPÍTULO 3

Materiais e Métodos

3. Materiais e Métodos

Neste capítulo são abordados os materiais e os métodos utilizados para a produção dos filamentos e *scaffolds* assim como as técnicas utilizadas para caracterizar os filamentos e *scaffolds*.

3.1. Preparação de grafite exfoliada funcionalizada

A funcionalização da grafite (Micrograf HC11, "EG", da Nacional de Grafite Lda.) ocorre através da reação de ciclo adição 1,3-dipolar. Para realizar a funcionalização misturaram-se de 10 g do aminoácido N-benziloxycarbonilglicina com 7 g de paraformaldeído e 50 ml de éter dietílico, mantendo-se em agitação magnética durante 10 min. De seguida, foram adicionadas 10g de EG e 50 ml éter dietílico e deixou-se em agitação até formar uma mistura homogênea. Após evaporação do éter dietílico, aumentou-se a temperatura para 250 °C e deixou-se a essa temperatura durante 3h. Na reação, descrita na Figura 10, é formada uma amina cíclica protegida. No caso da reação formada neste trabalho, a amina formada está representada na Figura 14 **(1)**. Quanto mais elevada for a temperatura da reação mais extensa é a reação de clivagem do grupo, originando a pirrolidina **(2)** [42]. A EG funcionalizada é lavada com sequência de solventes, designadamente: etanol, hexano, acetona e etanol de novo, e em seguida secada a 150 °C durante 2h sob vácuo. No fim deste processo obtém-se grafite funcionalizada (f-EG).

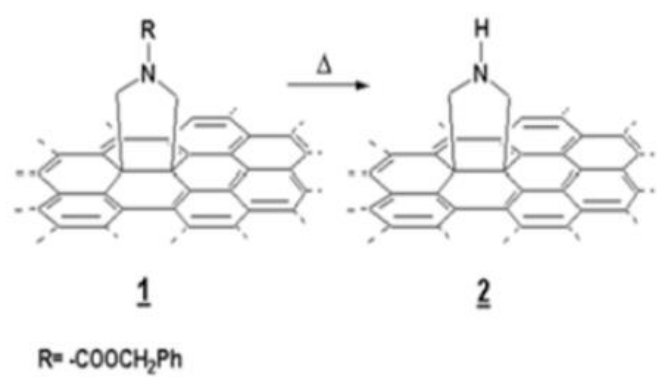


Figura 14: Reação de cicloadição 1,3-dipolar. Adaptado de [42].

3.2. Preparação de grafite exfoliado funcionalizada com adição de nanopartículas de prata

A ligação de grafite funcionalizada com nanopartículas de prata seguiu a seguinte sequência: utilizou-se 280 mg de f-EG e adicionou-se 16 ml da solução de N, N-dimetilformamida (DMF) que posteriormente durante 15 min é colocado sob agitação magnética com 500-600 rotações/min. Simultaneamente a este processo, pesou-se 140 mg de nitrato de prata que é colocado num frasco de vidro juntamente com 8 ml de etanol. O frasco foi colocado sob agitação magnética para que possa ocorrer a mistura das soluções. Depois do tempo terminar, introduziu-se a solução com o nitrato de prata na suspensão de f-EG e foi colocado novamente sob agitação. Como este processo que decorreu durante 72 h, a cada 24 h retirou-se a solução da agitação para colocar num banho de ultrassons durante 15 min. No decorrer de todo o processo cobriu-se o frasco reacional com folha de alumínio, para que não fique exposto à luz. Após as 72 h, seguiu-se a lavagem do material onde este foi filtrado com uma mistura de éter e hexano, e finalmente ocorreu a sua secagem a 150 °C em vácuo durante 2 h.

3.3. Mistura do poliácido láctico com os reforços

Previamente à formação dos filamentos pelo processo de extrusão, realizou-se a mistura dos grânulos de polímero com os diversos aditivos em estudo, nomeadamente, a grafite exfoliada, a grafite exfoliada funcionalizada e grafite exfoliada funcionalizada com adição de nanopartículas de prata. A Figura 15, apresenta o aspeto dos grânulos de PLA recobertos pelas nanopartículas antes da mistura no fundido e formação dos filamentos por extrusão.

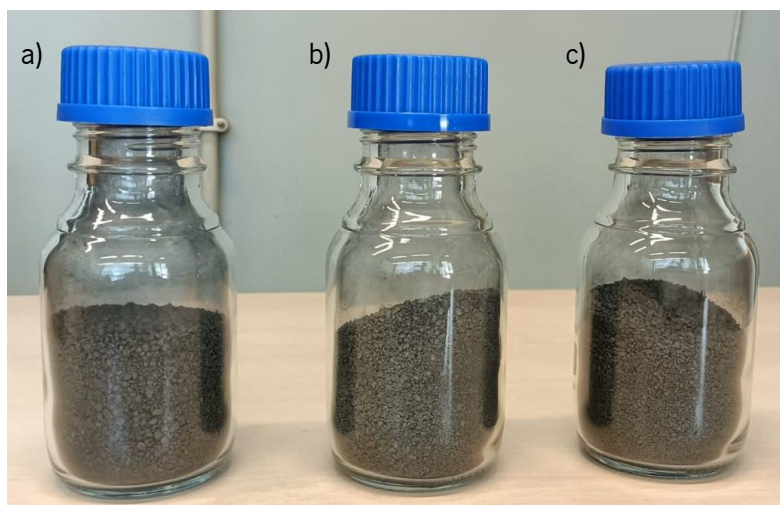


Figura 15: Mistura do poliácido láctico com os respetivos reforços. a) EG, b) f-EG e c) f-EG + Ag

Para isso, procedeu-se à secagem do PLA a 80°C sob vácuo e à secagem dos reforços a serem adicionados a 80°C sem vácuo, separadamente. Preparou-se cada compósito em frascos individuais de 250 ml, contendo 129.35 g de PLA e 0.65 g do respetivo reforço, agitando vigorosamente. De seguida, a dispersão foi mantida a 80°C sob vácuo até a sua utilização, para evitar a presença de humidade.

A percentagem de 0,5% em massa proposta para a grafite exfoliada nos compósitos é baseada nas tolerâncias indicadas para aplicações biomédicas, normalmente considera-se que concentrações de grafite até 1% em massa são adequadas em termos de citotoxicidade [75].

3.4. Produção dos filamentos compósitos

O polímero utilizado foi o PLA (PURASORB® PL 10 da Corbion), trata-se de um polímero com uma viscosidade inerente entre os 0.9 – 1.2 dl/g e com uma gama de fusão entre 170 – 200 °C. O PURASORB PL 10 é um PLA de grade médico utilizado principalmente para aplicações em dispositivos médicos e é adequado para todas as técnicas de processamento de polímeros comumente utilizadas. Os filamentos de PLA e PLA com 0,5% de EG, 0,5% de f-EG e 0.5% de f-EG + Ag foram processados por extrusão. Foi utilizada uma micro extrusora de duplo fuso co-rotativo Rondol Microlab, com parafuso de 10 mm de diâmetro, uma relação comprimento/diâmetro (L/D) de 22, usando uma velocidade de rotação do parafuso de 43 rpm.

À saída da feira encontram-se os rolos de puxo e a sua velocidade foi controlada de modo que o diâmetro do filamento fosse 1,75 mm, diâmetro que é adequado para impressão 3D. O primeiro rolo de puxo encontra-se mais próximo da feira exercendo a função de controlo de diâmetro e o segundo rolo de puxo tem como função o estiramento longitudinal do fio durante o arrefecimento. No final, os filamentos foram recolhidos e identificados. A extrusão foi feita sob atmosfera de azoto, uma vez que o polímero utilizado apresenta elevada sensibilidade à humidade, podendo sofrer degradação. Os parafusos apresentam 3 zonas de mistura diferentes que permitem que o material flua ao longo do canal promovendo uma mistura intensiva, como ilustra a Figura 16.



Figura 16: Parafusos duplos co-rotativos da extrusora Rondol Microlab.

Na Figura 17 está representada a mini-extrusora utilizada.



Figura 17: Extrusora Rondol Microlab utilizada para a produção dos filamentos.

Para o processamento dos filamentos de PLA e filamentos compósitos, as condições de processamento estão descritas na Tabela 6. A velocidade de rotação dos fusos e o débito dos filamentos compósitos foram idênticos ao filamento de PLA.

Tabela 6: Condições de processamento para a produção dos filamentos.

<p style="text-align: center;">PLA</p> <p style="text-align: center;">43 rpm</p> <p>Débito: 4.216 g/min</p> <p>Velocidade dos Rolos:</p> <p>R1 (mm/s) = 27.84</p> <p>R2 (mm/s) = 31.64</p> <p>Temperatura:</p> <p>135 °C – 170°C</p> <p>(alimentação— fieira)</p>

<p style="text-align: center;">PLA+0.5% EG</p> <p style="text-align: center;">43 rpm</p> <p>Débito: 4.216 g/min</p> <p>Velocidade dos Rolos:</p> <p>R1 (mm/s) = 45.70</p> <p>R2 (mm/s) = 47.87</p> <p>Temperatura:</p> <p>135 °C – 168°C</p> <p>(alimentação— fieira)</p>

<p style="text-align: center;">PLA+0.5% f-EG</p> <p style="text-align: center;">43 rpm</p> <p>Débito: 4.216 g/min</p> <p>Velocidade dos Rolos:</p> <p>R1(mm/s) = 34.50</p> <p>R2 (mm/s) = 35.50</p> <p>Temperatura:</p> <p>135 °C – 163°C</p> <p>(alimentação— fieira)</p>
--

<p style="text-align: center;">PLA+0.5% [(f-EG) + Ag]</p> <p style="text-align: center;">43 rpm</p> <p>Débito: 4.216 g/min</p> <p>Velocidade dos Rolos:</p> <p>R1(mm/s) = 32.81</p> <p>R2 (mm/s) = 35.85</p> <p>Temperatura:</p> <p>135 °C – 155°C</p> <p>(alimentação— fieira)</p>

3.5. Caracterização dos filamentos

3.5.1. Análise Termogravimétrica (TGA)

A análise termogravimétrica (TGA) monitoriza as alterações das propriedades físicas ou químicas de um material que envolvam variação de massa por efeito da temperatura. Esta técnica mede a variação de massa em função da temperatura ou do tempo de exposição a uma temperatura, em atmosfera controlada [76][77]. A TGA permite determinar a estabilidade térmica dos materiais, assim como alterações na sua composição e analisa materiais que apresentam perda ou ganho de massa devido à decomposição, oxidação ou perda de voláteis [78]. É uma técnica comum para determinar a quantidade de um reforço dentro de um polímero, uma vez que a amostra é aquecida para degradar toda a matéria orgânica, de maneira a obter uma percentagem do resíduo final do material testado [76]. O equipamento do TGA consiste em quatro componentes diferentes para fornecer dados analíticos precisos, nomeadamente uma balança para medir o peso da amostra, um forno programado para um aumento linear da temperatura, um programador de temperatura para a respetiva medição e controlo e um sistema de aquisição de dados para registar as mudanças de peso e temperatura [76][79]. Para além disso, um fluxo de gás (inerte ou oxidante) flui a um caudal constante dentro do forno para o limpar dos gases de degradação e aumentar a condutividade térmica da atmosfera do forno [4].

A análise de TGA foi realizada num equipamento Q500 da TA Instruments®. As amostras foram colocadas num cadinho de platina e aquecidas de 40 °C a 850 °C a 10 °C/min⁻¹ sob um fluxo constante de azoto. Foram efetuados 3 ensaios para cada tipo de filamento. Este ensaio permitiu a avaliação da estabilidade térmica dos filamentos, analisar a influência da incorporação do reforço (EG, f-EG e f-EG+Ag) na matriz polimérica, assim como a quantidade de reforço no final de cada ensaio.

3.5.2. Espectroscopia Raman

A espectroscopia de Raman é uma técnica de caracterização não destrutiva, rápida, com alta resolução e fornece informação estrutural e química dos materiais de carbono [80]. Tornou-se num método versátil para identificar e caracterizar a composição química e características físicas de materiais, sendo de particular interesse para os materiais de carbono, incluindo diamante, grafite, grafeno, nanotubos de carbono, entre outros [81]. A espectroscopia de Raman fornece uma grande quantidade de

informação, relativamente a defeitos e desordem dos cristais, espessura, dopagem, introdução de impurezas químicas, número de camadas de grafeno, condutividade térmica do grafeno, entre outros [82][83].

Utiliza um laser com um comprimento de onda que pode ser selecionado conforme o material a analisar. O laser fornece radiação que vai incidir sobre a amostra, e os fonões da radiação dispersa de forma elástica são analisados, sendo observada a radiação obtida por emissão (processo Stokes) ou absorção (processo anti-Stokes) [82][84].

As principais características nos espectros Raman do grafeno e seus derivados, são a banda G, situada a 1580 cm^{-1} e a banda 2D, situada a 2670 cm^{-1} , como se encontra representado na Figura 18 [82]. Pode também observar-se uma banda situada a 1350 cm^{-1} , a banda D, que está associada a defeitos estruturais do material, sendo tanto mais intensa quanto maior o número de defeitos presentes na estrutura do material. O pico G está relacionado com a vibração no plano de átomos de carbono sp^2 que formam a estrutura hexagonal da camada de grafeno e o pico 2D dá informações, por exemplo, relativamente ao número de camadas de grafeno [85].

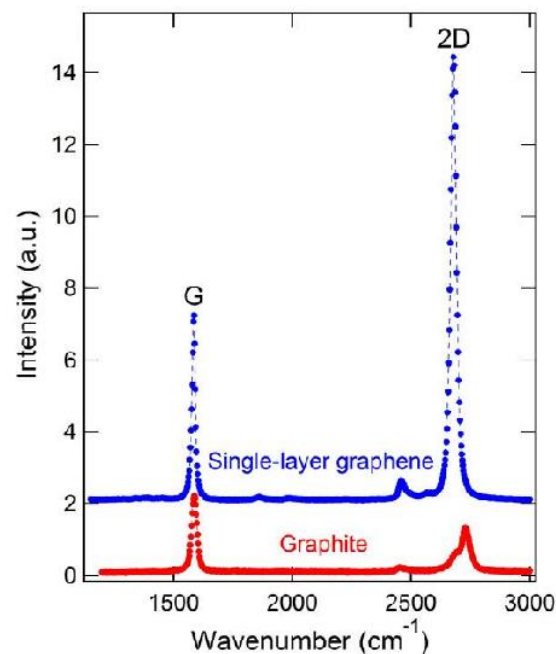


Figura 18: Espectros típicos de Raman para uma amostra de grafeno de camada única e grafite utilizando um laser de excitação de 532 nm. Adaptado de [82].

A espectroscopia de Raman foi utilizada de forma a identificar e avaliar a presença e a dispersão dos reforços nos filamentos compósitos. Foram cortados segmentos de cada filamento e colocados numa lamela para análise através do espectrómetro LabRAM HR Evolution Raman (Horiba Scientific, Japan) usando um laser com um comprimento de onda de 532 nm. A análise dos resultados foi conseguida através do software LabSpec6.

3.5.3. Microscopia Eletrónica de Varrimento (SEM)

O microscópio eletrónico de varrimento (SEM) é um instrumento que permite observar a morfologia de superfícies até à escala nanométrica e, usando a microanálise de raios X (EDS), caracterizar a composição química elementar dessas superfícies [86]. Devido à sua alta resolução, à sua grande profundidade de campo e à capacidade de realizar análise elementar, o SEM é muito utilizado na ciência dos materiais - incluindo a ciência dos polímeros - para elucidar a estrutura micro e nanométrica ou para diferenciar várias fases em materiais compósitos e misturas de materiais [87]. O SEM pode fornecer informações sobre a topografia da superfície, morfologia e composição química [88][89].

O SEM funciona exatamente como os seus equivalentes óticos, exceto na utilização de um feixe focalizado de eletrões em vez de luz, de forma a obter informações sobre a sua estrutura e composição [89]. Para preparar uma amostra para microscopia eletrónica a superfície desta deve ser condutora, caso contrário procede-se ao revestimento da superfície com uma camada de ouro ou de outros materiais, ou misturas de materiais, para evitar a acumulação de carga durante a visualização da amostra [90]. Um feixe de eletrões é formado e acelerado em direção à amostra utilizando um potencial elétrico positivo. Os eletrões no feixe interagem com os átomos do material, produzindo sinais que contêm informações sobre as suas propriedades e estas interações e efeitos são detetados e transformados numa imagem [89]. A Figura 19 esquematiza os componentes da microscopia eletrónica de varrimento.

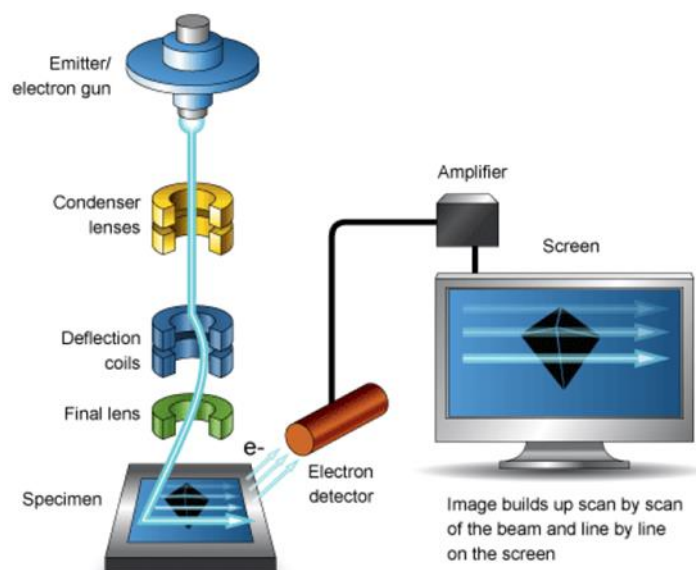


Figura 19: Esquema e funcionamento do SEM. Adaptado de [112].

A morfologia, composição química e distribuição do reforço dos filamentos de PLA, PLA+0.5% EG, PLA+0.5% f-EG e PLA+0.5% [(f-EG) + Ag] foram caracterizadas por SEM, utilizando o equipamento FEI Nova 200 FEG-SEM/EDS.

3.5.4. Microscopia Ótica

A função do microscópio ótico é produzir uma imagem ampliada do objeto contendo a informação estrutural pretendida e que possa ser percebida pelo sistema olho-cérebro. Por exemplo, a microscopia ótica pode ser utilizada para estudar a cinética de cristalização de materiais poliméricos semicristalinos ou para analisar o grau de dispersão de aditivos em nanocompósitos de polímeros [91][92].

Cada tipo de filamento (PLA, PLA+0,5% EG, PLA+0,5% f-EG e PLA+0,5% [(f-EG) +Ag]) foi submetido a cortes transversais com 2 μm de espessura com o auxílio de um micrótomo Leica EM UC6, de seguida a secção cortada foi colocada numa lamela de vidro com bálsamo do Canadá. Posteriormente foram analisadas com o microscópio ótico Olympus BH-2 usando uma objetiva de 4x, 10x e 20x, em modo de transmissão. As imagens obtidas foram analisadas pelo software *ImageJ* para análise

estatística. A microscopia ótica foi utilizada para determinar a presença de grafite e avaliar a dispersão e aglomeração das nanopartículas de grafeno no filamento.

3.5.5. Calorimetria Diferencial de Varrimento (DSC)

A calorimetria diferencial de varrimento (DSC) é uma ferramenta analítica para caracterização das propriedades térmicas de um polímero [93]. É utilizada para medir a energia absorvida ou libertada por um material em função da temperatura, quando o material é aquecido ou arrefecido [76]. Desta forma é possível detetar as transições que ocorrem no material na gama de temperaturas estudadas, tais como a temperatura de transição vítrea, temperatura de fusão e a temperatura de cristalização, assim como a entalpia envolvida em cada transição [4]. A vantagem do DSC em comparação com outras técnicas calorimétricas reside na ampla gama dinâmica no que diz respeito às taxas de aquecimento e arrefecimento, e a possibilidade de análise em modo isotérmico e modulado à temperatura [93].

Os ensaios de Calorimetria Diferencial de Varrimento (DSC) foram efetuados num DSC 200 F3 Maia da Netzsch sob um fluxo constante de nitrogénio. As amostras foram obtidas cortando pequenas seções de filamento com cerca de 9 mg. Efetuou-se um 1º aquecimento entre 30°C e 190°C a 5°C/min, seguido de um arrefecimento a 20°C/min até 30°C e um 2º aquecimento até 190°C à mesma velocidade. Para cada filamento foram realizados 3 ensaios. Foi possível detetar a transição vítrea, a fusão e a cristalização das amostras assim como os valores de entalpia e as temperaturas às quais ocorrem estes processos. Avaliou-se ainda a influência da adição do reforço na transição vítrea, fusão e cristalização dos filamentos compósitos.

3.5.6. Análise Mecânica Dinâmica (DMA)

A análise mecânica dinâmica (DMA) é uma ferramenta indispensável e eficaz para estudar o comportamento viscoelástico dos materiais poliméricos/compósitos em função da temperatura e/ou da frequência [76]. Numa experiência típica de DMA, é aplicada uma força dinâmica a uma amostra, e a resposta da deformação do material a esta força é medida. A partir dos dados registados, pode-se calcular

propriedades como o módulo de armazenamento (E'), o módulo de perda (E'') e o fator de amortecimento ($\tan(\delta)$) [94], representadas nas equações 1 e 2 [95]:

$$E' = \frac{\sigma_0}{\varepsilon_0} \cos(\delta) \quad (1)$$

$$E'' = \frac{\sigma_0}{\varepsilon_0} \sin(\delta) \quad (2)$$

Onde E' corresponde à capacidade de energia mecânica armazenada pelo material, E'' indica a capacidade dos polímeros de dispersar energia mecânica através de movimentos moleculares internos. E por fim, o fator de amortecimento é a razão entre E'' e E' e fornece informação sobre a ligação de interface entre o reforço e a matriz polimérica [96][97], representada na equação 3 [95]:

$$\tan(\delta) = \frac{E''}{E'} \quad (3)$$

De forma a avaliar as propriedades mecânicas/viscoelásticas dos filamentos foram realizados ensaios de DMA utilizando o equipamento Triton 2000B (Triton Technology, Reino Unido) em modo tração. As amostras foram cortadas com 10 mm de comprimento. Os ensaios foram efetuados entre 10 °C e 70 °C à frequência de 1 Hz e à velocidade de aquecimento de 2 °C/ min. As amostras foram submetidas a uma pré-carga estática de 0.5 N para manter a amostra estirada. Foram realizados 3 ensaios para o filamento de PLA e para os filamentos compósitos.

3.5.7. Resistividade Elétrica

Para as medições elétricas dos filamentos foi utilizado um picoamperímetro 6487 (Keithley, EUA), segundo a norma ASTM D257, aplicando uma voltagem variável, entre -10 e 10 V. Os diâmetros de cada segmento dos filamentos foram medidos usando um micrômetro (Mitutoyo, Japão). Cada amostra tinha 10 mm de comprimento.

A resistência do filamento (Ω) foi obtida pela lei de Ohm, aplicando a equação 4:

$$R = \frac{V}{I} \quad (4)$$

Onde V é a voltagem aplicada no filamento medida em Volt e I é a corrente elétrica medida em Ampere [98].

A resistividade volumétrica ρ_V ($\Omega.m$) foi determinada através da equação 5:

$$\rho = R \frac{A}{l} \quad (5)$$

Onde R é a resistência do filamento medida em Ohm, A é a área da amostra cm^2 e l é o comprimento da amostra (cm) [98].

3.6. Impressão 3D

Para a produção dos *scaffolds* utilizando os filamentos produzidos utilizou-se a técnica de impressão 3D. Os *scaffolds* foram concebidos utilizando o software Ultimaker Cura (versão 4.4) e impressos com uma impressora 3D Creality Ender-3 com a plataforma de extrusão mantida a $80^\circ C$, a temperatura do bico de impressão a $185^\circ C$ e a velocidade de extrusão a 45 mm.s^{-1} , para todos os filamentos. A distância de enchimento de 0,8 mm e a altura de camada de 0,15 mm foram mantidas constantes. Os *scaffolds* em 3D foram impressos horizontalmente e concebidos com um padrão linear de preenchimento (0 e 90°) e uma porosidade de 50%. A figura 20 apresenta o design do *scaffold* criado através do *software* numa perspectiva isométrica, com 9 mm de diâmetro por 32 mm de comprimento. Para além disso, também foram produzidos *scaffolds* com 9 mm x 4 mm para a sua posterior utilização em trabalhos futuros.

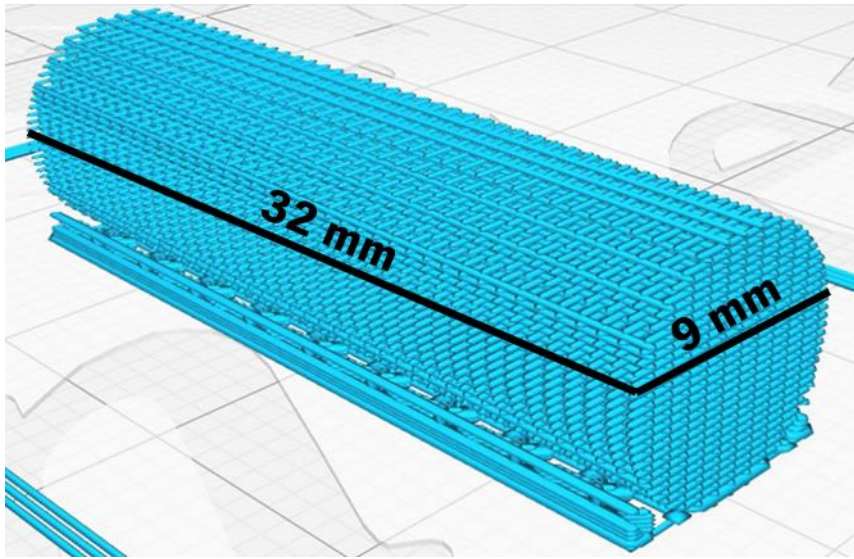


Figura 20: Design do scaffold criado através do software numa perspectiva isométrica.

CAPÍTULO 4

Discussão de Resultados

4. Discussão de Resultados

Este capítulo centra-se na discussão de todos os resultados obtidos sobre produção e caracterização dos filamentos e *scaffolds* desenvolvidos.

4.1. Caracterização estrutural da superfície do poliácido láctico com grafite

4.1.1. Microscopia Eletrónica de Varrimento (SEM)

Antes do processamento dos filamentos com diferentes composições, foi feita uma análise da superfície do polímero PLA e PLA com os três tipos de reforço, através da microscopia eletrónica de varrimento (SEM). A Figura 21 apresenta os resultados obtidos usando três ampliações. É possível observar uma grande quantidade de flocos de EG, f-EG e f-EG + Ag localizados à superfície dos grânulos de PLA. Estes resultados confirmam boa adesão da grafite, antes e após a funcionalização, na superfície do polímero.

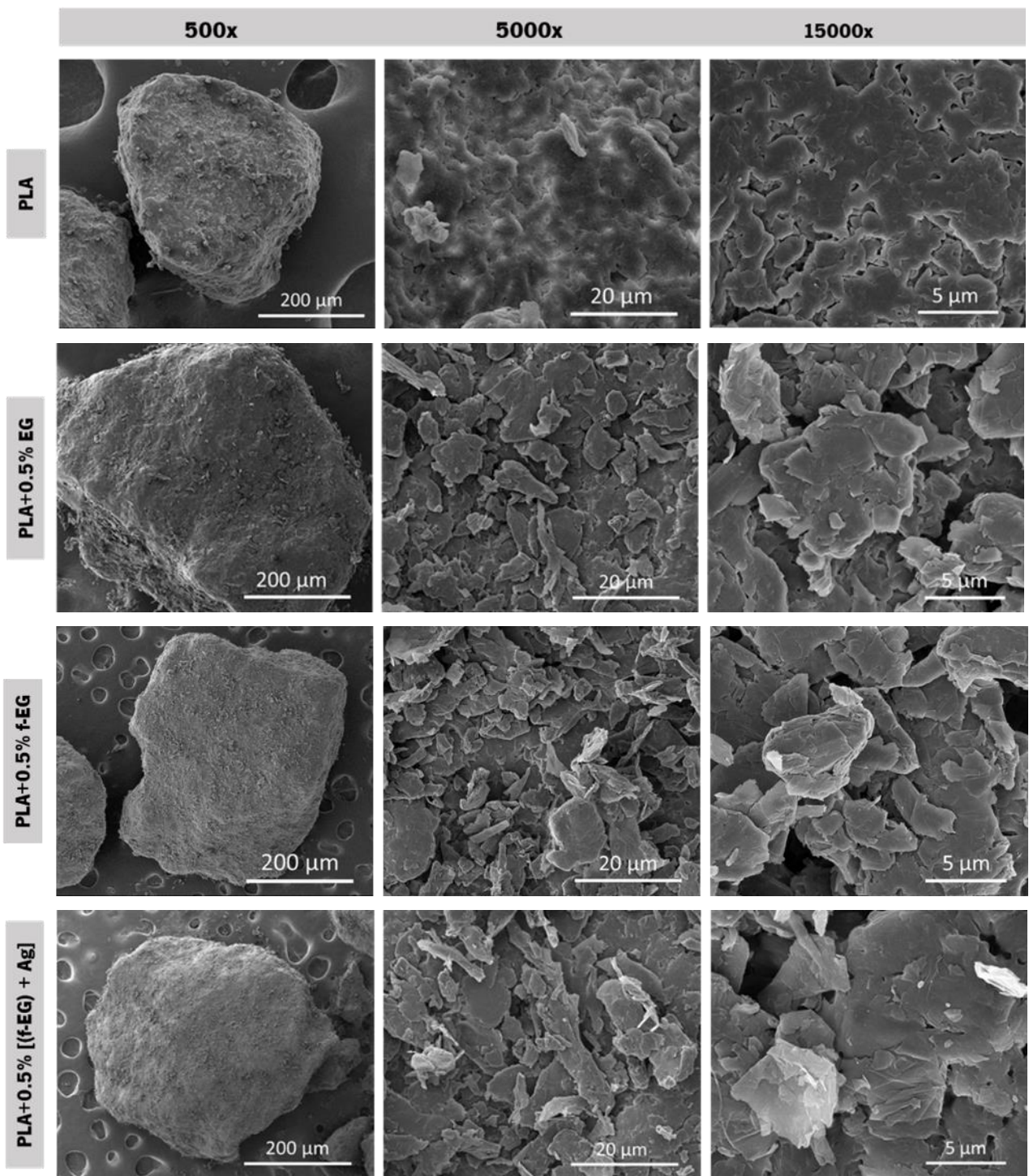


Figura 21 : Imagens de SEM da mistura do polímero com os respectivos reforços.

4.2. Caracterização macroscópica dos filamentos

A figura 22 apresenta os filamentos de PLA, PLA+0,5% EG e PLA+ 0,5%[(f-EG) +Ag] produzidos por extrusão. No final, obteve-se uma boa adesão das nanopartículas de grafite à superfície do PLA e uma flexibilidade adequada para a aplicação pretendida.

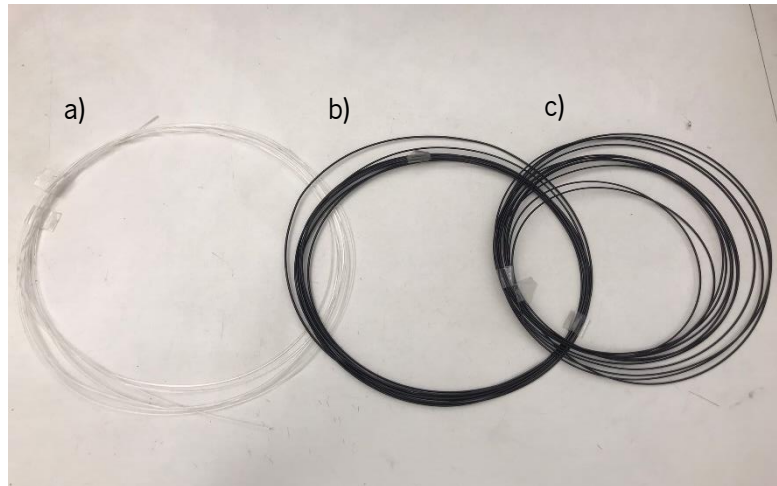


Figura 22: Filamentos compósitos: (a) PLA, (b) PLA+0,5% EG e (c) PLA+0,5% [(f-EG) + Ag]

As Figuras 23 e 24 apresentam os filamentos de PLA, PLA+0,5% EG, PLA+0,5% f-EG e PLA+ 0,5%[(f-EG) +Ag] com 1,75 mm de diâmetro, com uma objetiva de 2.5x através de uma lupa macroscópica.

É possível também observar à escala macroscópica homogeneidade da cor nos filamentos compósitos.

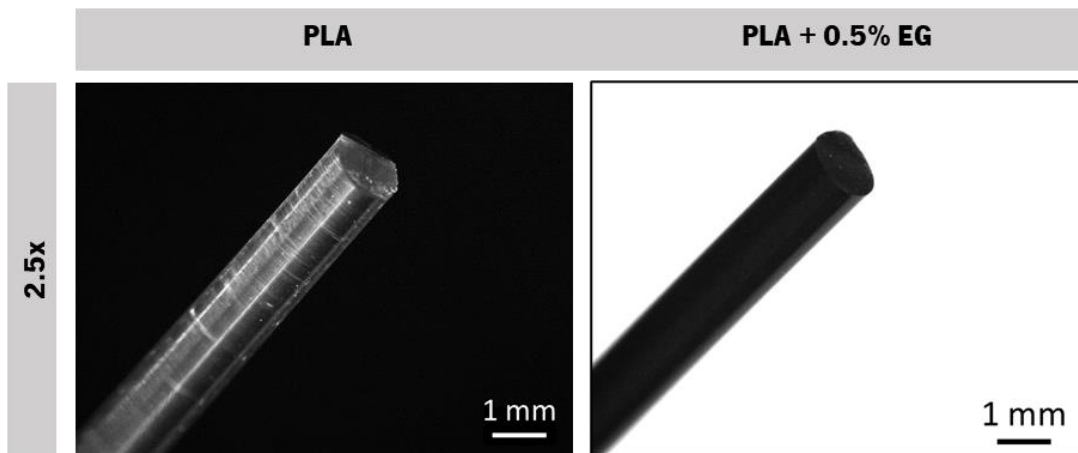


Figura 23: Filamento de PLA e PLA + 0,5% EG, à escala macroscópica.

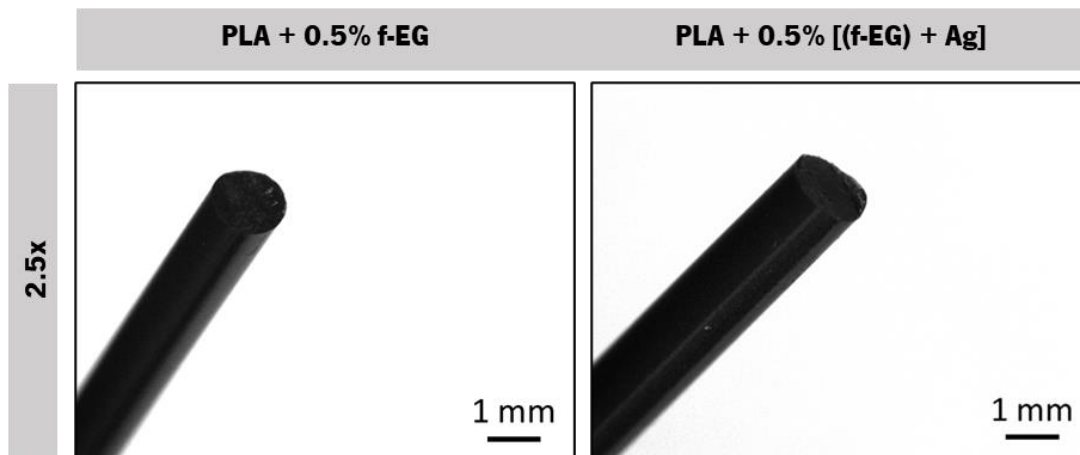


Figura 24: Filamento de PLA + 0,5% f-EG e PLA + 0,5% [(f-EG) + Ag], à escala macroscópica.

4.3. Caracterização estrutural dos filamentos

4.3.1. Microscopia Ótica

Uma dispersão uniforme e homogênea de nano aditivos em matrizes de polímeros é vital para alcançar um bom perfil de propriedades mecânicas em nanocompósitos [99].

Como foi referido anteriormente, a microscopia ótica visa avaliar a dispersão e aglomeração das nanopartículas do reforço no filamento. As secções dos filamentos com aproximadamente 2 μm de espessura foram observadas por microscopia ótica em modo de transmissão, usando três objetivas, de 4x, 10x e 40x. As imagens obtidas estão apresentadas na Figura 25.

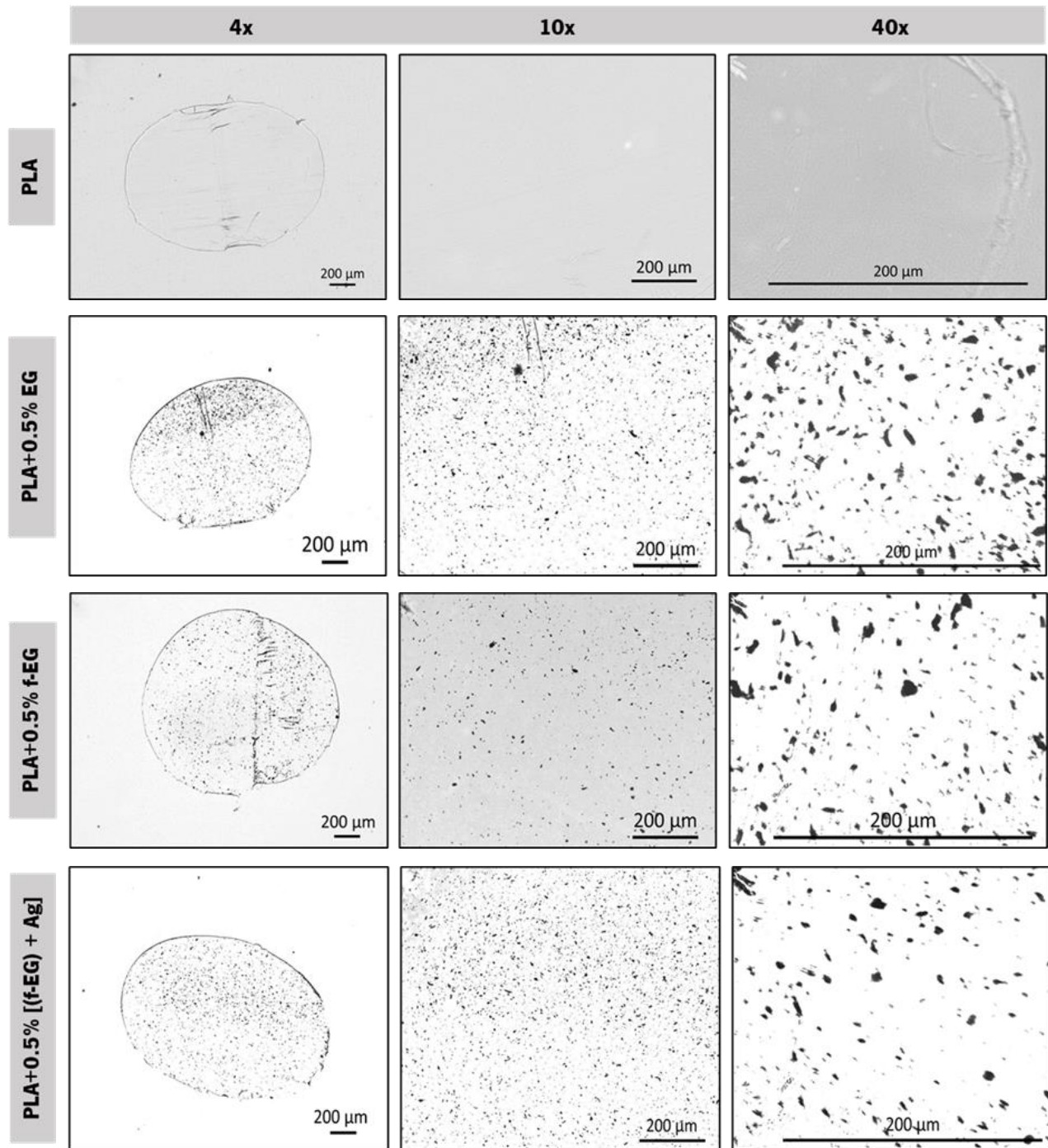


Figura 25: Imagens da microscopia ótica das secções dos filamentos.

A seção de filamento do PLA mostra uma superfície limpa e livre de partículas, permitindo comparar com os filamentos de nanocompósito. As seções cortadas de PLA+0,5% EG, PLA+0,5% f-EG e PLA+0,5% [(f-EG + Ag)] demonstram possuir uma boa dispersão e distribuição das partículas e podem conter a presença de aglomerados, embora de pequenas dimensões, atendendo às dimensões médias das nanopartículas de EG. Em comparação com as amostras de filamentos f-EG, as amostras de EG e f-EG + Ag possuem uma maior quantidade de partículas apesar da percentagem de reforço ser idêntica.

A análise estatística do número de partículas por unidade de área, tamanho médio dos aglomerados, razão da área dos aglomerados relativamente à área total de compósito e área máxima dos aglomerados dos compósitos, estão presentes na Tabela 7.

Tabela 7: Análise estatística da secção transversal dos filamentos compósitos

Amostra	Número de Partículas (mm⁻²)	Área Média das Partículas (µm²)	Razão de área de aglomerados (%)	Área Máxima das Partículas (µm²)
PLA+0.5% EG	2568	16.80	4.30	123.97
PLA+0.5% f-EG	1675	34.40	5.76	505.52
PLA+0.5% [(f-EG) + Ag]	3372	17.21	5.82	157.86

A análise estatística apresentada na Tabela 7 mostra que o tamanho médio das partículas para o filamento de EG é de 16.80 µm², para f-EG é de 34.40 µm² e para f-EG + Ag é de 17.21 µm². Nas imagens de microscopia com ampliação intermédia (Figura 25), destaca-se a amostra de grafite exfoliada funcionalizada, que possui um menor número de partículas, no entanto, estas têm um tamanho médio e área máxima das partículas de f-EG superiores, podendo resultar de uma maior coesão de nanopartículas após a funcionalização [62].

Observa-se ainda, que a razão da área dos aglomerados relativamente à área total de compósito varia, para todas as composições, entre 4.30–5.82 %, sendo que em f-EG + Ag é ligeiramente maior, devido à presença de um maior número de partículas na área.

4.3.2. Microscopia Eletrônica de Varrimento (SEM)

A secção transversal dos filamentos foi analisada por microscopia eletrônica de varrimento (SEM). A Figura 26, apresenta os resultados obtidos usando três tipos de ampliações: 5000x, 15000x e 50000x.

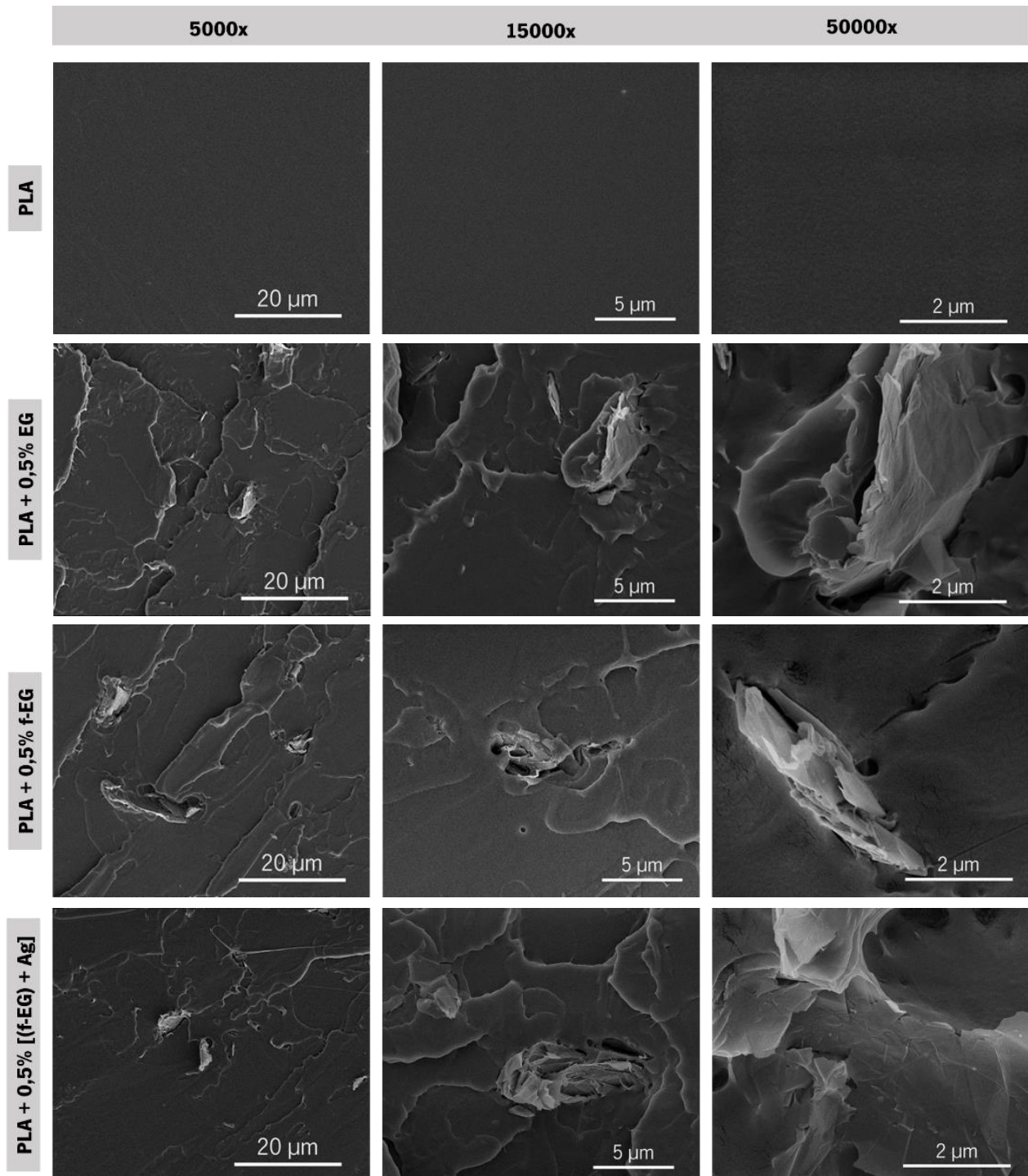


Figura 26: Imagens de SEM dos filamentos compósitos.

Como pode ser observado na Figura 26, a superfície da secção transversal dos filamentos que contém a presença de reforços é mais rugosa, do que a superfície do filamento de PLA.

Foi feita uma análise de espectroscopia de raios X por energia dispersiva (EDS) ao filamento f-EG+Ag, de modo a verificar a presença de prata. A Figura 27 apresenta a imagem SEM deste filamento, assim como o local no qual foi feita a análise (zona Z2) por EDS e o respetivo gráfico. O sinal C corresponde ao conteúdo em carbono, devido à presença da grafite, o sinal O representa o oxigénio presente no PLA, o ouro (Au) está presente na análise devido ao recobrimento das amostras para observação no SEM; e por fim o sinal de Ag confirma a presença de prata, ancorada nas f-EG dispersas nestes filamentos.

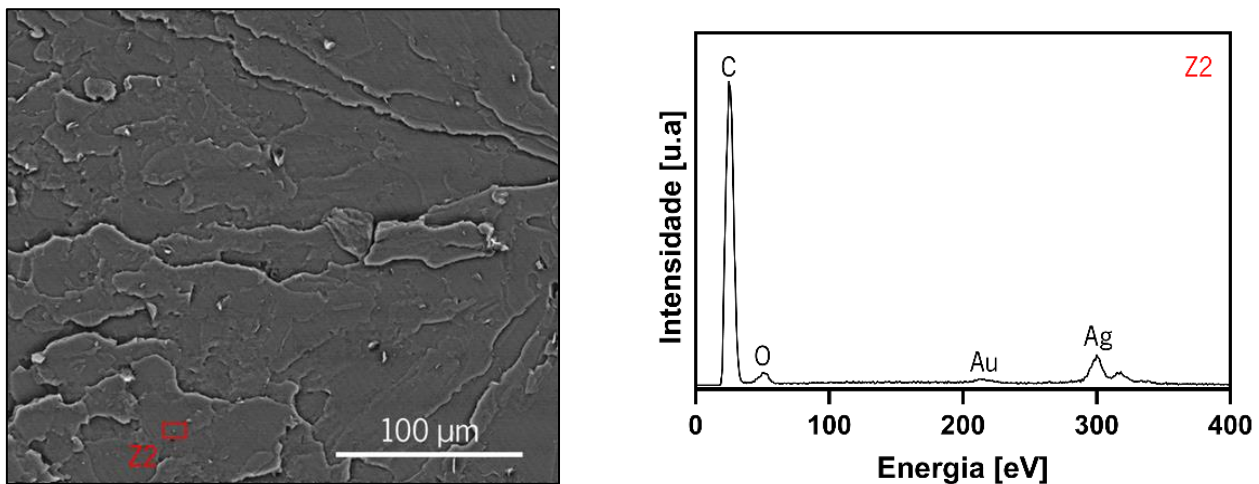


Figura 27: Imagens SEM e análise EDS no filamento PLA + 0,5% [(f-EG) + Ag]

4.3.3. Microscopia Raman

A microscopia de Raman foi utilizada para identificar e avaliar a presença dos reforços nos filamentos. A Figura 28 apresenta o espectro de Raman dos filamentos compósitos e do filamento de PLA. As bandas típicas de um material à base de grafite estão identificadas na figura, nomeadamente as bandas G e 2D. A banda G confirma a presença de EG (sem e com funcionalização) nos compósitos, já que o espectro do PLA não apresenta nenhuma banda nesta região dos 1580 cm^{-1} . Todas as amostras apresentam uma banda na região do comprimento de onda de 2700 cm^{-1} .

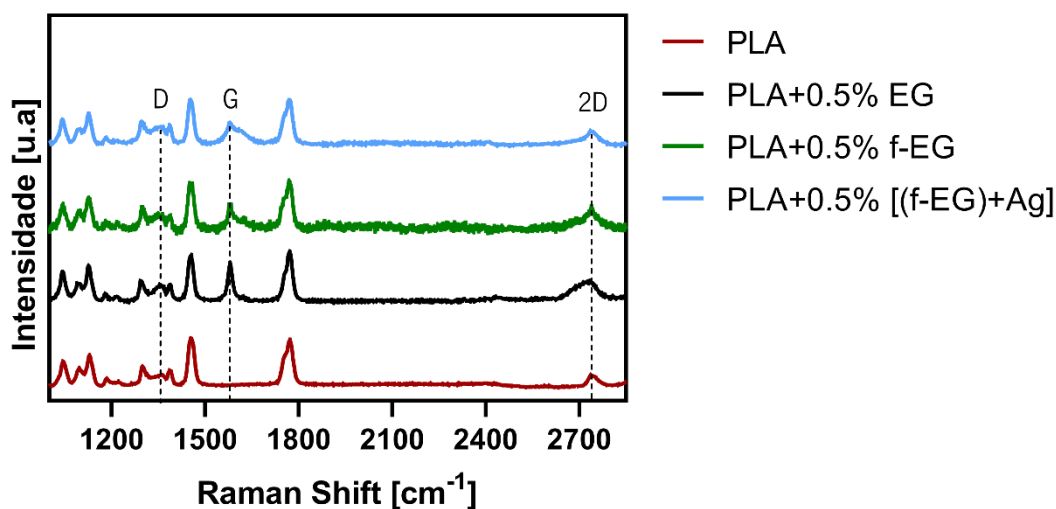


Figura 28: Espectro de Raman dos filamentos compósitos e do filamento de PLA.

4.3.4. Análise Termogravimétrica (TGA)

A análise termogravimétrica (TGA) permitiu analisar a estabilidade térmica dos filamentos produzidos. A estabilidade é um fator importante que é necessário conhecer de modo a controlar o processo de fusão, bem como nas aplicações de utilização final [62].

A Figura 29 exhibe o comportamento do filamento PLA e dos filamentos compósitos durante a degradação quando aquecidos até 800 °C numa atmosfera inerte. A Figura 30 representa a derivada da curva de TGA, sendo que o pico máximo representa a temperatura à qual a velocidade de decomposição térmica do material é máxima.

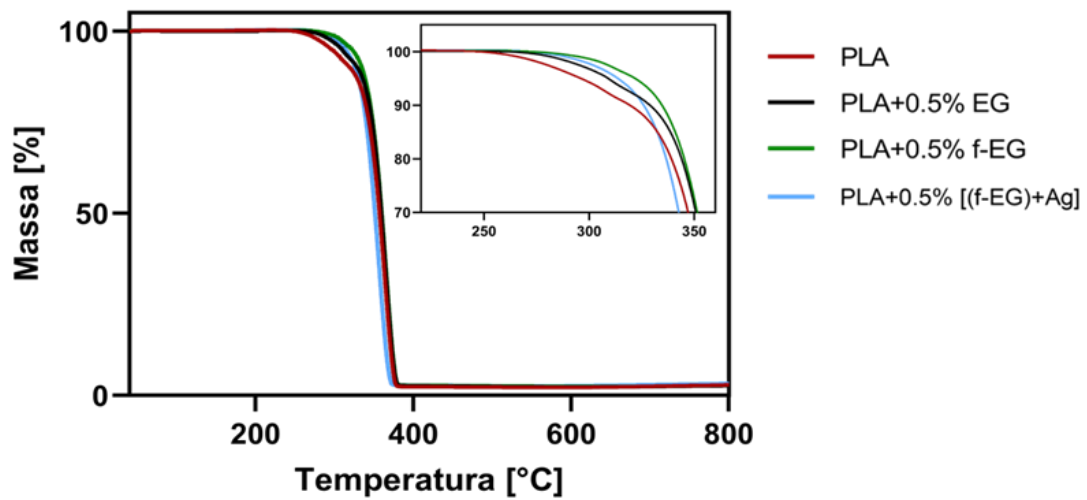


Figura 29: Perda de massa em função da temperatura.

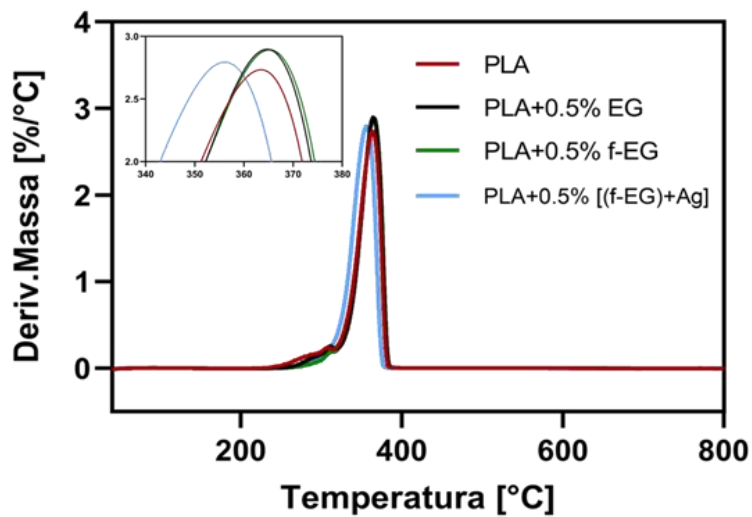


Figura 30: Derivada da perda de massa em função da temperatura.

A Tabela 8 apresenta a temperatura de degradação dos filamentos, assim como as respectivas temperaturas em que ocorre a velocidade máxima do processo de degradação.

Tabela 8: Temperatura de degradação e temperatura máxima de degradação dos filamentos.

	PLA	PLA+0.5% EG	PLA+0.5% f-EG	PLA+0.5% [(f-EG) +Ag]
Temp. de degradação (°C)	248.42	261.86	273.86	272.51
Temp. máxima de degradação (°C)	363.76	364.96	365.16	356.34

Nesta gama de temperaturas ocorre a degradação do PLA e dos grupos orgânicos dos reforços introduzidos na matriz polimérica. Avaliando a estabilidade térmica do filamento PLA e dos filamentos EG, f-EG e f-EG + Ag, é possível verificar que o pico de degradação das amostras com reforço ocorre a temperaturas ligeiramente superiores, isto é, os filamentos compósitos apresentam uma estabilidade térmica superior. Como o início da degradação térmica dos materiais compósitos ocorre sempre acima dos 240°C é possível afirmar que estes possuem as propriedades térmicas necessárias para a aplicação pretendida. Observa-se também que a temperatura máxima a que o PLA pode ser processado sem sofrer degradação térmica considerável.

Para além disso, através do ensaio de TGA é possível determinar a quantidade de resíduo no final de cada ensaio. Esta quantidade permite saber se a percentagem pretendida foi alcançada, nomeadamente os 0,5% para os filamentos compósitos. A Tabela 9 apresenta as percentagens de reforço presentes em cada filamento.

Tabela 9: Percentagem de reforço presente nos filamentos compósitos.

Amostra	Reforço (wt/%)
PLA + 0.5% EG	0.49 ± 0.38
PLA + 0.5% f-EG	0.52 ± 0.52
PLA + 0.5% [(f-EG) + Ag]	0.57 ± 0.39

Observa-se que a incorporação do reforço nos filamentos é semelhante à percentagem pretendida, apesar de poder haver erros associados relativamente à distribuição e dispersão não uniforme das partículas durante o processamento, dado que a quantidade de amostra analisada em cada ensaio é inferior a 10 mg.

4.3.5. Calorimetria Diferencial de Varrimento (DSC)

A calorimetria diferencial de varrimento (DSC) tem como objetivo analisar o comportamento térmico dos filamentos compósitos. Os resultados de DSC obtidos para (a) 1º aquecimento, (b) arrefecimento e (c) 2º aquecimento estão apresentados na Figura 31.

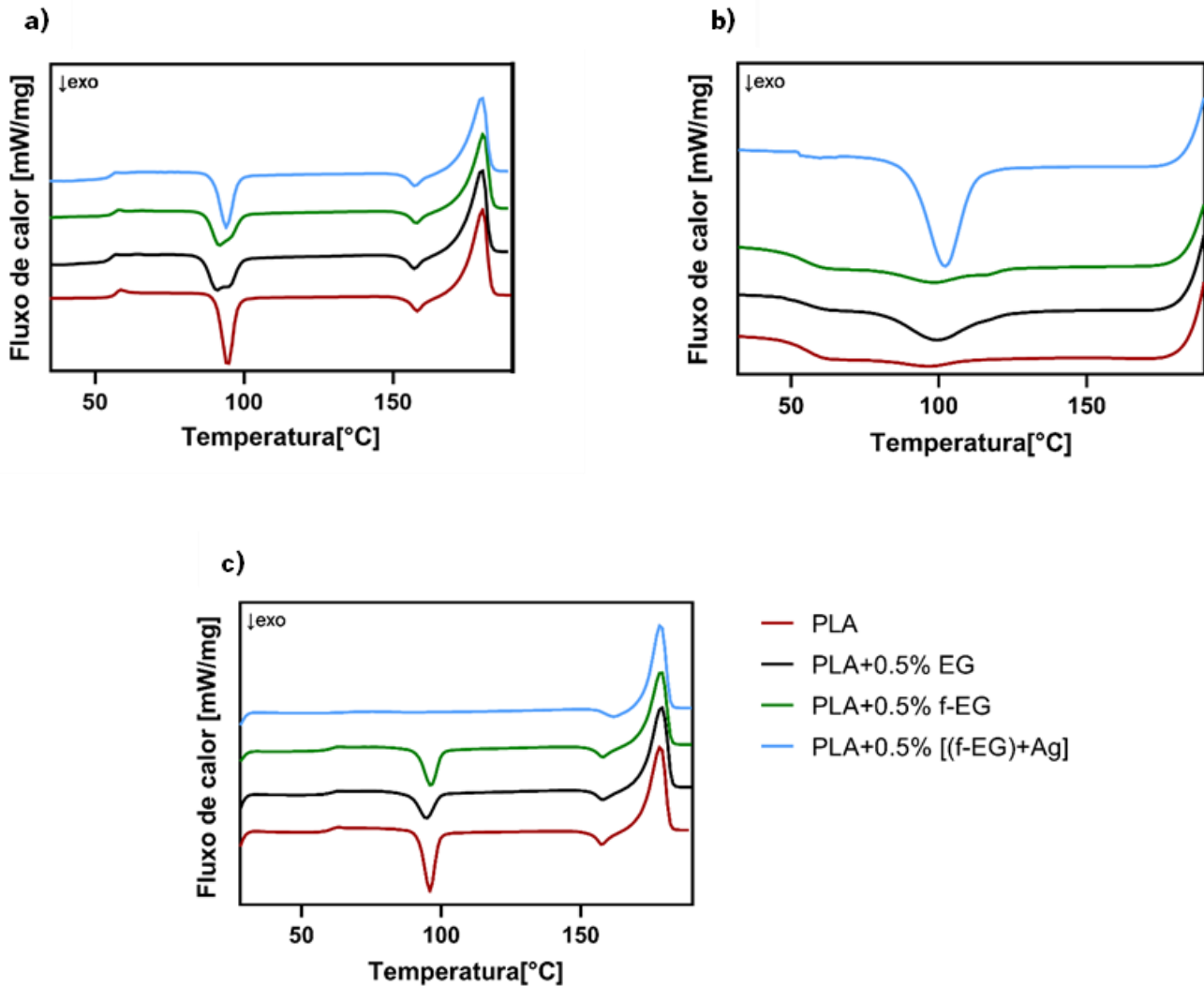


Figura 31: Resultados de DSC para (a) 1º aquecimento, (b) arrefecimento e (c) 2º aquecimento.

As propriedades térmicas dos filamentos, tais como, temperatura de transição vítrea (T_g), temperatura de cristalização a frio (T_c), temperatura de fusão (T_f), entalpia de cristalização (ΔH_c), entalpia de fusão (ΔH_f) e grau de cristalinidade (χ_c) estão indicadas nas Tabelas 10 e 11, para o 1º aquecimento e 2º aquecimento, respetivamente.

O grau de cristalinidade do PLA e dos filamentos compósitos foi calculado através da equação 6:

$$X_c (\%) = \frac{\Delta H_f - \Delta H_c}{\varphi_{PLA} \times \Delta H_f^0} \times 100 \quad (6)$$

Onde ΔH_f é a entalpia de fusão, ΔH_c é a entalpia de cristalização, φ_{PLA} é a fração do PLA presente no filamento e ΔH_f^0 é a entalpia de fusão do PLA 100% cristalino (93.7 J/g) [100].

Os gráficos relativamente ao 1º aquecimento são muito semelhantes para todos os filamentos: é observada a transição vítrea, o processo de cristalização a frio e a fusão, e as temperaturas a que se observam estas transições são muito próximas para o PLA e para os três compósitos preparados. O 1º aquecimento é realizado para avaliar as características térmicas do material extrudido. É também um processo de eliminar a história térmica das amostras. O arrefecimento controlado mostra o processo de cristalização do PLA e dos compósitos, observando-se um claro processo de cristalização apenas para o compósito com f-EG+Ag (Figura 28b) Relativamente ao gráfico do 2º aquecimento, apesar de todos os filamentos apresentarem temperaturas de transição vítrea e de fusão semelhantes, no filamento f-EG + Ag, o pico de cristalização a frio não é detetado, sendo este compósito o único com um pico de cristalização pronunciado durante o período de arrefecimento. Em ambos os aquecimentos surgiu um 2º pico de cristalização a frio, com uma intensidade baixa, muito próximo da fusão.

Tabela 10: Propriedades térmicas dos filamentos durante o 1º aquecimento

	T_g (°C)	T_c (°C)	2ª T_c (°C)	T_f (°C)	ΔH_c (J/g)	2ª ΔH_c (J/g)	ΔH_f (J/g)	X_c (%)
PLA	56.80	94.37	158.07	180.27	32.55	5.93	56.46	19.18
PLA + 0.5% EG	56.47	94.43	158.10	180.63	31.17	5.83	56.10	20.49
PLA + 0.5% f-EG	56.50	93.77	158.27	180.77	27.79	5.23	50.66	18.92
PLA + 0.5% [(f-EG) + Ag]	56.50	95.20	158.40	180.80	29.75	5.55	53.55	19.57

Tabela 11: Propriedades térmicas dos filamentos durante o 2º aquecimento

	1ª T_g (°C)	1ª T_c (°C)	2ª T_c (°C)	1ª T_f (°C)	ΔH_c (J/g)	2ª ΔH_c (J/g)	ΔH_f (J/g)	X_c (%)
PLA	60.27	96.07	157.73	178.67	29.28	5.94	55.54	21.69
PLA + 0.5% EG	60.07	94.97	157.93	178.77	17.61	4.69	55.45	35.56
PLA + 0.5% f-EG	60.20	95.93	157.77	178.77	22.23	4.94	49.99	24.48
PLA + 0.5% [(f-EG) + Ag]	54.73		161.77	178.80		4.97	51.50	49.91

A calorimetria diferencial de varrimento mostrou que a adição de grafeno à matriz polimérica, não afetou significativamente a temperatura de transição vítrea dos compósitos, que permanece entre 55-60 °C, gama típica do PLA puro [101]. Para concentrações baixas de reforço, como as nanopartículas estão uniformemente dispersas no interior da matriz, normalmente não interferem significativamente com a mobilidade das cadeias polimérica [102]. A temperatura de cristalização a frio não teve alterações significativas nos filamentos para o 1º e 2º aquecimento. No entanto, a 2ª temperatura de cristalização a frio, apresenta um aumento ligeiro no filamento de PLA +0.5% [(f-EG) + Ag]. Além disso todos os filamentos exibiram uma T_f semelhante de aproximadamente 180 °C. No 2º aquecimento, após apagar a história térmica, observa-se que o grau de cristalinidade do PLA nos compósitos aumentou com a introdução da EG, f-EG e f-EG + Ag no PLA. Assim, em condições de arrefecimento quasi-quietescentes, a formação de estruturas cristalinas foi promovida com a introdução dos aditivos de grafite, provavelmente devido ao efeito de nucleação adicional [103]. Espera-se que o aumento da cristalinidade nos *scaffolds* compósitos melhore as suas propriedades mecânicas.

4.3.6. Análise Mecânica Dinâmica (DMA)

Do ponto de vista mecânico, um dos principais paradigmas na engenharia de tecidos e na ciência biomecânica tem sido sempre que um *scaffold* deve imitar as propriedades biomecânicas do órgão ou tecido a ser substituído, de forma a fornecer apoio durante as fases iniciais de crescimento do tecido [104][105].

As propriedades mecânicas e viscoelásticas dos filamentos foram avaliadas com recurso ao DMA. A figura 32, apresenta a variação do módulo de armazenamento E' com o aumento de temperatura.

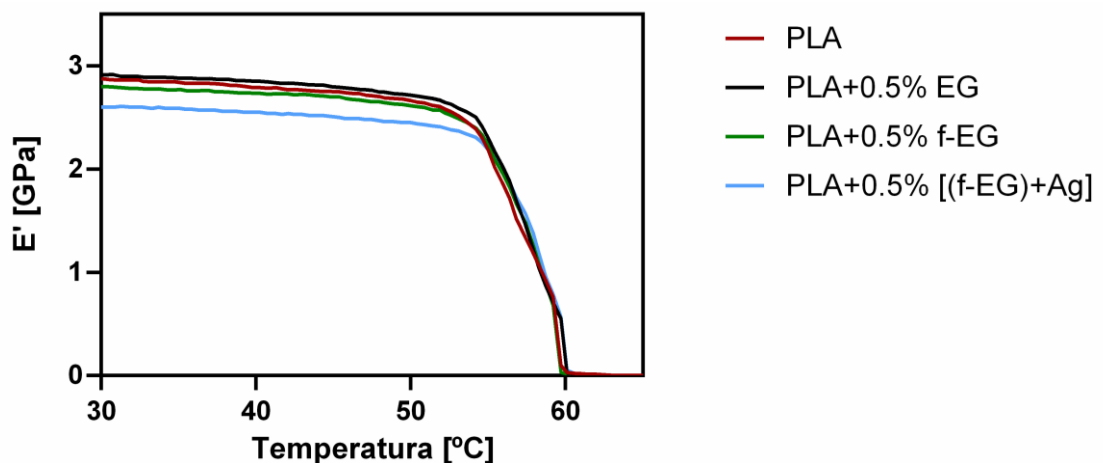


Figura 32: Módulo de armazenamento do PLA e dos filamentos compósitos em função da temperatura, na região da transição vítrea.

O módulo de armazenamento está frequentemente associado à rigidez de um material, considerado como capacidade de armazenamento de uma amostra [97]. Como se observa na Figura 32, a incorporação de nanopartículas de prata resulta na redução do módulo de armazenamento relativamente aos restantes compósitos.

A Tg pode se verificar no início da queda de E' ou no pico da curva de $\tan \delta$. Nas proximidades da Tg, observou-se uma diminuição acentuada do valor do módulo de armazenamento (E') que indica que os compósitos estão a passar por uma transição de um estado vítreo frágil para um estado de maior mobilidade molecular [95].

A Figura 33, apresenta o fator de amortecimento mecânico ($\tan \delta$) dos filamentos em função da temperatura.

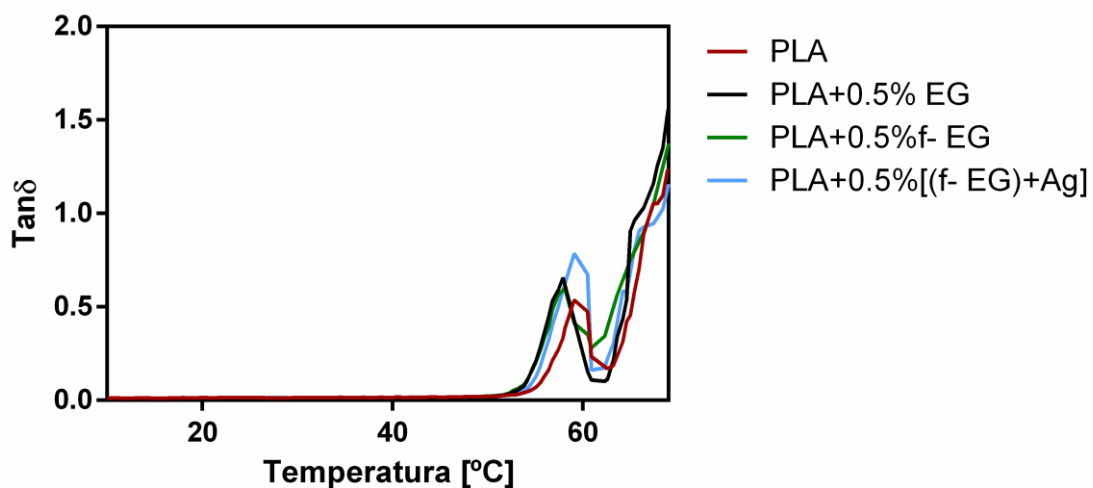


Figura 33: Fator de amortecimento do PLA e dos filamentos compósitos em função da temperatura, na região da transição vítrea.

Os filamentos compósitos com reforço apresentam valores de $\tan \delta$ mais elevados do que o filamento de PLA indicando que os compósitos reforçados com grafite possuem uma maior capacidade de dissipar energia, aumentando as suas capacidades de amortecimento mecânico [62][106].

As propriedades mecânicas/viscoelásticas do filamento de PLA e filamentos compósitos também foram avaliadas aos 37°C, temperatura típica do corpo humano. A Figura 34 apresenta o módulo de armazenamento a 37°C.

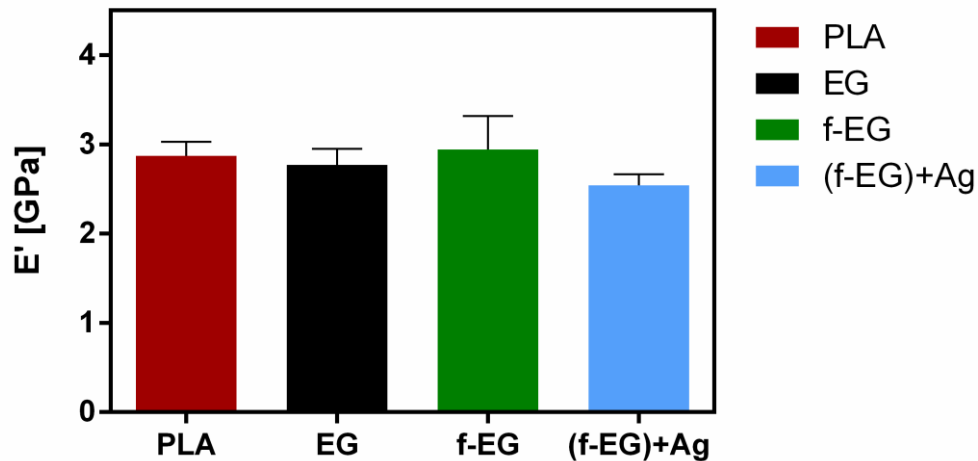


Figura 34: Módulo de armazenamento do PLA e dos filamentos compósitos a 37°C.

O filamento que detém o maior valor de módulo de armazenamento aos 37 °C é o filamento f-EG e o que possui menor valor é o filamento f-EG + Ag, embora as diferenças não sejam estatisticamente significativas. A adição de grafeno não melhorou consideravelmente as propriedades mecânicas dos filamentos compósitos, algo que já seria esperado uma vez que a percentagem de 0,5% em massa poderia não ser suficiente para alterar significativamente as propriedades mecânicas.

O módulo de elasticidade do LCA está entre os 100–165 MPa [14][15]. Apesar de as propriedades mecânicas não terem sido substancialmente melhoradas, os filamentos produzidos possuem as propriedades necessárias para o fim desejado, de acordo com os valores do módulo de elasticidade do LCA. O carácter viscoelástico destes filamentos tem particular relevância para a aplicação, uma vez que os ligamentos também exibem comportamento viscoelástico [107].

4.3.7. Resistividade Elétrica

A estimulação elétrica (ES) promove a reparação e regeneração de vários tecidos, incluindo osso, nervo e epiderme [108]. Os campos elétricos aplicados (estáticos e pulsantes) são largamente utilizados em práticas ortopédicas para melhorar a cicatrização ligamentar in vivo [109].

Na Tabela 12 estão apresentados os valores de resistência elétrica de cada filamento.

Tabela 12: Valores medidos da resistência elétrica dos filamentos.

	Resistividade elétrica (Ω.cm)
PLA	$2.72 \times 10^{11} \pm 6.45 \times 10^{10}$
PLA+0.5% EG	$1.30 \times 10^{11} \pm 3.08 \times 10^{10}$
PLA+0.5% f-EG	$5.11 \times 10^{10} \pm 3.50 \times 10^9$
PLA+0.5% [(f-EG) + Ag]	$5.52 \times 10^{10} \pm 1.91 \times 10^9$

O filamento com maior valor de resistividade é o filamento de PLA com $2.72 \times 10^{11} \Omega$.cm e o menor valor obtido corresponde ao filamento f-EG com $5.11 \times 10^{10} \Omega$.cm. Num estudo realizado recentemente, conclui-se que a resistividade elétrica do PLA sem a presença de grafite é da ordem de grandeza dos $10^{14} \Omega$.cm [110]. É possível observar um decréscimo considerável na resistência elétrica com a introdução dos reforços na matriz polimérica, apesar dos compósitos serem ainda isoladores elétricos. O método de medição utilizado não permite a medição correta da resistividade elétrica de materiais com resistividade superior a $10^{11} \Omega$.cm, por esse motivo a resistividade medida para o PLA ficou no valor limite que é possível medir, que é consideravelmente inferior à resistividade real do material. Vários estudos demonstraram que as propriedades elétricas dos nanocompósitos não dependem apenas do tipo de aditivo, mas também do histórico inicial de dispersão e processamento [99].

A introdução de cargas condutoras numa matriz polimérica promove a proliferação das células sob estimulação elétrica. O grafeno e seus derivados mostraram serem promissores como reforço em *scaffolds* poliméricos, uma vez que estudos recentes sugerem que pode aumentar a proliferação celular e pode ser eliminado por excreção renal, fagocitose e/ou endocitose [111].

4.4. Caracterização Macroscópica dos *Scaffolds*

4.4.1.1. Morfologia dos *scaffolds* produzidos

As Figuras 35-38 ilustram os *scaffolds* produzidos por impressão 3D, utilizando filamentos de PLA, PLA+0,5% EG, PLA+0,5% f-EG e PLA+0,5[(f-EG) +Ag], com objetivas de 1.6x e 6x, em diferentes posições: frente, topo e lateral. O microscópio digital permitiu observar a sua estrutura porosa e forma adequada. Os *scaffolds* de PLA apresentam uma morfologia e tamanho de poros semelhante aos dos *scaffolds* de nanocompósitos. Para TE os *scaffolds* requerem um tamanho dos poros superior a 150 μm , apresentar uma porosidade não superior a 80% e por fim, a sua estrutura tem de ser 100% interligada com um desenho e produção camada a camada. A temperatura do bico de impressão e a velocidade de impressão foram variadas de modo a obter *scaffolds* com a geometria e porosidade adequadas para TE. Quando estes valores foram definidos como 185 $^{\circ}\text{C}$ e 45 $\text{mm} \cdot \text{s}^{-1}$, respetivamente, os *scaffolds* exibiam poros bem definidos, sem deformação da camada, e boa definição geométrica. A impressão horizontal exigiu novamente a utilização de um material de suporte (também PLA) com um ângulo de contacto de 5 $^{\circ}$, o qual foi facilmente removido após arrefecimento. À escala macroscópica, todos os *scaffolds* apresentavam uma boa dispersão do reforço.

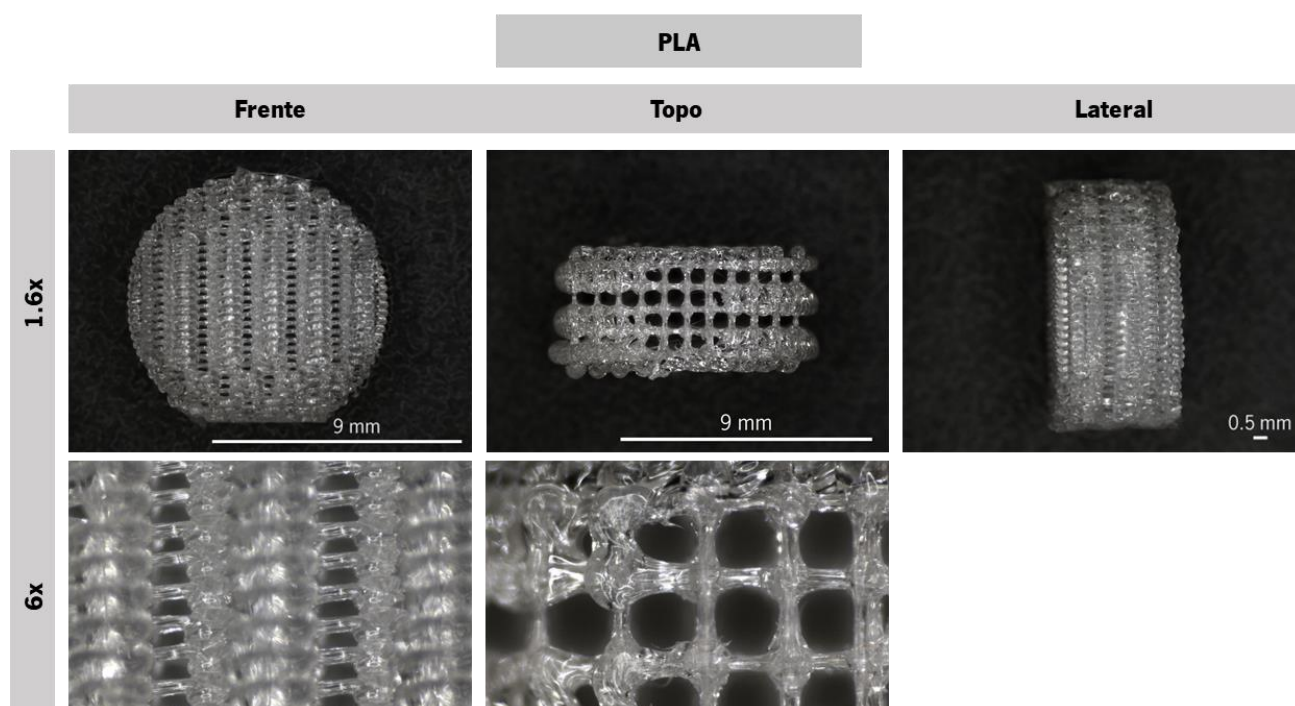


Figura 35: Scaffold de PLA produzido por impressão 3D.

PLA + 0.5% EG

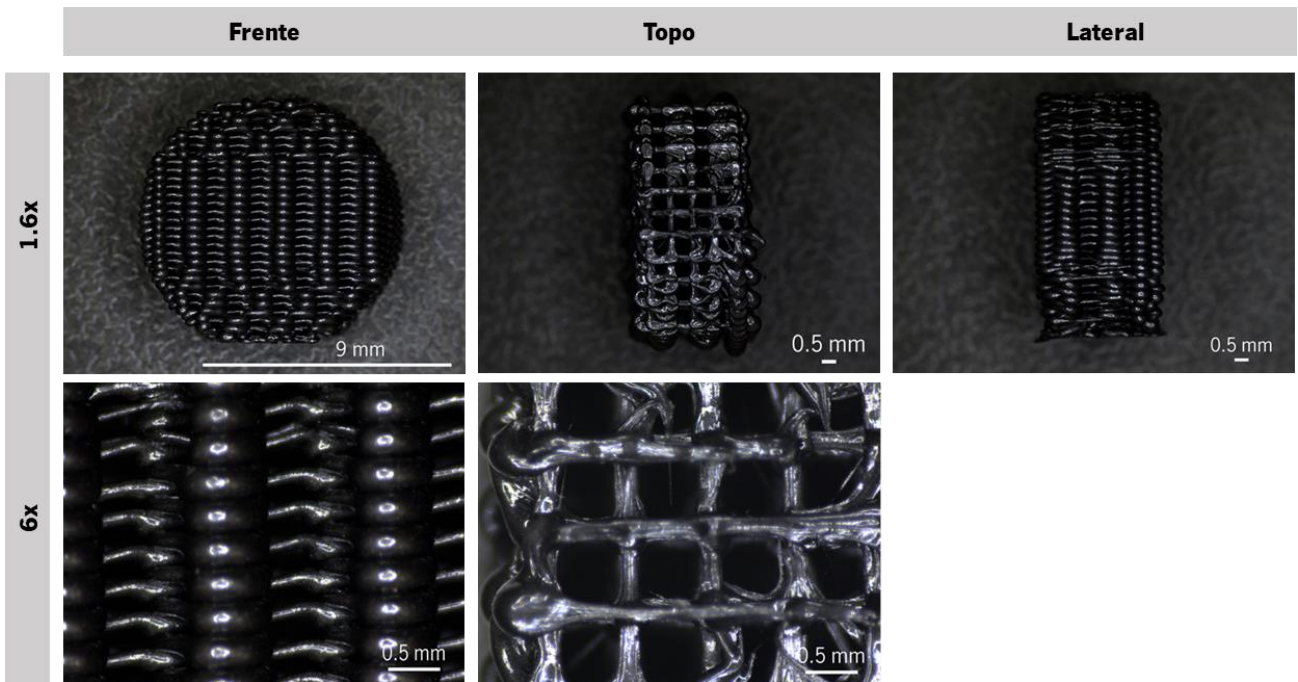


Figura 36: Scaffold de PLA + 0,5% EG produzido por impressão 3D.

PLA + 0.5% f-EG

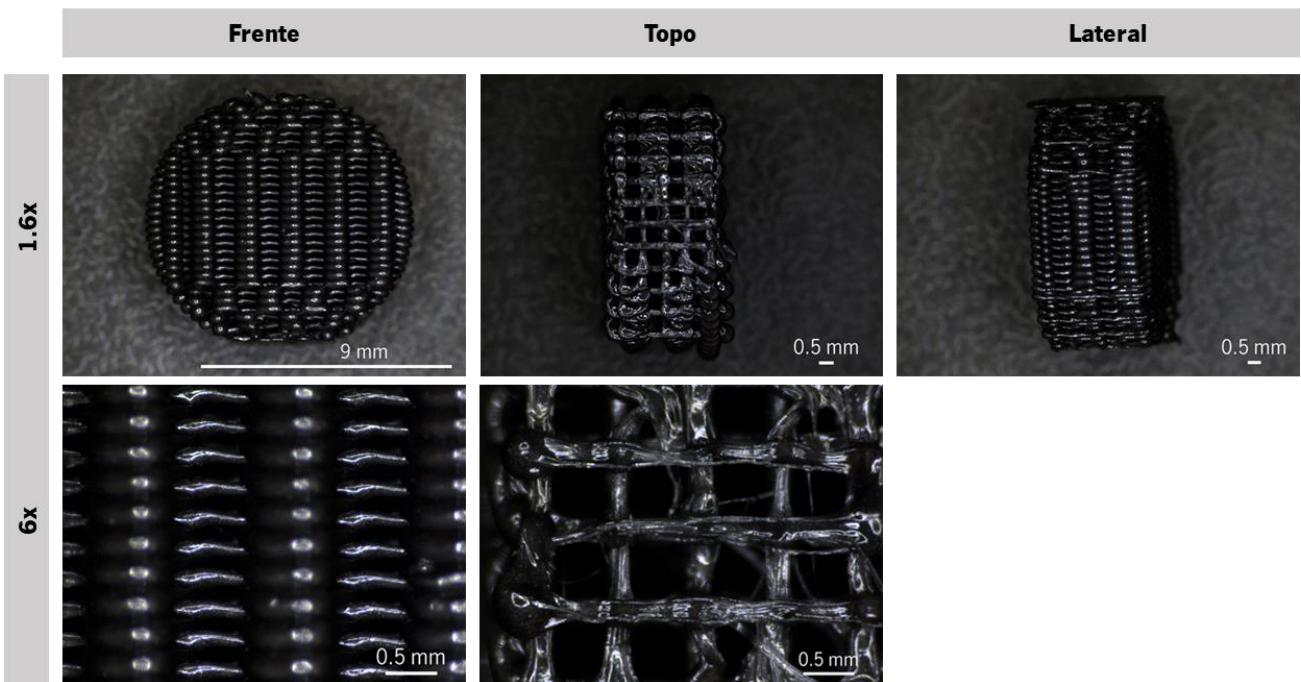


Figura 37: Scaffold de PLA + 0,5% f-EG produzido por impressão 3D.

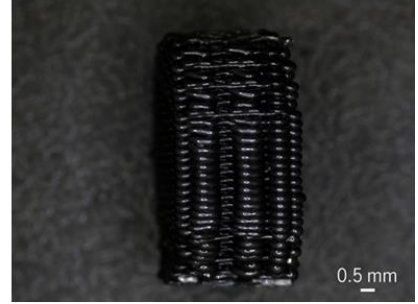
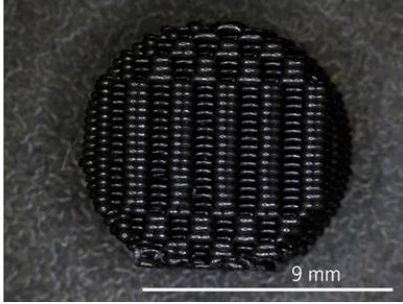
PLA + 0.5% [(f-EG) + Ag]

Frente

Topo

Lateral

1.6x



6x

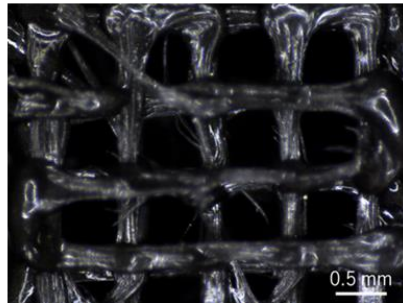
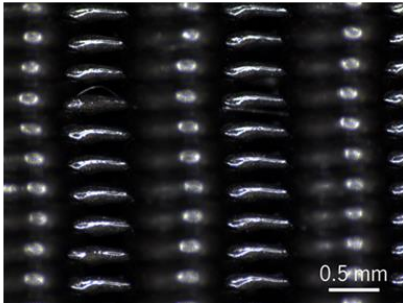


Figura 38: Scaffold de PLA + 0,5% [(f-EG) + Ag] produzido por impressão 3D.

Capítulo 5

Conclusão

5. Conclusão

O principal objetivo desta dissertação foi preparar filamentos de nanocompósitos de PLA e grafite exfoliada, com e sem funcionalização química e com adição de nanopartículas de prata, com características adequadas para impressão 3D. Previamente à formação dos filamentos, procedeu-se à funcionalização química da grafite exfoliada e ancoragem das nanopartículas de prata. Foi efetuada a funcionalização da grafite exfoliada através da reação cicloadição 1,3-dipolar, apresentando resultados satisfatórios na adesão das partículas ao polímero. Também se procedeu à mistura dos reforços e todas estas etapas foram realizadas com sucesso.

No processo de extrusão foram produzidos filamentos de PLA e PLA reforçado com 0,5% em massa de grafite exfoliada. Os filamentos nanocompósitos foram caracterizados, de forma a estudar o efeito da incorporação de nanopartículas de carbono na matriz polimérica do PLA sobre a morfologia e propriedades térmicas, mecânicas e elétricas. A presença dos reforços não afetou negativamente a estabilidade térmica dos filamentos compósitos, pelo contrário, a sua estabilidade térmica aumentou relativamente ao filamento PLA. Observou-se ainda que as propriedades térmicas dos filamentos compósitos não diferem muito das propriedades do polímero PLA de *grade* médico, levando à conclusão de que a influência da adição de EG, f-EG e f-EG + Ag foi pequena. Relativamente às propriedades mecânicas, não houve uma alteração relevante, apesar de o filamento com f-EG + Ag, apresentar um módulo de armazenamento mais baixo. Em termos de morfologia, a adição de reforço à matriz proporcionou uma superfície mais rugosa nos filamentos compósitos. Para além disso, foi observada uma boa dispersão e adesão das nanopartículas nos filamentos compósitos. Os testes elétricos efetuados mostraram não haver uma alteração significativa da resistividade, uma vez que a percentagem utilizada era reduzida. No entanto foi possível observar um decréscimo na resistividade elétrica com a introdução dos reforços na matriz polimérica.

Após a caracterização dos filamentos foi ainda possível produzir *scaffolds* por impressão 3D, demonstrando o potencial dos filamentos produzidos para a utilização desta técnica. Os *scaffolds* apresentam uma porosidade apropriada para a aplicação pretendida.

De acordo com os resultados obtidos, conclui-se que os filamentos produzidos nesta dissertação podem ser utilizados para a produção de *scaffolds* para impressão 3D, com o intuito final de serem utilizados para a regeneração do ligamento cruzado anterior.

5.1. Trabalho futuro

Apesar de os filamentos apresentarem as propriedades adequadas e a sua utilização em impressão 3D ter sido promissora para a produção de *scaffolds*, ainda é necessário a realização de certas etapas para serem utilizados na aplicação pretendida.

Desta forma, são apresentadas a seguir por tópicos, algumas sugestões a ter em conta no futuro:

- Realização de ensaios mecânicos aos *scaffolds* para avaliar as suas propriedades mecânicas na estrutura pretendida;
- Realização de testes de degradação aos *scaffolds* num ambiente com condições idênticas às do corpo humano.
- Realização de testes de biocompatibilidade e citotoxicidade dos *scaffolds* com os compósitos de PLA de grade médico.

6. Referências

- [1] N. L. Leong, J. L. Kator, T. L. Clemens, A. James, M. Enamoto-Iwamoto, and J. Jiang, "Tendon and Ligament Healing and Current Approaches to Tendon and Ligament Regeneration," *J. Orthop. Res.*, vol. 38, p. 1, 2020.
- [2] C. Yilgor, P. Yilgor Huri, and G. Huri, "Tissue engineering strategies in ligament regeneration," *Stem Cells Int.*, vol. 2012, pp. 1–4, 2012.
- [3] S. L. Hsu, R. Liang, and S. L. Y. Woo, "Functional tissue engineering of ligament healing," *Sport. Med. Arthrosc. Rehabil. Ther. Technol.*, vol. 2, no. 12, pp. 1–4, 2010.
- [4] C. B. Gomes, "Poly(lactide acid) and Graphene-based Fibers for Biomedical Applications." 2019.
- [5] X. Chen *et al.*, "Ligament regeneration using a knitted silk scaffold combined with collagen matrix," *Biomaterials*, vol. 29, p. 3683, 2008.
- [6] F. A. Petrigliano, D. R. McAllister, and B. M. Wu, "Tissue Engineering for Anterior Cruciate Ligament Reconstruction: A Review of Current Strategies," *Arthrosc. - J. Arthrosc. Relat. Surg.*, vol. 22, no. 4, pp. 441–446, 2006.
- [7] H. H. Lu *et al.*, "Anterior cruciate ligament regeneration using braided biodegradable scaffolds: In vitro optimization studies," *Biomaterials*, vol. 26, pp. 4805–4806, 2005.
- [8] T. Nau and A. Teuschl, "Regeneration of the anterior cruciate ligament: Current strategies in tissue engineering," *World J. Orthop.*, vol. 6, no. 1, pp. 127–128, 2015.
- [9] C. T. Laurencin and J. W. Freeman, "Ligament tissue engineering: An evolutionary materials science approach," *Biomaterials*, vol. 26, pp. 7530–7533, 2005.
- [10] E. H. L. Zigang Ge, Fang Yang, James C. H. Goh, Seeram Ramakrishna, "Biomaterials and scaffolds for ligament tissue engineering," *Wiley Interdisc.*, vol. 79, pp. 639–645, 2006.
- [11] S. G. McLean, K. F. Mallett, and E. M. Arruda, "Deconstructing the Anterior Cruciate Ligament: What We Know and Do Not Know about Function, Material Properties, and Injury Mechanics," *J. Biomech. Eng.*, vol. 137, no. 2, pp. 1–9, 2015.
- [12] T. Fukuda, "Lesão Do Ligamento Cruzado Anterior." <https://www.institutotrata.com.br/ligamento-cruzado-anterior/> (accessed Jul. 20, 2022).
- [13] A. C. Gurlek, B. Sevinc, E. Bayrak, and C. Eriskin, "Synthesis and characterization of polycaprolactone for anterior cruciate ligament regeneration," *Mater. Sci. Eng. C*, vol. 71, p. 820, 2017.
- [14] N. Chandrashekar, H. Mansouri, J. Slauterbeck, and J. Hashemi, "Sex-based differences in the tensile properties of the human anterior cruciate ligament," *J. Biomech.*, vol. 39, pp. 2943–2946, 2006.
- [15] J. Chandrashekar, N; Mansouri, H; Slauterbeck, J R; Hashemi, "The mechanical properties of human anterior cruciate ligament are dependent on sex."
- [16] R. M. Novais, F. Simon, P. Pötschke, T. Villmow, J. A. Covas, and M. C. Paiva, "Poly(lactic acid) Composites with Poly(lactic acid)-Modified Carbon Nanotubes," *J. Polym. Sci. Part A Polym. Chem.*, vol. 51, pp. 3740–3742, 2013.

- [17] C. M. Eleonora Carletti, Antonella Motta, "Scaffolds for Tissue Engineering and 3D Cell Culture," in *3D Cell Culture: Methods and Protocols, Methods in Molecular Biology*, vol. 695, J. W. Haycock, Ed. 2011, pp. 17–35.
- [18] F. J. O'Brien, "Biomaterials & scaffolds for tissue engineering," *Materials Today*, vol. 14, no. 3, pp. 88–94, 2011.
- [19] J. C. Monteiro, "Tratamento das lesões do LCA em atletas : Futura aplicação da engenharia de tecidos?," 2017.
- [20] N. L. Leong, F. A. Petrigliano, and D. R. McAllister, "Current tissue engineering strategies in anterior cruciate ligament reconstruction," *J. Biomed. Mater. Res. - Part A*, pp. 1–4, 2013, doi: 10.1002/jbm.a.34820.
- [21] D. W. Huttmacher, "Scaffolds in tissue engineering bone and cartilage," *Biomaterials*, vol. 21, p. 2535, 2000.
- [22] J. Freeman and A. Kwansa, "Recent Advancements in Ligament Tissue Engineering: The Use of Various Techniques and Materials for ACL Repair," *Recent Patents Biomed. Eng.*, vol. 1, no. 1, pp. 20–23, 2010.
- [23] I. Armentano, M. Dottori, E. Fortunati, S. Mattioli, and J. M. Kenny, "Biodegradable polymer matrix nanocomposites for tissue engineering: A review," *Polym. Degrad. Stab.*, vol. 95, pp. 2128–2130, 2010.
- [24] A. J. R. Lasprilla, G. A. R. Martinez, B. H. Lunelli, A. L. Jardini, and R. M. Filho, "Poly-lactic acid synthesis for application in biomedical devices - A review," *Biotechnol. Adv.*, vol. 30, pp. 321–326, 2012.
- [25] C. Ayres, "REVISÃO DAS ROTAS DE POLIMERIZAÇÃO DO ÁCIDO LÁCTICO FACTÍVEIS PARA O PREPARO DE MATERIAIS ÚTEIS PARA APLICAÇÕES EM MEDICINA REGENERATIVA," in *Coleção desafios das engenharias: engenharia biomédica*, vol. 5, P. D. A. C. de Oliveira, Ed. Atena Editora, 2021, pp. 50–58.
- [26] D. Garlotta, "A Literature Review of Poly (Lactic Acid) A Literature Review of Poly (Lactic Acid)," *J. Polym. Environ.*, vol. 9, no. 2, p. 66, 2002.
- [27] M. A. Horban, A. A. Silva, M. P. Maydl, R. Castella, and C. E. Lunelli, "Produção De Poli (Ácido Láctico) a Partir Do Soro Do Leite," *J. Eng. Exact Sci.*, vol. 3, no. 8, pp. 1137–1138, 2017.
- [28] S. M. Davachi and B. Kaffashi, *Polylactic Acid in Medicine*, vol. 54. 2015.
- [29] A. C. S. de Oliveira and S. V. Borges, "Poli (Ácido Láctico) aplicado para embalagens de alimentos: uma revisão," *Rev. Eletrônica Mater. e Process.*, vol. 15, no. 1, pp. 2–6, 2020.
- [30] A. A. Konta, M. García-Piña, and D. R. Serrano, "Personalised 3D printed medicines: Which techniques and polymers are more successful?," *Bioengineering*, vol. 4, no. 79, pp. 1–9, 2017.
- [31] J. C. Camargo, Á. R. Machado, E. C. Almeida, and E. F. M. S. Silva, "Mechanical properties of PLA-graphene filament for FDM 3D printing," *Int. J. Adv. Manuf. Technol.*, vol. 103, no. 5–8, pp. 1–3, 2019.
- [32] V. D. Jahno, "SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DO POLI (L-ÁCIDO LÁCTICO) PARA USO COMO BIOMATERIAL," 2005.

- [33] G. Li *et al.*, "Synthesis and Biological Application of Polylactic Acid," *molecules*, vol. 25, pp. 1–7, 2020.
- [34] D. D. L. Chung, "Review: Graphite," *J. Mater. Sci.*, vol. 37, pp. 1475–1476, 2002.
- [35] J. C. SŁonczewskit and P. R. Weiss, "Band structure of Graphite," *J. Chem. Phys.*, vol. 109, no. 2, p. 272, 1953.
- [36] J. P. HOWE, "Properties of Graphite," *J. Am. Ceram. Soc.*, vol. 35, no. 11, p. 275, 1952.
- [37] M. P. and R.Gupta, "Graphite, Graphene and Their Nanocomposites," 2013.
- [38] R. Sengupta, M. Bhattacharya, S. Bandyopadhyay, and A. K. Bhowmick, "A review on the mechanical and electrical properties of graphite and modified graphite reinforced polymer composites," *Prog. Polym. Sci.*, vol. 36, p. 641, 2011.
- [39] G. Furdin, "Exfoliation process and elaboration of new carbonaceous materials," *Fuel*, vol. 77, no. 6, p. 479, 1998.
- [40] D. D. L. Chung, "A review of exfoliated graphite," *J. Mater. Sci.*, vol. 51, no. 1, pp. 554–556, 2016.
- [41] D. D. L. Chung, "Review: Exfoliation of graphite," *J. Mater. Sci.*, vol. 22, p. 4190, 1987.
- [42] E. P. F. Cunha, "Funcionalização Química de Nanotubos de Carbono e Formação de Grafeno," 2011.
- [43] S. P. Lonkar, Y. S. Deshmukh, and A. A. Abdala, "Recent advances in chemical modifications of graphene," *Nano Res.*, vol. 8, no. 4, pp. 1039–1040, 2015.
- [44] N. M. Hasan and B. D. G. Marion, "Grafeno: Inovações, Aplicações e sua Comercialização," *Interfaces Científicas - Exatas e Tecnológicas*, vol. 2, no. 1, pp. 29–32, 2016.
- [45] M. C. P. Da Silva, "MÉTODOS DE DISPERSÃO E FUNCIONALIZAÇÃO DE NANOPARTÍCULAS À BASE DE CARBONO," 2017.
- [46] P. Cataldi, A. Athanassiou, and I. S. Bayer, "Graphene nanoplatelets-based advanced materials and recent progress in sustainable applications," *Appl. Sci.*, vol. 8, pp. 3–4, 2018.
- [47] ACS MATERIAL, "What Are Nanoplatelets?" <https://www.acsmaterial.com/blog-detail/what-are-nanoplatelets.html>.
- [48] L. M.Pastrana-Martinez, S. Morales-Torres, H. T. Gomes, and A. M. T. Silva, "Nanotubos e Grafeno: Os primos mais jovens na família do carbono," *Library (Lond)*, pp. 21–27, 1920.
- [49] V. Georgakilas *et al.*, "Functionalization of graphene: Covalent and non-covalent approaches, derivatives and applications," *Chem. Rev.*, vol. 112, no. 11, pp. 6157–6159, 2012.
- [50] A. Criado, M. Melchionna, S. Marchesan, and M. Prato, "The Covalent Functionalization of Graphene on Substrates," *Angew. Chemie - Int. Ed.*, vol. 54, no. 37, pp. 10735–10737, 2015.
- [51] L. Basta *et al.*, "Covalent organic functionalization of graphene nanosheets and reduced graphene oxide via 1,3-dipolar cycloaddition of azomethine ylide," *Nanoscale Adv.*, vol. 3, no. 20, pp. 5841–5842, 2021.
- [52] E. Cunha *et al.*, "The chemical functionalization of graphene nanoplatelets through solvent-free reaction," *RSC Adv.*, vol. 8, no. 58, pp. 33564–33565, 2018.

- [53] Z. S. B. de SOUZA, “Estudo da funcionalização do grafeno como via para compatibilização com a matriz de poli(tereftalato de etileno),” 2020.
- [54] P. M. Tiwari, K. Vig, V. A. Dennis, and S. R. Singh, “Functionalized gold nanoparticles and their biomedical applications,” *Nanomaterials*, vol. 1, no. 1, pp. 31–32, 2011.
- [55] A. C. Burduşel, O. Gherasim, A. M. Grumezescu, L. Mogoantă, A. Fikai, and E. Andronescu, “Biomedical applications of silver nanoparticles: An up-to-date overview,” *Nanomaterials*, vol. 8, no. 9, pp. 1–4, 2018.
- [56] S. Kumar, S. Raj, S. Jain, and K. Chatterjee, “Multifunctional biodegradable polymer nanocomposite incorporating graphene-silver hybrid for biomedical applications,” *Mater. Des.*, vol. 108, pp. 319–332, 2016.
- [57] C. Liao, Y. Li, and S. C. Tjong, “Antibacterial activities of aliphatic polyester nanocomposites with silver nanoparticles and/or graphene oxide sheets,” *Nanomaterials*, vol. 9, no. 8, pp. 1–10, 2019.
- [58] C. Sánchez-rodríguez, M. D. Avilés, R. Pamies, F. J. Carrión-vilches, J. Sanes, and M. D. Bermúdez, “Extruded PLA Nanocomposites Modified by Graphene Oxide and Ionic Liquid,” *Polymers (Basel)*, vol. 13, no. 4, p. 2, 2021.
- [59] J. Sanes, C. Sánchez, R. Pamies, M. D. Avilés, and M. D. Bermúdez, “Extrusion of polymer nanocomposites with graphene and graphene derivative nanofillers: An overview of recent developments,” *Materials (Basel)*, vol. 13, no. 3, pp. 1–2, 2020.
- [60] M. A. Repka *et al.*, “Melt extrusion: Process to product,” *Expert Opin. Drug Deliv.*, vol. 9, no. 1, pp. 105–109, 2012.
- [61] I. Armentano *et al.*, “Nanocomposites based on biodegradable polymers,” *Materials (Basel)*, vol. 11, no. 5, 2018.
- [62] M. Silva *et al.*, “Poly(Lactic acid)/graphite nanoplatelet nanocomposite filaments for ligament scaffolds,” *Nanomaterials*, vol. 11, pp. 1–17, 2021.
- [63] H. Guo, R. Lv, and S. Bai, “Recent advances on 3D printing graphene-based composites,” *Nano Mater. Sci.*, vol. 1, pp. 1–7, 2019.
- [64] C. Aumnate, A. Pongwisuthiruchte, P. Pattananuwat, and P. Potiyaraj, “Fabrication of ABS/Graphene oxide composite filament for fused filament fabrication (FFF) 3D Printing,” *Adv. Mater. Sci. Eng.*, vol. 2018, pp. 1–2, 2018.
- [65] D. Zhang *et al.*, “Fabrication of highly conductive graphene flexible circuits by 3D printing,” *Synth. Met.*, vol. 217, pp. 79–80, 2016.
- [66] X. Wang, M. Jiang, Z. Zhou, J. Gou, and D. Hui, “3D printing of polymer matrix composites: A review and prospective,” *Compos. Part B Eng.*, vol. 110, pp. 1–18, 2017.
- [67] T. N. A. T. Rahim, A. M. Abdullah, and H. Md Akil, “Recent Developments in Fused Deposition Modeling-Based 3D Printing of Polymers and Their Composites,” *Polym. Rev.*, vol. 59, no. 4, pp. 1–6, 2019.
- [68] R. Schipani, D. R. Nolan, C. Lally, and D. J. Kelly, “Integrating finite element modelling and 3D printing to engineer biomimetic polymeric scaffolds for tissue engineering,” *Connect. Tissue Res.*, p. 1, 2020.

- [69] J. Bustillos, D. Montero, P. Nautiyal, A. Loganathan, B. Boesl, and A. Agarwal, "Integration of Graphene in Poly(Lactic) Acid by 3D Printing to Develop Creep and Wear-Resistant Hierarchical Nanocomposites," *Polym. Polym. Compos.*, vol. 16, p. 1, 2008.
- [70] A. Salerno, M. Oliviero, E. Di Maio, S. Iannace, and P. A. Netti, "Design of porous polymeric scaffolds by gas foaming of heterogeneous blends," *J. Mater. Sci. Mater. Med.*, vol. 20, no. 10, pp. 2043–2044, 2009.
- [71] M. P. Browne and M. Pumera, "Impurities in graphene/PLA 3D-printing filaments dramatically influence the electrochemical properties of the devices," *Chem. Commun.*, vol. 55, p. 1, 2019.
- [72] H. Belaid *et al.*, "Development of new biocompatible 3D printed graphene oxide-based scaffolds," *Mater. Sci. Eng. C*, vol. 110, pp. 2–6, 2020.
- [73] H. B. Kim, D. K. Patel, Y. R. Seo, and K. T. Lim, "3D-Printed Scaffolds with Reinforced Poly (Lactic Acid)/Carbon Nanotube Filaments Based on Melt Extrusion," *J. Biosyst. Eng.*, vol. 44, no. 2, pp. 120–127, 2019.
- [74] A. Liu *et al.*, "3D Printing Surgical Implants at the clinic: A Experimental Study on Anterior Cruciate Ligament Reconstruction," *Sci. Rep.*, vol. 6, p. 6, 2016.
- [75] J. J. Grant, S. C. Pillai, S. Hehir, M. McAfee, and A. Breen, "Biomedical Applications of Electrospun Graphene Oxide," *ACS Biomater. Sci. Eng.*, vol. 7, no. 4, pp. 1278–1282, 2021.
- [76] H. M. Ng, N. M. Saidi, F. S. Omar, K. Ramesh, S. Ramesh, and S. Bashir, "Thermogravimetric Analysis of Polymers," *Encycl. Polym. Sci. Technol.*, pp. 1–25, 2018.
- [77] N. Saadatkhan *et al.*, "Experimental methods in chemical engineering: Thermogravimetric analysis—TGA," *Can. J. Chem. Eng.*, vol. 98, no. 1, pp. 1–15, 2020.
- [78] W.J. Sichina, "Characterization of Polymers Using TGA," *PerkinElmer*, pp. 1–4, 2011.
- [79] T. R. Manley, "Thermal analysis of polymers," *Pure Appl. Chem.*, vol. 61, no. 8, pp. 10–46, 1989.
- [80] A. C. Ferrari, "Raman spectroscopy of graphene and graphite: Disorder, electron-phonon coupling, doping and nonadiabatic effects," *Solid State Commun.*, vol. 143, no. 1–2, pp. 47–57, 2007, doi: 10.1016/j.ssc.2007.03.052.
- [81] J. Bin Wu, M. L. Lin, X. Cong, H. N. Liu, and P. H. Tan, "Raman spectroscopy of graphene-based materials and its applications in related devices," *R. Soc. Chem.*, vol. 47, no. 5, pp. 1–2, 2018.
- [82] H. C. and Y. P. C. Issac Childres, Luis A. Jauregui, Wonjun Park, "Raman Spectroscopy of graphene and related materials," in *The Dictionary of Genomics, Transcriptomics and Proteomics*, 2015, pp. 1–8.
- [83] M. S. Dresselhaus, A. Jorio, M. Hofmann, G. Dresselhaus, and R. Saito, "Perspectives on carbon nanotubes and graphene Raman spectroscopy," *Nano Lett.*, vol. 10, pp. 751–752, 2010.
- [84] R. Saito, M. Hofmann, G. Dresselhaus, A. Jorio, and M. S. Dresselhaus, "Raman spectroscopy of graphene and carbon nanotubes," *Adv. Phys.*, vol. 60, no. 3, p. 422, 2011.
- [85] M. Wall, "The Raman Spectroscopy of Graphene and the Determination of Layer Thickness," *Thermo Sci.*, pp. 1–2, 2011.

- [86] W. Zhou, R. Apkarian, Z. L. Wang, and D. Joy, "Fundamentals of scanning electron microscopy (SEM)," *Scanning Microsc. Nanotechnol. Tech. Appl.*, pp. 1–9, 2007.
- [87] G. H. Michler, *Electron Microscopy of Polymers*. Springer, 2008.
- [88] C. for E. M. K D Vernon-Parry, "Microscopy : an introduction," vol. 13, no. 4, pp. 40–41, 2000.
- [89] Dr. M. Kannan, "Scanning Electron Microscopy: Principle, Components and Applications," *Fundam. Appl. Nanotechnol.*, vol. 3, pp. 81–90, 2015.
- [90] Spectradyne, "Electron microscopy for particle size analysis."
https://nanoparticleanalyzer.com/technology-electronmicroscopy.php?gclid=Cj0KCQjwrs2XBhDjARIsAHVymmSd-EHHw_jDNpgCFAqcxXMWCnOF1iQfX6ZCotXS0I7I0RKUAQ4oMUkaAm5yEALw_wcB.
- [91] S. Sinha Ray, "Structure and Morphology Characterization Techniques," *Clay-Containing Polym. Nanocomposites*, p. 60, 2013.
- [92] Sebastião V. Canevarolo Jr, *Técnicas de caracterização de polímeros*. Artliber, 2004.
- [93] C. Schick, "Differential scanning calorimetry (DSC) of semicrystalline polymers," *Anal. Bioanal. Chem.*, vol. 395, no. 6, pp. 1589–1590, 2009.
- [94] G. Swaminathan and K. Shivakumar, "A Re-examination of DMA testing of polymer matrix composites," *J. Reinf. Plast. Compos.*, vol. 28, pp. 979–980, 2009.
- [95] K. P. Menard and N. R. Menard, *Dynamic Mechanical Analysis in the Analysis of Polymers and Rubbers*, no. 9. 2015.
- [96] Debra Dunson, "Characterization of Polymers using Dynamic Mechanical Analysis." pp. 1–8, 2021.
- [97] N. Saba, M. Jawaid, O. Y. Alothman, and M. T. Paridah, "A review on dynamic mechanical properties of natural fibre reinforced polymer composites," *Constr. Build. Mater.*, vol. 106, pp. 149–150, 2016.
- [98] J. Wiley, *Fundamentals of Materials Science and Engineering An Interactive*. John Wiley & Sons, Inc., 2001.
- [99] Y. Gao, O. T. Picot, E. Bilotti, and T. Peijs, "Influence of filler size on the properties of poly(lactic acid) (PLA)/graphene nanoplatelet (GNP) nanocomposites," *Eur. Polym. J.*, vol. 86, pp. 117–131, 2017, [Online]. Available: <http://dx.doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2016.10.045>.
- [100] S. Jia, D. Yu, Y. Zhu, Z. Wang, L. Chen, and L. Fu, "Morphology, crystallization and thermal behaviors of PLA-based composites: Wonderful effects of hybrid GO/PEG via dynamic impregnating," *Polymers (Basel)*, vol. 9, pp. 5–10, 2017.
- [101] L. Santana, J. L. Alves, A. da C. Sabino Netto, and C. Merlini, "A comparative study between PETG and PLA for 3D printing through thermal, chemical and mechanical characterization," *Rev. Mater.*, vol. 23, no. 4, p. 2, 2018.
- [102] M. A. Bashir, "Use of Dynamic Mechanical Analysis (DMA) for Characterizing Interfacial Interactions in Filled Polymers," *Solids*, vol. 2, no. 1, pp. 108–111, 2021.
- [103] R. Kotsilkova, I. Petrova-Doycheva, D. Menseidov, E. Ivanov, A. Paddubskaya, and P. Kuzhir, "Exploring thermal annealing and graphene-carbon nanotube additives to enhance crystallinity,

- thermal, electrical and tensile properties of aged poly(lactic) acid-based filament for 3D printing,” *Compos. Sci. Technol.*, vol. 181, pp. 1–7, 2019.
- [104] L. Moroni, J. R. De Wijn, and C. A. Van Blitterswijk, “3D fiber-deposited scaffolds for tissue engineering: Influence of pores geometry and architecture on dynamic mechanical properties,” *Biomaterials*, vol. 27, pp. 974–975, 2006.
- [105] H. Y. Mi *et al.*, “Characterization of thermoplastic polyurethane/poly(lactic) acid (TPU/PLA) tissue engineering scaffolds fabricated by microcellular injection molding,” *Mater. Sci. Eng. C*, pp. 1–3, 2013.
- [106] M. Mansour, K. Tsongas, and D. Tzetzis, “Measurement of the mechanical and dynamic properties of 3D printed poly(lactic) acid reinforced with graphene,” *Polym. Technol. Mater.*, vol. 58, no. 11, pp. 1234–1244, 2019.
- [107] T. Shearer, W. J. Parnell, B. Lynch, H. R. C. Screen, and I. D. Abrahams, “A recruitment model of tendon viscoelasticity that incorporates fibril creep and explains strain-dependent relaxation,” *J. Biomech. Eng.*, vol. 142, no. 7, pp. 1–13, 2020.
- [108] C. Fu, S. Pan, Y. Ma, W. Kong, Z. Qi, and X. Yang, “Effect of electrical stimulation combined with graphene-oxide-based membranes on neural stem cell proliferation and differentiation,” *Artif. Cells, Nanomedicine Biotechnol.*, vol. 47, no. 1, p. 1867, 2019, [Online]. Available: <https://doi.org/10.1080/21691401.2019.1613422>.
- [109] P. Hsiu G. Chao, H. H. Lu, C. T. Hung, S. B. Nicoll, and J. C. Bulinski, “Effects of applied DC electric field on ligament fibroblast migration and wound healing,” *Connect. Tissue Res.*, vol. 48, no. 4, p. 188, 2007.
- [110] R. Guo, Z. Ren, H. Bi, M. Xu, and L. Cai, “Electrical and thermal conductivity of poly(lactic) acid (PLA)-based biocomposites by incorporation of nano-graphite fabricated with fused deposition modeling,” *Polymers (Basel)*, vol. 11, no. 3, p. 5, 2019.
- [111] E. Murray, B. C. Thompson, S. Sayyar, and G. G. Wallace, “Enzymatic degradation of graphene/polycaprolactone materials for tissue engineering,” *Polym. Degrad. Stab.*, vol. 111, pp. 1–8, 2015.
- [112] A. Mohammed and A. Abdullah, “Scanning Electron Microscopy (SEM): a Review,” *Proc. 2018 Int. Conf. Hydraul. Pneum.*, pp. 77–82, 2018.