



Scaffolds de Nanocompósitos de Grafeno para Regeneração do
Ligamento Cruzado Anterior

UMinho | 2021 Hugo Jorge Alves de Sousa Gonçalves

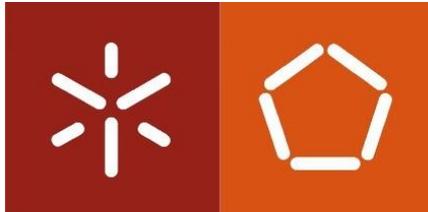


Universidade do Minho
Escola de Engenharia

Hugo Jorge Alves de Sousa Gonçalves

Scaffolds de Nanocompósitos de Grafeno para
Regeneração do Ligamento Cruzado Anterior

Julho de 2021



Universidade do Minho

Escola de Engenharia

Hugo Jorge Alves de Sousa Gonçalves

**Scaffolds de Nanocompósitos de
Grafeno para Regeneração do Ligamento
Cruzado Anterior**

Tese de Mestrado

Mestrado Integrado em Engenharia de Polímeros

Trabalho efetuado sobre a orientação de:

**Professora Doutora Maria de Conceição de Jesus
Rego Paiva**

Professora Doutora Natália Maria de Araújo Alves

Julho 2021

DECLARAÇÃO

Nome: Hugo Jorge Alves de Sousa Gonçalves

Endereço eletrónico: a79002@alunos.uminho.pt

Telefone: +351 914184899

Número do Bilhete de Identidade: 15366693

Título da Dissertação: Scaffolds de Nanocompósitos de Grafeno para Regeneração do Ligamento Cruzado Anterior

Orientadores: Professora Doutora Natália Maria de Araújo Alves

Professora Doutora Maria da Conceição de Jesus Rego Paiva

Ano de conclusão: 2021

Designação do Mestrado: Mestrado Integrado em Engenharia de Polímeros

Área de Especialização: Engenharia de Polímeros

Escola de Engenharia

Departamento de Engenharia de Polímeros

É AUTORIZADA A REPRODUÇÃO INTEGRAL DESTA DISSERTAÇÃO APENAS PARA EFEITOS DE INVESTIGAÇÃO, MEDIANTE DECLARAÇÃO ESCRITA DO INTERESSADO, QUE A TAL SE COMPROMETE.

Universidade do Minho, 15/07/2021

Assinatura:

Hugo Jorge Alves de Sousa Gonçalves



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.

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-Compartilhaval
CC BY-NC-SA

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

Agradecimentos

A realização desta dissertação põe um ponto final num percurso muito importante da minha vida. É o culminar de muitos anos de ensino. Muitos anos de dificuldades, sucessos, trabalho, mas acima de tudo, anos de aprendizagem, felicidade e superação. Apesar de todas as dificuldades que temos passado neste último ano, dou por concluído o meu mestrado em Engenharia de Polímeros e, como tal, quero agradecer a todos que de uma maneira ou de outra fizeram com que isto fosse possível.

Primeiramente, quero agradecer às minhas orientadoras, Maria da Conceição Paiva e Natália Alves, que apesar de todas as dificuldades e obstáculos que este último ano nos trouxe, se mostraram sempre, com uma simpatia enorme, presentes e prontas a ajudar, transmitindo conhecimentos e orientação que me ajudaram na realização desta dissertação.

Gostava de agradecer, do fundo do meu coração, à Magda Silva por toda a paciência e por me ter acompanhado sempre durante todo este meu percurso, sem nunca ter desistido de mim e sem nunca me ter recusado ajuda. Quero também agradecer pela companhia e por todo o conhecimento que me transmitiu. Foi sem dúvida alguma um pilar neste trabalho e uma surpresa muita boa que eu tive em todo o meu percurso académico.

Agradeço também aos técnicos e professores do departamento que sempre se mostraram disponíveis quer para ajudar quer para me ouvir.

Obrigado aos amigos que criei neste meu percurso académico. Obrigado por estes anos maravilhosos que percorreram ao meu lado, sempre unidos nos bons e maus momentos. Fico grato por vos ter conhecido e levo-vos comigo no coração e para o resto da minha vida.

Obrigado aos meus amigos de sempre. Aqueles que eu já trazia antes de entrar nesta aventura. Obrigado por estarem sempre lá para mim, obrigado por serem um dos meus maiores refúgios e por tudo o que fizeram por mim. Sem vocês não seria possível.

Obrigado à minha família, e em especial aos meus avós, que sempre acreditaram em mim e sempre celebraram as minhas conquistas. Esta conquista é para vocês, os que estão comigo e os que infelizmente já partiram.

Obrigado ao amor da minha vida, à minha namorada e companheira, que andou lado a lado comigo todos estes anos. Obrigado pela pessoa que és para mim, por todo amor e força que me dás, por seres um dos maiores pilares da minha vida, por nunca me teres recusado ajuda e acima de tudo por acreditares sempre em mim. Esta vitória também é tua.

Por fim, quero agradecer aquelas que são das pessoas mais importantes da minha vida. Quero agradecer aos meus pais, irmã, cunhado e afilhado por tudo o que fizeram e fazem por mim, por acreditarem em mim e tornarem isto possível. Obrigado por nunca terem desistido de mim, pelas palavras, pela educação, pela força e por todo o amor.

Resumo

O ligamento cruzado anterior (LCA) é o ligamento intra-articular do joelho mais frequentemente lesionado. A insuficiente vascularização deste tecido impede que ele cicatrize completamente após uma rutura ou rasgo, fazendo com que o desenvolvimento de enxertos para a reconstrução do LCA seja uma necessidade. As limitações dos enxertos existentes atualmente motivaram uma investigação de possíveis enxertos produzidos através de técnicas subjacentes ao ramo da engenharia de tecidos. A produção eficaz de um enxerto biodegradável deve possuir propriedades mecânicas semelhantes às do ligamento nativo; até o momento, nenhum enxerto sintético disponível comercialmente atingiu este requisito. Para atingir este objetivo, neste trabalho utilizou-se a técnica de entrançamento de fibra de polímero para projetar um *scaffold* de PLA com grafite para a engenharia de tecidos do LCA.

Inicialmente foram produzidos filamentos compósitos reforçados com grafite exfoliada, pela técnica de mistura no polímero fundido, com diâmetro controlado para posteriormente serem produzidos *scaffolds* através de técnicas têxteis, para aplicação biomédica na regeneração do LCA. Foram utilizados três tipos de grafites: grafite exfoliada (EG), grafite exfoliada funcionalizada (f-EG) e grafite exfoliada funcionalizada com adição de nanopartículas de prata (f-EG+Ag). Foram processados diferentes tipos de filamentos: PLA, PLA com 0,25, 0,5%, 1% e 2% de EG, PLA com 0,25, 0,5%, 1% e 2% de f-EG e PLA com 0,25, 0,5%, 1% e 2% de f-EG+Ag. A morfologia, propriedades térmicas, elétricas e mecânicas de todos os filamentos produzidos foram depois avaliadas. Depois de processados e caracterizados todos os tipos de filamentos, foram produzidos três *scaffolds* para três tipos de composições: PLA, 0.5% PLA + f-EG + Ag e 2%PLA + f-EG + Ag. Depois de produzidos, os *scaffolds* foram caracterizados por análise mecânica dinâmica.

Palavras Chave: PLA, LCA, *Scaffold*, Nanocompósitos, Grafeno



Abstract

The anterior cruciate ligament (ACL) is an intra-articular ligament of the knee and one of the most frequently injured. Insufficient vascularization of this tissue prevents it from scarring completely after a rupture or tear, making the creation of grafts for ACL reconstruction a necessity. The limitations of grafts currently existing motivated an investigation of possible grafts produced through techniques underlying the field of tissue engineering. The effective production of a biodegradable graft must have mechanical properties similar to those of the native ligament; to date, no commercially available synthetic graft has reached this requirement. To achieve this goal, polymer fiber braiding techniques were used to design a PLA scaffold for ACL tissue engineering.

To carry out this work, polymer composite filaments reinforced with exfoliated graphite were initially produced by mixing in the polymer melt, preparing filaments with controlled diameter that were then used to form scaffolds through textile techniques, for biomedical application on ACL regeneration. For this, three types of graphite were used: normal exfoliated graphite (EG), functionalized exfoliated graphite (f-EG) and a functionalized exfoliated graphite with the addition of silver nanoparticles (f-EG+Ag). Different types of filaments were processed: PLA filaments, PLA with 0.25, 0.5%, 1% and 2% of EG, PLA with 0.25, 0.5%, 1% and 2% of f-EG and PLA with 0.25, 0.5%, 1% and 2% of f-EG+Ag. The morphology, thermal, electrical and mechanical properties of all filaments produced were then evaluated. After processing and characterized all types of filaments, three scaffolds were produced for three types of compositions: PLA, 0.5% PLA + f-EG + Ag and 2%PLA + f-EG + Ag. Once produced, all scaffolds were characterized using dynamic mechanical analysis.

Keywords: PLA, ACL, *Scaffold*, Nanocomposites, Graphene

Conteúdo

Agradecimentos	iii
Resumo	v
Abstract	vi
Índice de Figuras	ixx
Índice de Tabelas	xi
Lista de Abreviaturas	xii
1. Introdução	2
1.1. Motivação	2
1.2. Esquema da Tese	4
2. Estado de Arte	7
2.1. Ligamento Cruzado Anterior	7
2.2. Design de scaffolds na regeneração de ligamentos	9
2.3. Materiais para a produção de scaffolds para regeneração de ligamentos	12
2.3.1. Poli (ácido láctico) (PLA)	12
2.3.2. Grafite	14
2.3.3. Grafeno	16
2.3.4. Funcionalização do grafeno	18
2.3.5. Grafeno decorado com nanopartículas de prata	19
2.4. Técnicas têxteis de processamento de <i>scaffolds</i> para regeneração de ligamentos	20
2.5. Produção de filamentos de compósito para regeneração do LCA	23
3. Materiais e Métodos	27
3.1. Materiais	27
3.1.1. Preparação de Grafite exfoliada funcionalizada	27
3.1.2. Decoração da grafite exfoliada funcionalizada com nanopartículas de Prata	27
3.1.3. Filamentos de Compósito	28
3.2. Métodos	28
3.2.1. Produção da grafite exfoliada funcionalizada	28
3.2.2. Decoração da grafite funcionalizada com nanopartículas de prata	29
3.2.3. Produção dos filamentos	30
3.2.4. Caracterização estrutural dos filamentos compósitos	32

3.2.5. Produção de Scaffolds	42
3.2.6. Caracterização Estrutural dos <i>Scaffolds</i>	43
4. Discussão de resultados.....	46
4.1. Caracterização estrutural do grafeno	46
4.1.1. Espectroscopia Raman da grafite e de derivados de grafeno.....	46
4.2. Caracterização estrutural dos filamentos compósitos	48
4.2.1. Análise Termogravimétrica (TGA)	48
4.2.2. Espectroscopia Raman	50
4.2.3. Microscopia Eletrónica de Varrimento (SEM)	51
4.2.4. Microscopia Ótica	56
4.2.5. Calorimetria Diferencial de Varrimento (DSC)	59
4.2.6. Análise Mecânica Dinâmica (DMA).....	63
4.2.7. Resistividade Elétrica	66
4.3. Produção dos <i>Scaffolds</i>	67
4.4. Caracterização Estrutural dos <i>Scaffolds</i>	68
4.4.1. Análise Mecânica Dinâmica (DMA).....	68
5. Conclusões	71
5.1. Trabalho Futuro.....	72
6.Referências.....	73

Índice de Figuras

FIGURA 1- RUTURA DO LIGAMENTO CRUZADO ANTERIOR. (61)	7
FIGURA 2- ESTRUTURA HIERÁRQUICA DE UM TENDÃO. (14)	8
FIGURA 3- ESTRATÉGIA GERAL DA ENGENHARIA DE TECIDOS. (19)	10
FIGURA 4- SÍNTESE DO PLA. (5)	12
FIGURA 5- ESTRUTURA QUÍMICA DO PLA.....	13
FIGURA 7- D-LÁCTICO. (17).....	13
FIGURA 8- L-LÁCTICO. (17).....	13
FIGURA 6- MESO-LÁCTICO. (17).....	13
FIGURA 9- ESTRUTURA MOLECULAR DA GRAFITE. (19).....	15
FIGURA 10- ESFOLIAÇÃO/EXPANSÃO DA GRAFITE. (20).....	16
FIGURA 11- ILUSTRAÇÃO ESQUEMÁTICA DA TERMINOLOGIA DO GRAFENO DE ACORDO COM A SUA ESCALA DE TAMANHO. (21).....	17
FIGURA 12- FUNCIONALIZAÇÃO DO GRAFENO. (46)	18
FIGURA 13- VÁRIOS MODOS DE ATAQUE DAS NANOPÁRTICULAS DE PRATA SOB AS BACTÉRIAS. (45).....	19
FIGURA 14- MÉTODOS TÊXTEIS UTILIZADOS PARA A PRODUÇÃO DE SCAFFOLDS. AS IMAGENS APRESENTAM OS SCAFFOLDS ENTRANÇADOS (A), COM TORÇÃO (B) E A COMBINAÇÃO DO ENTRANÇAMENTO COM A TORÇÃO (C). (10).....	21
FIGURA 15- LAYOUT DE EXTRUSORA CO-ROTATIVA DE PARAFUSO DUPLO. (28)	24
FIGURA 16- FUNCIONALIZAÇÃO DA SUPERFÍCIE CNT. (34).....	29
FIGURA 17- PARAFUSOS DA MINI EXTRUSORA CONSTITUÍDOS POR DIFERENTES ELEMENTOS DE MISTURA E TRANSPORTE.	30
FIGURA 18- COMPARAÇÃO DO ESPETRO RAMAN DA GRAFITE E DO GRAFENO. (63)	34
FIGURA 19- PRINCIPAIS CARACTERÍSTICAS DE UM MICROSCÓPIO ELETRÔNICO DE VARREDURA (SEM). (20)	36
FIGURA 20- REPRESENTAÇÃO DE UM MICROSCÓPIO ÓTICO DE LUZ POLARIZADA CONFIGURADO PARA REFLEXÃO E TRANSMISSÃO. (20).....	37
FIGURA 21- COMPONENTES DE MEDIÇÃO DO DSC. (62)	38
FIGURA 22- TÍPICA CURVA DE FLUXO DE CALOR. (28)	39
FIGURA 23- TÉCNICA DE ENTRANÇAMENTO APLICADA À PRODUÇÃO DE SCAFFOLDS. (64).....	42
FIGURA 24- DISPOSIÇÃO DOS FILAMENTOS PLA NUM DISCO KUMIHIMO.	43
FIGURA 25- FEIXE PRODUZIDO COM RECURSO AO DISCO KUMIHIMO.....	43
FIGURA 26- ESPECTRO RAMAN DOS COMPÓSITOS EG, F-EG E F-EG+AG. (28)	46
FIGURA 27- RESULTADOS DE TGA RELATIVOS À PERDA DE MASSA EM FUNÇÃO DA TEMPERATURA.	48
FIGURA 28- RESULTADOS DE TGA RELATIVOS À DERIVADA DE PERDA DE MASSA EM FUNÇÃO DA TEMPERATURA.	48
FIGURA 29- ESPECTROS RAMAN DOS FILAMENTOS COMPÓSITOS.	50
FIGURA 30- CURVAS DSC RELATIVAS AO 1º AQUECIMENTO.	60
FIGURA 31- CURVAS DSC RELATIVAS AO ARREFECIMENTO.....	60
FIGURA 32- CURVAS DSC RELATIVAS AO 2º AQUECIMENTO.	61

FIGURA 33- MÓDULO DE ARMAZENAMENTO DO PLA E DOS FILAMENTOS COMPÓSITOS EM FUNÇÃO DA TEMPERATURA, NA REGIÃO DA TRANSIÇÃO VÍTREA.	63
FIGURA 34- FATOR DE AMORTECIMENTO MECÂNICO DO PLA E DOS FILAMENTOS COMPÓSITOS EM FUNÇÃO DA TEMPERATURA, NA REGIÃO DA TRANSIÇÃO VÍTREA.	64
FIGURA 35- MÓDULO DE ARMAZENAMENTO DO PLA E DOS FILAMENTOS COMPÓSITOS A 37°C.	65
FIGURA 36- FATOR DE DISSIPAÇÃO DE ENERGIA DO PLA E DOS FILAMENTOS COMPÓSITOS A 37°C.	65

Índice de Tabelas

TABELA 1- PROPRIEDADES DO LIGAMENTO CRUZADO ANTERIOR HUMANO. (13)	9
TABELA 2 - ANÁLISE DA POROSIDADE PARA DIFERENTES TIPOS DE COMPOSIÇÕES POLIMÉRICAS. (15)	11
TABELA 3- PROPRIEDADES DE POLÍMEROS SINTÉTICOS APROVADOS PARA UTILIZAÇÃO EM IMPLANTES MÉDICOS. (14)	12
TABELA 4- PROPRIEDADES DO PLA. (18)	14
TABELA 5- ALGUMAS DAS PROPRIEDADES DA GRAFITE. (19)	15
TABELA 6- PRINCIPAIS ESTUDOS NA ÁREA DA ENGENHARIA DE TECIDOS PARA REGENERAÇÃO DE LIGAMENTOS. (14) (27)	22
TABELA 7- VANTAGENS E DESVANTAGENS DE MATERIAIS POLIMÉRICOS NA REGENERAÇÃO DE TECIDOS.	23
TABELA 8- PARÂMETROS DE PROCESSAMENTO PARA A PRODUÇÃO DE FILAMENTOS COMPÓSITOS COM 0,25%, 0,5%, 1% E 2% DE GRAFITE. ...	31
TABELA 9- VELOCIDADES DOS ROLOS DE PUXO PARA OS COMPÓSITOS COM 0,25%, 0,5%, 1 E 2% DE GRAFITE.	32
TABELA 10- RESULTADOS DOS ESPECTROS RAMAN. (28)	47
TABELA 11- TEMPERATURAS INICIAIS DE DEGRADAÇÃO.	49
TABELA 12- PERCENTAGEM DE REFORÇO PRESENTES NOS COMPÓSITOS	49
TABELA 13- IMAGENS SEM DO FILAMENTO DE PLA	51
TABELA 14- IMAGENS SEM DOS FILAMENTOS DE COMPÓSITOS: PLA+0.25EG E PLA+0.5EG.	51
TABELA 15- IMAGENS SEM DOS FILAMENTOS DE COMPÓSITOS: PLA+1EG E PLA+2EG.	52
TABELA 16- IMAGENS SEM DOS FILAMENTOS DE COMPÓSITOS: PLA+0.25F-EG E PLA+0.5F-EG.	53
TABELA 17- IMAGENS SEM DOS FILAMENTOS DE COMPÓSITOS: PLA+1F-EG E PLA+2F-EG.	53
TABELA 18- IMAGENS SEM DOS FILAMENTOS DE COMPÓSITOS: PLA+0.25F-EG+AG E PLA+0.5F-EG+AG.	54
TABELA 19- IMAGENS SEM DOS FILAMENTOS DE COMPÓSITOS: PLA+1F-EG+AG E PLA+2F-EG+AG.	54
TABELA 20- IMAGENS SEM E ANÁLISE EDS DO PLA+ 0,25% E 0,5% (F-EG+AG)	55
TABELA 21- IMAGENS SEM E ANÁLISE EDS DO PLA+ 1% E 2% (F-EG+AG).	56
TABELA 22- IMAGENS DO MICROSCÓPIO ÓTICO DA SECÇÃO TRANSVERSAL DOS FILAMENTOS	57
TABELA 23- IMAGENS DO MICROSCÓPIO ÓTICO DA SECÇÃO TRANSVERSAL DOS FILAMENTOS	58
TABELA 24- CARACTERIZAÇÃO DA SECÇÃO TRANSVERSAL DOS FILAMENTOS	59
TABELA 25- PROPRIEDADES TÉRMICAS DO PLA E DOS FILAMENTOS COMPÓSITOS RELATIVOS AO 1º AQUECIMENTO.	62
TABELA 26- PROPRIEDADES TÉRMICAS DO PLA E DOS FILAMENTOS COMPÓSITOS RELATIVOS AO 2º AQUECIMENTO.	62
TABELA 27- RESISTIVIDADE ELÉTRICA DO PLA E DOS FILAMENTOS COMPÓSITOS	ERRO! MARCADOR NÃO DEFINIDO.
TABELA 28- SCAFFOLDS PRODUZIDOS PARA O PLA E PARA OS FILAMENTOS COMPÓSITOS DE 0.5% E 2% F-EG+AG	68
TABELA 29- RESULTADOS DMA DOS SCAFFOLDS FIBROSOS.	69

Lista de Abreviaturas

A

ACL Anterior cruciate ligament

Ag Prata

Ag/NPs Nanopartículas de Prata

Au Ouro

C

Cu Cobre

C Carbono

D

DNA Ácido desoxirribonucleico

DMF Dimetilformamida

DSC Calorimetria Diferencial de Varrimento

DMA Análise Mecânica dinâmica

E

E Módulo de young

EDS Espectroscopia de raios X por energia dispersiva

EG Grafite Exfoliada

F

f-EG Grafite Exfoliada Funcionalizada

H

HOPG Grafite pirolítica altamente orientada

K

K-GIC Compostos de grafite intercalado

L

LCA Ligamento Cruzado Anterior

N

NPs Nanopartículas Metálicas

AgNO₃ Nitrato de Prata

P

PCL Poli-ε-caprolactona

PLA Poli (ácido láctico)

PDLA Poli (D-lático)

PDLLA Poli (DL-lático)

PLLA Poli (L-lático)

PGA Poli (ácido glicólico)

S

SEM Microscopia Eletrónica de Varrimento

T

TE Engenharia de Tecidos

T_c Temperatura de Cristalização

TGA Análise Termogravimétrica

T_g Temperatura de transição Vítrea

T_f Temperatura de fusão

O

O Oxigénio

Z

Zn Zinco

Símbolos

ΔH_c Entalpia de cristalização

ΔH_f Entalpia de fusão

ΔH_{f0} Entalpia de fusão teórica

Δc_p Capacidade Calorífica

\emptyset Fração em massa

ε Deformação

μm Micrótomos

ρ Densidade

σ Resistência à tração

χ Grau de Cristalinidade

ρ_V Resistividade Volumétrica

I Intensidade

V Volt

R Resistência

T_s Temperatura da amostra

T_R Temperatura de referência

Números

2D Duas dimensões

3D Três Dimensões



Capítulo 1

Introdução

1. Introdução

1.1. Motivação

Os tendões e ligamentos são tecidos conectivos densos que unem ossos a músculos e ossos a ossos respetivamente. As lesões nestes tecidos estão entre as lesões mais comuns relativas ao corpo humano e são particularmente comuns em população jovem e fisicamente ativa (1).

O ligamento cruzado anterior (LCA) é o ligamento do joelho mais comumente lesionado, com mais de 250.000 pacientes a cada ano com diagnóstico de rutura do LCA e aproximadamente 150.000 cirurgias de LCA realizadas anualmente. O LCA é um ligamento intra-articular que controla movimento normal e atua como um estabilizador articular, conectando o fêmur à tibia. Devido à sua pobre capacidade intrínseca de cura e vascularização limitada, estas ruturas não cicatrizam sendo geralmente necessária intervenção cirúrgica (2).

A alta incidência de patologias e ruturas de tendões e ligamentos e a ausência de tratamentos adequados que garantam a recuperação total da função conjunta ou da área afetada do sistema locomotor, tornam necessário pesquisar novos materiais que possam ser implantados e substituir temporariamente o tecido danificado até sua regeneração completa (3). Tradicionalmente, estas lesões são tratadas com enxertos biológicos (autoenxertos ou aloenxertos). Os autoenxertos e os aloenxertos possuem boa resistência mecânica inicial, promovem a proliferação celular e o crescimento de novos tecidos. No entanto, possuem também algumas desvantagens. Os autoenxertos requerem uma cirurgia adicional que é conhecida por causar morbidade local, aumento do tempo de recuperação e possível dor no local da colheita. Os aloenxertos por sua vez apresentam limitação no seu fornecimento, podendo transmitir doenças ou infeções bacterianas e provocar uma resposta imunogénica negativa do hospedeiro (4).

A utilização de polímeros como biomateriais teve bastante impacto no avanço da medicina moderna. Em particular, os biomateriais poliméricos biodegradáveis possuem a capacidade de se decompor, não sendo necessária a sua remoção após terem cumprido a sua função.



As aplicações são profusas, por exemplo, com polímeros biodegradáveis a serem aplicados clinicamente como suturas e implantes cirúrgicos. Para atender à demanda funcional, materiais com as propriedades físicas, químicas, biológicas, biomecânicas e de degradação adequadas para uma determinada aplicação devem ser selecionados. Felizmente, uma ampla gama de polímeros biodegradáveis naturais e sintéticos tem sido investigada para aplicações biomédicas, com novos materiais sendo constantemente desenvolvidos para enfrentar novos desafios (5).

Todos os dias, milhares de procedimentos cirúrgicos são realizados para substituir ou reparar tecidos danificados por doenças ou traumas. O campo em desenvolvimento da engenharia de tecidos (TE) procura regenerar tecidos danificados, combinando células humanas com scaffolds altamente porosos, que atuam como suportes para a regeneração de tecidos (6). A Engenharia de Tecidos é multidisciplinar, abrangendo, conhecimentos das áreas da ciência e engenharia de materiais, biologia e medicina. Nesta estratégia, tipicamente é efetuada a expansão *in vitro* de células provenientes do paciente dador sobre suportes de polímeros biodegradáveis, designados por scaffolds. Este suporte degrada enquanto um novo órgão ou tecido é formado.

Numa fase inicial, os biomateriais foram concebidos para que se mantivessem inertes no organismo. Desta maneira, os estudos concentraram-se na forma de prevenir/minimizar as reações teciduais indesejáveis. Atualmente, os polímeros correntes são concebidos para que haja uma interação com os tecidos, provocando respostas fisiológicas como proliferação e/ou diferenciação celular no local do implante.

Nas últimas décadas, foram obtidos avanços expressivos na compreensão dos mecanismos de interação das células animais com o seu ambiente natural, a matriz extracelular, bem como a influência da mesma na proliferação e diferenciação celular. Muitas vezes, este conhecimento tem sido utilizado para o desenvolvimento de polímeros que possam simular as propriedades da matriz extracelular, exercendo assim um papel ativo na regeneração tecidual. Os biomateriais aplicados podem ser classificados como permanentes ou temporários. Os materiais permanentes são utilizados com o objetivo de substituir um tecido danificado por tempo indeterminado. Dessa forma, são produzidos de modo a



reter as suas propriedades mecânicas e físico-químicas por longos períodos. Esses tipos de dispositivos são frequentemente utilizados como próteses, por exemplo, para substituir articulações danificadas. Em contrapartida, existem situações onde é necessário um suporte que preencha apenas temporariamente a região lesada, até que a regeneração dos tecidos ocorra, ou ainda que direcione o processo regenerativo. Neste caso, uma alternativa são os biomateriais temporários (7).

Os poli (α -hidróxi ácidos), tal como o poli (ácido láctico) (PLA) e o poli (ácido glicólico) (PGA), representam uma das classes de polímeros sintéticos biodegradáveis mais utilizados nesta área. Para o desenvolvimento e seleção desses materiais, o tempo de degradação é primordial para o sucesso do implante. Os estudos e os desafios atuais são normalmente direcionados para a compreensão da relação entre a composição química, morfologia, e a técnica de processamento utilizada (8).

Este trabalho concentra-se no desenvolvimento de fibras de compósito de grafite exfoliada e funcionalizada com o polímero PLA, através da extrusão de filamento, para aplicar na produção de suportes porosos (*scaffolds*) para regeneração de ligamentos. Espera-se que estes compósitos apresentem propriedades mecânicas superiores e menor resistividade elétrica.

1.2. Esquema da Tese

Esta tese está dividida em cinco capítulos:

No **Capítulo 1** é apresentada a motivação deste trabalho, assim como o esquema da tese.

O **Capítulo 2**, apresenta uma visão geral do estado da arte das funções e propriedades do ligamento cruzado anterior (LCA), assim como abordagens atuais no tratamento da rotura deste ligamento. É também apresentado um sumário dos materiais usados neste trabalho, assim como as suas principais propriedades, e a sua utilização na área biomédica. O método de torção e entrançamento para a produção de *scaffolds* também é abordado neste capítulo, assim como os métodos utilizados para produzir as fibras utilizadas nestes *scaffolds*.



O **Capítulo 3** descreve os materiais e métodos adotados neste trabalho, nomeadamente as técnicas usadas para a funcionalização da grafite exfoliada, incorporação de nanopartículas de prata, processamento de filamentos através de extrusão e produção dos *scaffolds* fibrosos. Todas as técnicas usadas para caracterizar os materiais produzidos também são apresentadas.

O **Capítulo 4** divide-se em dois subcapítulos, onde serão descritos: i) caracterização e discussão de resultados relativos aos filamentos compósitos e ii) caracterização e discussão de resultados relativos aos *scaffolds* fibrosos.

No **Capítulo 5** são apresentadas as principais conclusões deste trabalho assim como algumas propostas para trabalhos futuros de investigação.



Capítulo 2

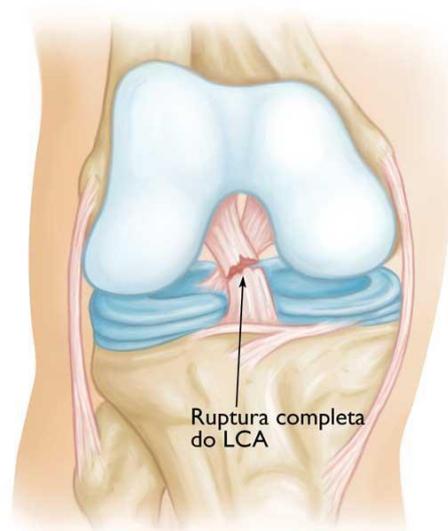
Estado de Arte



2. Estado de Arte

2.1. Ligamento Cruzado Anterior

A rutura do ligamento cruzado anterior (LCA), representada na figura 1, é uma das lesões ligamentares mais comuns do joelho (9). Mais de 800.000 pessoas procuram assistência médica a cada ano para lesões nos ligamentos e tendões. Estas roturas geralmente causam dor, inchaço e instabilidade articular e requerem cirurgia para reconstruir o tecido.



*Figura 1- Rutura do Ligamento Cruzado Anterior.
(61)*

O ligamento cruzado anterior (LCA) é vital para a estabilidade mecânica da articulação do joelho; funciona para restringir o movimento excessivo para a frente da tibia em relação ao fémur, limitando o movimento rotacional do joelho. A lesão neste ligamento resulta em rutura completa ou parcial do mesmo, sendo frequentemente observada no cenário clínico e particularmente em pacientes mais jovens e ativos [1]. Embora as ruturas sejam bastante comuns, a sua reconstrução cirúrgica apresenta baixas taxas de sucesso (10).

A lesão ocorre quando uma tensão excessiva é aplicada ao ligamento, geralmente devido a movimentos bruscos de torção e / ou desaceleração realizados no pé de apoio (11). As mesmas podem resultar em disfunção articular significativa, o que pode levar a lesões de outros tecidos e ao



desenvolvimento de doença articular degenerativa. O uso de substitutos de ligamentos sintéticos ganhou popularidade no final dos anos 80, mas apenas sob condições limitadas, não envolvendo o sacrifício de tecidos autógenos e minimizando a morbidade associada e o risco de transmissão de doenças (12).

Os ligamentos são tecidos densos e altamente ordenados, compostos de proteínas (como os tipos de colagénio I, III e V e elastina), proteoglicanos, água e células, contendo uma estrutura hierárquica com níveis crescentes de organização. Estes contêm moléculas de colagénio, fibrilas, conjuntos de fibrilas e fascículos que são organizados ao longo do eixo do tecido, como representado na figura 2. Além disso, o ligamento é cercado por uma bainha de epiligamento vascularizado (4).

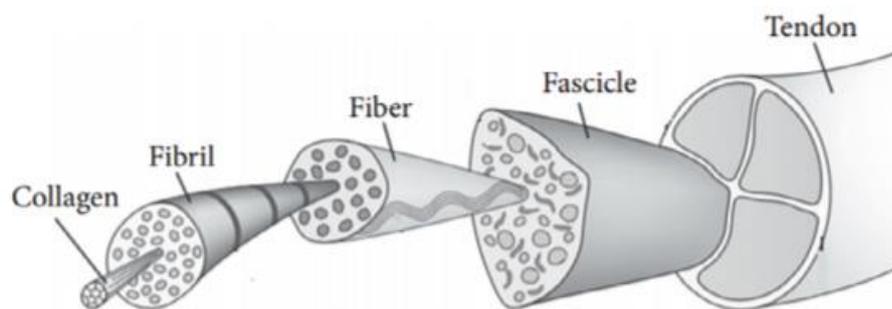


Figura 2- Estrutura Hierárquica de um tendão. (14)

Idealmente, um enxerto de substituição deve ser biocompatível e ter propriedades mecânicas semelhantes ao LCA natural. A estrutura hierárquica das fibras e fibrilas de colagénio nos ligamentos fornece propriedades mecânicas específicas, incluindo uma elevada resistência mecânica (4).

Existem diversas considerações biomecânicas que devem ser tidas em conta ao projetar soluções para regenerar o tecido do tendão ou ligamento, neste caso, do LCA. Segundo Chandrashekar *et al.*, após inúmeras pesquisas, a principal causa para uma elevada incidência nas taxas de rotura do ligamento cruzado anterior (LCA) no sexo feminino em comparação com o sexo masculino ainda permanece desconhecida. Até o momento, a possibilidade de que o ligamento feminino seja mecanicamente mais fraco do que o ligamento masculino não foi diretamente investigado. Embora já esteja estabelecido em estudos anteriores que o ligamento feminino é menor em tamanho, as diferenças nas propriedades estruturais do mesmo entre os dois sexos não foram estudadas. O objetivo desse estudo era determinar se existiam diferenças baseadas no sexo nas propriedades mecânicas do LCA



humano quando é considerada a idade, assim como outras variáveis do LCA, como é indicado na tabela 1 (13).

No início do processo de reabilitação, o enxerto tem de suportar e proteger o novo tecido das forças desenvolvidas por mobilização, e permitir um aumento gradual da exposição a uma carga. Isso irá permitir ao tecido que este se desenvolva mais naturalmente e de uma forma mais eficaz e saudável. A rigidez do enxerto deve diminuir ao longo do tempo, de maneira a evitar o stress constante.

Tabela 1- Propriedades do ligamento cruzado anterior humano. (13)

Comprimento (mm)	Homem: 29.61 ± 2.70 Mulher: 27.04 ± 2.90
Alongamento na rotura (mm)	Homem: 6.8-11 Mulher: 4.9-10
Tensão de rotura (%)	Homem: 24-36 Mulher: 19-35
Força de rotura (N)	Homem: 1119-2517 Mulher: 739-1793
Rigidez (N/mm)	Homem: 219-397 Mulher: 111-287
Módulo de elasticidade (MPa)	Homem: 93-163 Mulher: 49-149

2.2. Design de scaffolds na regeneração de ligamentos

A Engenharia de tecidos depende da utilização de suportes porosos (scaffolds) para fornecer o ambiente apropriado para a regeneração de tecidos e órgãos (6). Estes scaffolds atuam essencialmente como um modelo para a formação de tecidos e são tipicamente cultivados in vitro com células, implantados no local lesionado como é representado na figura 3 [2].

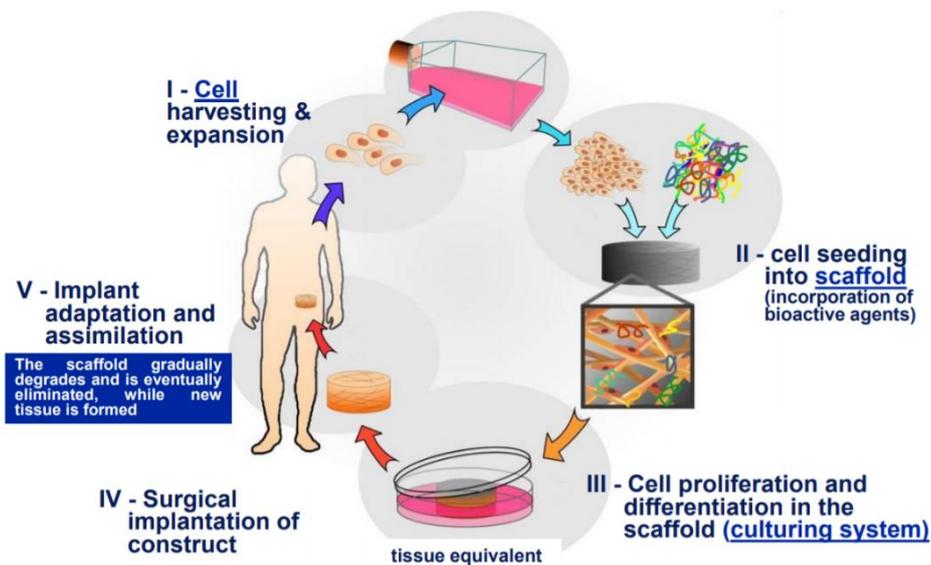


Figura 3- Estratégia Geral da Engenharia de Tecidos. (19)

Estes scaffolds devem ser fabricados a partir de um material biocompatível que não provoque uma reação imunológica adversa. Além disso, é necessário escolher um material polimérico que se degrade e reabsorva a uma taxa controlada ao mesmo tempo que as células cultivadas no suporte aderem e proliferam (14).

O scaffold ideal deve apresentar algumas propriedades importantes. Deve fornecer o suporte mecânico temporário necessário para a regeneração/formação do novo tecido. Deve também ser biodegradável para que a sua remoção cirúrgica, após ter cumprido a sua função, não seja necessária. No entanto, a cinética de degradação deve refletir a cinética de formação do tecido novo. Isso permite que o scaffold forneça o suporte mecânico estrutural temporário até que o tecido recém-formado possa suportar a carga mecânica.

O diâmetro dos poros é importante para facilitar a adesão e proliferação celular. No entanto é necessário obter o equilíbrio certo entre a regeneração do tecido e as propriedades mecânicas do scaffold. Poros com dimensões muito reduzidas são ineficientes, e poros com dimensões demasiado elevadas podem comprometer as propriedades mecânicas da mesma. A análise da porosidade para várias composições poliméricas é representada na tabela 2 [11].



Tabela 2 - Análise da porosidade para diferentes tipos de composições poliméricas. (15)

Polímero	Área Superficial (cm^2)	Porosidade (%)	Moda do diâmetro (μm)	Mediana do diâmetro (μm)
PGA	55 ± 1	63 ± 7	177 ± 68	103 ± 18
PLAGA	70 ± 12	59 ± 5	195 ± 44	84 ± 20
PLLA	64 ± 9	54 ± 8	226 ± 23	103 ± 20

Têm sido desenvolvidos scaffolds a partir de uma grande variedade de biomateriais e fabricados através de uma infinidade de técnicas, na tentativa de regenerar diferentes tecidos e órgãos do corpo [2]. Por exemplo, têm sido propostos scaffolds baseados em polímeros naturais tais como colagénio, seda, ácido hialurónico, quitosano ou fibrina. Os polímeros naturais, apesar de apresentarem uma maior biofuncionalidade e biocompatibilidade, tendo a capacidade de ser biologicamente conhecidos e de fornecerem um ambiente adequado para suportar a regeneração de tecidos, apresentam limitações que restringem a sua evolução de um estágio de pesquisa para uma potencial aplicação clínica, pelo menos por enquanto. Estas incluem as suas propriedades mecânicas inferiores, cinética de degradação não previsível ou controlada, pois esta depende da disponibilidade e concentração de enzimas no local do implante, processamento difícil e custo elevado (16).

Devido às desvantagens dos scaffolds baseados em polímeros naturais referidas anteriormente, têm sido desenvolvidos scaffolds, a partir de polímeros sintéticos biodegradáveis. Além de uma melhoria das propriedades mecânicas, mencionadas na tabela 3, estes polímeros também oferecem outras vantagens ligadas à produção em grande escala, uma vez que representam uma fonte confiável de matérias-primas, baixo riscos imunogénicos, estão disponíveis numa ampla variedade de composições e têm uma processabilidade satisfatória. Além disso, podem ser modificados para resolver problemas como efeitos inflamatórios colaterais, hidrofobicidade e baixa adesão celular. Devido às vantagens enumeradas, esta classe de polímeros tem sido amplamente utilizada na área médica. Poliésteres, como poli (ácido glicólico) (PGA), os estereoisómeros do poli (ácido láctico) (PLA), PLLA e PDLA, o seu copolímero poli (ácido (lático-co-glicólico) (PLGA) e a poli (ϵ -caprolactona) (PCL), estão entre os polímeros biodegradáveis mais utilizados em aplicações biomédicas. Todos estes poliésteres estão aprovados pela Food and Drug Administration (FDA) para uso clínico (16).



Tabela 3- Propriedades de polímeros sintéticos aprovados para utilização em implantes médicos. (14)

Polímero	Resistência à Tração (MPa)	Módulo de Young (GPa)	Deformação de Ruptura (%)	Biodegradação (Meses)
PGA	55-80	5-7	15-20	6-12
PLLA	45-70	2.7-3.5	5-10	>24
PLGA	55-80	2	3-10	1-12
PCL	10-35	0.4-0.6	300-500	>24

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

2.3.1. Poli (ácido láctico) (PLA)

Entre as famílias de polímeros sintéticos existentes, os poliésteres têm sido os que despertam mais interesse para aplicações biomédicas devido à facilidade de degradação por hidrólise da ligação éster, sendo os produtos de degradação tipicamente reabsorvidos pelas vias metabólicas, e ao potencial para modificar a sua estrutura para alterar a cinética de degradação. Os poliésteres também têm sido considerados para o desenvolvimento de aplicações no ramo da engenharia de tecidos, particularmente para engenharia de tecidos ósseos [12]. Embora vários poliésteres estejam disponíveis comercialmente e todos sejam teoricamente degradáveis, a natureza hidroliticamente estável da ligação éster significa que apenas poliésteres com cadeias alifáticas razoavelmente curtas podem ser utilizados como polímeros degradáveis para aplicações biomédicas. Devido à facilidade de síntese através da abertura do anel ou polimerização por condensação, figura 4, e disponibilidade comercial, os poli (a-ésteres) têm sido os biomateriais degradáveis mais pesquisados até o momento. Um exemplo de um poliéster amplamente usado na área biomédica, é o poli (ácido láctico) (PLA), ilustrado na figura 5 [1].

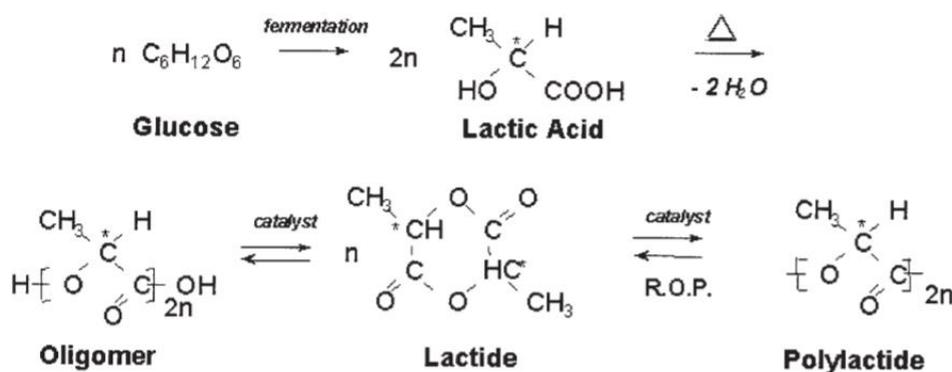


Figura 4- Síntese do PLA. (5)

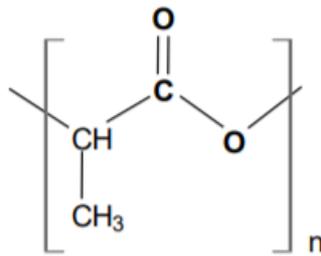


Figura 5- Estrutura química do PLA.

O aspeto mais atrativo do PLA, especialmente no que diz respeito a aplicações biomédicas, é a sua biocompatibilidade. O PLA hidrolisa para o seu constituinte hidroxiácido quando implantado em organismos vivos, incluindo o corpo humano, sendo depois incorporado no ciclo do ácido tricarbóxico e excretado. Além disso, o PLA é facilmente processado através de métodos baseados no processo de fusão, tais como injeção, extrusão, moldação sopro ou termoformação (17).

Como o PLA possui moléculas quirais, existem quatro estereoisómeros: poli (ácido L-láctico) (PLLA), poli (ácido D-láctico) (PDLA), poli (D, L-ácido láctico) (PDLLA) - uma mistura racémica de PLLA e PDLA e meso-poli (ácido láctico), representados nas figuras 6-8. O PLLA e o PDLLA têm sido propostos para diversas aplicações biomédicas (18). Na Tabela 4 estão algumas das principais propriedades do PLA (19).

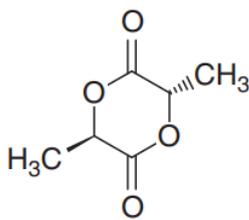


Figura 8- Meso-Láctico. (17)

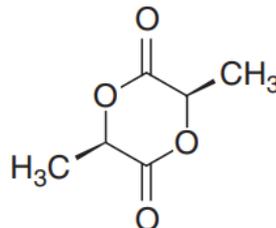


Figura 6- D-Láctico. (17)

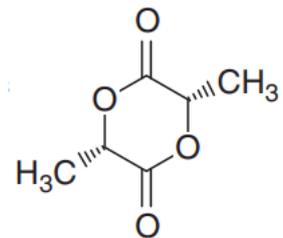


Figura 7- L-Láctico. (17)



Tabela 4- Propriedades do PLA. (18)

Densidade (ρ)	1.26 (g/cm ³)
Toxicidade	Não
Módulo de Young (E)	3.4-3.8 (GPa)
Deformação (ϵ)	2.3-2.5 (%)
Temperatura de Transição Vítrea (T_g)	49-63 (°C)
Temperatura de Fusão (T_m)	144-186 (°C)

2.3.2. Grafite

A grafite é um cristal formado por camadas tridimensionais (3D) de grafeno, como representado na figura 9. É por natureza um material com superfície lisa, constituído por camadas de carbonos hibridizados sp^2 ligados entre si na forma de um anel hexagonal planar. Essas camadas de grafeno têm 0,335 nm de distância de separação entre elas e o comprimento da ligação carbono-carbono no plano é de 0,142 nm. Além disso, as restantes orbitais p formam orbitais moleculares do tipo π deslocalizadas que se estendem paralelamente aos planos dos átomos de carbono e dão origem à mobilidade eletrónica (condutividade elétrica) assim como às atrações de van der Waals fracas entre os planos. A diferença entre as forças de ligação entre os carbonos no plano e entre os diferentes planos é responsável por diversas propriedades anisotrópicas e industrialmente relevantes da grafite, como a sua condutividade térmica, dureza, porosidade, condutividade elétrica, efeitos de superfície e reatividade química (20).

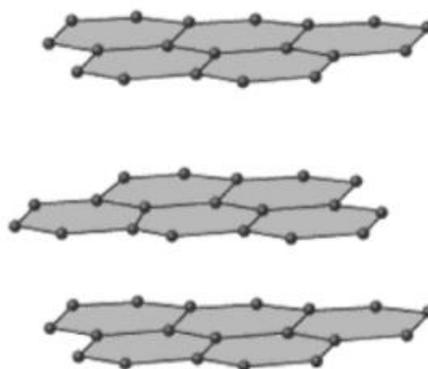


Figura 9- Estrutura molecular da grafite. (19)

A seleção de matérias-primas e condições de processamento é fundamental para a definição das propriedades do compósito final. Essas propriedades dependem da morfologia e do grau de anisotropia da grafite acabada. A tabela 5 ilustra o efeito da anisotropia nas propriedades da grafite (20).

Tabela 5- Algumas das propriedades da grafite. (19)

Propriedade	Unidade	Paralelo ao Plano	Perpendicular ao Plano (eixo z)
Resistividade	$\mu\Omega\cdot m$	0.40	60
Módulo de elasticidade	GPa	1020	36
Força de tensão	GPa	96	34
Condutividade térmica	$W/m\cdot K$	2000	10
Expansão térmica	$1/^\circ C$	-0.5×10^{-6}	27×10^{-6}

Do ponto de vista industrial, a mistura através da fusão é a técnica mais utilizada para a preparação de compósitos, por ser uma técnica direta, um processo económico e ambientalmente correto, uma vez que não são envolvidos solventes durante a preparação do compósito. Equipamentos de mistura tradicionais, como a extrusora, misturador interno e moinho de dois rolos podem ser adotados para as operações de mistura por fusão e geralmente estão disponíveis na maioria das unidades de composição (21).



2.3.2.1. Exfoliação da grafite

Quando a grafite é aquecida para lá da sua temperatura crítica ou exposta a radiações micro-ondas, ocorre uma grande expansão (até centenas de vezes) de flocos de grafite ao longo do eixo e depois na direção do plano, formando acordeões, com baixa densidade e resistência a altas temperaturas, sendo este produto expandido conhecido como grafite expandida (EG), representada na figura 10. Esta é composta por pilhas de nano folhas que podem variar de 100 a 400 nm. Industrialmente, a grafite expandida é produzida submetendo flocos de grafite naturais a ácido sulfúrico seguido de um choque térmico brutal. Esta exhibe uma estrutura em camadas semelhante a camadas de silicatos e apresenta uma boa afinidade com polímeros e compostos orgânicos (21)

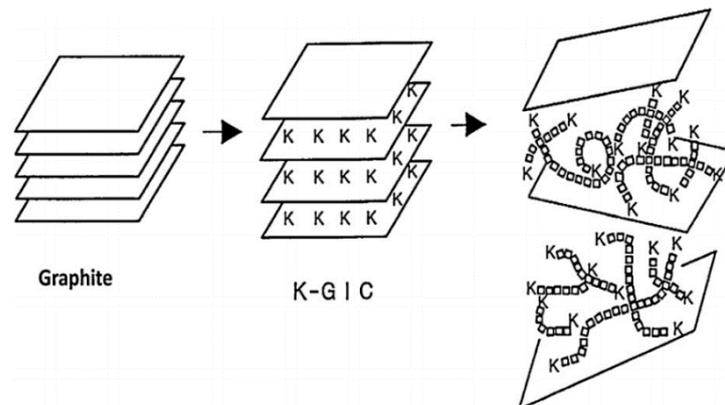


Figura 10- Esfoliação/Expansão da grafite. (20)

2.3.3. Grafeno

O grafeno, é uma folha individual bidimensional, com a espessura de um átomo de carbono, composta por uma rede hexagonal de átomos de carbono, que tem sido intensamente investigado desde o seu primeiro isolamento em 2004, baseado na exfoliação mecânica de grafite pirolisada altamente orientada (HOPG). As suas extraordinárias propriedades fazem dele um candidato promissor para diversas aplicações práticas no ramo da eletrónica, sensorização, catálise, armazenamento de energia, conversão, etc.



Tanto os estudos teóricos como os experimentais provaram que as propriedades do grafeno são principalmente dependentes da sua estrutura geométrica. Na figura 11 está representada a estrutura do grafeno de acordo com a sua escala de tamanho (22).

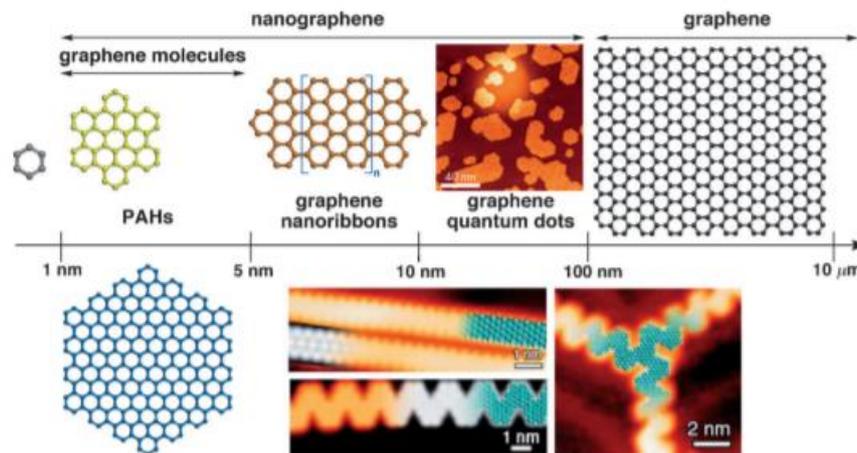


Figura 11- Ilustração esquemática da terminologia do grafeno de acordo com a sua escala de tamanho. (21)

Para regenerar o tecido muscular esquelético, as terapias baseadas em células-tronco são frequentemente usadas com nanomateriais que podem atuar como estruturas funcionais para estimular a viabilidade e diferenciação celular. A esse respeito, como os materiais à base de grafeno possuem excelente flexibilidade, condutividade elétrica relativamente alta e fortes propriedades mecânicas com densidade ultralateral, eles podem atuar como excelentes substratos celulares para engenharia de tecido muscular. Para além disso, estes materiais melhoram ainda a adesão, proliferação, miogênese das células musculares e o alinhamento celular, maximizando, estas últimas duas, o poder contrátil celular dos tecidos musculares (23).

Os biomateriais são componentes cruciais na engenharia de tecidos, pois podem induzir funções celulares específicas, diferenciação direta de células e modular interações célula-célula. No entanto, todos os tecidos no corpo possuem propriedades mecânicas, elétricas ou físicas diferentes. Materiais únicos podem não imitar as propriedades físicas e biológicas do tecido nativo; portanto, materiais híbridos com múltiplos componentes que podem atender a diferentes requisitos são amplamente utilizados para fabricar tecidos artificiais. As extraordinárias propriedades mecânicas e elétricas dos materiais à base de grafeno motivaram os pesquisadores a usá-los na engenharia de tecidos e na medicina regenerativa. O grafeno pode ser combinado com uma grande variedade de materiais bioativos para projetar materiais com as características desejadas.



O grafeno e seus derivados têm sido uma nova classe essencial de nanomateriais e um sistema modelo para o comportamento quântico. A excelente condutividade elétrica e térmica, área superficial, resistência térmica do material e possível biocompatibilidade são de grande interesse para a comunidade científica. Os materiais bidimensionais de grafeno têm sido amplamente utilizados em várias áreas de pesquisa biomédica, como bioeletrônica, liberação controlada de fármacos e engenharia de tecidos (22).

2.3.4. Funcionalização do grafeno

A funcionalização do grafeno, exemplificada na figura 12, aparece como uma estratégia adequada para aumentar a compatibilidade entre o grafeno e uma matriz polimérica, resultando na produção de compósitos com propriedades estruturais excepcionais com baixas cargas de reforço. A funcionalização do grafeno pode ser alcançada por meio de modificações covalentes e não covalentes. O primeiro leva à formação de interfaces fortes e estáveis com matrizes polimérica através da adição de grupos funcionais à superfície de grafeno, que fornece reatividade para certos compostos, polímeros ou moléculas com atividade biológica (24).

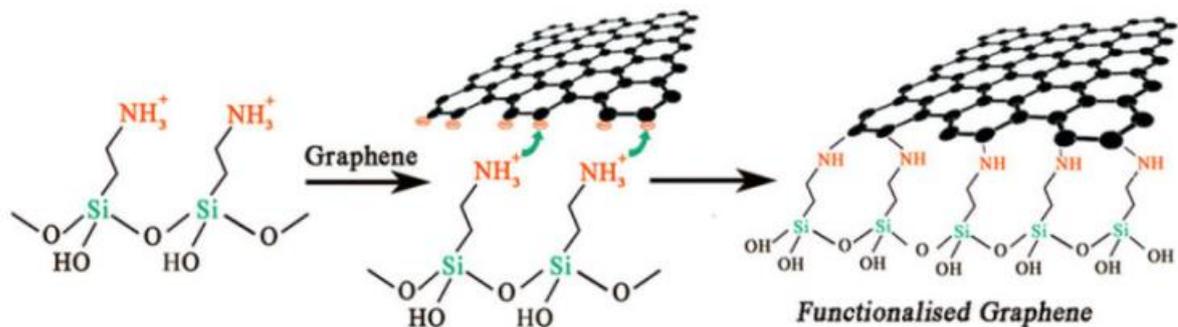


Figura 12- Funcionalização do grafeno. (46)



2.3.5. Grafeno decorado com nanopartículas de prata

A presença de um material estranho, como um biomaterial sintético, no corpo do recetor do implante representa um local potencial para a atividade microbiana. Reduzir a adesão bacteriana é muito importante, pois a fixação da superfície do microrganismo é o primeiro passo crítico no desenvolvimento de infeções associadas ao implante. Para superar as limitações dos tratamentos com antibióticos para a prevenção de infeções periprotéticas, é dada uma atenção especial ao uso de agentes antimicrobianos alternativos, como cobre (Cu), zinco (Zn) e prata (Ag). Este último, é um agente antibacteriano de amplo espectro e é usado nas formas iónica e metálica e é particularmente usado na forma de nanopartículas em soluções coloidais. A atividade antimicrobiana tem sido relacionada principalmente à sua forma oxidada (Ag^+), causando a rutura das membranas celulares bacterianas, inibição de atividades enzimáticas, produção de ATP nos processos de transporte de iões e replicação do DNA. A reatividade da prata é ainda mais potenciada quando é usada na forma de nanopartículas, que possuem uma enorme relação superfície /volume, sendo por isso, que a funcionalização do grafeno com as mesmas deve cumprir a sua função com o mínimo de prata possível, para que a toxicidade que pode advir da concentração da mesma em excesso seja evitada (25). Os vários modos de ataque das nanopartículas de prata sob bactérias são representados na figura 13.

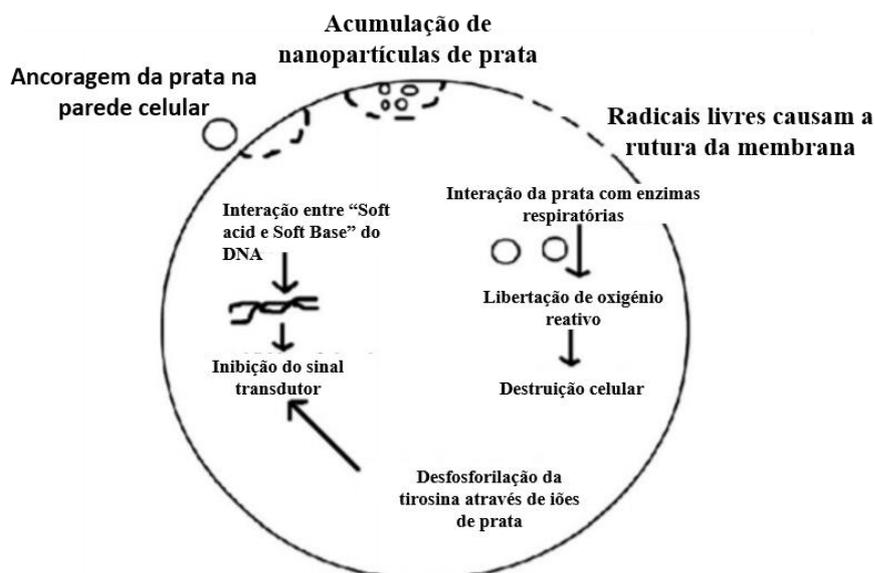


Figura 13- Vários modos de ataque das nanopartículas de prata sob as bactérias. (45)



Nanomateriais e, especialmente, nanopartículas metálicas (NPs), como o caso da prata (Ag), surgiram como uma nova classe de compostos particularmente interessantes para a ciência dos materiais devido a uma vasta gama de propriedades únicas. Podem ser aplicados em diversas áreas, da química à física, ciências dos materiais, biologia e medicina. A combinação desses materiais com nanoestruturas de carbono pode levar a uma integração bem-sucedida das propriedades dos dois componentes nos novos materiais híbridos que apresentam características importantes para catálise e nanotecnologia (26) (27).

É de prever que a decoração de grafeno com nanopartículas de prata possa ter efeito benéfico na condutividade elétrica de compósitos à base de grafeno e, por sua vez, levar a uma diminuição na resistividade do *scaffold*, podendo ser considerado uma vantagem, uma vez que se sabe que os campos elétricos aplicados (estáticos e pulsantes) são amplamente utilizados em práticas ortopédicas e têm demonstrado melhorar a cicatrização do ligamento in vivo (26) (27).

2.4. Técnicas têxteis de processamento de *scaffolds* para regeneração de ligamentos

Na última década, técnicas têxteis, tais como tecelagem, tricô, trança e eletrofiação surgiram como plataformas promissoras para o processamento de *scaffolds* para regeneração de tecidos humanos. Para fabricar um scaffold funcional, a construção projetada deve simular as suas propriedades estruturais, topográficas e mecânicas. Além disso, o *scaffold* deve facilitar a difusão de nutrientes e oxigênio (O), bem como a remoção de resíduos metabólicos durante a regeneração do tecido, como foi anteriormente mencionado.

Dois *designs* aplicados recentemente na produção de *scaffolds*, representados na figura 14, são a torção e o entrançamento (*braid-twist*). A combinação destas duas técnicas é normalmente usada no fabrico de materiais têxteis e ambas as técnicas têm sido usadas separadamente para produzir *scaffolds* para regenerar LCA. O entrançamento é uma técnica usada para produzir produtos que suportem cargas axiais e fornecer reforço mecânico. As estruturas entrançadas são resistentes ao corte, conformáveis e podem transferir grandes cargas enquanto fornecem extensão, e em comparação com outras estruturas têxteis, oferecem maior força axial. A porosidade e as propriedades mecânicas podem ser ajustadas espacialmente. Assim, além dos tecidos conjuntivos, as estruturas entrançadas podem ter o potencial de serem usadas em tecidos de engenharia que requerem alta resistência mecânica.

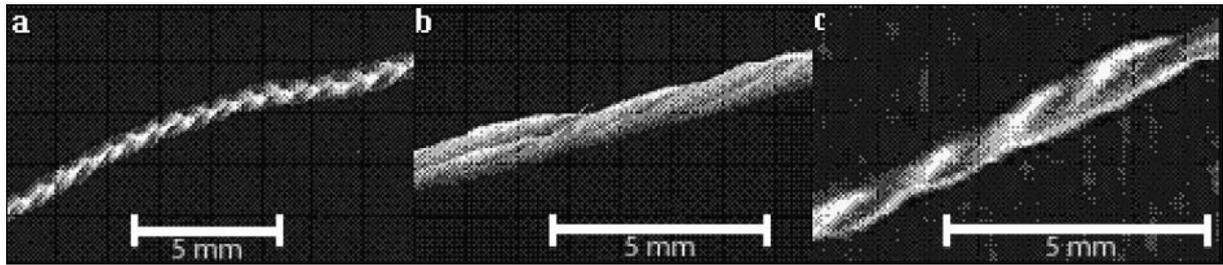


Figura 14- Métodos têxteis utilizados para a produção de scaffolds. As imagens apresentam os scaffolds entrançados (a), com torção (b) e a combinação do entrançamento com a torção (c). (10)

A torção das fibras é usada na indústria têxtil para formar fios. A direção e o grau de torção afetam a resistência do fio, a resistência à abrasão e a flexibilidade. Um baixo grau de torção produz fios mais frágeis que se separam e partem mais facilmente e podem desenvolver saliências nas suas superfícies devido a abrasões. O aumento do grau de torção melhora a resistência e a abrasão do fio. A combinação de torção com o entrançamento das fibras produz uma estrutura mecanicamente estável, com maior capacidade de carga e maior grau de extensibilidade. Os graus de entrançamento e de torção podem ser alterados para ajustar as propriedades mecânicas do *scaffold* às do tecido que se pretende regenerar [19].

A tabela 6 e 7 resumem os principais resultados dos estudos relacionados com a utilização de técnicas têxteis para a produção de *scaffolds* baseadas em poliésteres na regeneração de ligamentos, assim como algumas vantagens e desvantagens associados a cada um desses materiais poliméricos.



Tabela 6- Principais estudos na área da engenharia de tecidos para regeneração de ligamentos. (14) (27)

Biomaterial	Estudos	Técnicas Têxteis	Refs.
PGA	Um scaffold de PLLA tem maior integridade estrutural e propriedades mecânicas ao longo do tempo, apresentando uma maior contagem de células in vitro, quando comparado com scaffolds de PGA.	Entraçamento	(16) (28)
PLLA	Implantes entraçados de PLLA degradam-se mais rapidamente in vivo do que in vitro. Implantes de 2.0 mm perderam 69% da carga de tração inicial em 46 semanas de degradação in vitro. Em condições in vivo, ambos os implantes de 2.0 e 3.2 mm retiveram apenas 3% e 4% da sua carga de tração inicial.	Entraçamento Torção Entraçamento- Torção	(16) (28)
PLGA	Propriedades mecânicas diminuem na degradação in vitro, mas ainda dentro dos valores fisiologicamente relevantes.	Entraçamento	(16) (28)
PGA/PLA	O scaffold puro de PGA/PLA não conseguiu regenerar tecido com propriedades mecânicas adequadas, atingindo apenas 14% da força normal do tendão após o implante.	-	(16) (28)
PCL	Após 16 semanas, enxertos acelulares contendo fatores de crescimento alcançaram 58.8% da rigidez e 40.7% da carga do LCA nativo, e sem fatores de crescimento adicionados, alcançaram apenas 31.3% da rigidez e 28.2% da carga.	Entraçamento	(16) (28)



Tabela 7- Vantagens e desvantagens de materiais poliméricos na regeneração de tecidos.

Material	Vantagens	Desvantagens	Refs.
PCL	Considerado um polímero não-tóxico, compatível com o tecido e com outros polímeros e tem uma taxa de degradação lenta em comparação com o PLA;	Propriedades mecânicas reduzidas;	(29) (28)
PLLA	Boa adesão celular e proliferação, fácil de produzir e taxa de degradação lenta;	Biologicamente inerte; Produção de soluções tóxicas devido à sua degradação acida;	(28)
PGA	Boas propriedades mecânicas iniciais;	Degradação demasiado rápida aquando comparado com outros materiais e rápida perda de propriedades mecânicas;	(28)
PLA-PGA	Biocompatível, não-tóxico e não inflamatório.	Promovem reações adversas durante o processo de reparação de tecido.	(29)

É importante sublinhar, que a área da engenharia de tecidos ainda está numa fase embrionária e muitas abordagens diferentes estão a ser alvo de investigações experimentais. Assim, ainda não está claro o que define um conjunto scaffold/célula ou scaffold/tecido recém-formado ideal, mesmo para um tipo de tecido específico. De fato, uma vez que alguns tecidos desempenham múltiplas funções, é improvável que um único scaffold sirva de base universal para a regeneração de um único tecido. Portanto, as considerações para o seu desenvolvimento são complexas e incluem a composição do material, arquitetura porosa, propriedades mecânicas, propriedades da superfície, propriedades dos produtos de degradação, e ainda a composição de quaisquer componentes biológicos adicionados e, é claro, as variações de todos esses fatores com o tempo.

2.5. Produção de filamentos de compósito para regeneração do LCA

Os polímeros termoplásticos semicristalinos amolecem ou fundem quando aquecidos acima do seu ponto de fusão, este tipo de processamento tem sido uma técnica muito valiosa no fabrico de compósitos reforçados com nanopartículas. Em geral, este tipo de processamento envolve a mistura do polímero fundido com as nanopartículas por aplicação de forças de corte intensas. Dependendo da morfologia/forma final dos compósitos, as amostras podem ser processadas através de diversas técnicas, como por exemplo a extrusão.



Tal como acontece com outros polímeros, a preparação de compósitos de PLA/NP's através desta técnica é prejudicada pela capacidade de obter uma dispersão suficientemente boa. De fato, estes compósitos normalmente contêm aglomerados primários de nanopartículas remanescentes, devido às fortes interações entre elas. O tamanho e o número dos aglomerados restantes - e, portanto, o nível de dispersão - são influenciados pelos parâmetros de processamento. Altas tensões hidrodinâmicas, bem como longos tempos de residência durante a mistura são geralmente necessários para produzir níveis de dispersão mais elevados. Na extrusão, um perfil de parafuso que contenha um número significativo de elementos de mistura de distribuição tipicamente resulta numa melhor dispersão de nanopartículas na matriz de PLA do que um parafuso padrão com alguns elementos de mistura.

As fracas interações entre as nanopartículas de reforço e o polímero também podem afetar a dispersão, impedindo a infiltração do polímero fundido sobre os aglomerados primários, resultando em aglomerados remanescentes de maiores dimensões. Assim, a modificação química da superfície das nanopartículas com grupos funcionais adequados podem ser uma forma eficaz de aumentar as interações interfaciais e melhorar a dispersão.

Dependendo da morfologia/forma final dos compósitos, os materiais podem ser então processados através de variadas técnicas e usados em diversos tipos de equipamentos de mistura, como extrusoras, misturadores internos e outros tipos de misturadores, como por exemplo, a extrusora de parafuso duplo representada na figura 15 (30).

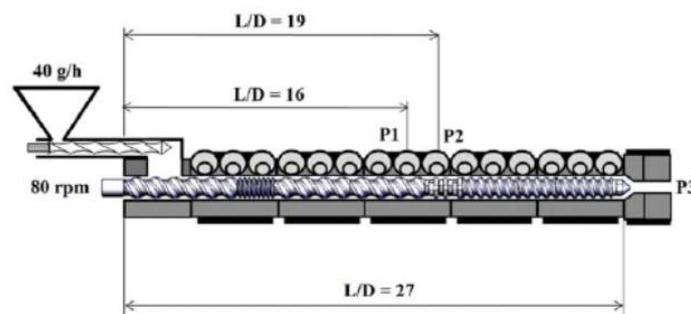


Figura 15- Layout de extrusora co-rotativa de parafuso duplo. (28)

Num estudo recente, com o objetivo de superar alguns desafios subjacentes à dispersão de grafite exfoliada em poli (ácido-lático) (PLA) através de extrusão, é utilizada outro tipo de abordagem, onde os grânulos de PLA são revestidos uniformemente pela grafite exfoliada antes da sua extrusão, sendo estudado o efeito do processamento por fusão em diferentes compósitos carregados de grafeno.



(31) Noutro estudos, foram também analisados os efeitos da extrusão de filamento, na condutividade elétrica e propriedades mecânicas em compósitos de poli (ácido láctico) (PLA) revestidos com nanopartículas de grafeno. (32) Assim como o efeito do múltiplo reprocessamento nas propriedades do poli (ácido láctico) (PLA) revestido também com nanopartículas de grafeno em comparação com a matriz polimérica pura do material fundido reprocessado, onde os materiais nanocompósitos foram preparados por uma extrusora co-rotativa de parafuso duplo (33).



Capítulo 3

Materiais e Métodos



3. Materiais e Métodos

Este trabalho divide-se em duas fases: Numa primeira fase realizou-se a funcionalização da grafite exfoliada (EG), e na segunda fase foram produzidos filamentos compósitos com 0.25 mm de diâmetro para produção de scaffolds através de técnicas têxteis. Os materiais e procedimentos experimentais adotados neste trabalho para produzir grafite esfoliada funcionalizada e filamentos de compósito são descritos neste capítulo, assim como todas as técnicas adotadas para a sua caracterização.

3.1. Materiais

3.1.1. Preparação de Grafite exfoliada funcionalizada

A Grafite exfoliada (EG), Micrograf HC11, com 99.5% de pureza e 9,9 μm de largura média da folha, foi obtida na Nacional de Grafite Lda. A EG foi funcionalizada via cicloadição dipolar 1,3 de íletos de azometina. Os reagentes usados foram um aminoácido, *N*-(benziloxycarbonil) -glicina (Z-Gly-OH, 99% da Aldrich) e paraformaldeído, da Sigma-Aldrich. A lavagem dos produtos foi realizada com etanol da Fisher Scientific UK, hexano comercial da JMS e acetona da Pronalab. O produto final é a EG funcionalizada, designada por f-EG.

3.1.2. Decoração da grafite esfoliada funcionalizada com nanopartículas de Prata

O procedimento de decoração da grafite esfoliada funcionalizada (f-EG) com nanopartículas de prata (f-EG + Ag) foi baseado na reação de redução dos iões de prata (Ag^+) utilizando N, N-dimetilformamida (DMF), da Panreac. A solução de nitrato de prata foi misturada com etanol, ambos da Fisher Scientific. O produto final foi obtido por filtração e lavagem com éter dietílico e hexano, também da Fisher Scientific.



3.1.3. Filamentos de Compósito

O polímero utilizado na produção dos filamentos foi o PLA Luminy LX175 da Total Corbion. É um polímero amorfo com uma viscosidade relativamente alta, sendo uma resina adequada para extrusão ou fiação de fibra, com índice de fluidez de 3 g/10 min. O PLA é um polímero de origem biológica derivado de recursos naturais com densidade de $1,25\text{gcm}^{-3}$. (28) Foi misturado por fusão com três composições diferentes de EG: Micrograf (EG recebido da Nacional de Grafite), grafite exfoliada funcionalizada (f-EG) e grafite exfoliada funcionalizada decorada com nanopartículas de prata [(f-EG) + Ag]. Uma extrusora Rondol Microlab de duplo fuso foi usada para preparar compósitos de PLA com 0,25%, 0,5%, 1% e 2% em massa de EG, f-EG e (f-EG) + Ag como mencionado anteriormente.

3.2. Métodos

3.2.1. Produção da grafite exfoliada funcionalizada

Como já referido anteriormente, a grafite exfoliada foi funcionalizada por meio de cicloadição dipolar 1,3 de íletos de azometina, ligando grupos de pirrolidina na superfície do grafeno. A funcionalização foi realizada com sucesso através dos seguintes passos: 10 g de Z-Gly-OH foram misturados com 50 ml de éter dietílico e deixados sob um agitador magnético, à temperatura ambiente, durante 5 min; em seguida, foram adicionados 7 g de paraformaldeído e a suspensão foi mantida outra vez sob agitação magnética, à temperatura ambiente, por mais 5 min. Por fim, foram adicionados 10 g de EG e 50 ml de éter dietílico à mistura anterior. A mistura reacional foi agitada e aquecida a 30-35 °C, até o éter dietílico evaporar. Em seguida, a mistura sólida foi aquecida a 250 °C durante três horas. De acordo com Paiva et al. (34), o aquecimento da mistura de reação sólida produz formaldeído por decomposição térmica do paraformaldeído; o formaldeído difunde-se e reage com o aminoácido fundido formando as espécies dipolares representadas na Figura 16, que reagem por cicloadição às ligações duplas C=C da superfície de grafeno.

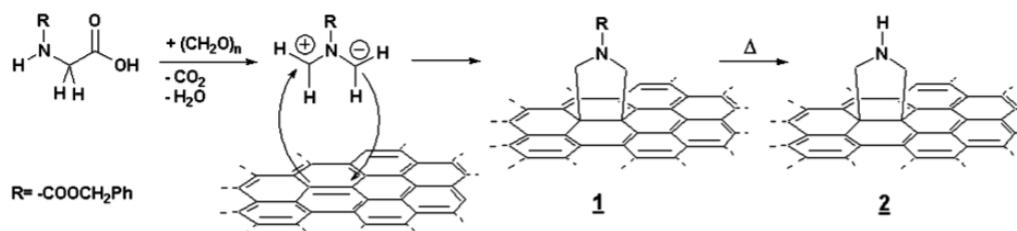


Figura 16- Funcionalização da superfície CNT. (34)

O produto foi seco a 80 °C durante 5 h e depois arrefecido à temperatura ambiente e lavado com uma sequência de solventes, nomeadamente etanol, hexano, acetona e uma segunda vez com etanol. Finalmente, é seco novamente por 2 horas a 150 °C e 1 hora a 100 °C sob vácuo. No final dessas etapas, obteve-se a grafite exfoliada funcionalizada (f-EG) (34).

3.2.2. Decoração da grafite funcionalizada com nanopartículas de prata

A decoração da grafite exfoliada funcionalizada com nanopartículas de prata em (f-EG + Ag) foi realizada usando o método descrito por Cheng Ma et al. (35). O procedimento foi o seguinte: primeiro, foram misturados 140 mg de nitrato de prata (NOAg₃) com 8 mL de etanol e deixados sob agitação magnética, à temperatura ambiente, durante 15 min; ao mesmo tempo, 280 mg de f-EG foram misturados com 16 ml de DMF e deixados sob agitação magnética, à temperatura ambiente, durante 15 min; em seguida, essas duas suspensões foram misturadas e agitadas por 72h; essa suspensão foi submetida a ultrassonografia por 15 min a cada 24h. Finalmente, o produto foi lavado com éter e hexano e seco a 150 °C durante 2 h em vácuo. No final dessa etapa, foi obtida a decoração da grafite esfoliada funcionalizada com nanopartículas de prata (f-EG + Ag).



3.2.3. Produção dos filamentos

Os filamentos foram produzidos com recurso a uma mini extrusora Rondol Microlab Twin Screw com PLA e PLA com 0,25, 0,5, 1 e 2% em massa de EG, f-EG e (f-EG) + Ag, individualmente. O equipamento foi inicialmente desenhado/projetado para processar pequenas quantidades de material, mantendo desta maneira as características térmicas e hidrodinâmicas de equipamentos de maiores dimensões. A extrusora possui um diâmetro de rosca de 10 mm, sendo o fuso configurado com diferentes elementos que permitem o escoamento do material ao longo do canal, promovendo ainda uma mistura intensiva e eficaz do material por inclusão de elementos de mistura, conforme ilustra a figura 17.



Figura 17- Parafusos da mini extrusora constituídos por diferentes elementos de mistura e transporte.

Para obter um filamento com 0,25 mm de diâmetro, que possa ser utilizado posteriormente na produção de *scaffolds* com recurso a técnicas têxteis, as condições de processamento variam de acordo com o filamento a ser processado da seguinte forma:

- Para a produção dos filamentos de PLA, a velocidade de rotação dos parafusos foi de 15 rpm, a zona de alimentação e a fiação eram mantidas a 160 e 130 °C, respetivamente, e um alimentador volumétrico miniaturizado era ajustado a 37,4 g/h.
- Em filamentos compósitos, as condições de processamento variaram dependendo do tipo de grafite a ser adicionado (EG, f-EG ou f-EG + Ag) e da percentagem de reforço necessária, tal como está indicado na tabela 8.



Tabela 8- Parâmetros de processamento para a produção de filamentos compósitos com 0,25%, 0,5%, 1% e 2% de grafite.

Material		Temperatura (°C) Zona de Alimentação/Meio/Fieira	Débito ($g \cdot h^{-1}$)	Velocidade do Parafuso(rpm)
PLA+ 0,25%	EG	160/170/130	0.096	15
PLA+ 0,5%			0.186	
PLA+ 1%		160/170/130	0.376	25
PLA+ 2%			0.759	45
PLA+ 0,25%	f-EG	160/170/123	0.108	25
PLA+ 0,5%			0.2	
PLA+ 1%		160/170/130	0.376	45
PLA+ 2%			0.759	65
PLA+ 0,25%	f-EG+Ag	160/170/123	0.126	25
PLA+ 0,5%			0.240	
PLA+ 1%		160/170/130	0.376	45
PLA+ 2%			0.759	65

Para uma extrusão controlada de cada filamento, em particular para o controlo do diâmetro do filamento extrudido, é exigido um par de rolos de puxo, posicionados em sequência de forma a puxar, ajustando o diâmetro e orientando a fibra horizontalmente. Durante este processo o filamento arrefece e consolida ao ar. Após isto, os filamentos foram enrolados e recolhidos. Durante a extrusão de cada tipo de filamento, a velocidade de ambos os rolos foi semelhante, tal como indicado na Tabela 9. No entanto, foram necessários alguns pequenos ajustes para cada composição, variando ligeiramente sua velocidade.



Tabela 9- Velocidades dos rolos de puxo para os compósitos com 0,25%, 0,5%, 1 e 2% de grafite.

Material	Velocidade dos rolos(rpm)	
	Rolo 1	Rolo 2
PLA	33.38-33.62	33.72-33.84
PLA + 0.25% EG	33.52-33.56	33.76-34.02
PLA + 0.5% EG	36.60-36.58	36.80-36.82
PLA + 1% EG	33.04-33.24	40.72-41.02
PLA + 2% EG	33.02-33.24	43.98-44.14
PLA + 0.25% f-EG	38.88	39.08-39.12
PLA + 0.5% f-EG	39.28	39.4-39.48
PLA+ 1% f-EG	35.54-35.86	42.86-43.14
PLA+ 2% f-EG	33.02-33.24	44.64-44.86
PLA+ 0.25% (f-EG+Ag)	39.24-39.30	39.44-39.48
PLA+ 0.5% (f-EG+Ag)	39.34	39.54-35.58
PLA+ 1% (f-EG+Ag)	35.58-35.88	43.66-43.9
PLA+ 2% (f-EG+Ag)	32.98-33.18	45.12-45.30

3.2.4. Caracterização estrutural dos filamentos compósitos

3.2.4.1. Análise Termogravimétrica (TGA)

A análise termogravimétrica é uma técnica importante usada para avaliar informações sobre a composição (alterações físicas -/- químicas) e estabilidade térmica de materiais de base polimérica. Este método avalia a alteração de massa de um material em função de um programa de temperaturas, permitindo avaliar a sua estabilidade térmica ao longo desse programa. A TGA também pode ser usado para determinar os teores de umidade, voláteis e de carga, para estudar os efeitos dos aditivos e para obter a separação de alguns componentes. Na tentativa de determinar os mecanismos exatos de degradação do polímero, a TGA foi acoplada a técnicas espectroscópicas para esclarecer os mecanismos de degradação e identificar componentes (36).

Os equipamentos TGA consistem em dois componentes principais: uma microbalança e um forno. As amostras são colocadas no cadinho inerte e colocadas no forno. A variação de massa é medida enquanto as amostras são submetidas a um programa de temperaturas definido. Um fluxo de



gás flui a uma velocidade constante através do forno para limpá-lo dos gases de degradação e aumentar a condutividade térmica da atmosfera do forno (36).

A análise de TGA foi realizada no equipamento Q500 (TA Instruments, EUA) para o rendimento da funcionalização da EG. quantificação do rendimento de funcionalização de EG e avaliar a sua estabilidade térmica. Aproximadamente 4 mg de cada amostra foi colocada no cadinho de platina e aquecida sob uma atmosfera de nitrogênio (fluxo constante de 50 mL/min) variando a temperatura entre 40 °C e 950 °C. Os ensaios foram realizados a uma velocidade de aquecimento de 10 °C/min (37).

3.2.4.2. Espectroscopia Raman

A espectroscopia Raman tem um papel importante no estudo e caracterização de materiais à base de grafite, sendo amplamente utilizado nas últimas quatro décadas para caracterizar grafite pirolítica, fibras de carbono (C), nanotubos de carbono, grafeno, entre outros, identificando os tipos de ligações e fornecendo informações sobre o grau de desordem da rede cristalina (38).

A espectroscopia Raman tem vindo a ser utilizada para analisar as características estruturais e eletrónicas do grafeno, grafite e seus derivados, fornecendo informações úteis sobre as três principais bandas, típicas do grafeno e derivados. A banda D, centrada próximo de 1350 cm^{-1} , que resulta de defeitos estruturais, que têm origem na inserção de grupos funcionais no plano de carbono originando hibridização sp^3 . A intensidade desta banda diminui com perfeição da ligação da rede hexagonal de carbono, indicativa de uma diminuição dos defeitos. A banda G, cerca de 1580 cm^{-1} , está diretamente relacionada com a vibração no plano de átomos de carbono sp^2 , refletindo a qualidade da rede de grafite do material, uma vez que avalia a hibridização sp^2 da estrutura. A banda 2D ou G', em torno dos 2670



cm^{-1} , corresponde ao “espalhamento” ou dispersão de segunda ordem da banda D, fornecendo informações sobre o número de camadas do grafeno. Estas bandas surgem no espectro de Raman em torno dos 1350 cm^{-1} , 1580 cm^{-1} e 2670 cm^{-1} conforme ilustrado na figura 18 (38) (39).

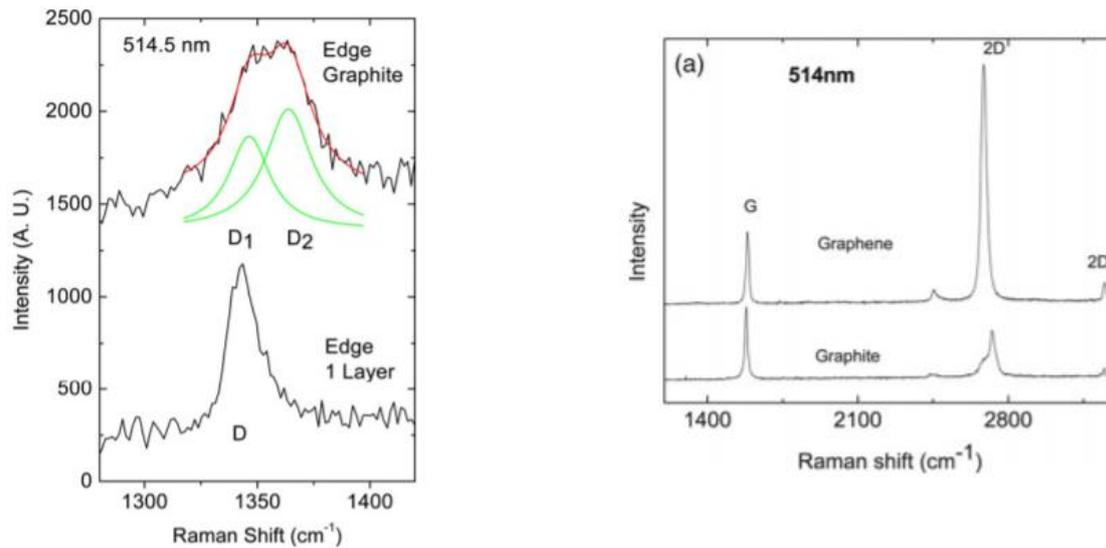


Figura 18- Comparação do Espectro Raman da grafite e do grafeno. (63)

De forma a avaliar o rendimento da funcionalização, a qualidade da estrutura e o nível de exfoliação através de Espectroscopia Raman, os filamentos de grafite exfoliada (EG), grafite exfoliada funcionalizada (f-EG) e (f-EG)+Ag, foram colocados sobre uma lamela de vidro e analisados num espectrómetro LabRAM HR Evolution Raman (Horiba Scientific, Japão) usando um laser com um comprimento de onda de 532 nm. Os resultados foram analisados e normalizados com o software LabSpec6.



3.2.4.3. Microscopia Eletrónica de Varrimento (SEM)

O microscópio eletrónico de varrimento (SEM), cujas características estão ilustradas na figura 19, é um instrumento que cria imagens ampliadas, revelando informações em escala microscópica sobre o tamanho, forma, composição, cristalografia e outras propriedades físicas e químicas de uma amostra, através de sinais de eletrões espalhados pela superfície, sendo habitualmente aplicado para visualização de materiais à base de grafite. (40) No SEM, os eletrões são gerados por um canhão de eletrões e focalizados num feixe de alta energia da ordem dos 2–10 nm de largura quando atinge a amostra. O feixe é controlado eletronicamente por uma série de lentes e permite digitalizar uma área desejada de uma superfície. Este feixe pode variar em energia de 1 a 40 keV. Os eletrões interagem com os átomos na amostra e são espalhados pela superfície da amostra produzindo uma variedade de sinais. Os sinais secundários e retro-difundidos são geralmente capturados e convertidos numa imagem da superfície (20).

O feixe de eletrões, extremamente estreito, produz imagens com uma grande profundidade de campo, de modo a que aspetos 3D da superfície possam ser visualizados. Usando detetores adequados, esses sinais podem ser usados para realizar análises químicas da superfície permitindo a identificação qualitativa e quantitativa dos elementos da amostra. A Figura 19 mostra as principais características de um microscópio eletrónico de varredura (SEM). Para imagens convencionais de SEM, as amostras devem ser eletricamente condutoras para evitar a acumulação de carga. As amostras não condutoras são revestidas com ouro, tornando as suas superfícies condutoras evitando distorções de imagem devido à acumulação de carga (20).

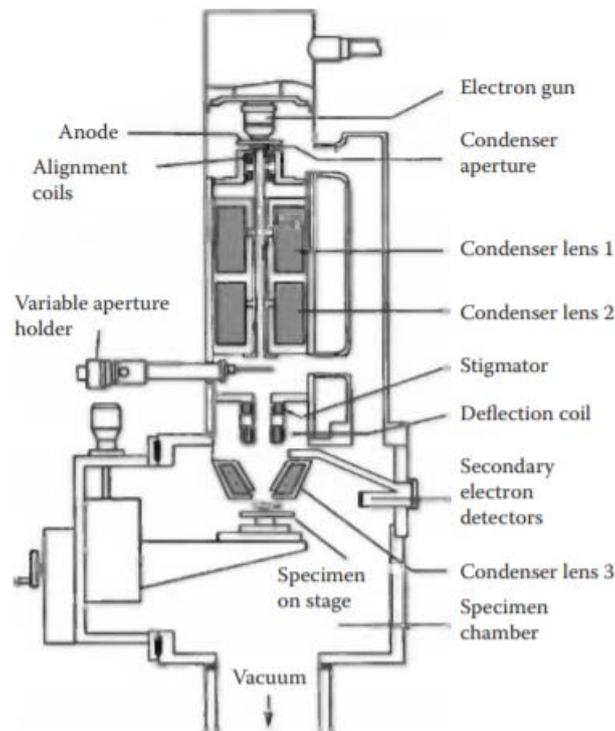


Figura 19- Principais características de um microscópio eletrônico de varredura (SEM). (20)

A morfologia e a distribuição do reforço dos filamentos de PLA, PLA com grafite exfoliada (EG), PLA com grafite exfoliada funcionalizada (f-EG) e do PLA com grafite exfoliada funcionalizada decorada com nanopartículas de prata (f-EG + Ag) foram caracterizadas por SEM, utilizando o instrumento FEI Nova 200 FEG-SEM/EDS.

3.2.4.4. Microscopia Ótica

O microscópio ótico, representado na figura 20, é um dispositivo que contém uma ou mais lentes que produzem uma imagem ampliada da amostra colocada no plano focal da lente. A resolução do microscópio ótico é limitada pelos efeitos de difração e aproxima-se dos comprimentos de onda da luz transmitida, na região dos 200 nm. Existem duas opções disponíveis em microscopia ótica: (1) Microscopia de transmissão, em que o feixe de luz passa por um objeto transparente ou por uma secção fina, e (2) microscopia de reflexão, na qual a luz incidente é refletida na superfície de uma amostra sólida. Uma possibilidade adicional destes dispositivos é o uso de luz polarizada no plano.



Esta técnica é particularmente adequada para o estudo de materiais anisotrópicos, como a grafite. A luz branca normal abrange todos os comprimentos de onda de luz visível que vibram em todas as direções em um plano perpendicular à direção de propagação. Quando essa luz passa através de um filtro de polarização, uma onda com apenas uma única direção de vibração paralela ao polarizador, ou luz plano- polarizada, emerge (20).

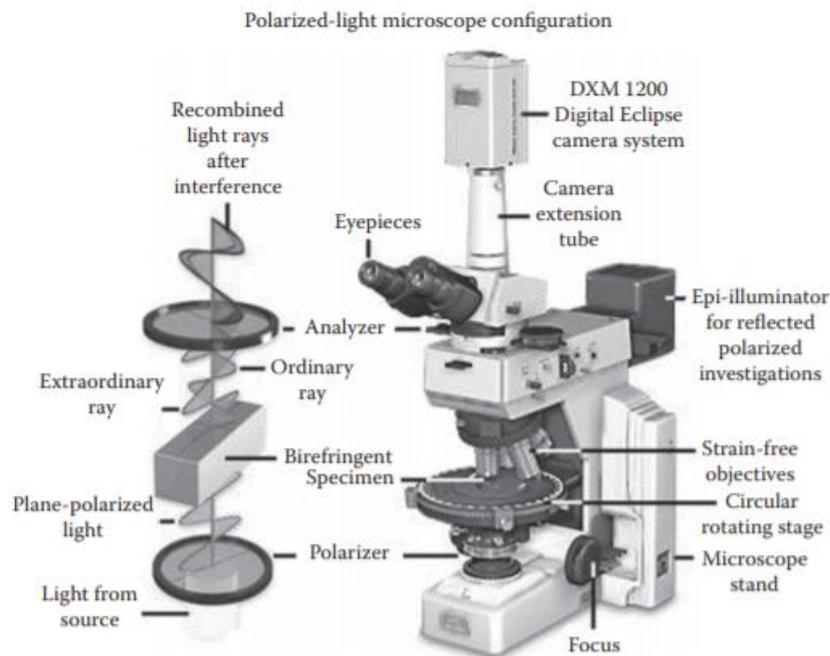


Figura 20- Representação de um microscópio ótico de luz polarizada configurado para reflexão e transmissão. (20)

A microscopia ótica foi utilizada para confirmar a presença de grafite nos compósitos, analisar a dispersão e possível formação de aglomerados e quantificar a razão de área das partículas de reforço na matriz. Para tal, foram cortadas secções transversais de cada filamento no micrótomo Leica EM UC6, colocadas sobre uma lamela de vidro com bálsamo do Canadá e, a seguir, analisadas no microscópio ótico Olympus BH-2 com as lentes de 10x e 40x, em modo de transmissão. As imagens obtidas por microscopia ótica foram analisadas com o software ImageJ para análise estatística.



3.2.4.5. Calorimetria Diferencial de Varrimento (DSC)

A Calorimetria Diferencial de Varrimento (DSC) permite medir a diferença entre o fluxo de calor fornecido a uma amostra e a uma referência enquanto ambas estão sujeitas a um programa de temperatura controlada (41). O DSC é provavelmente das técnicas mais populares de análise térmica devido à sua ampla gama de áreas de aplicação e também ao facto de que as medições são rápidas e fáceis (42). Como as reações químicas e muitas transições físicas estão relacionadas com a libertação ou absorção de calor, a calorimetria é um método universal para investigar tais processos. Dispositivos de medição onde uma quantidade exatamente conhecida de calor é introduzida numa amostra, ou abstraída dela, e a mudança de temperatura na amostra é medida (determinação da capacidade de calor, por exemplo), também são conhecidos como calorímetros. Os componentes do sistema de medição são representados esquematicamente na figura 21 (41).

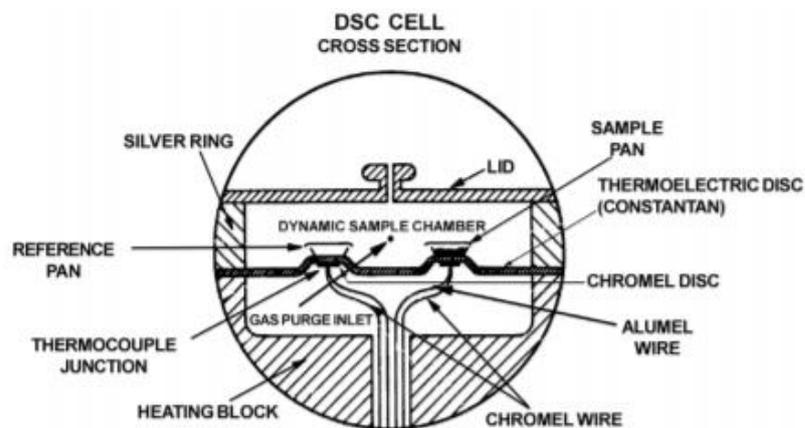


Figura 21- Componentes de medição do DSC. (62)

Quando o forno é aquecido (de forma linear no tempo), o fluxo de calor principal do forno passa para a amostra simetricamente através de um disco, de condutividade térmica média, que contém sensores de temperatura embutidos. Os recipientes das amostras são posicionados neste disco simétrico ao centro e o mesmo calor flui para a amostra e para a amostra de referência. A diferença de temperatura ΔT é então zero. Se este equilíbrio de estado estacionário é perturbado por uma transição de amostra, é gerado um diferencial que é proporcional à diferença entre as taxas de fluxo de calor para a amostra e para a amostra de referência, que é dado pela equação 1 (41):

$$\Delta T = T_S - T_R \quad (1)$$



A energia geralmente flui para dentro ou para fora de um material em resposta a uma mudança na temperatura, portanto, o DSC aquece ou arrefece um material de maneira controlada e mede o fluxo de energia para dentro ou para fora do material. Isso revela todas as transições que ocorrem no material ao longo da gama de temperaturas investigada, assim como as temperaturas em que ocorrem, como fusão, recristalização e também temperaturas de transição vítrea (T_g) (42).

Um exemplo típico de curva de fluxo de calor é apresentado na Figura 22, onde a fusão de um material é demonstrada em função da temperatura. A área do pico fornece a entalpia da transição, neste caso a entalpia de fusão (42).

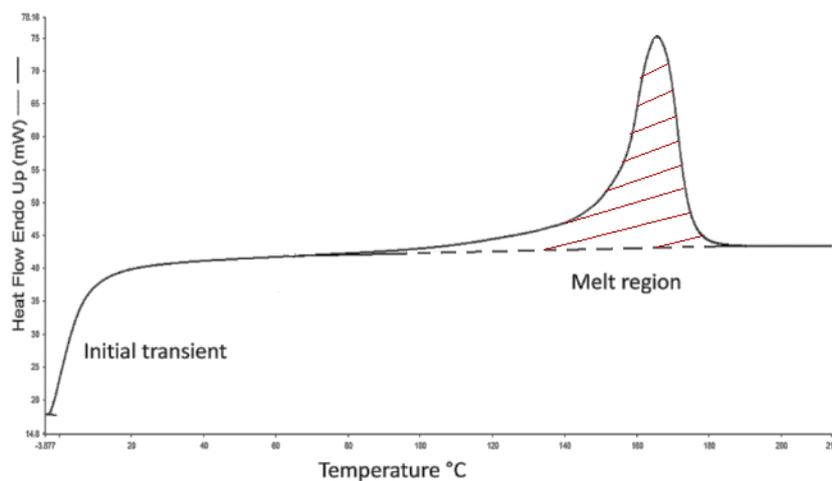


Figura 22- Típica curva de fluxo de calor. (28)

Neste trabalho, foram realizados ensaios de DSC no equipamento DSC 200 F3 sob fluxo constante de nitrogénio, para analisar a influência da EG, f-EG e (f-EG) + Ag na temperatura de fusão e na cristalização dos compósitos. As amostras foram aquecidas e reaquecidas entre 30 e 190 °C a 5 °C/min.



3.2.4.6. Análise Mecânica Dinâmica (DMA)

A análise mecânica dinâmica (DMA) é uma técnica que fornece informação sobre as propriedades viscoelásticas do material, onde uma tensão ou deformação é aplicada a uma amostra a frequências controladas, sendo depois analisada a resposta de modo a obter o ângulo de fase e a deformação. Estes dados permitem o cálculo do fator de amortecimento ($\tan\delta$), e do módulo complexo. É assim uma ferramenta poderosa para medir transições em polímeros (43) (44).

Os polímeros apresentam um comportamento viscoelástico que combina propriedades elásticas (sólido) com viscosas (líquido), onde a tensão aplicada é proporcional à deformação resultante (44). Os materiais viscoelásticos apresentam dois tipos de comportamentos comuns: a) Após a aplicação de uma tensão constante, a deformação não é constante, mas o material continua a deformar-se em função do tempo; b) Pode, de outro modo, armazenar parte da energia aplicada e usá-la para recuperar parcialmente sua forma (44). Como resultado destes dois tipos de comportamentos diferentes, o módulo complexo pode ser definido através da equação 2:

$$E^* = \frac{\sigma_0}{\varepsilon_0} (\cos(\delta) + i \sin(\delta)) \quad (2)$$

onde, $E' = \frac{\sigma_0}{\varepsilon_0} (\cos(\delta))$ é referido como o módulo de armazenamento (elástico) e representa a energia armazenada na amostra por ciclo e $E'' = \frac{\sigma_0}{\varepsilon_0} (\sin(\delta))$ representa a energia perdida/ dissipada por ciclo (44).

A razão entre a perda de energia e o armazenamento da mesma é dada pelo $\tan \delta$, medindo a dissipação de energia de um determinado material. Esta pode ser definida através da equação 3:

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

Para avaliar as propriedades mecânicas/viscoelásticas dos filamentos, foram realizados ensaios de DMA, com recurso ao equipamento Tritec 2000B (Triton Technology, Reino Unido), equipado com o



modo tração (37). As amostras foram cortadas com 20 mm de comprimento, aproximadamente. A espessura foi determinada em três pontos diferentes para cada amostra, utilizando um micrômetro (Mitutoyo, Japão). Depois de cortados, os filamentos foram fixados no aparelho com uma distância entre amarras de 15 mm. As medições foram realizadas a 70 °C. Depois de equilibrar a 70 °C, os espectros de DMA foram obtidos usando um ciclo de tensão à frequência de 1 Hz. Foi aplicada uma pré-carga estática de 0.5 N durante os ensaios para manter a amostra estirada. Foram efetuados 3 ensaios para cada condição.

3.2.4.7. Resistividade Elétrica

A aplicação de campos elétricos (estáticos e pulsantes) é amplamente utilizada em práticas ortopédicas para tratar lesões e têm demonstrado melhorar a cicatrização do ligamento in vivo. Os sinais elétricos influenciam o comportamento e função celular, particularmente quando se usam células excitáveis, tais como células do tecido músculo-esquelético cardíaco, ou neural (45).

Desta forma, foram feitos alguns avanços na incorporação de partículas condutoras, como nanofibras de carbono (45).

Neste trabalho, medições de resistividade elétricas foram realizadas num picoamperímetro 6487 (Keithley, EUA) com 8009 elétrodos (Keithley, EUA) e segundo a norma ASTM D257. Foi aplicada uma voltagem variável, entre -10,0 e 10,0, entre os elétrodos, e analisadas as curvas I-V obtidas para cada material.

A resistência do filamento, R (Ω), foi calculada de acordo com a equação 4, da lei de Ohm, onde V (V) é a voltagem aplicada no filamento e I (A) é a corrente medida (46).

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

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

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



onde $A(m^2)$ representa a área efetiva da amostra, e $R(\Omega)$ a resistência (46). Cada amostra tinha 10 mm de comprimento e os diâmetros das mesmas foram previamente medidos, usando um micrómetro (Mitutoyo, Japão).

3.2.5. Produção de Scaffolds

A técnica utilizada na produção de *scaffolds* para a regeneração do ligamento cruzado anterior, foi o entrançamento de filamentos. As estruturas produzidas a partir desta técnica para além de garantir a produção de estruturas porosas com poros com diferentes dimensões, permitem obter estruturas com propriedades mecânicas comparáveis ao ligamento natural. O método de entrançamento fornece também resistência ao desgaste e à rutura dos mesmos. Esta faz com que as fibras sejam tecidas em toda a espessura da trança dando-lhe força e reforçando a estrutura, evitando assim a falha total da estrutura se algumas das fibras romperem ou estragarem. O *scaffold* é composto por microfibras que são semelhantes em diâmetro às fibras de colagénio do ligamento natural. Essas microfibras são agrupadas, sendo organizadas em feixes e entrançadas em toda a espessura da estrutura, como é ilustrado na figura 23 (47) (48).

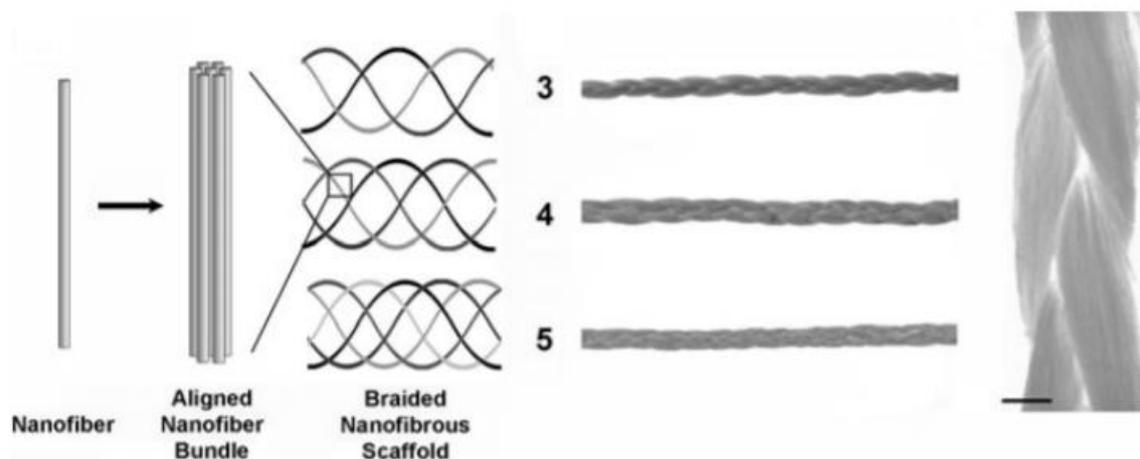


Figura 23- Técnica de entrançamento aplicada à produção de scaffolds. (64)



De maneira a se obter o entrançado desejado para a produção de scaffolds, foi utilizado um disco Kumihimo com aproximadamente 12 cm de diâmetro. Este pequeno equipamento, ilustrado na figura 24, é uma forma de arte tradicional japonesa de produzir tranças e cordões, que se baseia no entrelaçamento de fio, neste caso, filamentos de PLA (49).

Cada *scaffold* contém oito feixes, cada um com oito filamentos de PLA com aproximadamente 1mm de diâmetro cada e 2 cm de comprimento. Estes pequenos feixes foram depois agrupados dois a dois, para facilitar o entrelaçamento final e finalizar o *scaffold*. Os oito filamentos são colocados no kumihimo, como está representado nas figuras 24 e 25, de maneira a produzir o feixe. Foram selecionadas para este estudo, três das cinco composições existentes e produzidos três scaffolds para cada uma delas: PLA, PLA + 0.5% (f-EG)+Ag e PLA + 2% (f-EG)+Ag.



Figura 24- Disposição dos filamentos PLA num Disco Kumihimo.

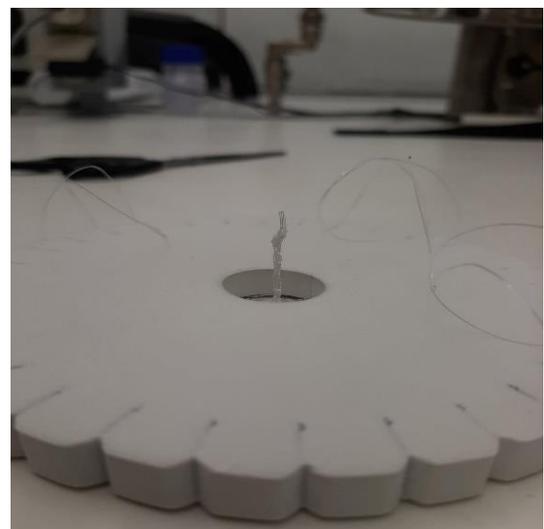


Figura 25- Feixe produzido com recurso ao Disco Kumihimo.

3.2.6. Caracterização Estrutural dos *Scaffolds*

3.2.6.1. Análise Mecânica Dinâmica (DMA)

Para avaliar as propriedades mecânicas dinâmicas e viscoelásticas dos compósitos, foram realizados testes dinâmicos de DMA à compressão, com recurso ao equipamento Tritec 2000B (Triton Technology, Reino Unido). As amostras tinham aproximadamente, entre 8-9 mm de comprimento, e a sua espessura, determinada em três pontos diferentes através de um micrómetro (Mitutoyo, Japão), era



aproximadamente de 7-8 mm. Antes de realizar os testes de DMA, as amostras foram hidratadas durante a noite, numa solução de PBS, para atingirem o equilíbrio de inchamento. As amostras foram posteriormente colocadas num reservatório de Teflon com PBS e, depois de equilibrar a temperatura a 37°C, os espectros de DMA foram obtidos para intervalos de frequência de 0.1 Hz a 10 Hz, e para cada condição, foram realizados três testes.



Capítulo 4

Discussão de Resultados



4. Discussão de resultados

4.1. Caracterização estrutural do grafeno

4.1.1. Espectroscopia Raman da grafite e de derivados de grafeno

Como já foi referido no capítulo anterior, a espectroscopia Raman tem um papel importante na análise das características estruturais e eletrónicas do grafeno, grafite e seus derivados, fornecendo informações úteis pela análise das três principais bandas. Num estudo anterior, foi possível comprovar que o espectro Raman da grafite e de derivados de grafeno exibem normalmente 3 bandas, bandas D, G e 2D, como está representado na figura 26.

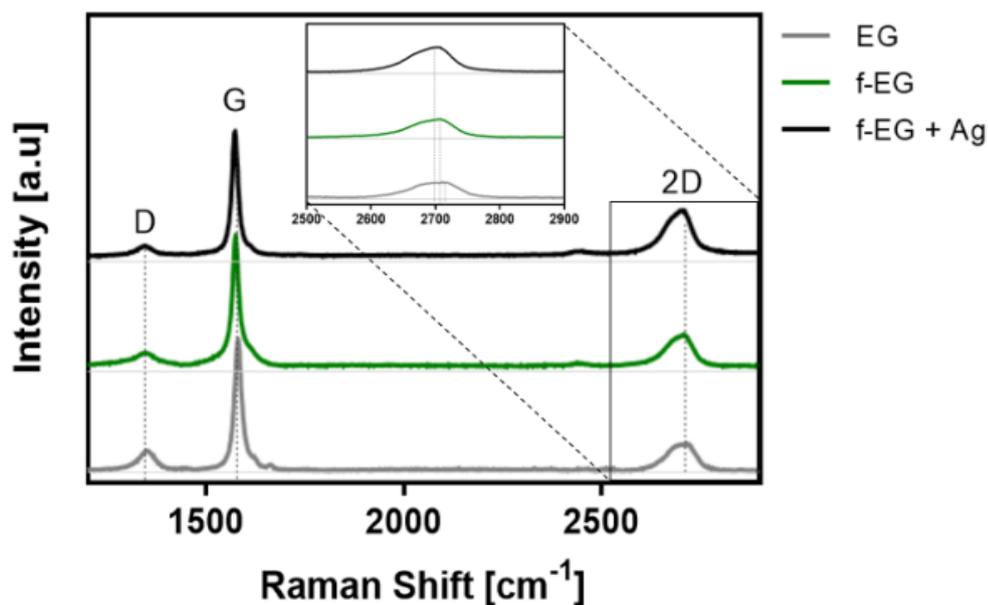


Figura 26- Espectro Raman dos compósitos EG, f-EG e f-EG+Ag. (28)

Os espectros Raman normalizados obtidos para EG, f-EG e f-EG + Ag estão representados na Figura 26, e os resultados obtidos para a razão de intensidade entre a banda D e a banda G, assim como o número de onda a que se encontra a banda 2D, estão representados na tabela 10. A relação entre as



bandas D e G (I_D / I_G) mostra que a banda D diminuiu com a funcionalização de 0,15 para 0,10, o que pode indicar uma menor quantidade de defeitos na grafite exfoliada funcionalizada quando comparada com a grafite exfoliada pura. Isso pode estar relacionado com a alta concentração de defeitos na forma pura de EG, causada principalmente pela técnica de produção. Além disso, a grafite original advém de uma mistura de flocos com diferentes níveis de defeitos, e como a funcionalização é uma reação de cicloadição às ligações duplas do grafeno, ocorre preferencialmente nos flocos mais perfeitos, separando-os dos mais defeituosos e levando a uma banda D mais fraca.

Tabela 10- Resultados dos espectros Raman. (28)

	Intensidade	Raman Shift [cm^{-1}]
	I_D / I_G	2D-Band
EG	0.15	2710
f-EG	0.10	2706
f-EG+Ag	0.12	2700

Com a adição de nanopartículas de prata, a razão de intensidade I_D / I_G entre f-EG e f-EG + Ag aumentou ligeiramente de 0,10 para 0,12, podendo estar relacionado com uma redução do caráter sp^2 no plano e aumento na hibridização de sp^3 devido à adição de nanopartículas de Ag nas camadas de grafeno.

Relativamente ao terceiro pico, designado como banda 2D, a frequência da mesma é quase o dobro da banda D. Como já relatado em diversos estudos, o pico 2D muda para valores de comprimento de onda mais altos tornando-se mais largo para um número crescente de camadas, enquanto o grafeno puro apresenta um único pico 2D nítido com dupla intensidade em relação ao pico G. Além do pico 2D um pouco mais nítido que foi obtido para f-EG e f-EG + Ag, quando comparado com o EG puro, o deslocamento do comprimento de onda do pico 2D pode ser observado de 2710 cm^{-1} , para EG, para 2706 e 2700 cm^{-1} , para os picos 2D de f-EG e f-EG + Ag, respetivamente. Isso pode resultar da funcionalização seletiva dos flocos EG mais finos e estruturalmente mais perfeitos.



4.2. Caracterização estrutural dos filamentos compósitos

4.2.1. Análise Termogravimétrica (TGA)

A Análise Termogravimétrica foi realizada com o intuito de avaliar a estabilidade térmica dos filamentos e calcular a percentagem do reforço através da massa dos resíduos finais. As Figuras 27 e 28 mostram a perda de massa e a derivada da perda de massa, respetivamente, do PLA e dos filamentos compósitos quando aquecidos até 900 °C, sob atmosfera inerte.

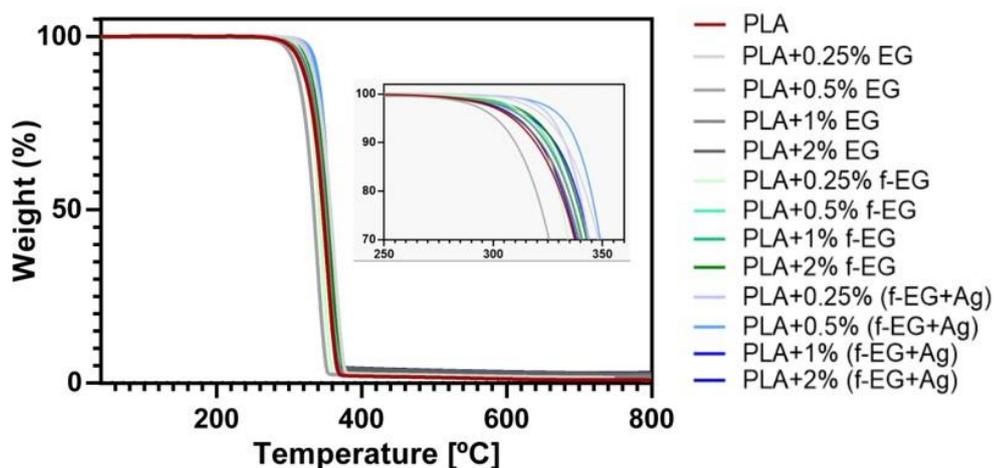


Figura 27- Resultados de TGA relativos à perda de massa em função da temperatura.

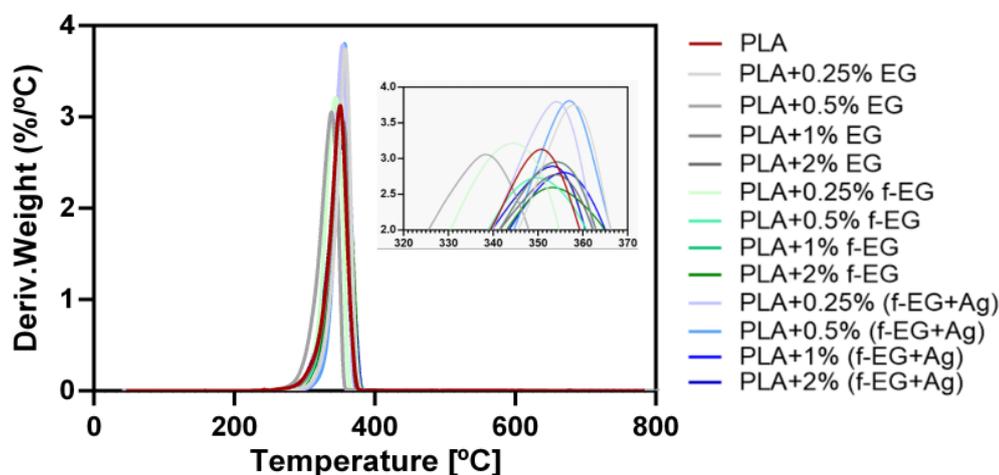


Figura 28- Resultados de TGA relativos à derivada de perda de massa em função da temperatura.



A maior perda de massa, ocorre entre os 300 e os 400 ° C, devido à decomposição do material polimérico e dos grupos funcionais de f-EG e f-EG+Ag. Pode também observar-se na figura 27 que todos os filamentos apresentam uma estabilidade térmica semelhante, independentemente da presença de grafite funcionalizada. Os valores da temperatura à qual o PLA e os compósitos começam a degradar estão apresentadas na tabela 11, sendo aproximadamente 300 °C para todas as composições. Assim, todos os materiais estudados são termicamente estáveis à temperatura de interesse para a aplicação pretendida, isto é, a 37°C. Um comportamento semelhante foi descrito por Novais *et al.* (34) para compósitos com PLA.

Tabela 11- Temperaturas iniciais de degradação.

Material	PLA	0.25EG	0.5EG	1EG	2EG	0.25f-EG	0.5f-EG	1f-EG	2f-EG	0.25f-EG+Ag	0.5f-EG+Ag	1f-EG+Ag	2f-EG+Ag
T(C°)	301.6	318.3	294.5	307.1	301.1	310.4	309.8	307.1	311.6	322.5	326.5	309.4	303.6

A grafite adicionada ao PLA durante a extrusão do filamento foi adicionada manualmente, portanto, de maneira a averiguar se a percentagem do reforço nos filamentos foi a pretendida recorreu-se ao TGA para analisar os resíduos e desta maneira calcular o reforço. Estes dados estão apresentados na Tabela 12.

Tabela 12- Percentagem de reforço presentes nos compósitos.

Filamento	Reforço (wt. %)
PLA+ 0,25%	0.2±0.25
PLA+ 0,5%	EG 0.39±0.31
PLA+ 1%	1.14±1.3
PLA+ 2%	2.34±1.74
PLA+ 0,25%	0.48±0.74
PLA+ 0,5%	f-EG 0.36±0.58
PLA+ 1%	1.15±0.26
PLA+ 2%	2.18±1.72
PLA+ 0,25%	0.21±0.85
PLA+ 0,5%	f-EG+Ag 0.53±0.44
PLA+ 1%	1.06±1.10
PLA+ 2%	1.02±0.22



Os resultados mostram que apesar de alguns erros, que podem estar associados à dispersão não uniforme devido à alimentação não contínua do reforço nos filamentos, assim como a presença de alguns aglomerados, praticamente todos os filamentos foram produzidos com a quantidade prevista de reforço.

4.2.2. Espectroscopia Raman

4.2.2.1. Espectroscopia Raman dos filamentos de compósitos

A espectroscopia Raman foi executada nos filamentos de maneira a examinar e analisar a presença de EG no compósito. Na Figura 29 estão presentes os espectros Raman de todos os filamentos compósitos analisados. Como o PLA não apresenta dispersão na região da banda G, o comprimento de onda correspondente pode ser usado para confirmar a presença de EG. O espectro Raman do filamento relativo ao PLA (linha vermelha) também apresenta um pico em torno dos 2740 cm^{-1} . Todos os filamentos apresentam a banda associada ao PLA, porém é mais larga devido à contribuição da banda 2D, mais próxima de 2700 cm^{-1} , do material EG. A banda G, característica da EG, está presente em todos os compósitos, e a intensidade aumenta com a concentração de EG no compósito.

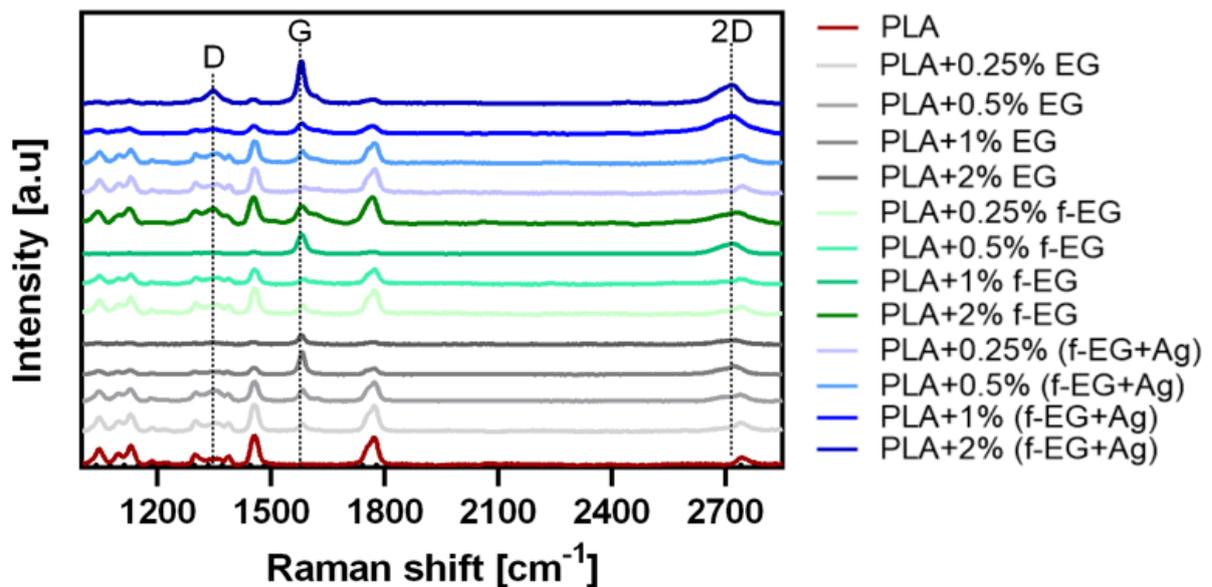


Figura 29- Espectros Raman dos filamentos compósitos.



4.2.3. Microscopia Eletrónica de Varrimento (SEM)

A morfologia da secção transversal de cada um dos filamentos foi analisada por microscopia eletrónica de varrimento (SEM). Os resultados obtidos para cada uma das composições são apresentados nas tabelas 13-19.

Tabela 13- Imagens SEM do filamento de PLA.

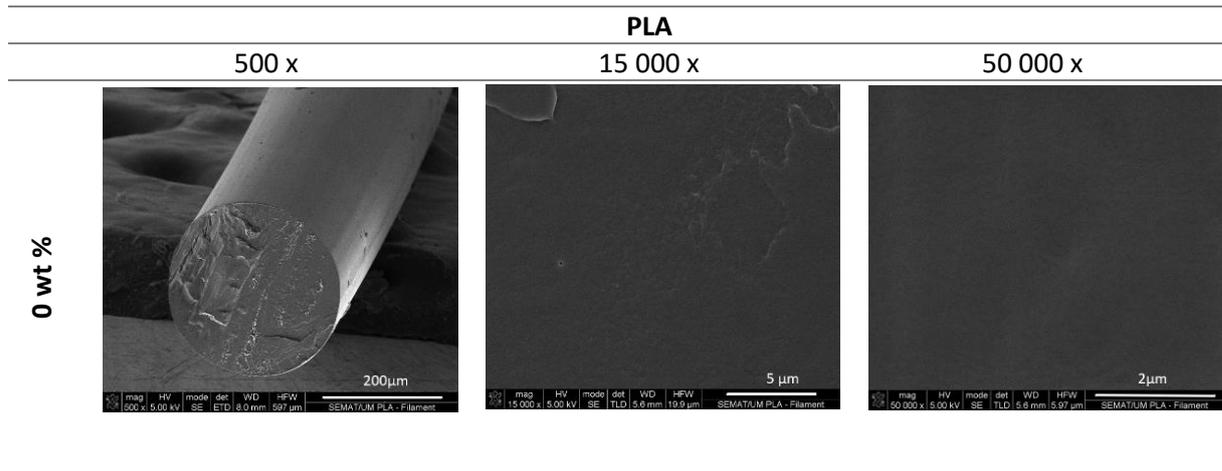
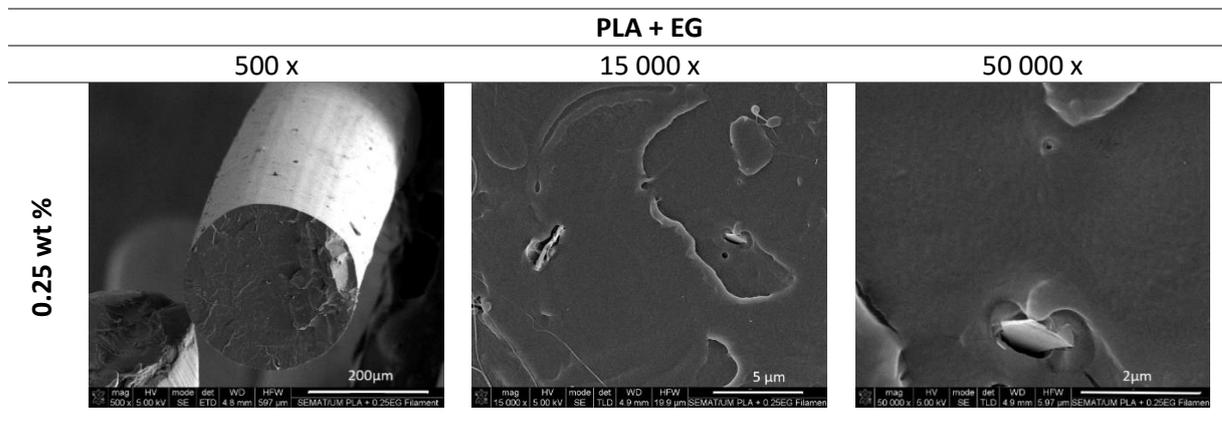


Tabela 14- Imagens SEM dos filamentos de compósitos: PLA+0.25EG e PLA+0.5EG.



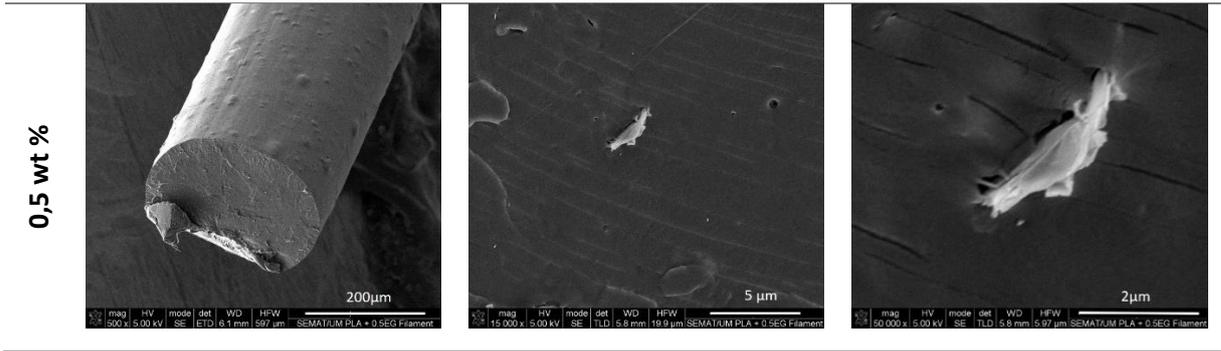


Tabela 15- Imagens SEM dos filamentos de compósitos: PLA+1EG e PLA+2EG.

		PLA + EG		
		500 x	15 000 x	50 000 x
1 wt %				



Tabela 16- Imagens SEM dos filamentos de compósitos: PLA+0.25f-EG e PLA+0.5f-EG.

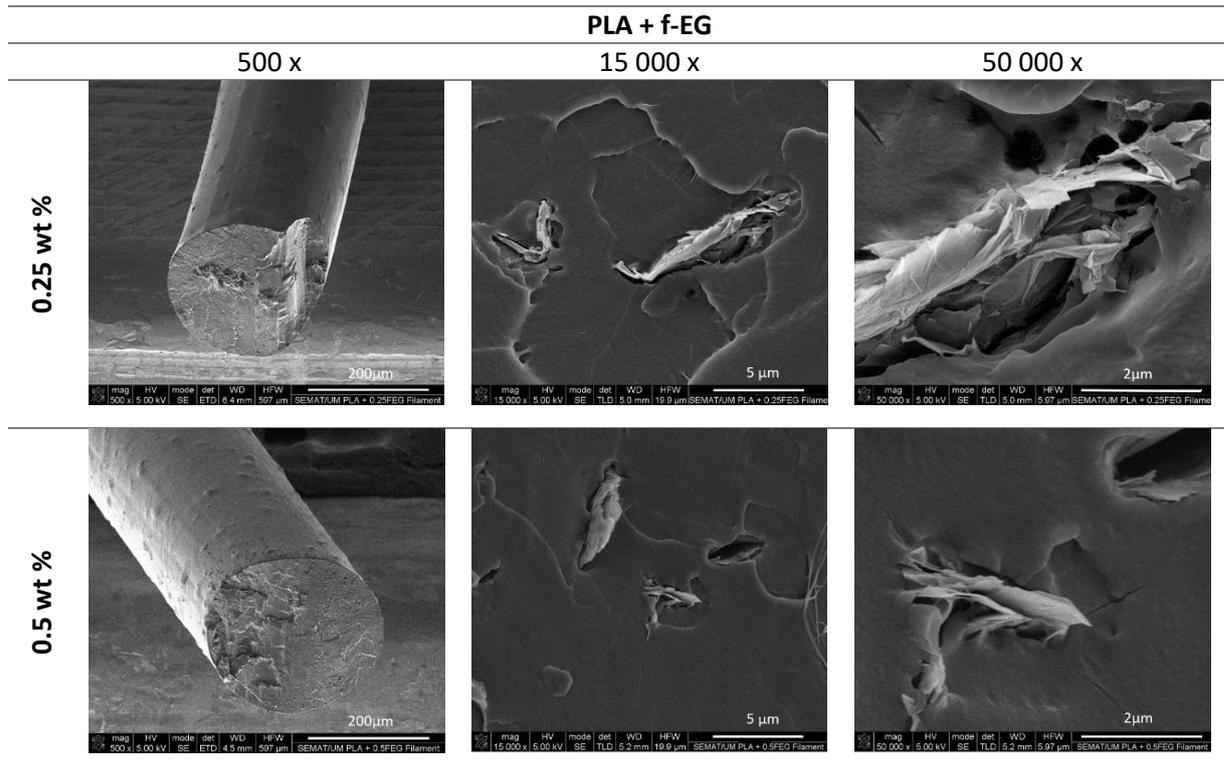


Tabela 17- Imagens SEM dos filamentos de compósitos: PLA+1f-EG e PLA+2f-EG.

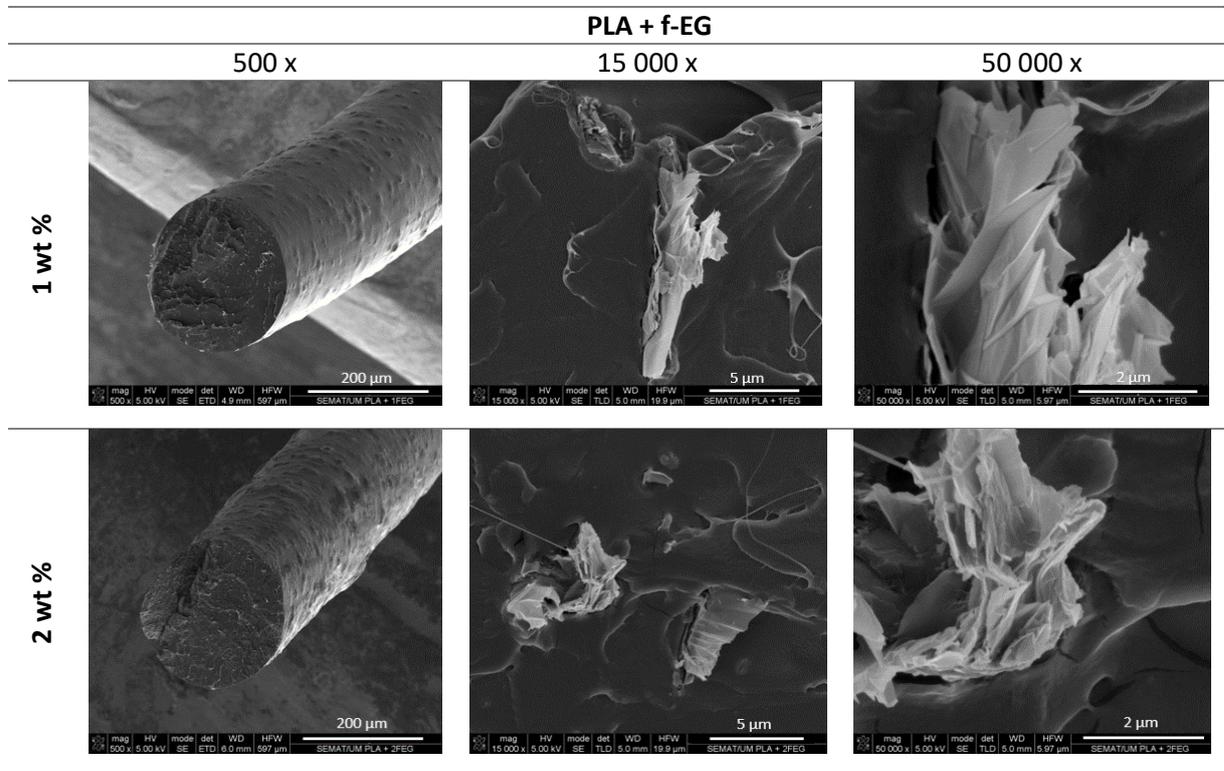




Tabela 18- Imagens SEM dos filamentos de compósitos: PLA+0.25f-EG+Ag e PLA+0.5f-EG+Ag.

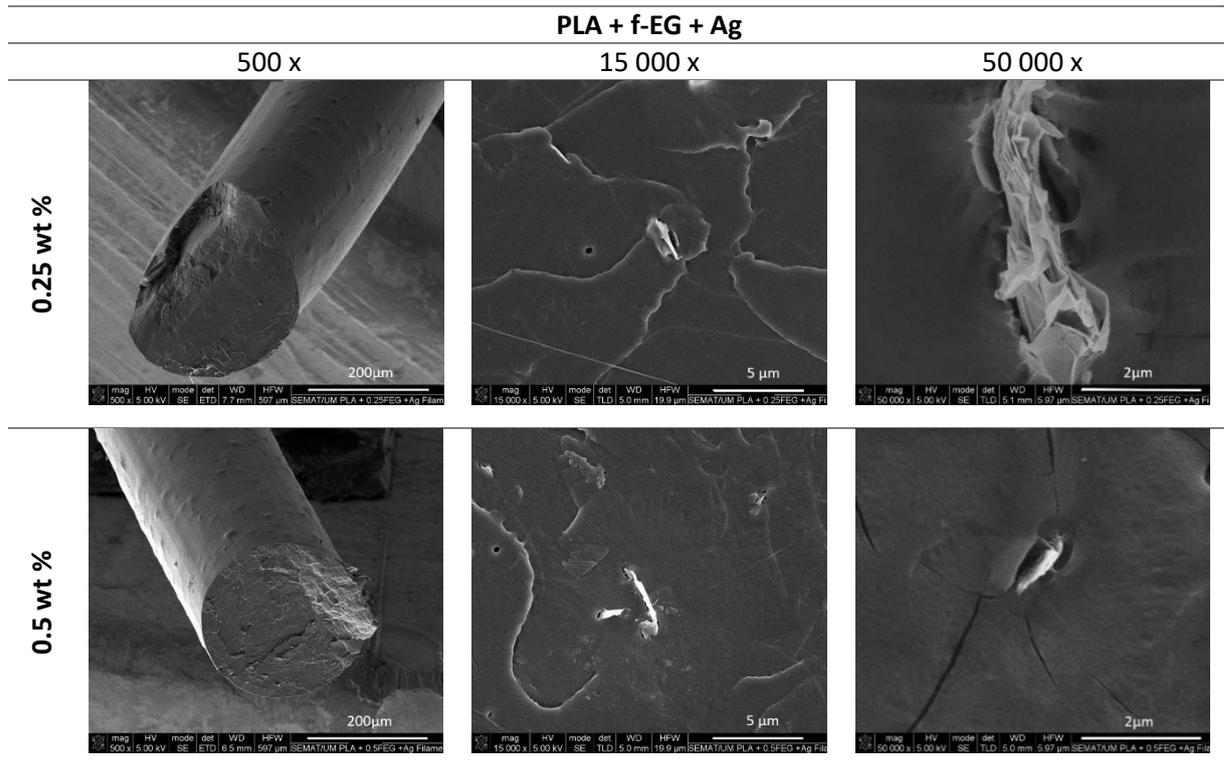
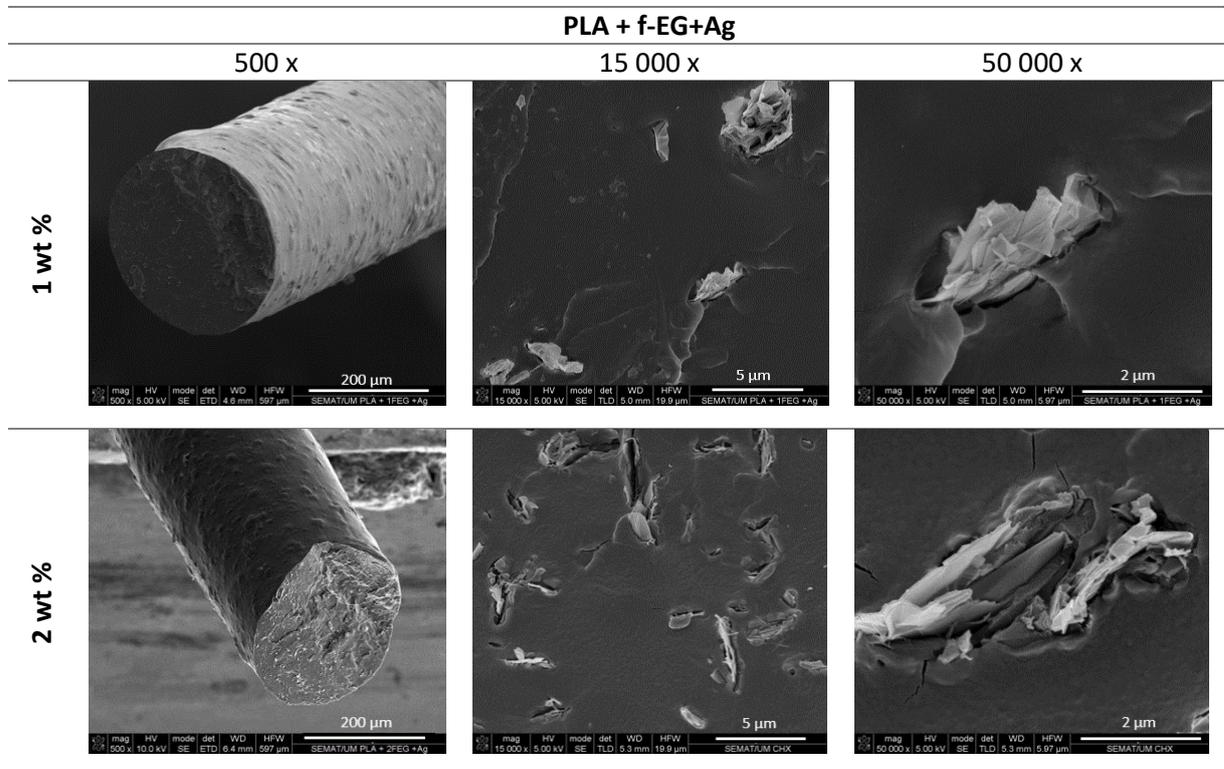


Tabela 19- Imagens SEM dos filamentos de compósitos: PLA+1f-EG+Ag e PLA+2f-EG+Ag.



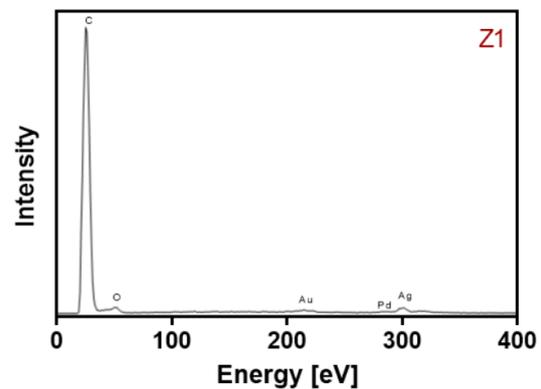
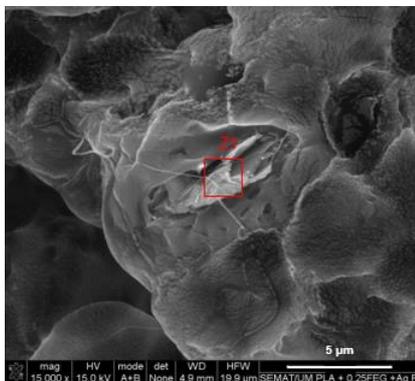


Ao analisar as imagens obtidas, é possível observar que o aumento da quantidade de reforço no filamento torna a sua superfície mais rugosa, como seria de prever. É ainda possível observar, uma boa interface entre a matriz polimérica e o reforço para todas as composições, podendo concluir-se também que a interface é melhorada após a funcionalização.

As amostras também foram analisadas por espectroscopia de raios X por energia dispersiva (EDS) para as composições decoradas com nanopartículas de prata, para confirmar a presença de prata. As Tabelas 20 e 21 apresentam imagens dos filamentos com 0,25%, 0,5%, 1% e 2%, onde as zonas Z1 e Z2 marcadas foram analisadas por EDS. É possível observar através destas imagens que a matriz polimérica foi degradada pelo feixe de eletrões, necessário para visualizar as partículas de prata mais brilhantes na imagem. O sinal C aparece devido à presença da grafite e do polímero, o sinal O aparece devido à presença de oxigénio, o sinal Au devido à presença de ouro (recobrimento da fibra para observação no SEM) e o sinal Ag confirma a presença de prata.

Tabela 20- Imagens SEM e análise EDS do PLA+ 0,25% e 0,5% (f-EG+Ag).

PLA+ 0,25% (f-EG+Ag)



PLA+ 0,5% (f-EG+Ag)

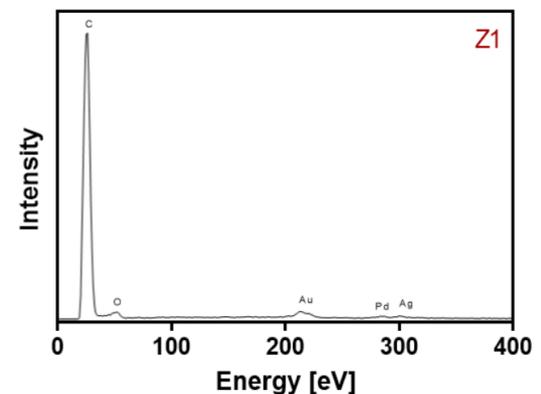
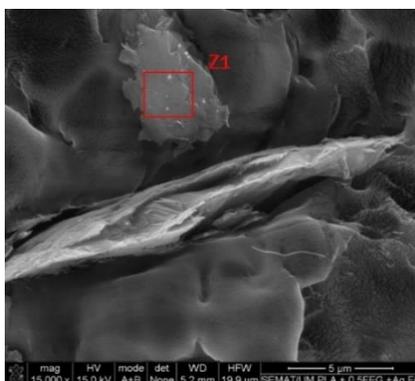
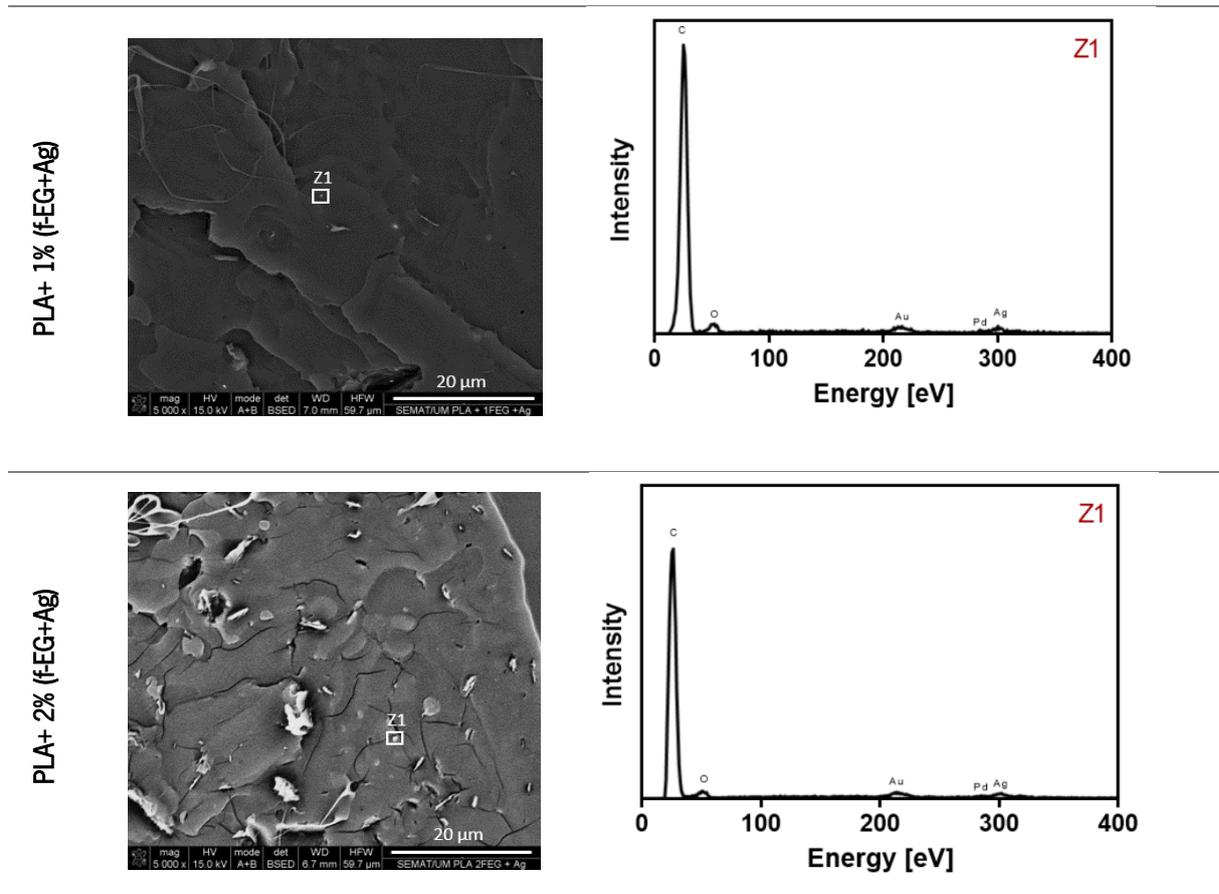




Tabela 21- Imagens SEM e análise EDS do PLA+ 1% e 2% (f-EG+Ag).



4.2.4. Microscopia Ótica

Com recurso a um micrótomo, foram efetuados cortes transversais a cada um dos filamentos com aproximadamente 2 μm de espessura, e de seguida observados através de um microscópio ótico (modo de transmissão) em duas ampliações diferentes (10x e 40x). As imagens obtidas estão apresentadas nas tabelas 22 e 23. Os resultados obtidos, relativos ao tamanho médio das partículas, número de partículas e tamanho máximo de partículas, estão presentes na Tabela 24.



Tabela 22- Imagens do microscópio ótico da secção transversal dos filamentos.

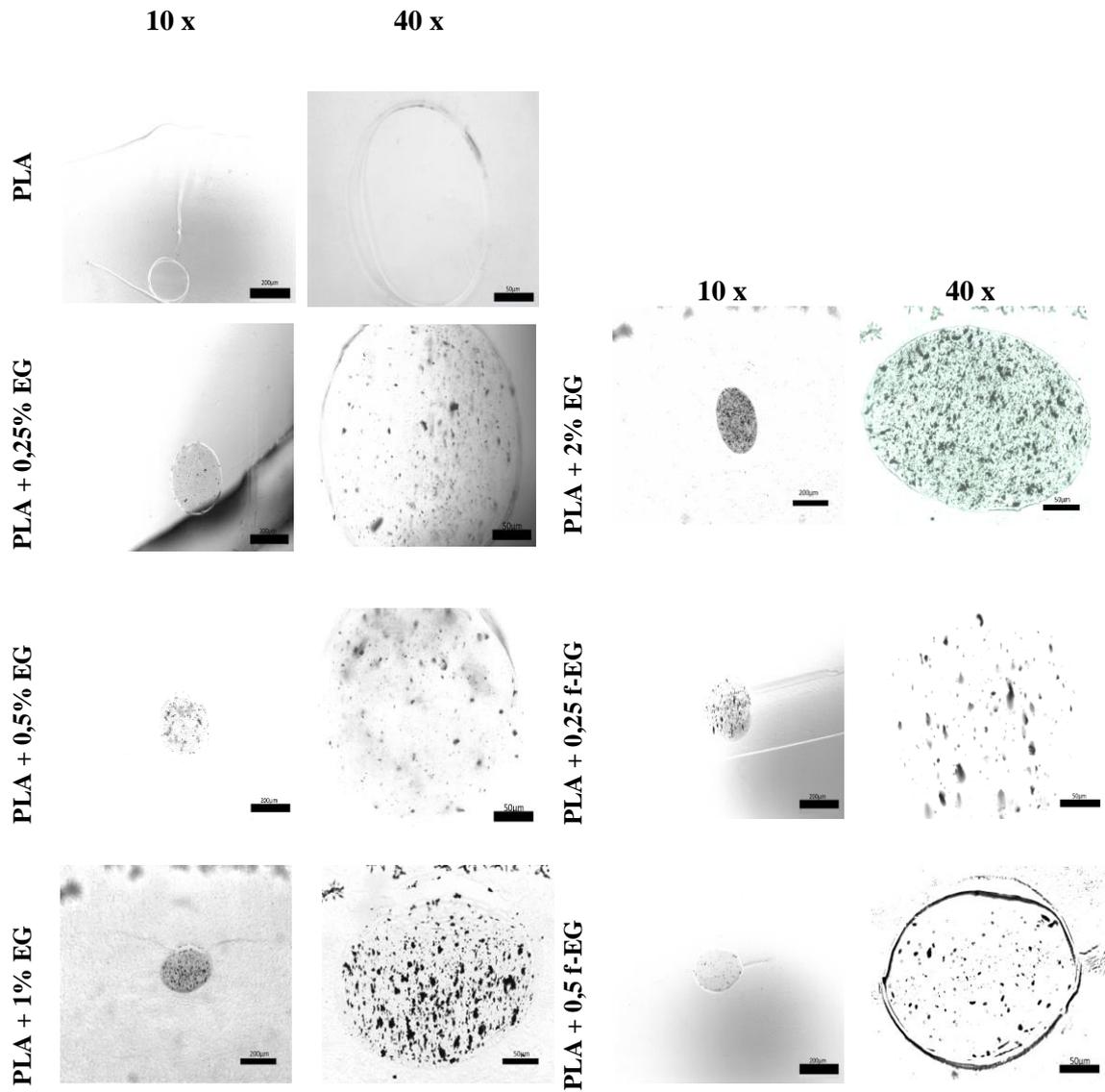
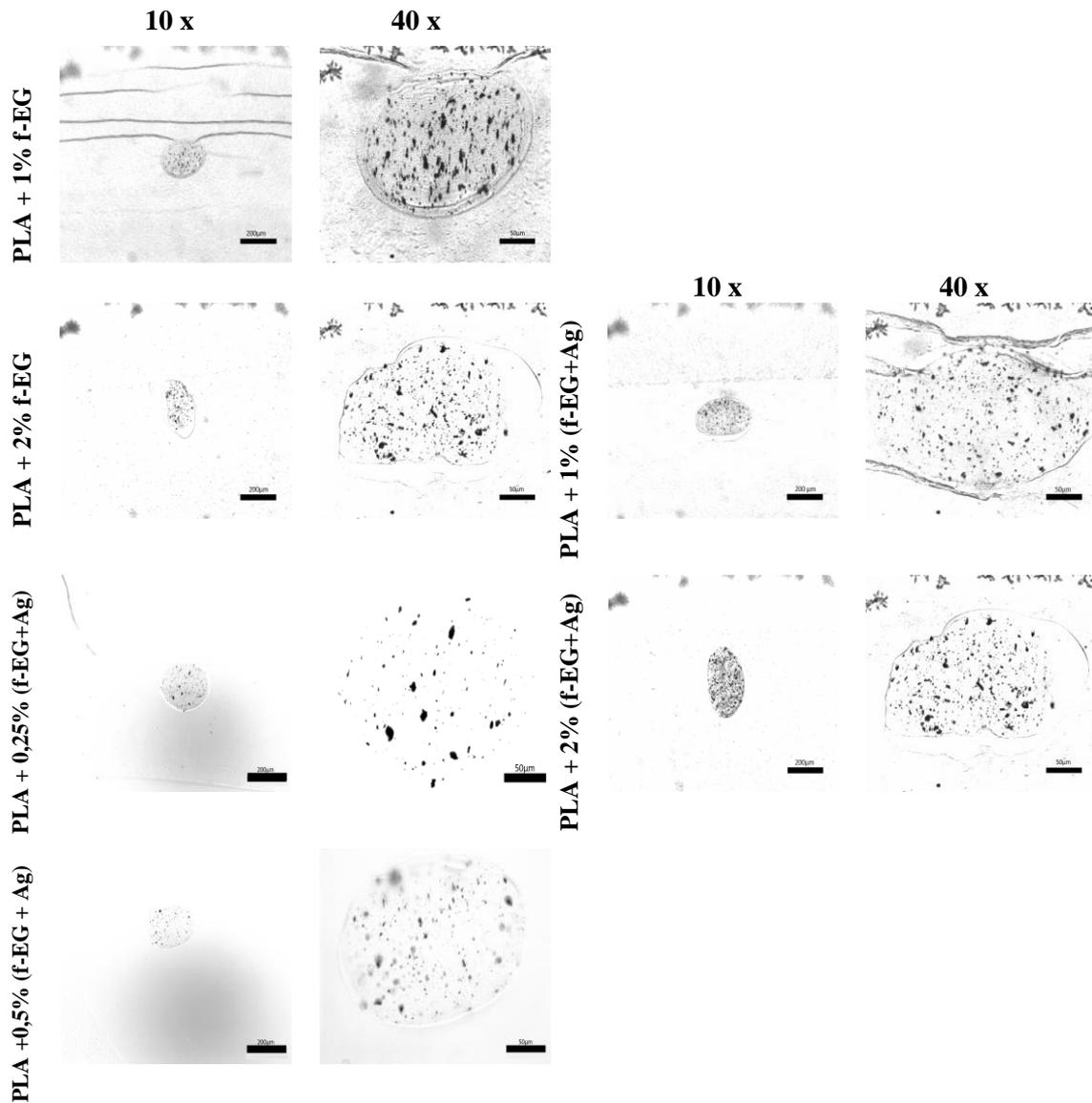




Tabela 23- Imagens do microscópio ótico da secção transversal dos filamentos.



Depois de analisar as imagens das tabelas 22 e 23 e os resultados da tabela 24, é possível verificar que o tamanho médio das partículas para cada composição depende da percentagem de reforço adicionado. Relativamente aos filamentos que contêm EG, para 0,25% e 0,5%, o tamanho médio é próximo de $1 \mu\text{m}^2$, e para 1% e 2%, aumenta para valores entre 5 e $7 \mu\text{m}^2$.



Relativamente aos filamentos que contêm f-EG, para 0,25% e 0,5%, o tamanho médio está entre 2 e 3 μm^2 , e para 1% e 2%, aumenta para valores entre 3,5 e 9 μm^2 . Por fim, para os filamentos com f-EG+Ag, para 0,25% e 0,5%, o tamanho médio varia entre 0,5 e 3 μm^2 , e para 1 e 2% em peso, o mesmo sobre para valores entre 3,5 e 4,5 μm^2 .

Em relação ao número de partículas por mm^2 , os filamentos com f-EG são os que apresentam um número relativamente mais baixo. Para terminar, em relação ao tamanho máximo de partículas, os filamentos com 1% EG, 2% EG e 1% f-EG, são os que apresentam maiores valores em relação às outras composições, como é possível constatar nas figuras presentes nas tabelas 22 e 23, podendo estar relacionado com a sua dispersão, pois foram adicionadas manualmente no processo de extrusão dos filamentos.

Tabela 24- Caracterização da secção transversal dos filamentos.

Amostra	Tamanho Médio de Partículas (μm^2)	Número de Partículas (mm^2)	Tamanho Máximo de Partículas (μm^2)
PLA + 0.25 EG	1,37	11025	22,05
PLA + 0.5 EG	0,717	11675	26,45
PLA + 1 EG	7,354	27244	192,04
PLA + 2 EG	4,925	29534	176,9
PLA + 0,25 f-EG	3,525	6523	73,19
PLA + 0,5 f-EG	1,834	7806,3	18,82
PLA + 1 f-EG	8,756	12044,6	122,82
PLA + 2 f-EG	3,64	14813,4	62,54
PLA + 0.25 f-EG+AG	3,381	9132,3	72,14
PLA + 0.5 f-EG+AG	0,595	9749,13	10,29
PLA + 1 f-EG+AG	3,655	12169,9	32,05
PLA + 2 f-EG+AG	4,655	20430,2	82,07

4.2.5. Calorimetria Diferencial de Varrimento (DSC)

A análise térmica para cada um dos filamentos foi também efetuada por calorimetria diferencial de varrimento (DSC). Os resultados obtidos, para o PLA e para os filamentos compósitos correspondentes ao primeiro aquecimento, arrefecimento e segundo aquecimento são apresentados nas figuras 30-32, respetivamente. Os resultados obtidos para cada uma das amostras correspondentes ao primeiro e



segundo aquecimentos estão resumidos nas tabelas 24 e 25. Ao comparar os filamentos compósitos com o PLA, é possível verificar que as curvas de cristalização dos compósitos são ligeiramente assimétricas, indicando uma distribuição heterogênea de cristais e uma espessura não uniforme dos mesmos desenvolvida durante a cristalização do PLA.

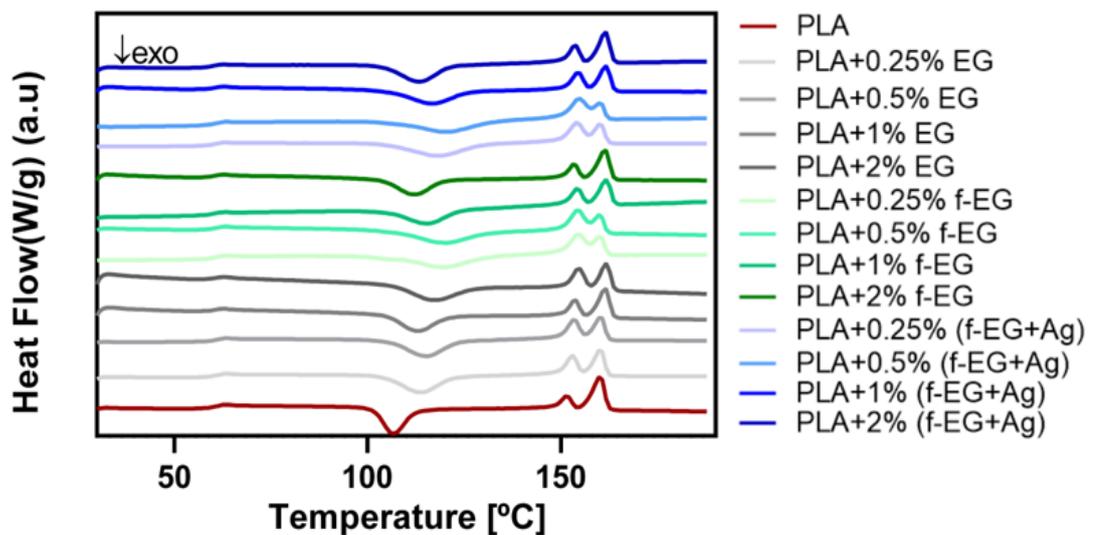


Figura 30- Curvas DSC relativas ao 1º Aquecimento.

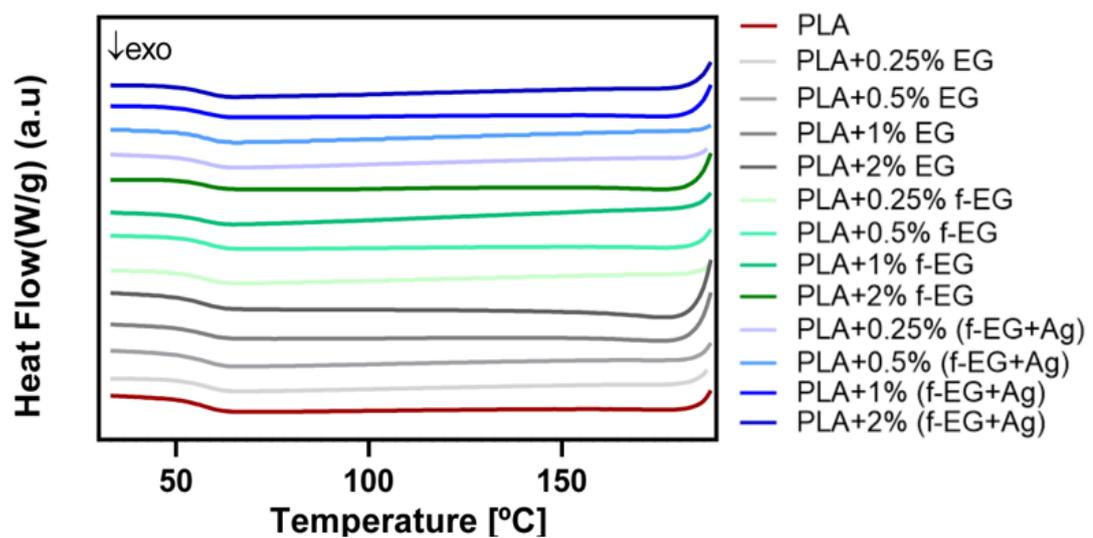


Figura 31- Curvas DSC relativas ao Arrefecimento.

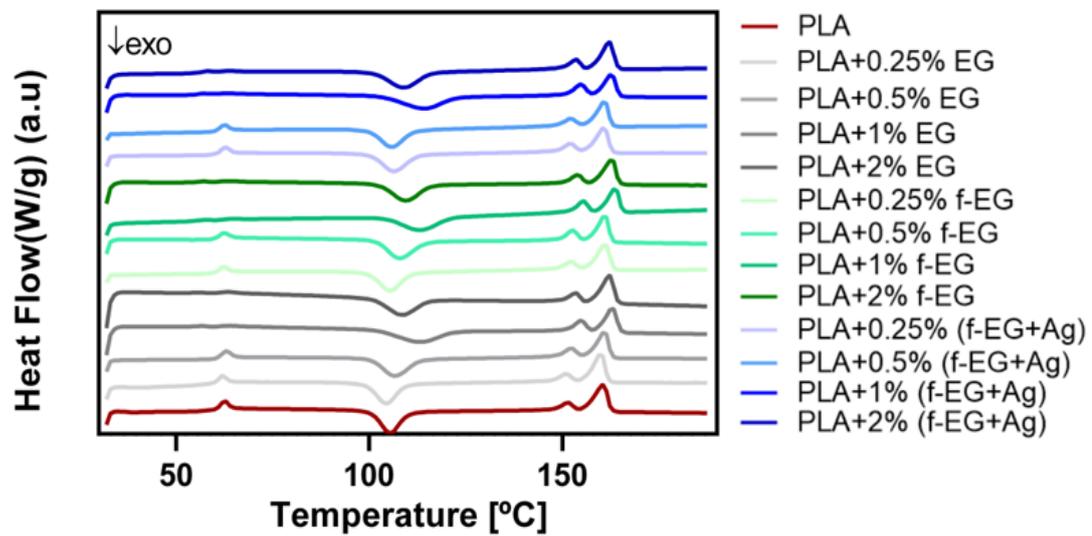


Figura 32- Curvas DSC relativas ao 2º Aquecimento.

As curvas obtidas para o segundo aquecimento, após a história térmica de cada composição ser eliminada, são também semelhantes, como acontece no primeiro aquecimento, apresentando todos uma transição vítrea, sofrendo uma cristalização a frio e possuindo picos de fusão semelhantes. Ao analisar as tabelas 24 e 25 podemos observar que as temperaturas de transições vítreas dos compósitos são semelhantes à temperatura de transição vítrea do PLA, podendo indicar que o reforço não interfere com a mobilidade das cadeias poliméricas (28) (50).

O comportamento de cristalização a frio é semelhante nos dois aquecimentos, pois a cristalização dos filamentos compósitos ocorre a temperaturas superiores à do PLA em ambos os casos, podendo concluir-se que a adição do reforço, principalmente nas grafites funcionalizadas, retarda o início da cristalização. Foi sugerido num estudo anterior que, com a adição de um reforço, este processo de cristalização é restringido pela formação de estruturas cristalinas imperfeitas e com espessuras lamelares mais baixas, podendo também ter como consequência temperaturas de fusão mais baixas nos filamentos compósitos do que no PLA (28).

O grau de cristalinidade para cada um dos filamentos, foi calculado através da equação 6:

$$\chi_c(\%) = \frac{\Delta H_f - \Delta H_c}{\Delta H_f^0 \times (1 - \phi)} \times 100 \quad (6)$$



onde ΔH_f representa a entalpia de fusão medido para a amostra, ΔH_c é entalpia de cristalização, ΔH_f^0 é a entalpia de fusão teórica tabelado para o PLA (93J/g) e ϕ é a fração em massa da grafite no compósito. Estes resultados são apresentados nas tabelas 25 e 26.

1. 1ºAquecimento

Tabela 25- Propriedades térmicas do PLA e dos filamentos compósitos relativos ao 1º aquecimento.

Amostra	Tg (°C)	Tcc (°C)	Tm (°C)	ΔH_c (J/g)	ΔH_m (J/g)	Xc (%)	ΔC_p (J/(g*K))	
PLA	59,4	103,6	159,2	26,8	29,3	2,63	0,36	
PLA+0.25%	EG	59,8	102,8	158,8	28,3	29,7	1,46	0,37
PLA+0.5%		59,4	104,2	158,8	27,0	28,1	1,20	0,38
PLA+1%		61,9	111,3	160,7	30,8	31,4	0,62	0,50
PLA+2%		55,7	107,2	142,7	30,4	30,6	0,24	0,26
PLA+0.25%		f-EG	59,5	103,4	158,6	27,6	28,6	1,08
PLA+0.5%	59,2		105,3	159,2	30,4	31,0	0,72	0,43
PLA+1%	56,3		110,7	161,0	28,3	28,7	0,41	0,25
PLA+2%	57,0		107,8	161,1	28,8	29,0	0,15	0,20
PLA+0.25%	f-EG+Ag	59,8	103,3	159,2	25,5	26,9	1,46	0,34
PLA+0.5%		59,7	104,1	159,6	25,4	26,8	1,52	0,41
PLA+1%		54,6	112,1	161,0	29,1	29,5	0,47	0,31
PLA+2%		55,2	107,5	160,8	26,5	26,8	0,3	0,54

2. 2ºAquecimento

Tabela 26- Propriedades térmicas do PLA e dos filamentos compósitos relativos ao 2º aquecimento.

Amostra	Tg (°C)	Tcc (°C)	Tm (°C)	ΔH_c (J/g)	ΔH_m (J/g)	% Xc	ΔC_p (J/(g*K))	
PLA	59,4	103,6	159,1	26,8	29,3	2,63	0,44	
PLA+0.25%	EG	58,8	112,1	159,0	30,7	31,7	1,09	0,31
PLA+0.5%		58,4	112,8	159,1	30,7	31,4	0,78	0,36
PLA+1%		58,7	112,3	160,6	29,3	31,6	2,60	0,46
PLA+2%		52,0	116,7	160,1	18,3	31,6	14,6	0,75
PLA+0.25%		f-EG	58,9	116,8	157,0	28,7	31,0	2,43
PLA+0.5%	59,1		118,2	155,6	32,6	33,6	1,10	0,44
PLA+1%	59,1		114,1	160,8	26,2	28,6	2,62	0,38
PLA+2%	58,8		111,0	160,6	28,1	28,9	0,91	0,42
PLA+0.25%	f-EG+Ag	60,1	118,2	156,2	30,6	32,1	1,68	0,46
PLA+0.5%		59,6	118,8	154,2	26,7	30,5	4,11	0,38
PLA+1%		60,4	116,2	160,8	23,4	30,0	7,17	1,03
PLA+2%		58,8	112,8	160,8	26,3	26,5	0,26	0,40



Os resultados mostram que o grau de cristalinidade (X_c) no 1º aquecimento diminui com a adição do reforço na matriz poliméricas, podendo estes resultados estar inerentes à forma como o material foi processado e à sua história térmica. A presença/adição de reforço no 1º aquecimento interfere com o processo de cristalização do PLA, não promovendo estruturas cristalinas. Relativamente ao 2º aquecimento, após a história térmica do material ser apagada, algumas percentagens de reforço promoveram a formação de estruturas cristalinas. De uma forma geral, para ambos os aquecimentos, a adição do reforço, principalmente nas grafites funcionalizadas, retarda o início da cristalização.

4.2.6. Análise Mecânica Dinâmica (DMA)

Foram realizados testes de DMA, para avaliar os efeitos da incorporação de grafeno funcionalizado nas propriedades mecânicas e viscoelásticas no PLA. A Figura 33 apresenta a variação do módulo de armazenamento E' ao longo da temperatura. É possível observar que para a maior parte dos filamentos compósitos, o módulo aumenta com o aumento da incorporação de grafeno no PLA, resultando num aumento da rigidez da matriz polimérica, o que era de esperar pois o grafeno é um material rígido. Foram obtidos em estudos anteriores resultados idênticos nas propriedades mecânicas após a incorporação de grafeno no PLA (37) (51).

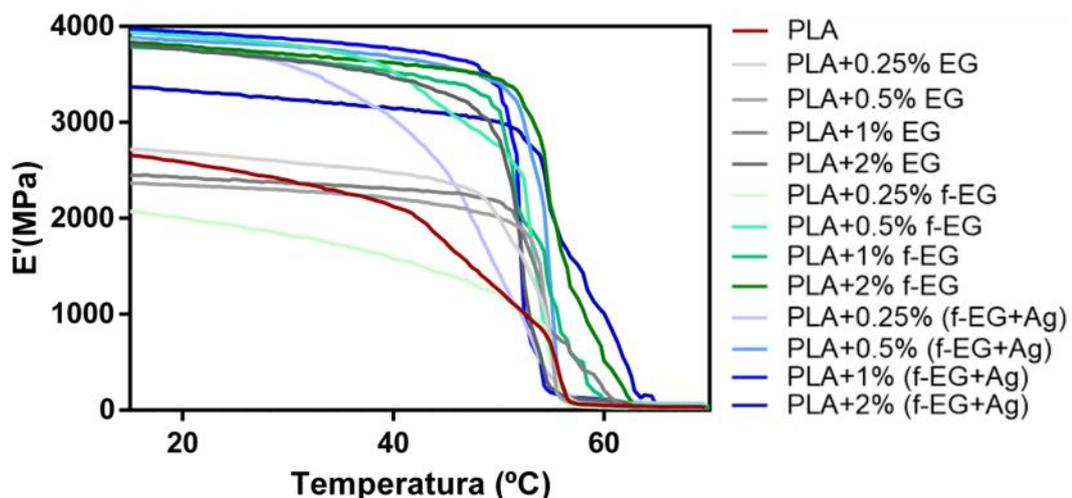


Figura 33- Módulo de armazenamento do PLA e dos filamentos compósitos em função da temperatura, na região da transição vítrea.



O fator de amortecimento mecânico, $\tan \delta$, é a razão entre a energia dissipada e a energia armazenada de um material. É um fator que mede a energia perdida, fornecendo informações sobre as propriedades de amortecimento do material. Na Figura 34 é apresentada a variação do $\tan \delta$ com a temperatura. De uma maneira geral, os filamentos compósitos com reforço apresentam valores de $\tan \delta$ mais elevados do que o filamento de PLA na região da transição vítrea, indicando que os compósitos reforçados com grafeno possuem uma maior capacidade de dissipar energia, aumentando as suas capacidades de amortecimento mecânico (37) (51). Relativamente às amostras 2% f-EG e 2% f-EG+Ag, as curvas das mesmas apresentam uma grande discrepância em comparação às restantes, devido a possíveis erros experimentais ou à reduzida aquisição de dados aquando a realização dos ensaios experimentais.

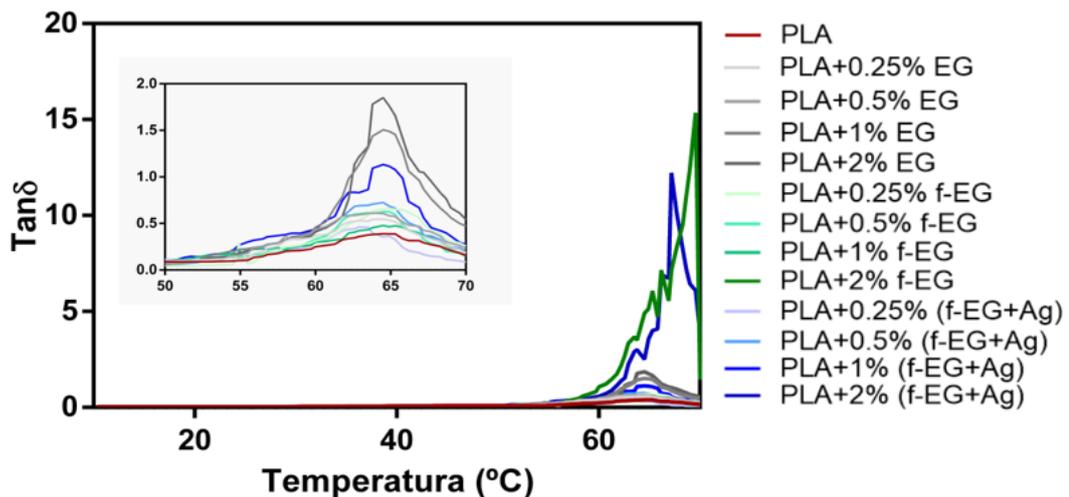


Figura 34- Fator de amortecimento mecânico do PLA e dos filamentos compósitos em função da temperatura, na região da transição vítrea.

Nas figuras 35 e 36 estão representados os resultados de DMA para o PLA e para os filamentos compósitos a 37°C, para analisar as propriedades mecânicas e viscoelásticas de cada amostra à temperatura normal do corpo humano.

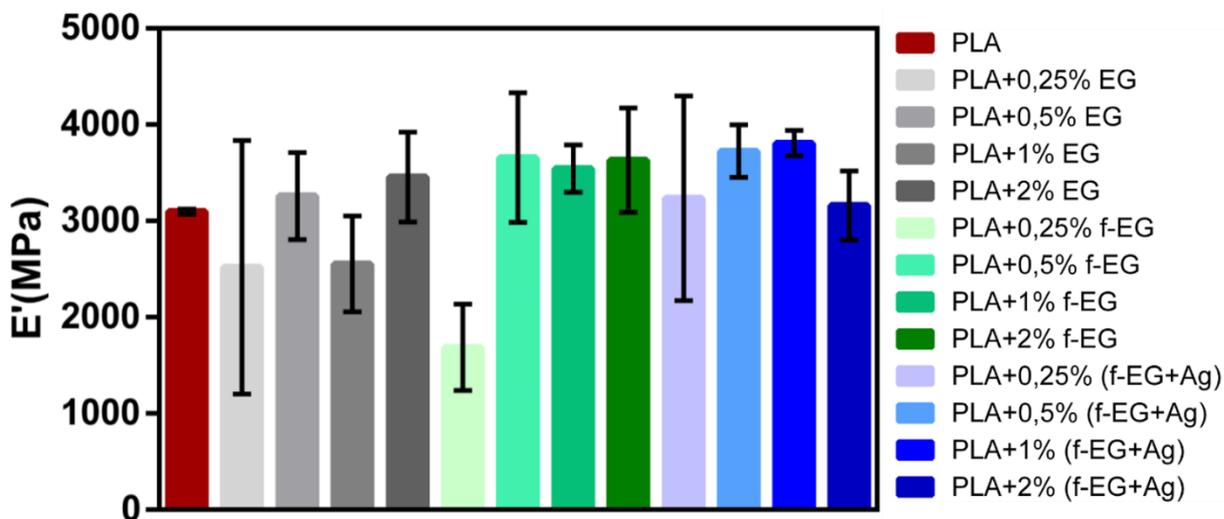


Figura 35- Módulo de armazenamento do PLA e dos filamentos compósitos a 37°C.

De um modo geral, verifica-se uma tendência para um aumento do módulo de armazenamento a 37°C, com a incorporação do reforço na matriz polimérica, conferindo uma rigidez superior ao PLA.

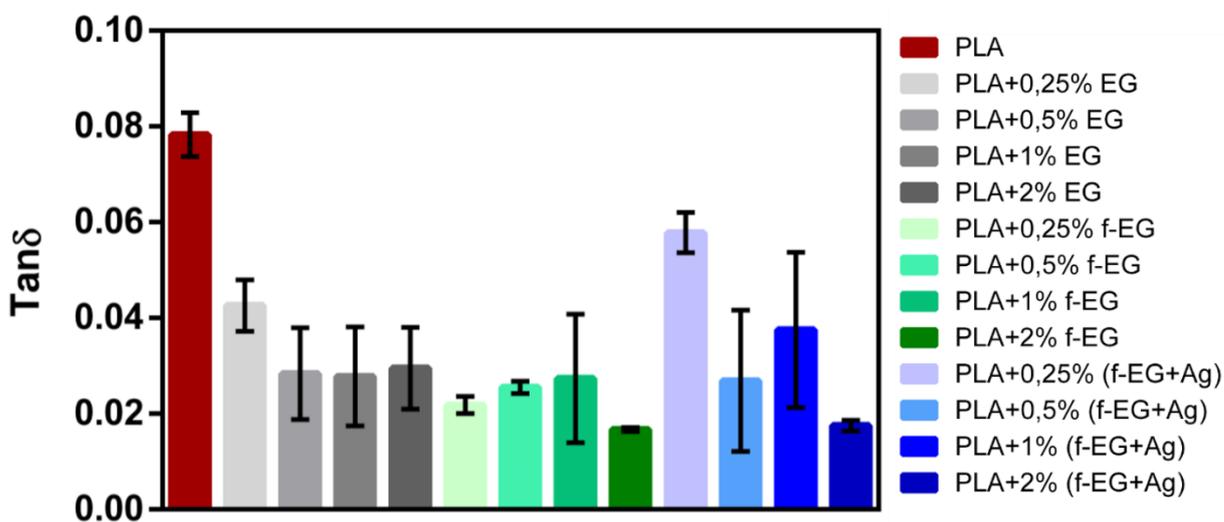


Figura 36- Fator de dissipação de energia do PLA e dos filamentos compósitos a 37°C.



Relativamente ao fator de dissipação, é possível verificar que todas as amostras dissipam energia, como seria de prever, uma vez que são materiais viscoelásticos, apresentando todos valores de $\text{Tan}\delta$ entre 0,02 e 0,08.

Segundo a literatura, o LCA apresenta um valor de módulo de young que varia de 100 a 300 MPa. (52) (53) (13) Assim, estes resultados indicaram que o PLA reforçado com grafeno é um material promissor, demonstrando valores de rigidez adequados para a aplicação pretendida e os valores de amortecimento mecânico são valores típicos apresentados por tecidos humanos, que também apresentam um comportamento viscoelástico. (54)

4.2.7. Resistividade Elétrica

A aplicação de campos elétricos é regularmente utilizada para fins ortopédicos, e tem vindo a mostrar-se uma técnica muito promissora, aumentando a capacidade de regeneração de um ligamento *in vivo*. Num estudo, aplicaram campos elétricos de corrente contínua no ligamento cruzado anterior (LCA), comprovando que estes podem ser utilizados para melhorar a cicatrização do ligamento (28) (27).

A Tabela 27 mostra a variação da resistividade elétrica medida nos filamentos em função da quantidade de EG adicionada. É possível observar que o maior valor de resistividade obtido foi o do filamento de PLA+0.25EG, com $6,98 \times 10^9 \Omega \cdot \text{cm}$, e o menor valor de resistividade foi o do filamento de PLA+2 EG, com $5,48 \times 10^8 \Omega \cdot \text{cm}$. Assim, a adição do reforço não altera significativamente a resistividade elétrica do filamento pois as concentrações de reforço utilizadas na realização deste trabalho são reduzidas. De qualquer modo, a presença deste reforço, reduz a resistividade elétrica, em duas ou três ordens de magnitude, o que é um indicador promissor para a produção de filamentos compósitos condutores com reforço à base do grafeno, conforme foi relatado em diversos estudos (24) (55).



Tabela 27- Resistividade elétrica do PLA e dos filamentos compósitos.

Amostra	Resistividade Elétrica (Ω .cm)
PLA+0.25% EG	6,98E+09 \pm 2,97E+09
PLA+0.5% EG	1,82E+09 \pm 6,09E+08
PLA+1% EG	9,41E+08 \pm 5,02E+07
PLA+ 2% EG	5,48E+08 \pm 1,23E+08
PLA+0.25% f-EG	1,12E+09 \pm 2,43E+08
PLA+0.5% f-EG	8,10E+08 \pm 4,24E+06
PLA+1% f-EG	7,49E+08 \pm 4,93E+06
PLA+2% f-EG	6,44E+08 \pm 3,04E+07
PLA +0.25% (f-EG+Ag)	3,44E+09 \pm 3,66E+09
PLA+0.5% (f-EG+Ag)	4,36E+09 \pm 5,19E+09
PLA+1% (f-EG+Ag)	6,96E+08 \pm 3,83E+07
PLA+2% (f-EG+Ag)	5,96E+08 \pm 1,14E+08

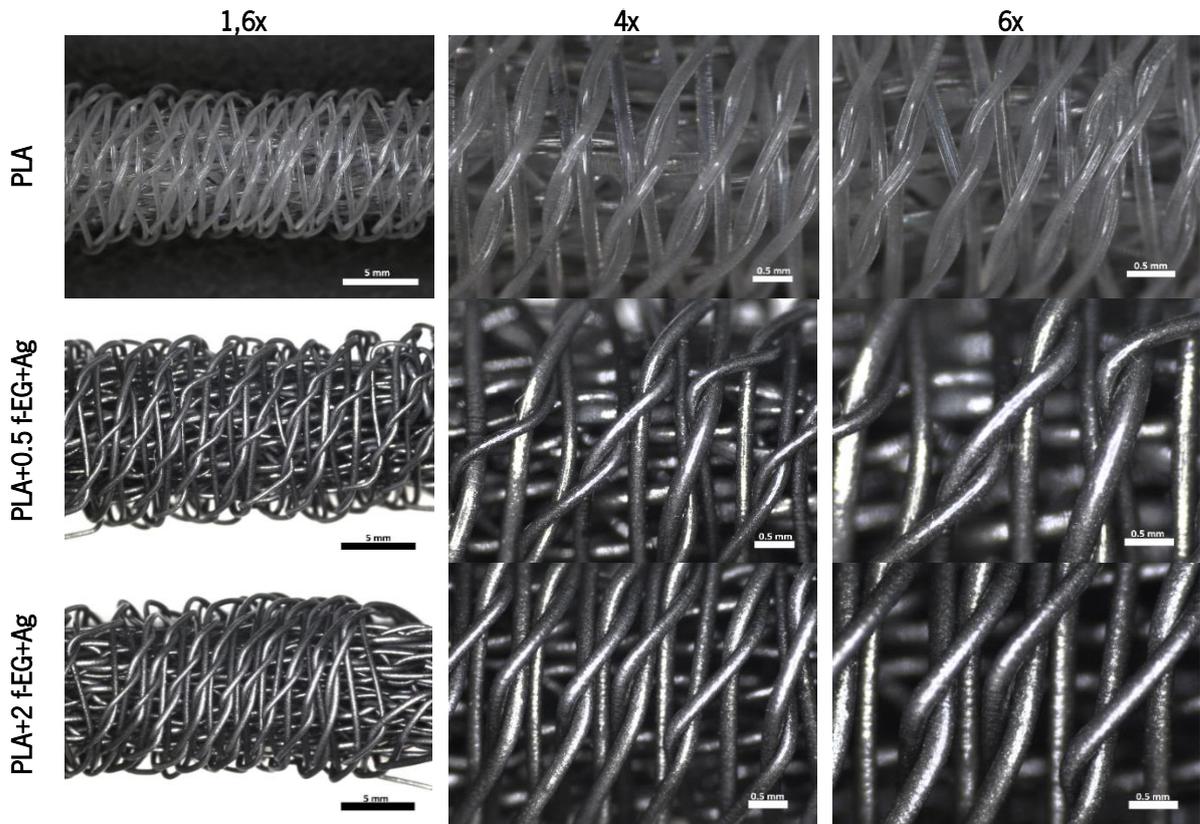
Num estudo realizado recentemente, concluíram que a resistividade elétrica do PLA sem a presença de grafite é da ordem de grandeza dos $10^{12}\Omega$.m. Ficou claramente demonstrado neste estudo que, com a adição do reforço ao compósito, a resistividade elétrica diminui gradualmente, levando à formação de caminhos condutores no compósito, interconectando as partículas de grafite, até atingir valores mais baixos na ordem dos $10^8\Omega$.cm (56).

4.3. Produção dos *Scaffolds*

Com recurso a um kumihimo, foram produzidos com sucesso *scaffolds* para as composições previamente selecionadas, através da técnica de entrançamento de fibra. De todas as composições, foi escolhido o PLA sem qualquer tipo de reforço e duas amostras com incorporação de reforço, o PLA + 0,5% f-EG+Ag e o PLA + 2% f-EG+Ag, para termos de comparação. Na tabela 28, estão apresentados os scaffolds produzidos para o PLA e para os compósitos 0,5% e 2 % f-EG+Ag, observados com recurso a uma lupa estereoscópica Leica.



Tabela 28- Scaffolds produzidos para o PLA e para os filamentos compósitos de 0.5% e 2% f-EG+Ag.



É possível observar através da análise das imagens obtidas, que todos os scaffolds produzidos apresentam uma estrutura bastante porosa, com poros interconectados, o que é extremamente importante para possibilitar a regeneração do tecido humano com sucesso. (57) (19)

4.4. Caracterização Estrutural dos Scaffolds

4.4.1. Análise Mecânica Dinâmica (DMA)

De maneira a avaliar as propriedades mecânicas e viscoelásticas dos scaffolds fibrosos, foram realizados ensaios de DMA a 37°C e a uma frequência crescente de 0,1 Hz a 1 Hz, para simular as frequências fisiológicas do corpo humano. Os resultados obtidos estão apresentados na tabela 29.



Tabela 29- Resultados DMA dos scaffolds fibrosos.

Amostra	Comprimento (mm)	Diâmetro (mm)	Compressão (1Hz)	
			E' (MPa)	Tan δ
PLA	8,82	7,19	0,682±0,026	0,201±0,015
PLA + 0,5%	f-EG+Ag	8,63	1,420±0,422	0,257±0,018
PLA + 2%		8,9	0,987±0,068	0,200±0,034

É possível observar que o módulo de armazenamento (E') tende a aumentar com a incorporação do grafeno funcionalizado na matriz polimérica, isto é, a rigidez dos *scaffolds* compósitos parece ser superior. O fator de amortecimento mecânico (tan δ) a 37°C é semelhante para todas as amostras e diferente de 0, o que evidencia a capacidade de dissipação de energia dos scaffolds. Em estudos realizados por outros autores, foram obtidos valores de módulos de armazenamento (E') e de fator de dissipação (Tan δ) semelhantes, que variavam com a porosidade do *scaffold* fibroso em causa. (58) (59)



Capítulo 5

Conclusões



5. Conclusões

Com a realização deste trabalho, procurou-se desenvolver filamentos compósitos com boas propriedades térmicas e mecânicas de maneira a produzir scaffolds com recurso a técnicas têxteis de entrançamento de fibra. De maneira a melhorar as propriedades mencionadas, procedeu-se previamente à funcionalização da grafite exfoliada e à ancoragem de nanopartículas de prata, sendo ambos os processos realizados com sucesso.

Posteriormente, procedeu-se à extrusão do PLA e dos filamentos compósitos com cerca de 0,25%, 0,5%, 1% e 2% de cada uma das grafites exfoliadas, sendo testadas de seguida quanto à sua morfologia, propriedades térmicas, mecânicas e elétricas. Relativamente à morfologia dos filamentos, foi possível observar um ligeiro aumento de rugosidade com a adição do reforço. Para além disso, é possível observar uma boa adesão do reforço à matriz polimérica. Em relação às propriedades térmicas dos filamentos, é possível concluir que a adição do reforço à matriz polimérica em nada afeta a sua estabilidade térmica, sendo todos os filamentos produzidos adequados para a aplicação pretendida. No que diz respeito às propriedades mecânicas, a adição do reforço à matriz aumentou o módulo de armazenamento e o fator de dissipação de energia ($\tan \delta$), o que era de prever, uma vez que a funcionalização da grafite exfoliada melhorou a interface matriz-reforço. No que se refere aos testes elétricos, pode-se concluir que apesar de a adição do reforço não alterar significativamente a resistividade elétrica dos filamentos, uma vez que as suas concentrações são reduzidas, a sua presença diminui de facto a mesma, sendo um indicador promissor para a aplicação pretendida.

De seguida, procedeu-se à produção e caracterização mecânica de scaffolds com o PLA e os filamentos compósitos produzidos e caracterizados anteriormente. Estes foram produzidos manualmente, com a ajuda de um dispositivo kumihimo, com recurso a técnicas têxteis de entrançamento de fibra. Foram produzidos três scaffolds para cada amostra a testar, cada um com oito feixes e cada feixe com oito filamentos, sendo testados de seguida quanto às suas propriedades mecânicas. Relativamente às propriedades mecânicas dos scaffolds, o módulo de armazenamento e o fator dissipativo aumentam com a adição do reforço, o que era de prever uma vez que o mesmo aconteceu na caracterização dos filamentos, podendo-se concluir que a adição da grafite exfoliada funcionalizada melhora as propriedades mecânicas de toda a estrutura fibrosa.



Tendo em consideração todos os resultados presentes neste trabalho, pode concluir-se de uma forma geral, que todos os filamentos produzidos podem ser utilizados na produção de scaffolds com recurso a técnicas têxteis de entrançamento de fibra.

5.1. Trabalho Futuro

Apesar de os resultados obtidos serem positivos, possibilitando a produção de filamentos com as propriedades desejadas para a aplicação em causa, será necessário continuar e aprofundar o estudo de maneira a preencher todos os requerimentos inicialmente propostos. Desta maneira, são apresentadas a seguir por tópicos, algumas sugestões a ter conta no futuro:

- Repetir ensaios DMA, para as amostras de 1% f-EG e 2% f-EG+Ag, aumentando a velocidade de aquisição de dados, de maneira a adquirir curvas com maior resolução e com menos ruído;
- Realização de ensaios de DMA no modo de tração, uma vez que neste trabalho só foi possível realizar ensaios de compressão;
- Realização de ensaios de Micro-CT, de modo a analisar a porosidade e tamanho dos poros das amostras em estudo.

É também importante realizar a produção de monofilamentos usando PLA de grau médico, produzir e caracterizar os scaffolds com esse PLA, que permitirá avaliar outras características importantes para a aplicação, tais como a biocompatibilidade e citotoxicidade.



6. Referências

1. *Development of hybrid polymer scaffolds for potential applications in ligament and tendon tissue engineering.* **Sambit Sahoo, James Goh Cho-Hong, Toh Siew-Lok.** 3, 2007, *Biomedical Materials*, Vol. 2, pp. 169-173.
2. *Fiber-based tissue-engineered scaffold for ligament replacement: design considerations and in vitro evaluation.* **James A. Cooper, Helen H. Lu, Frank K. Ko, Joseph W. Freeman, Cato T. Laurencin.** 13, 2005, *Biomaterials*, Vol. 26, pp. 1523-1532.
3. *Potential use of silkworm gut fiber braids as scaffolds for tendon and ligament tissue engineering.* **Ana Pagán, Salvador D. Aznar-Cervantes, José Pérez-Rigueiro, Luis Meseguer-Olmo, Jose L. Cenis.** 2019, *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied B*.
4. *Tissue engineering of the anterior cruciate ligament using a braid-twist scaffold design.* **Joseph W. Freeman, Mia D. Woods, Cato T. Laurencin.** 9, 2007, *Journal of Biomechanics*, Vol. 40, pp. 2029-2036.
5. **Bret D. Ulery, Lakshmi S. Nair, Cato T. Laurencin.** Review. *Biomedical Applications of Biodegradable Polymers.* 11 April 2011, pp. 832-864.
6. *Biomaterials & scaffolds.* **O'Brien, Fergal J.** 3, 2011, *Materials Today*, Vol. 14.
7. *Polímeros Biorreabsorvíveis como Substrato para Cultura de Células e Engenharia Tecidual.* **Arnaldo R. Santos Jr, Maria Lucia F. Wada.** 4, 2007, *Polímeros: Ciência e Tecnologia*, Vol. 17, pp. 308-317.
8. *Polímeros Bioreabsorvíveis na Engenharia de Tecidos.* **Samuel H. Barbanti, Cecília A. C. Zavaglia, Eliana A. R. Duek.** 1, 2005, *Polímeros: Ciência e Tecnologia*, Vol. 15, pp. 13-21.
9. *Current tissue engineering strategies in anterior cruciate ligament reconstruction.* **Natalie L. Leong, Frank A. Petrigliano, David R. McAllister.** 5, 2013, *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, Vol. 102, pp. 1-11.
10. *Tissue Engineering of the Anterior Cruciate Ligament: The Viscoelastic Behavior and Cell Viability of a Novel Braid-Twist Scaffold.* **Joseph W. Freeman, Mia D. Woods, Damond A. Cromer, Lee D. Wright & Cato T. Laurencin.** 12, 2009, *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition*, Vol. 20, pp. 1709-1728.
11. *Anterior Cruciate Ligament Tissue Engineering: A Review of Current Investigations.* **Megan A. Walters, Monique C. Chambers, M.D., Rabindra Karki, Eddie Knox, Gary Levengood, Saadiq F. El-Amin, M.D.** 1, 2016, *Journal of Nanotechnology and Materials Science*, Vol. 3, pp. 3-9.
12. *Biomaterials and scaffolds for ligament tissue engineering.* **Zigang Ge, Fang Yang, James C. H. Goh, Seeram Ramakrishna, Eng Hin Lee.** 3, 2006, *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, Vol. 77, pp. 639-652.
13. *Sex-based differences in the tensile properties of the human anterior cruciate ligament.* **Chandrashekar, Naveen, et al.** 16, 2006, *Journal of Biomechanics*, Vol. 39, pp. 2943-2950.
14. *Scaffolds in tissue engineering bone and cartilage.* **Hutmacher, Dietmar W.** 24, 2000, *Biomaterials*, Vol. 21, pp. 2529-2543.



15. *Anterior cruciate ligament regeneration using braided biodegradable scaffolds: in vitro optimization studies*. **Lub, Helen H., et al.** 23, 2005, *Biomaterials*, Vol. 26, pp. 4805-4816.
16. *Potential of Graphene–Polymer Composites for Ligament and Tendon Repair: A Review*. **Tânia Peixoto, Maria Conceição Paiva, António T. Marques, and Maria A. Lopes.** 2020, *Advanced Engineering Materials*.
17. *Progress in Polymer Science: Poly(lactic acid) modifications*. **Rahul M. Rasal, Amol V. Janorkar, Douglas E. Hirt.** 3, 2010, *Progress in Polymer Science*, Vol. 35, pp. 338-356.
18. **Bret D. Ulery, Lakshmi S. Nair, Cato T. Laurencin.** Review. *Biomedical Applications of Biodegradable Polymers*. 11 April 2011.
19. **Denchev, Professor Zlatan.** *Polímeros Naturais e Biodegradáveis*. Universidade do Minho : s.n., 2018.
20. **Gupta, M. Prithu and R.** *Graphite, Graphene and Their Polymer Nanocomposites*. United States of America : CRC Press, 2013.
21. *A review on the mechanical and electrical properties of graphite and modified graphite reinforced polymer composites*. **Rajatendu Sengupta, Mithun Bhattacharya, S. Bandyopadhyay, Anil K. Bhowmick.** 5, 2011, *Progress in Polymer Science*, Vol. 36, pp. 638-670.
22. *From Nanographene and Graphene Nanoribbons to Graphene Sheets: Chemical Synthesis*. **Long Chen, Yenny Hernandez, Xinliang Feng, and Klaus Millen.** 31, 2012, *Angewandte Minireviews*, Vol. 51, pp. 7640-7654.
23. *Graphene-based materials for tissue engineering*. **Su Ryon Shin, Yi-Chen Li, Hae Lin Jang, Parastoo Khoshakhlagh, Mohsen Akbari, Amir Nasajpour, Yu Shrike Zhang, Ali Tamayol, Ali Khademhosseini.** 2016, *Advanced Drug Delivery Reviews*, Vol. 105, pp. 255-274.
24. *Biomedical films of graphene nanoribbons and nanoflakes with natural polymers*. **Magda Silva, Sofia G. Caridade, Ana C. Vale, Eunice Cunha, Maria P. Sousa, Joao F. Mano, Maria C. Paiva and Natalia M. Alves.** 44, 2017, *RSC Advances*, Vol. 7, pp. 27578-27594.
25. *Nano-composite scaffolds for bone tissue engineering containing silver nanoparticles: preparation, characterization and biological properties*. **Marsich, Eleonora, et al.** 7, 2013, *Journal of Materials Science*, Vol. 24, pp. 1-9.
26. *Effect of CNT decoration with silver nanoparticles on electrical conductivity of CNT-polymer composites*. **Peng Cheng Maa, Ben Zhong Tangb, Jang-Kyo Kim.** 11, 2008, *Carbon*, Vol. 46, pp. 1497-1505.
27. *Effects of Applied DC Electric Field on Ligament Fibroblast Migration and Wound Healing*. **Pen-hsiu Grace Chao, Helen H. Lu, Clark T. Hung, Steven B. Nicoll & Jeannette Chloë Bulinski.** 4, 2007, *Connective Tissue Research*, Vol. 48, pp. 188-197.
28. **Gomes, Carina Branco.** *Poly(lactide acid) and Graphene-based Fibers for Biomedical Applications*. Guimarães : s.n., 2019.
29. *BIODEGRADABLE SYNTHETIC POLYMERS FOR TISSUE ENGINEERING*. **Adhikari, Pathiraja A.Gunatillake and Raju.** 2003, *European Cells and Materials*, Vol. 5, pp. 1-16.



30. *Poly(lactic acid) Composites with Poly(lactic acid)-Modified Carbon Nanotubes*. Rui M. Novais, Frank Simon, Petra Peotschke, Tobias Villmow, Jose A. Covas, Maria C. Paiva. 17, 2013, Journal of Polymer Science, Vol. 51, pp. 3740-3750.
31. *Investigating the properties of poly (lactic acid)/exfoliated graphene based nanocomposites fabricated by versatile coating approach*. Chakraborty, Gourhari, et al. 2018, International Journal of Biological Macromolecules, Vol. 113, pp. 1080-1091.
32. *Effects of Filament Extrusion, 3D Printing and Hot-Pressing on Electrical and Tensile Properties of Poly(Lactic) Acid Composites Filled with Carbon Nanotubes and Graphene*. Spinelli, Giovanni, et al. 1, 2019, Nanomaterials, Vol. 10, pp. 1-16.
33. *Reprocessing of PLA/Graphene Nanoplatelets Nanocomposites*. Luigi Botta, Roberto Scaffaro, Fiorenza Sutura and Maria Chiara Mistretta. 1, 2018, Polymers, Vol. 10, pp. 1-15.
34. *Controlled Functionalization of Carbon Nanotubes by a Solvent-free Multicomponent Approach*. M. Conceição Paiva, Frank Simon, Rui M. Novais, Tânia Ferreira, M. Fernanda Proenc, Wei Xu, Flemming Besenbacher. 12, 2010, ACS Nano, Vol. 4, pp. 7379-7386.
35. *Functionalization of Graphene: Covalent and Non-Covalent Approaches, Derivatives and Applications*. Vasilios Georgakilas, Michal Otyepka, Athanasios B. Bourlinos, Vimlesh Chandra, Namdong Kim,. 11, 2012, Chemical Reviews, Vol. 112, pp. 6156-6214.
36. *Physical, Chemical and Thermal Analysis of Plastics*. [book auth.] Steve Lampman. *Characterization and failure Analysis of Plastics*. s.l. : ASM International, 2003.
37. Silva, Magda Sofia Gonçalves da. *Freestanding Multilayered Films based on Functionalized Graphene and Natural Polymers for Biomedical Applications*. 2016.
38. *Perspectives on Carbon Nanotubes and Graphene Raman Spectroscopy*. Mildred S. Dresselhaus, Ado Jorio, Mario Hofmann, Gene Dresselhaus and Riichiro Saito. 3, 2010, Nano Letters, Vol. 10, pp. 751-758.
39. *Síntese, Estudo e Caracterização Estrutural da Redução Térmica e com Hidrazina do Óxido de Grafeno por Espectroscopia Raman e Espectroscopia de Infravermelho*. Oliveira, A. E. F., et al. 3, 2019, Revista Virtual de Química, Vol. 11, pp. 866-877.
40. Joseph I. Goldstein, Dale E. Newbury, Joseph R. Michael, Nicholas W.M. Ritchie, John Henry J. Scott, David C. Joy. *Scanning Electron Microscopy and X-Ray Microanalysis*. Fourth Edition. s.l. : Springer, 2003. Vol. 215.
41. G. W. H. Hohne, W. F. Hemminger, H.-J. Flammersheim. *Differential Scanning Calorimetry*. Second Edition. s.l. : Springer Science & Business Media, 2003.
42. P. J. Haines, G. R. Heal, P. G. Laye, D. M. Price, S. B. Warrington, R. J. Wilson. *Principles of Thermal Analysis and Calorimetry*. Segunda Edição. United Kingdom : Royal Society of Chemistry, 2002.
43. Kevin P. Menard, Noah Menard. Introduction and history of dynamic mechanical analysis. *Dynamic Mechanical Analysis*. 2017, pp. 1-25.
44. *Dynamic mechanical analysis of polymeric systems of pharmaceutical and biomedical significance*. Jones, David S. 2, 1998, International Journal of Pharmaceutics, Vol. 179, pp. 167-178.



45. *Tissue engineering of electrically responsive tissues using polyaniline based polymers: A review.* Taimoor H. Qazi, Ranjana Rai, Aldo R. Boccaccini. 33, 2014, *Biomaterials*, Vol. 35, pp. 9068-9086.
46. William F. Smith, Javad Hashemi, Ph.D., Dr. Francisco Presuel-Moreno. *Foundations of Materials Science and Engineering: Electrical Properties of Materials*. Fourth Edition. s.l. : Mc Graw Hill Education. pp. 185-248.
47. Freeman, Joseph W. and Kwansa, Albert L. Recent Patents on Biomedical Engineering. *Recent Advancements in Ligament Tissue Engineering: The Use of Various Techniques and Materials for ACL Repair*. 2008, Vol. 1, 1, pp. 18-23.
48. *Ligament tissue engineering: An evolutionary materials science approach.* Laurencin, Cato T. and Freeman, Joseph W. 36, 2005, *Biomaterials*, Vol. 26, pp. 7530-7536.
49. *New Wearable Sensor in the Shape of a Braided Cord (Kumihimo).* Yoshiro Tajitsu, Yuka Kawase, Kyousuke Katsuya, Masataka Tamura, Kosei Sakamoto, Kazuki Kawahara, Yuhei Harada, Takashi Kondo and Yuya Imada. 3, 2018, *IEEE Transactions on Dielectrics and Electrical Insulation*, Vol. 25, pp. 772-777.
50. *Effect of Cellulose Nanocrystal Polymorphs on Mechanical, Barrier and Thermal Properties of Poly(lactic acid) based bionanocomposites .* Prodyut Dhar, Debashis Tarafder, Amit Kumar and Vimal Katiyar. 74, 2015, *RSC Advances*, Vol. 5, pp. 60426-60440.
51. *Measurement of the mechanical and dynamic properties of 3D printed polylactic acid reinforced with graphene.* M. Mansour, K. Tsongas and D. Tzetzis. 11, 2018, *Polymer-Plastics Technology and Engineering*, Vol. 1.
52. *3D Numerical Analysis of an ACL Reconstructed.* M. Chizari, B. Wang. Aberdeen AB24 7QW, UK : s.n., 2009.
53. *The strength of the anterior cruciate ligament in humans and Rhesus monkeys.* Grood, Edward. 2006, *The Journal of Bone and Joint Surgery*, pp. 1074-1082.
54. Cowin, Stephen C. *Viscoelastic Properties of cortical bone.* *Bone Mechanics Handbook*. Boca Raton : CRC Press, 2001.
55. *Chemical Functionalization of Graphene To Augment Stem Cell Osteogenesis and Inhibit Biofilm Formation on Polymer Composites for Orthopedic Applications.* Sachin Kumar, Shammy Raj, Elayaraja Kolanthai, A.K. Sood, S. Sampath and Kaushik Chatterjee. 5, 2015, *ACS Applied*, Vol. 7, pp. 3237-3252.
56. *Electrical and Thermal Conductivity of Polylactic Acid (PLA)-Based Biocomposites by Incorporation of Nano-Graphite Fabricated with Fused Deposition Modeling.* Rui Guo, Zechun Ren, Hongjie Bi, Min Xu, Liping Cai. 3, 2019, *Polymers*, Vol. 11, p. 549.
57. *Fiber-based tissue-engineered scaffold for ligament replacement: design considerations and in vitro evaluation.* James A. Cooper, Helen H. Lu, Frank K. Ko, Joseph W. Freeman, Cato T. Laurencin. 13, 2005, *Biomaterials*, Vol. 26, pp. 1523-1532.
58. *3D fiber-deposited scaffolds for tissue engineering: Influence of pores geometry and architecture on dynamic mechanical properties.* L. Moroni, J.R. de Wijn, C.A. van Blitterswijk. 7, 2006, *Biomaterials*, Vol. 27, pp. 974-985.



59. *Three-dimensional plotted scaffolds with controlled pore size gradients: Effect of scaffold geometry on mechanical performance and cell seeding efficiency.* Jorge M. Sobral, Sofia G. Caridade, Rui A. Sousa, João F. Mano. 3, 2011, *Acta Biomaterialia*, Vol. 7, pp. 1009-1018.
60. Freeman, Joseph w. Bone and Tissue Regeneration Insights. *Tissue engineering Options for Ligament Healing.* 2009.
61. OrthoInfo. [Online] American Academy of Orthopaedic Surgeons, 1995-2020. [Cited: 10 Setembro 2020.] <https://orthoinfo.aaos.org>.
62. Blaine, Roger L. The case for a generic definition of differential scanning calorimetry.
63. *Raman spectroscopy of graphene and graphite: Disorder, electron–phonon coupling, doping and nonadiabatic effects.* Ferrari, Andrea C. 1-2, 2007, *Solid State Communications*, Vol. 143, pp. 47-57.
64. *Braided Nanofibrous Scaffold for Tendon and Ligament Tissue Engineering.* John G. Barber, Andrew M. Handorf, Tyler J. Allee, and Wan-Ju Li. 11-12, 2013, *Tissue Engineering Part A*, Vol. 19, pp. 1265-1274.