



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS

Programa de pós-graduação em Ciência dos
Materiais



BIANCA SABINO LEOCÁDIO ANTUNES

**DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO
DE GEL BIOATIVO À BASE DE FIBROÍNA DA
SEDA/PLDLA/SINVASTATINA PARA
IMPRESSÃO 3D**

SOROCABA

2022

BIANCA SABINO LEOCÁDIO ANTUNES

**DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE
GEL BIOATIVO À BASE DE FIBROÍNA DA
SEDA/PLDLA/SINVASTATINA PARA IMPRESSÃO 3D**

Dissertação/Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Materiais para obtenção do título de Mestre em Ciência dos Materiais

Orientação: Prof. Dr. Eliana Aparecida de Rezende Duek

Coorientação: Daniel Komatsu

Financiamento: O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES)

SOROCABA

2022

Antunes, Bianca Sabino Leocádio

Desenvolvimento e caracterização de gel bioativo à base de fibroína da seda/PLDLA/sinvastatina para impressão 3D. / Bianca Sabino Leocádio Antunes -- 2022.
88f.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de São Carlos, campus Sorocaba, Sorocaba
Orientador (a): Eliana Aparecida de Rezende Duek
Banca Examinadora: Marcos Akira d' Ávila, Aparecido Júnior de Menezes
Bibliografia

1. Biomateriais. 2. Reologia. 3. Impressão 3D. I. Antunes, Bianca Sabino Leocádio. II. Título.

Ficha catalográfica desenvolvida pela Secretaria Geral de Informática
(SIn)

DADOS FORNECIDOS PELO AUTOR

Bibliotecário responsável: Maria Aparecida de Lourdes Mariano - CRB/8
6979



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS

Centro de Ciências e Tecnologias Para a Sustentabilidade
Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Materiais

Folha de Aprovação

Defesa de Dissertação de Mestrado da candidata Bianca Sabino Leocádio Antunes, realizada em 30/08/2022.

Comissão Julgadora:

Profa. Dra. Eliana Aparecida de Rezende Duek (PUC-SP)

Prof. Dr. Aparecido Junior de Menezes (UFSCar)

Prof. Dr. Marcos Akira D'Ávila (UNICAMP)

O Relatório de Defesa assinado pelos membros da Comissão Julgadora encontra-se arquivado junto ao Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Materiais.

DEDICATÓRIA

Ao tio Jair, que me inspirou o seu fascínio pelos livros e pelo Desconhecido. Registrarei em minha memória nossos diálogos e divagações sobre os mais curiosos temas. E neste momento, permito-me citar Lavoisier; partindo de seu contexto científico para abranger o filosófico: deque neste universo “nada se cria, nada se perde, tudo se transforma”. Descanse em paz.

AGRADECIMENTOS

Quero agradecer à professora Eliana Duek, pela oportunidade dada a mim de desenvolver meu projeto de pesquisa, pela excelente orientação e por sua generosidade.

Ao professor Daniel Komatsu, pela coorientação e todas as sugestões dadas, nas quais contribuíram muito para enriquecer meu trabalho.

À professora Moema, pela ajuda que me deu, por sua gentileza, sempre disposta a esclarecer dúvidas e dar sugestões, devido à sua grande experiência na área acadêmica.

À equipe do Labiomat (PUC), onde recebi todo o apoio inicial ao ingressar no mestrado, pela troca de conhecimentos, pelas conversas e risadas, e principalmente pelos laços de amizade formados.

Ao meu esposo Júnior que me deu todo o apoio e motivação durante este processo, sempre estando do meu lado mesmo nos momentos mais desafiadores.

À minha família, meus pais, minha avó e meus irmãos, minha base; que sempre acreditaram em mim e me motivaram a concluir mais esta etapa da minha vida.

À Deus, no qual alicerço minha espiritualidade e me deslumbro em sua Criação através da Ciência.

“O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES)”

“O presente trabalho foi realizado com apoio da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), processo n° 2020/09917-8”

Um agradecimento em especial ao professor Cedric Dicko, da Universidade de Lund-Suécia, pelo fornecimento das fibras de seda.

RESUMO

A Engenharia de Tecidos Ósseos (ETO) vem crescendo nas últimas décadas como uma abordagem eficaz para o tratamento de grandes defeitos ósseos. Recentemente, a impressão tridimensional (3D) surgiu como uma ferramenta para revolucionar o campo da engenharia tecidual e medicina regenerativa junto a liberação de moléculas osteogênicas como a Sinvastatina (SIN). No entanto, sua imobilização em um sistema de arcabouço/fármacos ainda é um desafio. A fibroína da seda (FS) tem demonstrado ser um biomaterial promissor para a obtenção de arcabouços devido às suas propriedades mecânicas, biodegradabilidade controlável e adesão/proliferação celular adequada. A adição de outros polímeros é estudada para controlar a viscosidade da solução FS garantindo melhor qualidade da estrutura impressa. O objetivo deste trabalho é estudar as propriedades reológicas do gel à base de FS e PLDLA (poli (L-co-D, L ácido láctico)), com SIN, a fim de obter a melhor composição para impressão do *scaffold* 3D, visando a regeneração óssea. Foram realizadas as sínteses do PLDLA e obtenção da FS a partir de fios de seda da espécie *bombyx mori*. Após esse processo, a amostra de FS pura e do PLDLA foram caracterizados por DSC, TG e FTIR. Em seguida foram preparadas soluções de FS-PLDLA, em ácido fórmico, variando as concentrações de FS e PLDLA onde foram submetidas aos ensaios reológicos em regimes permanente e oscilatório. As formulações escolhidas foram então submetidas ao processo de impressão 3D, obtendo *scaffolds* estruturados e com poros, onde a formulação de FS 15,0% com adição de PLDLA 7,0%, resultou na construção de um arcabouço mais fidedigno ao desenho original, comparado às formulações FS 15,0%/PLDLA 3,0% e FS 15,0%/PLDLA 10,0%, apresentando poros mais evidentes e atendendo aos critérios de pseudoplasticidade, viscoelasticidade e tixotropia, requisitos importantes para que uma solução seja apta à impressão 3D. Os ensaios reológicos mostraram que a adição de SIN, nas concentrações de 0,1%, 0,25%, 0,5% 1,0% e 2,0% não alteraram significativamente o comportamento pseudoplástico, viscoelástico e tixotrópico do gel FS 15,0%/PLDLA 7,0%.

Palavras-chave: Reologia. Hidrogel. Impressão 3D. PLDLA. Fibroína da Seda. Sinvastatina.

ABSTRACT

Bone Tissue Engineering (BOT) has been growing in recent decades as an effective approach for the treatment of large bone defects. Recently, three-dimensional (3D) printing has emerged as a tool to revolutionize the field of tissue engineering and regenerative medicine along with the release of osteogenic molecules such as Simvastatin (SIM). However, its immobilization in a framework/drug system is still a challenge. Silk fibroin (SF) has been shown to be a promising biomaterial for obtaining scaffolds due to its mechanical properties, controllable biodegradability and adequate cell adhesion/proliferation. The addition of other polymers is studied to control the viscosity of the SF solution, ensuring better quality of the printed structure. The objective of this work is to study the rheological properties of the gel based on SF and PLDLA (poly (L-co-D, L lactic acid)), with SIM, in order to obtain the best composition for 3D scaffold printing, aiming at the bone regeneration. PLDLA syntheses and SF were obtained from silk threads of the *bombyx mori* species. After this process, the pure SF and PLDLA samples were characterized by DSC, TG and FTIR. Then, SF-PLDLA solutions were prepared in formic acid, varying the concentrations of SF and PLDLA where they were subjected to rheological tests in permanent and oscillatory regimes. The chosen formulations were then submitted to the 3D printing process, obtaining structured scaffolds with pores, where the formulation of FS 15.0% with the addition of PLDLA 7.0%, resulted in the construction of a more reliable scaffold to the original design, compared to to the SF 15.0%/PLDLA 3.0% and SF 15.0%/PLDLA 10.0% formulations, presenting more evident pores and meeting the criteria of pseudoplasticity, viscoelasticity and thixotropy, important requirements for a solution to be suitable for 3D printing. The rheological assays showed that the addition of SIM at concentrations of 0.1%, 0.25%, 0.5%, 1.0% and 2.0% did not significantly alter the pseudoplastic, viscoelastic and thixotropic behavior of the gel SF 15.0%/PLDLA 7.0%.

Keywords: Rheology. Hydrogel. 3D printing. PLDLA. Silk Fibroin. Simvastatin.

LISTA DE TABELAS

| | |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Tabela 1. Métodos de impressão 3D e suas particularidades | 22 |
| Tabela 2. Modelos matemáticos e seus respectivos parâmetros..... | 28 |
| Tabela 3. Parâmetros de ajuste ao modelo de Carreau a e Cross para as curvas de PLDLA ... | 50 |
| Tabela 4. Parâmetros de ajuste ao modelo de Carreau, Cross e Power-Law para as curvas de FS..... | 53 |

LISTA DE FIGURAS

| | |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Figura 1. Principais etapas durante a incorporação do <i>scaffold</i> no local do defeito ósseo..... | 18 |
| Figura 2. Principais métodos de Impressão 3D. | 21 |
| Figura 3. Mecanismos de deposição na impressão..... | 23 |
| Figura 4. Hidrogéis por reticulação química e seu tipo de ligação..... | 25 |
| Figura 5. Hidrogéis por reticulação física e seus tipos de ligações. | 25 |
| Figura 6. Comportamento reológico durante a impressão 3D..... | 26 |
| Figura 7. Curvas de viscosidade segundo modelos matemáticos..... | 27 |
| Figura 8. Ensaio oscilatório de amplitude | 30 |
| Figura 9. Ensaio oscilatório de varredura de frequência | 32 |
| Figura 10. Curva para ensaio de tixotropia (3ITT)..... | 33 |
| Figura 11. Estrutura da fibroína da seda..... | 35 |
| Figura 12. Estrutura química do copolímero PLDLA e seus monômeros..... | 37 |
| Figura 13. Curva de DSC do PLDLA puro | 43 |
| Figura 14. Curva de DSC da FS pura. | 44 |
| Figura 15. Curva termogravimétrica do PLDLA puro. | 45 |
| Figura 16. Curva termogravimétrica da FS pura | 46 |
| Figura 17. Espectro de FTIR do PLDLA puro | 47 |
| Figura 18. Espectro de FTIR da FS pura | 48 |
| Figura 19. Ensaio reológicos de soluções de PLDLA em diferentes concentrações (1.0; 3.0; 5.0; 7.0; 10.0 e 15.0%). a) Viscosidade vs taxa de cisalhamento. b) Viscosidade específica vs Concentração. | 49 |

| | |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Figura 20. Ensaio de frequência angular em regime oscilatório de soluções de PLDLA em diferentes concentrações (1,0; 3,0; 5,0; 7,0; 10,0 e 15,0 %). Módulos de perda (G'') e armazenamento (G') vs frequência angular..... | 51 |
| Figura 21. Ensaio reológico de soluções de FS em diferentes concentrações (0,5%; 1,0%; 3,0%; 5,0%; 7,0%; 10,0%; 15,0% ; 20,0%). a) Viscosidade vs taxa de cisalhamento. b) Viscosidade específica vs Concentração | 52 |
| Figura 22. Ensaio de frequência angular em regime oscilatório de soluções de FS em diferentes concentrações (0.5; 1.0; 3.0; 5.0; 7.0; 10.0 e 15.0 e 20.0%). Módulos de perda (G'') e armazenamento (G') vs frequência angular..... | 55 |
| Figura 23. Fator de amortecimento ($\tan \delta$) vs frequência angular para as soluções de FS nas concentrações: a) 0,5%; 1,0%; 3,0%; 5,0% b) 7,0%; 10,0%, 15,0%; 20,0% | 56 |
| Figura 24. Curvas de viscosidade vs taxa de cisalhamento para soluções de FS com adições de PLDLA. a) FS 10,0%; b) FS 15,0%; c) FS 20,0% | 57 |
| Figura 25. Ensaio de frequência em regime oscilatório de soluções de FS com adições de PLDLA (1,0%; 3,0%; 5,0%; 7,0%; 10,0%; 15,0%) de Módulos de perda (G'') e armazenamento (G') vs frequência angular; a) FS 10,0%; b) FS 15,0%; c) FS 20,0% | 59 |
| Figura 26. Ensaio de Tixotropia de três intervalos (3ITT) para a solução de FS 15,0% com adições de PLDLA (1,0%; 3,0%; 5,0%; 7,0%; 10,0%; 15,0%) | 61 |
| Figura 27. Arcabouço impresso antes da reticulação | 62 |
| Figura 28. Arcabouços de FS 15,0% com adições de PLDLA (da esquerda para direita): 10,0%; 3,0%; 7,0% | 63 |
| Figura 29. Ensaio reológico da formulação FS 15,0%/PLDLA 7,0%. a) Curvas de viscosidade X taxa de cisalhamento; b) Ensaio de frequência dos módulos G' , G'' X frequência angular; c) Ensaio de tixotropia da viscosidade X tempo..... | 65 |

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

"C" Regime diluído

C^* Regime semidiluído

C^{**} Regime concentrado

η Viscosidade

η_{sp} Viscosidade específica

η_0 Viscosidade de cisalhamento zero

η_∞ Viscosidade de cisalhamento ao infinito

γ Deformação

$\dot{\gamma}$ Taxa de cisalhamento

ω Frequência angular

G' Modulo de armazenamento

G'' Modulo de perda

n Índice de lei de potencias

T_g Temperatura de transição vítrea

T_m Temperatura de fusão

SUMÁRIO

| | |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| 1 INTRODUÇÃO | 13 |
| 2 OBJETIVOS | 16 |
| 2.1 Objetivos gerais | 16 |
| 2.2 Objetivos específicos..... | 16 |
| 3 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA..... | 17 |
| 3.1 Engenharia Tecidual Óssea (ETO) | 17 |
| 3.2 Sinvastatina (SIN)..... | 18 |
| 3.3 Manufatura aditiva (MA) | 20 |
| 3.4 Hidrogéis | 23 |
| 3.4.1 Reticulação Química..... | 24 |
| 3.4.2 Reticulação Física..... | 25 |
| 3.5 Parâmetros reológicos | 26 |
| 3.5.1 Comportamento pseudoplástico – Extrudabilidade..... | 27 |
| 3.5.2 Comportamento viscoelástico – Transição sol-gel..... | 28 |
| 3.5.3 Comportamento Tixotrópico..... | 33 |
| 3.6 Fibroína de seda (FS) | 34 |
| 3.7 Poli (L-co-D, L ácido láctico) – PLDLA | 36 |
| 4 METODOLOGIA..... | 38 |
| 4.1 Síntese do copolímero PLDLA | 38 |
| 4.2 Preparação da FS | 38 |
| 4.3 Preparação das soluções de FS-PLDLA | 39 |
| 4.4 Parâmetros reológicos | 40 |
| 4.4.1 Soluções de PLDLA (1,0%; 3,0%; 5,0%; 7,0%; 10,0%; 15,0% [% m/v]), de FS (0,5%; 1,0%; 3,0%; 5,0%; 7,0%; 10,0%; 15,0% 20,0% [% m/v]) e formulações de FS/PLDLA..... | 40 |
| 4.5 Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR) | 40 |
| 4.6 Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC) | 41 |
| 4.7 Termogravimetria (TG)..... | 41 |
| 4.8 Impressão do arcabouço 3D de FS/PLDLA* | 41 |
| 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO | 43 |

| | |
|-------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| 5.1 Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC) | 43 |
| 5.2 Termogravimetria (TG) | 44 |
| 5.3 Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR) | 46 |
| 5.4 Perfil reológico das soluções de PLDLA e FS | 48 |
| 5.6 Adição de PLDLA em soluções de FS | 56 |
| 5.7 Impressão do <i>scaffold</i> 3D de FS/PLDLA* | 62 |
| 5.8 Ensaios reológicos do gel FS 15,0%/PLDLA 7,0% com adições de SIN | 64 |
| 6 CONCLUSÕES..... | 67 |
| REFERÊNCIAS | 68 |

1 INTRODUÇÃO

O osso é caracterizado como um tecido conjuntivo mineralizado que fornece suporte ao corpo, sendo uma estrutura para fixação muscular, uma fonte de armazenamento de cálcio e fosfato e, também, um nicho para diferenciação celular. (MIGUEZ, 2020) (SILVA *et al.*, 2015) (WEIVODA *et al.*, 2020) (SIEBERATH *et al.*, 2020). Apesar do tecido ósseo apresentar resistência mecânica elevada, as lesões e os defeitos nesse tecido estão entre os maiores problemas clínicos. De acordo com Collins *et al.* (2021), o número de procedimentos cirúrgicos ortopédicos realizados em todo o mundo totalizou aproximadamente 22,3 milhões em 2017 e está projetado para se aproximar de 28,3 milhões até 2022.

Nas últimas décadas, a engenharia tecidual óssea tem sido desenvolvida como uma abordagem alternativa e efetiva para o tratamento de defeitos ósseos, sendo a obtenção de arcabouços com design e tempo de degradação adequado os maiores desafios. Neste caso, a substituição do tecido lesionado passa pela utilização dos arcabouços, os quais agem como matriz temporal a fim de mimetizar a matriz extracelular óssea permitindo a adesão, migração, diferenciação e crescimento celular para obtenção do tecido ósseo (CHENA; LIU, 2016). Junto ao arcabouço é possível integrar células e fármacos, para promover a regeneração óssea.

A sinvastatina (SIN) pertence à família das estatinas, sendo vastamente prescrita para diminuir a taxa de colesterol. Além disso, a SIN desenvolve um papel importante na neoformação óssea por suprimir a apoptose de osteoblastos, prevenir osteoclastogênese, regular a expressão de BMP-2 (WANG *et al.*, 2015), inibir a atuação dos osteoclastos e promover a osteogênese (B *et al.*, 2006) (PUERTO *et al.*, 2019). Além dessas características, a literatura tem reportado trabalhos visando a liberação controlada da SIN (SON Y.J *et al.*, 2014). A obtenção de um sistema arcabouço/fármaco com rigoroso controle de liberação da SIN, apresentando um perfil longo o suficiente para permitir que aconteça a completa diferenciação osteogênica, seria uma abordagem interessante para suprimir os efeitos tóxicos da SIN (KHEIRALLAH; ALMESHALY, 2016).

Além do desafio de se conseguir um sistema arcabouço/fármaco com perfil de liberação controlado e longo, o desenvolvimento de um arcabouço ideal que apresente biocompatibilidade, biodegradabilidade, osteocondutividade, porosidade e propriedades mecânicas adequadas ainda é um processo desafiador e complexo (MEENA *et al.*, 2020).

Dessa maneira, para se obter um arcabouço com porosidade adequada, a impressão 3D, uma técnica de manufatura aditiva, é uma tecnologia emergente que deverá revolucionar o campo da engenharia tecidual e a medicina regenerativa, a qual se baseia na deposição de

biomateriais, encapsulando células ou carregando células após a impressão, em escala micrométrica para formar estruturas sutis comparáveis ao tecido. Esta capacidade das impressoras de depositar tintas com precisão micrométrica, em condições adequadas para as células, dá uma vantagem sobre outras tecnologias de produção de *scaffolds*, as quais são limitadas em relação ao controle da estrutura 3D, bem como à distribuição de células pelo *scaffolds* (MARKSTEDT *et al.*, 2015).

Posto isto, os hidrogéis têm sido apontados como materiais atraentes para serem utilizados como biotintas, uma vez que são, em geral, biocompatíveis, apresentam baixa citotoxicidade e seu alto conteúdo de água lhes conferem uma semelhança estrutural com a matriz extracelular. Além disso, esta alta porcentagem de água no hidrogel é necessária para evitar entupimento do bico de extrusão. Diversos materiais têm sido utilizados no desenvolvimento das biotintas como, por exemplo, os polímeros naturais: fibroína da seda (silk fibroin), colágeno, gelatina, ácido hialurônico, quitosana, celulose e alginato, uma vez que facilitam a fixação celular e a manutenção da diferenciação.

Os bichos-da-seda (*Bombyx mori*) produzem casulos feitos de um fascinante material à base de proteínas chamado fibroína da seda (FS). A seda *Bombyx mori* nativa é composta por proteína de fibroína da seda revestida com proteína sericina, que faz parte de um grupo de glicoproteínas solúveis que são expressas na glândula de seda dos bichos-da-seda *Bombyx mori* (VEPARI; KAPLAN, 2007). Baseado no sistema de solução aquosa, a FS pode ser processada em diferentes tipos de forma como, por exemplo, de filmes, partículas, fibras, esponjas e hidrogéis. Entretanto, existe um grande desafio em aberto quando se utiliza biotinta a base de FS no processo de impressão 3D, pois em muitos casos a impressão do arcabouço é dificultada. Esta dificuldade é causada, principalmente, quando se utiliza baixa concentração da FS, devido à baixa viscosidade do sistema, resultando em dificuldades de reprodutibilidade de impressão. Entretanto, aumentar a concentração da FS e/ou adicionar outros componentes com maior viscosidade à solução da FS, seria uma maneira de evitar o colapso da estrutura impressa, devido à baixa viscosidade do gel. Porém, aumentar a concentração de FS causa o entupimento do bico da impressora, causando problemas de impressão.

Assim sendo, é possível observar, na literatura científica, uma grande quantidade de trabalhos, visando a mistura de diversos componentes, na tentativa de melhorar o perfil de viscosidade da solução de FS, a fim de otimizar a impressão 3D de arcabouços baseados em FS. Entretanto, não existem relatos, na literatura científica, de trabalhos que utilizam o poli (L-co-D, L Ácido Láctico) (PLDLA) como componente de maior massa molar, misturado à

solução de FS, a fim de melhorar o perfil de viscosidade da mesma, com o intuito de otimizar o processo de impressão 3D e, conseqüentemente, evitar que as estruturas dos arcabouços impressos se colapsem devido à baixa viscosidade do gel. Por conseguinte, o controle da viscosidade da solução de FS garantiria a melhora na qualidade dos arcabouços impressos e, também, a reprodutibilidade de impressão.

É importante salientar, também, que a presença do PLDLA no arcabouço tem como função acelerar o processo de degradação do mesmo, facilitando a sua integração com as células ósseas, uma vez que a medida que o arcabouço vai se degradando, haveria a migração dessas células para dentro da sua estrutura (DUBEY *et al.*, 2020). Portanto, o objetivo deste trabalho é estudar as propriedades reológicas de soluções a base de FS e PLDLA, com SIN, a fim de obter a melhor composição para impressão 3D de arcabouços, com características adequadas e precisas para este processo, que serão utilizados na regeneração tecidual óssea (MOUSER *et al.*, 2020) (HOLZL, K *et al.*, 2016).

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivos gerais

Desenvolver um gel à base de FS e PLDLA, carregado com SIN, para ser utilizado no processo de impressão 3D, visando a obtenção de um *scaffold* a ser utilizado no processo de regeneração tecidual óssea.

2.2 Objetivos específicos

- Realizar a síntese do PLDLA na proporção 70:30 e caracterizar por GPC, FTIR, DSC e TG;
- Extrair a fibroína das fibras de seda, seguindo um protocolo específico e FTIR, DSC e TG;
- Preparar formulações de FS/PLDLA em diferentes concentrações;
- Submeter aos ensaios reológicos (regime permanente e oscilatório) para traçar um perfil reológico;
- Testar formulações de FS/PLDLA (adequaram-se aos ensaios reológicos) na impressora 3D;
- Fazer ensaios reológicos da formulação escolhida com adições de sinvastatina (SIN) para determinar sua influência ou não influência no gel FS/PLDLA

3 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

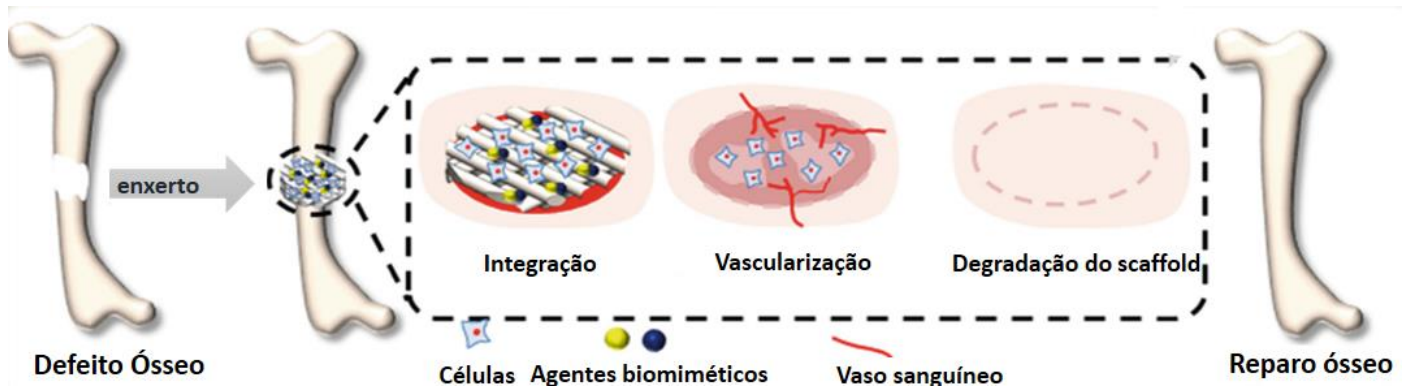
3.1 Engenharia Tecidual Óssea (ETO)

O osso é caracterizado como um tecido conjuntivo mineralizado que fornece suporte ao corpo, sendo uma estrutura para fixação muscular, uma fonte de armazenamento de cálcio e fosfato e, também, um nicho para diferenciação celular. (MIGUEZ, 2020) (SILVA *et al.*, 2015) (WEIVODA *et al.*, 2020) (SIEBERATH *et al.*, 2020). Apesar do tecido ósseo apresentar resistência mecânica elevada, as lesões e os defeitos nesse tecido estão entre os maiores problemas clínicos, sendo grande a preocupação em todo o mundo, pois as fraturas ósseas têm resultados devastadores como, por exemplo, diminuição da autonomia, custos com saúde e mortalidade (MESSINA *et al.*, 2019).

Atualmente, os tratamentos utilizados para os defeitos ósseos incluem o uso de substitutos ósseos e enxertos. Entretanto, certas desvantagens, como morbidade no local doador devido a infecção e hematoma, disponibilidade limitada de tecido doador e custo estão relacionadas aos autoenxertos. Da mesma maneira, os aloenxertos apresentam, também, uma série de desvantagens, como, por exemplo, restrições devido a insuficiência/indisponibilidade de tecidos para todos os pacientes, risco de transmissão de patógenos, possibilidade de introduzir infecção e rejeição (BRIEN, 2011). Assim, essas problemáticas, relacionadas aos enxertos, tem impulsionado os estudos relacionados aos biomateriais e engenharia tecidual óssea, como uma abordagem mais eficiente para o tratamento das lesões/defeitos ósseos (BASMNAV *et al.*, 2008).

Nas últimas décadas, a engenharia tecidual óssea tem sido desenvolvida como uma abordagem alternativa e efetiva para o tratamento de defeitos ósseos, sendo a obtenção de *scaffolds* com design e tempo de degradação adequados os maiores desafios. Neste caso, a substituição do tecido lesionado passa pela utilização dos arcabouços, os quais agem como matriz temporal a fim de mimetizar a matriz extracelular óssea permitindo a adesão, migração, diferenciação e crescimento celular para obtenção do tecido ósseo (CHENA; LIU, 2016). Dessa maneira, além da busca por um *scaffold* com um *design* e tempo de degradação adequados, muitos cientistas têm fundamentado seus estudos para se conseguir máxima eficiência no processo de regeneração óssea, através da incorporação, no mesmo, fatores de crescimento (LUKACĀ *et al.*, 2020), moléculas ativadoras da osteogênese ou mesmo moléculas indutoras da diferenciação (OUYANG *et al.*, 2016) (CHIMENE, *et al.*, 2020).

Figura 1. Principais etapas durante a incorporação do *scaffold* no local do defeito ósseo.



Fonte: PARK *et al.*, 2018

Entre as diferentes moléculas com capacidade osteogênicas, os estudos vêm dando ênfase às moléculas pequenas, com massa molar menor do que 1000 Da, pois comparadas com as moléculas de BMP, essas moléculas exibem vantagens intrínsecas como, por exemplo, facilidade de síntese, baixo custo, facilidade de manuseio, menor desnaturação e/ou perda de sua função durante o processamento e por isso, se mostram mais interessantes (ARAVAMUDHAN, *et al.*, 2013) (KALANI *et al.*, 2019) (ZUO, Q., *et al.*, 2012).

E por fim, pode-se destacar que o pequeno tamanho dessas moléculas favorece a difusão das mesmas através da membrana celular (MORAES, C. *et al.*, 2013). Portanto, moléculas pequenas, com potencial terapêutico, representam a próxima geração de estratégias para a engenharia tecidual regenerativa, aumentando a esperança de novas opções para tratar doenças ósseas e cartilaginosas que são muito prevalentes, principalmente, em idosos.

3.2 Sinvastatina (SIN)

A sinvastatina (SIN) pertence à família das estatinas, sendo vastamente prescrita para diminuir a taxa de colesterol, com uma série de efeitos como vasodilatação, antitrombótico, antioxidante, antiinflamatório e imunossupressor. A SIN desenvolve um papel importante na neoformação óssea por suprimir a apoptose de osteoblastos, prevenir osteoclastogênese, regular a expressão de BMP-2 (Lu WANG *et al.*, 2015), inibir a atuação dos osteoclastos, indiretamente estimular a neovascularização e conseqüentemente, promover a osteogênese (B. *et al.*, 2006) (PUERTO *et al.*, 2019).

Ali Moshiri e colaboradores (2016) publicaram um artigo de revisão abordando estudos *in vivo* (total de 96 artigos), no período de 1999 a 2015, realizados em camundongos, ratos, coelhos e cachorros, utilizando a SIN acoplada a diferentes materiais e que foram implantados no tecido ósseo. Os autores apontaram que ao se utilizar a SIN para promover a neoformação óssea, o ponto mais importante a ser considerado é a dose da sinvastatina a ser administrada (1mg/kg.dia a 20mg/kg.dia), pois a mesma depende do modelo animal, do local do implante e do tipo de carreadores, os quais podem ser materiais sintéticos ou naturais. De acordo com o trabalho publicado por Park, J.B. (2009) as concentrações limite de estatinas na medula óssea ainda não são bem estabelecidas, entretanto os osteoblastos e osteoclastos devem ser expostos a concentrações muito baixas de SIN, uma vez que altas concentrações podem causar processos inflamatórios e retardar a regeneração óssea (NYAN, M. *et al.*, 2007).

Neste sentido, a literatura tem reportado inúmeros trabalhos visando a liberação controlada da SIN. Son Y.J. e colaboradores (2014) mostraram que a imobilização de fármacos em arcabouços nanofibrosos favorece o controle da quantidade liberada bem como o perfil de liberação prolongado. Feng Qiao e colaboradores (2017) encapsularam a SIN em microesferas de PLGA e depositaram fibroína de seda na superfície dessas microesferas, investigando a cinética de liberação de SIN dessas microesferas. Os resultados mostraram que a taxa de liberação da SIN foi retardada pelo revestimento de fibroína da seda, sendo a cinética de liberação diferente das microesferas sem revestimento.

Ryu Wadagaki e colaboradores (2011) investigou um arcabouço a base de PLGA com SIN para engenharia de tecido ósseo. Os resultados mostraram que a liberação controlada de SIN promoveu a diferenciação osteogênica e melhorou a neoformação óssea *in vivo*. Dario Mendes Júnior e colaboradores (2017) realizou um estudo *in vivo* com membranas de PLGA contendo SIN e células tronco mesenquimais, o qual mostrou que as membranas contendo SIN promoveram maior crescimento ósseo, na área do defeito crítico, comparado às membranas de PLGA puras.

Wisam Khalaf Delan e colaboradores (2020) obtiveram nanopartículas de quitosana com SIN, como sistema de liberação controlada, visando tratamento ósseo. Os resultados mostraram que as nanopartículas de quitosana com SIN apresentaram alta capacidade de promover a geração óssea e melhorar a densidade óssea após 6 semanas de implantação. Kai. Portanto, embora seja possível observar nos trabalhos científicos que a SIN promove a osteogênese, a sua imobilização em sistemas arcabouço/fármaco ainda é um desafio em

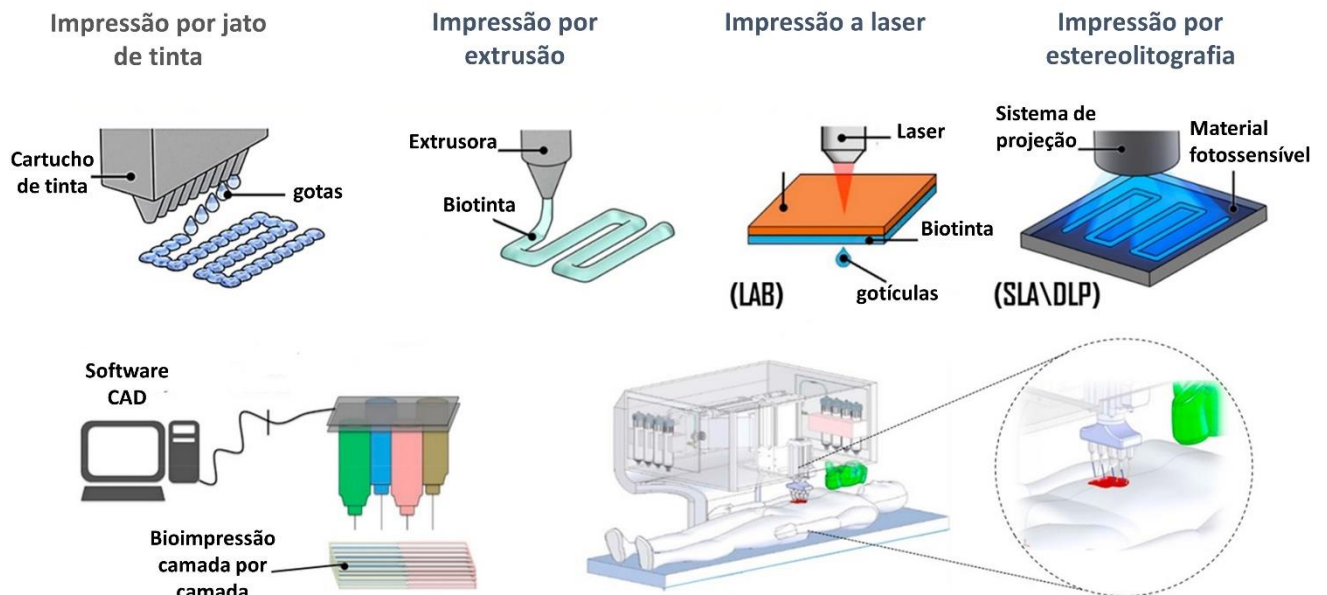
aberto considerando, como citado anteriormente, a necessidade de um rigoroso controle da liberação em termos de concentração da molécula ativa e da estabilidade do sistema.

Além do desafio de se conseguir um sistema arcabouço/fármaco com perfil de liberação controlado e longo, o desenvolvimento de um arcabouço ideal que apresente biocompatibilidade, biodegradabilidade (proporcionando espaço para novo crescimento ósseo), osteocondutividade, porosidade e propriedades mecânicas adequadas ainda é um processo desafiador e complexo (MEENA *et al.*, 2020).

3.3 Manufatura aditiva (MA)

A Manufatura Aditiva (MA) ou Impressão 3D, é uma tecnologia emergente que deverá revolucionar o campo da engenharia tecidual e a medicina regenerativa, a qual se baseia na deposição de biomateriais, encapsulando células ou carregando células após a impressão, em escala micrométrica para formar estruturas sutis comparáveis ao tecido. Esta capacidade das impressoras de depositar materiais com precisão micrométrica, em condições adequadas para as células, dá uma vantagem sobre outras tecnologias de produção de *scaffolds*, as quais são limitadas em relação ao controle da estrutura 3D, bem como à distribuição de células pelo *scaffolds* (MARKSTEDT *et al.*, 2015). A figura 2 ilustra os principais métodos de impressão 3D:

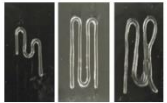
Figura 2. Principais métodos de Impressão 3D.



Fonte: FARHAT *et al.*, 2020

Dessa maneira, devido às vantagens como deposição precisa, custos baixos, simplicidade e controle da distribuição de células, o desenvolvimento e aplicação de impressão 3D tem aumentado constantemente nos últimos anos (NOH, 2018). Entretanto, a necessidade de desenvolver novas tintas que forneçam as propriedades necessárias para uma impressão bem-sucedida tem aumentado, levando a um extenso trabalho para desenvolver novas tintas que atendam, tanto aos requisitos biológicos, quanto aos requisitos necessários para uma boa capacidade de impressão, reprodutibilidade de impressão, propriedades mecânicas adequadas e janela de fabricação (IDONDERWINKE *et al.*, 2017). A tabela 1 mostra as principais técnicas de manufatura aditiva mais utilizadas em impressão 3D:

Tabela 1. Métodos de impressão 3D e suas particularidades

| Método de Impressão | Jato de tinta | Microextrusão | Laser (LAD) | Estereolitografia |
|---------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| |  |  |  |  |
| Descrição | A solução é expelida de gota a gota por meio de força térmica, piezoelétrica ou eletromagnética | O material é dispensado em filamento através de um bico de extrusão sob força mecânica ou pneumática | A solução é suspensa na parte inferior de uma fita e, quando vaporizadas por um pulso de laser, são impelidas para um substrato receptor | Utiliza-se de luz Ultravioleta com deposição de camada por camada |
| Vantagens | Alta velocidade, disponibilidade, baixo custo | Capacidade de utilizar soluções de alta viscosidade e imprimir alta densidade celular | Alto grau de precisão e resolução, capacidade de utilizar soluções de alta viscosidade e imprimir com alta densidade celular | Alto grau de precisão de fabricação e baixo tempo de impressão |
| Desvantagens | Falta de precisão no posicionamento e tamanho da gota, mais indicado utilizar soluções de baixa viscosidade | Técnica depende de característica específicas do material e propriedades mecânicas adequadas | Consome tempo, alto custo | Uso de luz ultravioleta de alta intensidade, pós-processamento demorado, falta de materiais compatíveis, pode comprometer a viabilidade celular |

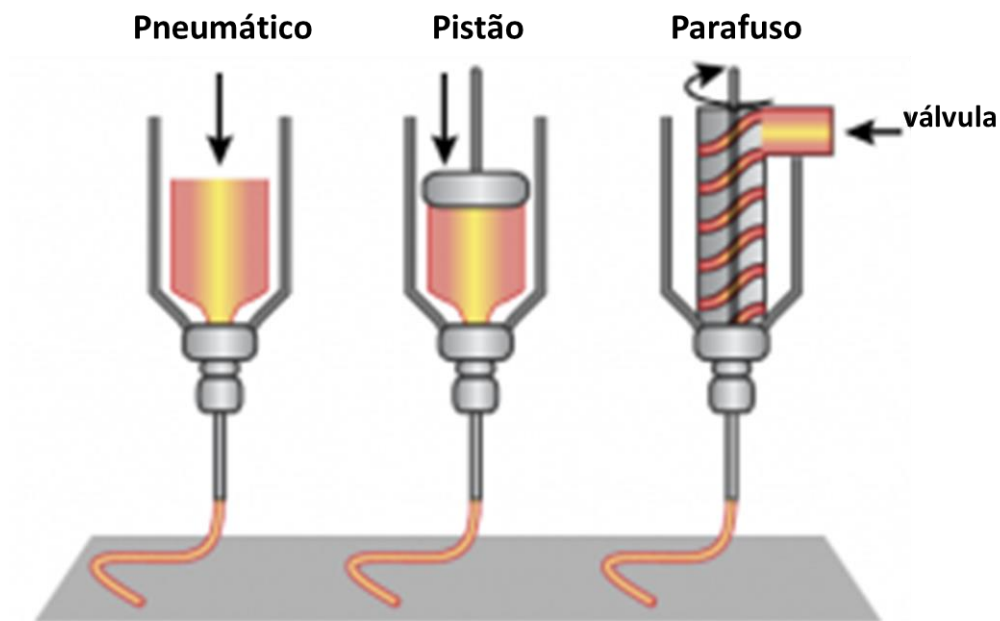
Fonte: BISHOP *et al.*, 2017; ZHANG *et al.*, 2018; LEE *et al.*; 2017

Dentre as técnicas de impressão citadas na tabela, o modelo baseado em extrusão é o método de impressão mais comum em uso hoje. As impressoras de microextrusão produzem filamentos contínuos de material, em contraste com as gotículas produzidas em uma impressora a jato de tinta, por exemplo (BISHOP *et al.*, 2017). O filamento é produzido seguindo um padrão gerado por um software de comando, que direciona o percurso para a formação de uma estrutura tridimensional. Os materiais que mais adequam-se à impressão por extrusão são os que possuem um perfil pseudoplástico e viscoelástico, como os polímeros por exemplo, pois utiliza-se de forças mecânicas ou pneumáticas para dispensar a tinta através de uma seringa.

Este comportamento de material pseudoplástico (não newtoniano) causa uma diminuição na viscosidade ao aumentar a tensão de cisalhamento. As altas taxas de cisalhamento que estão presentes no bico durante a impressão permitem que esses materiais fluam através do bico e, após a deposição, a taxa de cisalhamento diminui, causando uma recuperação na viscosidade (ZHANG *et al.*, 2018).

Por esse motivo, a impressão por extrusão tem a vantagem de imprimir tintas de alta viscosidade, utilizando materiais como polímeros complexos, células vivas e substratos à base de argila. Além destas vantagens, a técnica possibilita a impressão em densidades celulares muito altas para a formação de tecido (MURPHY; ATALA, 2014). A figura 3 ilustra os diferentes mecanismos de dispensação de tinta, referentes ao processo de impressão por extrusão.

Figura 3. Mecanismos de deposição na impressão



Fonte: PIAGGESI *et al.*, 2018

3.4 Hidrogéis

Um hidrogel é constituído por redes poliméricas tridimensionais capazes de absorver e reter alto teor de água, podendo originar-se de polímeros sintéticos ou naturais. No ramo da Engenharia tecidual, é possível combinar diversos materiais, ajustando propriedades desejáveis para a impressão de um arcabouço como: resistência mecânica, tempo de degradação adequado, viscoelasticidade, adesão e proliferação celular. Há uma crescente quanto ao estudo de hidrogéis, pois o material nessa forma pode apresenta diversas vantagens tanto na aplicação

voltada à regeneração de tecidos, por apresentarem estrutura semelhante à matriz extracelular, ser biocompatível e biodegradável, além de possuir facilidade de processamento (LI; GUO; ZHANG, 2021); (TOWNSEND *et al.*, 2019).

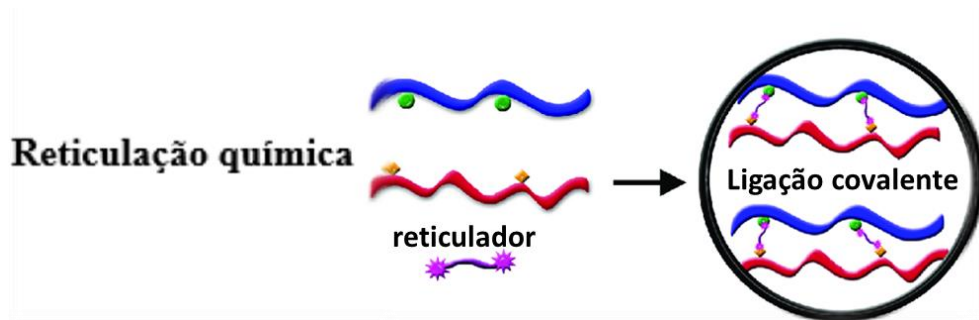
Posto isto, os hidrogéis têm sido apontados como materiais atraentes para impressão 3D, uma vez que são em geral, biocompatíveis, apresentam baixa citotoxicidade e seu alto conteúdo de água lhes conferem uma semelhança estrutural com a matriz extracelular. Além disso, esta alta porcentagem de água no hidrogel é necessária para evitar entupimento do bico de extrusão. Diversos materiais têm sido utilizados no desenvolvimento das tintas como, por exemplo, os polímeros naturais: fibroína da seda (silk fibroin), colágeno, gelatina, ácido hialurônico, quitosana, celulose e alginato, uma vez que facilitam a fixação celular e a manutenção da diferenciação (VEDADGHAVAMI *et al.*, 2017).

Quanto à impressão 3D, é possível combinar materiais entre si, com o intuito de aliar propriedades específicas de cada material promovendo uma sinergia, para que um novo material seja produzido com o objetivo de alcançar uma aplicação desejada. Os hidrogéis possuem propriedades viscoelásticas e biodegradáveis, o que pode facilitar o enxerto do material, a retenção no local da administração e a recuperação da elasticidade após a colocação. Neste caso, biomateriais em estado de hidrogel possibilita uma gama de combinações, por mecanismos de reticulação química ou física (TOWNSEND *et al.*, 2019); (HOFFMAN, 2012):

3.4.1 Reticulação Química

Também denominados de géis "permanentes" ou "químicos", são redes reticuladas por ligação covalente. O processo envolve o material ou uma combinação de matérias desejados junto a um agente reticulante. Os hidrogéis químicos também podem ser gerados por reticulação de polímeros solúveis em água ou por conversão de polímeros hidrofóbicos em polímeros hidrofílicos mais reticulação para formar uma rede. Como os hidrogéis físicos, os hidrogéis químicos não são homogêneos. Eles geralmente contêm regiões de baixo inchamento em água e alta densidade de reticulação, chamadas de “*clusters*”, que estão dispersos em regiões de alto inchamento e baixa densidade de reticulação.

Figura 4. Hidrogéis por reticulação química e seu tipo de ligação.

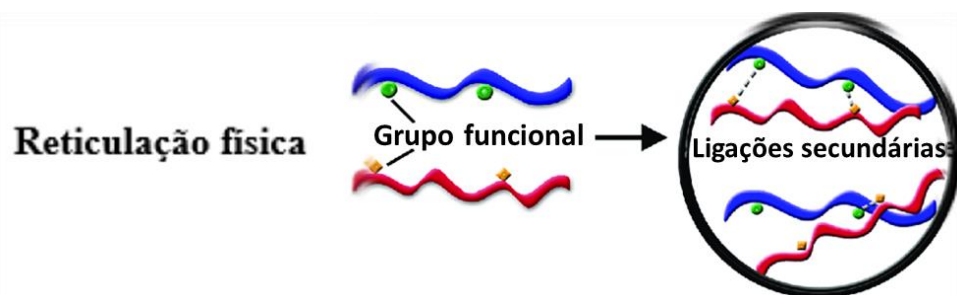


Fonte: RAMACHANDRAN *et al.*, 2019)

3.4.2 Reticulação Física

Ou comumente chamados de géis “reversíveis” ou “físicos”, ocorrem quando as redes são mantidas juntas por emaranhados moleculares ou forças secundárias, incluindo forças iônicas, de ligação de hidrogênio ou interações hidrofóbicas. Os hidrogéis físicos não são homogêneos, por causa dos grupos de emaranhados moleculares, domínios hidrofóbicos ou associados ionicamente. Todas essas interações são reversíveis e podem ser interrompidas por mudanças nas condições físicas, como força iônica, pH, temperatura, aplicação de estresse ou adição de solutos específicos que competem com o ligante polimérico pelo local de afinidade na proteína (HOFFMAN, 2012).

Figura 5. Hidrogéis por reticulação física e seus tipos de ligações.



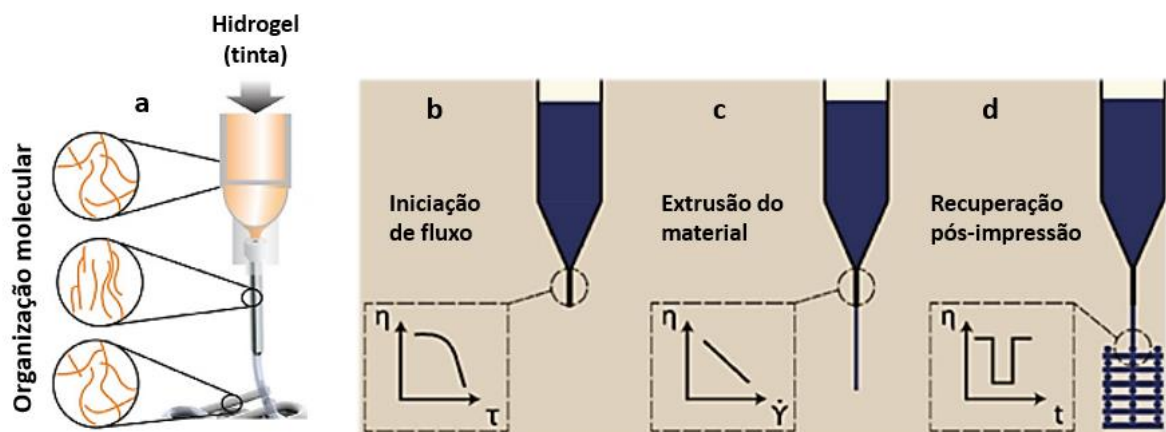
Fonte: RAMACHANDRAN *et al.*, 2019)

3.5 Parâmetros reológicos

Para a obtenção de uma estrutura impressa ideal, onde o objetivo seja obter um arcabouço funcional (resistente mecanicamente e viável para aplicação biomédica), é necessário analisar as propriedades mecânicas das formulações da tinta, por meio de ensaios reológicos. As análises reológicas que se correlacionam com impressão são muito necessárias para avançar no desenvolvimento da tinta (RUTZ *et al.*, 2015).

Dentre as técnicas de impressão 3D que envolvem o fluxo de material, como a extrusão, por exemplo, o material é carregado em uma seringa móvel e extrudado por forças mecânicas externas através de um bico para depositar em uma superfície. Durante a extrusão, espera-se que o material flua e, após a deposição, mantenha a estrutura inicialmente projetada. O desempenho de impressão, como extrudabilidade, fidelidade do filamento e transição sol-gel, são amplamente determinados pelas propriedades viscoelásticas da tinta que são caracterizadas por um conjunto de testes reológicos estáveis ou dinâmicos ilustrados na figura 6 (MU *et al.*, 2021).

Figura 6. Comportamento reológico durante a impressão 3D



Fonte: MU *et al.*, 2021; ZHANG *et al.*, 2018.

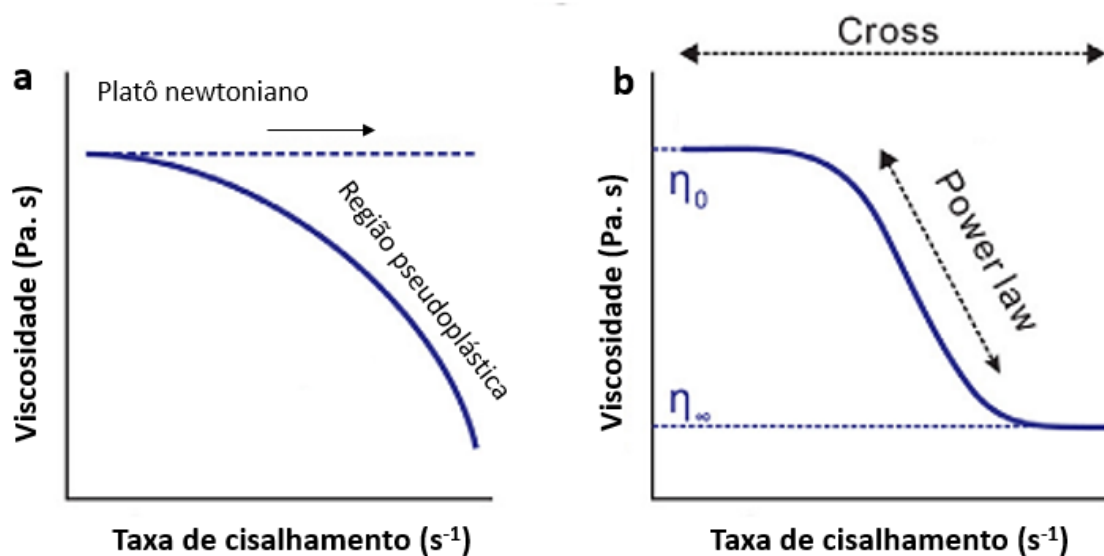
Além do comportamento reológico durante o processo de impressão 3D, também é possível observar a organização das cadeias, a nível molecular, na figura a. Quando submetida a uma tensão cisalhante, as cadeias alinham-se elasticamente em direção ao fluxo. Após a deposição e com tensão zero, leva um tempo para que as cadeias se reorganizem, para então

retornar à estrutura anterior ou dependendo da taxa de cisalhamento aplicada, possa recuperar boa parte de sua estrutura inicial (KONG *et al.*, 2021); (EVAGELIOU, 2020).

3.5.1 Comportamento pseudoplástico - Extrudabilidade

É esperado que um hidrogel apto para a extrusão se adeque aos parâmetros de viscosidade. A viscosidade é um parâmetro que indica a resistência de um fluido à deformação sob forças externas e, em nível molecular, a resistência ao deslizamento entre as moléculas (MU *et al.*, 2021). Para a impressão baseada em extrusão de polímeros, a viscosidade está fortemente relacionada com a concentração e o peso molecular, que por sua vez são proporcionais com o emaranhamento molecular. O emaranhamento molecular de materiais poliméricos impede o deslizamento das cadeias aumentando a viscosidade (COLBY, 2010). Por outro lado, materiais poliméricos possuem um comportamento pseudoplástico, onde os valores de viscosidade diminuem à medida que a tensão de cisalhamento aumenta, conforme ilustra as curvas de viscosidade da figura 7 (CHIMENE; KAUNAS; GAHARWAR, 2020):

Figura 7. Curvas de viscosidade segundo modelos matemáticos



Fonte: MU *et al.*, 2021

Este fenômeno dependente da taxa de cisalhamento é um comportamento não newtoniano, denominado como região pseudoplástica, em comparação ao fluxo independente de cisalhamento (newtoniano). Esta propriedade pseudoplástica é favorável para impressão 3D, pois reduz a pressão necessária para extrudar a tinta. O cisalhamento resulta do estiramento ou alongamento de moléculas sob cisalhamento, o que diminui os emaranhamentos moleculares e facilita o deslizamento entre as moléculas, diminuindo a viscosidade. Este comportamento de diminuição nos valores de viscosidade pode ser ajustado por vários modelos matemáticos, para adequar as curvas de acordo com as características da tinta utilizada, incluindo os modelos de Power-law, Cross e Carreau (MU *et al.*, 2021).

Tabela 2. Modelos matemáticos e seus respectivos parâmetros

| | | |
|------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------|
| Ostwald-de Waele | $\eta(\dot{\gamma}) = m\dot{\gamma}^{n-1}$ | m índice de consistência n índice de power-law |
| Cross | $\frac{\eta(\dot{\gamma}) - \eta_{\infty}}{\eta_0 - \eta_{\infty}} = 1 + (\lambda\dot{\gamma})^{-n}$ | n_0 viscosidade de cisalhamento zero n_{∞} viscosidade de cisalhamento infinita |
| Carreau | $\frac{\eta(\dot{\gamma}) - \eta_{\infty}}{\eta_0 - \eta_{\infty}} = [1 + (\lambda\dot{\gamma})^2]^{\frac{n-1}{2}}$ | $n_{\infty}=0$ λ constante de tempo |

Fonte: CORZO, 2021

3.5.2 Comportamento viscoelástico – Transição sol-gel

O comportamento viscoelástico é uma característica importante para a impressão 3D por extrusão, pois descreve a transição das fases líquida para sólida, frequentemente associada à reticulação das cadeias poliméricas. Para isso, é necessário entender o movimento molecular e os comportamentos de fluxo do material, já que a viscoelasticidade de um material é uma consequência direta desses movimentos moleculares.

Portanto, a reologia de cisalhamento oscilatório é amplamente utilizada para investigar as propriedades viscoelásticas do material, devido ao controle independente sobre a escala de tempo e a escala de comprimento proporcionada por mudanças na amplitude e frequência. (LEE *et al.*, 2019); (HYUN *et al.*, 2011); (LI; WANG; WANG, 2009). O cisalhamento oscilatório pode ser aplicado impondo a tensão (torque) ou a deformação (deslocamento). É padrão no cisalhamento oscilatório dirigido por deformação descrever um material como sendo submetido a uma deformação senoidal:

$$\gamma(t) = \gamma_0 \sin(\omega t) \quad (1.1)$$

$$*\sigma(t) = \sigma_0 \sin(\omega t + \delta)^1 \quad (2.1)$$

$$\sigma(t) = \sigma_0 \sin(\omega t) \quad (2.2)$$

Onde γ_0 representa a amplitude de deformação e ω a frequência angular. Neste caso, a resposta ao estresse é expressa como:

$$\sigma(t) = \gamma_0 (G'(\omega) \sin(\omega t) + G''(\omega) \cos(\omega t)) \quad (1.2)$$

$$\gamma(t) = \sigma_0 (J'(\omega) \sin(\omega t) - J''(\omega) \cos(\omega t)) \quad (2.3)$$

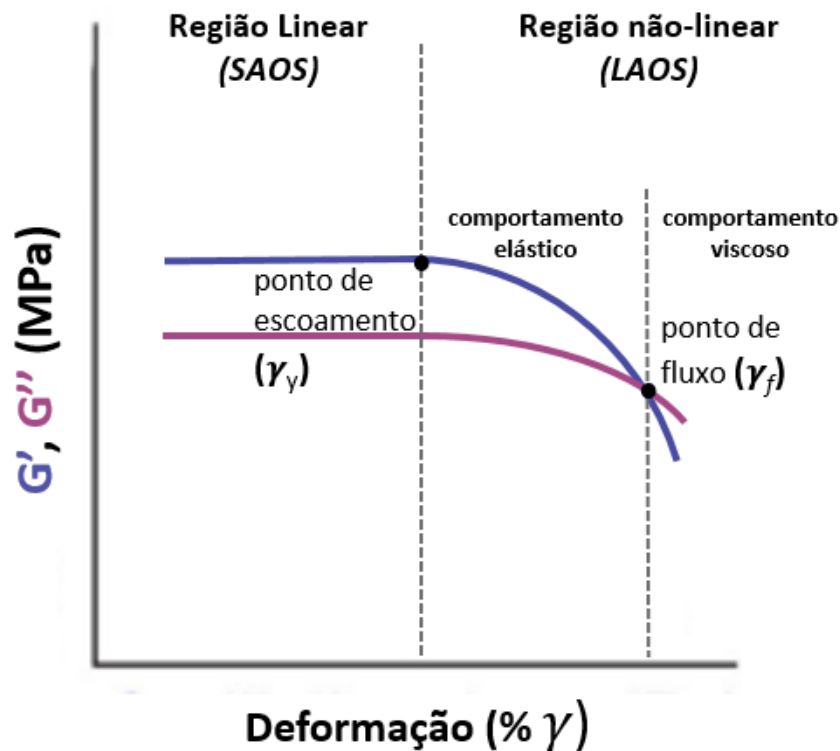
Onde os componentes $G'(\omega)$ e $G''(\omega)$ que descrevem a resposta ao estresse (que pode estar em fase ou fora de fase com a deformação), são os módulos de armazenamento e perda, respectivamente. Referidos como módulos dinâmicos, $G'(\omega)$ e $G''(\omega)$ contém detalhes de movimentos moleculares que levam à respostas viscoelásticas (LEE, Johnny Ching-Wei *et al.*, 2019). O módulo de armazenamento, $G'(\omega)$ descreve a energia média armazenada (por unidade de volume) ao longo de um ciclo de excitação e o módulo de perda, $G''(\omega)$ quanto à energia dissipada (por unidade de volume) do material ao longo de um ciclo de deformação.

¹ *Descreve o cisalhamento oscilatório sob termos de tensão e não de deformação. Na região não linear a tensão submetida (σ) passa a ser uma função da deformação (δ), enquadrando-se em outro regime. Este trabalho abordará somente a região linear para os ensaios oscilatórios, estando em regime SAOS. Sendo assim, as equações para deformação zero (γ_0) são suficientes para descrever o comportamento dos materiais caracterizados.

Através de ensaios reológicos de amplitude, é possível realizar um teste de varredura de deformação para determinar a região viscoelástica linear e não linear. Na região linear, os módulos de armazenamento (G') e perda (G'') são independentes da amplitude de deformação aplicada em uma frequência fixa e a tensão resultante é uma onda senoidal. No entanto, na região não linear, os módulos de armazenamento e perda tornam-se uma função da amplitude de deformação ($G'(\gamma_0)$ e $G''(\gamma_0)$) em uma frequência fixa e as formas de onda de tensão resultantes são distorcidas de ondas senoidais.

Para a região linear, o teste de cisalhamento oscilatório é chamado de Cisalhamento Oscilatório de Pequena Amplitude, mais conhecido como SAOS (do inglês: *Small Amplitude Oscillatory Shear*). Já na região não linear é denominado como Cisalhamento Oscilatório de Grande Amplitude ou LAOS (do inglês: *Large Amplitude Oscillatory Shear*). A figura 8 ilustra uma curva típica de um ensaio de amplitude com varredura de deformação:

Figura 8. Ensaio oscilatório de amplitude

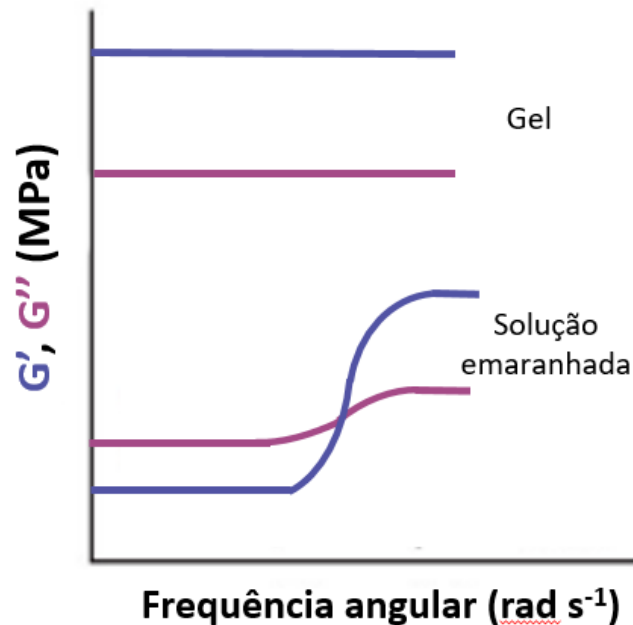


Tratando-se de materiais submetidos à impressão 3D, especificamente os hidrogéis, os ensaios de cisalhamento oscilatório são importantes para caracterizar o material quanto à sua estrutura e organização molecular, quando submetidas à tensão e deformação. Durante o processo de extrusão, a fidelidade do filamento é uma característica importante para a impressão de *scaffolds* mais estruturados, pois garante uma estrutura fidedigna e geometria intacta.

A tensão de escoamento τ_y (em termos de tensão ou deformação, τ_y ou γ_y , respectivamente), é uma propriedade inerente aos materiais viscoelásticos e deve ser analisada durante os ensaios reológicos (MU *et al.*, 2021). Uma tensão de escoamento insuficiente pode formar filamentos com baixa resistência mecânica, levando ao colapso da estrutura impressa devido ao peso das camadas que estão acima. A tensão de escoamento é dada a partir de uma varredura de amplitude, obtendo o ponto inicial da diminuição no módulo de armazenamento (G'), contornando assim os problemas de deslizamento da estrutura impressa e melhorando a reprodutibilidade.

Na região linear, também denominada Região Viscoelástica Linear (LVR- “*Linear Viscoelastic Region*”) o teste SAOS assume que a resposta do material está contida na precisão do reômetro e, portanto, as funções do material, por exemplo, G' e G'' descrevem completamente a resposta do material. Os testes SAOS fornecem uma caracterização reológica muito útil e conveniente de fluidos complexos ou hidrogéis, já que a viscoelasticidade linear possui embasamento na literatura, sendo rigorosamente fundamentada (KONDO, 1997); (BROSTOW, 1990); (DEALY; WISSBRUN, 1990); (FERRY, 1980). Sendo assim, a partir da região linear é possível fazer um ensaio de varredura de frequência para obter informações sobre o material dentro desse regime linear.

Figura 9. Ensaio oscilatório de varredura de frequência



Fonte: MU et al., 2021

Através do ensaio de varredura de frequência é possível determinar a estrutura do material e os emaranhamentos moleculares que ocorrem desde baixas até frequências mais altas. Em G' está contido as propriedades elásticas, semelhantes ao sólido; e G'' descreve o comportamento viscoso, semelhantes a líquido (MU *et al.*, 2021).

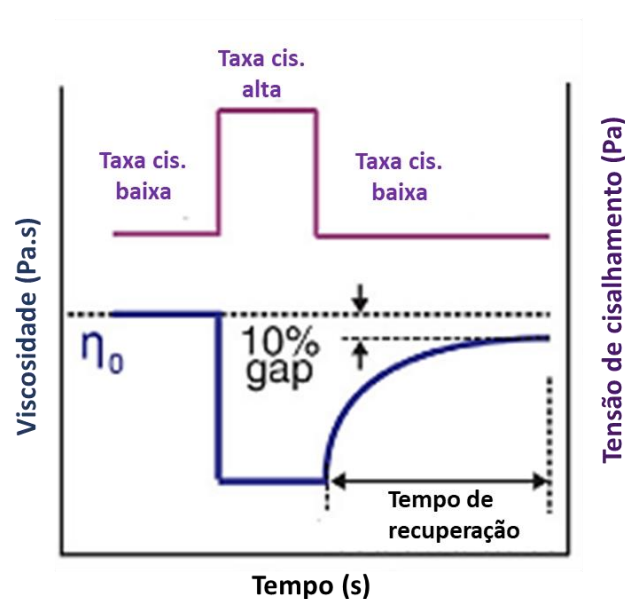
Para soluções semidiluídas, as cadeias poliméricas estão sobrepostas sob baixas frequências, onde $G'' > G'$ mostra que o comportamento viscoso prevalece. Já em frequências mais altas, ocorrem emaranhamentos entre as cadeias poliméricas, devido aos rearranjos moleculares resultantes do aumento da frequência angular. Quando o módulo de armazenamento é maior que o módulo de perda, ou seja, $G' > G''$, ocorre a transição de comportamento viscoso para o comportamento elástico. Entre a transição é possível detectar um ponto, chamado de ponto de gelificação. Em géis não ocorre essa transição, onde o módulo de armazenamento é maior que o módulo de perda ($G' > G''$) desde valores de frequência menores. Esta é uma característica notável para impressão 3D de hidrogéis, pois desta forma evita-se a colapso na estrutura do *scaffold*. A reticulação é caracterizada pela razão entre os módulos de armazenamento (G') e perda (G'') em um teste oscilatório.

3.5.3 Comportamento Tixotrópico

Um fluido tixotrópico é aquele que apresenta uma recuperação de viscosidade dependente do tempo, após reduzir a taxa de cisalhamento aplicada (FU *et al.*, 2021). A tixotropia pode ser caracterizada por uma varredura de cisalhamento em três tempos (3ITT) para indicar a viscosidade recuperada. Primeiramente é aplicada uma baixa taxa de cisalhamento, similar ao fluxo lento da tinta na seringa; em seguida, a taxa de cisalhamento é aumentada drasticamente, o que corresponde ao estado da tinta fluindo pelo bico; e na terceira etapa, aplica-se novamente uma baixa taxa de cisalhamento permitindo a reorganização das cadeias poliméricas, ocorrendo desta forma, a recuperação da viscosidade (ZHANG *et al.*, 2018).

Na Figura 10 ocorre uma recuperação de viscosidade em 90% do valor original; a lacuna (gap) de 10% pode ser permanente devido a mudanças estruturais irreversíveis na tinta. Para impressão 3D baseada em extrusão, o tempo rápido de reconstrução e uma grande porcentagem da viscosidade recuperada são favoráveis para a fidelidade do filamento e conseqüentemente da estrutura impressa (MU *et al.*, 2021); (LEE, Chi H.; MOTURI; LEE, 2009).

Figura 10. Curva para ensaio de tixotropia (3ITT)



Fonte: MU *et al.*, 2022

3.6 Fibroína de seda (FS)

A seda é um biopolímero de proteína encontrada na natureza, e é produzida em forma de fibras por artrópodes (como bichos da seda) e aracnídeos (aranhas, escorpiões e ácaros). Independentemente de sua origem, a seda é basicamente composta de proteínas, assim como polissacarídeos e lipídeos em quantidades mínimas. As fibras de seda que possuem maior aplicação na área biomédica são produzidas pela espécie *Bombyx mori*, ou comumente conhecida como bicho-da-seda, uma espécie de insetos lepidópteros, pertencente à família Bombycidae (BHATTACHARJEE *et al.*, 2017).

Os bichos-da-seda *Bombyx mori* passam por cinco estágios antes de sofrer metamorfose em uma mariposa. A seda é produzida em condições benignas no interior das glândulas produtoras de seda durante os primeiros estágios. No final do quinto estágio, ocorre um aumento na produção de seda pelas glândulas e as larvas tecem longos fios de seda crua para se abrigarem no interior de seus casulos (KOH *et al.*, 2015).

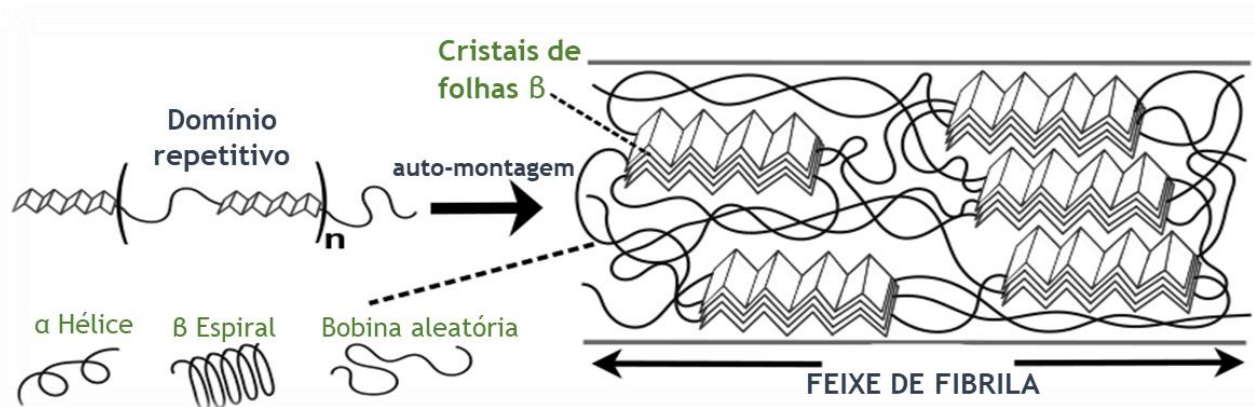
A fibra de seda de *B. mori* é composta por duas fibras paralelas de fibroína revestidas com uma camada de sericina. Enquanto que a sericina possui um aspecto de cola (propriedades adesivas) agregando os fios de fibras para formar o casulo, a fibroína é mais comercializada e corresponde a porção fibrosa da fibra de seda com excelentes propriedades mecânicas (KOH *et al.*, 2015); (BHATTACHARJEE *et al.*, 2017); (VEPARI; KAPLAN, 2007). Após a realização da remoção da sericina, as fibras FS podem ser dissolvidas e purificadas em uma solução aquosa através de diálise em água deionizada. (ROCKWOOD *et al.*, 2011); (WŁODARCZYK-BIEGUN; DEL CAMPO, 2017).

A fibroína da seda faz parte de um grupo de glicoproteínas solúveis e é constituída por polipeptídeos de cadeia leve (L) e de cadeia pesada (H) (VEPARI; KAPLAN, 2007). As cadeias leves, hidrofílicas, possuem massa atômica de aproximadamente 27,7 kDa, enquanto que as cadeias hidrofóbicas possuem massa de 391,6 kDa, ambas ligadas por uma ligação dissulfeto no terminal C da cadeia H (DORISHETTY; DUTTA; CHOUDHURY, 2020). As cadeias L por serem de menor tamanho, apresentam pouca função mecânica nas fibras de seda, em contrapartida as cadeias H formam cristalitos de folha β antiparalelos, estruturalmente responsáveis pelas propriedades mecânicas superiores. Esses cristalitos de folha beta estão organizados numa sequência de aminoácidos repetidos, junto às estruturas secundárias provenientes de interações químicas (pontes de hidrogênio, forças de van der Waals e interações

hidrofóbicas (KOH et al., 2015).

As repetições sequenciais dos aminoácidos são responsáveis por formar a estrutura primária da cadeia H. Para *Bombyx mori*, está configurado na sequência hexapeptídica GAGAGS. Esses blocos hidrofóbicos levam à formação de estruturas secundárias, por meio de fortes ligações de hidrogênio e interações hidrofóbicas ao longo da cadeia de proteína, que conferem cristalinidade (sequência ricas em alanina e glicina) e resistência mecânica para os fios de seda. Essas regiões cristalinas estão intercaladas com domínios amorfos de 30 a 40 aminoácidos de forma não- sequencial, resultando em propriedades elásticas para o material (KAPOOR; KUNDU, 2016); (DORISHETTY; DUTTA; CHOUDHURY, 2020).

Figura 11. Estrutura da fibroína da seda



Fonte: SARKAR, et al, 2019

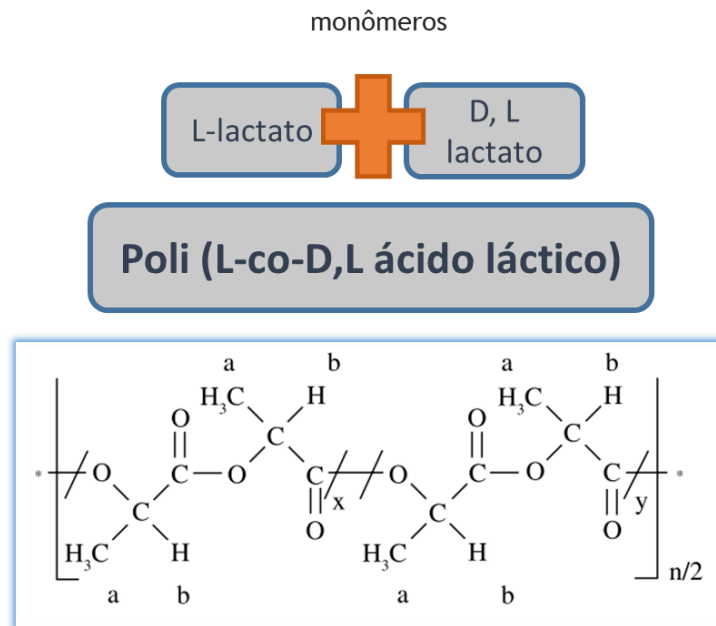
A fibroína da seda possui um longo histórico de aplicações clínicas e foi apta como biomaterial em 1993 pela Food and Drug Administration (FDA), sendo utilizada como suturas cirúrgicas devido a várias propriedades desejáveis. Em particular, essas propriedades incluem sua biocompatibilidade, a facilidade com que pode ser quimicamente modificada, sua baixa taxa de degradação in vivo e sua capacidade de ser processada em vários formatos de material a partir de solução aquosa ou solvente orgânico (MURPHY; KAPLAN, 2009) (VEPARI et al., 2010). Assim, a FS tem sido utilizada em várias aplicações, dentre estas destaca-se a área de regeneração óssea (MELKEA et al., 2016) (FAROKHI et al., 2018) (Xiaoyu Du et al., 2019) (REIZABAL et al., 2020).

3.7 Poli (L-co-D, L ácido láctico) – PLDLA

O Poli (L-co-D, L ácido láctico), PLDLA, é um copolímero da família dos poliésteres, com característica amorfa, biocompatível, biodegradável e biorreabsorvível. Este copolímero é originado do poli (ácido láctico) (PLA) é um poliéster sintético e alifático, alvo de muitos estudos em aplicações biomédicas devido à sua biocompatibilidade e bioreabsorvibilidade. O PLA existe em duas formas químicas específicas: Poli (ácido L-láctico) (PLLA) e poli (DL-ácido láctico) (PDLLA). O PLLA por exemplo, é um polímero amplamente estudado em aplicações biomédicas (CIAMBELLI *et al.*, 2013); (LEAL *et al.*, 2019)

O Poli (L-co-D, L ácido láctico) é obtido através de polimerização por abertura de anel pelos monômeros L-lactídeo e D, L lactídeo, na proporção de 70:30, respectivamente. Com isso, é possível de aliar suas particularidades, afim de serem combinadas para formar um copolímero com propriedades diferentes daquelas exibidas por cada um desses homopolímeros isolados. A vantagem do copolímero PLDLA é aliar as particularidades mecânicas inerentes ao poli (L-ácido láctico) sem o inconveniente do elevado tempo de degradação requerido por esse homopolímero, decorrente de sua alta cristalinidade. Isso é possível, pois o poli (D, L ácido láctico), ao contrário, apresenta maior taxa de degradação, apesar de possuir propriedades mecânicas aquém das do poli (L-ácido láctico). A figura 12 ilustra a estrutura química do PLDLA e seus monômeros (MOTTA; DUEK, 2007); (MCCARTHY *et al.*, 2013).

Figura 12. Estrutura química do copolímero PLDLA e seus monômeros



Fonte: MOTTA, DUEK et al., 2007

O resultado da copolimerização gera um polímero amorfo com taxa de degradação adequada, favorável para aplicação em engenharia de tecidos (mais especificamente em tecidos ósseos) e biocompatível, por não apresentar fragmentos cristalinos, o que poderia causar resposta inflamatória do tecido hospedeiro (MOTTA; DUEK, 2007). É importante salientar, também, que a presença do PLDLA na construção de um *scaffold*, tem como função acelerar o processo de degradação do mesmo, facilitando a sua integração com as células ósseas, uma vez que a medida que o arcabouço vai se degradando, haveria a migração dessas células para dentro da sua estrutura (DUBEY, N. *et al.*, 2020).

Devido a essas características, o PLDLA pode ser adequado para a impressão 3D de *scaffolds*, aliando suas características a polímeros naturais com a fibroína da seda, por exemplo, para compor formulações de tinta. Essa combinação pode resultar em um arcabouço específico para ser aplicado na forma de enxerto, atuando na regeneração tecidual óssea (MOUSER, V. H. *et al.*, 2020) (Holzl, K. *et al.*, 2016).

4 METODOLOGIA

4.1 Síntese do copolímero PLDLA

O copolímero L- ácido láctico e D, L ácido láctico (PLDLA) foi obtido por reação de polimerização em massa, por abertura de anel. Para a reação de polimerização foram escolhidos os monômeros L-lactato e D, L lactato (70:30), respectivamente e o catalisador 2-etilhexanoate de estanho II, conhecido como Sn (Oct)₂. Para a obtenção do PLDLA de alta massa molar a relação entre monômero/catalisador foi de aproximadamente 5000 vezes. Os monômeros e o catalisador foram devidamente pesados e transferidos para uma ampola de vidro, selada à vácuo e imersa em óleo a 130°C por 72h. Posteriormente foi adicionado clorofórmio (CHCl₃) para iniciar processo de dissolução do polímero por aproximadamente 4 dias. Decorrido esse tempo a solução viscosa foi coagulada em metanol (CH₃OH) e a massa polimérica foi disposta em placa de vidro em capela de exaustão, para evaporar o excesso de solvente. Após o processo de coagulação, o polímero foi seco na estufa a vácuo a 45°C por 8 horas. A massa final foi pesada e o polímero armazenado a vácuo para ser utilizado nos experimentos seguintes (MOTTA; DUEK, 2007).

4.2 Preparação da FS

A fibroína da seda foi gentilmente cedida pelo colaborador Prof. Dr. Cedric Dicko, da Universidade de Lund, Suécia, sendo obtida de fios de seda da espécie *Bombyx mori* seguindo um protocolo de extração padrão que consiste em 5 etapas: Degomagem, dissolução, diálise, centrifugação e liofilização.

Degomagem- Nesta etapa a fibra de seda foi submetida ao processo de remoção da sericina, uma das proteínas constituintes das fibras de seda que encapam os feixes de fibroína (HOU *et al.*, 2020); (ROCKWOOD *et al.*, 2011); (YAMADA *et al.*, 2001). As fibras de seda foram cortadas em pequenos pedaços e adicionadas a uma solução aquosa de Na₂CO₃ (0,2% m/v), já aquecida a 55°C e agitadas por 1 hora. Após esse tempo, as fibras foram lavadas abundantemente com água destilada, até que não houvesse resíduo esbranquiçado. Repetiu-se o procedimento de degomagem para uma remoção efetiva da sericina. Enfim, as fibras de seda foram secas na estufa a 50°C por 24h.

Dissolução- Para esta etapa, foi preparada 25 ml de solução de brometo de lítio (LiBr) (> 99% de pureza, Sigma Aldrich, Alemanha) a 9M utilizando água ultrapura. Todo o conteúdo da solução foi cuidadosamente despejado sobre 2,5g de fibras de seda dispostas em um béquer de vidro, até a sua completa dissolução. O aspecto foi de uma solução gelatinosa e amarelada. Após dissolver as fibras, a solução foi agitada e aquecida entre 65- 75°C, utilizando um agitador magnético por até 60 min até obter uma solução pouco viscosa, de aspecto transparente e levemente amarelada. Em seguida verteu-se a solução por uma peneira fina, para filtrar quaisquer partículas ou aglomerados que não foram dissolvidos no processo de regeneração. Após isso, o béquer contendo a solução foi deixado sobre uma bancada por 5 min para em seguida ser utilizado no processo de diálise.

Diálise- A diálise é importante nesse processo, para a remoção do LiBr e outros íons. Para isso, a solução foi transferida para uma membrana de celulose previamente lavada (15 cm x 2,5 cm dimensões), com corte de massa molar de 12.000,00 Da e dialisada em 2L de água durante 3 dias, com trocas regulares de água a cada 12 horas. Ao término, obteve-se uma solução quase translúcida com um resíduo turvo e coagulado. Foi possível retirar a porção coagulada do interior da membrana para facilitar o processo de centrifugação.

Centrifugação- A solução foi centrifugada em tubos falcon a 7500 rpm a 20°C durante 10min. O sobrenadante, que representa a porção de resíduo mais fluida, também foi coletado e descartado. Em alguns processos foi necessário centrifugar uma segunda vez, para a remoção completa de qualquer resíduo turvo da solução de fibroína. No final da centrifugação, obteve-se uma solução transparente e levemente viscosa, que foi congelada a -80 °C por 24h.

Liofilização- A solução foi então liofilizada por 48 h ou até que não houvesse traços de umidade no material. A obtenção da fibroína, resultou em um material leve, de cor branca, com textura semelhante a uma espuma, que foi armazenado em uma estufa a vácuo.

4.3 Preparação das soluções de FS-PLDLA

Inicialmente foram preparadas soluções de FS-PLDLA, em ácido fórmico (HCOOH) (> 88%, Synth, Brasil) variando as concentrações de FS e PLDLA, seguindo um experimento fatorial com dois fatores (FS e PLDLA) em estudo. Foram escolhidos seis níveis de concentração para o PLDLA (1,0%; 3,0%; 5,0%; 7,0%; 10,0%; 15,0%) e oito níveis de

concentração para a FS (0,5%; 1,0%; 3,0%; 5,0%; 7,0%; 10,0%; 15,0%; 20,0%) a fim de encontrar a/as formulações que apresentem o perfil reológico mais indicado para o processo de impressão 3D. As soluções foram preparadas, primeiramente dissolvendo a FS em ácido fórmico, mantendo em constante agitação por 24-72h (a depender da concentração de FS na solução), a 25°C. Seguiu-se da adição do PLDLA por 24h, ou até sua completa dissolução. As soluções foram então refrigeradas a 4°C até a sua utilização durante os ensaios reológicos.

4.4 Parâmetros reológicos

4.4.1 Soluções de PLDLA (1,0%; 3,0%; 5,0%; 7,0%; 10,0%; 15,0% [% m/v]), de FS (0,5%; 1,0%; 3,0%; 5,0%; 7,0%; 10,0%; 15,0% 20,0% [% m/v]) e formulações de FS/PLDLA

Para obtenção das propriedades reológicas do PLDLA e das misturas de PLDLA/FS, foi utilizado o Reômetro DHR-2, TA Instruments. O ensaio foi realizado a 25 °C, utilizando cone-placa como geometria, com diâmetro de 40 mm e espaçamento (gap) de 55 µm para as soluções de PLDLA e de FS. Para as misturas de PLDLA/FS foi utilizado placa-placa como geometria. Inicialmente foram realizadas medições em regime estacionário, a fim de obter as curvas de viscosidade, variando a taxa de cisalhamento entre 0,001 a 1000 s⁻¹. Posteriormente foram iniciados os ensaios em regime oscilatório, com testes de varredura de amplitude e de frequência. Para o ensaio de amplitude, variou-se a taxa de deformação entre 0,01 a 100%, a uma frequência angular constante, de 10 rad.s⁻¹, a fim de obter a região de viscoelasticidade linear (LVR) do gel e o ponto de fluxo (transição do comportamento *solid-like* (repouso) para o *liquid-like* (início de fluxo)). O valor de deformação na Região Viscoelástica Linear (LVR), foi utilizado para o teste varredura de frequência, variando entre 0,1 a 240 rad.s⁻¹, para obter os módulos de perda (G') e de armazenamento (G''). Enfim, foram realizados os ensaios de tixotropia em três intervalos (3ITT), para avaliar a recuperação de viscosidade das formulações. Para este ensaio, foram variados três valores de taxa de cisalhamento nos seus respectivos tempos: 1 s⁻¹ (25 s), 1000 s⁻¹ (50 s) e 1 s⁻¹ (400 s).

4.5 Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)

Foram obtidos os espectros de absorção na região do infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR) do PLDLA puro e da FS pura, no espectrofotômetro Perkin Elmer, modelo Spectrum 65, com resolução de 4 cm⁻¹, na região compreendida entre 4.000 a 600 cm⁻¹, utilizando a técnica de refletância total atenuada (ATR) com cristal de ZnSe.

4.6 Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC)

A calorimetria exploratória diferencial foi realizada no equipamento TA Instruments[®], modelo DSC 25. As amostras de PLDLA puro e FS pura com aproximadamente 10 mg, foram aquecidas de 25 a 200°C, mantidas por 5 minutos a 200°C, resfriadas até -50°C, mantidas por 5 minutos, sendo a seguir reaquecidas até 200°C, sob atmosfera de N₂. A taxa de aquecimento e resfriamento, em todas as etapas, foi de 10°C.min⁻¹.

4.7 Termogravimetria (TG)

As análises termogravimétricas (TG) foram realizadas no equipamento TGA 55 – linha Discovery (TA Instruments, Inc). As amostras de PLDLA puro e FS pura foram colocadas em um cadinho de platina e outro cadinho vazio foi usado como referência. As amostras foram aquecidas da temperatura ambiente a 500 ° C em um fluxo de 50 mL/ min de nitrogênio a uma taxa de aquecimento de 10 ° C/min.

4.8 Impressão do arcabouço 3D de FS/PLDLA*²

Os arcabouços foram impressos utilizando uma impressora 3D Biotechnology Solutions, modelo OctopusTM. As formulações escolhidas de FS/PLDLA foram armazenadas em seringas de 5ml, utilizando agulhas com diâmetro de 0,7 mm por 25 mm de comprimento. Os parâmetros de impressão como velocidade de impressão, força de vazão e temperatura do sistema são ajustados no software de comando da impressora. O projeto do arcabouço foi baseado em Kondiah et al., 2020, voltado especificamente para o reparo ósseo, por meio da entrega controlada de sinvastatina. O desenho do arcabouço foi projetado no software de fatiamento Slic3r apresentando as seguintes dimensões: 4,2 mm (altura) x 16 mm (diâmetro); 7 (camadas) x 0,5 mm (altura). A deposição de filamentos na parte interna em padrão de grade, com o intuito de criar um arcabouço com poros. Os arcabouços foram impressos em

² PLDLA*- Significa que o PLDLA está sendo adicionado na solução de FS. Ou seja, as adições/variações de PLDLA ocorrem na (s) solução (ões) de FS.

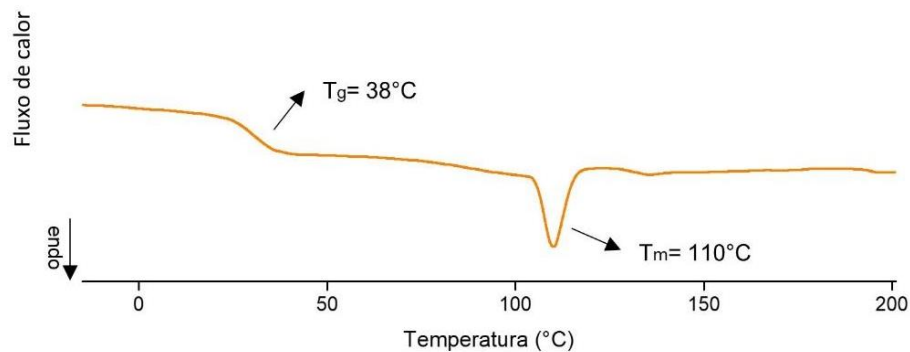
temperatura de 25°C. Após a impressão, os arcabouços foram imersos em solução de etanol 70,0% durante 30 min para reticular. Passado esse tempo, os arcabouços foram lavados em água destilada para retirar o resquício de etanol. Esse método de reticulação foi aplicado com sucesso, na literatura, em hidrogéis de fibroína. Para a reticulação dos arcabouços FS/PLDLA, a solução de etanol a 70,0% foi suficiente para induzir à reticulação (KAEWPIROM; BOONSANG, 2020); (TERADA *et al.*, 2016).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC)

A Figura 13 ilustra a curva de DSC do PLDLA puro. Foi possível identificar a temperatura de transição vítrea (T_g) em 38°C , assim como um pico endotérmico (T_m) a 110°C , relacionado à fusão cristalina desse polímero. A presença deste pico endotérmico pode ocorrer em razão de uma menor massa molar desse polímero, o que poderia conduzir a organização das cadeias poliméricas (MOTTA; DUEK, 2007).

Figura 13. Curva de DSC do PLDLA puro

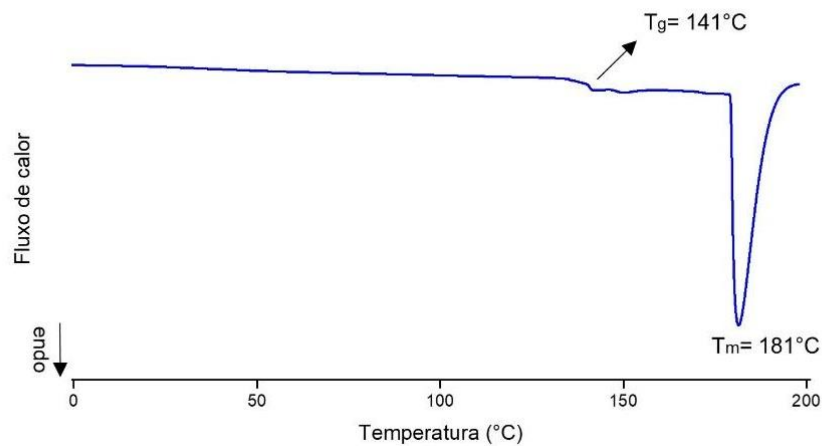


Fonte: ELABORADA PELO AUTOR, 2022

A Figura 14 ilustra a curva de DSC da FS pura. A temperatura de transição vítrea (T_g) para a FS ocorreu a 141°C , assim como foi possível observar um pico endotérmico a 181°C , atribuído ao ponto de fusão (T_m) da FS. Apesar da curva de DSC, deste trabalho, ter ido até 200°C , trabalhos na literatura relatam que a degradação térmica da FS acontece em aproximadamente 279°C , decorrente da transformação das estruturas amorfas instáveis em cristais de folha beta (LILIANA MEJÍA-SUAZA *et al.*, 2020); (WANG *et al.*, 2019); (ARAÚJO, *et al.*, 2018).

Figura 14. Curva de DSC da FS pura.

Fonte: ELABORADA PELO AUTOR, 2022.



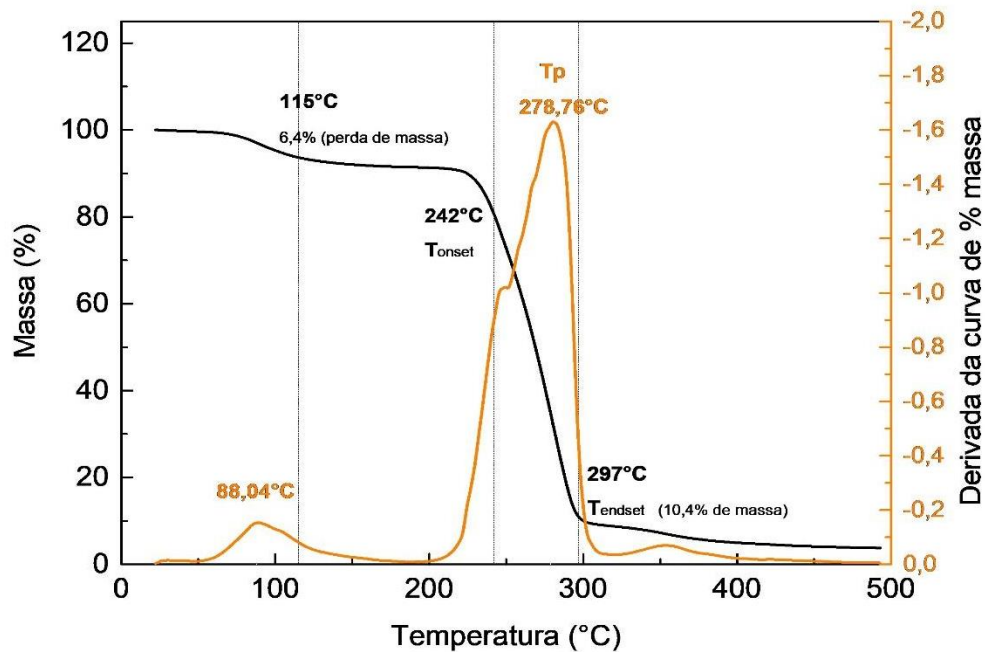
5.2 Termogravimetria (TG)

A Figura 15 ilustra a curva termogravimétrica do PLDLA puro. Observou-se dois eventos na curva de perda de massa. O primeiro evento de perda de massa, com T_{onset} próximo a 71,0°C, é atribuído a evaporação do solvente metanol, apresentando perda de massa de aproximadamente 6,4%. O segundo evento está relacionado à degradação térmica da amostra, onde a T_{onset} ocorreu a 242,0°C, com 10,4% de amostra residual no final do teste. Foi observado que a temperatura T_{onset} foi relativamente menor quando comparada a outros estudos relacionados a sínteses de PLDLA (MOTTA; DUEK, 2007).

Assim, esta diferença pode estar relacionada com o índice de polidispersão (IP) do PLDLA utilizado neste trabalho ($M_w/M_n=1,28$), que está mais próximo de 1, que pode ser diferente a de outros trabalhos relatados na literatura. Dessa maneira, o IP do PLDLA utilizado neste trabalho indica que as cadeias possuem tamanhos semelhantes em sua formação, ou seja,

apresentando maior homogeneidade entre as cadeias poliméricas e consequentemente faz com que a degradação térmica do material ocorra em temperaturas menores (BARAÚNA *et al.*, 2007).

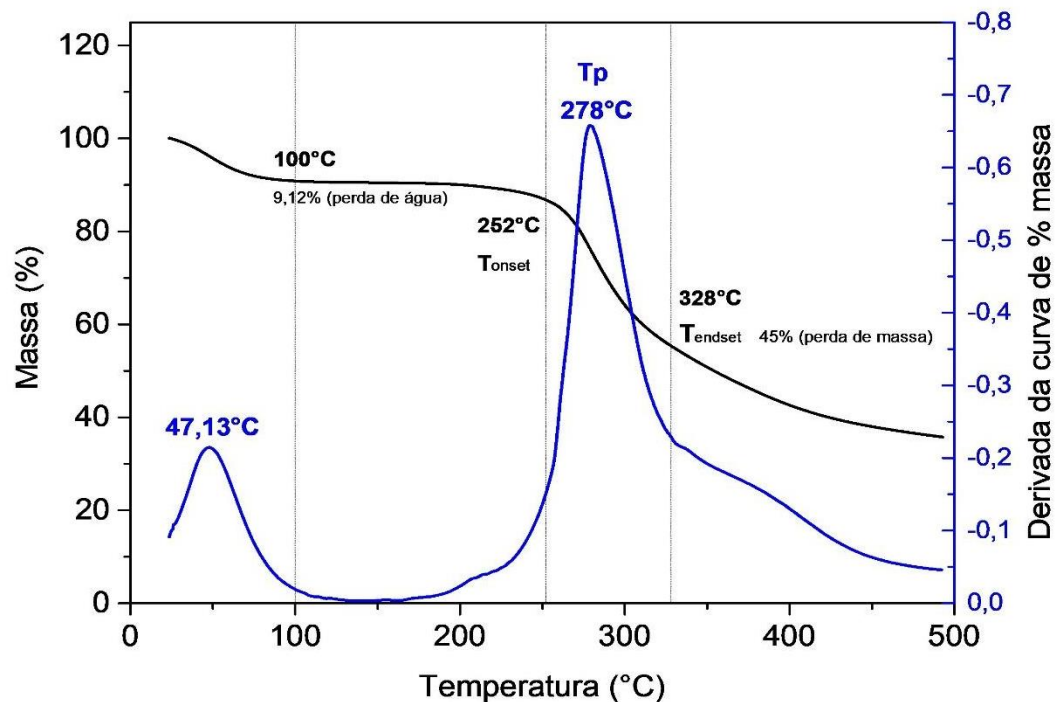
Figura 15. Curva termogravimétrica do PLDLA puro.



Fonte: ELABORADA PELO AUTOR, 2022.

A Figura 16 ilustra a curva termogravimétrica da FS pura. A primeira etapa de perda de massa ocorre por volta de 90°C, sendo atribuída a evaporação de água, apresentando uma perda de massa de aproximadamente 9,0%. A segunda etapa de perda de massa tem início próximo a 252°C (T_{onset}) e pode ser atribuída à degradação térmica da FS, devido à decomposição das ligações peptídicas das amidas (BARAÚNA *et al.*, 2007).

Figura 16. Curva termogravimétrica da FS pura

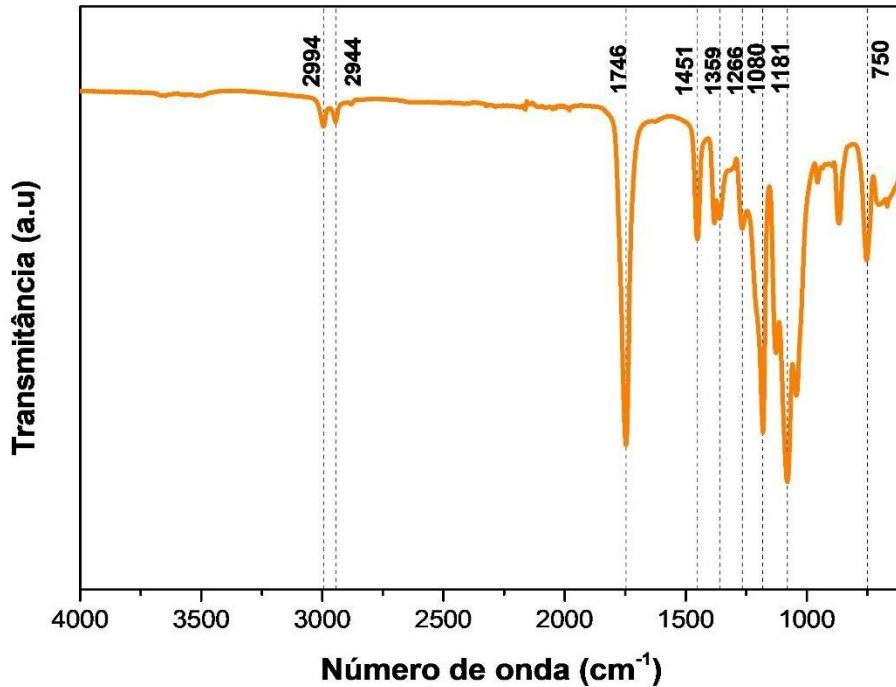


Fonte: ELABORADA PELO AUTOR, 2022.

5.3 Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)

A Figura 17 mostra o espectro de FTIR do PLDLA. As bandas em 2294 e 2944 cm^{-1} estão associadas às deformações axiais simétricas do grupo CH_2 e assimétricas do grupo CH_3 . A banda em 1746 cm^{-1} corresponde à deformação axial do grupo carbonila ($\text{C}=\text{O}$), característico dos poliésteres (LEAL *et al.*, 2019). Em 1450 e 1360 cm^{-1} ocorrem deformações angulares de grupos CH_3 . Em 1266 e 1081 cm^{-1} notam-se bandas polilactídicas características ao estiramento $=\text{C}-\text{O}$. Observa-se em 1181 cm^{-1} , um pico característico da ligação $\text{C}-\text{C}$ e em 750 cm^{-1} , relacionado ao CH .

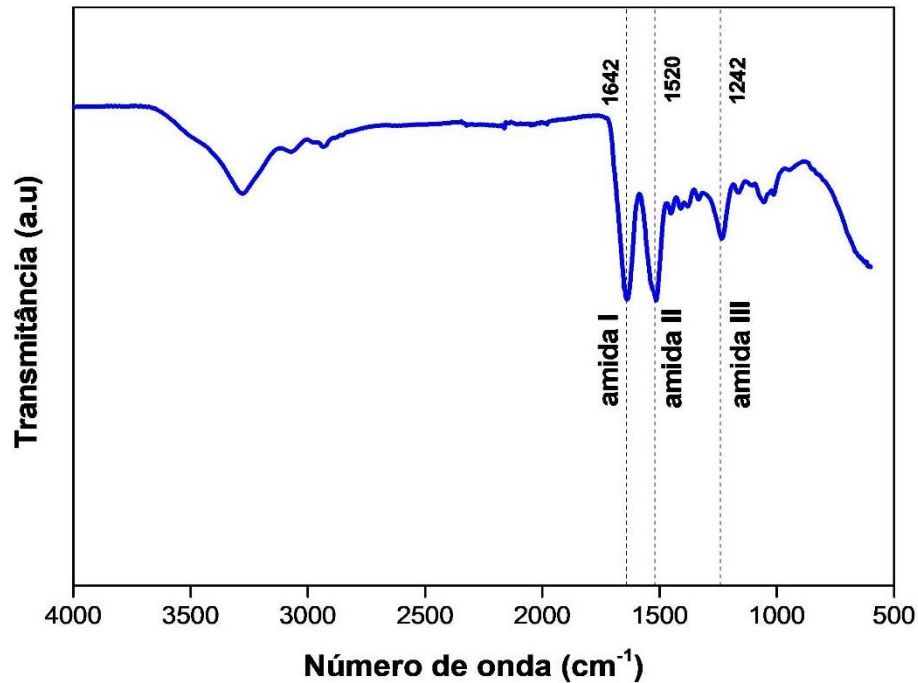
Figura 17. Espectro de FTIR do PLDLA puro



Fonte: ELABORADA PELO AUTOR, 2022.

A Figura 18 mostra o espectro de FTIR da FS pura. De acordo com Araújo, *et al.*, 2018, é possível identificar, para a fibroína obtida por dissolução em solução de brometo de lítio (LiBr), principais bandas correspondentes a essa proteína: em 1642 cm^{-1} referente a vibração da ligação C=O da amida I; em 1520 cm^{-1} correspondente à vibração referente à amida II, estando relacionada à vibração angular no plano do grupo N-H (60%) e pelo estiramento C-N (40%). E por fim, a banda em 1242 cm^{-1} referente à amida III resulta da combinação das vibrações de estiramento do N-C e de flexão do grupo C=O, estando relacionada à conformação de folha- β (ZHENG *et al.*, 2018) (ARANHA *et al.*, 2018)

Figura 18. Espectro de FTIR da FS pura



Fonte: ELABORADA PELO AUTOR, 2022.

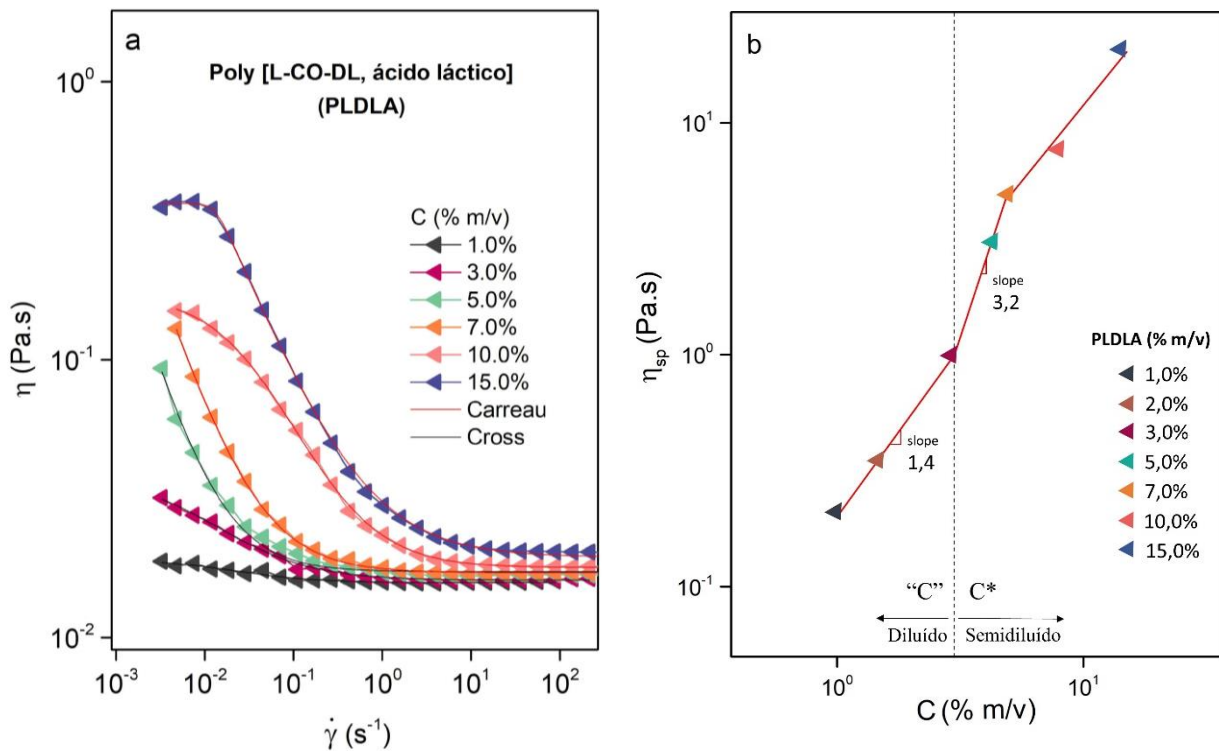
5.4 Perfil reológico das soluções de PLDLA e FS

A Figura 19a ilustra as curvas de viscosidade em função da taxa de cisalhamento para as soluções de PLDLA. As concentrações de 1.0% e 3.0% apresentaram pouca variação no valor da viscosidade, com um comportamento praticamente newtoniano desde as baixas até as altas taxas de cisalhamento. Já nas concentrações de 5.0, 7.0, 10 e 15% foi observado regiões pseudoplásticas, com redução nos valores de viscosidade, a partir de baixas taxas de cisalhamento. Conforme o aumento nas taxas de cisalhamento, as soluções apresentaram um 2º platô newtoniano, onde atingiram a deformação máxima, fazendo com que a viscosidade alcançasse um valor estável.

Isto acontece, pois, ao aumentar as taxas de cisalhamento, ocorre o desemaranhamento das cadeias poliméricas, reduzindo, assim, a resistência ao fluxo das cadeias poliméricas em direção ao escoamento. Após valores mais elevados da taxa de cisalhamento (acima de 10^0 s^{-1}) a viscosidade não variou mais, adotando uma conformação de cadeias alinhadas. De acordo

com o modelo de Carreau, este parâmetro é denominado de viscosidade de cisalhamento ao infinito (η_{∞}), onde a viscosidade alcança um valor fixo, independente do aumento da taxa de cisalhamento. As soluções de PLDLA a partir de 5.0% tiveram a viscosidade diminuída sob mínimas tensões submetidas, não resistindo às altas taxas de cisalhamento. Simulando o processo de extrusão, todas as soluções de PLDLA na faixa de concentração estudadas, não resistiriam à maior força de extrusão, gotejando a solução pela agulha da seringa.

Figura 19. Ensaio reológico de soluções de PLDLA em diferentes concentrações (1.0; 3.0; 5.0; 7.0; 10.0 e 15.0%). a) Viscosidade vs taxa de cisalhamento. b) Viscosidade específica vs Concentração.



Fonte: ELABORADA PELO AUTOR, 2022.

Além da obtenção das curvas de viscosidade, foi necessário aplicar modelos matemáticos, para ajustar os resultados à curva característica, inerente aos materiais pseudoplásticos. Os modelos utilizados foram o de Cross, que se adequou nas soluções de 1.0, 3.0 e 5.0% e o de Carreau, melhor ajustado nas soluções de 7.0, 10.0 e 15.0%. Os parâmetros de ajuste foram organizados na tabela 3 abaixo:

Tabela 3. Parâmetros de ajuste ao modelo de Carreau a e Cross para as curvas de PLDLA

| | C (% m/v) | η_0 (Pa.s) | η_∞ (Pa.s) | n | R ² |
|-----------------------|-----------|-----------------|----------------------|--------|----------------|
| Carreau-Yasuda | 1,0% | 0,01913 | 0,01579 | 0,9999 | 0,99 |
| | 3,0% | 0,02131 | 0,01613 | 0,9280 | 0,99 |
| | 5,0% | 0,07508 | 0,01726 | 0,8280 | 0,99 |
| | 7,0% | 0,08125 | 0,01743 | 0,8332 | 0,99 |
| | C (% m/v) | η_0 (Pa.s) | η_∞ (Pa.s) | n | R ² |
| Cross | 10,0% | 0,08858 | 0,01780 | 0,8001 | 0,99 |
| | 15,0% | 2,35625 | 0,01948 | 0,7834 | 0,99 |

Fonte: ELABORADA PELO AUTOR, 2022.

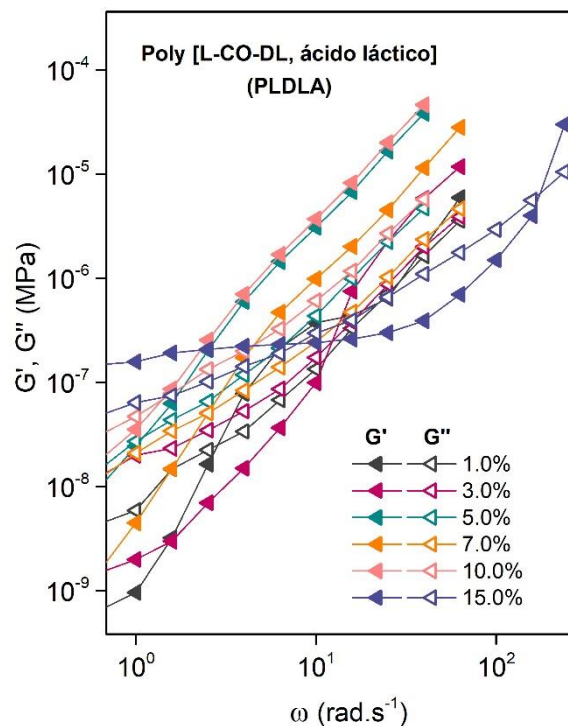
De acordo com a tabela 3 foi possível observar um aumento nos valores de viscosidade (η_0) conforme o aumento da concentração. Porém nas soluções de PLDLA em concentrações de 3.0% para 5.0% e 10.0% para 15.0%, houve um aumento pronunciado no valor da viscosidade. Para explicar este aumento significativo e também a relação do aumento da η_0 com o aumento da concentração, foi plotado um gráfico de logaritmo duplo pelo método de Verbeeten, de viscosidade específica (η_{sp}) em função da concentração demonstrado na figura 19.b (VERBEETEN, 2010).

Foi observado que o aumento de η_0 nas soluções de PLDLA em concentrações de 3.0% para 5.0% e 10.0% para 15.0%, pode ser explicado com base na teoria de polímeros neutros em solução, onde adota-se dois regimes de concentração distintos: O regime diluído (“C”), situação na qual as cadeias estão separadas em maior mobilidade, justamente por estarem em menor quantidade em relação à quantidade de solvente; e o regime semidiluído (C*), situação na qual iniciam-se as sobreposições das cadeias poliméricas devido ao maior espaço que elas ocupam no solvente, restringindo sua mobilidade. A transição dos regimes “C” para C* é evidenciado pela mudança de inclinação na reta de 1,4 (“C”) para 3,2 (C*). As duas regiões lineares $\eta_{sp} \sim C^{1,4}$ (“C”) e $\eta_{sp} \sim C^{3,2}$ (C*) observadas, ficaram próximas à lei de escala física para polímeros neutros em solução, onde os limiares são: $\eta_{sp} \sim C^{1,0-1,5}$ (“C”) e $\eta_{sp} \sim C^{3,5-4,5}$ (C*) (KONG *et al.*, 2021); (YU *et al.*, 2014); (COLBY, 2010).

Para investigar as propriedades viscoelásticas das soluções de PLDLA, foi realizado um ensaio de frequência, dos módulos G' , G'' em função da frequência angular. As curvas foram plotadas a partir do valor de deformação (em porcentagem %) na região de LVR, antes de

ocorrer a tensão de escoamento (σ_y). A Figura 20 ilustra as curvas em regime oscilatório para as soluções de PLDLA a 1,0%, 3,0%, 5,0%, 7,0%, 10,0% e 15,0%. Nas soluções de 1,0% a 10,0% de PLDLA, o ponto de gelificação ($G' > G''$), ocorre em frequências mais baixas. Somente na solução de 15,0% de PLDLA o ponto de cruzamento de G'' para G' ocorre em altas frequências. Isto ocorre, porque a solução de 15,0% além de possuir o maior valor de viscosidade em relação às Isto ocorre, porque a solução de 15,0% além de possuir o maior valor de viscosidade em relação às outras concentrações estudadas, as cadeias (C^*) estão mais sobrepostas, resistindo aos movimentos oscilatórios em baixas frequências ao assumir um caráter viscoso ($G'' > G'$), com armazenamento de energia em altas frequências, prevalecendo um caráter predominantemente elástico ($G' > G''$) (COLBY, 2010) (RUSSO, 2013).

Figura 20. Ensaio de frequência angular em regime oscilatório de soluções de PLDLA em diferentes concentrações (1,0; 3,0; 5,0; 7,0; 10,0 e 15,0 %). Módulos de perda (G'') e armazenamento (G') vs frequência angular

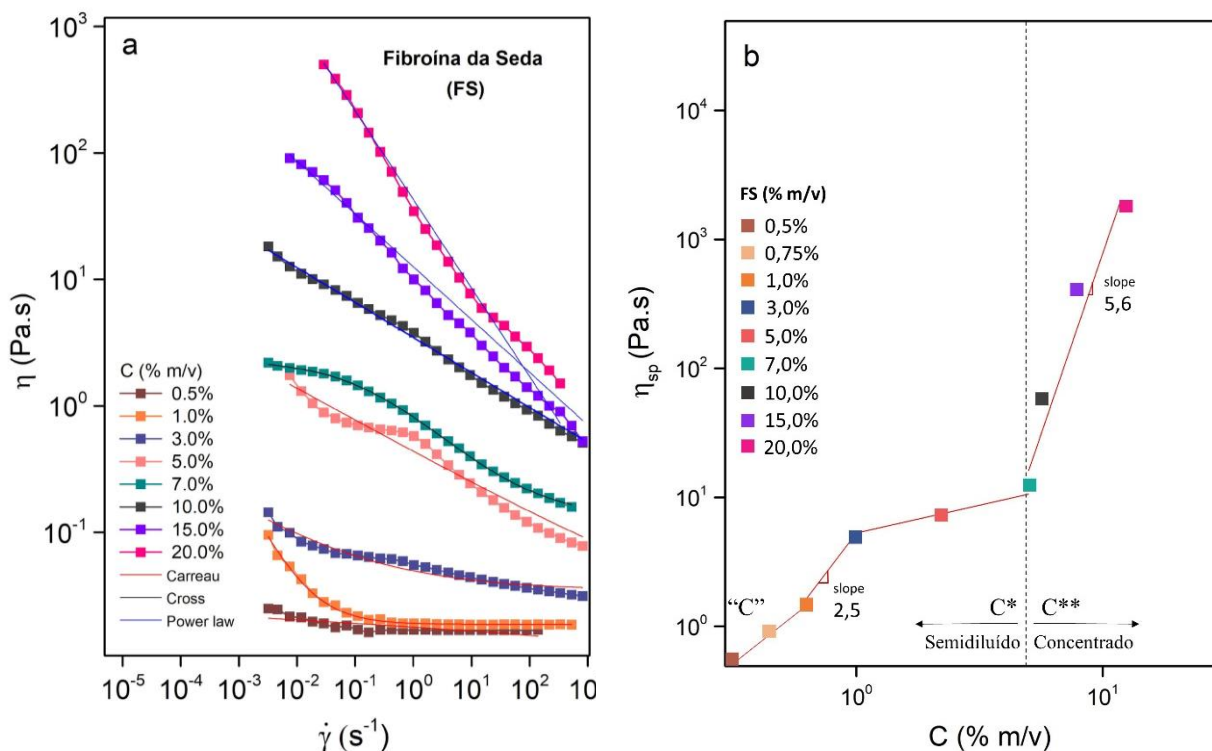


Fonte: ELABORADA PELO AUTOR, 2022.

A Figura 21a ilustra as curvas de viscosidade em função da taxa de cisalhamento para as soluções de FS. A concentração de 0,5% apresentou pouca variação no valor da viscosidade, com um comportamento praticamente newtoniano desde as baixas até as altas taxas de cisalhamento. Nas concentrações de 1,0 e 3,0% foi observado pouca queda no valor da viscosidade em baixas taxas de cisalhamento, com região pseudoplástica pouco destacada. A partir das concentrações de 5,0% até 20,0%, foi possível observar uma evidente mudança no comportamento da curva, apresentando quedas abruptas no valor da viscosidade desde baixas até altas taxas de cisalhamento.

As regiões pseudoplásticas bem evidenciadas, sugerem que o aumento na concentração de FS resultou em maior formação de folhas beta antiparalelas que possuem regiões cristalinas, conferindo alta resistência mecânica. A formação dessas redes estruturadas exige aplicação de altas taxas de cisalhamento, para que ocorra o desemaranhamento e alinhamento das cadeias em direção ao fluxo.

Figura 21. Ensaio reológico de soluções de FS em diferentes concentrações (0,5%; 1,0%; 3,0%; 5,0%; 7,0%; 10,0%; 15,0%; 20,0%). a) Viscosidade vs taxa de cisalhamento. b) Viscosidade específica vs Concentração



Fonte: ELABORADA PELO AUTOR, 2022.

Além da obtenção das curvas de viscosidade, foi necessário aplicar modelos matemáticos, para ajustar os resultados à curva característica, inerente aos materiais pseudoplásticos. Para os ajustes das curvas das soluções de FS, foram utilizados três modelos, ajustando-se às suas respectivas concentrações: Modelo de Carreau para as soluções de 0,5%, 1,0%, 3,0% e 5,0% de FS; Modelo de Cross para a solução de 7,0% de FS; e por fim o Modelo de Power Law que melhor se ajustou nas soluções de concentração 10,0%, 15,0% e 20,0% de FS. Os parâmetros de ajuste foram organizados na tabela 4 abaixo:

Tabela 4. Parâmetros de ajuste ao modelo de Carreau, Cross e Power-Law para as curvas de FS

| | C (% m/v) | η_0 (Pa.s) | η_∞ (Pa.s) | n | R ² |
|-----------------------|-----------|-----------------|----------------------|----------------|----------------|
| Carreau-Yasuda | 0,5% | 0,01817 | 0,01735 | 1 | |
| | 1,0% | 0,35742 | 0,01871 | 0,9668 | 0,99 |
| | 3,0% | 0,68616 | 0,03487 | 0,91361 | 0,94 |
| | 5,0% | 2,33617 | 0,13111 | 0,80674 | 0,94 |
| Cross | C (% m/v) | η_0 | η_∞ | n | R ² |
| | 7,0% | 3,46937 | 0,01551 | 0,53258 | 0,99 |
| Power-Law | C (% m/v) | m | n | R ² | |
| | 10,0% | 6,46937 | 0,72337 | 0,99 | |
| | 15,0% | 12,62028 | 0,58263 | 0,99 | |
| | 20,0% | 43,01659 | 0,29973 | 0,99 | |

Fonte: ELABORADA PELO AUTOR, 2022.

De acordo com a tabela 4 foi possível observar uma dependência do aumento da viscosidade (η_0) pelo aumento da concentração. No entanto, ao aumentar a concentração de 3,0% para 5,0% de FS, a mudança no valor de η_0 na solução de 5,0% de FS foi 3 vezes maior em relação ao valor de viscosidade da solução de 3,0% de FS. Outro momento de mudança brusca no valor de η_0 , ocorreu no aumento de concentração de 15,0% para 20,0% de FS. Desta vez a diferença de valor de η_0 foi até 4 vezes maior em relação ao valor de η_0 da solução de 15,0% de FS. Para investigar a mudança abrupta nestes valores de viscosidade (η_0) e também a relação do aumento da η_0 com o aumento da concentração, foi plotado um gráfico de logaritmo

duplo, utilizando novamente o método de Verbeeten, de viscosidade específica (η_{sp}) em função da concentração, demonstrado na figura 21.b (VERBEETEN, 2010).

Foi então observado que o aumento de η_0 nas soluções de FS em concentrações de 3.0% para 5.0% e 15.0% para 20.0%, pode ser explicado com base na teoria de polímeros neutros em solução, onde adota-se dois regimes de concentração distintos: O regime semi diluído (C^*), situação na qual iniciam-se as sobreposições das cadeias poliméricas devido ao maior espaço que elas ocupam no solvente, restringindo sua mobilidade; e o regime concentrado (C^{**}), situação onde ocorrem os emaranhamentos das cadeias poliméricas ou a formação de aglomerados (folhas β) no caso solução de FS, em valores significativamente maiores do que em C^* .

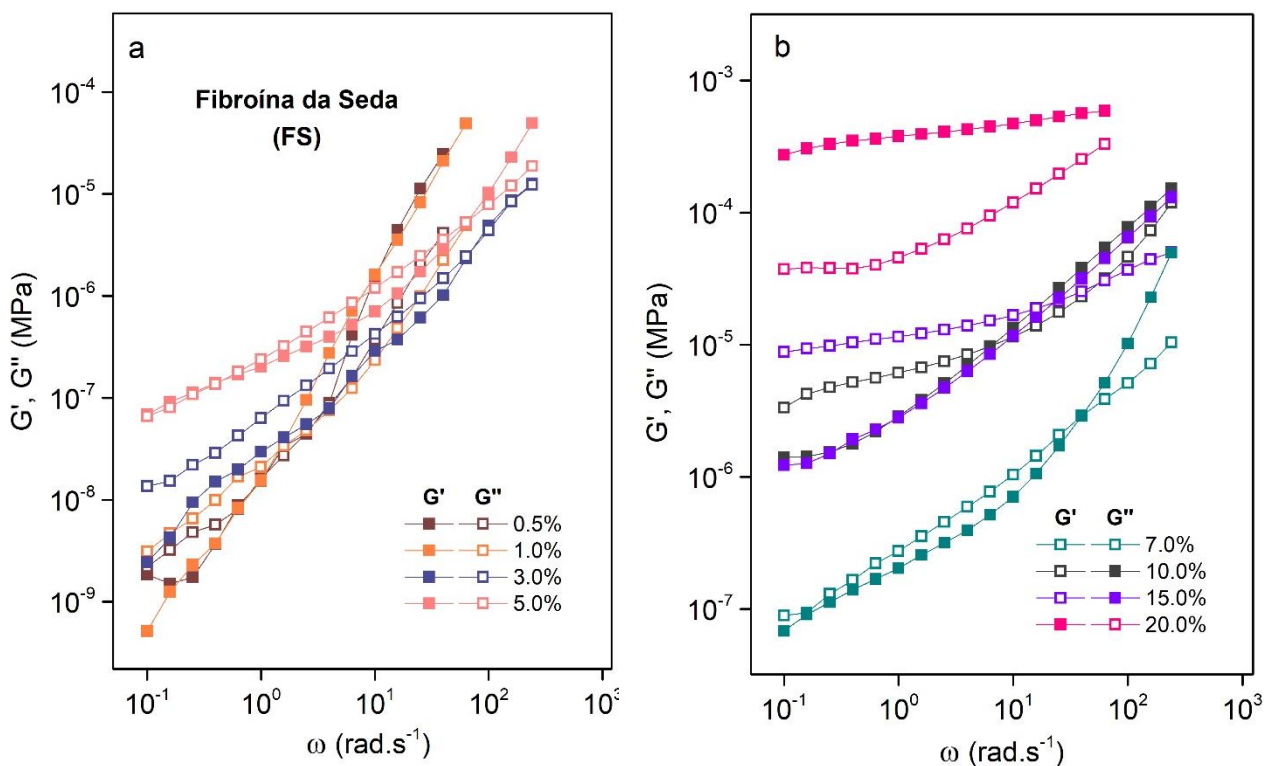
Na transição do regime semidiluído para o emaranhado a mudança é abrupta, sendo aproximadamente em 3º fator no expoente da lei de potência, para a dependência da concentração da viscosidade na concentração de emaranhamento (C^{**}) (KONG *et al.*, 2021) (COLBY, 2010). Isto explica a mudança brusca nos valores de viscosidade entre as concentrações de FS de 3,0% para 5,0%. A transição dos regimes C^* para C^{**} é evidenciado pela mudança crescente do valor da inclinação da reta de 2,5 (C^*) para 5,6 (C^{**}). As duas regiões lineares identificadas $\eta_{sp} \sim C^{2,5}$ (C^*) e $\eta_{sp} \sim C^{5,6}$ (C^{**}) observadas, ficaram próximas à lei de escala física para polímeros neutros em solução, onde os limiares são: $\eta_{sp} \sim C^{1,0-1,5}$ (“ C ”) e $\eta_{sp} \sim C^{3,5-4,5}$ (C^*) (KONG *et al.*, 2021); (YU *et al.*, 2014); (COLBY, 2010).

Para investigar as propriedades viscoelásticas das soluções de FS, foi realizado um ensaio de frequência, dos módulos G' , G'' em função da frequência angular. As Figuras 22a e 22b ilustram as curvas em regime oscilatório para as soluções de FS a 0,5%, 1,0%, 3,0% e 5,0%, 7,0%, 10,0%, 15,0% e 20,0%. Nas soluções de 0,5% e 3,0% o ponto de cruzamento do módulo de perda para o módulo de armazenamento ($G' > G''$) ocorreu em frequências menores, abaixo da frequência angular de 10^1 rad.s^{-1} . Com o aumento da concentração, nas soluções de 5,0% e 7,0% o ponto de cruzamento ($G' > G''$) foi deslocado para frequências maiores, acima da frequência angular de 10^1 rad.s^{-1} . A transição de $G' > G''$ demonstra um caráter predominantemente elástico, com armazenamento de energia diante os movimentos oscilatórios aplicados, fazendo com que ocorresse um emaranhamento das cadeias.

Já as soluções de 7,0%, 10,0% e 15,0% apresentaram o módulo de perda maior que o módulo de armazenamento ($G'' > G'$) em baixas frequências, assumindo um comportamento

de líquido viscoso, e uma transição onde o módulo de armazenamento foi maior que o módulo de perda ($G' > G''$), assumindo um caráter de sólido elástico. E por fim, na solução de 20,0% de FS, o módulo de armazenamento foi maior que o módulo de perda ($G' > G''$) durante todo o intervalo de frequência escolhido para realizar o ensaio. Isto sugere que a solução nesta concentração possui uma característica de gel.

Figura 22. Ensaio de frequência angular em regime oscilatório de soluções de FS em diferentes concentrações (0.5; 1.0; 3.0; 5.0; 7.0; 10.0 e 15.0 e 20.0%). Módulos de perda (G'') e armazenamento (G') vs frequência angular

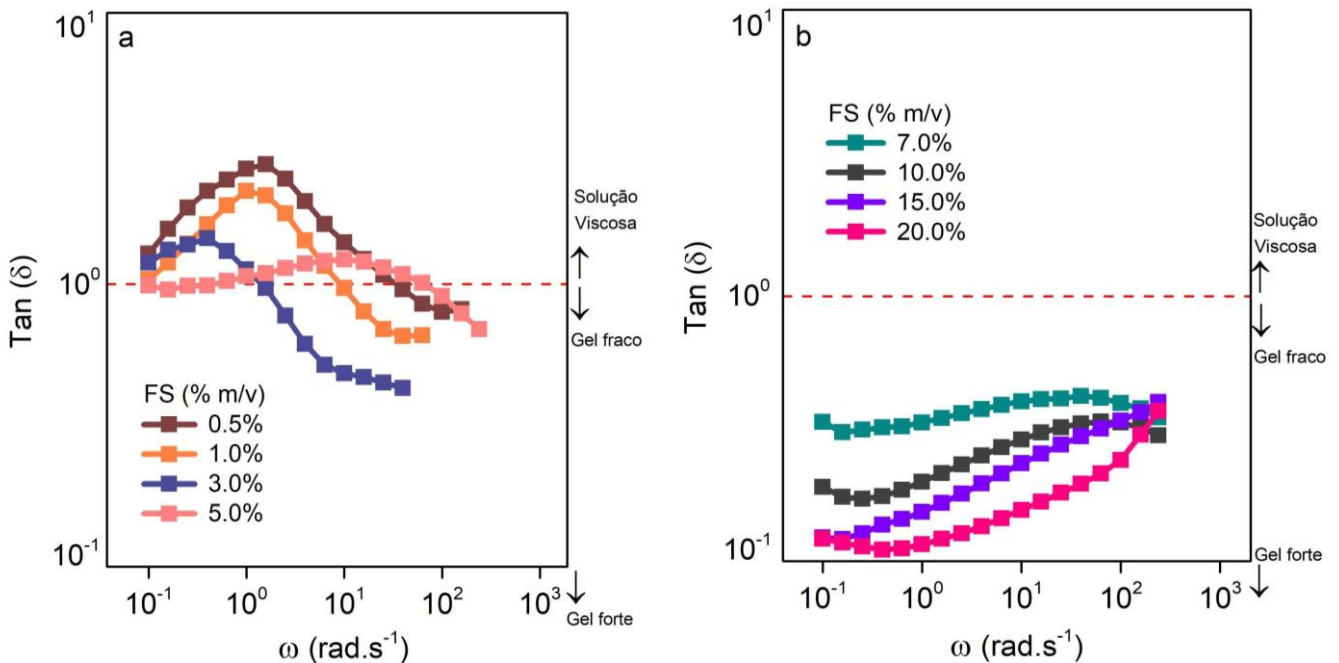


Fonte; ELABORADA PELO AUTOR, 2022

As figuras 23a e 23b mostram as curvas do fator de amortecimento ($\tan \delta = G''/G'$) em função da frequência angular. Este tipo de ensaio analisa o comportamento de uma solução, que pode ser do tipo líquida, indicando um caráter viscoso ($\tan \delta > 1$) ou do tipo sólida, com um caráter predominantemente elástico ($\tan \delta < 1$) (XIN *et al.*, 2004). Na figura 23a, as soluções de FS, nas concentrações de 0,5% a 5,0%, apresentaram um fator de amortecimento de $\tan \delta > 1$, indicando que essas soluções comportam-se como líquidos viscosos. Já na figura 23b, as soluções de FS nas concentrações de 7,0% a 20,0%, apresentaram um valor de $\tan \delta > 1$,

indicando a formação de géis fracos. Através da caracterização das soluções de FS, foi possível fazer uma escolha das concentrações que seriam avaliadas nos ensaios posteriores, adicionando quantidades de PLDLA. Foram, então, escolhidas as soluções nas concentrações de 10,0%, 15,0% e 20,0%, pelo motivo de estarem em regime C**, próximo da linha onde começam a formação de géis fortes ($\tan \delta > 10^{-1}$), por meio do aumento de folhas beta (β) antiparalelas, fornecendo uma base estrutural para a impressão do arcaçoço.

Figura 23. Fator de amortecimento ($\tan \delta$) vs frequência angular para as soluções de FS nas concentrações: a) 0,5%; 1,0%; 3,0%; 5,0% b) 7,0%; 10,0%, 15,0%; 20,0%



Fonte: ELABORADA PELO AUTOR, 2022

5.6 Adição de PLDLA em soluções de FS

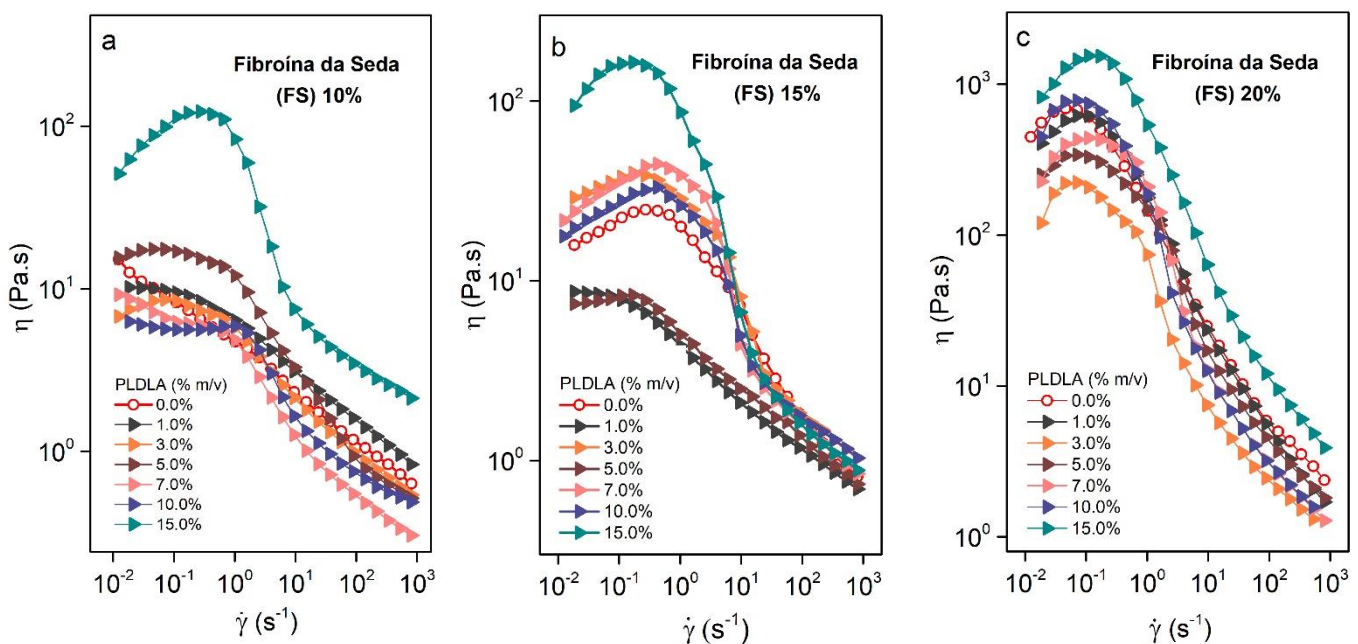
A Figura 24 ilustra as curvas de viscosidade em função da taxa de cisalhamento em regime permanente, para as soluções de FS de 10,0%, 15,0% e 20,0%, com adições de PLDLA (1,0%; 3,0%; 5,0%; 7,0%; 10,0%; 15,0%).

Na figura 24a, foi possível observar a influência das adições de PLDLA sobre a solução de FS 10,0%, com mudança de comportamento da curva, revelando regiões de platô newtoniano em baixas taxas de cisalhamento e regiões pseudoplásticas bem definidas em taxas de

cisalhamento mais altas. Além disso, foi observado uma relação entre o aumento da concentração de PLDLA com a diminuição no valor de viscosidade (η) na solução de FS 10,0%.

Com o aumento na concentração de PLDLA houve também um aumento na formação de cadeias livres, transitando entre as folhas beta (β) antiparalelas da FS, inibindo o efeito de viscosidade da solução de FS 10,0% com diminuição no valor de η (WANG et al., 2019). Também foi possível observar uma relação direta do aumento da concentração de PLDLA com o aumento nos valores de η na solução de FS 10,0%. Isto ocorreu durante o aumento de concentração de PLDLA de 3,0% para 5,0% e de 10,0% para 15,0% relacionado à transição para o regime semidiluído (C^*), que por sua vez possuem cadeias sobrepostas de PLDLA que interagem com os cristais de folha beta (β) da solução de FS 10,0% em regime concentrado C^{**} , promovendo um aumento no valor de η (COLBY, 2010). As relações do aumento da concentração de PLDLA em razão do aumento/diminuição dos valores de η , ocorreram devido à interação das cadeias poliméricas do PLDLA com as folhas β da solução de FS 10,0%, que são constantemente reorganizadas a cada adição em massa de PLDLA, influenciando em valores maiores ou menores em η .

Figura 24. Curvas de viscosidade vs taxa de cisalhamento para soluções de FS com adições de PLDLA. a) FS 10,0%; b) FS 15,0%; c) FS 20,0%



Fonte: ELABORADA PELO AUTOR, 2022.

Na figura 24b, as adições de PLDLA de 1,0% e 5,0% apresentaram um comportamento de curva com platô newtoniano em baixas taxas de cisalhamento (10^{-2} a 10^{-1} s $^{-1}$) com regiões pseudoplásticas em altas taxas de cisalhamento (10^0 a 10^3 s $^{-1}$). Para essas duas concentrações, foi observado uma relação do aumento da concentração de PLDLA com a diminuição do valor de η , relacionado à forma de como as cadeias de PLDLA se movem livremente entre a rede de cristais de folhas-beta da solução de FS 15,0% que ainda não foram efetivamente interligadas/interpenetradas entre si. Já as adições de PLDLA de 3,0%, 5,0%, 10,0% e 7,0% apresentaram um comportamento de curva semelhante ao da solução de FS 15,0% pura, com regiões pseudoplásticas bem evidenciadas em altas taxas de cisalhamento (10^0 a 10^3 s $^{-1}$).

Também foi observado uma relação do aumento da concentração com uma discreta diminuição no valor de η , devido aos rearranjos das cadeias poliméricas de PLDLA com os cristais de folhas beta (β) da FS. Isto sugere que ao adicionar PLDLA (3,0%;5,0%;7,0%) na solução de FS 15,0%, ocorre interações proteína-polímero, onde a melhor proporção entre as cadeias sobrepostas de PLDLA com cristais de folhas beta (β) da solução de FS 15,0%, gera um efeito sinérgico com formação de uma rede reticulada, resultando no aumento do valor de η .

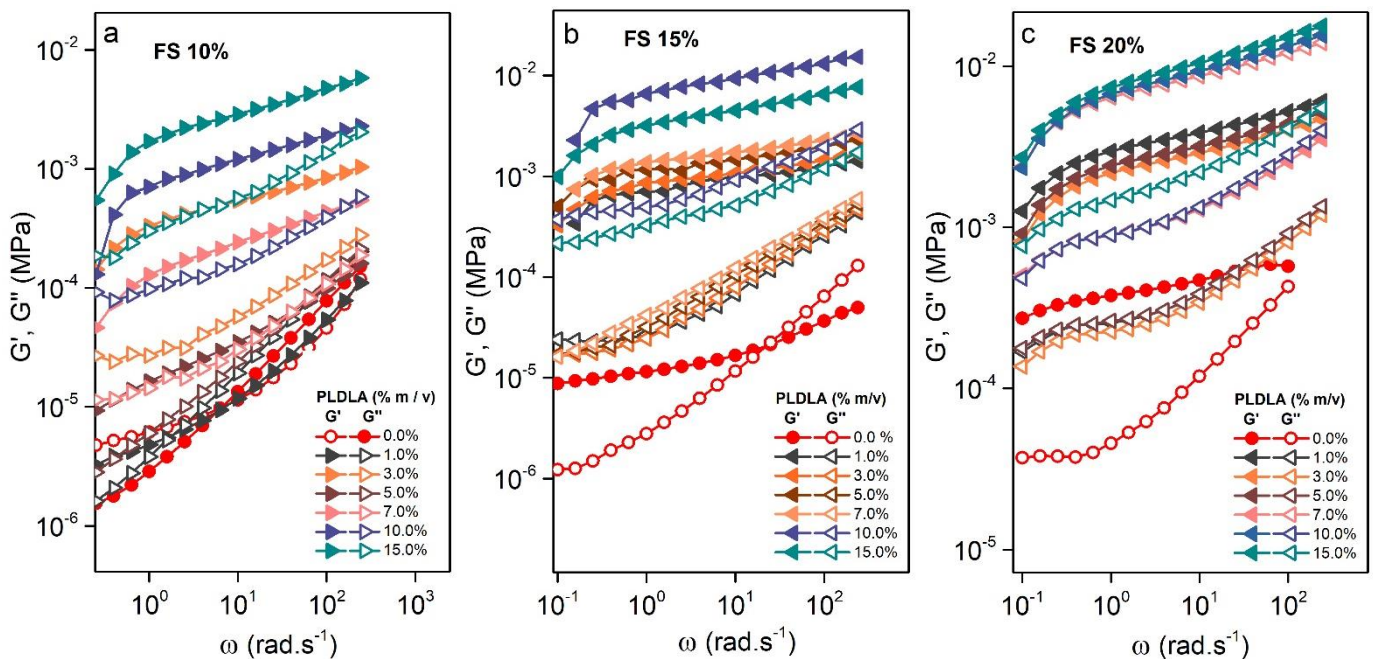
Importante destacar que a adição de 15,0% de PLDLA gerou um efeito diferenciado, tanto adicionado na solução de FS 10,0% (24a), quanto na solução de FS 15,0% (24b). Neste caso, com o aumento da concentração houve um aumento abrupto nos valores de η , relacionado tanto ao maior valor de viscosidade que a solução de PLDLA 15,0% já possui, quanto às interações das cadeias de PLDLA em regime C* com os cristais de folhas beta da FS em regime C**, por meio de ligações de hidrogênio, formando uma rede estruturada (ZHENG et al., 2018). Isto gerou um efeito “somatório”, consequentemente influenciando os aumentos drásticos nos valores de viscosidade.

E por fim, na figura 24c, as adições de 1,0% a 10,0% de PLDLA na solução de FS 20,0% não alteraram significativamente o comportamento da curva, nem os valores de η . Assim, a adição da maior concentração de PLDLA (15,0%) na solução de FS 20,0%, resultou em um alto valor de viscosidade (η), na ordem de 10^3 Pa.s. Frisando que todas as curvas apresentaram regiões pseudoplásticas em altas taxas de cisalhamento (10^{-0} a 10^3 s $^{-1}$). O comportamento comum em todas as curvas indica a interação das cadeias sobrepostas de PLDLA em regime C* entre os cristais de folhas beta (β) da solução de FS 20,0%, que além de possuir o maior

valor de viscosidade dentre todas as concentrações de FS estudadas, está em regime emaranhamento (C^{**}). Principalmente na adição de 15,0% de PLDLA, isto resultou na formação de uma rede fortemente reticulada por meio de ligações de hidrogênio, gerando restrição de movimento entre as interações proteína-polímero, o que ocasionou um aumento significativo no valor da viscosidade (η) em relação à solução de FS 20,0% pura. (ZHAO et al., 2021), (JOHARI, et al., 2020)

As Figuras 25a, 25b e 25c ilustram os módulos de armazenamento (G') e de perda (G'') obtidos em regime oscilatório para as soluções de FS 10,0%; FS15,0% e FS 20,0%, variando as concentrações de PLDLA (1,0%; 3,0%; 5,0%; 7,0%; 10,0%; 15,0%). Para todas as concentrações de PLDLA analisadas, o módulo de armazenamento é maior do que o módulo de perda ($G' > G''$), indicando um comportamento de gel, sugerindo assim, um caráter predominantemente elástico em razão dos emaranhamentos das cadeias do PLDLA, junto à formação de folhas beta (β) da FS, restringindo a mobilidade, para formar redes reticuladas (RYU et al., 2016).

Figura 25. Ensaio de frequência em regime oscilatório de soluções de FS com adições de PLDLA (1,0%; 3,0%; 5,0%; 7,0%; 10,0%; 15,0%) de Módulos de perda (G'') e armazenamento (G') vs frequência angular; a) FS 10,0%; b) FS15,0%; c) FS 20,0%



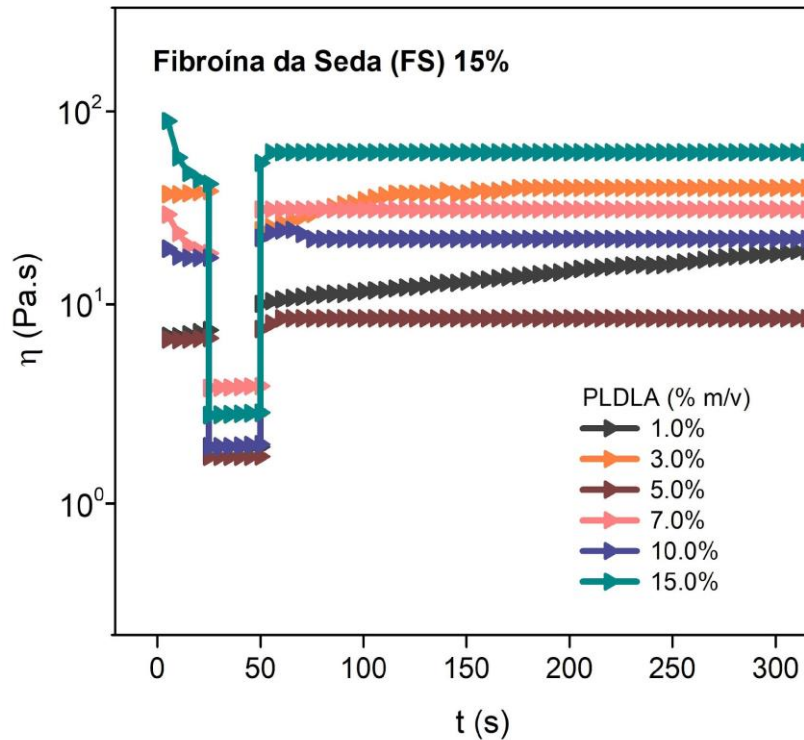
Fonte: ELABORADA PELO AUTOR, 2022.

Através dos ensaios realizados em regime oscilatório e em regime permanente das soluções de FS (10,0%; 15,0%; 20,0%) foi deparado com a problemática apresentada no início do trabalho, a qual foi baseada na literatura, a respeito da utilização da FS no desenvolvimento de hidrogéis para impressão 3D: I- Se utilizada em baixas concentrações, a quantidade na formação de folhas beta antiparalelas (β) seriam insuficientes para formar redes estruturadas, resultando em soluções com baixos valores de viscosidade, causando colapso da estrutura impressa ou até o gotejamento pelo bico da impressora; II- Em altas concentrações (C^{**}) ocorre um aumento da formação de folhas (β), as quais possuem regiões cristalinas, organizando-se em aglomerados. Quando submetida ao cisalhamento, as regiões amorfas da FS são alinhadas em direção ao escoamento, porém os cristais de folhas (β) formam impedimentos na direção do fluxo, ocasionando o entupimento no bico da impressora.

Estudos utilizando a fibra de seda em seu estado natural, investigaram o mecanismo de fiação no interior das glândulas das larvas de seda, em resposta às forças de cisalhamento aplicadas, simulando o processo por meio de ensaios reológicos. De acordo com esses estudos, a força de cisalhamento aplicada a partir de determinadas magnitudes, induz à cristalização da fibra de seda (SCHAEFER *et al.*, 2020); (SPARKES; HOLLAND, 2019); (LAITY; HOLLAND, 2016). Hipoteticamente, aplicando a informação obtida na literatura para soluções de FS, é que pode ocorrer um fenômeno semelhante durante o processo de impressão, justificando o entupimento no bico da mesma quando utilizada soluções de FS em altas concentrações. O desafio, então, foi encontrar a concentração de FS que não estivesse nesses limiares de baixa/alta concentração, considerando também que o papel da adição de PLDLA na solução de FS melhorasse seu perfil viscoso, auxiliando no processo de impressão e adicionando propriedades específicas para a construção do arcabouço direcionada ao reparo ósseo.

Dessa forma, a solução de FS escolhida para os testes de impressão 3D, selecionada a partir dos ensaios reológicos realizados e das justificativas apresentadas acima, foi na concentração de 15,0% de FS.

Figura 26. Ensaio de Tixotropia de três intervalos (3ITT) para a solução de FS15,0% com adições de PLDLA (1,0%; 3,0%; 5,0%; 7,0%; 10,0%; 15,0%)



Fonte: ELABORADA PELO AUTOR, 2022

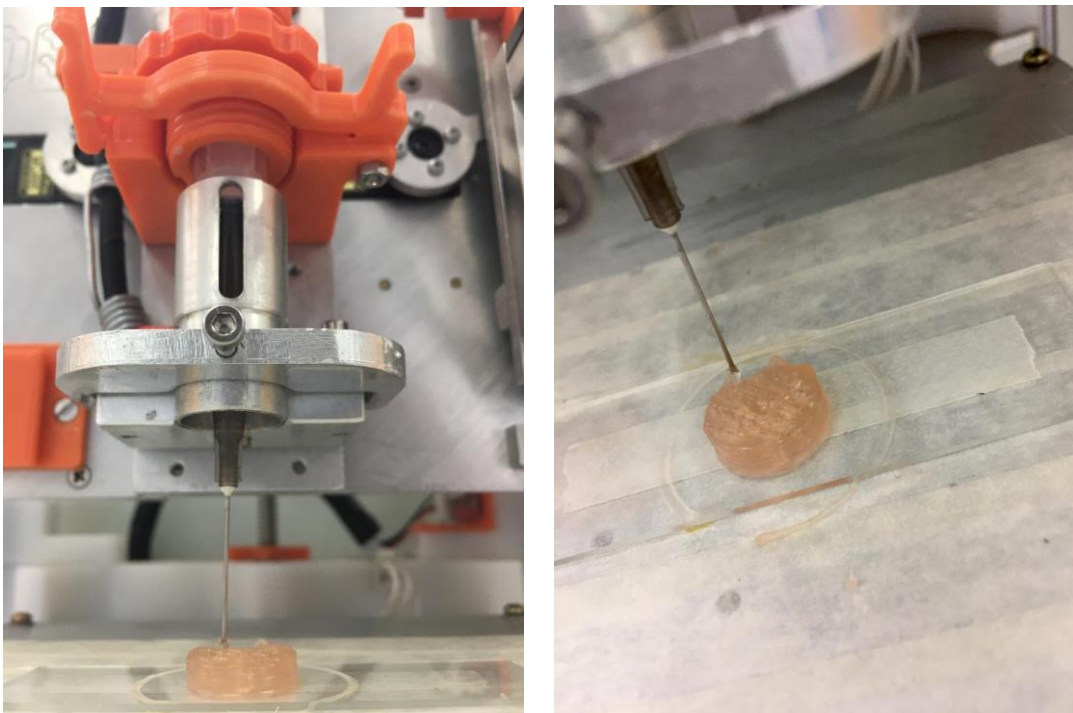
A figura 26 mostra o ensaio de tixotropia 3ITT, para avaliar o tempo de recuperação da solução de FS 15,0% com adições de PLDLA de 1,0%, 3,0%, 5,0%, 7,0%, 10,0% e 15,0%. Foi possível observar, que todas as soluções de FS*/PLDLA tiveram 100% da viscosidade recuperada imediatamente após a retirada da força de cisalhamento, exceto na solução de FS 15,0%/PLDLA 3,0% onde o tempo de recuperação foi ligeiramente maior, em comparação às outras soluções de FS*/PLDLA. Desta forma, as formulações escolhidas para o processo de impressão 3D foram nas proporções de: FS 15,0%/PLDLA 3,0%; FS 15,0%/PLDLA 5,0% e FS 15,0%/PLDLA 7,0%. Importante frisar, que as concentrações de PLDLA escolhidas basearam-se nos três principais requisitos relacionados aos critérios de “(I) Pseudoplasticidade/ (II) Viscoelasticidade/ (III) Tixotropia”, que um material apto à impressão 3D deve atender. Esses critérios de impressão foram atendidos, por meio dos ensaios realizados que resultaram:

- I. As curvas obtidas no ensaio de viscosidade em função da taxa de cisalhamento (figura 21b), apresentaram valores de viscosidade adequados para impressão (acima de 10^1 Pa.s) com regiões pseudoplásticas bem evidenciadas;
- II. Quanto ao ensaio de frequência realizado (figura 22b), as curvas obtidas nessas concentrações apresentaram módulos $G' > G''$, revelando comportamentos característicos de gel;
- III. Os ensaios de tixotropia (figura 23) mostraram que para essas concentrações de PLDLA (3,0%; 7,0%; 10,0%) houve total recuperação de viscosidade.

Outra justificativa para a escolha dessas concentrações de PLDLA, foi de que acima da concentração de 10,0%, o arcabouço reticulado após a impressão, resultaria em um material de aspecto mais rígido e quebradiço, em razão da maior quantidade de PLDLA contido no *scaffold*.

5.7 Impressão do *scaffold* 3D de FS/PLDLA*

Figura 27. Arcabouço impresso antes da reticulação



Fonte: ELABORADA PELO AUTOR, 2022.

A figura 27 exemplifica um arcabouço impresso antes de ser reticulado. É possível observar que a estrutura impressa não é tão nítida na pós-impressão por se tratar de um hidrogel. No entanto, a estrutura do arcabouço é mantida sem risco de colapsar após finalizar a impressão. De acordo com Nisal et al., 2013, a solução de FS possui uma propriedade de formar um filme superficial na interface ar-solução, devido às suas moléculas, formada por blocos hidrofílicos e hidrofóbicos, que por sua vez possuem a capacidade de cristalizar na interface ar-solução. Portanto, esta propriedade pode ser favorável ao arcabouço pós-impresso, auxiliando a manter a sua estrutura.

Figura 28. Arcabouços de FS 15,0% com adições de PLDLA (da esquerda para direita): 10,0%; 3,0%; 7,0%



Fonte: ELABORADA PELO AUTOR, 2022.

A figura 28 mostra os arcabouços impressos após a reticulação das seguintes formulações, respectivamente: FS 15,0%/PLDLA 10,0%, FS 15,0%/PLDLA 3,0% e FS 15,0%/PLDLA 7,0%. Como observado, o arcabouço na formulação com adição de 10,0% de PLDLA, apresentou um aspecto mais rígido, devido à maior concentração de PLDLA contida na formulação. Durante a extrusão, ocorreu a formação de filamentos, intercalado com formação de gotas espessas. Isto influenciou na deposição em camadas do material o que resultou em uma estrutura menos fidedigna, em relação à geometria original projetada. Já as adições de 3,0% e 7,0% PLDLA na solução de FS 15,0%, auxiliaram significativamente no processo de impressão, resultando em estruturas consideravelmente mais fidedignas ao desenho original, ao produzir filamentos mais contínuos. Porém, a adição de 7,0% de PLDLA produziu um arcabouço mais nítido em comparação ao arcabouço com 3,0% de PLDLA, com formação de filamento contínuo, aparentando poros mais visíveis.

Concluindo a etapa da impressão, foi escolhido o *scaffold* de FS 15,0%/PLDLA 7,0%, pois essa formulação foi a que melhor se adequou aos critérios de impressão, considerando a:

I- Fluidez do gel no momento da extrusão; II- Formação de filamento contínuo, suportando o peso das camadas sucessivas durante a deposição do material; III- Obtenção de um arcabouço estruturado, sem que haja colapso da estrutura pós-impressão. A figura 25 mostra os arcabouços impressos na formulação FS 15,0%/PLDLA 7,0%, 24h após a reticulação, mostrando reprodutibilidade de impressão (FU *et al.*, 2021).

Figura 25. Arcabouços impressos de FS 15,0%/PLDLA 7,0%

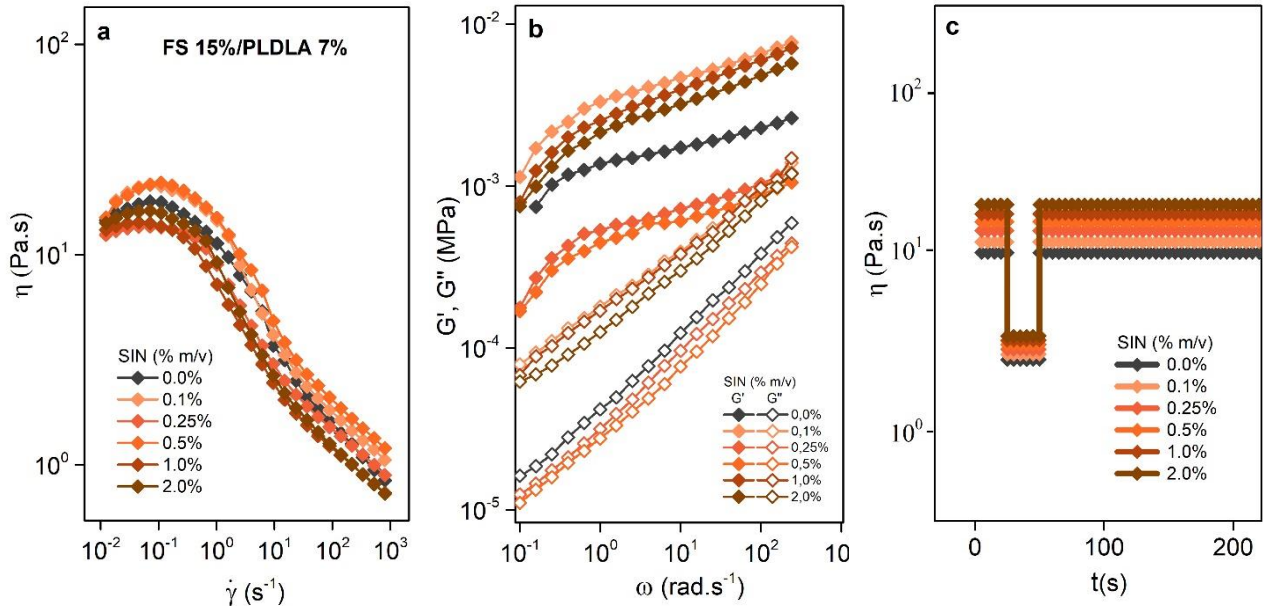


Fonte: ELABORADA PELO AUTOR, 2022.

5.8 Ensaio reológico do gel FS 15,0%/PLDLA 7,0% com adições de SIN

Após a impressão dos arcabouços e escolhida a formulação adequada, ensaios reológicos foram realizados, variando a concentração de sinvastatina (SIN) (% m/v) ao gel FS 15,0%/PLDLA 7,0%, para investigar se a incorporação da SIN alteraria as suas propriedades reológicas. Estudos *in vivo* mostraram a sinvastatina (SIN) sendo administrada de diversas formas, como por aplicação tópica em gel diretamente no local do defeito ósseo; contidas em microesferas de poli (ácido lático-co-glicólico) (PLGA); e incorporadas em *scaffolds* para a liberação controlada do fármaco. Em todos eles foi revelado que a SIN na concentração de 2,5% apresentou um potencial osteogênico, ou seja, a capacidade de neoformação óssea, além de ostoindução (OLIVEIRA *et al.*, 2011) (FERREIRA *et al.*, 2015) (MENDES *et al.*, 2017). A figura 29 mostra os ensaios reológicos da formulação FS 15,0%/PLDLA 7,0%, em cinco adições de SIN: 0,1%; 0,25%; 0,5%; 1,0%; 2,0%.

Figura 29. Ensaio reológico da formulação FS 15,0%/PLDLA 7,0%. a) Curvas de viscosidade X taxa de cisalhamento; b) Ensaio de frequência dos módulos G' , G'' X frequência angular; c) Ensaio de tixotropia da viscosidade X tempo.



Fonte: ELABORADA PELO AUTOR, 2022.

Os ensaios reológicos mostraram que não houve alteração no comportamento da curva de viscosidade (Fig. 29a) comparada à formulação sem adição de SIN (0,0 %), principalmente na região pseudoplástica da curva, onde a queda no valor da viscosidade é importante durante o processo de extrusão. A figura 29b mostrou que as adições de SIN não influenciaram no comportamento viscoelástico de FS 15,0%/PLDLA 7,0%, mantendo a característica de gel da formulação. E por fim, o ensaio de tixotropia (Fig. 29c) mostrou que a incorporação de SIN na formulação FS 15,0%/PLDLA 7,0%, não prejudicou a recuperação da viscosidade.

Concluindo, os ensaios reológicos mostraram que não houveram alterações significativas nas propriedades reológicas do gel FS 15,0%/PLDLA 7,0% quando adicionada SIN nessas quantidades determinadas. Um estudo publicado por Ali Moshiri e colaboradores (2016), apontou que ao se utilizar a SIN para promover a neoformação óssea, o ponto mais importante a ser considerado é a dose da sinvastatina a ser administrada (1mg/kg.dia a 20mg/kg.dia). De acordo com o trabalho publicado por Park, J.B. (2009) as concentrações limite de estatinas na medula óssea ainda não são bem estabelecidas, entretanto os osteoblastos e osteoclastos devem ser expostos a concentrações muito baixas

de SIN, uma vez que altas concentrações podem causar processos inflamatórios e retardar a regeneração óssea (NYAN, M. *et al.*, 2007).

6 CONCLUSÕES

De acordo com os ensaios reológicos realizados, a formulação de FS/15,0%/ PLDLA de 7,0% foi a que apresentou um perfil reológico mais adequado para o processo de impressão 3D comparado com as formulações de FS 15,0%/PLDLA 3,0% e FS15,0%/PLDLA10,0%. Segundo alguns estudos relatados na discussão, concentrações maiores de fibroína são favoráveis para a reticulação física, pois ajudam a dar estrutura para o arcabouço, devido a maior formação de folhas beta antiparalelas, além da propriedade de formar filmes finos na interface ar/solução. A interação de folhas beta da FS em regime emaranhado (C^{**}) com as cadeias de PLDLA em concentração C^* de regime semidiluído, possibilitou a formação de uma rede mais reticulada, evitando colapso na estrutura do arcabouço 3D.

Além disso, a adição de PLDLA cumpriu o seu papel diante da problemática apresentada no início do trabalho, que seria de melhorar o perfil viscoso da FS ao evitar entupimentos no bico da impressora. Portanto, a adição de PLDLA na solução de FS resultou em um hidrogel mais fluido, auxiliando dessa forma no processo de extrusão. Os ensaios reológicos mostraram que a adição de SIN, nas concentrações de 0,1%, 0,25%, 0,5%, 1,0% e 2,0% não alteraram significativamente o comportamento pseudoplástico, viscoelástico e tixotrópico do gel FS 15,0%/PLDLA 7,0%. É importante frisar, que estas propriedades reológicas devem estar em sinergia, caso contrário pode haver alteração no perfil reológico do gel, influenciando no processo de impressão 3D.

Concluído os ensaios com a sinvastatina (SIN) e sua influência no comportamento reológico do gel FS 15,0%/PLDLA 7,0%, será necessário investigar o papel da SIN no ensaio de liberação controlada, para determinar seu perfil de liberação, assim como testes biológicos que demonstrem o seu potencial osteogênico e osteoindutor, cruciais para o processo de regeneração óssea. Para etapas posteriores, também fica proposto a caracterização dos *scaffolds* FS 15,0%/ PLDLA 7,0% e FS 15,0%-PLDLA 7,0%/SIN por Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC), Termogravimetria (TG), Espectroscopia no Infravermelho (FTIR), Microscopia de Varredura (MEV), assim como ensaio de degradação, intumescimento e citotoxicidade.

REFERÊNCIAS

ALI, Moshiri; ALI Mohammad Sharifi; AHMAD Oryan. Role of Simvastatin on fracture healing and osteoporosis: a systematic review on in vivo investigations. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology* 43, 659–684, 2016.

AMIT, Panwar; LAY, Poh Tan. Current Status of Bioinks for Micro-Extrusion-Based 3D Bioprinting. *Molecules*, 21, 1-26, 2016.

BESSA, P.C., CASAL, M., REIS, R.L. Bone morphogenetic proteins in tissue engineering: the road from laboratory to clinic, part II (BMP delivery). *Journal of tissue engineering and regenerative medicine*, 2, 81-96, 2008.

BHATTACHARJEE, Promita; KUNDU, Banani; NASKAR, Deboki; KIM, Hae Won; MAITI, Tapas K.; BHATTACHARYA, Debasis; KUNDU, Subhas C. Silk scaffolds in bone tissue engineering: An overview. *Acta Biomaterialia*, vol. 63, p. 1–17, 1 Nov. 2017. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2017.09.027>.

BISHOP, Elliot S.; MOSTAFA, Sami; PAKVASA, Mikhail; LUU, Hue H.; LEE, Michael J.; WOLF, Jennifer Moriatis; AMEER, Guillermo A.; HE, Tong Chuan; REID, Russell R. 3-D bioprinting technologies in tissue engineering and regenerative medicine: Current and future trends. *Genes and Diseases*, vol. 4, no. 4, p. 185–195, 1 Dec. 2017. <https://doi.org/10.1016/J.GENDIS.2017.10.002>.

BROSTOW, Witold. The phenomenological theory of linear viscoelastic behavior. *Materials Chemistry and Physics*, vol. 26, no. 3–4, p. 417, 1990. [https://doi.org/10.1016/0254-0584\(90\)90029-a](https://doi.org/10.1016/0254-0584(90)90029-a).

BUITRAGO, J.O., PATEL, K.D., EL-FIQI, A., LEE, J.H., KUNDU, B., LEE, H.H., KIM, H.W. (2018). Silk fibroin/collagen protein hybrid cell-encapsulating hydrogels with tunable gelation and improved physical and biological properties. *Acta Biomaterialia*, 69, 218-233, 2018.

CHARU, Vepari; DAVID L. Kaplan. Silk as a Biomaterial. *Progress in Polymer Science*, 32, 991-1007, 2007.

CHIMENE, David; KAUNAS, Roland; GAHARWAR, Akhilesh K. Hydrogel bioink reinforcement for additive manufacturing: a focused review of emerging strategies. *Adv. Mater.*, vol. 32, no. 1, p. 190202, 1 Jan. 2020. <https://doi.org/10.1002/adma.201902026>.

CIAMBELLI, Giuliano Serafino; PEREZ, Mariana Ortega; SIQUEIRA, Guilherme Vasconcelos; CANDELLA, Marco Aurélio; MOTTA, Adriana Cristina; DUARTE, Marcia Adriana Tomaz; ALBERTO-RINCON, Maria Do Carmo; DUEK, Eliana Aparecida De Rezende. Characterization of poly (L-co-D,L Lactic Acid) and a study of polymer-tissue interaction in subcutaneous implants in wistar rats. *Materials Research*, vol. 16, no. 1, p. 28–37, Jan. 2013. <https://doi.org/10.1590/S1516-14392012005000146>.

COLBY, Ralph H. Structure and linear viscoelasticity of flexible polymer solutions: Comparison of polyelectrolyte and neutral polymer solutions. *Rheologica Acta*, vol. 49, no. 5, p. 425–442, 29 May 2010. DOI 10.1007/S00397-009-0413-5/FIGURES/15. Available at: <https://link-springer-com.ez31.periodicos.capes.gov.br/article/10.1007/s00397-009-0413-5>. Accessed on: 25 Nov. 2021.

COLLINS et al., Scaffold Fabrication Technologies and Structure_Function Properties in Bone Tissue Engineering _ Enhanced Reader. 2021. .

DAVID, Williams; PATRICK, Thayer; HECTOR, Martinez; ERIK, Gatenholm, ALI Khademhosseini. A perspective on the physical, mechanical and biological specifications of bioin;s and the development of functional tissues in 3D bioprinting. *Bioprinting*, 9,19-36, 2018.

DEALY, John M.; WISSBRUN, Kurt F. Melt Rheology and Its Role in Plastics Processing. *Melt Rheology and Its Role in Plastics Processing*, 1990. <https://doi.org/10.1007/978-94-009-2163-4>.

DESIMONE, E., SCHACHT, K., JUNGST, T., GROLL, J., SCHEIBEL, T. Biofabrication of 3D constructs: Fabrication technologies and spider silk proteins as bioinks. *Pure and Applied Chemistry*, 87, 737-749, 2015.

DORISHETTY, Pramod; DUTTA, Naba K.; CHOUDHURY, Namita Roy. Silk fibroins in multiscale dimensions for diverse applications. *RSC Advances*, vol. 10, no. 55, p. 33227–33247, 8 Sep. 2020. <https://doi.org/10.1039/d0ra03964k>.

EVAGELIOU, Vasiliki. Shear and extensional rheology of selected polysaccharides. *International Journal of Food Science and Technology*, vol. 55, no. 5, p. 1853–1861, 2020. <https://doi.org/10.1111/ijfs.14545>.

FA-MING, Chena; XIAOHUA Liu. Advancing biomaterials of human origin for tissue engineering. *Progress in Polymer Science*, 53, 86-168, 2016.

FEIGE, D. L.; BAILLY J. J. S. Emerging role of bone morphogenetic proteins in angiogenesis. *Cytokine & Growth Factor Reviews*, 20, 203-212, 2009.

FENG, Qiao; JUNJIANG, Zhang; JIANGHONG, Wang; BO, Du; XIAOHUAN, Huang; LIYUN, Pang; ZHIMIN, Zhou. Silk fibroin-coated PLGA dimpled microspheres for retarded release of simvastatin. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 158, 112-118, 2017.

FERREIRA, Lorraine B.; BRADASCHIA-CORREA, Vivian; MOREIRA, Mariana M.; MARQUES, Natasha D.M.; ARANA-CHAVEZ, Victor E. Evaluation of bone repair of critical size defects treated with simvastatin-loaded poly(lactic-co-glycolic acid) microspheres in rat calvaria. *Journal of Biomaterials Applications*, vol. 29, no. 7, p. 965–976, 17 Feb. 2015. <https://doi.org/10.1177/0885328214550897>.

FERRY, John D. *Viscoelastic Properties of PVME*. New York, 1980. .

FU, Zhouquan; NAGHIEH, Saman; XU, Cancan; WANG, Chengjin; SUN, Wei; CHEN, Xiongbiao. Printability in extrusion bioprinting. *Biofabrication*, vol. 13, no. 3, p. 033001, 8 Apr. 2021. DOI 10.1088/1758-5090/ABE7AB. Available at: <https://iopscience-iop.ez31.periodicos.capes.gov.br/article/10.1088/1758-5090/abe7ab>. Accessed on: 4 Dec. 2021.

FU, Zhouquan; NAGHIEH, Saman; XU, Cancan; WANG, Chengjin; SUN, Wei; CHEN, Xiongbiao. Printability in extrusion bioprinting. *Biofabrication*, vol. 13, no. 3, p. 033001, 8 Apr. 2021. DOI 10.1088/1758-5090/ABE7AB. Available at: <https://iopscience-iop.ez31.periodicos.capes.gov.br/article/10.1088/1758-5090/abe7ab>. Accessed on: 4 Dec. 2021.

HYUN, Kyu; WILHELM, Manfred; KLEIN, Christopher O.; CHO, Kwang Soo; NAM, Jung Gun; AHN, Kyung Hyun; LEE, Seung Jong; EWOLDT, Randy H.; MCKINLEY, Gareth H. A review of nonlinear oscillatory shear tests: Analysis and application of large amplitude oscillatory shear (LAOS). *Progress in Polymer Science (Oxford)*, vol. 36, no. 12, p. 1697–1753,

2011. DOI 10.1016/j.progpolymsci.2011.02.002. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.progpolymsci.2011.02.002>.

KAEWPIROM, Supranee; BOONSANG, Siridech. Influence of alcohol treatments on properties of silk-fibroin-based films for highly optically transparent coating applications. *RSC Advances*, vol. 10, no. 27, p. 15913–15923, 21 Apr. 2020. DOI 10.1039/D0RA02634D. Available at: <https://pubs.rsc.org/en/content/articlehtml/2020/ra/d0ra02634d>. Accessed on: 9 Nov. 2021.

KAI, Zhu; FUTING, Zhao; YANHUA, Yang; WEIDONG, Mu. Effects of simvastatin loaded PLGA microspheres on treatment of rats with intervertebral disk degeneration and on 6 K PGF1 α and HIF 1 α . *Experimental and Therapeutic Medicine*, 19, 579-584, 2020.

KAPOOR, Sonia; KUNDU, Subhas C. Silk protein-based hydrogels: Promising advanced materials for biomedical applications. *Acta Biomaterialia*, vol. 31, p. 17–32, 1 Feb. 2016. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2015.11.034>.

KOH, Leng-Duei; CHENG, Yuan; TENG, Choon-Peng; KHIN, Yin-Win; LOH, Xian-Jun; TEE, Si-Yin; LOW, Michelle; YE, Enyi; YU, Hai-Dong; ZHANG, Yong-Wei; HAN, Ming-.

KONDIAH, Pariksha Jolene; KONDIAH, Pierre P.D.; CHOONARA, Yahya E.; MARIMUTHU, Thashree; PILLAY, Viness. A 3D bioprinted pseudo-bone drug delivery scaffold for bone tissue engineering. *Pharmaceutics*, vol. 12, no. 2, 2020. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics12020166>.

KONDO, T. *Polymers physics*. *Polymer Science*, vol. 35, p. 717, 1997. .

KONG, De Chao; YANG, Ming Hao; ZHANG, Xue Song; DU, Zu Chen; FU, Qiang; GAO, Xue Qin; GONG, Jia Wei. Control of Polymer Properties by Entanglement: A Review. *Macromolecular Materials and Engineering*, 2021. <https://doi.org/10.1002/MAME.202100536>.

LAITY, Peter R.; HOLLAND, Chris. The rheology behind stress-induced solidification in native silk feedstocks. *International Journal of Molecular Sciences*, vol. 17, no. 11, 2016. <https://doi.org/10.3390/ijms17111812>.

LEAL, Claudenete Vieira; DOS SANTOS ALMEIDA, Rosemeire; DÁVILA, José Luis; DOMINGUES, Juliana Almeida; HAUSEN, Moema A.; DUEK, Eliana A.Rezende; D'ÁVILA, Marcos Akira. Characterization and in vitro evaluation of electrospun aligned-fiber membranes

of poly(L-co-D,L-lactic acid). *Journal of Applied Polymer Science*, vol. 136, no. 24, 2019. <https://doi.org/10.1002/app.47657>.

LEE, Chi H.; MOTURI, Venkat; LEE, Yugyung. Thixotropic property in pharmaceutical formulations. *Journal of Controlled Release*, vol. 136, no. 2, p. 88–98, 2009. DOI 10.1016/j.jconrel.2009.02.013. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jconrel.2009.02.013>.

LEE, Johnny Ching-Wei; HONG, Yu-Tong; WEIGANDT, Katie M.; KELLEY, Elizabeth G.; KONG, Hyunjoon; ROGERS, Simon A. Strain shifts under stress-controlled oscillatory shearing in theoretical, experimental, and structural perspectives: Application to probing zero-shear viscosity. *Journal of Rheology*, vol. 63, no. 6, p. 863, 23 Sep. 2019. DOI 10.1122/1.5111358. Available at: <https://sor-scitation-org.ez95.periodicos.capes.gov.br/doi/abs/10.1122/1.5111358>. Accessed on: 21 Oct. 2022.

LI, Na; GUO, Rui; ZHANG, Zhenyu Jason. Bioink Formulations for Bone Tissue Regeneration. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, vol. 9, 5 Feb. 2021. <https://doi.org/10.3389/FBIOE.2021.630488>.

LI, Xin; WANG, Shi-Qing; WANG, Xiaorong. Nonlinearity in large amplitude oscillatory shear (LAOS) of different viscoelastic materials. *Journal of Rheology*, vol. 53, no. 5, p. 1255–1274, Sep. 2009. <https://doi.org/10.1122/1.3193713>.

MCCARTHY, Edward D.; ZAMMARANO, Mauro; FOX, Douglas M.; NIEUWENDAAL, Ryan C.; KIM, Yeon S.; MAUPIN, Paul H.; TRULOVE, Paul C.; GILMAN, Jeffrey W. Formation of extended ionomeric network by bulk polymerization of l,d-lactide with layered-double-hydroxide. *Polymer*, vol. 54, no. 1, p. 90–101, 8 Jan. 2013. <https://doi.org/10.1016/j.polymer.2012.11.037>.

MEENA, L; HILAL Rather, DHAVAL Kedaria Rajesh Vasita. Polymeric microgels for bone tissue engineering applications: a review. *International journal of polymeric materials and polymeric biomaterials*, 69, 381-397, 2020.

MENDES, Dario; DOMINGUES, Juliana A.; HAUSEN, Moema A.; CATTANI, Silvia M.M.; ARAGONES, Aguedo; OLIVEIRA, Alexandre L.R.; INÁCIO, Rodrigo F.; BARBO, Maria L.P.; DUEK, Eliana A.R. Study of mesenchymal stem cells cultured on a poly(Lactic-co-glycolic acid) scaffold containing simvastatin for bone healing. *Journal of Applied Biomaterials*

and Functional Materials, vol. 15, no. 2, p. e133–e141, 1 Apr. 2017. <https://doi.org/10.5301/JABFM.5000338>.

MOTTA, Adriana C; DUEK, Eliana A R. Síntese e Caracterização do Copolímero Poli (L-co-D,L Ácido Láctico) Synthesis and Characterization of the Copolymer Poly(L-co-D,L lactic acid). [S. l.: s. n.], 2007.

MU, Xuan; AGOSTINACCHIO, Francesca; XIANG, Ning; PEI, Ying; KHAN, Yousef; GUO, Chengchen; CEBE, Peggy; MOTTA, Antonella; KAPLAN, David L. Recent advances in 3D printing with protein-based inks. *Progress in Polymer Science*, vol. 115, 1 Apr. 2021. <https://doi.org/10.1016/J.PROGPOLYMSCI.2021.101375>.

MURPHY, Sean V.; ATALA, Anthony. 3D bioprinting of tissues and organs. *Nature Biotechnology*, vol. 32, no. 8, p. 773–785, 2014. <https://doi.org/10.1038/nbt.2958>.

NAZEER, M; EMEI, Yilgor; ISKENDER, Yilgor. Electrospun polycaprolactone/silk fibroin nanofibrous bioactive scaffolds for tissue engineering applications. *Polymer*, 168, 86-94, 2019.

NISAL, Anuya; KALELKAR, Chirag; BELLARE, Jayesh; LELE, Ashish. Rheology and microstructural studies of regenerated silk fibroin solutions. *Rheologica Acta* 2013 52:10, vol. 52, no. 10, p. 833–840, 25 Jul. 2013. DOI 10.1007/S00397-013-0723-5. Available at: <https://link-springer-com.ez95.periodicos.capes.gov.br/article/10.1007/s00397-013-0723-5>. Accessed on: 2 Sep. 2021.

OLIVEIRA, N. M; CORREA, V, B; CHAVEZ, Vi. E. A. Early alveolar bone regeneration in rats after topical administration of simvastatin. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology and Endodontology*, vol. 112, no. 2, p. 170–179, Aug. 2011. <https://doi.org/10.1016/J.TRIPLEO.2010.08.027>.

RUTZ, Alexandra L.; HYLAND, Kelly E.; JAKUS, Adam E.; BURGHARDT, Wesley R.; SHAH, Ramille N. A multimaterial bioink method for 3D printing tunable, cell-compatible hydrogels. *Advanced Materials*, vol. 27, no. 9, p. 1607–1614, 4 Mar. 2015. <https://doi.org/10.1002/ADMA.201405076>.

SÁNCHEZ, J. Rheological studies and 3D extrusion-based printing of nanocomposite hydrogels. 2018. 109 f. Tese (Doutorado em Engenharia Mecânica) - Faculdade de Engenharia Mecânica, Universidade Estadual de Campinas,, Campinas-SP, 2018.

SCHAEFER, Charley; LAITY, Peter R.; HOLLAND, Chris; MCLEISH, Tom C.B. Silk Protein Solution: A Natural Example of Sticky Reptation. *Macromolecules*, vol. 53, no. 7, p. 2669–2676, 14 Apr. 2020. DOI 10.1021/ACS.MACROMOL.9B02630. Available at: <https://pubs-acsc-org.ez95.periodicos.capes.gov.br/doi/full/10.1021/acs.macromol.9b02630>. Accessed on: 9 Nov. 2021.

SPARKES, James; HOLLAND, Chris. The Energy Requirements for Flow-Induced Solidification of Silk. *Macromolecular Bioscience*, vol. 19, no. 3, p. 1800229, 1 Mar. 2019. DOI 10.1002/MABI.201800229. Available at: <https://onlinelibrary-wiley.ez95.periodicos.capes.gov.br/doi/full/10.1002/mabi.201800229>. Accessed on: 9 Nov. 2021.

TERADA, Dohiko; YOKOYAMA, Yoshiyuki; HATTORI, Shinya; KOBAYASHI, Hisatoshi; TAMADA, Yasushi. The outermost surface properties of silk fibroin films reflect ethanol-treatment conditions used in biomaterial preparation. *Materials Science and Engineering: C*, vol. 58, p. 119–126, 1 Jan. 2016. <https://doi.org/10.1016/J.MSEC.2015.07.041>.

TOWNSEND, Jakob M.; BECK, Emily C.; GEHRKE, Stevin H.; BERKLAND, Cory J.; DETAMORE, Michael S. Flow behavior prior to crosslinking: The need for precursor rheology for placement of hydrogels in medical applications and for 3D bioprinting. *Progress in Polymer Science*, vol. 91, p. 126–140, 1 Apr. 2019. <https://doi.org/10.1016/J.PROGPOLYMSCI.2019.01.003>.

UNGARO, F.; CATANZANO, O.; D'ANGELO, I.; GOMEZ L.; CONCHEIRO A.; MIRO, C. A.; LORENZO, A.; QUAGLIA, F. Microparticle-embedded fibroin/alginate beads for prolonged local release of simvastatin hydroxyacid to mesenchymal stem cells. *Carbohydrate Polymers*, 175, 645-653, 2017.

VEDADGHAVAMI, Armin; MINOOEI, Farnaz; MOHAMMADI, Mohammad Hossein; KHETANI, Sultan; REZAEI KOLAHCHI, Ahmad; MASHAYEKHAN, Shohreh; SANATI-NEZHAD, Amir. Manufacturing of hydrogel biomaterials with controlled mechanical properties for tissue engineering applications. *Acta Biomaterialia*, vol. 62, p. 42–63, 15 Oct. 2017. <https://doi.org/10.1016/J.ACTBIO.2017.07.028>.

VERBEETEN, Wilco M. H. Non-linear viscoelastic models for semi-flexible polysaccharide solution rheology over a broad range of concentrations. *Journal of Rheology*, vol. 54, no. 3, p. 447–470, 2010. <https://doi.org/10.1122/1.3329746>.

WŁODARCZYK-BIEGUN, Małgorzata K.; DEL CAMPO, Aránzazu. 3D bioprinting of structural proteins. *Biomaterials*, vol. 134, p. 180–201, 1 Jul. 2017. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2017.04.019>.

XIN, Xuejun; BORZACCHIELLO, A.; NETTI, P. A.; AMBROSIO, L.; NICOLAIS, L. Hyaluronic-acid-based semi-interpenetrating materials. *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition*, vol. 15, no. 9, p. 1223–1236, 2004. <https://doi.org/10.1163/1568562041753025>.

YONG. Structures, mechanical properties and applications of silk fibroin materials. *Progress in Polymer Science*, vol. 46, p. 86–110, 2015. DOI 10.1016/j.progpolymsci.2015.02.001. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.progpolymsci.2015.02.001>. Accessed on: 26 Jan. 2021.

YU, Fengyuan; ZHANG, Fei; LUAN, Tu; ZHANG, Zinan; ZHANG, Hongbin. Rheological studies of hyaluronan solutions based on the scaling law and constitutive models. *Polymer*, vol. 55, no. 1, p. 295–301, 14 Jan. 2014. <https://doi.org/10.1016/J.POLYMER.2013.11.047>.

ZHANG, Zhengyi; JIN, Yifei; YIN, Jun; XU, Changxue; XIONG, Ruitong; CHRISTENSEN, Kyle; RINGEISEN, Bradley R.; CHRISEY, Douglas B.; HUANG, Yong. Evaluation of bioink printability for bioprinting applications. *Applied Physics Reviews*, vol. 5, no. 4, 1 Dec. 2018. <https://doi.org/10.1063/1.5053979>.