

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA E
MONITORAMENTO AMBIENTAL – PPGBMA

FLAVIA MARIA MORAIS PEDRINI

**IMPRESSÃO 3D DE *SCAFFOLDS* DE PLDLA-TMC COMO MODELO PARA
ENGENHARIA TECIDUAL DE CARTILAGEM: DA REOLOGIA AO
BIORREATOR**

Sorocaba

2024

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA E
MONITORAMENTO AMBIENTAL – PPGBMA

FLAVIA MARIA MORAIS PEDRINI

**IMPRESSÃO 3D DE *SCAFFOLDS* DE PLDLA-TMC COMO MODELO PARA
ENGENHARIA TECIDUAL DE CARTILAGEM: DA REOLOGIA AO
BIORREATOR**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Monitoramento Ambiental, para obtenção do título de Doutor em Biotecnologia e Monitoramento Ambiental

Orientação: Prof.^a. Eliana Aparecida de Rezende Duck

Financiamento: Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)

Sorocaba

2024

Maria Morais Pedrini, Flavia

Impressão 3D de scaffolds de PLDLA-TMC como modelo para engenharia tecidual de cartilagem: da reologia ao biorreator / Flavia Maria Morais Pedrini -- 2024. 125f.

Tese de Doutorado - Universidade Federal de São Carlos, campus Sorocaba, Sorocaba

Orientador (a): Eliana Aparecida de Rezende Duek

Banca Examinadora: Marcos Akira D'Ávila, Arnaldo

Rodrigues dos Santos Júnior, Aparecido Júnior de

Menezes, Jane Maria Faulstich de Paiva

Bibliografia

1. Engenharia tecidual. 2. Biomateriais. 3. Biorreator. I. Maria Morais Pedrini, Flavia. 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 Biotecnologia e Monitoramento Ambiental

FOLHA DE APROVAÇÃO

Defesa de Tese de Doutorado da candidata Flavia Maria Moraes Pedrini, realizada em 27/02/2024.

Comissão Julgadora:

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

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

Prof. Dr. Arnaldo Rodrigues dos Santos Júnior (UFABC)

Prof. Dr. Aparecido Júnior de Menezes (UFSCar)

Profa. Dra. Jane Maria Faulstich de Paiva (UFSCar)

O Relatório de Defesa assinado pelos membros da Comissão Julgadora encontra-se arquivado junto ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Monitoramento Ambiental.

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, Salete e Wilson, pelo apoio incondicional.

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar, quero expressar minha mais profunda gratidão a Deus por me guiar, proteger e sustentar ao longo de toda esta jornada. Sou imensamente grata pela sua presença constante em minha vida, por ser a minha luz nos momentos de escuridão e por me abençoar com cada conquista alcançada.

À minha querida orientadora Eliana Duek, expresso minha profunda gratidão por sua orientação, mentoria e inspiração ao longo destes anos. Sua orientação e apoio me proporcionaram a coragem e a determinação necessárias para enfrentar os desafios e superar os obstáculos que encontrei ao longo do caminho.

Aos meus pais, meu eterno agradecimento por todo o amor, apoio e sacrifício que dedicaram a mim ao longo dos anos. Suas palavras de incentivo, seus conselhos sábios e seu amor incondicional foram o alicerce sobre o qual construí minha jornada acadêmica. Sem o seu apoio inabalável, eu não estaria aqui hoje, celebrando essa conquista.

À querida Moema Hausen, gostaria de expressar minha profunda gratidão por todos os ensinamentos e orientações preciosas. Sua paixão pela pesquisa e pelo conhecimento foi uma fonte constante de inspiração para mim, motivando-me a me esforçar e buscar a excelência em meus próprios projetos e estudos.

Ao Daniel, por todo suporte e orientação sempre que precisei, meus sinceros agradecimentos.

Aos amigos queridos do Labiomat, que estiveram ao meu lado durante este percurso, eu agradeço do fundo do coração. Obrigada por cada sorriso, cada momento compartilhado e cada desafio superado juntos que tornaram essa jornada mais leve e significativa.

À UFSCar e ao PPGbma, expresso minha gratidão por fornecer os recursos, oportunidades e ambiente propício para o meu crescimento acadêmico e profissional. Os desafios e aprendizados proporcionados por este programa moldaram meu pensamento crítico, ampliaram meus horizontes e me prepararam para enfrentar os desafios do futuro com confiança e determinação.

Por fim, gostaria de expressar minha gratidão a todos os professores, colaboradores e instituições que contribuíram para o desenvolvimento deste trabalho. Sem o apoio de cada um de vocês, este feito não teria sido possível.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES).

"A ciência é a arte de criar possibilidades."

Thomas S. Kuhn

PRODUÇÃO CIENTÍFICA DURANTE O PERÍODO

a. Capítulo de livro:

PEDRINI, FLAVIA; HAUSEN, M. A.; DUEK, E. A. R. Optimized Method to Improve Cell Activity in 3D Scaffolds Under a Dual Real-Time Dynamic Bioreactor System. **Methods in Molecular Biology** (Clifton, N.J.), v., p. 1-8, 2021.

b. Artigos científicos:

PEDRINI, FLAVIA; HAUSEN, MOEMA; GOMES, RODRIGO; DUEK, ELIANA. Enhancement of cartilage extracellular matrix synthesis in Poly(PCL-TMC)urethane scaffolds: a study of oriented dynamic flow in bioreactor. **Biotechnology Letters**, v. 42, p. 2721-2734, 2020.

PEDRINI, FLAVIA; NAZATO, VIRGÍNIA S.; HAUSEN, MOEMA A.; KOMATSU, DANIEL; PEÑA, STELA S.; ALMEIDA, ANA LÍDIA M.; PIROLA, FERNANDA J. C.; FRANÇO SO, MARINA P.; DUEK, ELIANA A. R. In Vitro Cell Behavior and Antibiotic Activity under Sustained Release of Doxycycline-Loaded Poly(lactic-co-glycolic acid) Microspheres. **Antibiotics-Basel**, v. 11, p. 945, 2022.

HAUSEN, MOEMA DE ALENCAR; MORAES, ARIANA DE SOUZA; **PEDRINI, FLAVIA;** GRABARZ, FELIPE; CAMILLI, JOSÉ ANGELO; DUEK, ELIANA APARECIDA DE REZENDE. Crosslinked Collagen-Hyaluronic Acid Scaffold Enhances Interleukin-10 Under Co-Culture of Macrophages and Adipose-Derived Stem Cells. **Macromolecular Bioscience**, v. 5, p. 327, 2023.

PEDRINI, FLAVIA; GOMES, RODRIGO CÉSAR; MORAES, ARIANA SOUZA; ANTUNE, BIANCA SABINO LEOCÁDIO; MOTTA, ADRIANA CRISTINA; DÁVILA, JOSÉ LUIS; HAUSEN, MOEMA ALENCAR ; KOMATSU, DANIEL; DUEK, ELIANA APARECIDA REZENDE. Poly(L-co-D,L-lactic acid-co-trimethylene carbonate) for extrusion-based 3D printing: Comprehensive characterization and cytocompatibility assessment. **Polymer**, v. 290, p. 126585, 2024.

Participação em eventos científicos:

a. Apresentação oral

PEDRINI, F; GOMES, R. C.; MORAES, A. S.; ANTUNES, B. S. L.; HAUSEN, M. A.; KOMATSU, D.; DUEK, E. A. R. Unlocking The Potential of Poly(L-co-D,L-Lactic Acid-co-Trimethylene Carbonate) for Extrusion-Based 3D Printing. 2023. (Apresentação de Trabalho/Congresso) – XII Congresso Latino-Americano de Órgãos Artificiais e Biomateriais (COLAOB).

PEDRINI, M. M. F.; ANTUNES, B. S. L. ; GOMES, R. C. ; KOMATSU, D. ; DUEK, E. A. R. Comportamento Reológico do Terpolímero Poli(L-co-D,L-co-Trimetileno Carbonato) para Impressão 3D. 2022. (Apresentação de Trabalho/Outra) - IX Workshop de Pesquisa e Tecnologia em Ciência dos Materiais (UFSCar).

PEDRINI, M. M. F.; GOMES, R. C.; KOMATSU, D.; HAUSEN, M. A.; DUEK, E. A. R. Impressão 3D de *scaffolds* de PLDLA-TMC como modelo para engenharia tecidual de cartilagem. 2022. (Apresentação de Trabalho/Simpósio) - I Simpósio em Biotecnologia e Monitoramento Ambiental (UFSCar).

PEDRINI, FLAVIA; HAUSEN, M. A. ; GOMES, R. C. ; DUEK, E. A. R. . Cultura e Diferenciação de Células-Tronco Mesenquimais em Condrócitos em Scaffolds Impressos de PLDLA-TMC: Cultura Estática e Dinâmica em Biorreator. 2023. (Apresentação de Trabalho/Simpósio) - II Simpósio em Biotecnologia e Monitoramento Ambiental (UFSCar).

b. Pôsteres

ROMANI, P. I.; BARROS, I. R. S.; **PEDRINI, F.;** RUIZ, R. O.; DUEK, E. A. R.; HAUSEN, M. A. Comparative Analysis of Poly-L-Lactic Acid and Calcium Hydroxyapatite for Treating Cutaneous Flaccidity: A Clinical Trial. 2023. (Apresentação de Trabalho/Congresso) – XII Congresso Latino-Americano de Órgãos Artificiais e Biomateriais (COLAOB).

GOMES, R. C.; **PEDRINI, F.;** HAUSEN, M. A.; KOMATSU, D.; DUEK, E. A. R. Mechanical Characterization, Hydrolytic Degradation, and Cell Viability of a New

Polyurethane Based on PCL and Trimethylene Carbonate. 2023. (Apresentação de Trabalho/Congresso) – XII Congresso Latino-Americano de Órgãos Artificiais e Biomateriais (COLAOB).

ANTUNES, B. S. L.; KOMATSU, D.; **PEDRINI, F.**; GOMES, R. C.; DUEK, E. A. R. Rheological Characterization of Silk Fibroin/PLDLA/Sinvastatin-Based Gel for 3D Printing. 2023. (Apresentação de Trabalho/Congresso) – XII Congresso Latino-Americano de Órgãos Artificiais e Biomateriais (COLAOB).

RESUMO

PEDRINI, Flavia M. M. Título: Impressão 3D de *scaffolds* de PLDLA-TMC como modelo para engenharia tecidual de cartilagem: da reologia ao biorreator. 2024. Tese de Doutorado em Biotecnologia e Monitoramento Ambiental – Universidade Federal de São Carlos, *campus* Sorocaba, Sorocaba, 2024.

O aumento da expectativa de vida e a prática de atividades físicas têm impactado no número de lesões traumáticas e doenças degenerativas, tais como ruptura dos meniscos e osteoartrite. O menisco é formado por um tecido fibrocartilaginoso submetido a grandes esforços mecânicos o qual apresenta baixa capacidade intrínseca de reparo. Quando lesionado, é frequentemente retirado parcial ou totalmente, levando a complicações articulares futuras. Apesar dos dispositivos comerciais disponíveis, encontrar uma solução para a meniscectomia total ainda é um desafio. Com o intuito de explorar soluções que possam mitigar os problemas associados às lesões meniscais, foi conduzido um estudo para caracterizar o terpolímero Poli(L-co-D,L ácido láctico-co-trimetileno carbonato) (PLDLA-TMC) em proporções de 60/40 e 70/30 quanto às suas propriedades físico-químicas, térmicas e reológicas, visando a impressão de *scaffolds* tridimensionais (3D). A partir dos ensaios reológicos foi evidenciado o comportamento pseudoplástico dos materiais, indispensável para o processo de impressão. A partir da caracterização dos *scaffolds*, a temperatura de impressão foi o fator que mais influenciou na degradação do material. Quando submetidos ao ensaio mecânico de compressão, os *scaffolds* de PLDLA-TMC 60/40 apresentaram módulo elástico (2.9 MPa) semelhante ao menisco humano (1 MPa), tornando-o elegível para aplicação como prótese de menisco, em detrimento dos *scaffolds* de PLDLA-TMC 70/30. A velocidade de impressão se mostrou menos significativa na redução da massa molar dos *scaffolds*, enquanto o tempo de residência do material na impressora teve impacto nesta propriedade. O ensaio de degradação *in vitro* demonstrou a estabilidade do material durante as 4 semanas de estudo. Os ensaios de citocompatibilidade e diferenciação celular em condrócitos nos *scaffolds* impressos de PLDLA-TMC 60/40, tanto em cultura estática como em cultura dinâmica, demonstraram seu potencial como carreador celular em abordagens de engenharia tecidual de cartilagem.

Palavras-chave: Engenharia tecidual; Menisco; *Scaffolds*; PLDLA-TMC; Reologia; Impressão 3D.

ABSTRACT

PEDRINI, Flavia M. M. Title: 3D printing of PLDLA-TMC scaffolds as a model for cartilage tissue engineering: from rheology to bioreactor. 2024. Tese de Doutorado em Biotecnologia e Monitoramento Ambiental – Universidade Federal de São Carlos, *campus* Sorocaba, Sorocaba, 2024.

The increase in life expectancy and the practice of physical activities have impacted the number of traumatic injuries and degenerative diseases, such as meniscal tears and osteoarthritis. The meniscus is composed of fibrocartilaginous tissue subjected to significant mechanical stresses, with low intrinsic repair capacity. When injured, it is often partially or completely removed, leading to future joint complications. Despite available commercial devices, finding a solution for total meniscectomy remains a challenge. In order to explore solutions that may mitigate the problems associated with meniscal injuries, a study was conducted to characterize the Poly(L-co-D,L lactic acid-co-trimethylene carbonate) (PLDLA-TMC) terpolymer in proportions of 60/40 and 70/30 regarding its physicochemical, thermal, and rheological properties, aiming for the printing of three-dimensional (3D) scaffolds. Rheological tests revealed the pseudoplastic behavior of the materials, which is indispensable for the printing process. From the characterization of the scaffolds, printing temperature was the factor that most influenced material degradation. When subjected to mechanical compression testing, PLDLA-TMC 60/40 scaffolds showed an elastic modulus (2.9 MPa) similar to the human meniscus (1 MPa), making them eligible for application as meniscal prostheses, as opposed to PLDLA-TMC 70/30 scaffolds. Printing speed proved to be less significant in reducing the molecular weight of the scaffolds, while the material residence time in the printer impacted this property. In vitro degradation testing demonstrated the material's stability over the 4-week study period. Citocompatibility and differentiation assays on PLDLA-TMC 60/40 printed scaffolds, both in static and dynamic culture, demonstrated their potential as cell carriers in cartilage tissue engineering approaches.

Keywords: Tissue engineering; Menisci; Scaffolds; PLDLA-TMC; Rheology; 3D printing.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: (A) Vista superior da anatomia dos meniscos. (B) Vista axial de um platô tibial direito mostrando seções do menisco e sua relação com os ligamentos cruzados.	24
Figura 2: Variações anatômicas na vascularização e população celular nos meniscos.	25
Figura 3: Representação esquemática dos diferentes mecanismos de extrusão.	30
Figura 4: Representação esquemática do comportamento da viscosidade em função da taxa de cisalhamento para (a) um material dilatante; (b) um material pseudoplástico; e (c) um fluido Newtoniano.	32
Figura 5: Curva de viscosidade de um material pseudoplástico, evidenciando o platô Newtoniano a baixas (η_0) e altas (η_∞) taxas de cisalhamento e a região de Lei das Potências.	33
Figura 6: Curva de recuperação da viscosidade (η) em função do tempo a partir do ensaio de tixotropia em três intervalos (3ITT).	35
Figura 7: Fluxograma da metodologia empregada no projeto evidenciando suas três etapas principais.	37
Figura 8: Representação dos <i>scaffolds</i> durante o processo de modelagem no software Slic3r.	41
Figura 9: Sistema do biorreator Electroforce® BioDynamic 5210®, Bose/TA Instruments. (A) Representação esquemática do sistema conectado à bomba peristáltica. (B) Câmaras montadas no biorreator evidenciando a célula de carga do equipamento e a posição do <i>scaffold</i> dentro da câmara.	43
Figura 10: (A) Espectros de FTIR das amostras de PLDLA, PLDLA-TMC 60/40 e PLDLA-TMC 70/30. (B) Ampliação da região entre 700-900 cm^{-1} evidenciando o aumento da intensidade do pico em 790 cm^{-1} após correção da linha base.	46
Figura 11: Estrutura química do PLDLA-TMC.	47
Figura 12: Curvas de DSC do segundo aquecimento das amostras de PLDLA, PLDLA-TMC 60/40 e PLDLA-TMC 70/30.	47
Figura 13: Curvas de perda de massa (%) em função da temperatura das amostras de PLDLA e PLDLA-TMC.	48
Figura 14: (A) Dependência do módulo de armazenamento (G') (símbolos sólidos) e do módulo de perda (G'') (símbolos abertos) em função da frequência angular (ω) para o PLDLA-TMC 60/40. Os dados foram deslocados verticalmente para evitar sobreposição. (B) Módulo de armazenamento e (C) módulo de perda.	51

Figura 15: Dependência do módulo de armazenamento (G') (símbolos sólidos) e do módulo de perda (G'') (símbolos abertos) em função da frequência angular (ω) para o PLDLA-TMC 70/30. Os dados foram deslocados verticalmente para evitar sobreposição. (B) Módulo de armazenamento e (C) módulo de perda.	52
Figura 16: Coeficiente de amortecimento ($\tan \delta$) em função da frequência angular (ω) para o PLDLA-TMC 60/40 em diferentes temperaturas.	54
Figura 17: Coeficiente de amortecimento ($\tan \delta$) em função da frequência angular (ω) para o PLDLA-TMC 70/30 em diferentes temperaturas.	55
Figura 18: Viscosidade complexa (η^*) do PLDLA-TMC 60/40 em diferentes temperaturas (90°C – 190°C), em função da frequência angular (ω).	56
Figura 19: Viscosidade complexa (η^*) do PLDLA-TMC 70/30 em diferentes temperaturas (140°C – 190°C), em função da frequência angular (ω).	57
Figura 20: Curvas de viscosidade (η) do PLDLA-TMC 60/40 em estado estacionário para diferentes temperaturas (90°C – 190°C).....	58
Figura 21: Curvas de viscosidade (η) do PLDLA-TMC 70/30 em estado estacionário para diferentes temperaturas (140°C – 190°C).....	60
Figura 22: Curvas de viscosidade (η) do PLDLA-TMC 60/40 em estado estacionário para diferentes temperaturas (90°C – 120°C) ajustadas para o modelo de Carreau-Yasuda. A linha sólida corresponde ao ajuste do modelo e os símbolos abertos correspondem aos dados experimentais.	61
Figura 23: Curvas de viscosidade (η) do PLDLA-TMC 60/40 em estado estacionário para diferentes temperaturas (A) 130°C – 170°C e (B) 180°C – 190°C ajustadas para o modelo de Cross. A linha sólida corresponde ao ajuste do modelo e os símbolos abertos correspondem aos dados experimentais.	63
Figura 24: Curvas de viscosidade (η) do PLDLA-TMC 70/30 em estado estacionário para diferentes temperaturas (140°C – 190°C) ajustadas para o modelo de Carreau-Yasuda. A linha sólida corresponde ao ajuste dos modelos e os símbolos abertos correspondem aos dados experimentais.	64
Figura 25: (A) Curvas de viscosidade (η) em função do tempo para o PLDLA-TMC 60/40 em diferentes temperaturas (90°C-190°C); (B) Percentual de recuperação da viscosidade em função do tempo para diferentes temperaturas (90°C – 190°C).	67
Figura 26: (A) Curvas de viscosidade (η) em função do tempo para o PLDLA-TMC 70/30 em diferentes temperaturas (140°C - 190°C); (B) Percentual de recuperação da viscosidade em função do tempo para diferentes temperaturas (140°C – 190°C).	67

Figura 27: <i>Scaffolds</i> de PLDLA-TMC 60/40 e PLDLA-TMC 70/30 impressos na temperatura de 120°C e 140°C, respectivamente.	69
Figura 28: Espectros de infravermelho na região das bandas C=O e C-H e respectiva curva de variação do índice de carbonila em função da temperatura de impressão dos <i>scaffolds</i> de PLDLA-TMC 60/40.	71
Figura 29: Espectros de infravermelho na região das bandas C=O e C-H e respectiva curva de variação do índice de carbonila em função da temperatura de impressão dos <i>scaffolds</i> de PLDLA-TMC 70/30.	73
Figura 30: Curvas de DSC do segundo aquecimento dos <i>scaffolds</i> impressos de PLDLA-TMC 60/40 em diferentes temperaturas (120°C – 190°C).	74
Figura 31: Curvas de DSC dos <i>scaffolds</i> impressos de PLDLA-TMC 70/30 em diferentes temperaturas (140°C – 190°C).	75
Figura 32: Curvas de Compressão (MPa) x Deformação (%) dos <i>scaffolds</i> impressos de PLDLA-TMC 60/40 e 70/30.	80
Figura 33: Micrografias dos <i>scaffolds</i> de PLDLA-TMC 60/40 impressos na velocidade de 4 mm/s (A) e 8 mm/s (B) em diferentes aumentos.	83
Figura 34: Espectros de FTIR dos <i>scaffolds</i> submetidos à degradação durante 2 e 4 semanas (A e B, respectivamente).	86
Figura 35: Curvas de DSC do segundo aquecimento dos <i>scaffolds</i> submetidos à degradação durante 2 e 4 semanas (A e B, respectivamente).	87
Figura 36: Curvas de perda de massa (%) em função da temperatura dos <i>scaffolds</i> submetidos à degradação durante 2 e 4 semanas (A e B, respectivamente).	88
Figura 37: Micrografias dos <i>scaffolds</i> submetidos à degradação durante 2 e 4 semanas (A e B, respectivamente) em diferentes aumentos.	89
Figura 38: Micrografias de varredura confocal a laser identificando as CTMs aderidas nos <i>scaffolds</i> impressos de PLDLA-TMC 60/40 em diferentes tempos de cultivo (7 e 21 dias). Em azul é identificado o núcleo pela marcação com DAPI, enquanto em vermelho evidencia-se o citoesqueleto por meio de faloidina conjugada com Alexafluor 647.	90
Figura 39: Micrografias de varredura confocal a laser das CTM diferenciadas em condrócitos após 21 dias de cultura dinâmica em biorreator. Em (A) marcação para DAPI, colágeno II e SOX9. Em (B) marcação para DAPI, agrecana e SOX9.	92
Figura 40: Intensidade de fluorescência da marcação específica para agrecana, colágeno II e SOX9 para os <i>scaffolds</i> submetidos à condrogênese em cultura estática (A e C) e biorreator (B e D).	94

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Modelos matemáticos que descrevem o comportamento da viscosidade em função da taxa de cisalhamento para materiais pseudoplásticos.	33
Tabela 2: Parâmetros utilizados na impressão dos scaffolds de PLDLA-TMC 60/40 e 70/30.	40
Tabela 3: Valores de M_n , M_w e IP obtidos por meio do GPC.	44
Tabela 4: Temperaturas de transição vítrea (T_g) dos polímeros determinadas pelas curvas do segundo aquecimento.	48
Tabela 5: Valores da temperatura de início da perda de massa (T_{onset}) e temperatura onde a perda de massa é máxima (T_{max}) para o PLDLA e PLDLA-TMC.	49
Tabela 6: Frequência de cruzamento (ω_c) e tempo de relaxação (λ) do PLDLA-TMC 60/40 e 70/30.	53
Tabela 7: Parâmetros de ajuste do PLDLA-TMC 60/40 para o modelo de Carreau-Yasuda nas temperaturas de 90°C – 120°C.	62
Tabela 8: Parâmetros de ajuste do PLDLA-TMC 60/40 para o modelo de Cross nas temperaturas de 130°C – 190°C.	63
Tabela 9: Parâmetros de ajuste do PLDLA-TMC 70/30 para o modelo de Carreau-Yasuda.	65
Tabela 10: Valores de M_n , M_w e IP para os <i>scaffolds</i> de PLDLA-TMC 60/40 impressos em diferentes temperaturas.	69
Tabela 11: Valores de M_n , M_w e IP para os <i>scaffolds</i> de PLDLA-TMC 70/30 impressos em diferentes temperaturas.	72
Tabela 12: Temperatura de transição vítrea (T_g) dos <i>scaffolds</i> impressos de PLDLA-TMC 60/40 determinadas por DSC.	74
Tabela 13: Temperatura de transição vítrea (T_g) dos <i>scaffolds</i> impressos de PLDLA-TMC 70/30 determinadas por DSC.	76
Tabela 14: Temperatura dos eventos de perda de massa dos <i>scaffolds</i> impressos de PLDLA-TMC 60/40 em função da temperatura de impressão.	77
Tabela 15: Temperatura dos eventos de perda de massa dos <i>scaffolds</i> impressos de PLDLA-TMC 70/30 em função da temperatura de impressão.	78
Tabela 16: Módulo de elasticidade dos <i>scaffolds</i> impressos de PLDLA-TMC 60/40 e 70/30.	81
Tabela 17: Valores de M_n e M_w dos <i>scaffolds</i> de PLDLA-TMC 60/40 impressos na temperatura de 120°C, em diferentes velocidades (4 mm/s e 8 mm/s).	82

Tabela 18: Massa das amostras submetidas à degradação durante 2 e 4 semanas comparada à massa das amostras antes do ensaio.	84
Tabela 19: Valores de M_n , M_w e IP das amostras submetidas à degradação durante 2 e 4 semanas.....	85
Tabela 20: Temperatura de transição vítrea (T_g) e temperatura dos eventos de perda de massa dos <i>scaffolds</i> submetidos à degradação durante 2 e 4 semanas.	87

LISTA DE ABREVIATURAS

λ	Constante de tempo
$\dot{\gamma}$	Taxa de cisalhamento
3D	Tridimensional
3ITT	Ensaio de tixotropia de três pontos
ASTM	American Society for Testing and Materials
CMI	<i>Collagen Meniscus Implant</i>
CTM	Célula-tronco mesenquimal
DAPI	4',6-diamidino-2-fenilindol
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DSC	Calorimetria Exploratória Diferencial
EDTA	Ácido Etileno Diamino Tetra-acético
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FTIR	Espectroscopia por Infravermelho com Transformada de Fourier
G'	Módulo de armazenamento
G''	Módulo de perda
GPC	Cromatografia de Permeação em Gel
IP	Índice de polidispersividade
ISO	International Organization for Standardization
k	Índice de consistência
MA	Manufatura Aditiva
MEC	Matriz extracelular
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura
M_n	Massa molar numérica média
M_w	Massa molar ponderal média
MVCL	Microscopia de Varredura Confocal a Laser
n	Índice de comportamento do fluxo
η	Viscosidade
η^*	Viscosidade complexa
η_0	Viscosidade em cisalhamento zero
η_∞	Viscosidade em cisalhamento infinito
PBS	Tampão fosfato-salino

PCL	Policaprolactona
PFA	Paraformaldeído
PLA	Poli(ácido láctico)
PDLA	Poli(D,L-ácido láctico)
PLLA	Poli(L-ácido láctico)
PLDLA	Poli(L-co-D,L ácido láctico)
PLDLA-TMC	Poli(L-co-D,L ácido láctico-co-trimetileno carbonato)
PU	Poliuretano
SFB	Soro Fetal Bovino
SOX9	Fator de transcrição SOX9
TMC	Trimetileno Carbonato
Tan δ	Fator de amortecimento
THF	Tetraidrofurano
TG	Termogravimetria
T_g	Temperatura de Transição Vítrea
UV-C	Radiação ultravioleta
ω	Frequência angular
ω_c	Frequência de cruzamento

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	23
2 REFERENCIAL TEÓRICO	24
3 OBJETIVOS	36
3.1 Objetivo Geral.....	36
3.2 Objetivos Específicos	36
4 MATERIAIS E MÉTODOS.....	36
4.1 Cromatografia de Permeação em Gel (GPC).....	38
4.2 Espectroscopia por Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR).....	38
4.3 Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC).....	38
4.4 Termogravimetria (TG)	38
4.5 Parâmetros reológicos.....	38
4.5.1 Ensaio em regime oscilatório.....	39
4.5.2 Ensaio em regime estacionário	39
4.5.3 Tixotropia	39
4.6 Impressão dos <i>scaffolds</i>	40
4.7 Índice de carbonila	41
4.8 Ensaio mecânico de compressão.....	41
4.9 Estudo da degradação <i>in vitro</i> dos <i>scaffolds</i> impressos de PLDLA-TMC	41
4.10 Cultura de células.....	42
4.10.1 Citocompatibilidade	42
4.10.2 Diferenciação celular em condrócitos	42
4.10.3 Cultura dinâmica em biorreator.....	42
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	44
1ª Etapa – Caracterização físico-química, térmica e reológica do copolímero PLDLA e do terpolímero PLDLA-TMC nas proporções de 60/40 e 70/30	44
Cromatografia de permeação em gel (GPC)	44

Espectroscopia por Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)	44
Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC)	47
Termogravimetria (TG).....	48
Ensaio reológicos.....	49
2ª Etapa – Impressão e caracterização físico-química, térmica e mecânica dos <i>scaffolds</i> de PLDLA-TMC 60/40 e PLDLA-TMC 70/30.....	68
Cromatografia de permeação em gel (GPC) dos <i>scaffolds</i> impressos de PLDLA-TMC 60/40	69
Índice de carbonila – PLDLA-TMC 60/40	70
Cromatografia de permeação em gel (GPC) dos <i>scaffolds</i> impressos de PLDLA-TMC 70/30	71
Índice de carbonila – PLDLA-TMC 70/30	73
Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC)	73
Termogravimetria.....	76
Ensaio mecânico de compressão	79
Seleção do material e da temperatura de impressão dos <i>scaffolds</i>	81
3ª Etapa – Degradação <i>in vitro</i> , citocompatibilidade e diferenciação em condrócitos em <i>scaffolds</i> impressos de PLDLA-TMC 60/40.....	84
Degradação <i>in vitro</i>	84
Citocompatibilidade	89
Cultura dinâmica em biorreator.....	91
6 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	96
7 REFERÊNCIAS	97
APÊNDICE A – CURVAS DE FTIR DOS <i>SCAFFOLDS</i> IMPRESSOS DE PLDLA-TMC 60/40.....	112
APÊNDICE B – CURVAS DE FTIR DOS <i>SCAFFOLDS</i> IMPRESSOS DE PLDLA-TMC 70/30.....	116
APÊNDICE C - TERMOGRAVIMETRIA DOS <i>SCAFFOLDS</i> IMPRESSOS DE PLDLA-TMC 60/40.....	119

APÊNDICE D - TERMOGRAVIMETRIA DOS <i>SCAFFOLDS</i> IMPRESSOS DE PLDLA-TMC 70/30.....	123
---	------------

1 INTRODUÇÃO

Nos últimos anos, o aumento da expectativa de vida tem sido acompanhado por um crescente interesse pela prática de atividades físicas e, conseqüentemente, um aumento no número de lesões traumáticas e doenças degenerativas, como ruptura dos meniscos e osteoartrite. O menisco, um componente crucial das articulações, é formado por um tecido fibrocartilaginoso que enfrenta grandes esforços mecânicos e possui baixa capacidade intrínseca de reparo. Quando lesionado, muitas vezes é removido parcial ou totalmente, o que pode levar a complicações articulares futuras.

Diante desse cenário desafiador, a engenharia tecidual surge como uma ferramenta promissora para a regeneração de tecidos. Atualmente, os principais modelos artificiais utilizados para reparação parcial do menisco são o *Collagen Meniscus Implant* (CMI[®]) e o Actifit[®]. Ambos os implantes são compostos por materiais biorreabsorvíveis e promovem a colonização por células endógenas, resultando em melhorias nos sintomas e funcionalidade do menisco. No entanto, desafios como as propriedades mecânicas inferiores do CMI[®], sua delicada implantação devido à fragilidade do material e a necessidade de aceleração do processo de regeneração através da adição de células autólogas, ainda persistem. Além disso, esses implantes não podem substituir integralmente a estrutura do menisco, sendo indicados apenas para lesões meniscais parciais. Uma alternativa em teste clínico pelo *Food and Drug Administration* (FDA) é o NUsurface[®], um implante não reabsorvível que reproduz as propriedades biomecânicas do menisco, porém, sua aplicação está associada a quadros de travamento do joelho devido à falta de fixação na articulação.

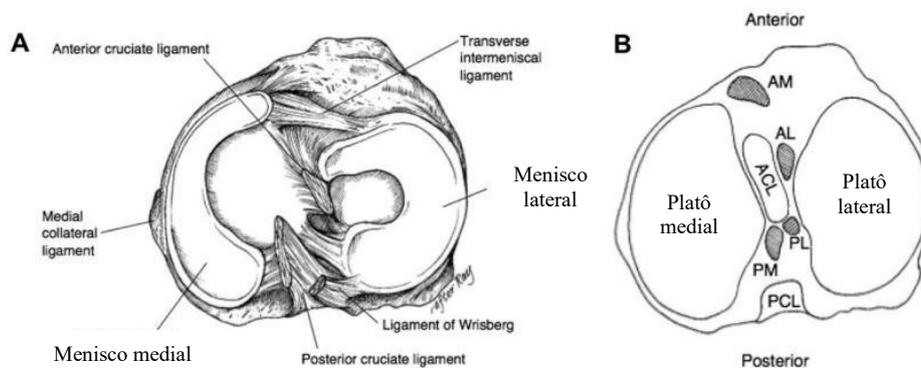
Portanto, com o intuito de explorar soluções que possam mitigar os problemas associados às lesões meniscais, foi conduzido um estudo para caracterizar o terpolímero PLDLA-TMC em proporções de 60/40 e 70/30 quanto às suas propriedades físico-químicas, térmicas, reológicas e de citocompatibilidade, visando a impressão de *scaffolds* 3D. Esta extensa caracterização tem como objetivo aprofundar o conhecimento sobre as propriedades deste material e compreender os impactos dessas propriedades em sua aplicação como modelo na engenharia tecidual de cartilagem, dada a limitada compreensão do papel regulador desses fatores no desenvolvimento de dispositivos para a regeneração de tecidos cartilaginosos.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

Com o aumento da expectativa de vida da população e o crescente interesse na prática de atividades físicas, tem-se observado um aumento significativo no número de lesões traumáticas e doenças articulares degenerativas ao longo dos anos (SUN; LUO, 2019). Dentre elas, a ruptura de menisco emerge como uma das lesões mais frequentes que afetam a articulação do joelho a qual está associada à dor e disfunção articular, podendo levar a quadros de osteoartrite progressiva (MORDECAI et al., 2014).

Os meniscos são estruturas fibrocartilaginosas que desempenham um papel fundamental na transmissão e distribuição de cargas na articulação do joelho. O menisco medial, em formato de "C", atua diretamente na manutenção da estabilidade ântero-posterior do joelho, enquanto o menisco lateral, em formato de "U", contribui para a estabilidade rotacional (NOVARETTI et al., 2019) (Figura 1). Suas propriedades únicas são determinadas pela complexa interação entre sua anatomia, ultraestrutura e composição tecidual (FOX et al., 2012).

Figura 1: (A) Vista superior da anatomia dos meniscos. (B) Vista axial de um platô tibial direito mostrando seções do menisco e sua relação com os ligamentos cruzados.



Fonte: (Adaptado de FOX et al., 2012).

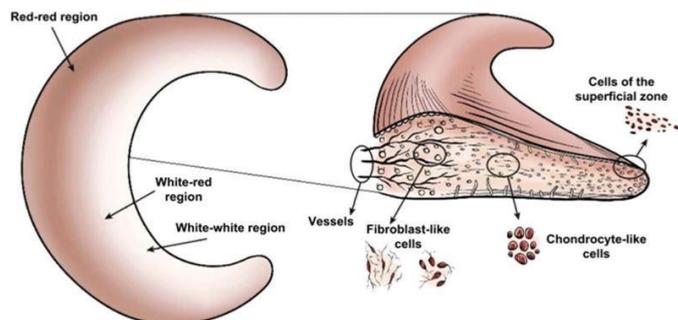
Durante atividades normais de movimento, como caminhar, a articulação do joelho é submetida a uma carga mecânica que pode ser até cinco vezes maior que o peso corporal em repouso (KLARMANN et al., 2021). Diante dessa demanda, o tecido meniscal se deforma e gera tensões que se propagam em todas as direções através da matriz extracelular (MEC).

A MEC do menisco é composta principalmente por água, agrecana e colágeno tipo II. A agrecana consiste em uma proteína altamente hidrofílica que tem a capacidade

de se ligar a grandes quantidades de água, formando complexos de proteoglicanos. Esses complexos têm uma função de "amortecedor", ajudando a distribuir as cargas mecânicas ao longo do menisco de forma mais uniforme. A presença da agrecana confere ao menisco sua característica de resistência à compressão, permitindo que ele absorva choques e proteja as superfícies articulares (MANGE et al., 2024). O colágeno, por sua vez, é organizado em feixes que fornecem suporte mecânico ao menisco, permitindo-lhe resistir às forças de tensão e compressão durante os movimentos articulares. Além disso, a organização específica do colágeno, com fibras orientadas em diferentes direções, contribui para sua capacidade de distribuir cargas de forma eficaz ao longo do tecido (TRAMS; KAMINSKI, 2024). Dessa forma, por meio deste intrincado processo, o menisco é capaz de distribuir e absorver as cargas durante os movimentos articulares, ajudando a proteger a articulação do joelho contra lesões.

Outra característica típica dos meniscos está relacionada à sua limitada vascularização. Tradicionalmente, três zonas distintas são identificadas: a zona vascular (*red-zone*), localizada na periferia, a zona avascular (*white-zone*), central, e a zona intermediária com atributos de ambas as zonas (*white-red zone*). Em relação às células que constituem o tecido, o exame histológico da zona branca revela células arredondadas, semelhantes aos condrócitos, enquanto as células da zona vermelha têm aparência oval ou fusiforme e são classificadas como fibroblastos (Figura 2). Assim, a composição e estrutura dos meniscos são mantidas por meio de um equilíbrio das atividades anabólicas e catabólicas das células residentes, frequentemente referidas como fibrocondrócitos (MAKRIS et al., 2011; FOX et al., 2012; MCNULTY; GUILAK, 2015).

Figura 2: Variações anatômicas na vascularização e população celular nos meniscos.



Fonte: (MAKRIS et al., 2011).

Considerando a importância do suprimento sanguíneo no contexto da regeneração tecidual, os meniscos apresentam baixa capacidade intrínseca de reparo. Durante muito tempo, acreditava-se que os meniscos não serviam a nenhum propósito funcional e no caso de lesões estes eram frequentemente removidos por meniscectomia (MCDERMOTT; AMIS, 2006). A meniscectomia parcial ou total, no entanto, apesar de melhorar a dor e parte da funcionalidade da articulação, não protege contra o desenvolvimento de osteoartrite (MCNULTY; GUILAK, 2015). Além disso, após a meniscectomia total, a área de contato tíbio-femoral aumenta em aproximadamente 50%, reduzindo a capacidade de absorção de estresse do joelho (FRIZZIERO et al., 2012). Especificamente, a pressão de contato aumenta em 24% após uma meniscectomia parcial e em 134% após uma meniscectomia total, em comparação com um menisco íntegro. Esse aumento na pressão de contato pode contribuir para o desenvolvimento de problemas como osteoartrite do joelho (VIGNES et al., 2022). Nesse contexto, novas estratégias têm sido desenvolvidas ao longo dos anos a fim de aprimorar o tratamento das lesões meniscais e melhorar a qualidade de vida dos pacientes, entre elas, o implante de meniscos artificiais (KLUYSKENS et al., 2022).

Atualmente, os modelos artificiais mais amplamente utilizados para reparação parcial do menisco são o CMI[®] e o Actifit[®]. O CMI[®], comercializado pela Stryker Corporation (Kalamazoo, MI, EUA), passou por seu primeiro ensaio clínico em 1997 e recebeu a aprovação do FDA (*Food and Drug Administration*) em 2008 nos Estados Unidos (STEADMAN et al., 2005). É composto por fibras de colágeno tipo I derivadas de tendões de Aquiles bovinos e glicosaminoglicanos. Por outro lado, o Actifit[®] (Orteq Sports Medicine Ltd., Londres, Reino Unido) é composto por uma mistura sintética de policaprolactona (PCL) e poliuretano (PU) (BAYNAT et al., 2014). Ambos os *scaffolds* são biorreabsorvíveis e promovem a colonização por células endógenas que se diferenciam e regeneram a fibrocartilagem. Uma recente meta-análise destacou que ambos os implantes têm apresentado resultados clínicos favoráveis, com melhorias nos sintomas e na funcionalidade do menisco, e uma taxa de falha relativamente baixa (7% para o CMI[®] e 9% para o Actifit[®]) (REALE et al., 2022). No entanto, ainda há desafios a serem superados. O CMI[®] possui propriedades mecânicas inferiores em comparação com o menisco nativo e sua implantação é delicada, devido à fragilidade do material (MARTINEK et al., 2006; BULGHERONI et al., 2016). Além disso, sua remodelação após a implantação é um processo lento, com a estrutura geral do *scaffold* ainda visível após seis meses (REGUZZONI et al., 2005). A invasão por células endógenas também

pode ser insuficiente, sendo sugerida a adição de células autólogas antes do implante para acelerar o processo de regeneração (MARTINEK et al., 2006). Tanto o CMI[®] quanto o Actifit[®] não podem substituir integralmente a estrutura do menisco, sendo indicados apenas para lesões meniscais parciais (REALE et al., 2022). Uma alternativa à substituição integral do menisco, ainda em testes clínicos pelo FDA, consiste no implante não reabsorvível NUsurface[®] (Active Implants LLC, Memphis, TN, EUA) feito de polietileno reforçado com policarbonato uretano. Este dispositivo é particularmente interessante por reproduzir as propriedades biomecânicas do menisco, mas pode resultar em travamento do joelho devido à sua falta de fixação na articulação (ELSNER et al., 2010; SHEMESH et al., 2014).

Frente a esse cenário, a engenharia tecidual desponta como uma área de grande potencial na busca por novas terapias em medicina regenerativa. Este campo integra de forma interdisciplinar os princípios da medicina, biologia e engenharia, com o propósito de desenvolver substitutos biológicos capazes de restaurar, manter e aprimorar as funções dos tecidos (NII; KATAYAMA, 2021; RAHMATI et al., 2021). Baseia-se no uso de *scaffolds* 3D biorreabsorvíveis, os quais servem como substrato para a adesão e proliferação celular, com o objetivo de promover a regeneração dos tecidos (CHUNG; BURDICK, 2008; HARAGUCHI et al., 2012). Sua finalidade é mimetizar a estrutura da matriz extracelular e fornecer suporte a partir de uma organização 3D (QU et al., 2019). Inúmeros polímeros naturais e sintéticos têm sido usados na fabricação de *scaffolds* e entre os polímeros sintéticos, destaca-se o Poli(ácido lático) (PLA). O PLA é um poliéster alifático hidrofóbico, o qual pode existir em duas formas estereoquímicas distintas: poli(L-ácido lático) (PLLA) e o poli(D,L-ácido lático) (PDLA) (NAMPOOTHIRI et al., 2010). Ambos apresentam propriedades intrínsecas à sua configuração. O PLLA é um polímero altamente cristalino, com propriedades de resistência mecânica superiores aos polímeros amorfos. No entanto, devido à alta cristalinidade, os implantes obtidos a partir desse material apresentam baixa taxa de degradação e absorção pelo organismo (MOTTA; DUEK, 2007). O PDLA, por sua vez, consiste em um polímero completamente amorfo, que apresenta tempo de degradação e módulo elástico inferiores quando comparado ao PLLA (MIDDLETON; TIPTON, 2000). Dessa forma, a copolimerização do diéster cíclico do L-ácido lático com o diéster cíclico do D,L-ácido lático (PLDLA) consiste em uma estratégia para combinar as propriedades de ambos os monômeros e contornar os fatores que limitam sua aplicação de forma individualizada (AMANO et al., 2004). A partir da copolimerização, uma redução da

crystalinidade e do tempo de degradação são identificados, no entanto, o copolímero PLDLA apresenta alto módulo de elasticidade e baixo alongamento na ruptura, conferindo a ele características de um material frágil (MOTTA; DUEK, 2007). Para aplicações que demandam certa deformação por parte do material, sem ruptura do mesmo, como no caso dos meniscos, seu uso pode ser limitado. Logo, uma forma de ampliar o espectro de aplicação do copolímero PLDLA consiste na inserção do trimetileno carbonato (TMC) na composição do material, formando o terpolímero poli(L-co-D,L ácido láctico-co-TMC) (PLDLA-TMC) (MESSIAS et al., 2014). A inserção do TMC confere maior flexibilidade ao material, tornando-o menos rígido, o que permite um maior número de aplicações na área ortopédica (BROSSIER et al., 2021).

No contexto da engenharia tecidual, no entanto, o sucesso desses materiais também depende da técnica de cultura empregada. A cultura 3D, por exemplo, emergiu como uma abordagem padrão-ouro na construção e regeneração de tecidos, pois permite a formação de estruturas multicelulares mais complexas, permitindo uma comunicação celular mais eficaz e a representação mais precisa dos tecidos *in vivo* (MCDERMOTT et al., 2019). Ainda assim, quando a cultura 3D é realizada por meio de estratégias convencionais de cultura estática, seu êxito pode ser limitado. Isso ocorre porque na cultura estática uma suspensão de células concentrada é adicionada à superfície do *scaffold*, o que pode resultar em uma distribuição celular heterogênea, com baixa eficiência de semeadura e penetração celular limitada. Consequentemente, a cultura estática em *scaffolds* 3D proporciona uma distribuição celular menos eficiente em comparação com a cultura dinâmica (BEŞKARDEŞ et al., 2018; KATO et al., 2018).

O organismo humano representa um intrincado conjunto de ambientes dinâmicos nos quais interações bioquímicas, físico-químicas e mecano-estruturais regulam o comportamento das células. Estas células são constantemente expostas a forças de cisalhamento, compressão e tensão, cuja intensidade está relacionada às características funcionais do próprio tecido. Dessa forma, estratégias *in vitro* que sejam capazes de mimetizar a dinâmica *in vivo* proporcionam uma compreensão mais aprofundada dos processos biológicos fundamentais. Nesse contexto, os biorreatores desempenham um papel vital, permitindo a cultura celular em um ambiente controlado, que garante a manutenção e a nutrição das células no interior do *scaffold* (JULIAN; AL-RUBEAI, 2005; FRITH et al., 2010). Assim, os biorreatores podem reproduzir de forma mais precisa as condições de um organismo vivo, proporcionando um ambiente fisiológico *in*

vitro específico do tecido de interesse (ROSSER; THOMAS, 2018), garantindo resultados mais próximos dos obtidos em ensaios pré-clínicos.

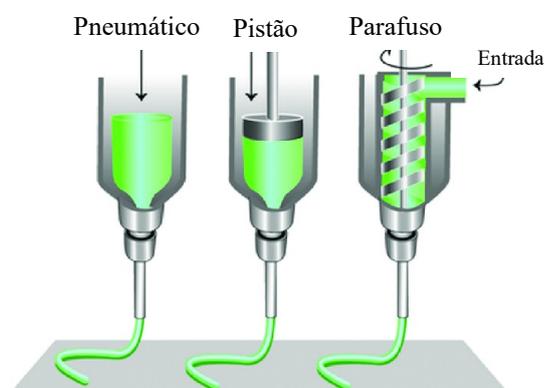
Dentre os diversos tipos de biorreatores, os de perfusão têm mostrado ser altamente eficazes na formação de tecido cartilaginoso uma vez que melhoram a qualidade da cartilagem ao promover uma melhor retenção da matriz extracelular (SHAHIN; DORAN, 2011). Além disso, a cartilagem cultivada em biorreatores de perfusão apresentou propriedades biomecânicas semelhantes àquelas da cartilagem nativa (SANTORO et al., 2010).

Logo, o desenvolvimento e o avanço da tecnologia referente aos biorreatores garantem um grande progresso no campo da engenharia tecidual, uma vez que eles fornecem os meios tecnológicos para a realização de estudos controlados (MARTIN et al., 2004). Da mesma forma, ao longo dos anos, uma variedade de métodos de processamento de polímeros foi amplamente desenvolvida para a obtenção de *scaffolds* 3D para aplicação na engenharia tecidual (REVES et al., 2009; KIM et al., 2012; THADAVIRUL et al., 2013; AKBARZADEH; YOUSEFI, 2014; RAKOVSKY et al., 2014). Muitos destes métodos, entretanto, não permitem um controle preciso das propriedades dos *scaffolds*, principalmente no que se refere à porosidade. Para superar esse desafio, as técnicas de manufatura aditiva (MA) surgiram como uma abordagem que permite o controle preciso da geometria dos *scaffolds* (ZHOU et al., 2021).

A MA, também conhecida como impressão 3D, consiste em uma técnica de processamento e obtenção de dispositivos tridimensionais a partir do uso de diferentes materiais (metais, polímeros, cerâmicas, entre outros). O processo baseia-se na união de material em camadas sucessivas, a partir de um modelo gerado por computador (BOSE et al., 2018; NATH; NILUFAR, 2020). Uma de suas principais vantagens é a obtenção de objetos personalizados sem a necessidade de moldes, reduzindo o custo de produção quando comparado a outras técnicas (FRANCHETTI; KRESS, 2017). No contexto da engenharia tecidual, há uma demanda por *scaffolds* que forneçam suporte estrutural e mecânico, que apresentem porosidade para garantir o suprimento de nutrientes para as células e permitir a vascularização e que tenham a capacidade de se remodelar e integrar com o organismo quando implantado (ZHANG et al., 2022). A MA permite a obtenção de *scaffolds* com esses requisitos por meio de um controle preciso do processo de impressão, a partir da seleção assertiva de biomateriais e técnicas compatíveis (JUNGST et al., 2016). As técnicas de MA podem ser classificadas em sete categorias principais, de acordo com os métodos de deposição do material (ISO/ASTM 52900:2015). Dentre os

diferentes processos, a impressão por extrusão é um dos métodos mais difundidos para obtenção de *scaffolds* poliméricos, sobretudo devido à constante evolução dos projetos *open-source* de impressoras 3D *desktop*, que possibilita a adaptação de impressoras 3D para a criação de modelos de baixo custo. O material polimérico amolecido ou fundido é extrudado através de um bico de diâmetro reduzido e depositado camada por camada em uma plataforma de construção (CALIGNANO et al., 2017). O escoamento do material pode ser controlado por um sistema pneumático, de pistão ou rosca (LIU; YAN, 2018) (Figura 3).

Figura 3: Representação esquemática dos diferentes mecanismos de extrusão.



Fonte: Adaptado de LIU; YAN (2018).

Na deposição por sistema pneumático, o controle de pressão ocorre a partir da pressurização de um gás. No sistema de pistão, o material é bombeado através de um êmbolo, enquanto no sistema de roscas, um parafuso transporta o material até a bico de extrusão (JUNGST et al., 2016). Os sistemas de pistão apresentam controle direto da deposição do material, tornando-o um dos métodos mais viáveis para impressão de *scaffolds*, uma vez que permite a impressão de estruturas complexas em menores intervalos de tempo (YU et al., 2020).

No processo de extrusão, a qualidade da impressão depende de vários parâmetros, incluindo a temperatura de amolecimento do polímero, a temperatura do leito de impressão, diâmetro do bico, espessura da camada, orientação e velocidade da impressão (SHETH et al., 2017). Além disso, se a viscosidade do material for muito baixa no momento da impressão, as camadas do *scaffold* poderão apresentar falhas devido à sua incapacidade de suportar as camadas subsequentes, criando instabilidade estrutural. Em contraste, se a viscosidade for alta, isso pode impedir a extrusão (CICALA et al., 2018).

Portanto, o conhecimento das propriedades reológicas do material é fundamental para que o processo de impressão por extrusão seja bem-sucedido.

A reologia é a ciência que estuda o fluxo e a deformação da matéria sob influência de uma tensão, em regime de cisalhamento estacionário ou oscilatório. A caracterização reológica dos materiais é de grande relevância quando se almeja a obtenção de *scaffolds* por impressão 3D, uma vez que os comportamentos viscoelástico, viscoso e tixotrópico apresentado pelo material indicam a sua aplicabilidade (ABRAHAM et al., 2017).

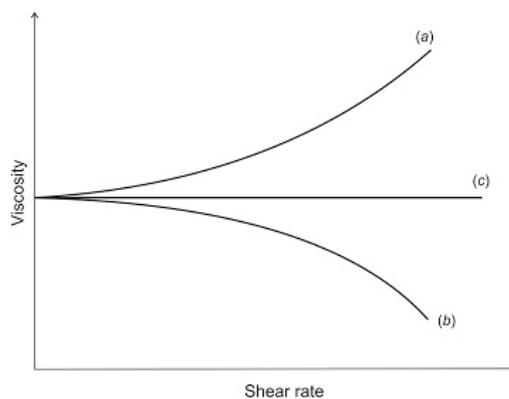
A descrição das propriedades reológicas tem por base a definição de três tipos distintos de materiais: os materiais viscosos, os quais dissipam todo o trabalho externo aplicado durante a deformação, os materiais elásticos, que armazenam todo o trabalho externo aplicado, e os materiais viscoelásticos, capazes de armazenar e dissipar o trabalho externo (BRETAS; d'ÁVILLA, 2006). Por se tratar de uma propriedade inerente aos materiais de elevada massa molar, os polímeros pertencem ao grupo dos materiais viscoelásticos.

Como forma de medir as propriedades viscoelásticas dos polímeros, realiza-se o ensaio de cisalhamento oscilatório em pequena amplitude (AGIRRE-OLABIDE et al., 2014). A partir deste ensaio é possível quantificar, separadamente, a contribuição elástica e viscosa do material, correspondentes aos módulos de armazenamento (G') e perda (G''), respectivamente. Quando o material apresenta $G' > G''$ diz-se que o material tem características predominantes de um sólido elástico. Em contraste, quando $G'' > G'$, o material apresenta características predominantes de líquido viscoso (KHAN et al., 2021). A compreensão do comportamento viscoelástico do material auxilia no entendimento de sua processabilidade e na seleção de parâmetros de impressão (KUZMAN et al., 2019). Além disso, considerando que o comportamento viscoelástico dos materiais é uma função do tempo e da temperatura, a definição de um conjunto de ensaios em diferentes condições se faz importante quando se almeja a impressão por extrusão, a fim de caracterizar o material em circunstâncias operacionais distintas (IBRULJ; DZAFEROVIC, 2020).

Quando um material é submetido a uma taxa de cisalhamento em regime estacionário, este pode se comportar de três formas distintas: 1) como um fluido Newtoniano, 2) como um dilatante ou, 3) como um pseudoplástico (A. ARSHINOFF et al., 2021). No caso dos fluidos Newtonianos, independentemente das tensões ou deformações aplicadas, a viscosidade (η) é constante, ou seja, tais materiais apresentam apenas um único valor de viscosidade (CHHABRA, 2010). No caso dos dilatantes,

observa-se um aumento da viscosidade em função do aumento da taxa de cisalhamento. Tais materiais não são aplicáveis à impressão por extrusão, visto que as altas taxas de cisalhamento impostas no bico da impressora (10^2 - 10^3 s⁻¹) ocasionariam um aumento da viscosidade do material, impossibilitando sua impressão (ZOŁEK-TRYZNOWSKA, 2015). Os materiais que apresentam comportamento pseudoplástico, por sua vez, demonstram uma diminuição da viscosidade frente ao aumento da taxa de cisalhamento (FANG; HANNA, 1999). Ocorre tanto em soluções poliméricas concentradas como em polímeros fundidos, os quais são compatíveis com o processo de impressão por extrusão (DEO et al., 2020) (Figura 4).

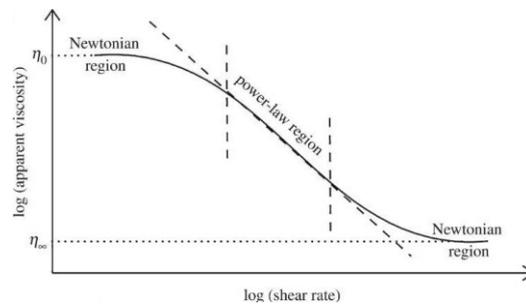
Figura 4: Representação esquemática do comportamento da viscosidade em função da taxa de cisalhamento para (a) um material dilatante; (b) um material pseudoplástico; e (c) um fluido Newtoniano.



Fonte: (ZOŁEK-TRYZNOWSKA, 2015).

Dessa forma, diferentemente dos fluidos Newtonianos, para os pseudoplásticos é necessário a obtenção de uma função que descreva a dependência da viscosidade em relação à taxa de cisalhamento. Na maioria dos polímeros fundidos, a curva de viscosidade *versus* taxa de cisalhamento apresenta duas regiões: uma a baixas taxas de cisalhamento, chamada platô Newtoniano, em que os valores da viscosidade independem da taxa de cisalhamento aplicada, e outra a altas taxas de cisalhamento, chamada de região de Lei das Potências, em que a viscosidade decresce em função das taxas de cisalhamento. Alguns materiais podem ainda apresentar um terceiro platô em altas taxas de cisalhamento, acima da região de Lei das Potências, onde o alinhamento das cadeias atingiu seu limite e a viscosidade novamente se torna independente à variação da taxa (BRETAS; d'ÁVILA, 2006) (Figura 5).

Figura 5: Curva de viscosidade de um material pseudoplástico, evidenciando o platô Newtoniano a baixas (η_0) e altas (η_∞) taxas de cisalhamento e a região de Lei das Potências.



Fonte: (IONESCU et al., 2020).

Alguns modelos matemáticos possibilitam descrever o comportamento pseudoplástico dos materiais, entre eles os modelos de Cross e Carreau-Yasuda. O modelo de Carreau-Yasuda permite descrever o comportamento da viscosidade do material a baixas, médias e altas taxas de cisalhamento. Prevê um patamar Newtoniano a baixas taxas de cisalhamento (η_0), a região de Lei das Potências, e um patamar Newtoniano a altas taxas de cisalhamento (η_∞). O modelo de Cross é semelhante ao Carreau-Yasuda, no entanto, não prevê o patamar a altas taxas de cisalhamento (Tabela 1).

Tabela 1: Modelos matemáticos que descrevem o comportamento da viscosidade em função da taxa de cisalhamento para materiais pseudoplásticos.

Modelo	Equação	Parâmetros
Cross	$\eta = \eta_\infty + \frac{\eta_0 - \eta_\infty}{1 + [k \cdot \dot{\gamma}]^n}$	η_0 : viscosidade em cisalhamento zero;
		η_∞ : viscosidade em cisalhamento infinito; k : índice de consistência; n : índice de comportamento do fluxo.
	$\eta = \eta_\infty + \frac{\eta_0 - \eta_\infty}{(1 + (\lambda \dot{\gamma})^a)^{\frac{1-n}{a}}}$	η_0 : viscosidade em cisalhamento zero;

Carreau-Yasuda

η_{∞} : viscosidade em cisalhamento infinito;

λ : constante de tempo;

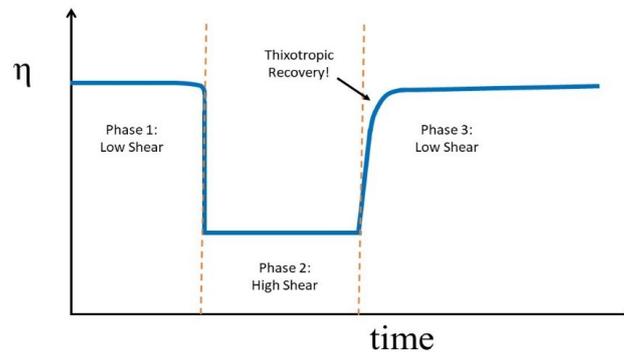
a : parâmetro adimensional que descreve a região de transição entre η_0 e a região de Lei das Potências;

n : índice de comportamento do fluxo.

Para ambos os modelos, o parâmetro n da equação é uma medida da pseudoplasticidade do material. Valores de $n < 1$ indicam que a viscosidade diminui com o aumento da taxa de cisalhamento e o material apresenta comportamento pseudoplástico. Maior grau de pseudoplasticidade é observado para n tendendo a zero. Valores de $n > 1$ indicam que a viscosidade aumenta com a taxa de cisalhamento e o material apresenta comportamento dilatante (RAPP, 2017). A caracterização da pseudoplasticidade do material auxilia de maneira direta na seleção dos parâmetros de impressão.

Para alguns materiais, o comportamento pseudoplástico é reversível, ou seja, há uma recuperação da viscosidade inicial quando o cisalhamento é retirado. Dessa forma, o comportamento tixotrópico é dependente do tempo e não da taxa de cisalhamento (BRETAS; d'ÁVILA, 2006). A tixotropia de um material pode ser caracterizada a partir de um ensaio de tixotropia em três intervalos (3ITT). A resposta típica de um material com comportamento tixotrópico está demonstrada na Figura 6. A partir deste ensaio, é possível simular o comportamento reológico do material antes, durante e após a impressão, quando a taxa de cisalhamento é retirada e o material pode recuperar sua viscosidade (MU et al., 2021).

Figura 6: Curva de recuperação da viscosidade (η) em função do tempo a partir do ensaio de tixotropia em três intervalos (3ITT).



Fonte: (MU et al., 2021).

Diante do exposto, fica evidente que no contexto da engenharia tecidual, a escolha do material e do método de processamento para a fabricação de *scaffolds* é um processo que demanda uma análise cuidadosa de diversos fatores. Devido às suas propriedades termoplásticas, estabilidade térmica e biocompatibilidade, a literatura consolida os polímeros a base de Poli(ácido láctico) como excelentes candidatos à engenharia tecidual a partir da obtenção de *scaffolds* por impressão 3D (SENATOV et al., 2016; TYLER et al., 2016). Embora estudos anteriores tenham evidenciado esse potencial, o entendimento das propriedades, sobretudo reológicas, do PLDLA-TMC sempre fora limitado. Portanto, o conhecimento aprofundado das propriedades do PLDLA-TMC e a compreensão de como essas propriedades podem impactar sua aplicação como modelo na engenharia tecidual de cartilagem se faz de grande importância, dada a limitada compreensão do papel regulador desses fatores no desenvolvimento de dispositivos para a regeneração de tecidos cartilagosos, tais como os meniscos.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Realizar a impressão 3D de *scaffolds* tridimensionais de PLDLA-TMC como modelo para engenharia tecidual de cartilagem.

3.2 Objetivos Específicos

1ª Etapa:

- Caracterizar físico-química, reológica e termicamente o terpolímero PLDLA-TMC nas proporções de 60/40 e 70/30.

2ª Etapa:

- Realizar a impressão 3D dos *scaffolds* de PLDLA-TMC 60/40 e 70/30.
- Caracterizar físico-química, mecânica e termicamente os *scaffolds* impressos de PLDLA-TMC 60/40 e 70/30.

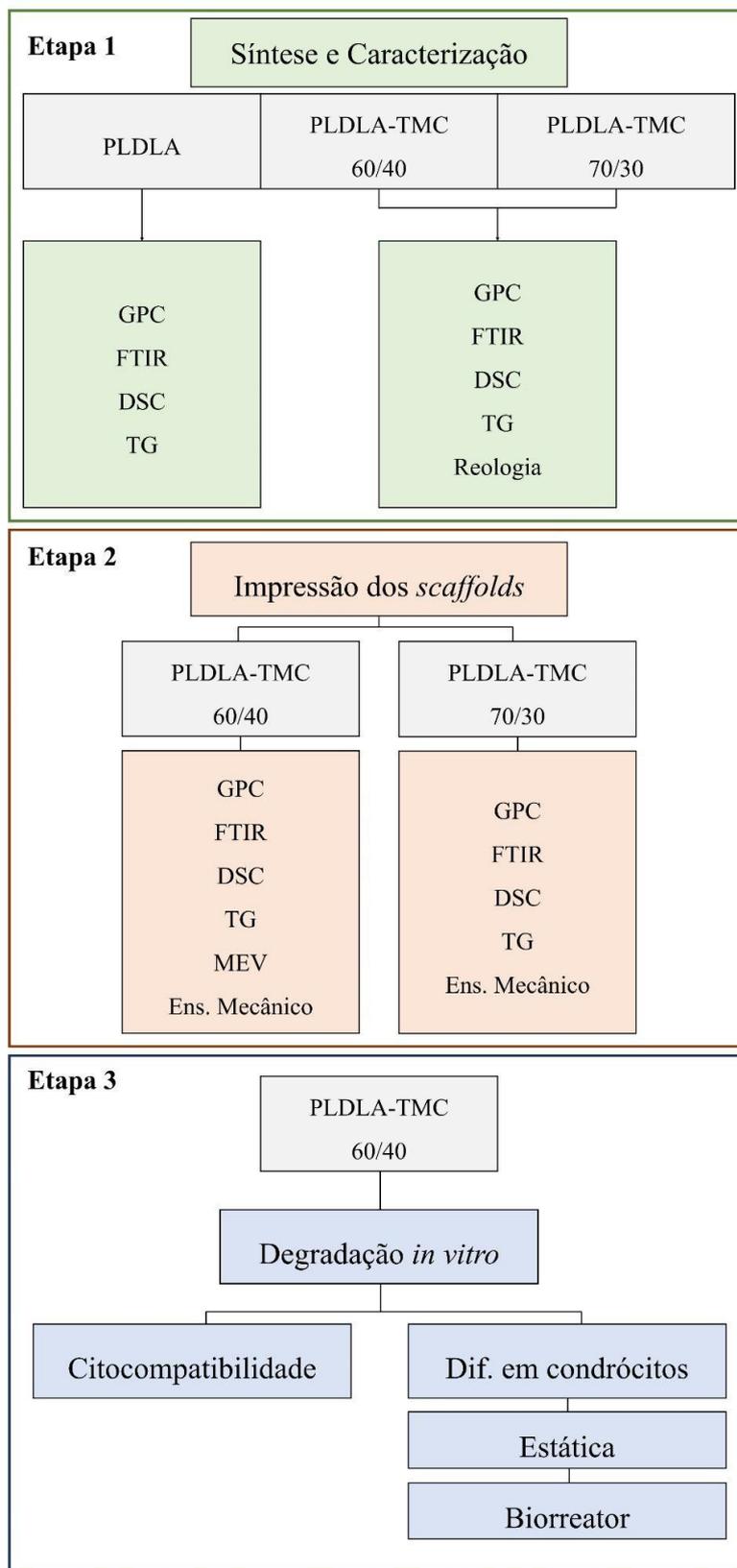
3ª Etapa:

- Realizar ensaio de degradação *in vitro* dos *scaffolds* impressos de PLDLA-TMC 60/40 ou 70/30.
- Realizar ensaios de citocompatibilidade e diferenciação celular em condrócitos nos *scaffolds* impressos de PLDLA-TMC 60/40 ou 70/30.
- Realizar ensaios de cultura celular nos *scaffolds* impressos de PLDLA-TMC 60/40 ou 70/30 em biorreator sob módulo dinâmico de perfusão.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

A metodologia empregada neste trabalho foi dividida em três etapas: **Etapa 1** – Caracterização físico-química, térmica e reológica do copolímero Poli(L-co-D,L ácido láctico) (PLDLA) e do terpolímero Poli(L-co-D,L ácido láctico-co-trimetileno carbonato) (PLDLA-TMC), nas proporções de 60/40 e 70/30 em relação aos monômeros lactídeo e trimetileno carbonato (% de massa). **Etapa 2** – Impressão e caracterização físico-química, térmica e mecânica dos *scaffolds* impressos de PLDLA-TMC 60/40 e 70/30. **Etapa 3** – Degradação *in vitro*, citocompatibilidade e diferenciação em condrócitos em *scaffolds* impressos de PLDLA-TMC 60/40 em cultura estática e dinâmica em biorreator. O fluxograma apresentado pela Figura 7 sumariza as etapas realizadas.

Figura 7: Fluxograma da metodologia empregada no projeto evidenciando suas três etapas principais.



4.1 Cromatografia de Permeação em Gel (GPC)

A massa molar numérica média (M_n), a massa molar ponderal média (M_w) e o índice de polidispersividade (IP) foram obtidos em um cromatógrafo da marca Waters. Tetraidrofurano (THF) foi utilizado como fase móvel em um sistema contendo um par de colunas 7,8 x 300 mm com partículas de 5 μm (Styragel HR), aquecidas a 35 °C e detector de índice de refração Waters 2414. Amostras dos polímeros: PLDLA, PLDLA-TMC 60/40 e PLDLA-TMC 70/30 foram injetadas manualmente (3.00 mg/mL) a um fluxo de 1,00 mL/min. Padrões de poliestireno monodisperso, aplicados sob mesma concentração e fluxo das amostras, foram utilizados para calibração.

4.2 Espectroscopia por Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)

Os espectros de FTIR para todas as amostras foram obtidos em um espectrômetro Perkin Elmer, modelo Spectrum 65, na região de 4000 cm^{-1} a 600 cm^{-1} .

4.3 Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC)

As análises de DSC foram realizadas em um equipamento da empresa TA Instruments®, modelo DSC 25. Para o primeiro aquecimento, as amostras (8 mg) foram avaliadas em intervalo de temperatura entre -50°C e 200°C, razão de aquecimento de 10°C/min e fluxo de nitrogênio de 20mL/min. Em seguida, as amostras foram resfriadas até -50°C a 10°C/min e mantidas nessa temperatura durante 1 minuto. Para o segundo aquecimento, as amostras foram aquecidas até 200°C, utilizando a mesma razão de aquecimento e fluxo de nitrogênio.

4.4 Termogravimetria (TG)

As análises de termogravimetria foram realizadas em um equipamento da empresa TA Instruments®, modelo TGA 55. As amostras (8 mg) foram avaliadas em intervalos de temperatura entre 25 e 400°C, razão de aquecimento de 10°C/min e fluxo de nitrogênio de 100mL/min.

4.5 Parâmetros reológicos

As propriedades reológicas do terpolímero PLDLA-TMC foram avaliadas por meio de ensaios em regime oscilatório e estacionário, utilizando um reômetro da TA Instruments®, modelo DHR-2, com geometria placa-placa (25 mm de diâmetro). A fim de avaliar o efeito da temperatura nas propriedades reológicas do material, os ensaios

descritos nos itens 4.5.1, 4.5.2 e 4.5.3 foram realizados para diferentes faixas de temperatura: PLDLA-TMC 60/40 - 90°C a 190°C e PLDLA-TMC 70/30 - 140°C a 190°C. As faixas de temperatura estudadas foram selecionadas de acordo com a processabilidade do material no reômetro. Para o PLDLA-TMC 60/40, foi possível amolecer o polímero à temperatura mínima de 90°C. Para o PLDLA-TMC 70/30, no entanto, a temperatura mínima de amolecimento foi de 140°C.

4.5.1 Ensaios em regime oscilatório

Foram realizados testes de varredura de amplitude e frequência em regime oscilatório. Para o ensaio de amplitude, variou-se a taxa de deformação entre 0,001% e 20%, a uma frequência angular constante de 10 rad/s, a fim de encontrar a região viscoelástica linear do material. O valor obtido a partir deste ensaio (0,2% para o PLDLA-TMC 60/40 e 0,4% para o PLDLA-TMC 70/30) foi utilizado no teste de varredura de frequência, a qual variou entre 0,1 e 100 rad/s, para obtenção dos módulos de armazenamento (G') e perda (G'').

4.5.2 Ensaios em regime estacionário

Para obtenção das curvas de viscosidade, as análises foram realizadas em regime estacionário a partir da variação da taxa de cisalhamento (0,001 a 1000 s⁻¹) e os resultados obtidos foram ajustados em dois modelos matemáticos distintos, Cross (Equação 1) e Carreau-Yasuda (Equação 2).

$$\eta = \eta_{\infty} + \frac{\eta_0 - \eta_{\infty}}{1 + [k \cdot \dot{\gamma}]^n} \quad (\text{Eq. 1})$$

$$\eta = \eta_{\infty} + \frac{\eta_0 - \eta_{\infty}}{(1 + (\lambda \dot{\gamma})^a)^{\frac{1-n}{a}}} \quad (\text{Eq. 2})$$

4.5.3 Tixotropia

A fim de avaliar se o terpolímero PLDLA-TMC apresenta comportamento tixotrópico, ou seja, se é capaz de recuperar sua viscosidade quando retirado o cisalhamento, foi realizado o ensaio de tixotropia em três intervalos (3ITT). Neste teste, inicialmente é aplicada uma taxa de cisalhamento de pequena magnitude para simular o

comportamento em “repouso” das amostras antes da impressão. Em seguida, ocorre a súbita aplicação de uma alta taxa de cisalhamento, a fim de reproduzir o efeito da passagem do material pelo bico de extrusão da impressora. Finalmente, uma baixa taxa de cisalhamento é novamente aplicada, por um período mais longo, para permitir a recuperação estrutural da amostra após a impressão (ÖZKAN et al., 2017). Para cada etapa foram aplicadas as taxas de 1 s^{-1} (25s), 1000 s^{-1} (50s) e 1 s^{-1} (300s), respectivamente.

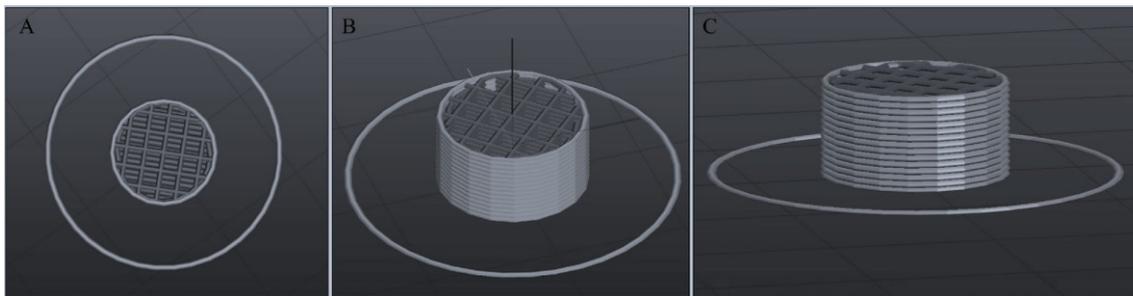
4.6 Impressão dos *scaffolds*

Para impressão dos *scaffolds* de PLDLA-TMC foi utilizada uma bioimpressora da 3D Biotechnology Solutions, modelo OctopusTM. Os *scaffolds* foram obtidos a partir do processo de impressão por extrusão via pistão. Inicialmente, foi realizada a modelagem dos *scaffolds* por meio do *software* Slic3r, onde foram definidos os parâmetros de impressão e as dimensões dos espécimes (10 mm x 2.4 mm), conforme observado na Figura 8. Para o PLDLA-TMC 60/40 foram impressos *scaffolds* nas temperaturas de 110°C, 120°C, 130°C, 140°C, 150°C, 160°C, 170°C, 180°C e 190°C. Para o PLDLA-TMC 70/30, as temperaturas de 140°C, 150°C, 160°C, 170°C, 180°C e 190°C foram utilizadas para impressão. A Tabela 2 resume os parâmetros utilizados na impressão.

Tabela 2: Parâmetros utilizados na impressão dos *scaffolds* de PLDLA-TMC 60/40 e 70/30.

	Material	
	PLDLA-TMC 60/40	PLDLA-TMC 70/30
Temperatura de impressão	110°C - 190°C	140°C - 190°C
Temperatura da mesa	Sem aquecimento	Sem aquecimento
Velocidade de impressão	4 mm/s e 8 mm/s	4 mm/s e 8 mm/s
Distância entre as camadas	0.4 mm	0.4 mm

Figura 8: Representação dos *scaffolds* durante o processo de modelagem no *software* Slic3r.



4.7 Índice de carbonila

O índice de carbonila foi calculado a partir da razão entre a intensidade no ponto máximo da banda de carbonila (C=O) em 1750 cm^{-1} e a intensidade no ponto máximo da banda de C-H em 1453 cm^{-1} (MENA et al., 2020), de acordo com a Equação 3:

$$\text{Índice de carbonila} = \frac{\text{Intensidade da banda C=O}}{\text{Intensidade da banda C-H}} \quad (\text{Eq. 3})$$

4.8 Ensaio mecânico de compressão

O ensaio mecânico de compressão foi realizado seguindo as diretrizes preconizadas pela norma ASTM D575-91. A análise foi realizada em quintuplicata usando a máquina universal de ensaios INSTRON EMIC 23-30 a 25°C com taxa de deslocamento do travessão de 12 mm/min . A espessura dos *scaffolds* impressos foi de 6 mm e o diâmetro igual a 28 mm . A partir do ensaio de compressão foi possível obter o gráfico de Compressão (MPa) x Deformação (%) dos *scaffolds* impressos de PLDLA-TMC 60/40 e 70/30.

4.9 Estudo da degradação *in vitro* dos *scaffolds* impressos de PLDLA-TMC

A degradação *in vitro* dos *scaffolds* de PLDLA-TMC 60/40 foi realizada em tampão fosfato-salino (PBS) em pH 7.4. Os *scaffolds* foram inseridos em um banho termostático e mantidos à 37°C durante 2 e 4 semanas. O ensaio foi realizado em triplicata. A morfologia dos *scaffolds*, antes e após degradação *in vitro*, foi avaliada por microscopia eletrônica de varredura (MEV) (FEI Quanta 250). Os *scaffolds* foram metalizados com uma camada de 30 nm de ouro (Leica EM ACE200) e as imagens foram obtidas em 10 kV .

4.10 Cultura de células

Para o ensaio de citocompatibilidade e diferenciação celular foram utilizadas células-tronco mesenquimais (CTM), adquiridas pela empresa Thermo Fisher Scientific (Código: R7788110). Uma vez recebidas, as células foram congeladas em nitrogênio líquido (-196°C) e então descongeladas em meio DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium, Sigma-Aldrich – código: D6046) suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) e antibióticos. As células foram expandidas em garrafas de cultura de células de 75cm² e após assumirem monocamada foram tripsinizadas com solução tripsina-EDTA a 0,2%. Células entre a 3^a e 5^a passagem foram utilizadas nos experimentos.

4.10.1 Citocompatibilidade

A fim de avaliar a citocompatibilidade do PLDLA-TMC 60/40, as CTM foram submetidas a ensaios preliminares de adesão e proliferação em *scaffolds* impressos com 10 mm de diâmetro por 1.2 mm de espessura. Os *scaffolds* foram esterilizados por radiação ultravioleta (254nm) (UV-C) durante 1h e imersos em DMEM puro por 24h à 37°C. Transcorridos os tempos de cultivo (7 e 21 dias), as células foram fixadas com paraformaldeído (PFA) a 4%, os núcleos marcados com DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindol) e o citoesqueleto marcado com faloidina conjugada com AlexaFluor 647. As análises foram feitas por microscopia de varredura confocal a laser (MVCL) (Leica TCS SP8).

4.10.2 Diferenciação celular em condrócitos

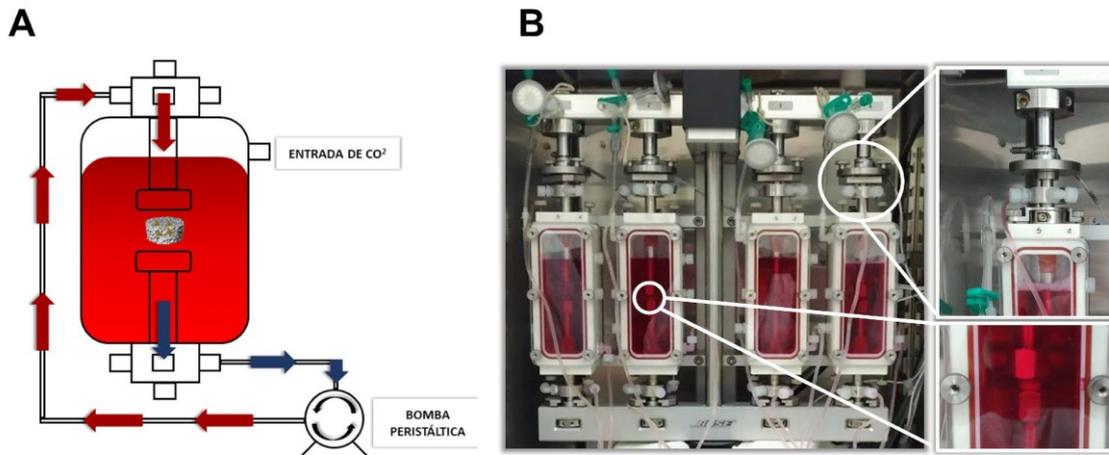
Para a diferenciação das CTM, utilizou-se o protocolo de diferenciação em condrócitos do Kit StemPro[®] (Gibco – código: A1007101). As CTM foram inicialmente semeadas nos *scaffolds* de PLDLA-TMC 60/40 (10 mm de diâmetro por 2.4 mm de espessura) em meio DMEM, suplementado com 10% de SFB e antibióticos. Uma vez estabelecida a cultura (4 dias), o meio padrão foi trocado por meio condrogênico, suplementado por fatores de crescimento de condrócitos durante 14 dias.

4.10.3 Cultura dinâmica em biorreator

Após 14 dias em cultura estática, os *scaffolds* foram acoplados às câmaras de cultura do biorreator, montadas no equipamento (Electroforce[®] BioDynamic 5210[®], Bose/TA Instruments) e mantidas a 37°C em 5% de atmosfera de CO₂ (Figura 9). Cada câmara de cultura contendo o *scaffold* foi preenchida com 180 mL de meio DMEM,

suplementado com 10% de SFB e antibióticos. Configurou-se o biorreator para bombeamento do meio a uma taxa de fluxo dinâmico contínuo de 0.4 mL/min, com base em estudo previamente publicado (CARTMELL et al., 2003). Após 21 dias, os *scaffolds* tiveram suas células fixadas com PFA a 4% e os núcleos marcados com DAPI. Foi realizada também a imunomarcação das amostras para a análise da expressão de agrecana, colágeno II e SOX9. Os resultados foram analisados por MVCL (Zeiss LSM 710). Após a obtenção das imagens, foi quantificada a expressão de agrecana, colágeno II e SOX9.

Figura 9: Sistema do biorreator Electroforce[®] BioDynamic 5210[®], Bose/TA Instruments. (A) Representação esquemática do sistema conectado à bomba peristáltica. (B) Câmaras montadas no biorreator evidenciando a célula de carga do equipamento e a posição do *scaffold* dentro da câmara.



5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Conforme descrito no Capítulo 4, referente à metodologia, a execução deste trabalho foi dividida em três etapas. Dessa forma, os resultados obtidos estão apresentados de acordo com esta divisão.

1ª Etapa – Caracterização físico-química, térmica e reológica do copolímero PLDLA e do terpolímero PLDLA-TMC nas proporções de 60/40 e 70/30

Cromatografia de permeação em gel (GPC)

Os valores da massa molar numérica média (M_n), massa molar ponderal média (M_w) e o índice de polidispersividade (IP) para os polímeros PLDLA, PLDLA-TMC 60/40 e PLDLA-TMC 70/30 estão destacados na Tabela 3.

Tabela 3: Valores de M_n , M_w e IP obtidos por meio do GPC.

Síntese	M_n (g/mol)	M_w (g/mol)	IP
PLDLA	458.787	631.171	1.37
PLDLA-TMC 60/40	163.411	257.919	1.57
PLDLA-TMC 70/30	249.165	384.149	1.54

Conforme é possível observar, os valores de massa molar obtidos foram da ordem de 10^5 g/mol, o que é compatível com polímeros de alta massa molar (LIANG et al., 2020). Tal característica é fundamental para materiais cuja aplicação demanda desempenho mecânico, como no caso das próteses de menisco, considerando que polímeros com baixa massa molar apresentam propriedades mecânicas inferiores (BALANI et al., 2015). Em relação à polidispersividade, um aumento da polidispersão é observado em função da presença do TMC, porém, quando variou-se a proporção de TMC, o índice de dispersão não apresentou alteração significativa.

Espectroscopia por Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)

A partir dos espectros de FTIR foi possível identificar a presença dos principais grupos funcionais para o terpolímero PLDLA-TMC nas proporções de 60/40 e 70/30 e para o copolímero PLDLA (Figura 10A). Todos os espectros mostraram as bandas

características da família dos Poli(ácido lácticos), entre elas: 1081 cm^{-1} (estiramento C-O), 1185 cm^{-1} (estiramento C-O-C), 1745 cm^{-1} (estiramento C=O no grupo éster), 2945 cm^{-1} (estiramento CH) e 2995 cm^{-1} (estiramento CH_3).

As bandas atribuídas à presença do TMC encontram-se nas regiões de 1745 cm^{-1} (estiramento C=O no grupo éster), 1247 cm^{-1} (estiramento assimétrico O-C-O) e 790 cm^{-1} (deformação assimétrica O=C-O) (RUCKENSTEIN; YUAN, 1998; ZHU et al., 2016) de acordo com a estrutura química do terpolímero (Figura 11). É perceptível que a banda que diferencia o espectro de PLDLA do espectro do PLDLA-co-TMC é a banda em 790 cm^{-1} , referente à deformação assimétrica da ligação (O=C-O). Além disso, a intensidade dessa banda aumenta com o aumento da proporção de TMC na amostra. (Figura 10B).

Figura 10: (A) Espectros de FTIR das amostras de PLDLA, PLDLA-TMC 60/40 e PLDLA-TMC 70/30. (B) Ampliação da região entre 700-900 cm^{-1} evidenciando o aumento da intensidade do pico em 790 cm^{-1} após correção da linha base.

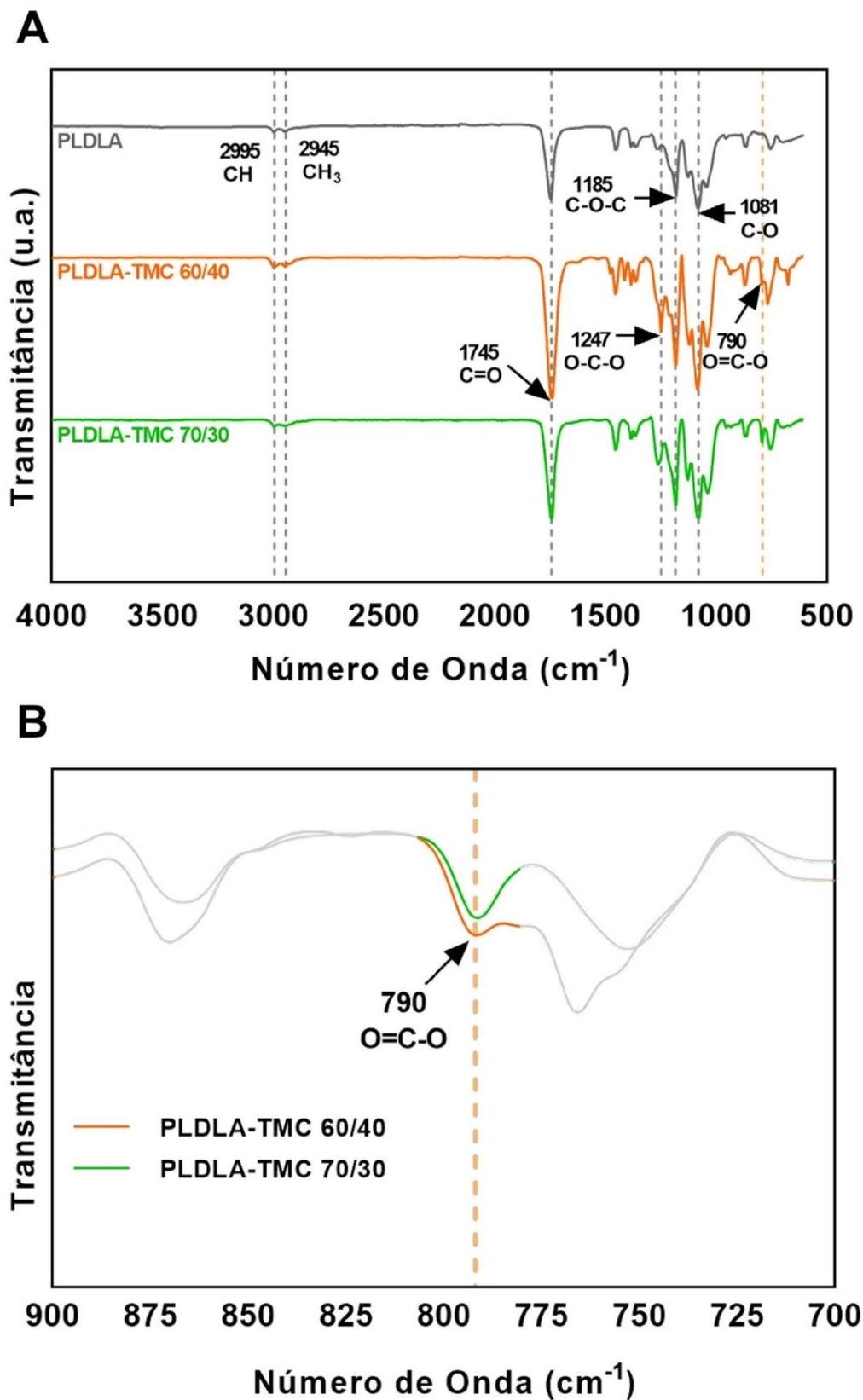
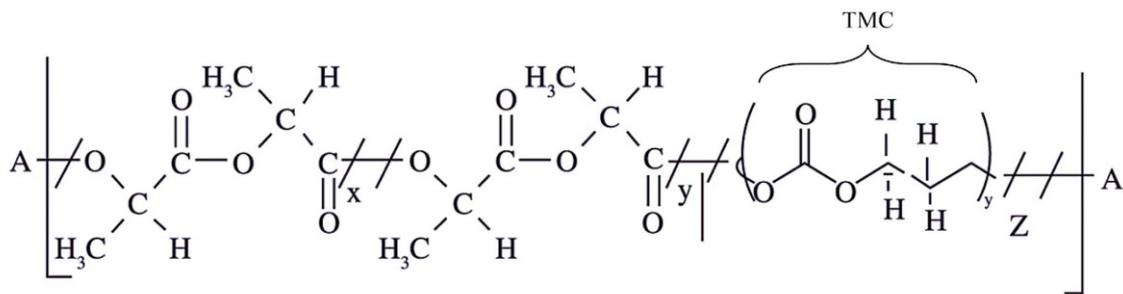


Figura 11: Estrutura química do PLDLA-TMC.

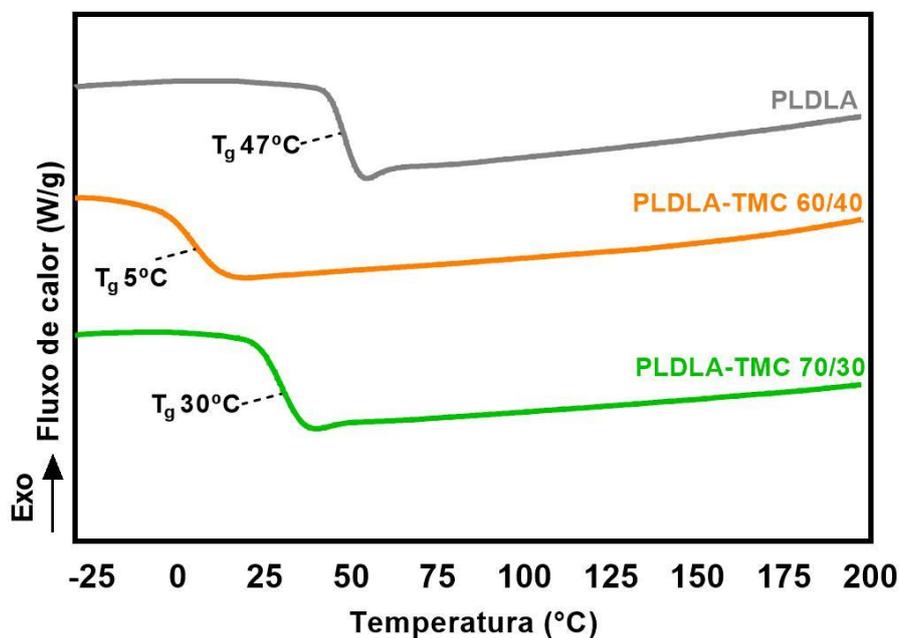


Fonte: Adaptado de MOTTA; DUEK (2014).

Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC)

As curvas de DSC para o primeiro e segundo aquecimento das amostras de PLDLA, PLDLA-TMC 60/40 e PLDLA-TMC 70/30 apresentaram apenas a temperatura de transição vítrea (T_g) (Tabela 4), indicando o caráter amorfo das mesmas. As curvas de DSC referentes ao segundo aquecimento estão apresentadas na Figura 12.

Figura 12: Curvas de DSC do segundo aquecimento das amostras de PLDLA, PLDLA-TMC 60/40 e PLDLA-TMC 70/30.



Conforme estabelecido na literatura, a síntese do copolímero PLDLA com diferentes proporções de L-lactídeo e D,L-lactídeo dá origem a um polímero completamente amorfo (MOTTA; DUEK, 2007; AURAS et al., 2010; EL-HADI, 2018).

Além disso, a adição do trimetileno carbonato facilita a mobilidade das cadeias, o que fica evidente pela diminuição dos valores de T_g conforme a proporção de TMC aumenta (DAVACHI et al., 2012; FUOCO et al., 2020).

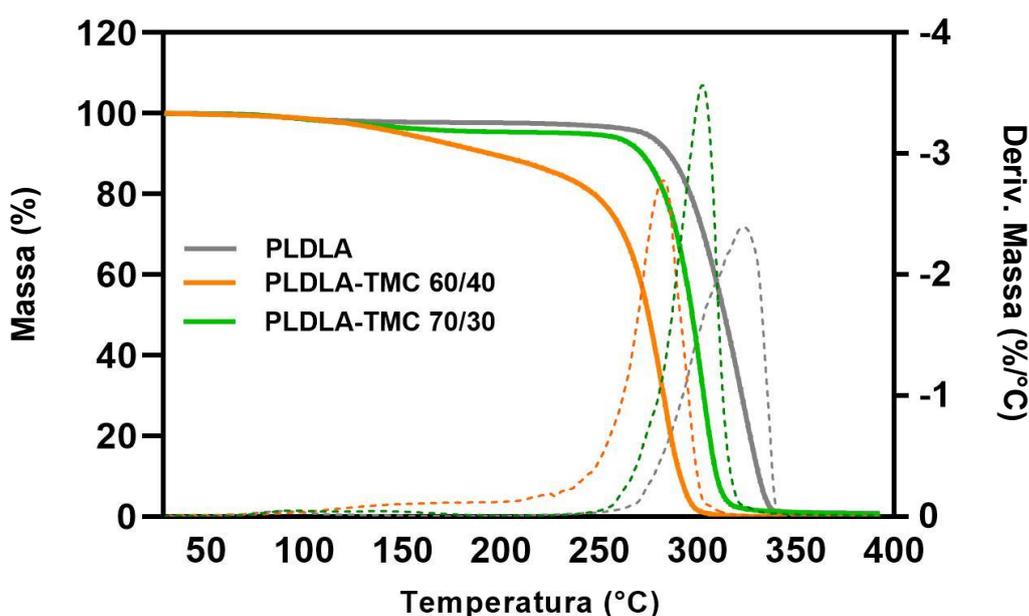
Tabela 4: Temperaturas de transição vítrea (T_g) dos polímeros determinadas pelas curvas do segundo aquecimento.

Material	T_g (°C)
PLDLA	48
PLDLA-TMC 60/40	5
PLDLA-TMC 70/30	30

Termogravimetria (TG)

Considerando que a temperatura é um fator decisivo no processo de impressão de *scaffolds* poliméricos, a termogravimetria é de extrema importância para compreensão da estabilidade térmica do material. As curvas de massa em função da temperatura do PLDLA e do PLDLA-TMC 60/40 e 70/30 estão demonstradas na Figura 13.

Figura 13: Curvas de perda de massa (%) em função da temperatura das amostras de PLDLA e PLDLA-TMC.



É possível observar um evento de perda de massa, tanto para o copolímero PLDLA como para o terpolímero PLDLA-TMC nas diferentes proporções. A Tabela 5 evidencia a temperatura na qual a perda de massa se inicia (T_{onset}), e a temperatura onde a degradação do polímero é máxima (T_{max}). A partir de tais valores, nota-se que para o PLDLA-TMC 60/40, T_{onset} é inferior aos demais polímeros em aproximadamente 30°C. Logo, fica evidente que a concentração de TMC na composição do polímero tem efeito direto na estabilidade térmica do material (MÁRQUEZ et al., 2012).

Tabela 5: Valores da temperatura de início da perda de massa (T_{onset}) e temperatura onde a perda de massa é máxima (T_{max}) para o PLDLA e PLDLA-TMC.

Material	T_{onset} (°C)	T_{max} (°C)
PLDLA	287	320
PLDLA-TMC 60/40	258	282
PLDLA-TMC 70/30	280	300

Ensaio reológico

Como parâmetro inicial para a escolha das temperaturas dos ensaios reológicos, foram utilizados os resultados obtidos a partir das análises de DSC e da Termogravimetria. A partir de tais valores, estabeleceu-se um limite inferior, o qual seria a T_g de cada polímero, e um limite superior (190 °C). Sabe-se pela literatura, que os polímeros não são suficientemente fluidos para impressão na temperatura de transição vítrea e que as temperaturas de processamento são aproximadamente 120°C acima de T_g (AJINJERU et al., 2018).

Logo, para o PLDLA-TMC 70/30, em temperaturas inferiores a 140°C não houve amolecimento suficiente do material para que os ensaios pudessem ser realizados. Para o PLDLA-TMC 60/40, no entanto, a temperatura mínima de processamento foi de 90°C.

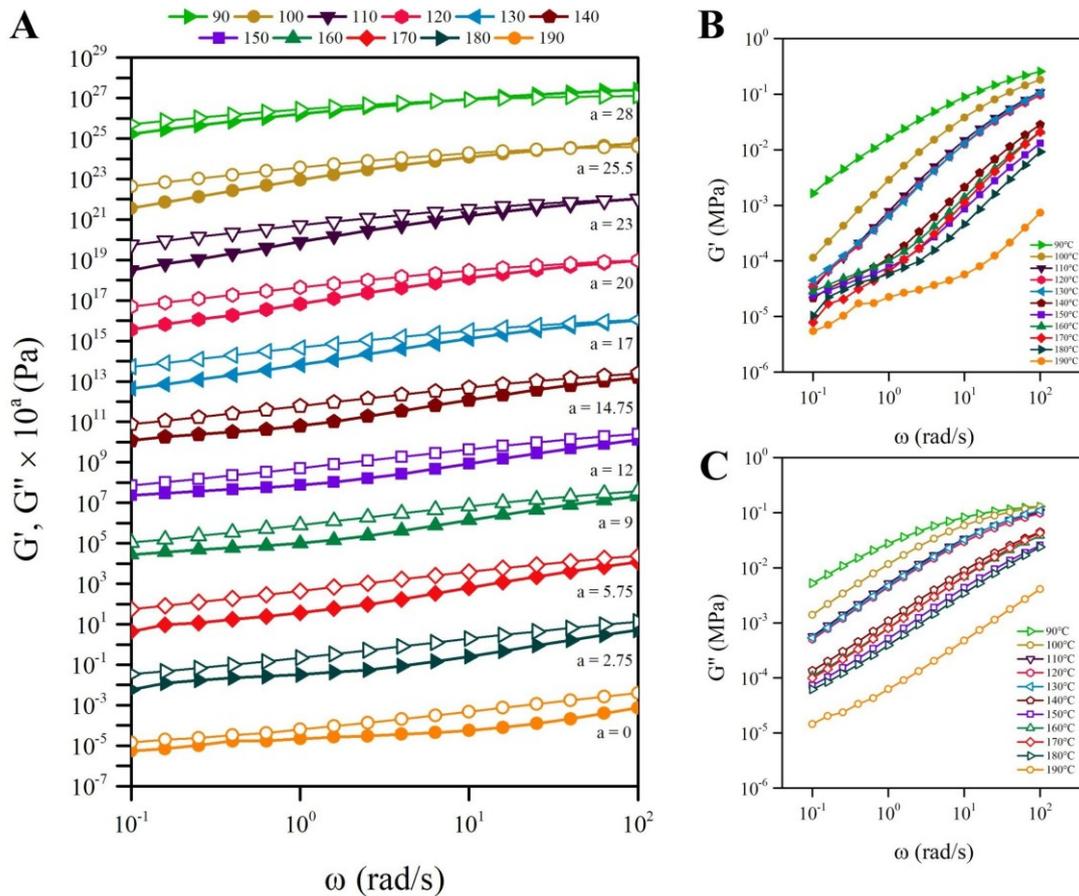
Ensaio reológico em regime oscilatório para o terpolímero PLDLA-TMC 60/40 e 70/30

As amostras de PLDLA-TMC 60/40 e 70/30 foram submetidas a ensaios reológicos em regime oscilatório em diferentes faixas de temperatura. As propriedades reológicas obtidas a partir de tais ensaios são importantes para o estudo do processamento

de polímeros, pois permitem obter informações acerca da estrutura do material e, sobretudo, sobre sua viscoelasticidade. Inicialmente, foi realizada uma varredura de amplitude (dados não apresentados), a fim de identificar a região viscoelástica linear dos materiais. A identificação desta região é fundamental quando se deseja estudar as propriedades estruturais do polímero, uma vez que nessa região a tensão e a deformação são proporcionais, ou seja, a tensão aplicada é insuficiente para causar ruptura estrutural do material (BRETAS; d'ÁVILA, 2006). Logo, os resultados obtidos podem ser diretamente correlacionados às propriedades estruturais do polímero em estudo. Para o PLDLA-TMC 60/40 foi estabelecida a tensão de 0,2%, enquanto para o PLDLA-TMC 70/30, a tensão foi de 0,4%.

A partir de tais valores, realizou-se os ensaios de varredura de frequência. Na Figura 14 estão apresentados os resultados obtidos para o PLDLA-TMC 60/40.

Figura 14: (A) Dependência do módulo de armazenamento (G') (símbolos sólidos) e do módulo de perda (G'') (símbolos abertos) em função da frequência angular (ω) para o PLDLA-TMC 60/40. Os dados foram deslocados verticalmente para evitar sobreposição. (B) Módulo de armazenamento e (C) módulo de perda.

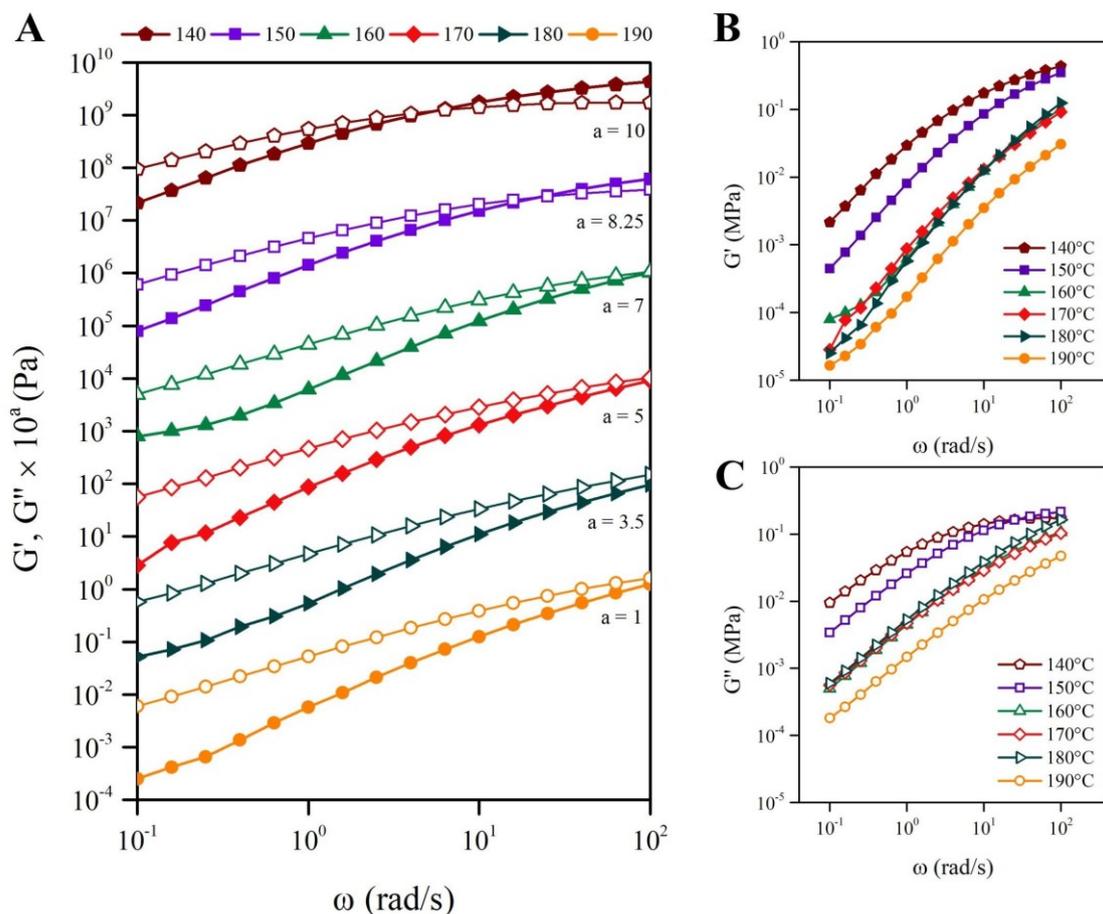


É possível observar que ambos os módulos aumentaram com o aumento da frequência em todas as temperaturas avaliadas, evidenciando uma relação de dependência entre eles. Além disso, na maioria das temperaturas testadas, os materiais apresentaram comportamento mais viscoso que elástico, visto que mesmo em frequências maiores, os módulos de perda foram predominantemente superiores aos módulos de armazenamento. Apenas para as temperaturas de 90°C, 100°C e 110°C observou-se um cruzamento dos módulos a uma determinada frequência (ω_c), sugerindo que a influência destas temperaturas nas propriedades estruturais do material foi menor. No entanto, com o aumento da temperatura, observou-se um deslocamento da frequência de cruzamento (ω_c) e o desaparecimento da resposta elástica do material, evidenciando um comportamento predominantemente viscoso. Ademais, para as temperaturas de 110°C, 120°C e 130°C, é possível observar uma sobreposição dos valores dos módulos, sugerindo uma faixa de

temperatura para a qual o comportamento estrutural do material é semelhante (Figura 14B e C).

De maneira semelhante ao PLDLA-TMC 60/40, o comportamento do PLDLA-TMC 70/30 sob regime oscilatório também se mostrou predominantemente viscoso na maioria das temperaturas testadas (Figura 15A). Da mesma forma, nas menores temperaturas (140°C e 150°C) o módulo elástico foi superior ao de perda, ressaltando o efeito da temperatura nas propriedades estruturais de ambos os materiais. Conforme observado para o PLDLA-TMC 60/40, em determinada faixa de temperatura nota-se uma sobreposição dos valores dos módulos para o PLDLA-TMC 70/30 (nesse caso, de 160°C a 180°C) (Figura 15B e C).

Figura 15: Dependência do módulo de armazenamento (G') (símbolos sólidos) e do módulo de perda (G'') (símbolos abertos) em função da frequência angular (ω) para o PLDLA-TMC 70/30. Os dados foram deslocados verticalmente para evitar sobreposição. (B) Módulo de armazenamento e (C) módulo de perda.



Em estudo publicado na literatura, onde foram avaliadas as propriedades reológicas de blendas de PLLA/PLDA, foi observado que os valores dos módulos G' e G'' diminuíram com o aumento da temperatura, semelhante ao observado para o PLDLA-TMC 60/40 e 70/30. Para o estudo em questão, esta diminuição foi atribuída à destruição da estrutura semicristalina das blendas devido às altas temperaturas, resultando na perda da estrutura do material. Conseqüentemente, para as temperaturas mais altas (220°C e 230°C), G'' foi superior mesmo em altas frequências (JING et al., 2016). Considerando o caráter completamente amorfo do PLDLA-TMC, a influência da temperatura nos valores de G' e G'' é ainda mais evidente, sendo observada a partir de 110°C e 160°C para o PLDLA-TMC 60/40 e PLDLA-TMC 70/30, respectivamente.

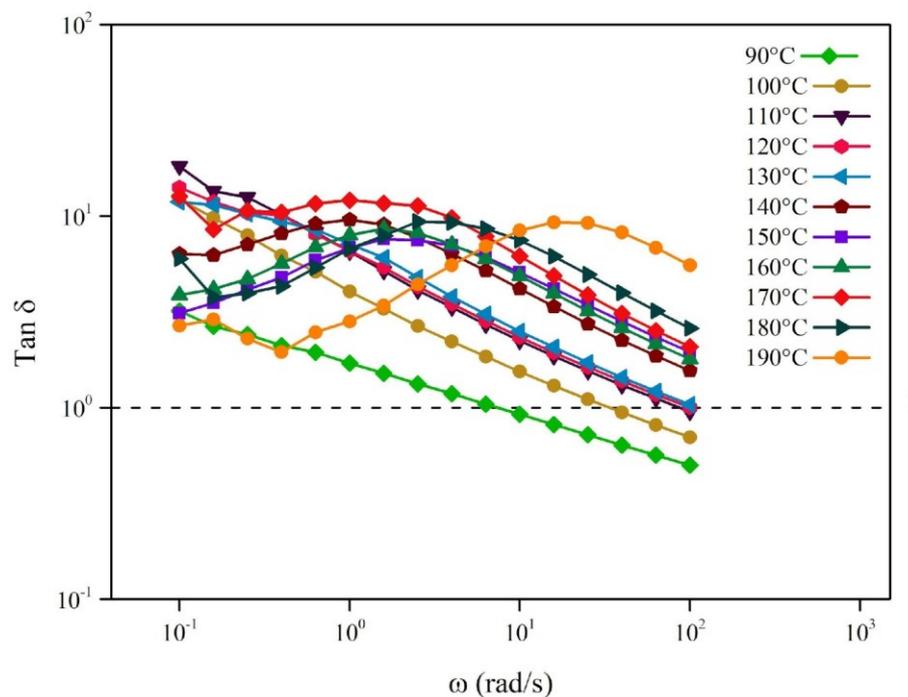
Ainda nesse contexto, a partir do inverso da frequência de cruzamento ($\omega_c^{-1} \times 2\pi$) foi possível identificar o tempo de relaxação dos materiais (λ), o qual consiste no tempo que o polímero requer para retornar à sua forma original após a deformação (AZAD; TRIVEDI, 2019). Foi observado que o tempo de relaxação de ambos os materiais diminuiu em função da temperatura (Tabela 6). Esta dependência entre o tempo de relaxação (λ) e a temperatura está relacionada à mobilidade da cadeia polimérica sob deformação, conforme descrito por Xu e Engquist (2018) e Adamchuk e colaboradores (2019). Quando há um aumento da temperatura, a mobilidade da cadeia sofre alterações e o λ diminuiu (CASSU; FELISBERTI, 2005).

Tabela 6: Frequência de cruzamento (ω_c) e tempo de relaxação (λ) do PLDLA-TMC 60/40 e 70/30.

		ω_c (rad/s)	λ (s)
PLDLA-TMC 60/40	90°C	7.41753	0.847072
	100°C	33.6339	0.186811
	110°C	87.0015	0.072219
PLDLA-TMC 70/30	140°C	5.40754	1.161930
	150°C	22.4723	0.279597

A relação entre os módulos de perda e armazenamento (G''/G'), conhecida como coeficiente de amortecimento ($\text{Tan } \delta$), também foi avaliada. Por meio de $\text{Tan } \delta$, uma medida da magnitude relativa do armazenamento e dissipação de energia é obtida. Valores de $\text{Tan } \delta$ inferiores a um representam um comportamento elástico, enquanto valores superiores à unidade, denotam um comportamento mais viscoso por parte do material (AJINJERU et al., 2018). As curvas obtidas estão demonstradas nas Figuras 16 e 17, para o PLDLA-TMC 60/40 e para o PLDLA-TMC 70/30, respectivamente.

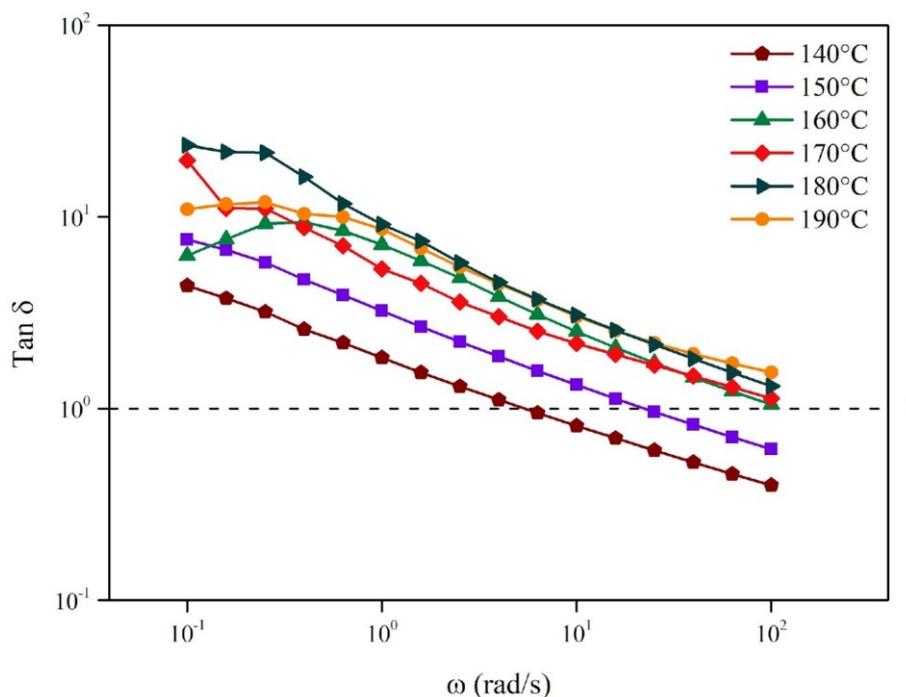
Figura 16: Coeficiente de amortecimento ($\text{Tan } \delta$) em função da frequência angular (ω) para o PLDLA-TMC 60/40 em diferentes temperaturas.



A partir das curvas, é possível observar que na faixa de temperatura de 110°C a 190°C os valores de $\text{Tan } \delta$ são superiores a um (predominantemente viscoso), independente da frequência. Para 90°C e 100°C, em frequências mais altas (acima de 10 rad/s), $\text{Tan } \delta$ apresenta valores inferiores a um (predominantemente elástico). Nota-se ainda, que a partir de 140°C há um aumento do coeficiente de amortecimento para valores intermediários de frequência (pouco abaixo de 1 até 10 rad/s). Para a temperatura de 190°C, esse efeito é observado em altas frequências, de maneira totalmente oposta ao que ocorre para as temperaturas mais baixas de 90°C e 100°C.

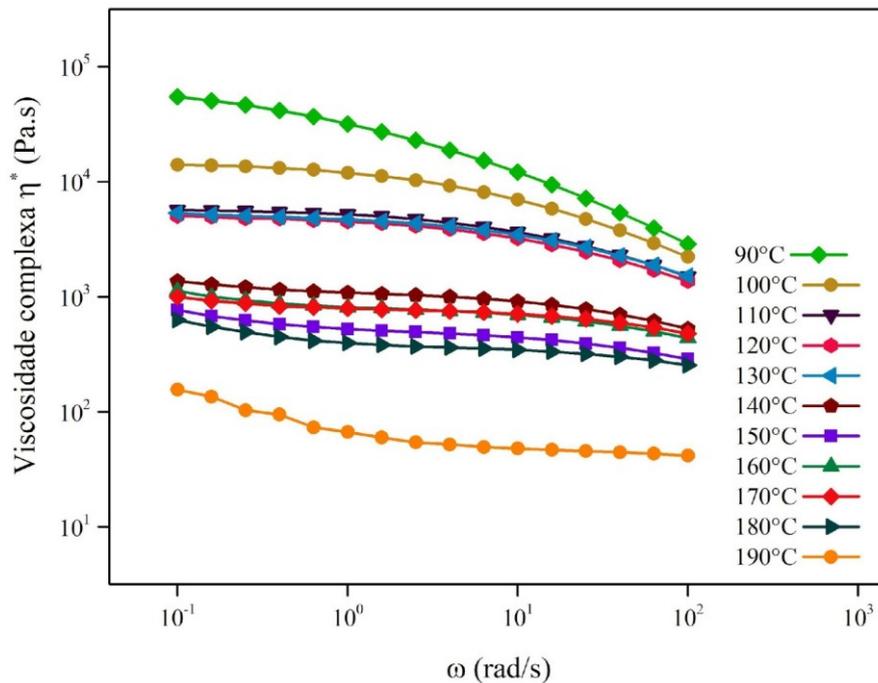
Para o PLDLA-TMC 70/30, não são identificados picos proeminentes como para o PLDLA-TMC 60/40, apenas uma diminuição dos valores de $\text{Tan } \delta$ em função do aumento da frequência (Figura 17). O que se observa é que próximo a frequência de 10 rad/s, para as temperaturas de 140°C e 150°C, $\text{Tan } \delta$ apresenta valores inferiores a um, indicando um comportamento mais elástico em frequências mais altas, o que corrobora o observado nos gráficos de G' e G'' apresentados anteriormente (Figuras 14 e 15).

Figura 17: Coeficiente de amortecimento ($\text{Tan } \delta$) em função da frequência angular (ω) para o PLDLA-TMC 70/30 em diferentes temperaturas.



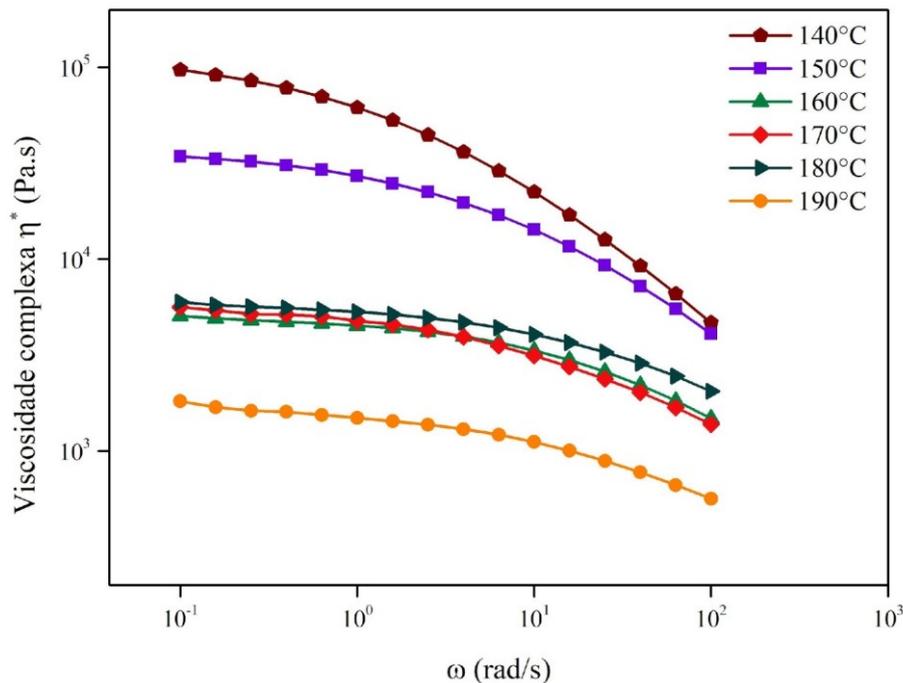
Ainda em relação às propriedades viscoelásticas lineares, obtidas em regime oscilatório de pequena amplitude, foi avaliada a viscosidade complexa (η^*) do PLDLA-TMC 60/40 e PLDLA-TMC 70/30 (Figuras 18 e 19, respectivamente).

Figura 18: Viscosidade complexa (η^*) do PLDLA-TMC 60/40 em diferentes temperaturas (90°C – 190°C), em função da frequência angular (ω).



Para ambos os materiais é possível observar que a temperatura tem influência no comportamento da viscosidade complexa. Para o PLDLA-TMC 60/40, nas temperaturas entre 90°C e 130°C, observa-se uma redução da viscosidade conforme há um aumento da taxa de deformação. No entanto, quando se observa a faixa de temperatura de 140°C a 190°C, esse efeito diminui e o que se nota é um comportamento Newtoniano. Ainda para o PLDLA-TMC 60/40, é possível identificar que a temperatura limite para essa mudança de comportamento é de 130°C. Para o PLDLA-TMC 70/30, esse efeito também pode ser observado a partir de 150°C (Figura 19). Esta mudança de comportamento na viscosidade complexa sob influência da temperatura já foi previamente descrita na literatura para os polímeros PLLA/PLDA (JING et al., 2016).

Figura 19: Viscosidade complexa (η^*) do PLDLA-TMC 70/30 em diferentes temperaturas (140°C – 190°C), em função da frequência angular (ω).

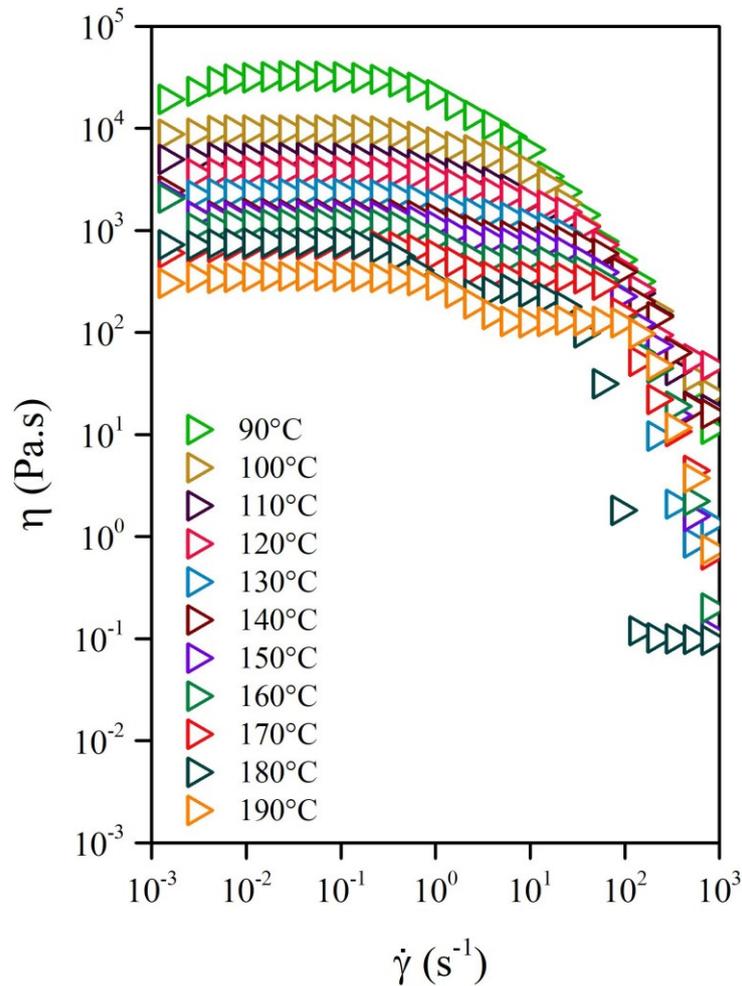


Sabe-se que quanto menor a frequência aplicada durante o fluxo oscilatório, maior a tendência do polímero se comportar como um fluido Newtoniano, pois tanto a tensão como a taxa de deformação são pequenas (BRETAS; d'ÁVILA, 2006). Logo, fica evidente a necessidade da realização de ensaios em regime estacionário, onde a viscosidade dos materiais pode ser melhor avaliada e seu comportamento melhor compreendido, numa taxa de cisalhamento compatível com o processo de impressão.

Ensaio reológico em regime estacionário para o terpolímero PLDLA-TMC 60/40 e 70/30

A viscosidade consiste na propriedade que mede a resistência do material a um dado tipo de fluxo, o qual pode ser oscilatório $\eta^*(\omega)$, ou estacionário $\eta(\dot{\gamma})$ (BRETAS; d'ÁVILA, 2006). A viscosidade em função da taxa de cisalhamento $\eta(\dot{\gamma})$ é a propriedade reológica mais importante no estudo do processamento dos polímeros para impressão 3D, visto que os parâmetros de temperatura, pressão ou velocidade dependem diretamente dessa propriedade (GUNDUZ et al., 2018). As curvas de viscosidade (η) obtidas a partir dos ensaios em regime estacionário para o PLDLA-TMC 60/40 estão demonstradas na Figura 20.

Figura 20: Curvas de viscosidade (η) do PLDLA-TMC 60/40 em estado estacionário para diferentes temperaturas (90°C – 190°C).



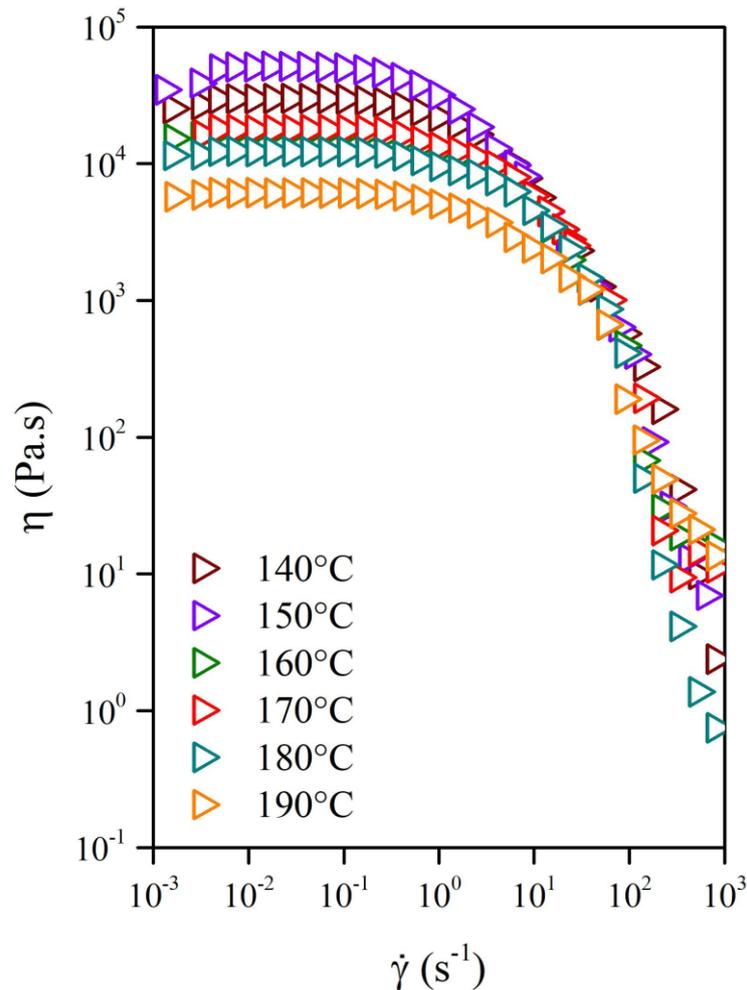
Conforme descrito anteriormente, quando um material é submetido a uma taxa de cisalhamento, este pode se comportar de três formas distintas: 1) como um fluido Newtoniano, 2) como um pseudoplástico ou, 3) como um dilatante (A. ARSHINOFF et al., 2021).

Logo, diante dos resultados obtidos, nota-se que independente da temperatura, todas as curvas demonstraram o comportamento pseudoplástico do material. É possível observar também que conforme a temperatura aumenta, a viscosidade diminui e há um aumento da largura do platô Newtoniano. O comportamento pseudoplástico é o mais comum em polímeros fundidos e é consequência do desnovelamento e da orientação das macromoléculas, promovidos pela taxa de cisalhamento aplicada (LYU et al., 2020). Quando as taxas são baixas, o gradiente de velocidade não é suficiente para desenovelar as macromoléculas, e a viscosidade permanece alta. Quando essas taxas aumentam, as

macromoléculas passam a ter maior mobilidade e conseqüentemente começam a desfazer os nós entre elas, diminuindo a viscosidade. Por fim, quando as taxas são elevadas, as macromoléculas já desfizeram quase todos os nós e se orientarão na direção do fluxo, diminuindo por completo a viscosidade (JOJIBABU et al., 2016). Nesse ponto, é importante ressaltar que a influência da temperatura é muito mais evidente na região do platô Newtoniano do que na região da Lei das Potências. As temperaturas elevadas aumentam os movimentos intermoleculares e o volume livre entre as moléculas, diminuindo o atrito entre as macromoléculas e, conseqüentemente, diminuindo a viscosidade. No entanto, o aumento da temperatura também aumenta a vibração molecular e a probabilidade de contatos intermoleculares, conseqüentemente, as velocidades de emaranhamento e desemaranhamento ficam similares por mais tempo, o que reflete no aumento da largura do patamar Newtoniano conforme a temperatura aumenta (BRETAS; d'ÁVILA, 2006). Essa dependência é similar à observada na viscosidade complexa (η^*), descrita anteriormente. No entanto, como o cisalhamento para aquele ensaio era muito inferior, verificou-se apenas a predominância de um platô Newtoniano nas curvas obtidas, mas não o momento da queda da viscosidade.

Quando a viscosidade do PLDLA-TMC 70/30 foi avaliada em regime estacionário de cisalhamento, observou-se comportamento semelhante ao identificado para o PLDLA-TMC 60/40. Os resultados obtidos estão demonstrados na Figura 21.

Figura 21: Curvas de viscosidade (η) do PLDLA-TMC 70/30 em estado estacionário para diferentes temperaturas (140°C – 190°C).

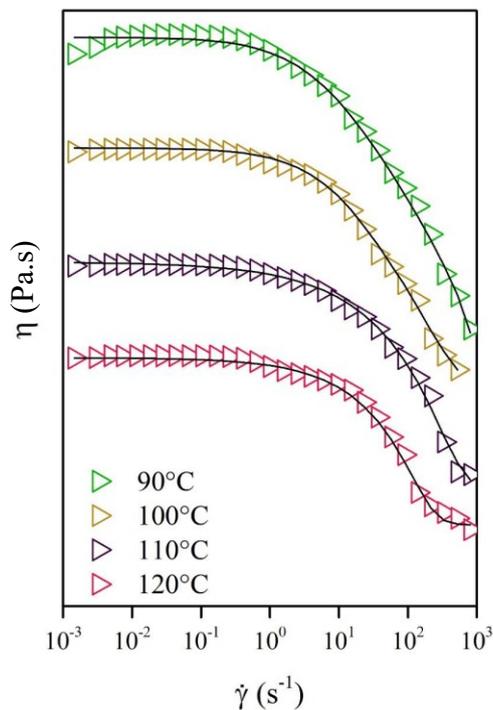


É possível observar que conforme há um aumento da temperatura, a viscosidade diminui, evidenciando o comportamento pseudoplástico do PLDLA-TMC 70/30, sobretudo na faixa de cisalhamento onde ocorre o processo de impressão por extrusão ($10^2 - 10^3 \text{ s}^{-1}$). De forma análoga ao PLDLA-TMC 60/40, também se percebe um aumento do platô Newtoniano frente ao aumento da temperatura, efeito das vibrações moleculares e as interações intermoleculares, o qual já foi explicado anteriormente.

Embora o comportamento pseudoplástico de ambos os materiais possa ser deduzido qualitativamente pela observação direta das curvas de viscosidade em função da taxa de cisalhamento, as análises quantitativas, por meio do ajuste aos modelos matemáticos, podem oferecer informações adicionais. Dessa forma, os dados de viscosidade do PLDLA-TMC 60/40 e PLDLA-TMC 70/30 obtidos a partir dos ensaios em regime estacionário foram ajustados usando os modelos de viscosidade de Cross e

Carreau-Yasuda. Vale ressaltar que um mesmo conjunto de dados pode ser representado por mais de um modelo, cabendo à interpretação dos parâmetros a escolha do modelo que melhor descreva os resultados obtidos (FANG; HANNA, 1999). A partir das curvas obtidas para o PLDLA-TMC 60/40, foi realizado o ajuste para o modelo de Carreau-Yasuda nas temperaturas entre 90°C e 120°C. Para as temperaturas de 130°C a 190°C, o melhor ajuste foi obtido para o modelo de Cross. As curvas de viscosidade do PLDLA-TMC 60/40 ajustadas para ambos os modelos estão demonstradas nas Figuras 22 e 23.

Figura 22: Curvas de viscosidade (η) do PLDLA-TMC 60/40 em estado estacionário para diferentes temperaturas (90°C – 120°C) ajustadas para o modelo de Carreau-Yasuda. A linha sólida corresponde ao ajuste do modelo e os símbolos abertos correspondem aos dados experimentais.



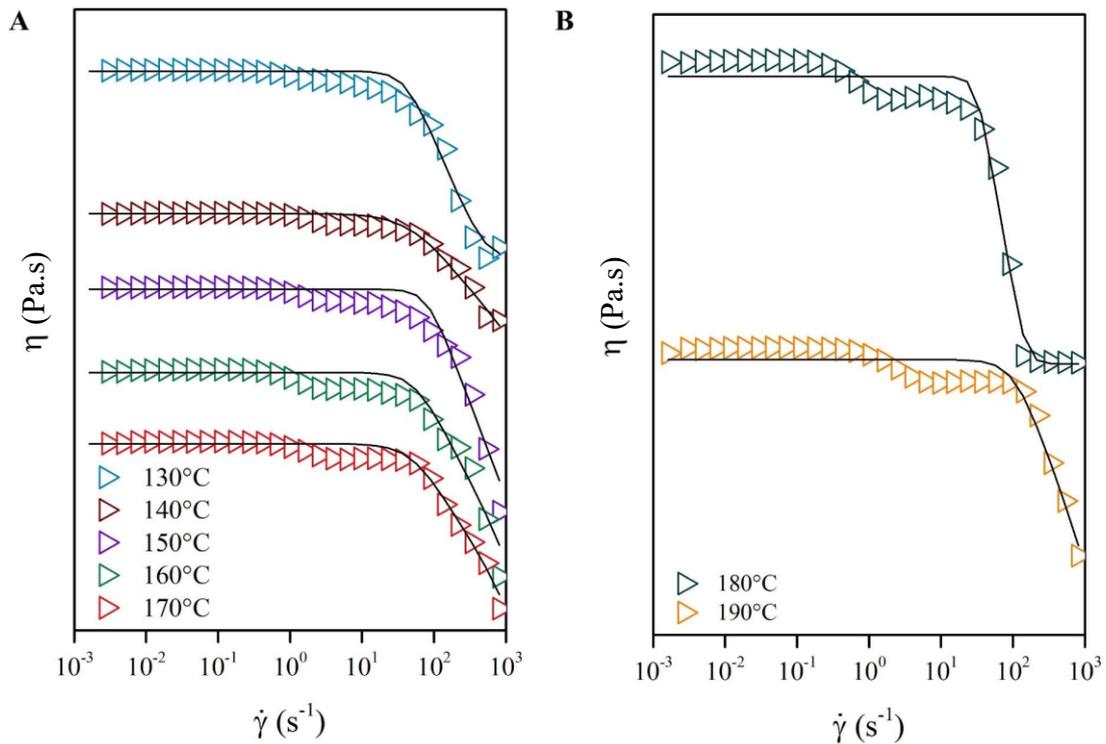
Os parâmetros de ajuste para o modelo de Carreau-Yasuda estão apresentados na Tabela 7.

Tabela 7: Parâmetros de ajuste do PLDLA-TMC 60/40 para o modelo de Carreau-Yasuda nas temperaturas de 90°C – 120°C.

Temperatura (°C)	η_0 (Pa.s)	η_∞ (Pa.s)	λ	a	n	R²
90	96.325	1.232	1,654	3,163	0,82	0,95
100	8.380	173,81	0,148	0,876	0,12	0,99
110	5.395	337,85	0,492	1,043	0,51	0,99
120	4.842	850,15	1,107	1,216	0,76	0,99

A partir do parâmetro de viscosidade em cisalhamento zero (η_0) é possível identificar, conforme previamente explicitado, que frente ao aumento da temperatura há um decréscimo nos valores de viscosidade. A viscosidade em cisalhamento infinito (η_∞) também diminui, o que sugere menor atrito entre as cadeias poliméricas à medida que a temperatura aumenta. Em relação ao índice de pseudoplasticidade, o valor de n foi inferior a um, confirmando o comportamento pseudoplástico do material para a faixa de temperaturas avaliada. As curvas de viscosidade do PLDLA-TMC 60/40 ajustadas para o modelo de Cross estão demonstradas na Figura 23.

Figura 23: Curvas de viscosidade (η) do PLDLA-TMC 60/40 em estado estacionário para diferentes temperaturas (A) 130°C – 170°C e (B) 180°C – 190°C ajustadas para o modelo de Cross. A linha sólida corresponde ao ajuste do modelo e os símbolos abertos correspondem aos dados experimentais.



Os parâmetros de ajuste para o modelo de Cross estão apresentados na Tabela 8.

Tabela 8: Parâmetros de ajuste do PLDLA-TMC 60/40 para o modelo de Cross nas temperaturas de 130°C – 190°C.

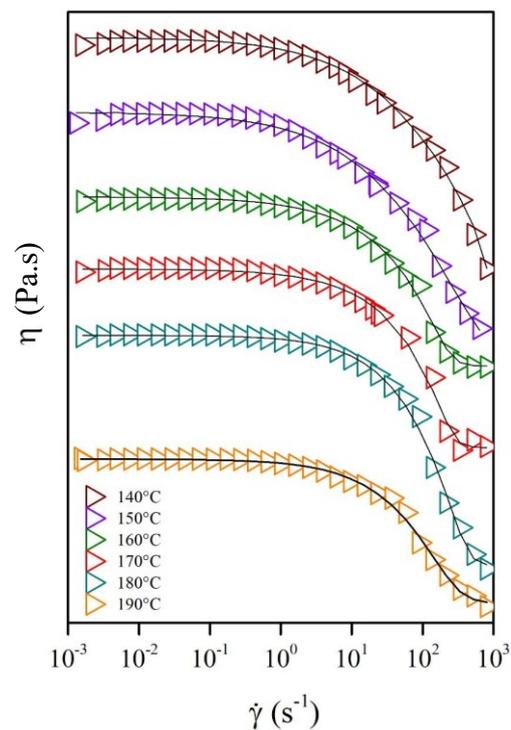
Temperatura (°C)	η_0 (Pa.s)	η_∞ (Pa.s)	K	n	R ²
130	2.332	251,36	0,083	0,64	0,98
140	1.473	239,68	0,047	0,56	0,97
150	1.431	164,48	0,113	0,55	0,98
160	1.200	60,31	0,246	0,57	0,95
170	728,44	106,32	0,086	0,51	0,94
180	784,05	21,47	0,856	0,77	0,95

190 361,80 18,67 0,314 0,64 0,93

De maneira análoga ao observado para as temperaturas de 90°C a 120°C, nota-se uma diminuição dos valores de viscosidade frente ao aumento da temperatura, entre as temperaturas de 130°C e 190°C. Da mesma forma, os valores de n foram inferiores a um.

Para as curvas de viscosidade do PLDLA-TMC 70/30 obtidas a partir dos ensaios em regime estacionário, o modelo de Carreau-Yasuda foi o que melhor se ajustou aos resultados (Figura 24).

Figura 24: Curvas de viscosidade (η) do PLDLA-TMC 70/30 em estado estacionário para diferentes temperaturas (140°C – 190°C) ajustadas para o modelo de Carreau-Yasuda. A linha sólida corresponde ao ajuste dos modelos e os símbolos abertos correspondem aos dados experimentais.



Os parâmetros de ajuste para o modelo de Carreau-Yasuda estão apresentados na Tabela 9.

Tabela 9: Parâmetros de ajuste do PLDLA-TMC 70/30 para o modelo de Carreau-Yasuda.

Temperatura (°C)	η_0 (Pa.s)	η_∞ (Pa.s)	λ	a	n	R²
140	36.412	-480,20	0,544	1,242	0,34	0,99
150	102.319	-953,64	1,529	2,109	0,66	0,97
160	14.630	-210,52	0,172	0,871	0,31	0,99
170	17.727	-448,74	0,288	1,007	0,18	0,99
180	10.170	-129,02	0,069	0,830	0,77	0,99
190	6.465	-302,88	0,295	1,055	0,38	0,99

Para as curvas de PLDLA-TMC 70/30 observa-se que o valor de n foi inferior a um em todas as temperaturas avaliadas, reiterando o caráter pseudoplástico do material. Tanto os dados experimentais sobrepostos às curvas do modelo, como os valores de R² indicam a adequação dos resultados aos modelos utilizados.

Tixotropia

A tixotropia é uma propriedade de fluidos não-Newtonianos que apresentam viscosidade dependente do tempo. Para muitos materiais, o comportamento pseudoplástico é reversível, ou seja, há uma recuperação da viscosidade uma vez que a taxa de cisalhamento é retirada, resultado da reorganização das moléculas. Quando este processo de recuperação é dependente do tempo, o fluido é chamado de tixotrópico. Um material pseudoplástico não necessariamente será tixotrópico, no entanto, todo material tixotrópico será sempre pseudoplástico. Portanto, a tixotropia indica a reversibilidade da viscosidade do material, ou seja, sua recuperação a partir do momento em que a taxa de cisalhamento é retirada (KULICHIKHIN; MALKIN, 2022).

O estudo da tixotropia para polímeros fundidos, no entanto, é um assunto em discussão uma vez que todo material viscoelástico apresenta uma recuperação gradual de viscosidade cuja escala de tempo depende do seu tempo de relaxação (LARSON, 2015; AGARWAL et al., 2021). Portanto, existe uma dificuldade em distinguir o que seria a recuperação, intrínseca à viscoelasticidade do material, e a recuperação devido a um comportamento tixotrópico apresentado por ele. Algumas definições encontradas na

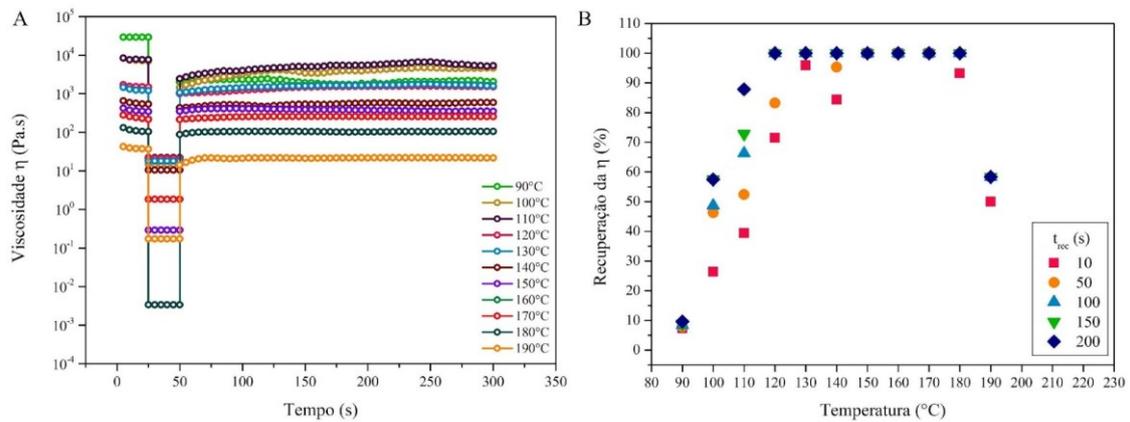
literatura referem-se explicitamente aos polímeros fundidos como materiais que apresentam tixotropia (BARNES, 1997; DULLAERT; MEWIS, 2005). Outros autores, no entanto, não atribuem à tixotropia a recuperação de viscosidade apresentada pelos fluidos poliméricos.

De toda forma, embora haja essa discussão no que se refere a interpretação da recuperação da viscosidade para os polímeros fundidos, foi realizado o ensaio de tixotropia em três intervalos (3ITT) a fim de analisar o processo de recuperação das amostras. Para o cálculo do percentual de recuperação, o método mais utilizado consiste na determinação de um determinado tempo (t), no qual a viscosidade da estrutura é recuperada (η_{rec}) e esta é comparada com a viscosidade em repouso (η_i) (Equação 4) (BRAUN; ROSEN, 1999).

$$\eta_{rec} = \frac{\eta_{t_{rec}}}{\eta_i} * 100 \quad (\text{Eq. 4})$$

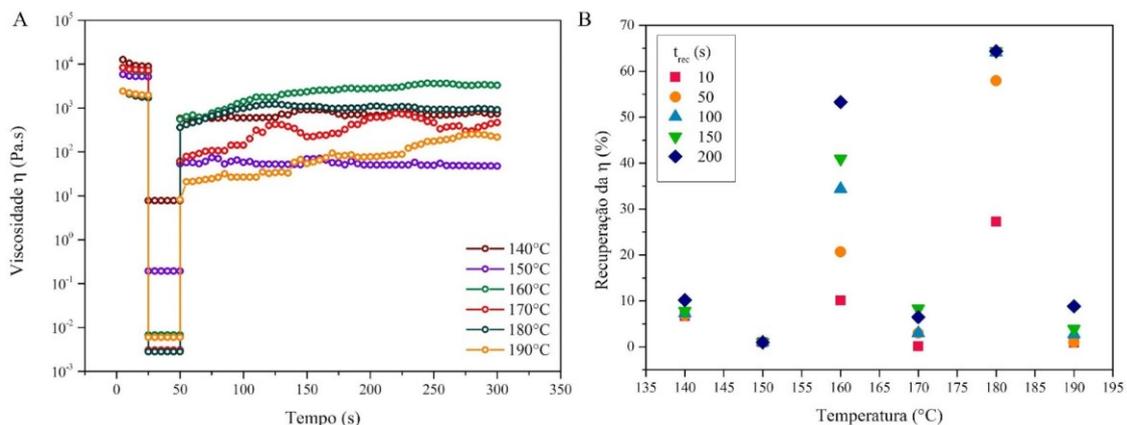
Quando se avalia a recuperação da viscosidade, o tempo de recuperação pode ser considerado como uma medida relativa da tixotropia (SONEBI; YAHIA, 2019). Além disso, de acordo com alguns autores, o que pode auxiliar na distinção entre viscoelasticidade ou tixotropia de polímeros fundidos, conforme pontuado anteriormente, é justamente o tempo que essa recuperação leva para acontecer (LARSON, 2015). A recuperação em tempos maiores estaria associada ao comportamento tixotrópico do material (BARNES, 1997; DULLAERT; MEWIS, 2005). Logo, a recuperação dos materiais foi avaliada em cinco momentos diferentes: 10s, 50s, 100s, 150s e 200s após a remoção da taxa de cisalhamento. As curvas de viscosidade em função do tempo e o percentual de recuperação para o PLDLA-TMC 60/40 e para o PLDLA-TMC 70/30 estão apresentadas nas Figuras 25 e 26, respectivamente.

Figura 25: (A) Curvas de viscosidade (η) em função do tempo para o PLDLA-TMC 60/40 em diferentes temperaturas (90°C-190°C); (B) Percentual de recuperação da viscosidade em função do tempo para diferentes temperaturas (90°C – 190°C).



É possível observar que para o PLDLA-TMC 60/40 na temperatura de 90°C houve baixíssima recuperação da viscosidade. Mesmo após 200s, a recuperação não foi superior a 10%. Nas temperaturas de 100°C e 110°C, a recuperação máxima foi de 60% e 90%, respectivamente. Para as temperaturas entre 120°C e 180°C, houve recuperação de 100% da viscosidade. No entanto, algumas amostras demonstraram caráter tixotrópico inferior (150°C, 160°C e 170°C), uma vez que essa recuperação foi instantânea à remoção da taxa de cisalhamento. Para a temperatura de 190°C, a recuperação também foi rápida, no entanto, até 60%.

Figura 26: (A) Curvas de viscosidade (η) em função do tempo para o PLDLA-TMC 70/30 em diferentes temperaturas (140°C - 190°C); (B) Percentual de recuperação da viscosidade em função do tempo para diferentes temperaturas (140°C – 190°C).



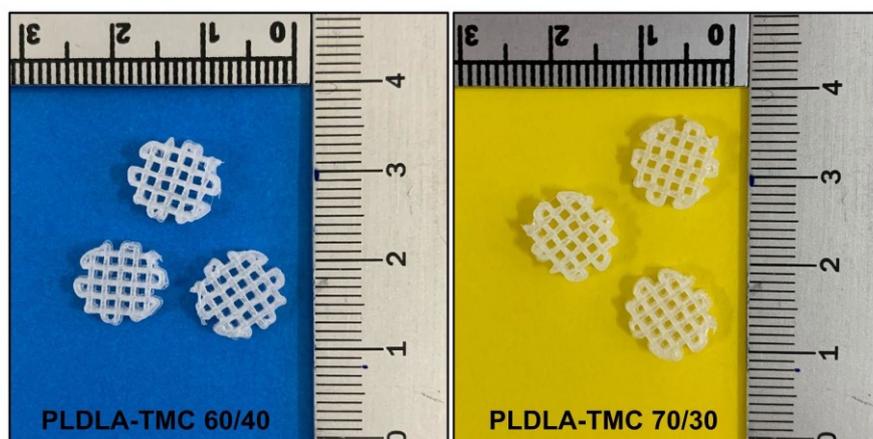
Para o PLDLA-TMC 70/30, é possível observar que a recuperação da viscosidade das amostras foi muito inferior quando comparado às amostras de PLDLA-TMC 60/40. Nas temperaturas de 140°C, 150°C, 170°C e 190°C, houve uma recuperação inferior a 20%, mesmo após 200s. Para a temperatura de 160°C, houve recuperação gradual da viscosidade, embora a recuperação tenha sido pouco acima de 50%. Na temperatura de 180°C, houve o maior percentual de recuperação (~70%), no entanto, inferior a 100%.

Portanto, a partir dos resultados obtidos, é possível identificar que as amostras apresentam variação no grau de recuperação quando na ausência da taxa de cisalhamento. No entanto, é possível apenas inferir que essa recuperação seja consequência de um comportamento tixotrópico apresentado pelos materiais, visto que parte dessa recuperação está associada à viscoelasticidade intrínseca do material. De acordo com a literatura, mais estudos devem ser realizados para que um critério de distinção entre ambas as propriedades seja finalmente estabelecido (AGARWAL et al., 2021).

2ª Etapa – Impressão e caracterização físico-química, térmica e mecânica dos *scaffolds* de PLDLA-TMC 60/40 e PLDLA-TMC 70/30

A partir do conjunto de resultados obtidos na 1ª Etapa, foi realizada a impressão dos *scaffolds* de PLDLA-TMC nas proporções de 60/40 e 70/30 (Figura 27). Ressalta-se que não foi possível a obtenção de *scaffolds* de PLDLA-TMC 60/40 nas temperaturas de 90°C, 100°C e 110°C, uma vez que não houve formação de um filamento que possibilitasse a impressão do material nestas temperaturas, devido a uma menor viscosidade do material. Conseqüentemente, os resultados que seguem se referem aos *scaffolds* obtidos a partir da temperatura de 120°C para o PLDLA-TMC 60/40. Para o PLDLA-TMC 70/30, foram obtidos *scaffolds* em todas as temperaturas testadas.

Figura 27: *Scaffolds* de PLDLA-TMC 60/40 e PLDLA-TMC 70/30 impressos na temperatura de 120°C e 140°C, respectivamente.



Considerando que as cadeias poliméricas são muito sensíveis aos efeitos da temperatura e cisalhamento, os *scaffolds* impressos de PLDLA-TMC 60/40 e PLDLA-TMC 70/30 foram caracterizados quanto às variações de massa molar e quanto às suas propriedades térmicas e mecânicas.

Cromatografia de permeação em gel (GPC) dos *scaffolds* impressos de PLDLA-TMC 60/40

As variações de massa molar dos *scaffolds* impressos de PLDLA-TMC 60/40 em função da temperatura de impressão estão destacadas na Tabela 10.

Tabela 10: Valores de M_n , M_w e IP para os *scaffolds* de PLDLA-TMC 60/40 impressos em diferentes temperaturas.

Temperatura de impressão (°C)	M_n (g/mol)	M_w (g/mol)	IP
120	91.727	194.932	2.12
130	74.985	143.612	1.91
140	72.224	143.230	1.98
150	68.694	118.313	1.72
160	63.201	116.347	1.84
170	57.435	108.576	1.89

180	53.547	104.296	1.94
190	48.801	94.083	1.92

Nota-se, a partir dos valores de massa molar obtidos, que existe uma relação direta entre a temperatura de impressão e a degradação do material, visto que quanto maior a temperatura aplicada, menores foram os valores de M_n e M_w . Nesse contexto, deve-se considerar que a degradação enfrentada pelo material durante o processo de impressão é do tipo termomecânica, ou seja, o efeito da temperatura soma-se ao efeito gerado pelo cisalhamento, com a atuação concomitante de ambos (PINHEIRO et al., 2004; SPEIGHT, 2020). Durante o cisalhamento, as cadeias poliméricas são tensionadas, o que favorece sua quebra. Da mesma forma, o aumento da temperatura promove a quebra das ligações químicas da cadeia principal. Conseqüentemente, o que se observa é a redução da massa molar do material após a impressão (CANEVAROLO, 2004; LA MANTIA et al., 2017; MIKULA et al., 2021).

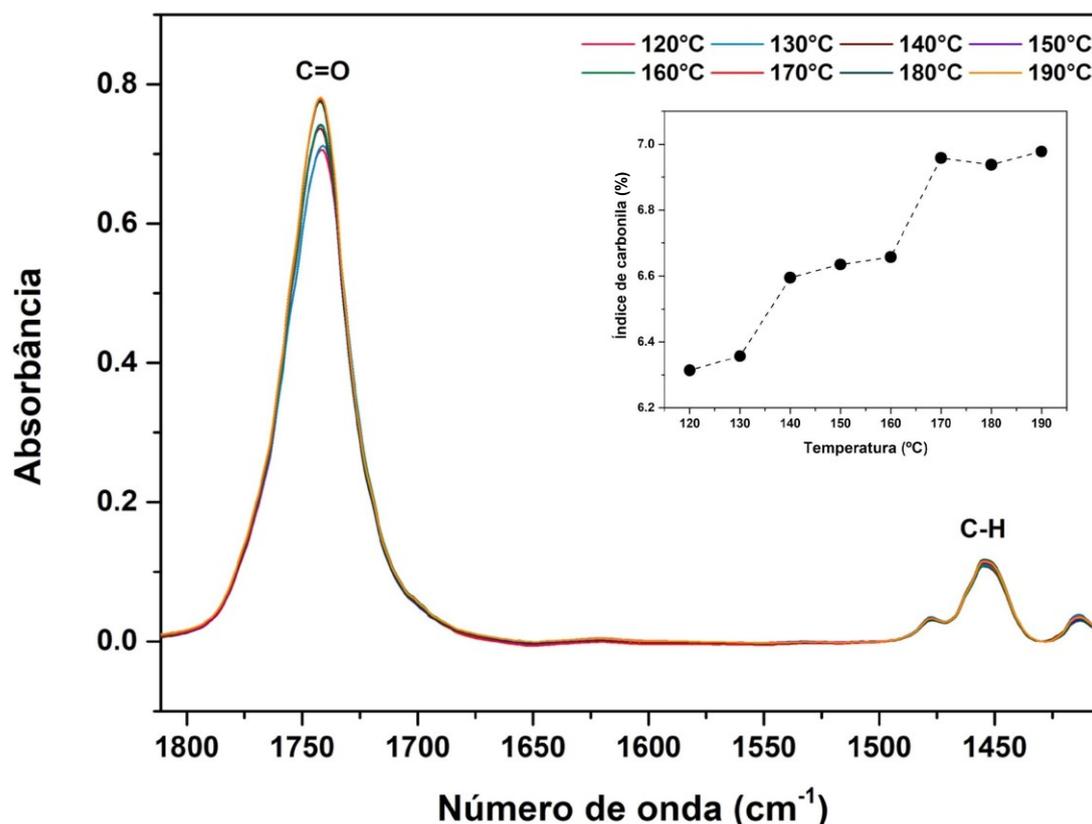
Quando se compara os valores de massa molar dos *scaffolds* impressos de PLDLA-TMC 60/40 com os valores obtidos antes da impressão (M_n : 163.411 g/mol; M_w : 257.919 g/mol), observa-se que na menor temperatura de impressão (120°C), o material apresentou uma redução média de 35% de sua massa molar. Conforme já discutido, esse percentual aumenta gradativamente com o aumento da temperatura. Nas temperaturas mais altas (180°C e 190°C), a massa molar do material foi reduzida em aproximadamente 70% após o processo de impressão. Portanto, para a escolha da temperatura de impressão deve-se considerar as implicações da redução da massa molar nas propriedades dos *scaffolds* impressos, uma vez que as propriedades mecânicas dos polímeros estão diretamente associadas a este parâmetro (ZHANG et al., 2019).

Índice de carbonila – PLDLA-TMC 60/40

Sabe-se que durante a degradação termomecânica de polímeros a base de Poli(ácido láctico), a quebra das cadeias poliméricas está associada à formação de grupos carbonila. Como consequência, variações na intensidade da banda em 1750 cm^{-1} , atribuída ao estiramento da carbonila, podem ser observadas a partir do espectro de FTIR (CUADRI; MARTÍN-ALFONSO, 2018; ALMOND et al., 2020). Dessa forma, foi calculado o índice de carbonila para os *scaffolds* de PLDLA-TMC 60/40 impressos em diferentes temperaturas a partir da razão entre a intensidade no ponto máximo da banda

de carbonila (C=O) em 1750 cm^{-1} e a intensidade no ponto máximo da banda de C-H em 1453 cm^{-1} , o qual pode ser observado na Figura 28.

Figura 28: Espectros de infravermelho na região das bandas C=O e C-H e respectiva curva de variação do índice de carbonila em função da temperatura de impressão dos scaffolds de PLDLA-TMC 60/40.



É possível observar que o índice de carbonila aumenta em função da temperatura de impressão, corroborando os resultados obtidos pelo GPC. Quando se compara as temperaturas dos extremos (120°C e 190°C), a variação é evidente (6.3-6.9). Tais resultados reiteram o processo de degradação sofrido pelo material durante a impressão 3D, conforme discutido anteriormente. Os gráficos individuais de cada uma das curvas estão apresentados no **Apêndice A**.

Cromatografia de permeação em gel (GPC) dos *scaffolds* impressos de PLDLA-TMC 70/30

Assim como realizado para o PLDLA-TMC 60/40, os *scaffolds* impressos de PLDLA-TMC 70/30 foram caracterizados quanto à sua massa molar. Os valores da massa

molar numérica média (M_n), massa molar ponderal média (M_w) e o índice de polidispersividade (IP) para os *scaffolds* impressos de PLDLA-TMC 70/30 estão destacados na Tabela 11.

Tabela 11: Valores de M_n , M_w e IP para os *scaffolds* de PLDLA-TMC 70/30 impressos em diferentes temperaturas.

Temperatura de impressão (°C)	M_n (g/mol)	M_w (g/mol)	IP
140	98.230	202.155	2.05
150	91.953	188.630	2.05
160	87.271	182.290	2.08
170	80.652	176.178	2.18
180	67.867	157.114	2.31
190	55.125	154.466	2.80

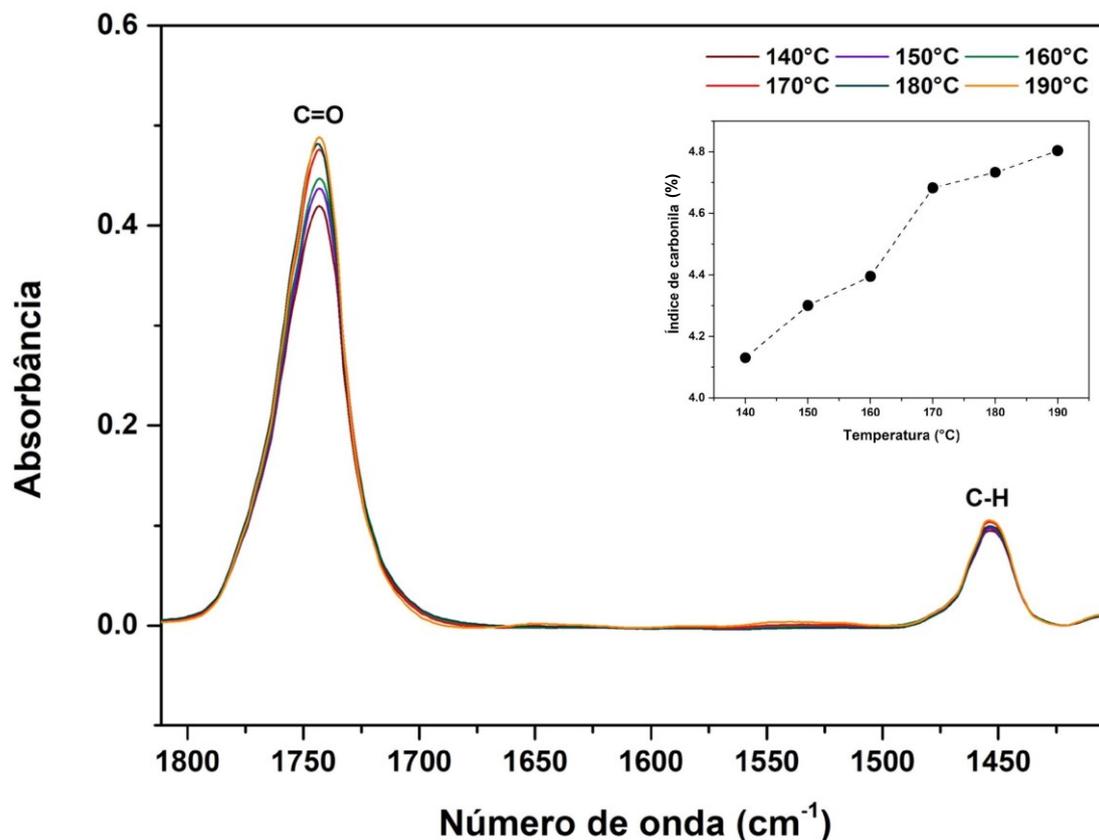
É possível perceber que a massa molar do polímero diminuiu com o aumento da temperatura, de forma semelhante ao que ocorreu para o PLDLA-TMC 60/40. Nota-se, no entanto, que o índice de polidispersividade é maior para os *scaffolds* de PLDLA-TMC 70/30 quando comparado ao valor obtido para o polímero antes da impressão, indicando que a degradação das cadeias ocorre de forma aleatória (YU et al., 2003).

Além disso, observa-se que na menor temperatura de impressão (140°C), a redução da massa molar foi superior a 50% quando comparado aos valores antes da impressão (M_n : 249.165 g/mol; M_w : 384.149 g/mol). Considerando novamente que a redução da massa molar está associada a um tempo de degradação e propriedades mecânicas inferiores, os *scaffolds* impressos a partir do PLDLA-TMC 70/30 podem representar um entrave para aplicação como prótese de menisco, visto que desempenho mecânico é requerido para este tipo de implante (MCNULTY; GUILAK, 2015) e uma vez que logo na menor temperatura de obtenção dos *scaffolds*, redução significativa da massa molar foi observada.

Índice de carbonila – PLDLA-TMC 70/30

O índice de carbonila para os *scaffolds* impressos de PLDLA-TMC 70/30 também foi calculado e os resultados estão demonstrados na Figura 29.

Figura 29: Espectros de infravermelho na região das bandas C=O e C-H e respectiva curva de variação do índice de carbonila em função da temperatura de impressão dos *scaffolds* de PLDLA-TMC 70/30.



Corroborando os resultados anteriores, é possível observar um aumento do índice de carbonila (4.1-4.8) frente ao aumento da temperatura de impressão, efeito do processo de degradação termomecânica sofrido pelos *scaffolds* durante a impressão, conforme previamente discutido. Os gráficos individuais de cada uma das curvas estão apresentados no **Apêndice B**.

Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC)

Os *scaffolds* impressos de PLDLA-TMC 60/40 e 70/30 foram submetidos à análise térmica. As curvas de DSC para o primeiro e segundo aquecimento dos *scaffolds* de PLDLA-TMC 60/40 apresentaram apenas a temperatura de transição vítrea (T_g)

(Tabela 12), reiterando o caráter completamente amorfo do material mesmo após o processo de impressão. As curvas de DSC referentes ao segundo aquecimento estão apresentadas na Figura 30.

Figura 30: Curvas de DSC do segundo aquecimento dos *scaffolds* impressos de PLDLA-TMC 60/40 em diferentes temperaturas (120°C – 190°C).

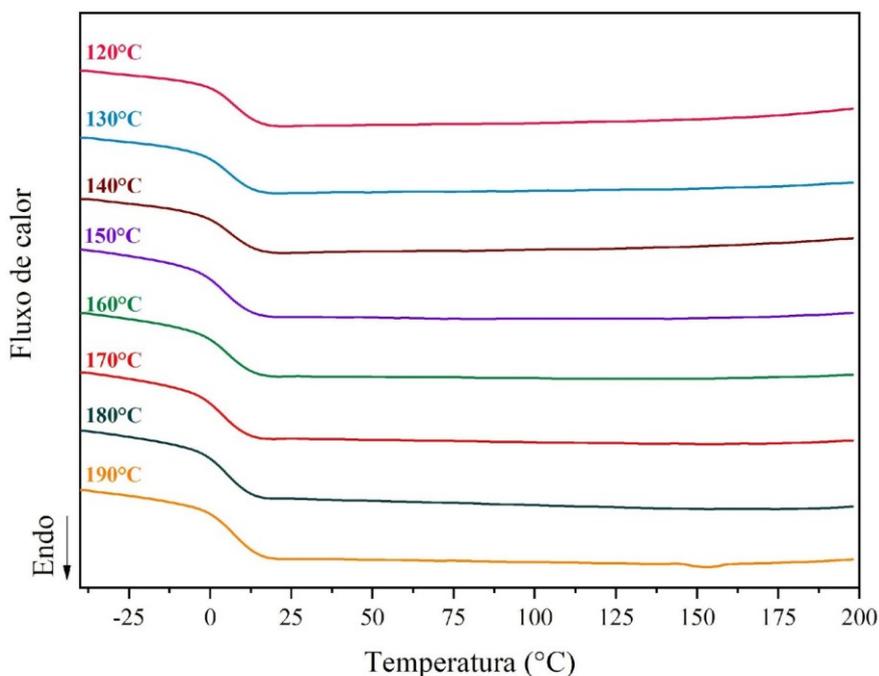


Tabela 12: Temperatura de transição vítrea (T_g) dos *scaffolds* impressos de PLDLA-TMC 60/40 determinadas por DSC.

Temperatura de impressão (°C)	T_g (°C)
120	8
130	6
140	6
150	5
160	6
170	4

180

5

190

7

Não foram observadas diferenças significativas nos valores de T_g entre os *scaffolds* impressos. Em relação à temperatura de transição vítrea do PLDLA-TMC 60/40 antes do processo de impressão ($T_g = 5^\circ\text{C}$), não foram observadas variações.

Para o PLDLA-TMC 70/30, as curvas de DSC para o primeiro e segundo aquecimento dos *scaffolds* impressos também apresentaram apenas a temperatura de transição vítrea (T_g) (Tabela 13), indicando que o processo de impressão não provocou nenhum processo de cristalização no material. As curvas de DSC referentes ao segundo aquecimento estão apresentadas na Figura 31.

Figura 31: Curvas de DSC dos *scaffolds* impressos de PLDLA-TMC 70/30 em diferentes temperaturas ($140^\circ\text{C} - 190^\circ\text{C}$).

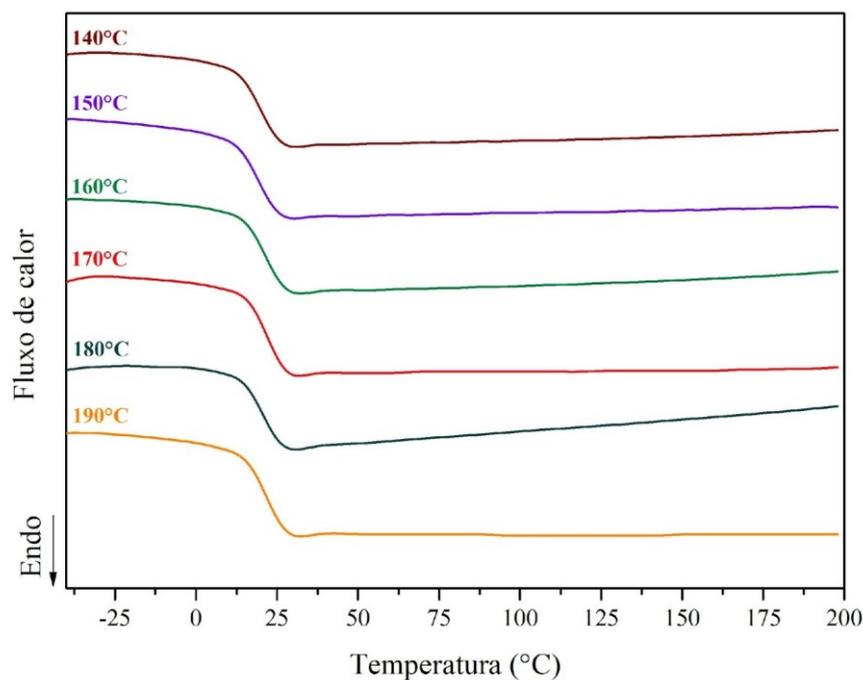


Tabela 13: Temperatura de transição vítrea (T_g) dos *scaffolds* impressos de PLDLA-TMC 70/30 determinadas por DSC.

Temperatura de impressão (°C)	T_g (°C)
140	20
150	19
160	21
170	22
180	20
190	21

A partir dos valores de T_g para os *scaffolds* impressos de PLDLA-TMC 70/30, é possível observar que houve uma diminuição da temperatura de transição vítrea para todas as temperaturas de impressão, quando comparadas com a T_g do polímero antes da impressão ($T_g = 30^\circ\text{C}$). Essa diminuição é atribuída ao processo de quebra das cadeias poliméricas que ocorre durante a degradação termomecânica do material (RASSELET et al., 2014; DINTCHEVA et al., 2017; CUADRI; MARTÍN-ALFONSO, 2018). Embora esse processo de degradação seja semelhante para o PLDLA-TMC 60/40, apenas para os *scaffolds* de PLDLA-TMC 70/30 uma variação significativa nos valores de T_g foi identificada. Isso pode ser melhor compreendido quando se observa os valores de M_n e M_w (Tabela 10), onde ficou evidente que os *scaffolds* de PLDLA-TMC 70/30 sofreram maior redução da massa molar após o processo de impressão, mesmo nas menores temperaturas.

Termogravimetria

Os processos de degradação durante o processo de impressão podem afetar a estabilidade térmica dos *scaffolds* e, conseqüentemente, provocar variações nos processos de perda de massa. A estabilidade térmica dos *scaffolds* de PLDLA-TMC 60/40 e PLDLA-TMC 70/30 foi avaliada por termogravimetria e os respectivos eventos de perda de massa identificados estão detalhados nas Tabelas 14 e 15. As curvas de perda de massa de ambos os materiais para cada uma das temperaturas de impressão estão apresentadas

nos **Apêndices C e D** para o PLDLA-TMC 60/40 e para o PLDLA-TMC 70/30, respectivamente.

Tabela 14: Temperatura dos eventos de perda de massa dos *scaffolds* impressos de PLDLA-TMC 60/40 em função da temperatura de impressão.

Temperatura de impressão (°C)	Eventos de perda de massa (°C)			
	T ₁ *	T ₂ *	T ₃ *	T ₄ *
120	265	291	297	-
130	262	288	295	-
140	187	259	285	-
150	257	284	291	-
160	263	287	296	-
170	205	264	285	294
180	194	253	284	292
190	197	265	283	-

* T₁, T₂, T₃ e T₄: temperaturas dos eventos de perda de massa obtidas a partir da primeira derivada da curva de massa.

A partir da primeira derivada da curva de massa dos *scaffolds* de PLDLA-TMC 60/40 (**Apêndice C**), foi possível identificar a ocorrência de diversos eventos de perda de massa em todas as temperaturas de impressão avaliadas.

Independente do processo de degradação, seu início está sempre relacionado à quebra de uma ligação química covalente. Esta quebra irá gerar espécies reativas, em sua maioria radicais livres, que são responsáveis pela propagação do processo de degradação, o qual irá provocar alterações na estabilidade térmica do material (DE PAOLI, 2009). Portanto, a quebra das cadeias poliméricas, responsável pela degradação termomecânica sofrida pelo material durante a impressão, gera compostos de baixa estabilidade térmica, que por sua vez, são eliminados em momentos diferentes, o que explica os diversos eventos de perda de massa observados (T₁, T₂, T₃ e T₄). Além disso, produtos de oxidação contendo grupos éster ou carbonila, formados durante a degradação, também são capazes

de acelerar a instabilidade térmica de polímeros a base de Poli(ácido láctico) (FAN et al., 2004; AMORIN et al., 2014; OLIVEIRA et al., 2016; CUADRI; MARTÍN-ALFONSO, 2018).

Para os *scaffolds* de PLDLA-TMC 70/30, o mesmo efeito foi observado. Para a maioria das temperaturas de impressão avaliadas, mais de um evento de perda de massa foi identificado (Tabela 15).

Tabela 15: Temperatura dos eventos de perda de massa dos *scaffolds* impressos de PLDLA-TMC 70/30 em função da temperatura de impressão.

Temperatura de impressão (°C)	Eventos de perda de massa (°C)		
	T ₁ *	T ₂ *	T ₃ *
140	274	283	-
150	247	280	285
160	287	-	-
170	290	-	-
180	259	289	294
190	227	289	-

* T₁, T₂ e T₃: temperaturas dos eventos de perda de massa obtidas a partir da primeira derivada da curva de massa.

A partir da primeira derivada da curva de perda de massa dos *scaffolds* de PLDLA-TMC 70/30 (**Apêndice D**), foi possível identificar para a temperatura de impressão de 140°C, um pico de perda de massa em 283°C com um pequeno ombro no lado de menor temperatura (274°C). Para a temperatura de impressão de 150°C, três eventos distintos são observados, sendo os eventos em 247°C e 285°C menos evidentes. Para as temperaturas de impressão de 160°C e 170°C, no entanto, apenas um evento de perda de massa é identificado. Logo, é possível inferir que mais de uma reação de quebra de cadeias poliméricas está ocorrendo e produzindo produtos voláteis em diferentes momentos durante a degradação térmica dos *scaffolds*, conforme discutido acima, embora alguns processos sejam menos evidentes nesse caso.

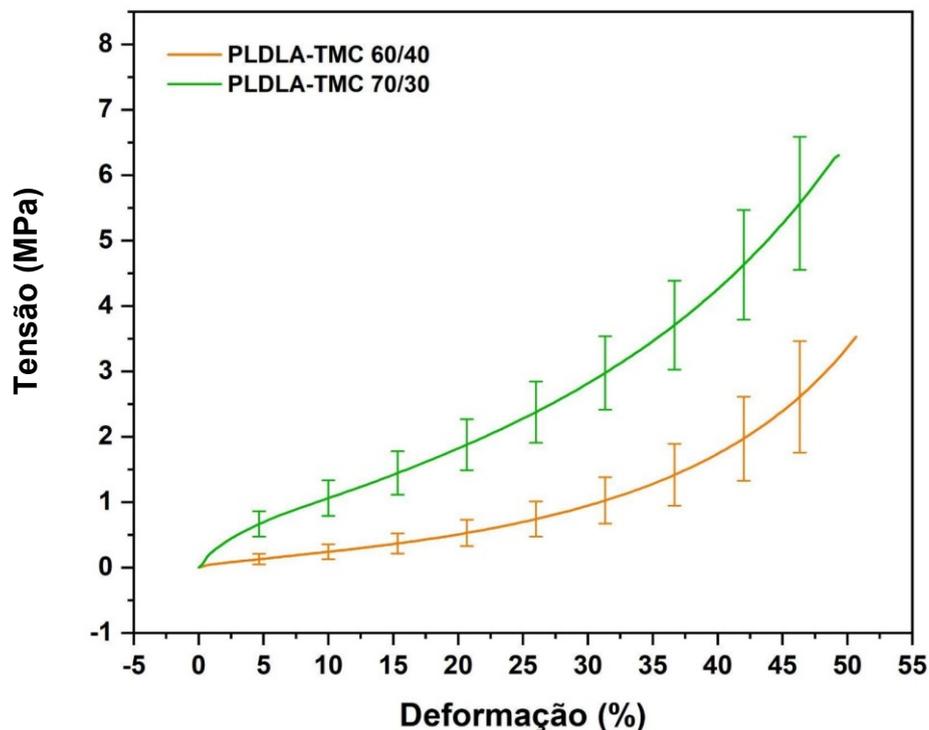
Ensaio mecânico de compressão

As propriedades mecânicas dos materiais poliméricos são de grande importância devido às diversas aplicações que demandam desempenho mecânico por parte destes materiais. Dessa forma, parâmetros como módulo elástico podem servir como base de comparação do desempenho mecânico de diferentes materiais (CANEVAROLO, 2004). Portanto, a fim de avaliar as propriedades mecânicas dos *scaffolds* impressos de PLDLA-TMC 60/40 e PLDLA-TMC 70/30, foi realizado o ensaio mecânico de compressão de acordo com o preconizado pela norma ASTM D575-91.

Destaca-se nesse momento que a partir do conjunto de resultados obtidos previamente, ficou evidente a influência da temperatura de impressão, sobretudo na redução da massa molar dos *scaffolds* impressos. Consequentemente, conforme já pontuado, essa diminuição está diretamente associada a propriedades mecânicas reduzidas. Logo, para a impressão dos *scaffolds* que seriam submetidos à compressão mecânica, foram escolhidas as menores temperaturas nas quais a impressão era viável, tanto para o PLDLA-TMC 60/40 como para o PLDLA-TMC 70/30. As temperaturas de impressão escolhidas para a impressão foram 120°C e 140°C para o PLDLA-TMC 60/40 e para o PLDLA-TMC 70/30, respectivamente.

As curvas de Compressão x Deformação obtidas a partir do ensaio mecânico para os *scaffolds* impressos de PLDLA-TMC 60/40 e PLDLA-TMC 70/30 estão representadas na Figura 32.

Figura 32: Curvas de Compressão (MPa) x Deformação (%) dos *scaffolds* impressos de PLDLA-TMC 60/40 e 70/30.



O perfil elastomérico das curvas é semelhante para todos os espécimes e para ambos os materiais. Tais semelhanças indicam que foi possível obter reprodutibilidade na obtenção dos *scaffolds* a partir dos parâmetros adotados no processo de impressão, uma vez que variações no processo provocariam alterações nas propriedades mecânicas dos espécimes, as quais seriam observadas nas curvas de deformação.

A literatura evidencia que o menisco saudável é capaz de suportar uma carga compressiva de até 20 MPa, sendo a tensão da ordem de 5 MPa a requerida durante a marcha (XIE et al., 2006; ZHANG et al., 2019). Dessa forma, o resultado obtido a partir do ensaio demonstra o potencial de aplicação dos *scaffolds* impressos de ambos os materiais como prótese de menisco, uma vez que de um modo geral os espécimes apresentaram deformação de até 50% sem comprometimento da estrutura do material ou ruptura da amostra quando submetidos a uma tensão de até 5 MPa. No entanto, quando se compara o módulo elástico dos materiais, nota-se que o PLDLA-TMC 60/40 apresenta comportamento mecânico mais próximo da aplicação pretendida (Tabela 16), visto que o módulo elástico do menisco saudável é da ordem de 1 MPa, semelhante ao resultado obtido para os *scaffolds* de PLDLA-TMC 60/40 (CHIA; HULL, 2008).

Tabela 16: Módulo de elasticidade dos *scaffolds* impressos de PLDLA-TMC 60/40 e 70/30.

Material	Módulo Elástico (MPa)	Desvio Padrão (\pm)
PLDLA-TMC 60/40	2,9	2,1
PLDLA-TMC 70/30	20,9	8,9

De um modo geral, as propriedades mecânicas de um material são dependentes de fatores relacionados à sua estrutura e composição (SUN et al., 2017). Logo, a partir dos resultados obtidos neste ensaio, e considerando que as dimensões e a porosidade estabelecida durante o processo de impressão foram as mesmas para os *scaffolds* de ambos os materiais, fica evidente que o aumento da proporção de TMC na composição do polímero foi determinante para a obtenção de propriedades mecânicas compatíveis à aplicação como prótese de menisco.

Seleção do material e da temperatura de impressão dos *scaffolds*

Após extensa caracterização reológica, físico-química, térmica e mecânica dos materiais selecionados como candidatos para impressão 3D, foi realizada uma análise global dos resultados obtidos a fim de eleger o material e a temperatura de impressão dos *scaffolds*.

Conforme largamente discutido, a temperatura foi o fator que mais influenciou os resultados obtidos em quase toda a totalidade dos ensaios realizados, com exceção do ensaio mecânico de compressão, para o qual não houve comparação em função da temperatura. Portanto, no quesito temperatura de impressão, é coerente que sua escolha se baseie naquela que menos influencia negativamente as propriedades do material, ao passo que garante a viabilidade da impressão. Consequentemente, tais temperaturas correspondem a 120°C para o PLDLA-TMC 60/40 e 140°C para o PLDLA-TMC 70/30.

No que se refere a escolha do material, destacam-se os resultados obtidos pelo GPC dos *scaffolds* e pelo ensaio mecânico de compressão. Para os *scaffolds* de PLDLA-TMC 70/30, a redução da massa molar na menor temperatura de impressão (140°C) foi superior a 50%. Considerando as implicações que esta redução pode gerar nas propriedades finais do *scaffold*, a composição do material nestas proporções pode não ser compatível com a aplicação desejada. Corroborando tal afirmação, o módulo elástico

obtido pelo ensaio mecânico de compressão para o PLDLA-TMC 60/40 demonstrou seu potencial de aplicação como prótese de menisco. Dessa forma, o PLDLA-TMC 60/40 foi selecionado como o polímero mais apropriado para a impressão dos *scaffolds*, visando os ensaios referentes à Etapa 3.

A partir de tais definições, outros parâmetros foram avaliados, entre eles a velocidade e o tempo de residência do polímero durante a impressão. A escolha das velocidades de impressão baseou-se no estudo de Ghodbane e colaboradores (2019), onde estabeleceu-se que uma faixa de velocidades entre 4 mm/s e 8 mm/s se faz necessário para a obtenção precisa de *scaffolds* com geometrias complexas, tais como os meniscos. Os resultados de massa molar obtidos pelo GPC em função da variação destes parâmetros estão descritos na Tabela 17.

Tabela 17: Valores de M_n e M_w dos *scaffolds* de PLDLA-TMC 60/40 impressos na temperatura de 120°C, em diferentes velocidades (4 mm/s e 8 mm/s).

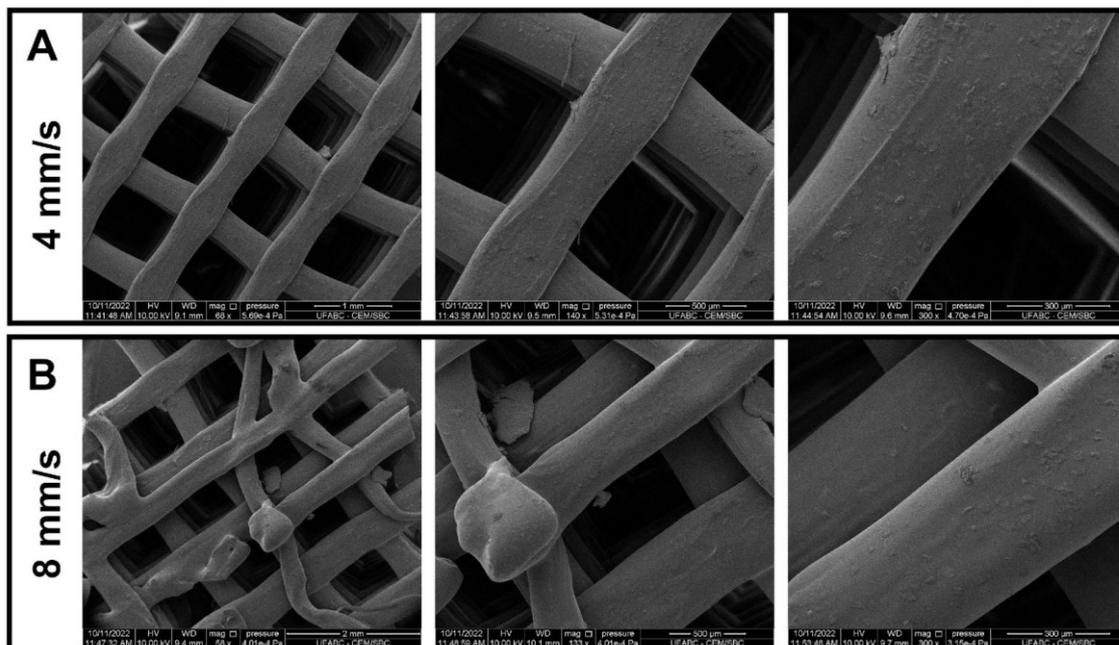
<i>Scaffold</i>	120°C (4 mm/s)		120°C (8 mm/s)	
	M_n (g/mol)	M_w (g/mol)	M_n (g/mol)	M_w (g/mol)
1°	71.014	135.813	89.322	135.224
2°	70.182	142.547	54.086	112.632
3°	63.477	116.175	62.385	116.749
4°	54.678	97.049	77.731	132.497
5°	53.547	89.073	76.499	117.016
6°	48.049	87.124	52.888	117.545

É possível identificar a partir dos valores de M_n e M_w que a variação da velocidade teve menor influência na redução da massa molar quando comparado ao tempo de residência do material no êmbolo da impressora. Para as amostras impressas na velocidade de 4 mm/s, a impressão de cada *scaffold* demorou em média 15 minutos. Dessa forma, o intervalo de tempo entre a impressão do 1° e do 6° *scaffold* foi de 90 minutos. Quando se compara os valores de massa molar entre as seis amostras, nota-se uma diminuição nos valores de M_n e M_w em função do tempo de residência do material. Essa

influência fica mais evidente na comparação com os resultados obtidos pelo GPC para os *scaffolds* impressos na velocidade de 8 mm/s. Nota-se que a variação entre os valores de massa foi menor quando a velocidade de impressão foi duas vezes superior, uma vez que, conseqüentemente, o tempo de residência do material no êmbolo da impressora caiu pela metade.

Outro aspecto relevante a ser pontuado está relacionado à fidelidade de forma dos *scaffolds* obtidos. A partir da variação da velocidade, diferenças nessa fidelidade foram identificadas (Figura 33). Quando a velocidade de impressão foi igual a 4 mm/s, é possível observar a obtenção de filamentos uniformes, conduzindo à formação de poros retangulares por toda a estrutura do *scaffold*. No entanto, quando a velocidade aumentou para 8 mm/s nota-se que a deposição do material resultou em poros irregulares, filamentos defeituosos e baixa qualidade de impressão.

Figura 33: Micrografias dos *scaffolds* de PLDLA-TMC 60/40 impressos na velocidade de 4 mm/s (A) e 8 mm/s (B) em diferentes aumentos.



Embora os resultados anteriores indicaram que o tempo de residência tem relação direta com a redução da massa molar, é importante considerar todos os fatores envolvidos na escolha de um material como modelo para engenharia tecidual de cartilagem. Dessa forma, a precisão dos *scaffolds* obtidos a partir da impressão na temperatura de 120°C com velocidade de 4 mm/s foi um aspecto relevante na escolha dos parâmetros de

impressão, uma vez que do ponto de vista biológico, a interconectividade dos poros possibilita a integração adequada do material ao tecido, permitindo a proliferação celular, e conseqüentemente, a substituição dos implantes por tecidos neoformados (MBARKI et al., 2017).

3ª Etapa – Degradação *in vitro*, citocompatibilidade e diferenciação em condrócitos em *scaffolds* impressos de PLDLA-TMC 60/40.

Degradação *in vitro*

Uma vez definidos o material, a temperatura e a velocidade de impressão, foi realizado o ensaio de degradação hidrolítica dos *scaffolds* a fim de identificar o perfil de degradação do material, previamente aos ensaios de citocompatibilidade e cultura dinâmica no biorreator. Os *scaffolds* submetidos à degradação durante 2 e 4 semanas foram analisados pelas técnicas de GPC, FTIR, DSC, TG e MEV. A escolha do tempo máximo de 4 semanas teve como base o ensaio de cultura dinâmica, o qual não foi superior a 28 dias.

Após os tempos de degradação, as amostras tiveram suas massas aferidas para avaliar se houve diminuição da massa dos *scaffolds* após o ensaio. Os resultados referentes a esta variação estão descritos na Tabela 18.

Tabela 18: Massa das amostras submetidas à degradação durante 2 e 4 semanas comparada à massa das amostras antes do ensaio.

Tempo de degradação	Amostra	Massa (g)	
		Antes do ensaio	Após o ensaio
2 semanas	1	0.5465	0.5358
	2	0.5018	0.4921
	3	0.4895	0.4815
4 semanas	1	0.5435	0.4835
	2	0.6369	0.5884

3

0.6797

0.6455

Como é possível observar, as amostras submetidas à degradação durante 2 semanas apresentaram uma redução de apenas 2% em suas massas quando comparadas a massa antes do ensaio. Para o grupo de 4 semanas, no entanto, as amostras tiveram uma redução média de 8% em relação à massa inicial. Quando foi realizado o ensaio de GPC, também se observou comportamento semelhante em relação à massa molar das amostras (Tabela 19). Para as amostras submetidas à degradação durante 2 semanas, houve uma redução média de 50% da massa molar quando comparada ao controle, ou seja, a amostra que não foi submetida à degradação. Além disso, o aumento do índice de polidispersividade indica a ocorrência de um processo aleatório de quebra de cadeias (ROWE et al., 2016). Por sua vez, para as amostras submetidas à degradação durante 4 semanas, nota-se uma redução de aproximadamente 70% da massa molar, reiterando o efeito da degradação na estrutura do material.

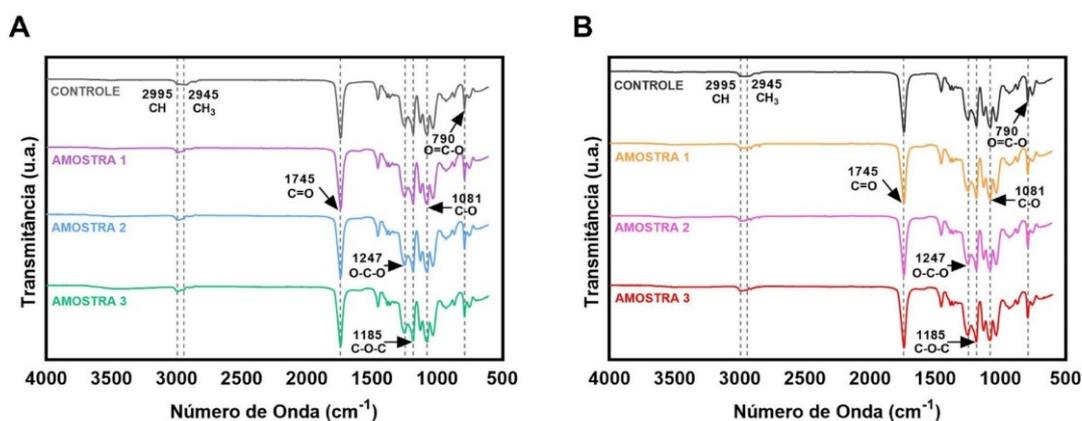
Tabela 19: Valores de M_n , M_w e IP das amostras submetidas à degradação durante 2 e 4 semanas.

Tempo de degradação	Amostra	M_n (g/mol)	M_w (g/mol)	IP
2 semanas	Controle	258.192	334.575	1.29
	1	110.989	224.197	2.01
	2	112.522	230.245	2.04
	3	93.705	199.788	2.13
4 semanas	Controle	118.146	290.695	2.46
	1	38.633	93.028	2.40
	2	31.195	81.778	2.62
	3	39.747	89.093	2.24

Durante a degradação do PLDLA-TMC, as cadeias poliméricas se quebram em fragmentos menores, resultando em uma diminuição significativa na massa molar ponderal média (M_w) e na resistência mecânica do material. No entanto, apesar desta diminuição, inicialmente não é observada uma redução significativa na massa total da amostra. Isso ocorre porque os produtos de degradação, entre eles os monômeros de ácido láctico, são solúveis e podem ser removidos da matriz polimérica sem afetar significativamente a massa total da amostra (ELSAWY et al., 2017).

A partir dos espectros de FTIR foi possível observar que não houve nenhuma alteração no perfil químico do material após 2 e 4 semanas de degradação *in vitro*. Não foram identificados novos picos ou deslocamento de bandas (Figura 34).

Figura 34: Espectros de FTIR dos *scaffolds* submetidos à degradação durante 2 e 4 semanas (A e B, respectivamente).



Em relação às curvas de DSC, não foram observadas diferenças significativas na temperatura de transição vítrea antes e após a degradação (Figura 35). Apenas um ligeiro aumento na T_g foi identificado quando os *scaffolds* foram submetidos à degradação, sobretudo após 4 semanas (Tabela 20).

Figura 35: Curvas de DSC do segundo aquecimento dos *scaffolds* submetidos à degradação durante 2 e 4 semanas (A e B, respectivamente).

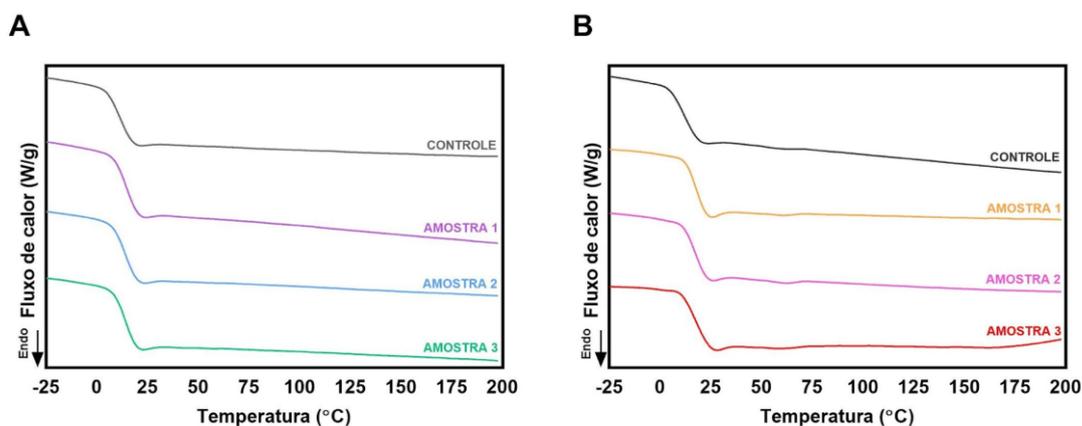


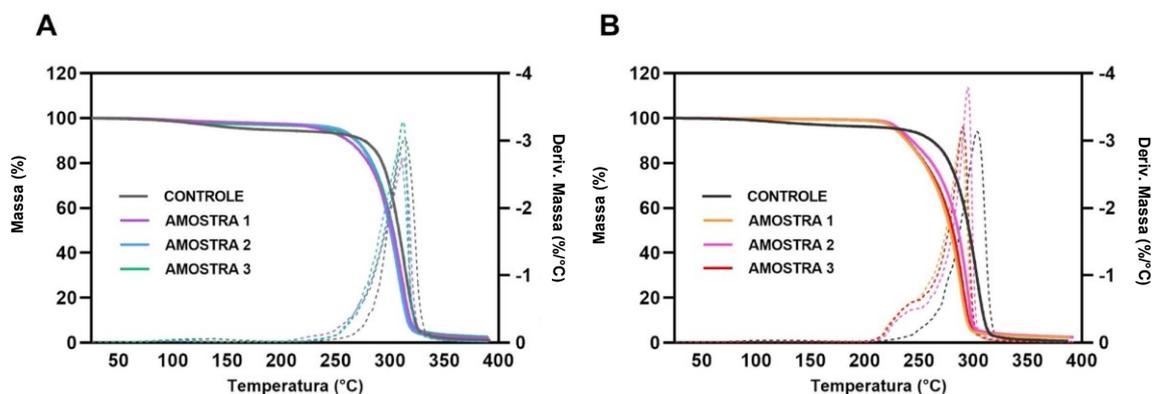
Tabela 20: Temperatura de transição vítrea (T_g) e temperatura dos eventos de perda de massa dos *scaffolds* submetidos à degradação durante 2 e 4 semanas.

Tempo de degradação	Amostra	T_g (°C)	Eventos de perda de massa (°C)	
			T_1^*	T_2^*
2 semanas	Controle	11	130	292
	1	14	313	-
	2	13	310	-
	3	13	314	-
4 semanas	Controle	12	129	307
	1	17	235	291
	2	17	232	294
	3	17	234	290

* T_1 e T_2 : temperaturas dos eventos de perda de massa obtidas a partir da primeira derivada da curva de massa.

A partir das curvas TG e dTG, também foi possível observar um ligeiro aumento na estabilidade térmica do material quando se compara os *scaffolds* antes e após a degradação (Figura 36).

Figura 36: Curvas de massa (%) em função da temperatura dos *scaffolds* submetidos à degradação durante 2 e 4 semanas (A e B, respectivamente).

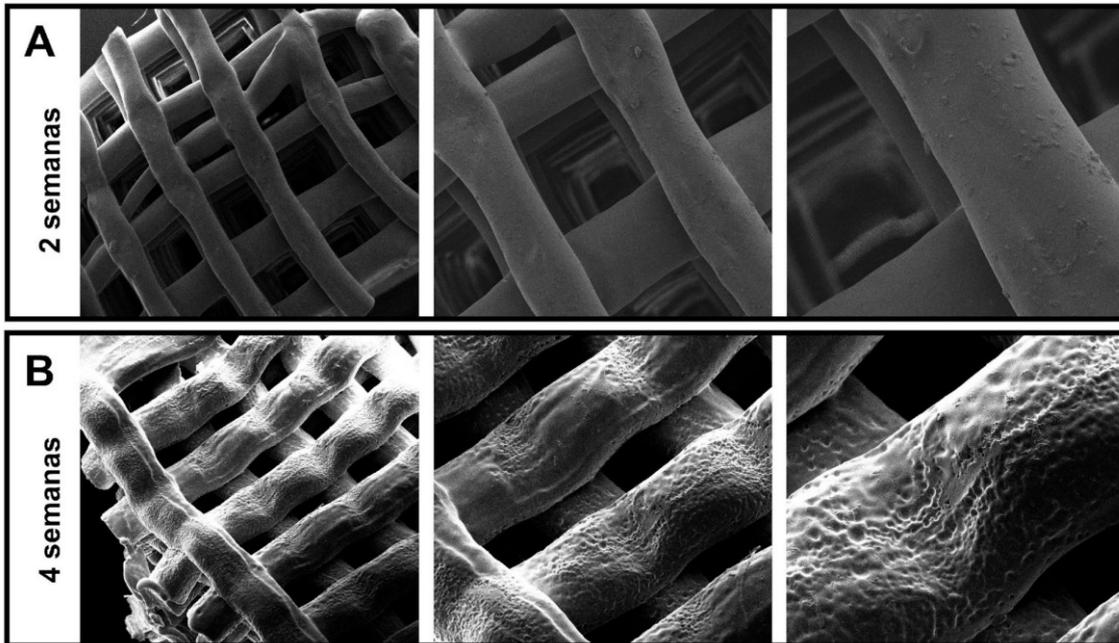


No grupo de amostras que sofreram degradação durante 2 semanas, apenas a amostra controle apresentou dois eventos de perda de massa, sendo o primeiro em 130°C. De forma análoga ao observado nos resultados de DSC, as amostras submetidas à degradação demonstraram maior estabilidade térmica em comparação a amostra controle que não sofreu degradação. Para os *scaffolds* que degradaram durante 4 semanas, todos apresentaram dois eventos de perda de massa. No entanto, a amostra controle também apresentou o primeiro evento a uma temperatura menor que as demais (Tabela 20).

Durante a degradação hidrolítica, alguns grupos funcionais podem ser liberados como produtos de degradação, os quais podem reagir e formar novas ligações cruzadas. Essas ligações aumentam a estabilidade do material, levando a um aumento na T_g e em uma maior estabilidade térmica do mesmo (SAHA; TSUJI, 2006), conforme observado nos resultados de DSC e termogravimetria.

Os resultados do MEV para as amostras submetidas à degradação durante 2 e 4 semanas estão apresentados na Figura 37. A partir do MEV foi possível observar que nos *scaffolds* submetidos à degradação durante 2 semanas, nenhuma alteração foi identificada nos filamentos (Figura 37A). Em contrapartida, é evidente o efeito da degradação nas amostras após 4 semanas de ensaio (Figura 37B). Nota-se um processo de erosão dos filamentos ao longo de toda a estrutura do *scaffold*. Os buracos observados nas amostras são atribuídos à dissolução dos fragmentos de cadeias formados pelo processo de hidrólise (DONG et al., 2013).

Figura 37: Micrografias dos *scaffolds* submetidos à degradação durante 2 e 4 semanas (A e B, respectivamente) em diferentes aumentos.

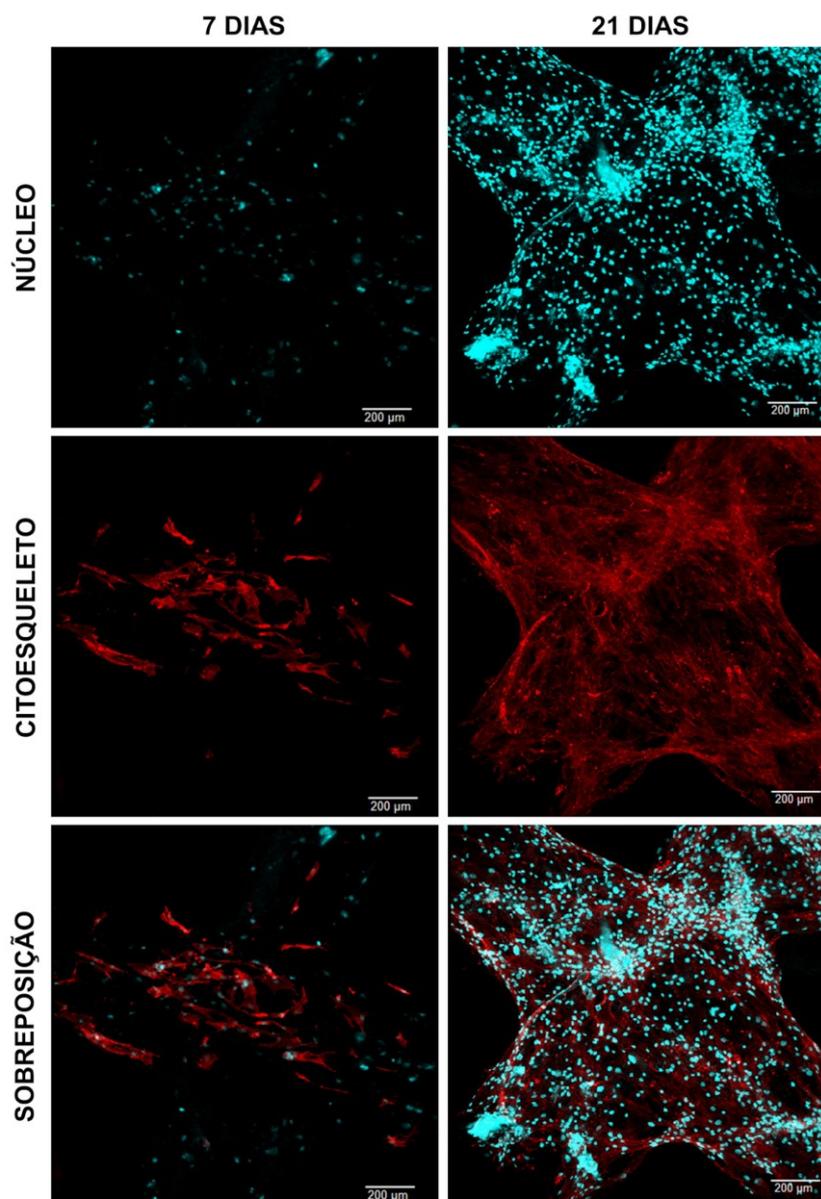


O perfil de degradação de um material é uma propriedade bastante relevante a qual está intrinsecamente relacionada à aplicação para a qual este material será destinado. Quando um material biorreabsorvível é implantado, espera-se que haja um equilíbrio entre a regeneração do tecido e a degradação do material (SABIR et al., 2009). Dessa forma, o ensaio de degradação hidrolítica auxilia na escolha do material para a aplicação pretendida e na compreensão de suas características. No contexto do presente trabalho, se faz necessário conhecer o perfil de degradação do PLDLA-TMC 60/40 uma vez que os *scaffolds* serão submetidos à cultura dinâmica em biorreator sob módulo de perfusão.

Citocompatibilidade

O ensaio de citocompatibilidade foi realizado em cultura estática a fim de avaliar o potencial do PLDLA-TMC 60/40 como carreador celular, previamente ao ensaio em biorreator. Conforme esperado, a partir das análises de microscopia dos *scaffolds*, foi possível observar que houve proliferação celular ao longo do tempo, com maior adesão das células após 21 dias (Figura 38). Núcleos de células foram encontrados por toda a geometria do *scaffold* a uma profundidade de até 300 μm .

Figura 38: Micrografias de varredura confocal a laser identificando as CTMs aderidas nos *scaffolds* impressos de PLDLA-TMC 60/40 em diferentes tempos de cultivo (7 e 21 dias). Em azul é identificado o núcleo pela marcação com DAPI, enquanto em vermelho evidencia-se o citoesqueleto por meio de faloidina conjugada com Alexafluor 647.

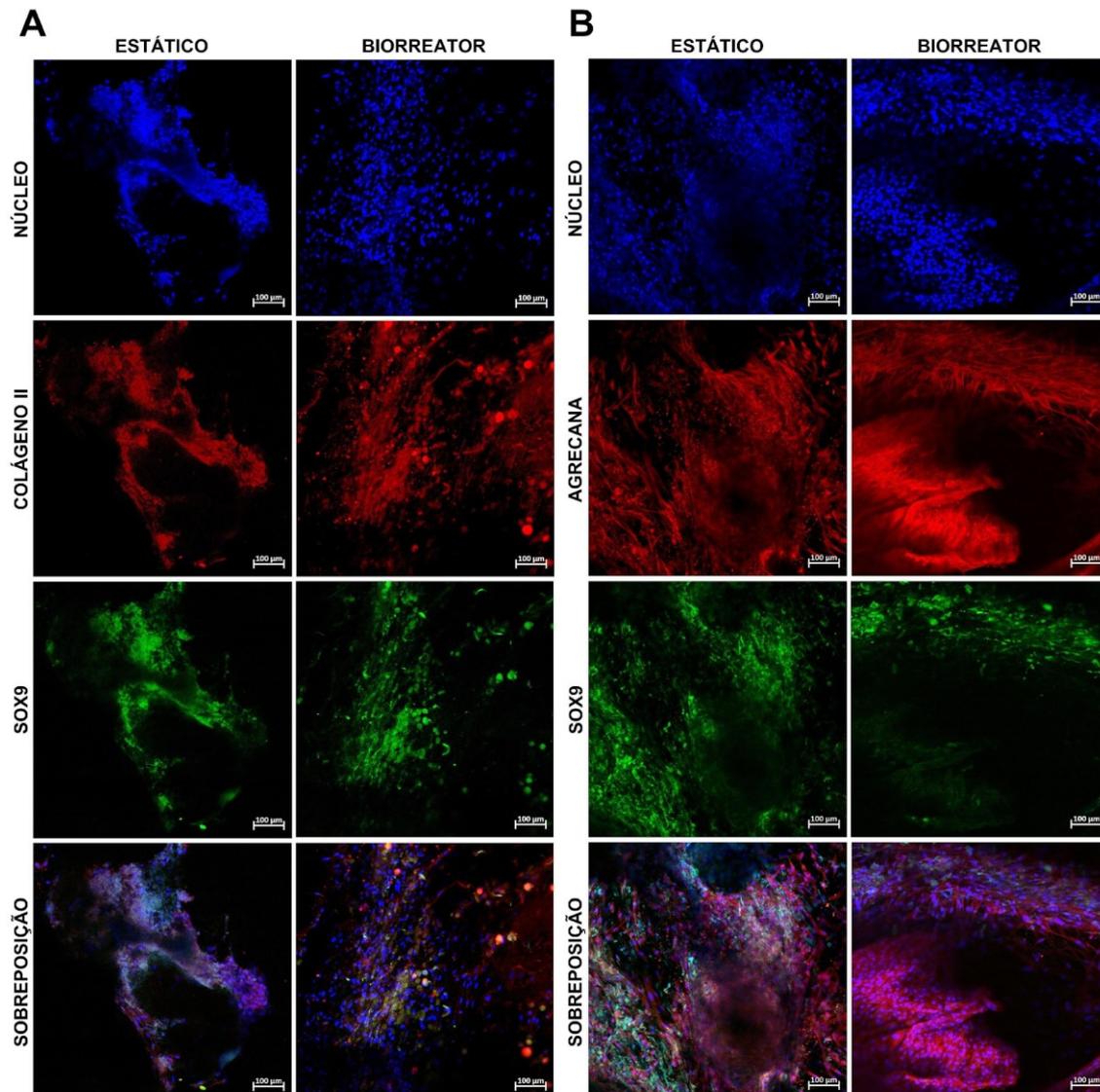


O crescimento celular nos *scaffolds* evidenciou a afinidade das células pelo material a partir da adesão homogênea das mesmas e a manutenção de sua capacidade de proliferação ao longo do tempo (KEANE; BADYLAK, 2014). Considerando que a capacidade de adesão e proliferação celular é fator fundamental na escolha de materiais para aplicações de contato direto e de integração com tecidos, os resultados obtidos demonstram o potencial do PLDLA-TMC 60/40 como candidato à engenharia tecidual.

Cultura dinâmica em biorreator

Os *scaffolds* impressos de PLDLA-TMC 60/40 foram submetidos à diferenciação celular e mantidos durante 21 dias em biorreator sob módulo dinâmico de perfusão. A partir da microscopia de varredura confocal a laser, foi possível observar a marcação para agrecana, principal molécula constituinte da matriz extracelular do tecido cartilaginoso, colágeno tipo II e SOX9 (Figura 39). Os *scaffolds* submetidos à cultura dinâmica foram comparados aos *scaffolds* que ficaram em cultura estática pelo mesmo período.

Figura 39: Micrografias de varredura confocal a laser das CTM diferenciadas em condrócitos após 21 dias de cultura dinâmica em biorreator. Em (A) marcação para DAPI, colágeno II e SOX9. Em (B) marcação para DAPI, agregana e SOX9.

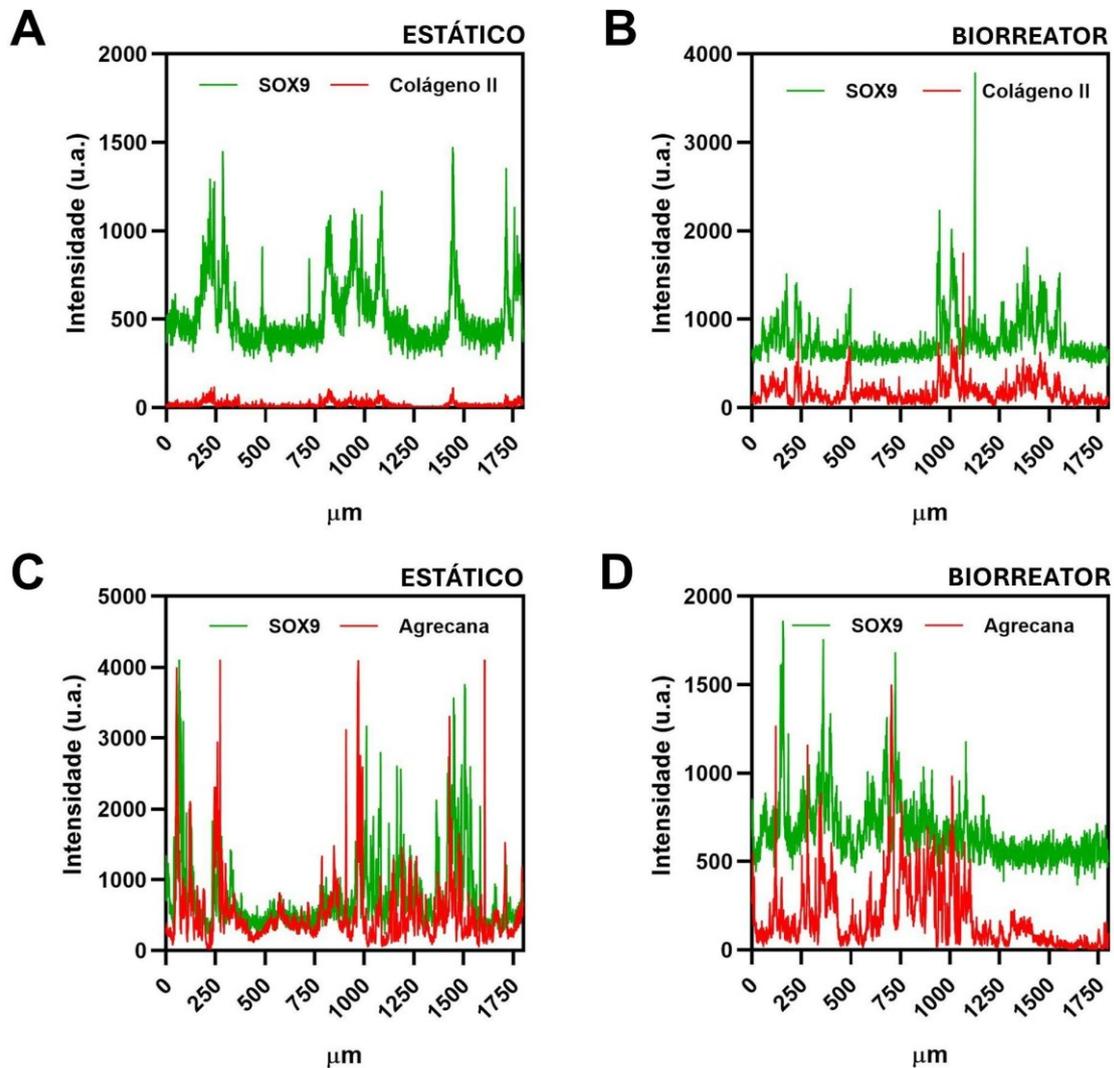


A partir da apresentação das imagens, nota-se que houve diferenciação das CTMs em condrócitos nos *scaffolds* impressos de PLDLA-TMC 60/40, uma vez que foi possível identificar a marcação para as três moléculas de interesse após 21 dias (BARRY et al., 2001; MARDONES et al., 2015). Na Figura 39A, que evidencia a marcação para colágeno II e SOX9 é possível observar uma grande diferença entre o grupo controle (cultura estática) e os *scaffolds* submetidos à cultura dinâmica no biorreator. Além de menor densidade de células no grupo controle, as células ficaram restritas a uma única região do *scaffold*, ao passo que no *scaffold* que ficou em cultura no biorreator, as células espalharam ao longo da estrutura do material, sendo encontrados núcleos de células até

350 μm de profundidade para este grupo. Ademais, a expressão das moléculas da matriz extracelular de cartilagem, sobretudo o colágeno tipo II, também se mostrou mais difusa no segundo grupo. Em relação à Figura 39B, nota-se uma expressão bastante difusa das moléculas no grupo controle, no entanto, a expressão da agrecana no grupo referente ao biorreator evidencia uma conformação celular estratificada típica de tecido cartilaginoso. Essa diferença entre ambos os grupos (cultura estática e biorreator) está diretamente associada ao efeito da perfusão promovida pelo biorreator, que garante uma distribuição mais homogênea dos nutrientes e permite a proliferação das células em profundidades maiores (AFZALI et al., 2024). Vale destacar ainda que após a transferência dos *scaffolds* para o biorreator, conforme descrito no item 3.10.3 da metodologia, as células foram mantidas em meio de cultura sem suplementos para diferenciação. Dessa forma, o estímulo recebido pelo biorreator juntamente com a sinalização parácrina das células já diferenciadas, foi suficiente para manter a proliferação de células em condrogênese, mesmo na ausência de estímulos bioquímicos, conforme previamente descrito (PEDRINI et al., 2020).

A quantificação da expressão de SOX9 também corrobora o processo de diferenciação das CTM, tanto na cultura estática como no biorreator (Figura 40).

Figura 40: Intensidade de fluorescência da marcação específica para agregcana, colágeno II e SOX9 para os *scaffolds* submetidos à condrogênese em cultura estática (A e C) e biorreator (B e D).



SOX9 é um fator de transcrição que regula a expressão de vários genes envolvidos na formação e na manutenção da cartilagem, incluindo colágeno tipo II e proteoglicanos específicos da cartilagem. Quando as CTMs iniciam o processo de diferenciação, a expressão de SOX9 aumenta, o que por sua vez ativa a expressão desses genes específicos da cartilagem. Em estágios iniciais da diferenciação, SOX9 mantém as células em um estado proliferativo enquanto induz a expressão de genes condrogênicos. À medida que a diferenciação avança, SOX9 ajuda a coordenar a transição das CTMs para um estado diferenciado de condrócitos, onde as células se tornam menos proliferativas e mais especializadas na produção de matriz extracelular. Logo, sua

expressão desempenha um papel fundamental na determinação do destino celular das CTMs, o qual induz ao fenótipo condrogênico (JO et al., 2014).

Diante deste cenário, fica evidente que a capacidade de diferenciação das células-tronco não é apenas regulada por fatores biológicos, mas também pelo microambiente onde estão inseridas. Logo, fatores como morfologia e composição química dos *scaffolds* são muito importantes para garantir o processo de diferenciação destas células (HIGUCHI et al., 2017). Dessa forma, diante deste conjunto de resultados, pode-se afirmar que o PLDLA-TMC 60/40 é elegível para aplicações futuras como próteses de menisco, visto que permitiu a proliferação das células em condrogênese, tanto em sua superfície quanto em seu interior, em uma profundidade de até 350 μm . Além disso, ao correlacionar os resultados da cultura dinâmica com os resultados do ensaio de degradação *in vitro*, fica evidente que há um equilíbrio entre a degradação do material e o crescimento tecidual. Após 21 dias em cultura no biorreator, indícios de formação de cartilagem foram observados, enquanto o MEV demonstrou que o material ainda oferece suporte estrutural que viabiliza a formação do tecido nesse mesmo período.

Embora a reprodução fiel da anisotropia característica do tecido meniscal e sua complexa organização fibrilar, fundamental para suas propriedades biomecânicas e funcionais, não tenham sido completamente reproduzidas neste modelo de cultura, os resultados obtidos indicam a capacidade do PLDLA-TMC 60/40 em promover a formação homogênea de tecido cartilaginoso em profundidades consideráveis, o que é essencial para aplicações clínicas bem-sucedidas. Além disso, a estratégia de cultura dinâmica adotada, juntamente com o suporte estrutural oferecido pelo *scaffold* de PLDLA-TMC, sugere que nosso modelo pode contribuir significativamente para o desenvolvimento de terapias regenerativas mais eficazes e adaptadas à complexidade do menisco. Assim, mesmo com reconhecidas limitações, os resultados obtidos oferecem uma base sólida para futuras investigações no sentido de aprimorar a reprodução da anisotropia meniscal e a funcionalidade do tecido regenerado.

6 CONCLUSÕES

1ª Etapa:

Os resultados obtidos a partir dos ensaios reológicos em modo estacionário evidenciaram o comportamento pseudoplástico do PLDLA-TMC 60/40 e 70/30, indispensável para o processo de impressão por extrusão.

2ª Etapa:

As caracterizações realizadas nos *scaffolds* impressos, sobretudo a caracterização da massa molar, demonstraram que a temperatura de impressão foi o fator que mais influenciou na degradação do material durante o processo de extrusão.

A velocidade de impressão se mostrou menos significativa na redução da massa molar dos *scaffolds* quando comparado ao tempo de residência do material no êmbolo da impressora.

O ensaio mecânico de compressão demonstrou que o módulo elástico apresentado pelo PLDLA-TMC 60/40 se mostrou mais compatível à aplicação como prótese de menisco frente ao PLDLA-TMC 70/30.

A partir dos ensaios de caracterização da massa molar dos *scaffolds* e dos resultados do ensaio mecânico de compressão, optou-se pela seleção do PLDLA-TMC 60/40. Quanto aos parâmetros de impressão, a temperatura de 120°C e velocidade de 4 mm/s foram selecionadas.

3ª Etapa:

O ensaio de degradação *in vitro* demonstrou a estabilidade do material durante o período avaliado de até 4 semanas, compatível com a formação tecidual de cartilagem.

O ensaio de citocompatibilidade nos *scaffolds* impressos comprovou o potencial do PLDLA-TMC 60/40 como substrato para cultura e diferenciação celular.

O ensaio de cultura dinâmica em biorreator evidenciou a diferenciação das CTMs em condrócitos e formação de tecido cartilaginoso no grupo de *scaffolds* submetidos à perfusão, corroborando o potencial do PLDLA-TMC 60/40 como um material viável para futuras aplicações como próteses de menisco.

Portanto, a totalidade dos resultados obtidos proporcionaram uma visão abrangente e promissora do PLDLA-TMC 60/40 como uma opção viável para a impressão 3D de *scaffolds* destinados à engenharia tecidual de cartilagem. Esses resultados destacam a relevância do PLDLA-TMC 60/40 como uma escolha estratégica e eficaz neste contexto.

7 REFERÊNCIAS

A. ARSHINOFF, S. et al. Role of rheology in tears and artificial tears. **Journal of Cataract and Refractive Surgery**, v. 47, n. 5, p. 655–661, 2021.

ABRAHAM, J. et al. Rheological characteristics of nanomaterials and nanocomposites. In: **Micro and Nano Fibrillar Composites (MFCs and NFCs) from Polymer Blends**. [s.l.] Elsevier Inc., 2017, p. 327–350.

ADAMCHUK, D. et al. Distributions of relaxation times in relaxor ferroelectric Ba(Ti_{0.8} Ce_{0.2})O₃. **Ferroelectrics**, v. 553, n. 1, p. 103–110, 2019.

AFZALI, A. M. et al. Bioreactor design-assisted bioprinting of stimuli-responsive materials for tissue engineering and drug delivery applications. **Bioprinting**, v. 37, p. e00325, 2024.

AGARWAL, M. et al. Distinguishing thixotropy from viscoelasticity. **Journal of Rheology**, v. 65, n. 4, p. 663–680, 2021.

AGIRRE-OLABIDE, I. et al. Characterization of the linear viscoelastic region of magnetorheological elastomers. **Journal of Intelligent Material Systems and Structures**, v. 25, n. 16, p. 2074–2081, 2014.

AJINJERU, C. et al. Determination of melt processing conditions for high performance amorphous thermoplastics for large format additive manufacturing. **Additive Manufacturing**, v. 21, p. 125–132, 2018.

AKBARZADEH, R.; YOUSEFI, A-M. Effects of processing parameters in thermally induced phase separation technique on porous architecture of scaffolds for bone tissue engineering. **Journal Of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials**, v. 102, n. 6, p. 1304-1315, 2014.

- ALMOND, J. et al. Determination of the carbonyl index of polyethylene and polypropylene using specified area under band methodology with ATR-FTIR spectroscopy. **E-Polymers**, v. 20, n. 1, p. 369–381, 2020.
- AMANO, Y. et al. Evaluation of a poly-l-lactic acid membrane and membrane fixing pin for guided tissue regeneration on bone defects in dogs. **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontics**, v. 97, n. 2, p. 155–163, 2004.
- AMORIN, N. S. Q. S. et al. Study of thermodegradation and thermostabilization of poly(lactide acid) using subsequent extrusion cycles. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 131, n. 6, p. n/a-n/a, 2014.
- ASTM D575-91, Standard Test Methods for Rubber Properties in Compression, ASTM International, West Conshohocken, 2018.
- AURAS, R. et al. **Poly(Lactic Acid)**. Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc., 2010.
- AZAD, M. S.; TRIVEDI, J. J. Quantification of the Viscoelastic Effects During Polymer Flooding: A Critical Review. **SPE Journal**, v. 24, n. 06, p. 2731–2757, 2019.
- BALANI, K. et al. Physical, Thermal, and Mechanical Properties of Polymers. In: **Biosurfaces**. Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc, 2015. p. 329–344.
- BARNES, H. Thixotropy—a review. **Journal Of Non-Newtonian Fluid Mechanics**, v. 70, n. 1-2, p. 1-33, 1997.
- BARRY, F. et al. Chondrogenic Differentiation of Mesenchymal Stem Cells from Bone Marrow: Differentiation Dependent Gene Expression of Matrix Components. **Experimental Cell Research**, v. 268, n. 2, p. 189–200, 2001.

BAYNAT, C. et al. Actifit Synthetic Meniscal Substitute: Experience with 18 Patients in Brest, France. **Orthopaedics and Traumatology: Surgery and Research**, v. 100, p. 100, S385–S389, 2014.

BEŞKARDEŞ, I. G. et al. A systematic study for optimal cell seeding and culture conditions in a perfusion mode bone-tissue bioreactor. **Biochemical Engineering Journal**, v. 135, p. 100-111, 2018.

BOSE, S. et al. Additive manufacturing of biomaterials. **Progress in Materials Science**, v. 93, p. 45–111, 2018.

BRAUN, D. B.; ROSEN, M. R. Commercially Available Rheology Modifiers. In: **Rheology Modifiers Handbook**. [s.l.] Elsevier, 1999. p. 71–191.

BRETAS, R.; d'ÁVILLA, M. **Reologia De Polimeros Fundidos**. 2. ed. [S.L.]: Edufscar, 2006. 257 p.

BROSSIER, T. et al. Synthesis of Poly(Trimethylene Carbonate) from Amine Group Initiation: Role of Urethane Bonds in the Crystallinity. **Polymers**, v. 13, n. 2, p. 280, 2021.

BULGHERONI, E. et al. Comparative Study of Collagen versus Synthetic-Based Meniscal Scaffolds in Treating Meniscal Deficiency in Young Active Population. **Cartilage**, v. 7, p. 29–38, 2016.

CALIGNANO, F. et al. Overview on additive manufacturing technologies. **Proceedings of the IEEE**, v. 105, n. 4, p. 593–612, 2017.

CANEVAROLO, S. V. **Técnicas de Caracterização de Polímeros**. São Carlos: Artliber, 2004. 448 p.

CARTMELL, S. H. et al. Effects of Medium Perfusion Rate on Cell-Seeded Three-Dimensional Bone Constructs in Vitro. **Tissue Engineering**, v. 9, n. 6, p. 1197–1203, 2003.

CASSU, S. N.; FELISBERTI, M. I. Dynamic mechanical behavior and relaxations in polymers and polymeric blends. **Química Nova**, v. 28, n. 2, p. 255–263, 2005.

CHHABRA, R. P. Non-Newtonian fluids: An introduction. In: **Rheology of Complex Fluids**. [s.l.] Springer New York, 2010. p. 3–34.

CHIA, H. N.; HULL, M. L. Compressive moduli of the human medial meniscus in the axial and radial directions at equilibrium and at a physiological strain rate. **Journal of Orthopaedic Research**, v. 26, n. 7, p. 951–956, 2008.

CHUNG, C.; BURDICK, J. A. Engineering cartilage tissue. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 60, n. 2, p. 243-262, 2008.

CICALA, G. et al. Comparison of Ultem 9085 used in fused deposition modelling (FDM) with polyetherimide blends. **Materials**, v. 11, n. 2, p. 285, 2018.

CUADRI, A. A.; MARTÍN-ALFONSO, J. E. Thermal, thermo-oxidative and thermomechanical degradation of PLA: A comparative study based on rheological, chemical and thermal properties. **Polymer Degradation and Stability**, v. 150, p. 37–45, 2018.

DAVACHI, S. M. et al. Investigating thermal degradation, crystallization and surface behavior of l-lactide, glycolide and trimethylene carbonate terpolymers used for medical applications. **Materials Science and Engineering C**, v. 32, n. 2, p. 98–104, 2012.

DE PAOLI, Marco-Aurelio. **Degradação E Estabilização De Polimeros**. [S.L.]: Artliber, 2009. 286 p.

DEO, K. A. et al. Bioprinting 101: Design, Fabrication, and Evaluation of Cell-Laden 3D Bioprinted Scaffolds. **Tissue Engineering - Part A**, v. 26, n. 5–6, p. 318–338, 2020.

DINTCHEVA, N. T. et al. Thermo-oxidative stabilization of poly(lactic acid)-based nanocomposites through the incorporation of clay with in-built antioxidant activity.

Journal of Applied Polymer Science, v. 134, n. 24, 2017.

DONG, W. et al. Effect of Chain-Extenders on the Properties and Hydrolytic Degradation Behavior of the Poly(lactide)/ Poly(butylene adipate-co-terephthalate) Blends. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 14, n. 10, p. 20189-20203, 2013.

DULLAERT, K.; MEWIS, J. Thixotropy: Build-up and breakdown curves during flow. **Journal of Rheology**, v. 49, n. 6, p. 1213–1230, 2005.

EL-HADI, A. M. Miscibility of crystalline/amorphous/crystalline biopolymer blends from PLLA/PDLLA/PHB with additives. **Polymer - Plastics Technology and Engineering**, v. 58, n. 1, p. 31–39, 2018.

ELSAWY, M. A. Hydrolytic degradation of polylactic acid (PLA) and its composites. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 79, p. 1346-1352, 2017.

ELSNER, J. J. et al. Design of a Free-Floating Polycarbonate-Urethane Meniscal Implant Using Finite Element Modeling and Experimental Validation. **Journal of Biomechanical Engineering**, v. 132, p. 095001, 2010.

FAN, Y. et al. Thermal degradation behaviour of poly(lactic acid) stereocomplex. **Polymer Degradation and Stability**, v. 86, n. 2, p. 197–208, 2004.

FANG, Q.; HANNA, M. A. Rheological properties of amorphous and semicrystalline polylactic acid polymers. **Industrial Crops and Products**, v. 10, n. 1, p. 47–53, 1999.

FOX, A. J. S. et al. The basic science of human knee menisci: structure, composition, and function. **Sports health**, v. 4, n. 4, p. 340–51, 2012.

FRANCHETTI, M.; KRESS, C. An economic analysis comparing the cost feasibility of replacing injection molding processes with emerging additive manufacturing

techniques. **International Journal of Advanced Manufacturing Technology**, v. 88, n. 9–12, p. 2573–2579, 2017.

FRITH, J. E. et al. Dynamic Three-Dimensional Culture Methods Enhance Mesenchymal Stem Cell Properties and Increase Therapeutic Potential. **Tissue Engineering Part C: Methods**, v. 16, n. 4, p. 735–749, 2010.

FRIZZIERO, A. et al. The meniscus tear: State of the art of rehabilitation protocols related to surgical procedures. **Muscles, Ligaments and Tendons Journal**, v. 21, 2(4), p. 295-301, 2012.

FUOCO, T. et al. Multipurpose Degradable Physical Adhesive Based on Poly(D,L-lactide- co-trimethylene Carbonate). **Macromolecular Chemistry and Physics**, v. 221, n. 10, p. 2000034, 2020.

GHODBANE, S. A et al. Achieving molecular orientation in thermally extruded 3D printed objects. **Biofabrication**, v. 11, n. 4, p. 045004, 2019.

GUNDUZ, I. E. et al. 3D printing of extremely viscous materials using ultrasonic vibrations. **Additive Manufacturing**, v. 22, p. 98–103, 2018.

HARAGUCHI, Y. et al. Concise Review: Cell Therapy and Tissue Engineering for Cardiovascular Disease. **Stem Cells Translational Medicine**, v. 1, n. 2, p. 136–141, 2012.

HIGUCHI, A. et al. Polymeric design of cell culture materials that guide the differentiation of human pluripotent stem cells. **Progress in Polymer Science**. Elsevier Ltd, 2017.

IBRULJ, J.; DZAFEROVIC, E. Modeling of viscoelastic behavior of 3D printed polymeric materials. **Annals of DAAAM & Proceedings**, annual 2020, pp. 0328+.

IONESCU, C. M. et al. Mathematical modelling with experimental validation of viscoelastic properties in non-Newtonian fluids. **Philosophical Transactions of the**

Royal Society A: Mathematical, Physical and Engineering Sciences, v. 378, n. 2172, p. 20190284, 2020.

ISO/ASTM 52900-15. Standard Terminology for Additive Manufacturing—General Principles—Terminology; ASTM International: West Conshohocken, PA, USA, 2015.

JING, Z. et al. Rheology and crystallization behavior of asymmetric PLLA/PDLA blends based on linear PLLA and PDLA with different structures. **Polymers for Advanced Technologies**, v. 27, n. 8, p. 1108–1120, 2016.

JO, A. et al. The versatile functions of Sox9 in development, stem cells, and human diseases. **Genes & Diseases**, v. 1, n. 2, p. 149-161, 2014.

JOJIBABU, P. et al. Effect of different carbon nano-fillers on rheological properties and lap shear strength of epoxy adhesive joints. **Composites Part A: Applied Science and Manufacturing**, v. 82, p. 53–64, 2016.

JULIAN, C.; AL-RUBEAI, M. **Bioreactors for Tissue Engineering Principles, Design and Operation**. [s.l.] Springer, 2005, v. 3.

JUNGST, T. et al. Strategies and Molecular Design Criteria for 3D Printable Hydrogels. **Chemical Reviews**, v. 116, n. 3, p. 1496–1539, 2016.

KATO, Y. et al. Comparison of growth kinetics between static and dynamic cultures of human induced pluripotent stem cells. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 125, n. 6, p. 736–740, 2018.

KEANE, T. J.; BADYLAK, S. F. Biomaterials for tissue engineering applications. **Seminars in Pediatric Surgery**, v. 23, n. 3, p. 112–118, 2014.

KHAN, M. et al. A concise review on the elastomeric behavior of electroactive polymer materials. **International Journal of Energy Research**, v. 45, n. 10, p. 14306–14337, 2021.

KIM, H. J. et al. Gas foaming fabrication of porous biphasic calcium phosphate for bone regeneration. **Tissue Engineering and Regenerative Medicine**, v. 9, n. 2, p. 63–68, 2012.

KLARMANN et al. A review of strategies for development of tissue engineered meniscal implants. **Biomaterials and Biosystem**, v. 26, n. 4, p. 100026, 2021.

KLUYSKENS, L. et al. Biomaterials for Meniscus and Cartilage in Knee Surgery: State of the Art. **Journal of ISAKOS**, v. 7. p. 67-77, 2022.

KULICHIKHIN, V. G.; MALKIN, A. Y. The Role of Structure in Polymer Rheology: Review. **Polymers**, v. 14, n. 6, p. 1262, 2022.

KUZMAN, M. K. et al. Effect of selected printing settings on viscoelastic behaviour of 3D printed polymers with and without wood. **Materials Research Express**, v. 6, n. 10, p. 105362, 2019.

LA MANTIA, F. P. et al. Degradation of polymer blends: A brief review. **Polymer Degradation and Stability**, v. 145, p. 79–92, 2017.

LARSON, R. G. Constitutive equations for thixotropic fluids. **Journal of Rheology**, v. 59, n. 3, p. 595–611, 2015.

LIANG, T. et al. A simple and versatile nickel platform for the generation of branched high molecular weight polyolefins. **Nature Communications**, v. 11, n. 1, p. 1–8, 2020.

LIU, J.; YAN, C. 3D Printing of Scaffolds for Tissue Engineering. In: **3D Printing**. [s.l.] InTech, 2018.

LYU, Y. et al. Structure and evolution of multiphase composites for 3D printing. **Journal of Materials Science**, v. 55, n. 16, p. 6861–6874, 2020.

MAKRIS, E. et al. The knee meniscus: structure–function, pathophysiology, current repair techniques, and prospects for regeneration. **Biomaterials**, v. 32, n. 30, p. 7411–

7431, 2011.

MANGE, T. et al. Cell biology and pathology of cartilage and meniscus. **Cartilage Tissue And Knee Joint Biomechanics**, p. 47-60, 2024.

MARDONES, R. et al. Cell Therapy and Tissue Engineering Approaches for Cartilage Repair and/or Regeneration. **International Journal Of Stem Cells**, v. 8, n. 1, p. 48-53, 2015.

MÁRQUEZ, Y. et al. Thermal degradation studies of poly(trimethylene carbonate) blends with either polylactide or polycaprolactone. **Thermochimica Acta**, v. 550, p. 65–75, 2012.

MARTIN, I. et al. The role of bioreactors in tissue engineering. **Trends in Biotechnology**, fev. 2004.

MARTINEK, V. et al. Second Generation of Meniscus Transplantation: In-Vivo Study with Tissue Engineered Meniscus Replacement. **Archives of Orthopaedic and Trauma Surgery**, v. 126, p. 228–234, 2006.

MBARKI, M. et al. Hydroxyapatite bioceramic with large porosity. **Materials Science and Engineering: C**, v. 76, p. 985–990, 2017.

MCDERMOTT, I. D.; AMIS, A. A. The consequences of meniscectomy. **The Journal Of Bone And Joint Surgery**. British Volume, v. 88-, n. 12, p. 1549-1556, 2006.

MCDERMOTT, A.M. et al. Recapitulating Bone Development through Engineered Mesenchymal Condensations and Mechanical Cues for Tissue Regeneration. **Science Translational Medicine**, v. 11, p. eaav7756, 2019.

MCNULTY, A. L.; GUILAK, F. Mechanobiology of the meniscus. **Journal of Biomechanics**, v. 48, n. 8, p. 1469–1478, 2015.

MENA, R. L. et al. Fotodegradação de polímeros acompanhada por infravermelho: um

tutorial. **Revista Virtual de Química**, v. 12, n. 4, 2020.

MESSIAS, A. D. et al. Synthesis, Characterization, and Osteoblastic Cell Culture of Poly(L-co-D,L-lactide-co-trimethylene carbonate) Scaffolds. **International Journal of Biomaterials**. p.1-7, 2014.

MIDDLETON, J. C.; TIPTON, A. J. Synthetic biodegradable polymers as orthopedic devices. **Biomaterials**, v. 21, n. 23, p. 2335–2346, 2000.

MIKULA, K. et al. 3D printing filament as a second life of waste plastics—a review. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 28, n. 10, p. 12321–12333, 2021.

MORDECAI, S. C. et al. Treatment of meniscal tears: An evidence based approach. **World Journal of Orthopedics**, v. 5, n. 3, p. 233–241, 2014.

MOTTA, A. C.; DUEK, E. A. R. Synthesis and characterization of the copolymer poly(L-co-D,L lactic acid). **Polimeros**, v. 17, n. 2, p. 123–129, 2007.

MOTTA, A. C.; DUEK, E. A. de R. Synthesis and characterization of a novel terpolymer based on L-lactide, D,L-lactide and trimethylene carbonate. **Materials Research**, v. 17, n. 3, p. 619–626, 2014.

MU, X. et al. Recent advances in 3D printing with protein-based inks. **Progress in Polymer Science**, vol. 115, 2021.

NAMPOOTHIRI, K. et al. An overview of the recent developments in polylactide (PLA) research. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 22, p. 8493-8501, 2010.

NATH, S. D.; NILUFAR, S. An Overview of Additive Manufacturing of Polymers and Associated Composites. **Polymers**, v. 12, n. 11, p. 2719, 2020.

NII, T.; KATAYAMA, Y. Biomaterial-assisted regenerative medicine. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, n. 16, p. 8657, 2021.

NOVARETTI, J. V. et al. Lateral Meniscal Allograft Transplantation With Bone Block and Suture-Only Techniques Partially Restores Knee Kinematics and Forces. **The American Journal of Sports Medicine**, v. 47, n. 10, p. 2427-2436, 2019.

OLIVEIRA, M. et al. The role of shear and stabilizer on PLA degradation. **Polymer Testing**, v. 51, p. 109–116, 2016.

ÖZKAN, M. et al. Inkjet-printed platinum counter electrodes for dye-sensitized solar cells. **Organic Electronics**, v. 44, p. 159–167, 2017.

PEDRINI, F. et al. Enhancement of cartilage extracellular matrix synthesis in Poly(PCL-TMC)urethane scaffolds: a study of oriented dynamic flow in bioreactor. **Biotechnology Letters**, v. 42, n. 12, p. 2721-2734, 2020.

PINHEIRO, L. A. et al. The role of chain scission and chain branching in high density polyethylene during thermo-mechanical degradation. **Polymer Degradation and Stability**, v. 86, n. 3, p. 445–453, 2004.

QU, H. et al. Biomaterials for bone tissue engineering scaffolds: a review. **RSC Advances**, v. 9, n. 45, p. 26252-26262, 2019.

RAHMATI, M. et al. Electrospinning for tissue engineering applications. **Progress In Materials Science**, v. 117, p. 100721, 2021.

RAPP, B. E. Fluids. In: **Microfluidics: Modelling, Mechanics and Mathematics**. [s.l.] Elsevier, 2017. p. 243–263.

RAKOVSKY, A. et al. β -TCP-poly lactide composite scaffolds with high strength and enhanced permeability prepared by a modified salt leaching method. **Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials**, v. 32, p. 89–98, 2014.

RASSELET, D. et al. Oxidative degradation of polylactide (PLA) and its effects on physical and mechanical properties. **European Polymer Journal**, v. 50, n. 1, p. 109–116, 2014.

- REALE, D. et al. No Differences in Clinical Outcome between CMI and Actifit Meniscal Scaffolds: A Systematic Review and Meta-Analysis. **Knee Surgery, Sports Traumatology, Arthroscopy**, v. 30, p. 328–348, 2022.
- REGUZZONI, M. et al. Histology and Ultrastructure of a Tissue-Engineered Collagen Meniscus before and after Implantation. **Journal of Biomedical Materials Research part B Applied Biomaterials**, v. 74, p. 808–816, 2005.
- REVES, B. T. et al. Lyophilization to improve drug delivery for chitosan-calcium phosphate bone scaffold construct: A preliminary investigation. **Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials**, v. 90B, n. 1, p. 1–10, 2009.
- ROSSER, J.; THOMAS, D. J. Bioreactor processes for maturation of 3D bioprinted tissue. **3D Bioprinting for Reconstructive Surgery**, p. 191–215, 2018.
- ROWE, M. D. et al. Hydrolytic degradation of bio-based polyesters: Effect of pH and time. **Polymer Testing**, v. 52, p. 192-199, 2016.
- RUCKENSTEIN, E.; YUAN, Y. Molten ring-open copolymerization of L-lactide and cyclic trimethylene carbonate. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 69, n. 7, p. 1429–1434, 1998.
- SABIR, M. I. et al. A review on biodegradable polymeric materials for bone tissue engineering applications. **Journal of Materials Science**, v. 44, p. 5713–5724, 2009.
- SAHA, S. K.; TSUJI, H. Hydrolytic Degradation of Amorphous Films of L-Lactide Copolymers with Glycolide and D-Lactide. **Macromolecular Materials and Engineering**, v. 291, p. 357-368, 2006.
- SANTORO, R. et al. Bioreactor based engineering of largescale human cartilage grafts for joint resurfacing. **Biomaterials**, v. 31, n. 34, p. 8946–8952, 2010.

SENATOV, F. S. et al. Mechanical properties and shape memory effect of 3D-printed PLA-based porous scaffolds. **Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials**, v. 57, p. 139–148, 2016.

SHAHIN, K.; DORAN, P. M. Strategies for Enhancing the Accumulation and Retention of Extracellular Matrix in Tissue-Engineered Cartilage Cultured in Bioreactors. **PLoS ONE**, v. 6, n. 8, p. e23119, 2011.

SHEMESH, M. et al. Viscoelastic Properties of a Synthetic Meniscus Implant. **Journal of Mechanical Behavior of Biomedical Materials**, v. 29, p. 42–55, 2014.

SHETH, S. et al. Numerical Investigation of Stiffness Properties of FDM Parts as a Function of Raster Orientation. [s.l.] University of Texas at Austin, 2017.

SONEBI, M.; YAHIA, A. Mix design procedure, tests, and standards. In: **Self-Compacting Concrete: Materials, Properties and Applications**. [s.l.] Elsevier Inc., 2019. p. 1–30.

SPEIGHT, J. G. Hydrocarbons from crude oil. In: **Handbook of Industrial Hydrocarbon Processes**. [s.l.] Elsevier, 2020. p. 95–142.

STEADMAN, J. R. et al. Tissue-Engineered Collagen Meniscus Implants: 5- to 6-Year Feasibility Study Results. **Arthroscopy**, v. 21. p. 515–525, 2005.

SUN, J. et al. An Overview of Scaffold Design and Fabrication Technology for Engineered Knee Meniscus. **Materials 2017, Vol. 10, Page 29**, v. 10, n. 1, p. 29, 2017.

SUN, Z.; LUO, Z. J. Osteoporosis therapies might lead to intervertebral disc degeneration via affecting cartilage endplate. **Medical Hypotheses**, v. 125, p. 5–7, 2019.

THADAVIRUL, N. et al. Development of Polycaprolactone Porous Scaffolds by Combining Solvent Casting, Particulate Leaching, and Polymer Leaching Techniques for Bone Tissue Engineering. **Journal of Biomedical Materials Research Part A**, v.

102, n. 10, p. 3379-92, 2013.

TRAMS, E.; KAMINSKI, R. Molecular Biology of Meniscal Healing: A Narrative Review. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 25, n. 2, p. 768, 2024.

TYLER, B. Polylactic acid (PLA) controlled delivery carriers for biomedical applications. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 107, p. 163-175, 2016.

VIGNES, H. et al. Meniscus Repair: From In Vitro Research to Patients. **Organoids**, v. 1, p. 116-134, 2022.

XIE, J. et al. Mechano-active scaffold design based on microporous poly(L-lactide-co-epsilon-caprolactone) for articular cartilage tissue engineering: dependence of porosity on compression force-applied mechanical behaviors. **Tissue engineering**, v. 12, n. 3, p. 449–458, 2006.

XU, Q.; ENGQUIST, B. A mathematical model for fitting and predicting relaxation modulus and simulating viscoelastic responses. **Proceedings. Mathematical, physical, and engineering sciences**, v. 474, n. 2213, p. 20170540, 2018.

YU, H. et al. Modeling of poly(L-lactide) thermal degradation: Theoretical prediction of molecular weight and polydispersity index. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 88, n. 11, p. 2557–2562, 2003.

YU, X. et al. 3D Printing and Bioprinting Nerve Conduits for Neural Tissue Engineering. **Polymers**, v. 12, n. 8, p. 1637, 2020.

ZHANG, K. et al. Effect of degenerative and radial tears of the meniscus and resultant meniscectomy on the knee joint: a finite element analysis. **Journal of Orthopaedic Translation**, v. 18, p. 20–31, 2019.

ZHANG, L. et al. Step-Growth Polymerization Method for Ultrahigh Molecular Weight Polymers. **ACS Macro Letters**, v. 8, n. 8, p. 948–954, 2019.

ZHANG, X. et al. Decellularized extracellular matrix scaffolds: recent trends and emerging strategies in tissue engineering. **Bioactive Materials**, v. 10, p. 15-31, 2022.

ZHOU, X. et al. Fabrication of polylactic acid (PLA)-based porous scaffold through the combination of traditional bio-fabrication and 3D printing technology for bone regeneration. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 197, p. 111420, 2021.

ZHU, R. et al. Synthesis of polycarbonate urethane elastomers and effects of the chemical structures on their thermal, mechanical and biocompatibility properties. **Heliyon**, v. 2, n. 6, p. e00125, 2016.

ZOŁEK-TRYZNOWSKA, Z. Rheology of Printing Inks. In: **Printing on Polymers: Fundamentals and Applications**. [s.l.] Elsevier Inc., 2015. p. 87–99.

APÊNDICE A – CURVAS DE FTIR DOS *SCAFFOLDS* IMPRESSOS DE PLDLA-TMC 60/40

Figura 1A: Ampliação do espectro de FTIR na região entre 1800 e 1000 cm^{-1} evidenciando as bandas C=O e C-H para os *scaffolds* de PLDLA-TMC 60/40 impressos na temperatura de 120°C, após correção da linha base. Os valores que acompanham as linhas tracejadas se referem aos valores de absorbância para as respectivas bandas.

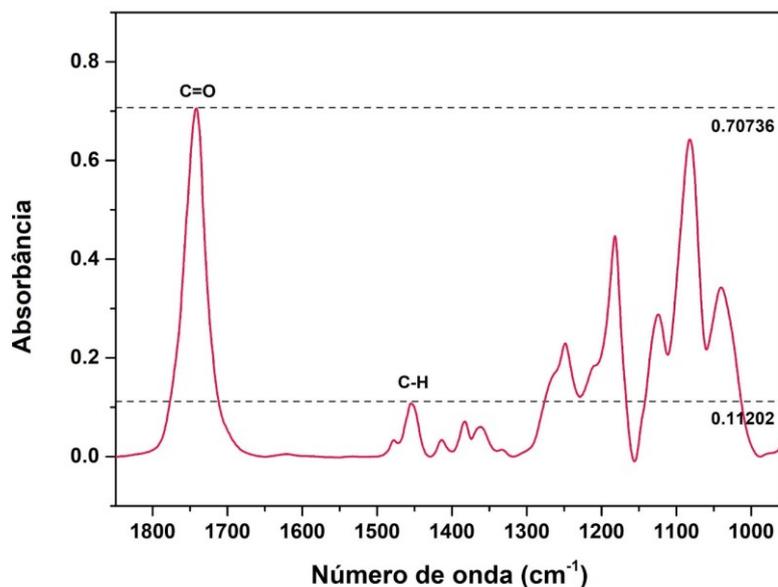


Figura 2A: Ampliação do espectro de FTIR na região entre 1800 e 1000 cm^{-1} evidenciando as bandas C=O e C-H para os *scaffolds* de PLDLA-TMC 60/40 impressos na temperatura de 130°C, após correção da linha base. Os valores que acompanham as linhas tracejadas se referem aos valores de absorbância para as respectivas bandas.

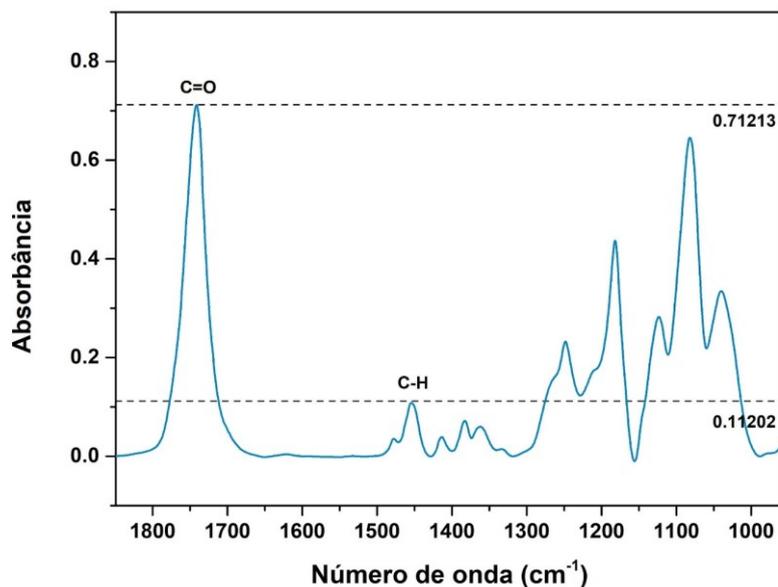


Figura 3A: Ampliação do espectro de FTIR na região entre 1800 e 1000 cm^{-1} evidenciando as bandas C=O e C-H para os *scaffolds* de PLDLA-TMC 60/40 impressos na temperatura de 140°C, após correção da linha base. Os valores que acompanham as linhas tracejadas se referem aos valores de absorvância para as respectivas bandas.

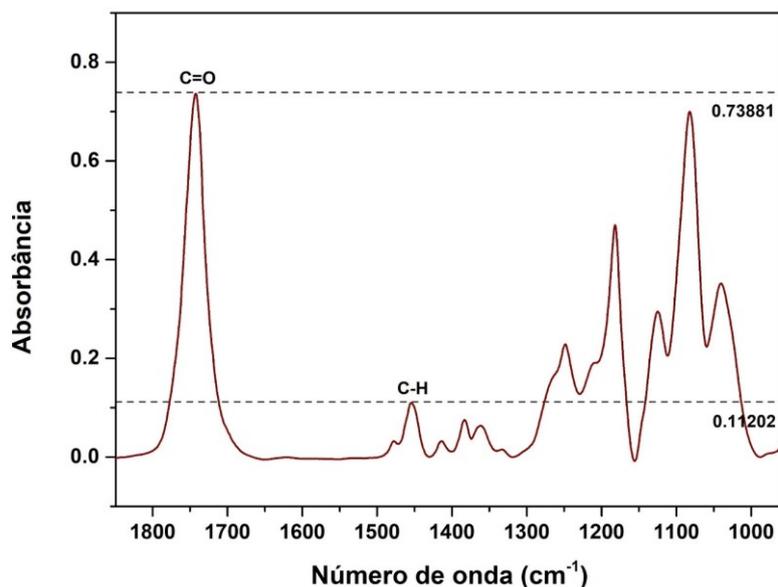


Figura 4A: Ampliação do espectro de FTIR na região entre 1800 e 1000 cm^{-1} evidenciando as bandas C=O e C-H para os *scaffolds* de PLDLA-TMC 60/40 impressos na temperatura de 150°C, após correção da linha base. Os valores que acompanham as linhas tracejadas se referem aos valores de absorvância para as respectivas bandas.

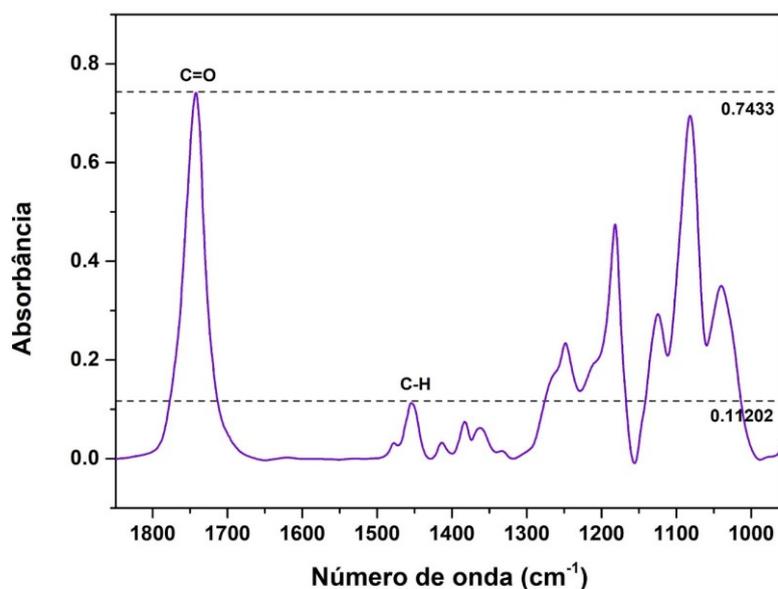


Figura 5A: Ampliação do espectro de FTIR na região entre 1800 e 1000 cm^{-1} evidenciando as bandas C=O e C-H para os *scaffolds* de PLDLA-TMC 60/40 impressos na temperatura de 160°C, após correção da linha base. Os valores que acompanham as linhas tracejadas se referem aos valores de absorbância para as respectivas bandas.

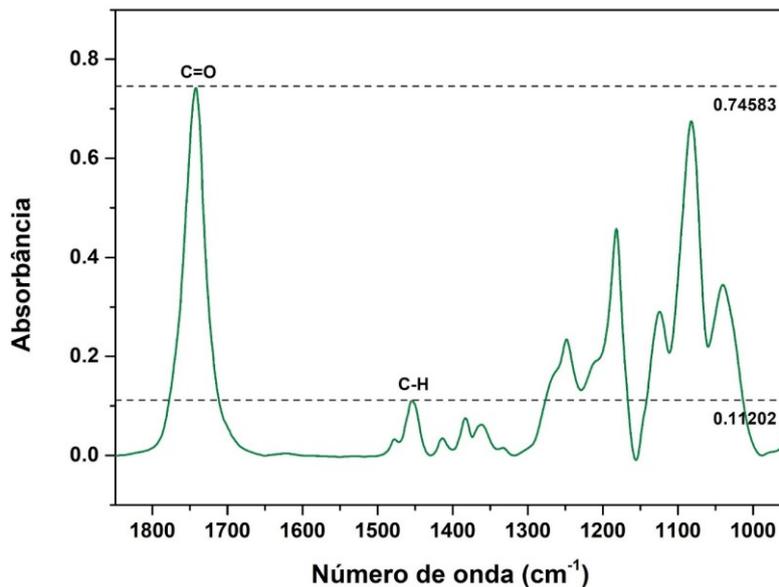


Figura 6A: Ampliação do espectro de FTIR na região entre 1800 e 1000 cm^{-1} evidenciando as bandas C=O e C-H para os *scaffolds* de PLDLA-TMC 60/40 impressos na temperatura de 170°C, após correção da linha base. Os valores que acompanham as linhas tracejadas se referem aos valores de absorbância para as respectivas bandas.

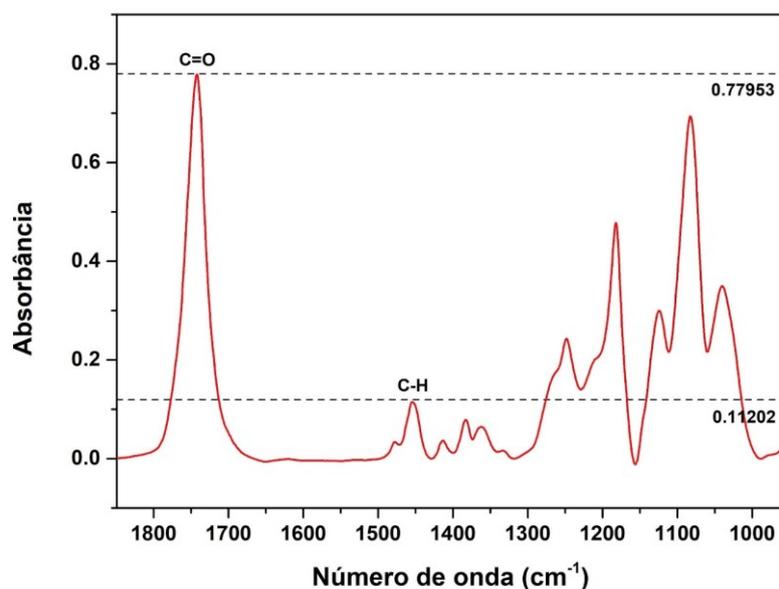


Figura 7A: Ampliação do espectro de FTIR na região entre 1800 e 1000 cm^{-1} evidenciando as bandas C=O e C-H para os *scaffolds* de PLDLA-TMC 60/40 impressos na temperatura de 180°C, após correção da linha base. Os valores que acompanham as linhas tracejadas se referem aos valores de absorvância para as respectivas bandas.

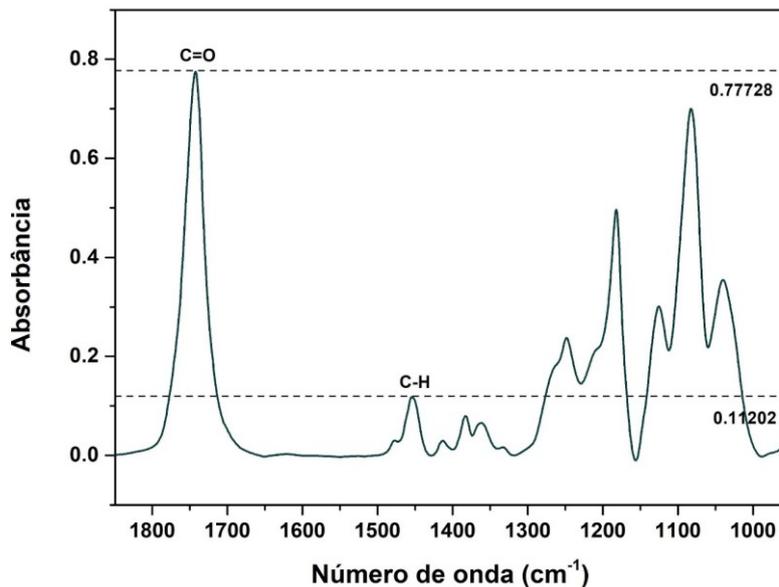
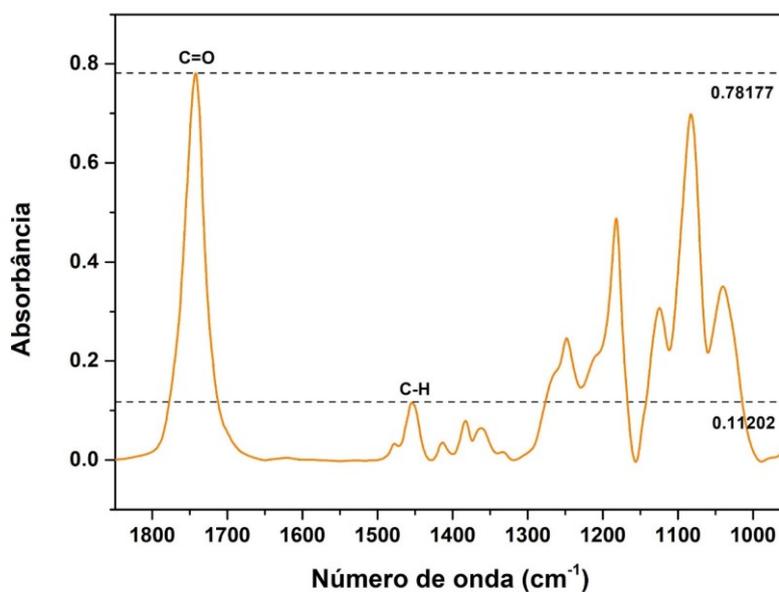


Figura 8A: Ampliação do espectro de FTIR na região entre 1800 e 1000 cm^{-1} evidenciando as bandas C=O e C-H para os *scaffolds* de PLDLA-TMC 60/40 impressos na temperatura de 190°C, após correção da linha base. Os valores que acompanham as linhas tracejadas se referem aos valores de absorvância para as respectivas bandas.



APÊNDICE B – CURVAS DE FTIR DOS *SCAFFOLDS* IMPRESSOS DE PLDLA-TMC 70/30

Figura 1B: Ampliação do espectro de FTIR na região entre 1800 e 1000 cm^{-1} evidenciando as bandas C=O e C-H para os *scaffolds* de PLDLA-TMC 70/30 impressos na temperatura de 140°C, após correção da linha base. Os valores que acompanham as linhas tracejadas se referem aos valores de absorvância para as respectivas bandas.

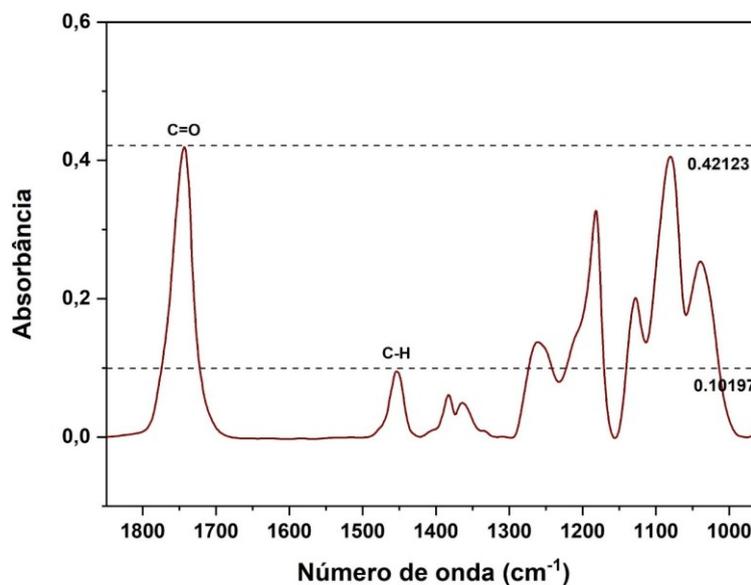


Figura 2B: Ampliação do espectro de FTIR na região entre 1800 e 1000 cm^{-1} evidenciando as bandas C=O e C-H para os *scaffolds* de PLDLA-TMC 70/30 impressos na temperatura de 150°C, após correção da linha base. Os valores que acompanham as linhas tracejadas se referem aos valores de absorvância para as respectivas bandas.

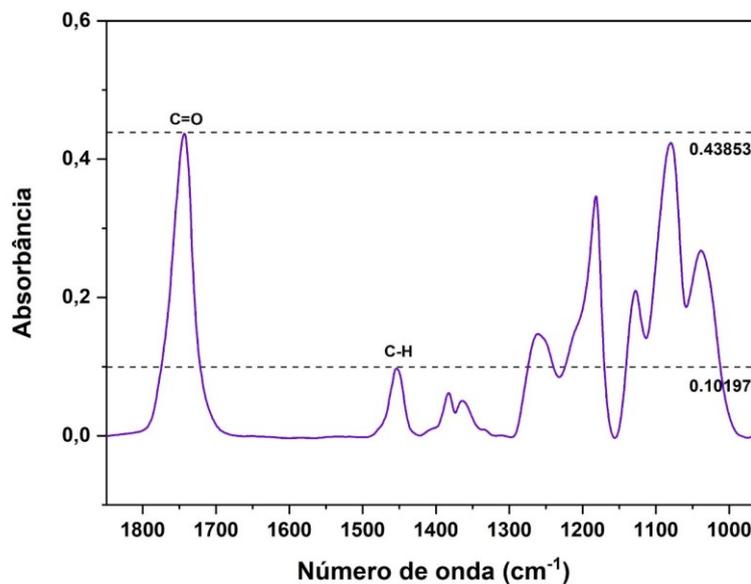


Figura 3B: Ampliação do espectro de FTIR na região entre 1800 e 1000 cm^{-1} evidenciando as bandas C=O e C-H para os *scaffolds* de PLDLA-TMC 70/30 impressos na temperatura de 160°C, após correção da linha base. Os valores que acompanham as linhas tracejadas se referem aos valores de absorvância para as respectivas bandas.

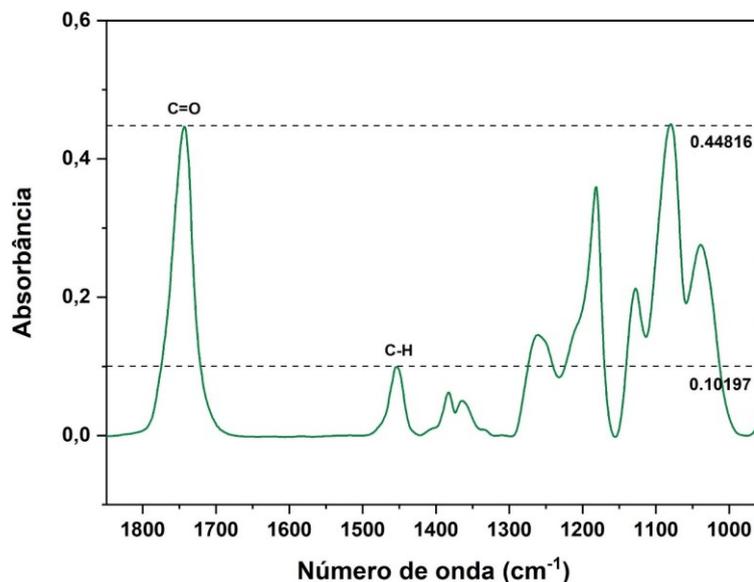


Figura 4B: Ampliação do espectro de FTIR na região entre 1800 e 1000 cm^{-1} evidenciando as bandas C=O e C-H para os *scaffolds* de PLDLA-TMC 70/30 impressos na temperatura de 170°C, após correção da linha base. Os valores que acompanham as linhas tracejadas se referem aos valores de absorvância para as respectivas bandas.

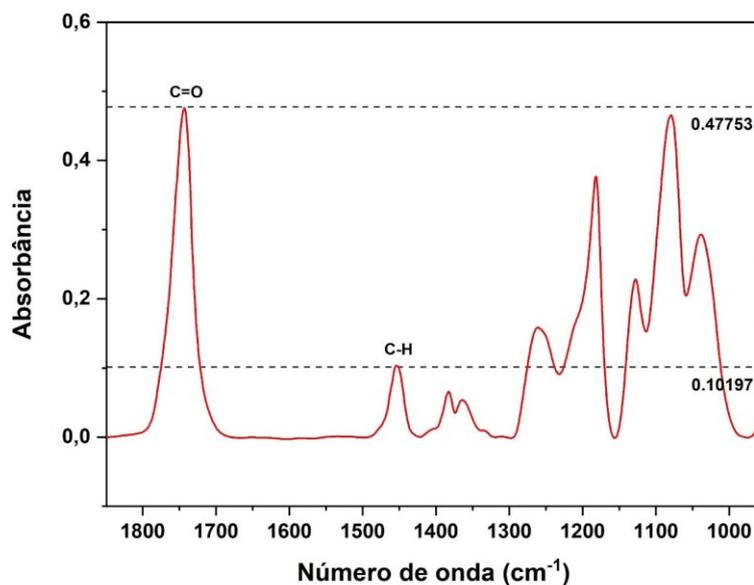


Figura 5B: Ampliação do espectro de FTIR na região entre 1800 e 1000 cm^{-1} evidenciando as bandas C=O e C-H para os *scaffolds* de PLDLA-TMC 70/30 impressos na temperatura de 180°C, após correção da linha base. Os valores que acompanham as linhas tracejadas se referem aos valores de absorbância para as respectivas bandas.

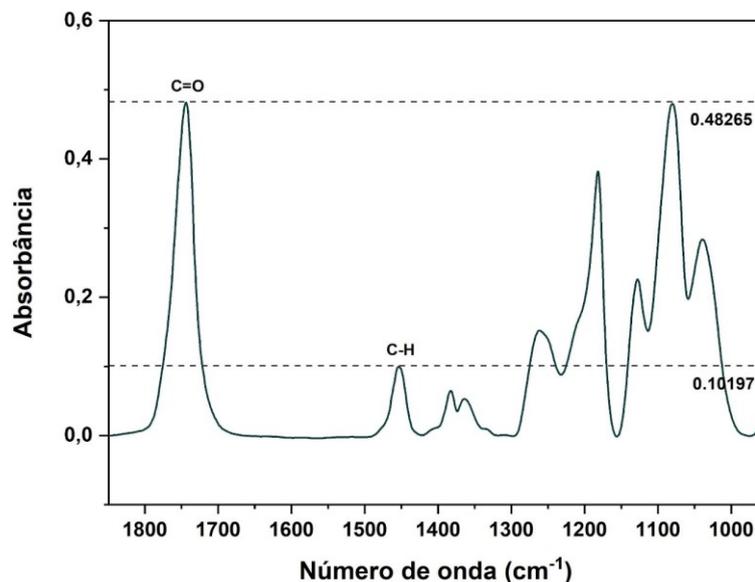
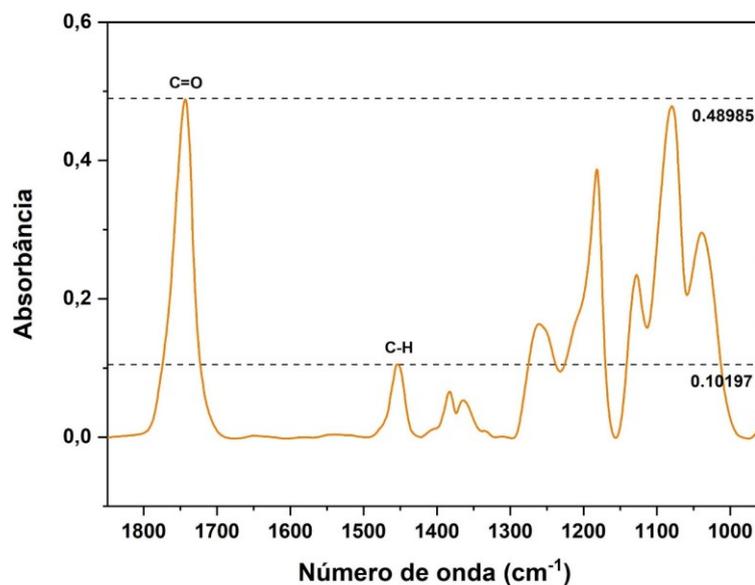


Figura 6B: Ampliação do espectro de FTIR na região entre 1800 e 1000 cm^{-1} evidenciando as bandas C=O e C-H para os *scaffolds* de PLDLA-TMC 70/30 impressos na temperatura de 190°C, após correção da linha base. Os valores que acompanham as linhas tracejadas se referem aos valores de absorbância para as respectivas bandas.



APÊNDICE C - TERMOGRAVIMETRIA DOS *SCAFFOLDS* IMPRESSOS DE PLDLA-TMC 60/40

Figura 1C: Curva de perda de massa (%) e derivada da perda de massa (%/°C) para os *scaffolds* de PLDLA-TMC 60/40 impressos na temperatura de 120°C.

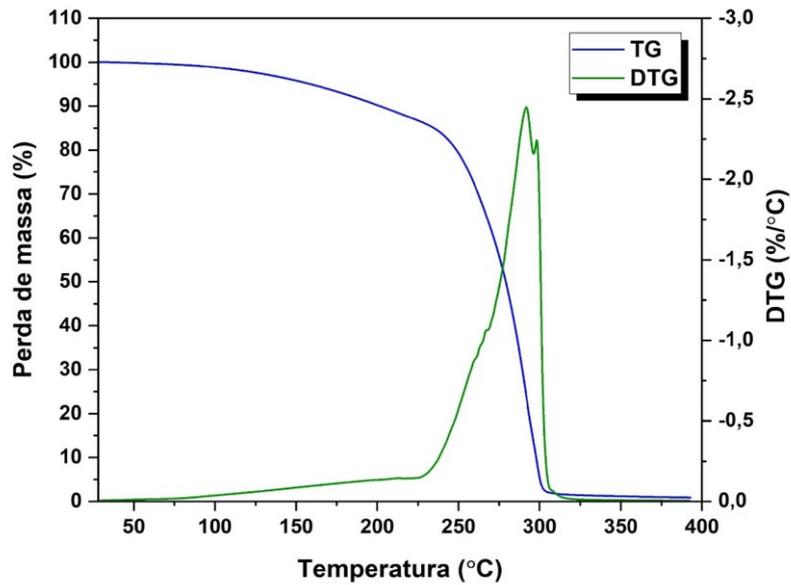


Figura 2C: Curva de perda de massa (%) e derivada da perda de massa (%/°C) para os *scaffolds* de PLDLA-TMC 60/40 impressos na temperatura de 130°C.

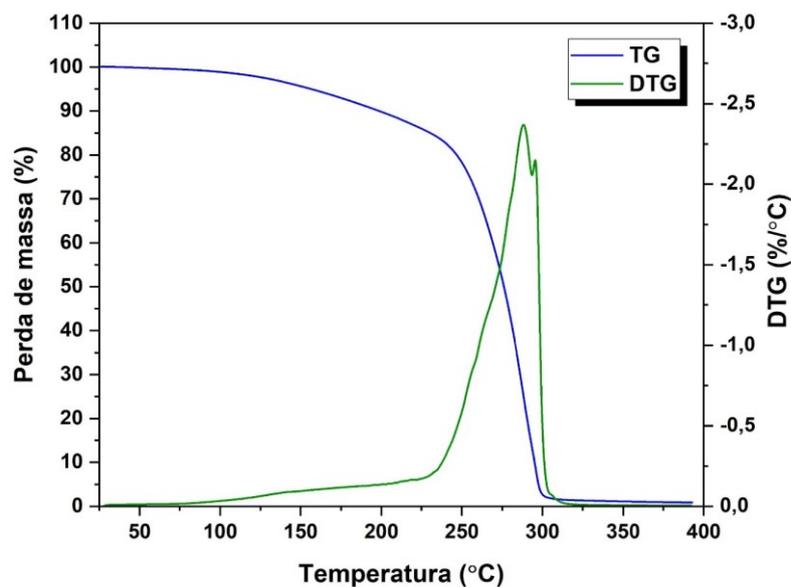


Figura 3C: Curva de perda de massa (%) e derivada da perda de massa (%/°C) para os *scaffolds* de PLDLA-TMC 60/40 impressos na temperatura de 140°C.

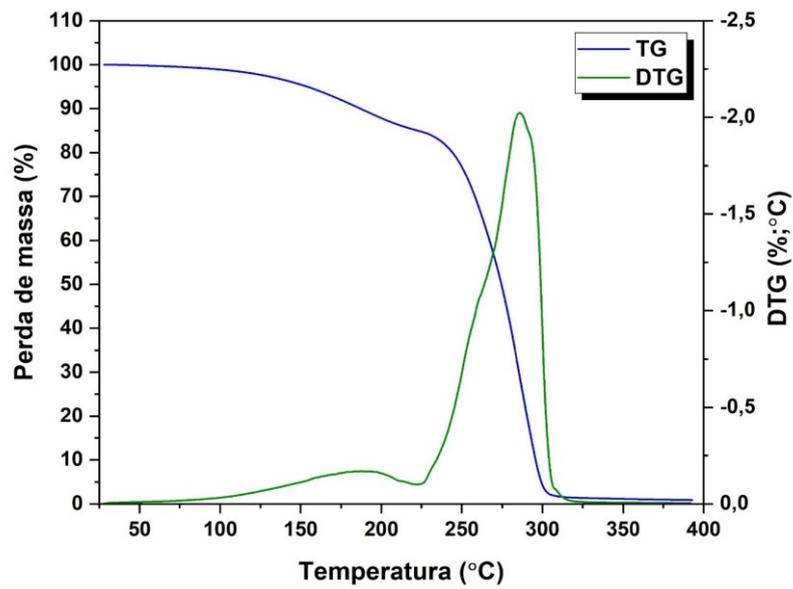


Figura 4C: Curva de perda de massa (%) e derivada da perda de massa (%/°C) para os *scaffolds* de PLDLA-TMC 60/40 impressos na temperatura de 150°C.

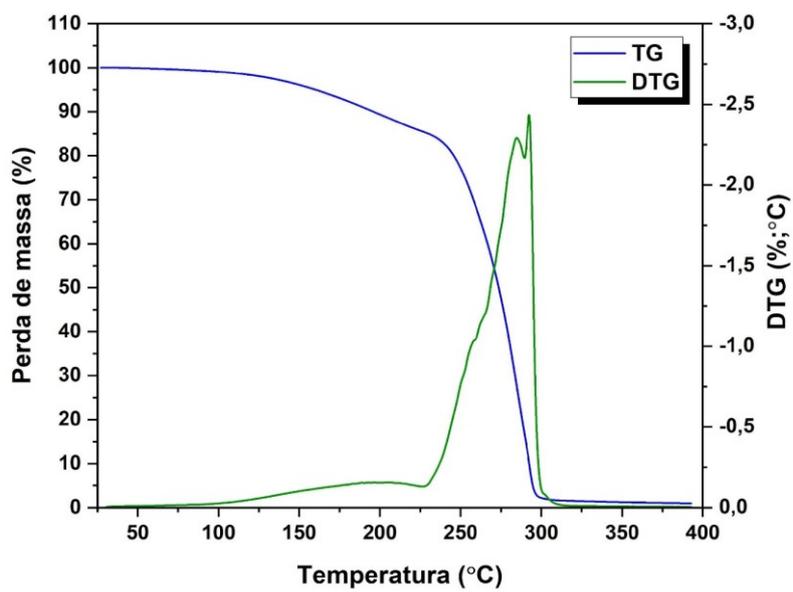


Figura 5C: Curva de perda de massa (%) e derivada da perda de massa (%/°C) para os *scaffolds* de PLDLA-TMC 60/40 impressos na temperatura de 160°C.

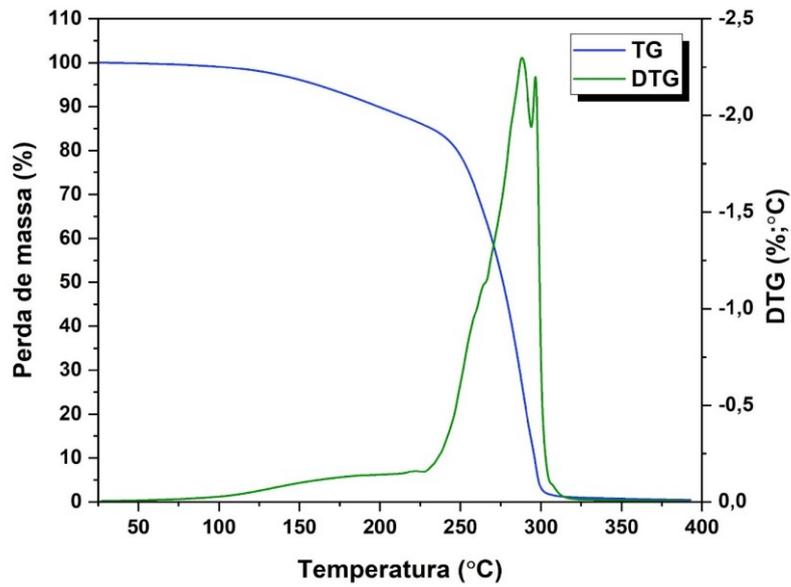


Figura 6C: Curva de perda de massa (%) e derivada da perda de massa (%/°C) para os *scaffolds* de PLDLA-TMC 60/40 impressos na temperatura de 170°C.

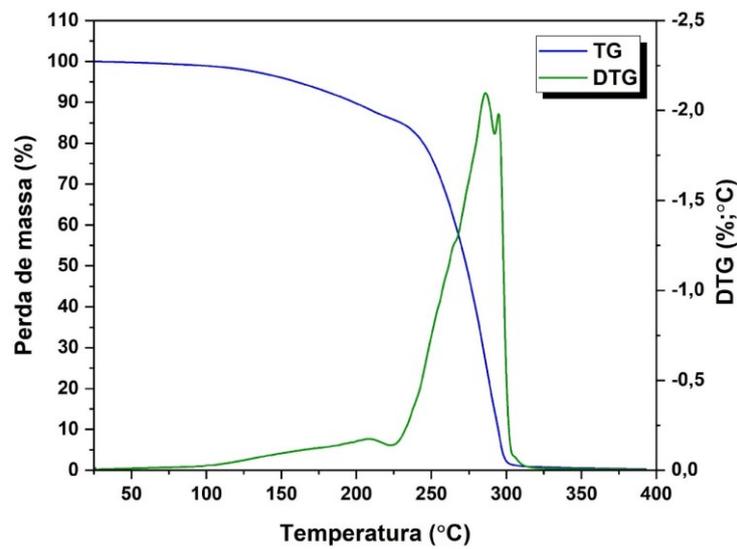


Figura 7C: Curva de perda de massa (%) e derivada da perda de massa (%/°C) para os *scaffolds* de PLDLA-TMC 60/40 impressos na temperatura de 180°C.

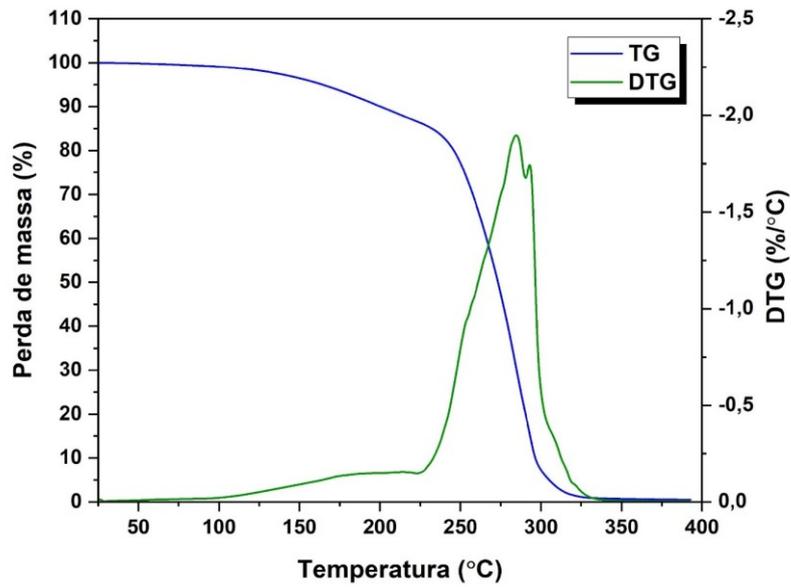
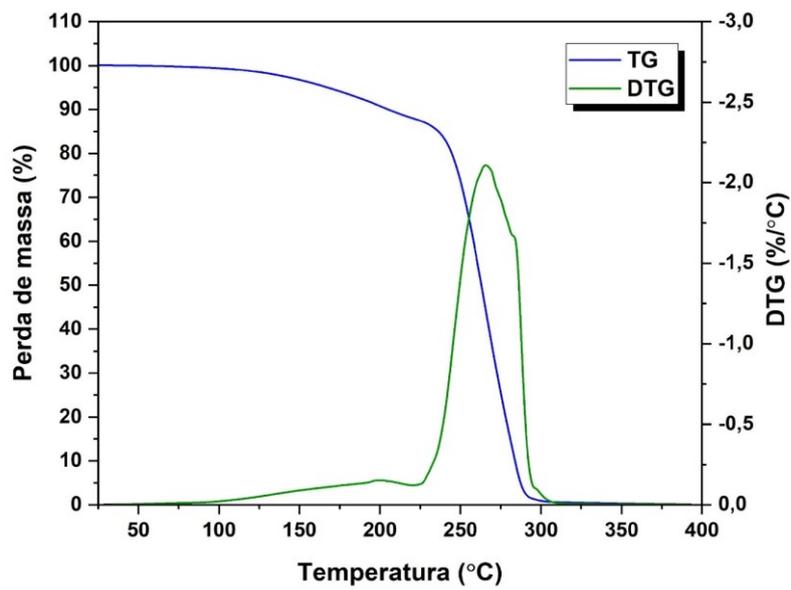


Figura 8C: Curva de perda de massa (%) e derivada da perda de massa (%/°C) para os *scaffolds* de PLDLA-TMC 60/40 impressos na temperatura de 190°C.



APÊNDICE D - TERMOGRAVIMETRIA DOS *SCAFFOLDS* IMPRESSOS DE PLDLA-TMC 70/30

Figura 1D: Curva de perda de massa (%) e derivada da perda de massa (%/°C) para os *scaffolds* de PLDLA-TMC 70/30 impressos na temperatura de 140°C.

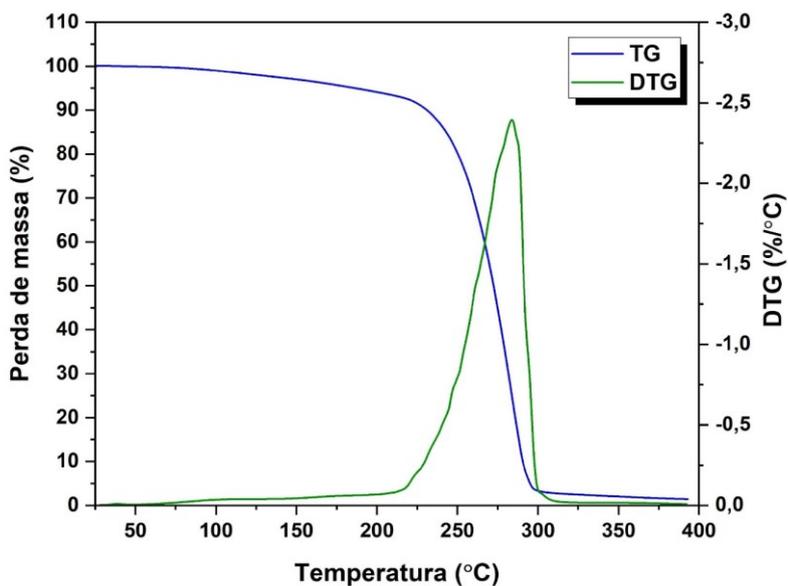


Figura 2D: Curva de perda de massa (%) e derivada da perda de massa (%/°C) para os *scaffolds* de PLDLA-TMC 70/30 impressos na temperatura de 150°C.

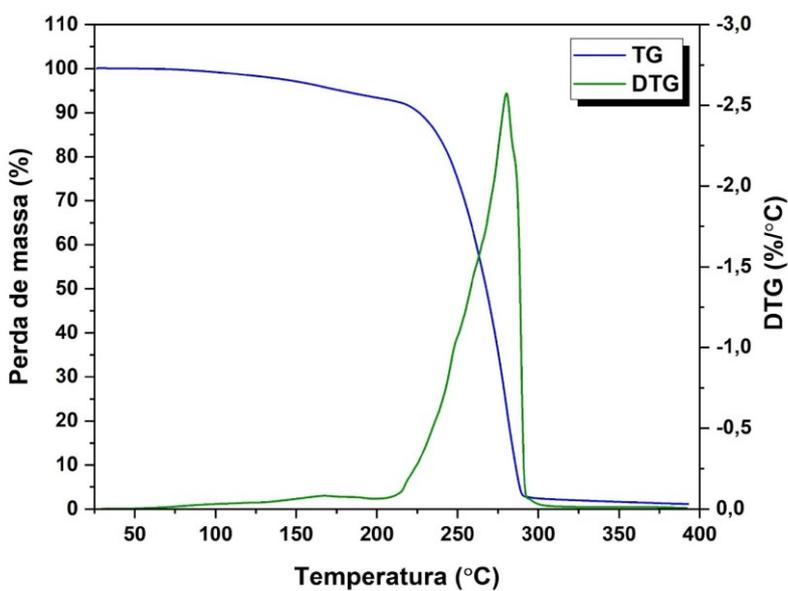


Figura 3D: Curva de perda de massa (%) e derivada da perda de massa (%/°C) para os *scaffolds* de PLDLA-TMC 70/30 impressos na temperatura de 160°C.

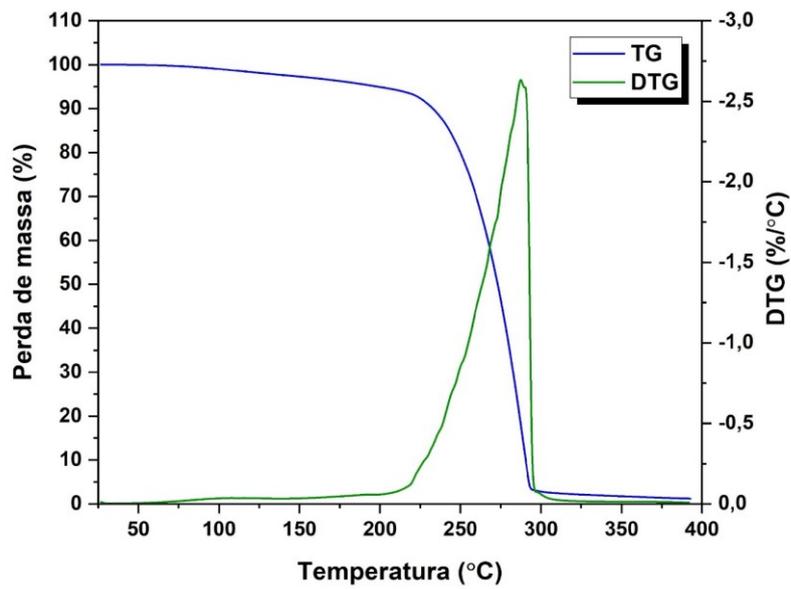


Figura 4D: Curva de perda de massa (%) e derivada da perda de massa (%/°C) para os *scaffolds* de PLDLA-TMC 70/30 impressos na temperatura de 170°C.

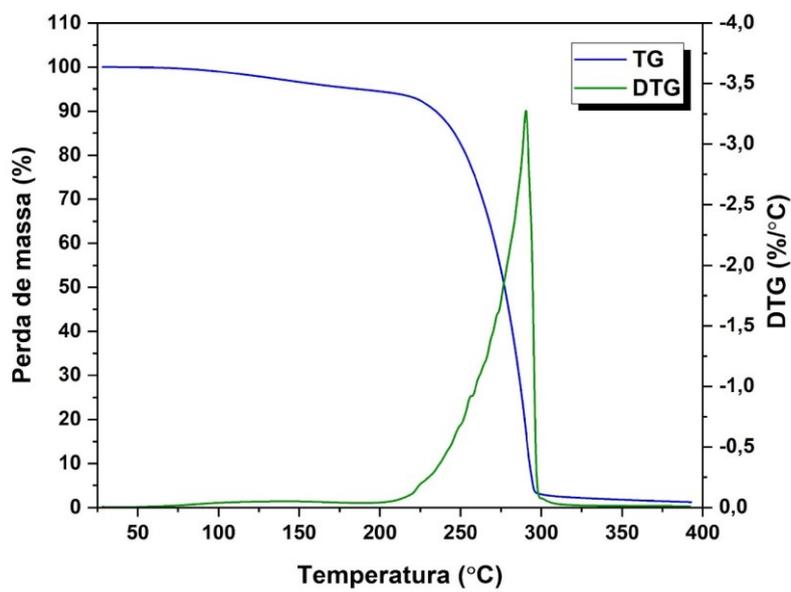


Figura 5D: Curva de perda de massa (%) e derivada da perda de massa (%/°C) para os *scaffolds* de PLDLA-TMC 70/30 impressos na temperatura de 180°C.

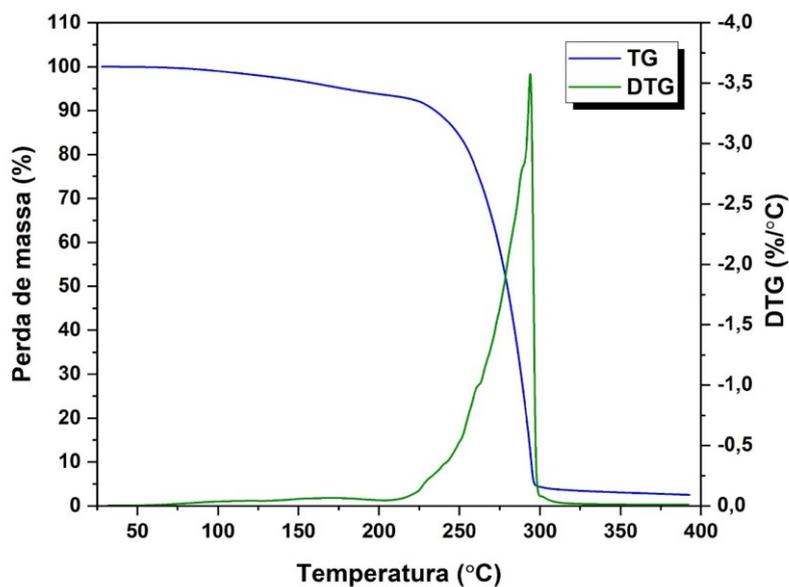


Figura 6D: Curva de perda de massa (%) e derivada da perda de massa (%/°C) para os *scaffolds* de PLDLA-TMC 70/30 impressos na temperatura de 190°C.

