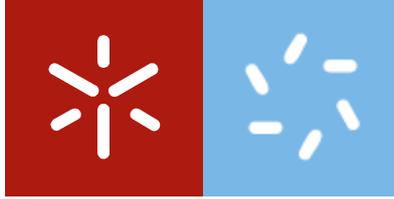


Universidade do Minho
Escola de Ciências

Marta Maria da Silva Maciel

**Desenvolvimento e otimização de
estruturas condutoras de base
polimérica para engenharia de tecidos**



Universidade do Minho

Escola de Ciências

Marta Maria da Silva Maciel

**Desenvolvimento e otimização de
estruturas condutoras de base
polimérica para engenharia de tecidos**

Dissertação de Mestrado
Dissertação de Mestrado
em Biofísica e Bionanossistemas

Trabalho efetuado sob a orientação de:
Professor Doutor Senen Lanceros-Mendéz
Doutora Clárisse Ribeiro

AGRADECIMENTOS

No final desta etapa não posso deixar de agradecer a todas as pessoas que fizeram parte dela e que tornaram possível a sua concretização.

Em primeiro lugar agradeço ao professor Senentxu a oportunidade dada para trabalhar neste grupo, pela disponibilidade, pela motivação ao longo do trabalho, pela oportunidade de fazer Erasmus e por me ter dado as condições necessárias para a realização desta dissertação.

À Clarisse, agradeço a dedicação, a paciência, a disponibilidade, a preocupação ao longo de todo o trabalho.

A todos os meus colegas do grupo, Electroactive Smart Materials, em especial aos que contribuíram diretamente para a realização desta dissertação, agradeço a disponibilidade e o apoio, mas também o bom ambiente de trabalho e por me terem recebido muito bem. Agradeço, em especial, à Sylvie por toda a ajuda e dedicação a todas as etapas desta dissertação.

À Cristina, Ermelinda e Davide obrigada por tornarem Milão uma experiência fantástica e enriquecedora a nível do estudo de polímeros condutores principalmente do polipirrole e da polianilina.

A todas as pessoas que eu conheci em Erasmus agradeço o apoio, a amizade e serem uma família longe de casa.

A todos os meus amigos que me acompanharam nesta etapa especialmente, obrigada pelo apoio, a força e o otimismo mesmo nos momentos de stress e por acreditarem em mim.

Por último, à minha família, mas sobretudo aos meus pais e à minha irmã, pois sem o apoio incondicional, o incentivo constante e a paciência inesgotável nunca seria possível chegar até aqui. A eles devo tudo e é a eles a quem dedico todo o meu trabalho.

RESUMO

A engenharia de tecidos é uma área científica com o objetivo de corrigir as falhas que existem a nível de regeneração e substituição de órgãos e/ou tecidos danificados impossíveis de recuperar. Através da utilização de células do indivíduo, fornecendo os estímulos necessários e numa estrutura apropriada é possível formar um novo tecido totalmente viável e funcional.

Neste trabalho pretendeu-se desenvolver uma estrutura híbrida utilizando como base um polímero piezoelétrico, o poli(fluoreto de vinilideno) (PVDF), revestido com polímeros condutores: o polipirrole (Ppy) e a polianilina (PANI), com o objetivo de fornecer às células os estímulos biofísicos necessários ao seu correto desenvolvimento.

As fibras de PVDF foram produzidas pelo método de *electrospinning* de duas formas diferentes: orientadas (O) e não orientadas (NO). O diâmetro médio das fibras O e NO situa-se no intervalo dos 700-800 nm. Estas fibras possuem uma estrutura semicristalina e uma fase β no intervalo dos 80-95% o que indica uma elevada quantidade de piezoelectricidade presente nestas fibras. As propriedades mecânicas das fibras foram avaliadas e verificou-se que as fibras O possuíam um módulo de Young superior quando o stress é aplicado ao longo da direção das fibras, indicativo da morfologia anisotrópica das fibras. As fibras NO são isotrópicas e mostravam a mesma resposta independentemente da direção da aplicação da força. Posteriormente, as fibras foram revestidas com polímero condutor através da polimerização por método químico.

As fibras com uma biocompatibilidade e condutividade apropriadas foram caracterizadas a nível morfológico e quanto às suas propriedades mecânicas. As fibras revestidas com Ppy e dopadas com cloreto de sódio apresentaram os melhores resultados para aplicações em engenharia de tecidos pois eram biocompatíveis, condutoras, e possuíam um revestimento uniforme à volta das fibras. Além disso, o processo de deposição não modificou significativamente as suas propriedades mecânicas. Essas amostras foram também submetidas a testes de proliferação celular, em condições estáticas, onde se verificou que as células proliferaram apesar de aderirem menos comparativamente às fibras sem revestimento.

Palavras-chave: Engenharia de tecidos, piezoelectricidade, condutividade, fibras, poli(fluoreto de vinilideno), polipirrole

ABSTRACT

Tissue engineering is a research field with the objective to correct the flaws that exist in the regeneration and replacement of damaged organs/tissues that are impossible to recover. Using the cells from the patient, providing necessary stimulus in appropriate structure, it is possible to form a tissue viable and completely functional.

In this work was developed a hybrid structure using as a base a piezoelectric polymer, poly(vinylidene fluoride) (PVDF) coated with conductive polymers, polypyrrole (PPy) and polyaniline (PANI), with the objective to provide to the cells the biophysical stimulus needed for their functional development.

The PVDF fibers were produced by electrospinning in two different ways: oriented (O) and random (NO). The diameter of O and NO fibers is in the range of 700-800 nm. These fibers have a semicrystalline structure and a β phase between 80-95% which indicates a high amount of the piezoelectric phase present in the fibers. The mechanical properties of the fibers were evaluated and it was found that O fibers show a higher Young Modulus when the stress is applied along the direction of the fibers, indicative of the anisotropic morphology of the fiber mats. The NO fibers are isotropic and show the same response independently of the direction of application of the applied force. Then, the fibers were coated with a conductive polymer through polymerization by chemical method.

The fibers with proper biocompatibility and conductivity were submitted to characterization process at the level of morphology and their mechanical properties. The fibers coated with Ppy and doped with sodium chloride were the ones with the best results for tissue engineering applications as they are biocompatible, conductive, and show a uniform coating around the fibers. Furthermore, their mechanical properties are not significantly modified by the deposition process. This fibers were submitted to cellular proliferation, in static assays, where it was verified that the cells proliferate, although the cells adhere less than the fibers without coating.

Keywords: Tissue engineering, piezoelectricity, conductivity, fibers, poly(vinylidene fluoride), polypyrrole.

ÍNDICE

AGRADECIMENTOS	iii
RESUMO	v
ABSTRACT	vii
ÍNDICE	ix
ÍNDICE DE FIGURAS	xi
ÍNDICE DE TABELAS	xiii
CAPÍTULO I: INTRODUÇÃO	1
1.1 MOTIVAÇÃO	3
1.2 OBJETIVOS.....	4
1.3 ESTRUTURA DA TESE.....	4
CAPÍTULO II: POLÍMEROS INTELIGENTES NA VANGUARDA DA ENGENHARIA DE TECIDOS	7
2.1 ENGENHARIA DE TECIDOS.....	9
2.2 CÉLULAS.....	9
2.3 SCAFFOLDS	10
2.4 ESTÍMULOS BIOQUÍMICOS E BIOFÍSICOS.....	12
2.5 MATERIAIS UTILIZADOS EM ENGENHARIA DE TECIDOS	13
2.6 MATERIAIS INTELIGENTES	14
2.6.1 POLÍMEROS PIEZOELÉTRICOS.....	15
2.6.2 POLÍMEROS CONDUTORES	16
2.7 MATERIAIS HÍBRIDOS.....	18
2.8 ELECTROSPINNING.....	19
CAPÍTULO III: MATERIAIS E MÉTODOS	21
3.1 MATERIAIS	23
3.2 PRODUÇÃO DE FIBRAS DE PVDF POR ELECTROSPINNING.....	23
3.3 DEPOSIÇÃO DO POLÍMERO CONDUTOR.....	23
3.4 TÉCNICAS DE CARATERIZAÇÃO.....	25

3.4.1	MICROSCOPIA ELETRÓNICA DE VARRIMENTO.....	25
3.4.2	ESPECTROSCOPIA DE INFRAVERMELHO COM TRANSFORMADAS DE FOURIER E REFLEÇÃO TOTAL ATENUADA.....	25
3.4.3	CALORIMETRIA DIFERENCIAL DE VARRIMENTO.....	26
3.4.4	CARATERIZAÇÃO MECÂNICA E ELETROMECHANICA	27
3.4.5	ÂNGULOS DE CONTACTO	28
3.4.6	RESISTIVIDADE ELÉTRICA DA SUPERFÍCIE	29
3.4.7	CITOTOXICIDADE.....	29
3.4.8	CULTIVO ESTÁTICO – PROLIFERAÇÃO CELULAR	30
CAPÍTULO IV: RESULTADOS E DISCUSSÃO.....		33
4.1	ANÁLISE DAS PROPRIEDADES DAS FIBRAS PURAS DE PVDF	35
4.1.1	ANÁLISE ESTRUTURAL DAS FIBRAS DE PVDF	35
4.1.2	ANÁLISE MORFOLÓGICA DAS FIBRAS DE PVDF	37
4.1.3	PROPRIEDADES MECÂNICAS DAS FIBRAS PURAS DE PVDF	39
4.2	FIBRAS REVESTIDAS COM POLÍMERO CONDUTOR.....	44
4.2.1	CONDUTIVIDADE E CITOTOXICIDADE	44
4.2.2	MORFOLOGIA E HIDROFOBICIDADE DAS AMOSTRAS.....	46
4.2.3	COMPORTAMENTO MECÂNICO DAS FIBRAS REVESTIDAS DE PVDF	48
4.2.4	COMPORTAMENTO ELETROMECHANICO DAS FIBRAS REVESTIDAS DE PVDF	48
4.2.5	PROLIFERAÇÃO CELULAR DAS FIBRAS REVESTIDAS DE PVDF	49
CAPÍTULO V: CONCLUSÕES E TRABALHO FUTURO		53
BIBLIOGRAFIA.....		57

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 - Triade da engenharia de tecidos: células que serão colocadas em scaffolds e onde serão submetidas a estímulos para proliferarem e diferenciarem. Adaptado de [7]	10
Figura 2 - Estruturas de diferentes tipos de scaffolds utilizados em engenharia de tecidos. Adaptado de [12], imagens SEM dos filmes e membranas porosas retiradas de [12], fibras de [13] e estrutura tridimensional de [14].	12
Figura 3 - Esquema de um sistema de electrospinning para formação de fibras não orientadas observando-se a fonte de tensão, a bomba de fluxo e o coletor estático.....	19
Figura 4 - Esquema com os diversos métodos utilizados para deposição de PANI.	24
Figura 5 - Esquemas com os diversos métodos utilizados para deposição de Ppy.....	24
Figura 6 - Estiramento das fibras de PVDF O nas diferentes direções (0, 45 e 90°) de acordo com a orientação das fibras.....	27
Figura 7 - Gráfico de DSC das amostras de PVDF O e NO.	36
Figura 8 - Gráfico do espectro de FTIR-ATR das amostras de PVDF O e NO.	36
Figura 9 - Imagens de SEM das fibras de PVDF. A e B – Fibras NO com uma ampliação de 100 µm e 20 µm, respetivamente, e C e D – Fibras O com uma ampliação de 100 µm e 20 µm, respetivamente.	38
Figura 10 - Diâmetro médio das amostras de PVDF O e NO.....	39
Figura 11 - Gráficos das propriedades mecânicas das fibras de PVDF: A – Curvas de tensão-deformação e B - Módulo de Young relativamente ao grau de inclinação entre a fibra e direção de estiramento das fibras de PVDF puras O e NO.....	40
Figura 12 - Imagens de SEM da orientação das fibras de PVDF O_90° com diferentes graus de estiramento 0%, 3%, 16% e 100%.	41
Figura 13- Medição da orientação das fibras O_90° nos diferentes graus de estiramento, A - 0%, B - 3%, C - 16% e D - 100%.....	42
Figura 14 - Valores médios de diâmetro das diferentes fibras de PVDF A) O_0°, B) O_45°, C) O_90° e D) NO nas diferentes orientações estiradas a 3, 16 e 100%.....	43
Figura 15 - Viabilidade celular das diferentes amostras de PVDF revestidas após 72 horas.....	46
Figura 16 - SEM das fibras de PVDF revestida com A) Ppy e B) PANI.	47
Figura 17 - A- Medições eletromecânicas das fibras de PVDF O revestidas com PPy com uma pré-deformação de 10% e com um ciclo de 5% de deformação; e B – Variação relativa da resistência elétrica com a deformação aplicada.	49
Figura 18 - Avaliação da proliferação celular às 24 h e 72 h das amostras de PVDF O e NO com e sem revestimento de Ppy.	50

Figura 19 - Morfologia das células C2C12 semeadas nas diferentes amostras de PVDF após 3 dias de cultivo celular: A - O sem revestimento, B - NO sem revestimento, C - O revestidas com Ppy e D - NO revestidas com Ppy.....51

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1 - Polímeros piezoelétricos e os seus coeficientes de piezoelectricidade. Adaptado de [28].	16
Tabela 2 - Designação das amostras estiradas.	28
Tabela 3 - Quantidade obtida da $F(\alpha)$, $F(\beta)$ e cristalinidade das fibras de PVDF orientadas e não orientadas.	37
Tabela 4 - Valores da média dos ângulos de contacto das diferentes amostras.	39
Tabela 5 - Amostras produzidas e a respetiva resistividade elétrica (R_s) da superfície.	45
Tabela 6 - Ângulos de contacto das fibras de PVDF O revestidas com polímero condutor.	47
Tabela 7 - Módulos de Young das fibras revestidas com diferentes polímeros condutores.	48

LISTA DE SÍMBOLOS E ACRÓNIMOS

- ΔH_{α} – Entalpia da fusão da amostra 100% cristalina na fase α
- ΔH_{β} – Entalpia da fusão da amostra 100% cristalina na fase β
- ΔX_c – Grau de cristalinidade
- % w/w – Percentagem massa/massa
- Ω/sq – Ohm/quadrado
- ANI – Anilina
- CSA – Ácido canforsulfónico
- DMEM – Meio modificado de Eagle Dulbecco
- DMF – Dimetilformamida
- DMSO – Dimetilsulfóxido
- DSC – Calorimetria diferencial de varrimento
- F(α) – Fase α
- F(β) – Fase β
- FBS – Soro fetal bovino
- FTIR-ATR – Espectroscopia de infravermelhos com transformadas de Fourier e reflexão total atenuado
- MEC – Matriz extracelular
- MTT – ((Brometo de 3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio)
- MTS – 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazólio)
- NO – Não orientadas
- N-PPDA– N-fenil-p-fenilenodiamina
- O – Orientadas
- PANI – Polianilina
- PCL – Poli-caprolatona
- PEG – Polietileno glicol
- PEDOT – Poli(3,4-etilenodioxitiofeno)
- PHB – Polihidroxiacetato
- PLA – Ácido poliláctico
- PLGA – Poli (ácido láctico-co-ácido glicólico)
- PLLA – Ácido-L-poliláctico
- Py – Pirrole

PPy – Polipirrole

P/S – Penicilina/estreptomicina

PVDF – Poli(fluoreto de vinilideno)

PVDF-TrFe – Poli(fluoreto de vinilideno-trifluoretileno)

SA – Ácido salicílico

SEM – Microscopia de varrimento eletrônica

SD – Desvio padrão

CAPÍTULO I: INTRODUÇÃO

1.1 MOTIVAÇÃO

O ser humano é um organismo frágil e desde do momento da sua concepção poderá sofrer malformações congénitas, doenças e traumas que podem desencadear lesões e danos irreparáveis em tecidos e/ou órgãos. Ao longo da história, o ser humano sempre procurou novas formas de tratamento para este tipo de enfermidade sendo que novas estratégias têm sido desenvolvidas e aperfeiçoadas à medida que a ciência cria e desenvolve novos conceitos e processos [1].

Numa primeira fase, as próteses e os implantes surgiram para substituir membros amputados ou dentes e, são atualmente produzidos utilizando materiais mais biocompatíveis, resistentes e leves. A evolução das técnicas cirúrgicas permitiu o tratamento e restauração de tecidos e órgãos que outrora não era possível, contudo nem sempre é possível a restauração com eficácia e sem futuras consequências. Quando há falência total de um órgão e/ou tecido, como por exemplo o coração, o fígado ou os rins, os procedimentos anteriores são, na maioria das vezes, ineficazes e, por isso, é necessário a substituição do órgão. A transplantação de tecidos/órgãos demonstrou-se uma alternativa viável e que permite salvar inúmeras vidas, mas está dependente da situação nacional, do sistema de saúde em que o paciente se insere, o nível de capacidade técnica e a disponibilidade de órgãos [2]. Apesar de ser viável que o transplante ocorra utilizando tecido do recetor, na maioria dos casos, é necessário que se tenha de procurar um dador diferente do recetor devido ao tecido/órgão danificado (coração, fígado, entre outros). Todavia, e apesar de se procurar sempre um enxerto com a maior similaridade possível, os transplantes podem trazer consequências a longo prazo, como por exemplo a toma de medicamentos de supressores do sistema imunitário para evitar a rejeição do enxerto que poderia levar ao aparecimento de doenças oportunistas [3].

A engenharia de tecidos humanos é uma área em crescimento que pretende colmatar as desvantagens acima referidas. Nascida da necessidade de tratamentos menos prejudiciais e mais rápidos pretende regenerar ou originar tecido/órgãos através do uso de células provenientes do doente. Ao dar os estímulos certos e ao recriar um ambiente similar ao encontrado no organismo humano é possível que este tipo de tratamento passe a ser concretizável num futuro próximo. Assim, é necessário criar uma estrutura biocompatível com o sistema humano, mas que também sirva como suporte para a regeneração de tecido. A aplicação de materiais fez com que um novo ramo na área dos materiais surgisse – os biomateriais – materiais capazes de interagir com o organismo humano e permitir o processo de regeneração. As fibras produzidas por *electrospinning*

conseguem mimetizar a matriz extracelular (MEC) e assim disponibilizar às células um ambiente similar ao encontrado no organismo humano. Ao utilizar um polímero piezoelétrico capaz de fornecer estímulos elétricos e mecânicos, este sistema passa a ser capaz de fornecer um ambiente com estímulos biofísicos às células similar ao que acontece no organismo humano. Contudo, como a condutividade não é uniforme em toda a superfície, uma das opções é depositar um material condutor capaz de uniformizar a superfície e fazer com que o estímulo ou a resposta seja mais rápida e em toda a sua superfície.

1.2 OBJETIVOS

Neste trabalho pretende-se produzir uma estrutura condutora em que a base é um polímero piezoelétrico, o poli(fluoreto de vinilideno) (PVDF) que posteriormente será revestido com um polímero condutor (polipirrole (PPy) ou polianilina (PANI)) para aplicações na área de engenharia de tecidos. Os principais objetivos deste trabalho são:

- Produção e caracterização de fibras de PVDF por *electrospinning*;
- Otimização da deposição de um polímero condutor nas fibras de PVDF;
- Testar a condutividade e a citotoxicidade das amostras;
- Caracterizar as fibras condutoras a nível mecânico e eletromecânico;
- Testar a proliferação celular nas amostras produzidas.

1.3 ESTRUTURA DA TESE

A tese está dividida em 5 capítulos.

O primeiro capítulo expõe a motivação e os principais objetivos desta dissertação, a sua estrutura e contributos importantes que resultaram da sua realização.

No segundo capítulo é feita uma revisão da literatura sobre engenharia de tecidos e os polímeros inteligentes com ênfase nos polímeros piezoelétricos e condutores e o desenvolvimento destes nesta área.

No terceiro capítulo são descritos os materiais e métodos utilizados para a preparação das diferentes estruturas assim como as diferentes técnicas de caracterização utilizadas ao longo do trabalho.

No quarto capítulo são apresentados e discutidos os resultados relativos à caracterização das fibras produzidas por *electrospinning* e às revestidas com polímero condutor, avaliando a sua morfologia e estrutura, mas também a sua biocompatibilidade e proliferação celular.

No quinto capítulo são apresentadas as conclusões relativas ao trabalho realizado assim como ao trabalho futuro.

CAPÍTULO II: POLÍMEROS
INTELIGENTES NA
VANGUARDA DA ENGENHARIA
DE TECIDOS

2.1 ENGENHARIA DE TECIDOS

A engenharia de tecidos é uma área em crescimento e nasce da necessidade de colmatar as desvantagens das terapias utilizadas quando ocorre a falência de tecidos e dos custos/complicações que delas advêm. A sua própria definição tem evoluído ao longo dos anos sendo que uma das mais aceitas é a de *Langer & Vancati* que estipularam a engenharia de tecidos como a “área que utiliza os princípios da engenharia e das ciências da vida com o objetivo de desenvolver substitutos biológicos de forma a restaurar, manter ou melhorar a função do tecido” [4].

A produção de tecidos biológicos viáveis e funcionais comporta não só um conjunto vasto de materiais e métodos passíveis de utilizar, mas também um conhecimento amplo em várias áreas desde da biologia à medicina passando pela física e engenharia [5].

A partir desta multidisciplinariedade, foi possível deduzir duas estratégias principais para se produzirem tecidos viáveis e funcionais: a primeira através da produção de tecido *in vitro* em estruturas apropriadas e que posteriormente é implantado no organismo e a segunda através da criação de uma estrutura passível de ser estimulada e que, após a sua implantação no local pretendido do organismo, suporta e impulsiona o crescimento celular [6].

Pode-se assim identificar um conjunto de três pontos fundamentais para formar tecido (figura1): células, *scaffolds* e estímulos. Para que ocorra a formação de tecido é necessário um material que sirva de suporte, normalmente designado como *scaffold*, onde serão cultivadas as células. Dependendo do tecido, da função pretendida e da técnica necessária para a sua formação deverão ser utilizados estímulos bioquímicos (ex.: fatores de crescimento) e estímulos biofísicos (ex.: forças de tensão) de forma a mimetizar o ambiente celular em que elas estão inseridas [7].

2.2 CÉLULAS

No organismo humano ocorrem processos de formação e regeneração de tecidos através do uso de informação pré-programada nas células e dos estímulos que lhe são fornecidos [1]. A produção de tecidos quer *in vitro* quer *in vivo* requer a utilização de células que permitam formar tecido utilizando os *scaffolds* como plataforma para esse efeito. As células utilizadas podem ser divididas em células diferenciadas e células estaminais.

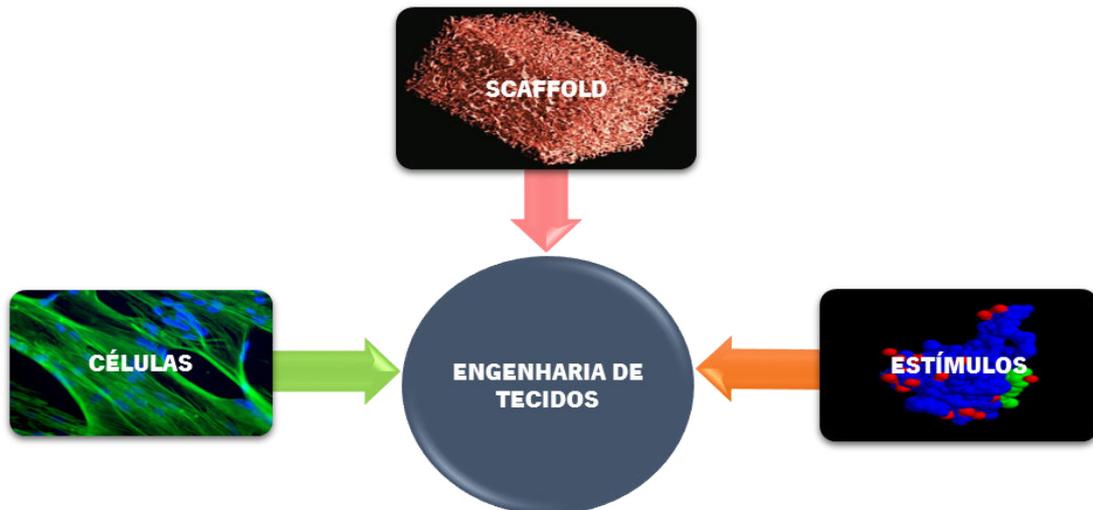


Figura 1 - Tríade da engenharia de tecidos: células que serão colocadas em *scaffolds* e onde serão submetidas a estímulos para proliferarem e diferenciarem. Adaptado de [7]

As primeiras são provenientes do paciente, totalmente diferenciadas e a sua utilização em conjunto com os *scaffolds* na produção de tecido tem tido sucesso [8]. Todavia, as suas limitações passam pela natureza invasiva que possuem e o potencial para se encontrarem em estado de doença.

Alternativamente, as células estaminais possuem uma alta capacidade de regeneração e podem diferenciar-se em diferentes tipos de células. Os problemas colocados ao seu uso devem-se sobretudo a dilemas éticos e ao potencial de formação de teratomas [9].

2.3 SCAFFOLDS

Relativamente aos *scaffolds*, estes necessitam de cumprir certos requisitos para a sua utilização em seres humanos, apresentados de seguida:

a) Biocompatibilidade – Os *scaffolds* e os produtos da sua degradação não poderão desencadear respostas inflamatórias no sistema imunitário o que poderá levar a rejeição do tecido formado e outras complicações noutras locais do organismo [10].

b) Biodegradabilidade – A importância da biodegradabilidade de um material em engenharia de tecidos depende da finalidade que lhe queira ser atribuída. No caso de *scaffolds* que sejam implantados este é um fator importante visto que o objetivo não é a sua permanência no organismo humano, mas a sua atuação como um intermediário. Assim, é necessário que à medida que o tecido seja formado haja a degradação do *scaffold* e que os seus produtos de

degradação possam ser eliminados pelas vias de excreção do organismo sem que haja interferência com outros órgãos e tecidos [7, 10]. Mas se o objetivo for produzir o tecido fora do organismo humano e depois transplantá-lo a biodegradabilidade pode não ser um requisito importante a cumprir.

c) Propriedades mecânicas – O *scaffold* deve ter propriedades mecânicas consistentes com o local onde será feito o implante e ao mesmo tempo ser forte o suficiente para que seja manuseado sem que haja perturbação da sua estrutura. As características mecânicas devem ter em conta o tecido, o local, a idade do paciente, o processo de regeneração e permitir ao mesmo tempo a vascularização e a infiltração celular. Por exemplo, na regeneração óssea é necessário ter em conta que a estrutura produzida resista a pressões hidrostáticas e, ao mesmo tempo, conserve a matriz celular e a sua porosidade permitindo a infiltração celular [7, 11].

d) Arquitetura do *scaffold* – A forma da estrutura que o material poderá adquirir depende do material usado, do local e de como a formação do tecido se dá. Deverá ter-se em conta pontos como a porosidade, o formato utilizado (filme, membrana porosa, fibras, estrutura tridimensional, entre outros) (figura 2) e a superfície do material [7]. Geralmente, a arquitetura do *scaffold* procura mimetizar a MEC de um determinado tecido pois é nele que as células crescem, diferenciam e está adaptado para suportar os estímulos químicos e físicos fornecidos naquele determinado ambiente.

e) Tecnologia de produção – O *scaffold* deve ser passível de reproduzir tanto em laboratório como industrialmente tendo sempre em conta como será feita a utilização do produto [7].

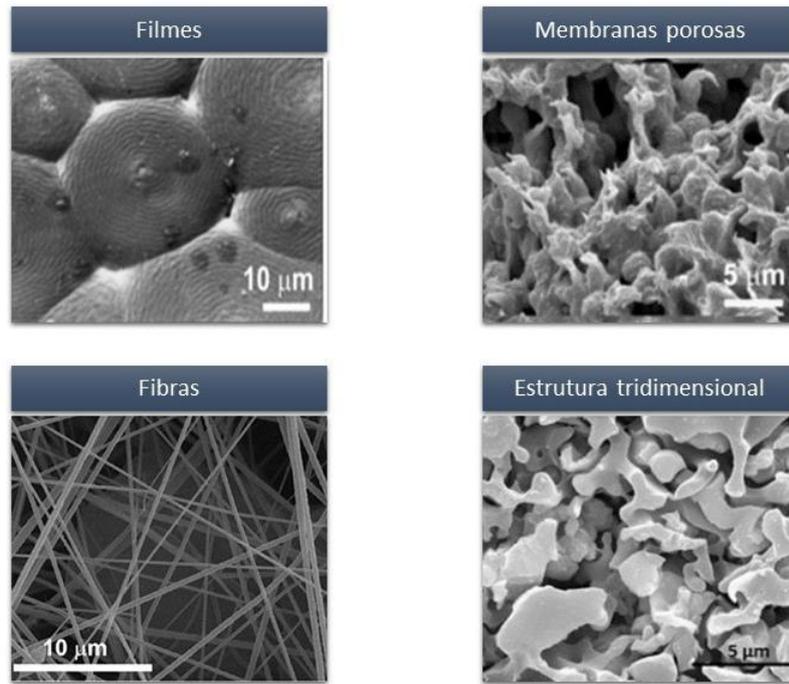


Figura 2 - Estruturas de diferentes tipos de *scaffolds* utilizados em engenharia de tecidos. Adaptado de [12], imagens SEM dos filmes e membranas porosas retiradas de [12], fibras de [13] e estrutura tridimensional de [14].

Atualmente, já são feitos *scaffolds* com sucesso a nível de proliferação celular, mas em certos tipos de tecido, como o osso, a cartilagem ou o músculo têm havido certas dificuldades em obter a funcionalidade do tecido. É assim importante investigar os diferentes estímulos a que as diferentes células estão sujeitas.

2.4 ESTÍMULOS BIOQUÍMICOS E BIOFÍSICOS

O grande desafio da engenharia de tecidos é que o tecido ou órgão regenerado seja funcional e idêntico ao que foi perdido ou danificado irremediavelmente. Uma célula encontra-se rodeada de um microambiente que determina as características funcionais das mesmas através de estímulos como por exemplo, as moléculas solúveis, a MEC/substrato, o contacto célula – célula e as forças mecânicas/físicas. Apesar de atualmente ser quase impossível o estudo de todos estes sinais/estímulos e a influência que cada um possui em cada tipo de célula, pode-se estudar a combinação dos estímulos mais importantes e os seus efeitos e escolher os que melhor se adequam ao objetivo pretendido [15].

Os estímulos bioquímicos (fatores de crescimento, fatores quimiotáticos) foram os primeiros a ser estudados e aplicados para proliferação e diferenciação celular. Atualmente está

a ser estudada como poderá ser feita a incorporação destes nos *scaffolds* para potenciar a regeneração mas também a entrega de fármacos [6]. Contudo, e apesar de haver proliferação *in vitro* num modelo bidimensional, as suas características numa estrutura tridimensional são bastante diferentes [15].

Assim, além de aliar a produção de uma estrutura apropriada ao desenvolvimento celular, é necessário também mimetizar os estímulos biofísicos que as células recebem.

Alguns exemplos destes são as forças de tensão-compressão, a perfusão, o campo eletromagnético, a tensão de oxigénio, a força gravitacional, a forma da célula, a elasticidade e a topografia [16].

A própria constituição dos órgãos e tecidos humanos, desde dos seus componentes até à sua própria estrutura e disposição no organismo humano, estão perfeitamente capazes de suportar e responder aos estímulos que estão submetidos. É importante que os materiais escolhidos tenham características capazes de suportar o ambiente estimulante onde os diferentes tecidos se inserem.

2.5 MATERIAIS UTILIZADOS EM ENGENHARIA DE TECIDOS

A construção de um *scaffold* não implica apenas a escolha de um material qualquer, mas sim de um material que cumpra os requisitos específicos já acima mencionados, que consiga suportar os diferentes estímulos a que as células estão sujeitas e que mimetize o ambiente celular em que as células estão inseridas.

Existem diferentes materiais que têm sido estudados e aplicados no ramo biomédico como por exemplo os metais. A utilização de metais e ligas metálicas em aplicações biomédicas não é de todo desconhecida devido à sua utilização em próteses para a substituição de tecido ósseo, no entanto, a sua utilização em *scaffolds* para engenharia de tecidos é bastante recente. Foram produzidas estruturas metálicas porosas, principalmente à base de titânio, com o objetivo de aplicar-se na regeneração de tecido ósseo [17-19]. E, apesar de estudos *in vitro* comprovarem a proliferação [20] e diferenciação celular [21, 22], surgem problemas ao nível da sua utilização *in vivo* que pode desencadear toxicidade a longo prazo devido a processos como a corrosão que leva à acumulação de produtos tóxicos nos tecidos.

Os materiais cerâmicos estruturalmente mais diversos demonstram-se mais promissores que os metais e as ligas metálicas. As biocerâmicas são especialmente produzidas para reparação

e reconstrução de partes de corpo danificadas podendo ser cristais, policristalinas, vidros, vidros cerâmicos ou compósitos [23]. A sua utilização mais conhecida das cerâmicas é em substitutos de ancas, joelhos e dentes. No entanto, a sua aplicação para formação de *scaffolds* é focada maioritariamente na área de regeneração óssea [24-26]. Apesar de ser um alvo de menor utilização, as biocerâmicas podem vir a ser utilizadas na regeneração odontológica [27].

Nos últimos anos são os polímeros que se têm destacado pelas suas características únicas uma vez que permitem uma diversidade de estruturas químicas através da facilidade de modificação e funcionalização, mas também por serem de fácil produção e manipulação. A sua origem pode ser natural ou sintética, sendo que os primeiros possuem características atrativas para serem empregues no ramo biomédico por exibirem propriedades similares aos tecidos a regenerar e promoverem a adesão e a proliferação celular. Por outro lado, o processamento destes materiais é bastante difícil e as suas propriedades elétricas e mecânicas são bastante limitadas [28]. A utilização deste tipo de polímeros está bastante avançada e, recentemente, está a desenvolver-se um *scaffold* à base de colagénio para a formação de um órgão completo (a bexiga) já com resultados promissores a nível de biocompatibilidade e diferenciação celular [29].

Por sua vez, os polímeros de origem sintética, devido à facilidade de manipulação da sua estrutura, possuem uma enorme diversidade estrutural como funcional [28]. Polímeros como o ácido poliláctico (PLA) [30-32], policaprolactona (PCL) [33, 34] ou o polietileno glicol (PEG) [35-37] contribuíram para um enorme desenvolvimento da aplicação de polímeros em engenharia de tecidos, mas também para áreas como os sistemas de entrega de fármacos [38].

Com o desenvolvimento das técnicas e dos materiais pode-se atualmente produzir inúmeros polímeros, como é o caso dos materiais inteligentes.

2.6 MATERIAIS INTELIGENTES

Os materiais inteligentes, do inglês *smart materials*, são materiais que sofrem variações reprodutíveis, significativas e estáveis de uma determinada propriedade físico-química quando submetidos a um dado estímulo [28]. Estas variações podem ser classificadas de acordo com o estímulo a que o material responde sendo exemplos destes a temperatura, o pH, a força iónica, a luz, o campo elétrico e magnético, entre outros [39]. Dentro destes polímeros, os polímeros eletroativos são os que mais despertam atenção devido ao seu mecanismo de transdução eletromecânico e subdividem-se em polímeros eletrónicos e iónicos.

Os primeiros envolvem uma resposta eletromecânica devido a forças eletrostáticas fazendo parte os elastômeros dielétricos e eletro-viscoelásticos, os ferroelétricos, entre outros. Os segundos compreendem mecanismos de atuação que envolvem a difusão de íons como por exemplo, os nanotubos de carbono, os polímeros condutores e os polímeros de géis iônicos [28, 40].

A variedade de polímeros existentes permite selecionar os que melhor se adequam aos objetivos pretendidos principalmente se partilham essas particularidades com as encontradas no organismo humano. Os polímeros piezoelétricos são um dos tipos de polímeros que atualmente tem suscitado interesse devido à piezoelectricidade - uma propriedade encontrada em vários tecidos do corpo humano.

2.6.1 POLÍMEROS PIEZOELÉTRICOS

A piezoelectricidade é uma característica inerente a alguns materiais inorgânicos mas também a tecidos do corpo humano como o osso [41, 42], os tendões [43], o colagénio [44], os dentes [45], entre outros. Pode ser definida como a propriedade do material que é observada quando ocorre uma mudança elétrica ou a produção de uma voltagem através da aplicação de forças mecânicas podendo ocorrer também o contrário, ou seja, a deformação mecânica causada pela aplicação de um campo elétrico [46].

Existem alguns polímeros com piezoelectricidade como por exemplo o ácido L-poliláctico (PLLA) [47], polihidroxibutirato (PHB) [48], o poli(fluoreto de vinilideno) (PVDF) [49], entre outros. De todos os polímeros piezoelétricos atualmente conhecidos, o PVDF e os seus copolímeros apresentam o maior coeficiente piezoelétrico, que indica a proporção entre o estímulo aplicado e a resposta do material (tabela 1). Este é um polímero semicristalino e pode apresentar quatro fases cristalinas conhecidas (α , β , δ , γ), sendo que a fase β ($F(\beta)$) possuiu uma maior quantidade de dipolos permanentes e portanto melhores propriedades piezoelétricas [50]. Além disso, o PVDF possui outras propriedades como a piroelectricidade e a ferroelectricidade, é biocompatível o que o torna atrativo para a sua utilização na área biomédica, apesar de não ser biodegradável.

Tabela 1 - Polímeros piezoelétricos e os seus coeficientes de piezoelectricidade. Adaptado de [28].

Polímeros	Coefficiente piezoelétrico (pC/N)
PLA	10
PHB	1.6-2.0
PVDF	24-34
Poli(fluoreto de vinilideno-trifluoretileno) (PVDF-TrFE)	38
Poliamida-11	4

A utilização de polímero piezoelétricos em engenharia de tecidos tem vindo a aumentar e a serem comprovados os seus benefícios. Por exemplo, a aplicação de filmes de β -PVDF polarizados e não polarizados para regeneração óssea sob condições mecânicas demonstra uma maior adesão e proliferação de osteoblastos nos filmes polarizados [51]. Existem mais exemplos da sua utilidade para a regeneração neuronal [52-54] e muscular [55, 56].

Porém, a vantagem da entrega de estímulos elétricos utilizando materiais piezoelétricos que é feita sem a necessidade de uma fonte externa, torna-se também a desvantagem porque o controlo do estímulo é bastante limitado [57].

Para certos tecidos é necessário controlar a condutividade elétrica principalmente no tecido nervoso. A razão é que o sistema nervoso transmite sinais a todo o organismo e coordena todas as ações permitindo que o ser humano seja capaz de pensar e ser consciente devido à atividade elétrica produzida no cérebro.

Uma alternativa aos polímeros piezoelétricos serão os polímeros condutores pois possuem características promissoras como permitir o controlo externo e a intensidade do estímulo que é fornecido mas também atinge valores elevados de condutividade e conseguem ser mais moduláveis que os polímeros piezoelétricos [58].

2.6.2 POLÍMEROS CONDUTORES

Os polímeros condutores fazem parte do grupo de materiais eletroativos iónicos pois permitem a entrega direta de um estímulo químico, eléctrico e/ou eletromecânico nas células através dos iões. Possuem inúmeras vantagens como o excelente controlo do estímulo eléctrico, propriedades óticas e eléctricas muito boas, elevada razão entre condutividade/peso e podem ser biocompatíveis, biodegradáveis e porosos [59].

A síntese destes polímeros pode ser feita de duas formas: química e eletroquímica. Na primeira é necessária a utilização de um agente oxidante enquanto na segunda, a polimerização ocorre através da passagem da corrente entre dois elétrodos numa solução que contém o monómero, o solvente e o agente dopante [59]. A condutividade é fornecida geralmente por processos de dopagem que alteram a cadeia neutralizada do polímero tornando-a oxidada ou reduzida, ou seja, carregada positiva ou negativamente [58].

O polipirrole (Ppy) é o polímero condutor mais estudado e conhecido. A sua síntese é bastante fácil e flexível, possui uma boa estabilidade química, uma elevada condutividade e pode ser manipulado facilmente para se tornar mais biocompatível [59, 60]. Na área biomédica, este polímero pode ser utilizado por exemplo, para a libertação de fármacos a nível ocular [61], em compósitos com outros materiais para formar *scaffolds* [62-64] ou funcionalizado para servir como biossensor de ácido desoxirribonucleico [65]. Além de servir como um suporte para o desenvolvimento de tecidos, estes polímeros podem conduzir estímulos elétricos às células que necessitam destes para se diferenciarem [66].

Outro exemplo de polímero condutor é a polianilina (PANI) que também tem sido amplamente estudada devido às suas vantagens como uma síntese fácil, um baixo custo de produção e uma boa estabilidade. Este possuiu três estados de oxidação: uma forma totalmente oxidada – pernigranilina, uma forma metade oxidada - esmeraldina e uma forma totalmente reduzida - leucoesmeraldina. A mais estável e com maior condutividade é a esmeraldina e possuiu uma cor esverdeada. A biocompatibilidade deste polímero é por vezes posta em causa, mas a sua toxicidade deve-se não ao polímero em si mas aos reagentes e produtos de reação formados aquando da sua síntese [67]. As suas aplicações vão desde o desenvolvimento de fibras de compósitos para a extração de toxinas da água [68] a sensores [69, 70]. Na área biomédica, as nanopartículas deste polímero podem ser utilizadas em diagnóstico de doenças e tumores [71] e a libertação de fármacos [72]. Em engenharia de tecidos, a utilização de PANI tem sido aplicada principalmente à parte de regeneração muscular [73, 74] e neuronal [75] e, com menos ênfase, na regeneração óssea [76]. Existem alguns polímeros bastante prometedores como é o caso do poli(3,4-etilenodioxitiofeno) (PEDOT), que apesar da sua aplicação ser bastante recente exhibe níveis elevados de biocompatibilidade e condutividade. Contudo, os polímeros condutores possuem algumas desvantagens, a sua biocompatibilidade por vezes é dúbia e não são biodegradáveis.

A necessidade de obter materiais que aliem as melhores propriedades de cada polímero levou à junção de diferentes materiais para colmatar as desvantagens que singularmente cada

tipo de polímero possui e exponenciar as qualidades de ambos levando à produção de um novo gênero de materiais: os materiais híbridos.

2.7 MATERIAIS HÍBRIDOS

A junção de diversos tipos de materiais dá origem a novos materiais e estruturas complexas que possuem propriedades únicas e híbridas. Podem-se fazer diversas estruturas combinando diferentes polímeros como *blendings*, revestimentos, compósitos, entre outros.

A nível de polímeros piezoelétricos podem ser adicionados, na sua síntese, compostos como nanopartículas [77] ou outros polímeros [70] para torná-los por exemplo mais condutores ou adicionar alguma característica que não possuem (ex.: magnéticos).

Os polímeros condutores são muitas vezes misturados com materiais capazes de os tornar mais biocompatíveis através do uso de proteínas mas também pode ser utilizado no revestimento de outros polímeros [78, 79] ou *blendings* [74].

Encontram-se na literatura vários exemplos deste tipo de materiais e a sua aplicação em engenharia de tecidos. Lee et al produziram nanofibras de poli(ácido láctico-co-ácido glicólico) (PLGA) e revestidas com Ppy com o objetivo de se aplicarem na regeneração de tecido nervoso através da aplicação de estímulos elétricos. Nesse estudo verificou-se que as membranas, além de suportarem o crescimento e a diferenciação celular, permitiam uma melhor diferenciação celular quando acompanhadas da aplicação de estímulos elétricos [80]. Aznar Cervantes et al aplicaram o revestimento de Ppy mas em fibras de fibroína de seda comprovando a adesão e a proliferação de células mesenquimais [81]. Outro exemplo, com um polímero condutor diferente, o PANI são fibras resultantes da mistura deste polímero com gelatina que tiveram resultados prometedores na proliferação e diferenciação de células cardíacas [82].

De uma forma geral, verifica-se que há uma tendência para serem empregues polímeros piezoelétricos e condutores em fibras em engenharia de tecidos. As fibras são capazes de mimetizar a MEC e a produção pode ser feita com diferentes polímeros, o que faz com que estas possuam características excepcionais e promissoras para a sua aplicação em engenharia de tecidos [83].

Existem variados métodos para se produzir fibras: *drawing* [84], *template synthesis* [85], separação de fase [86], *self-assembly* [87], ou *electrospinning* [50]. Esta última tem sido o

processo mais escolhido para a produção de fibras, uma vez que é simples, permite o controle das características das fibras e funciona com diversos polímeros.

2.8 ELECTROSPINNING

A técnica de *electrospinning* foi inventada por Formhals Anton em 1934 e permite produzir fibras através de um jato carregado eletricamente de um determinado composto [88].

É necessário ter algumas condições para que este processo se realize: o polímero necessita de ser solúvel, é necessária uma fonte de tensão, uma bomba de fluxo com uma seringa e uma agulha e um coletor que pode ser estático ou rotativo, como exemplificado na figura 3. O polímero que se encontra na ponta da agulha possui uma tensão de superfície e é submetido a um campo elétrico, induzindo uma carga na solução que por sua vez provoca repulsão de cargas e uma força diretamente oposta à tensão de superfície. À medida que a tensão aumenta, a solução na ponta da agulha, que formava uma forma hemisférica, alonga-se formando um cone (Cone de Taylor). Quando chega ao valor crítico e a tensão de superfície é ultrapassada pelas forças elétricas repulsivas, há a formação de um jato carregado. Há medida que o jato voa, o solvente evapora criando uma fibra de polímero carregado que é controlada pelo campo elétrico formado e que se dirige ao coletor onde é recolhida [89].

O diâmetro das fibras depende de diferentes condições: a distância da ponta da agulha ao coletor, o fluxo, a temperatura ambiente durante a formação da fibra, a tensão, o diâmetro da agulha, a viscosidade, entre outras [13].

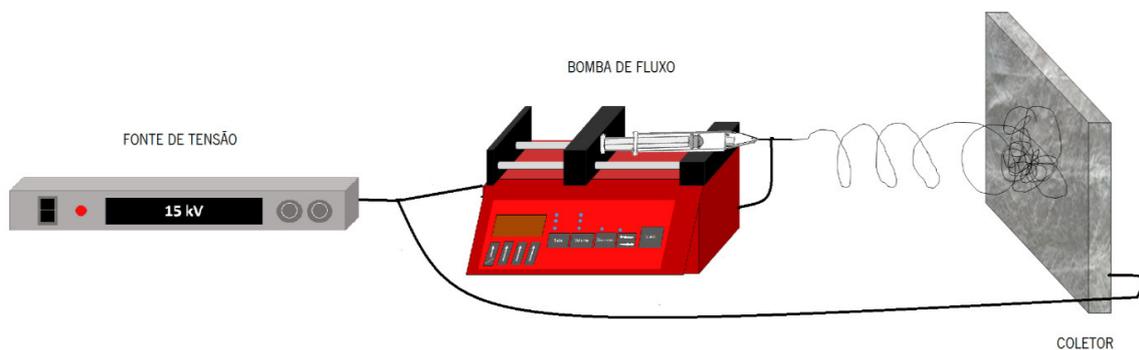


Figura 3 - Esquema de um sistema de *electrospinning* para formação de fibras não orientadas observando-se a fonte de tensão, a bomba de fluxo e o coletor estático.

CAPÍTULO III: MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 MATERIAIS

Para o *electrospinning* o PVDF (Solef 5130) e o dimetilformamida (DMF) foram adquiridos à Solvay e à Merck, respetivamente.

Para a deposição de polímero condutor foram utilizados os seguintes compostos: Anilina (ANI), Pirrole (Py), N-fenil-p-fenilenodiamina (N-PPDA), ácido canforsulfónico (CSA), ácido salicílico (SA), peróxido de hidrogénio (H_2O_2), ácido clorídrico (HCl), cloreto de ferro (III) ($FeCl_3$) foram adquiridos à Sigma Aldrich. O etanol (EtOH, pureza 99%) foi adquirido por Panreac e o EtOH a 70% adquirido a Manuel Vieira & Companhia, Lda.

3.2 PRODUÇÃO DE FIBRAS DE PVDF POR *ELECTROSPINNING*

O PVDF com uma concentração de 17% w/w foi totalmente dissolvido em DMF, em agitação magnética. De seguida, colocou-se a solução numa seringa esterilizada com uma agulha com um diâmetro de 0,5 mm. A bomba de fluxo utilizou um fluxo constante de 0,4 mL/h e a fonte de alta tensão da Glasman (modelo PS/FC30P04) aplicou uma voltagem aplicada de 13 kV entre a ponta da agulha e o coletor que se encontravam a 20 cm de distância [13]. Neste trabalho foram utilizados dois tipos de coletores: um estático, que consistia numa placa de esferovite recoberta com uma folha de alumínio para formar fibras não orientadas (NO), e um dinâmico, que consistia num motor ligado a um cilindro também ele recoberto com folha de alumínio para formar fibras orientadas (O).

3.3 DEPOSIÇÃO DO POLÍMERO CONDUTOR

Os polímeros condutores escolhidos para deposição nas fibras de PVDF foram o PANI e o Ppy.

A deposição com PANI dividiu-se em duas estratégias (figura 4): na primeira optou-se por uma via mais comum através da utilização do ANI para iniciar a polimerização e na segunda utilizou-se uma nova abordagem, a utilização do N-PPDA para início da síntese da PANI. Foram utilizados dois oxidantes diferentes: o $FeCl_3$ e o H_2O_2 e os agentes dopantes utilizados foram o HCl, o SA e o CSA.

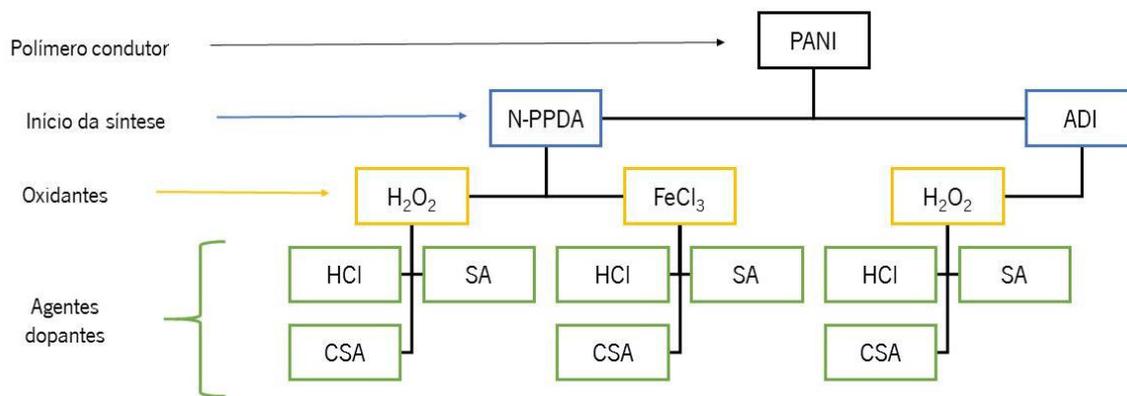


Figura 4 - Esquema com os diversos métodos utilizados para deposição de PANI.

A deposição com Ppy (figura 5) foi feita a partir do Py e alterou-se apenas o oxidante (FeCl₃ e H₂O₂) e os agentes dopantes (NaCl, HCl, SA e CSA).

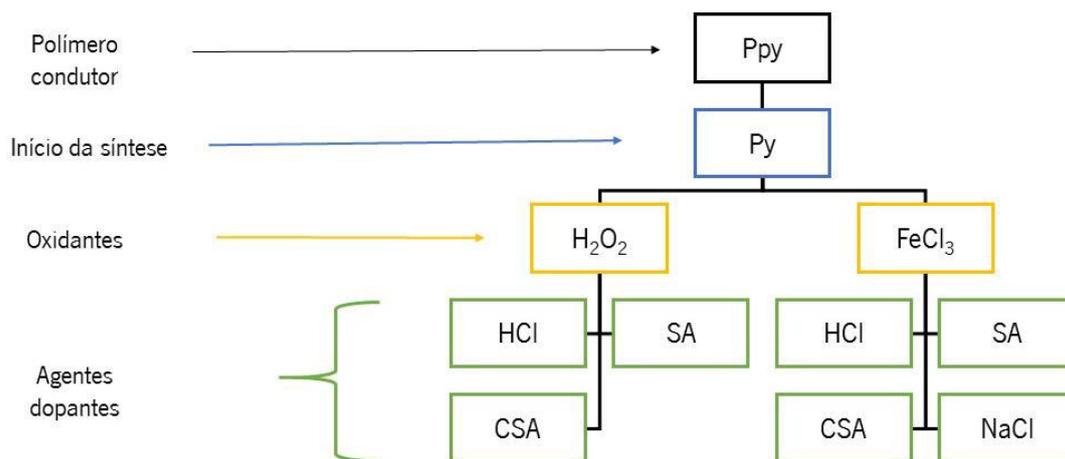


Figura 5 - Esquemas com os diversos métodos utilizados para deposição de Ppy.

De seguida é mencionado o protocolo relativo à amostra mais consensual e em que foram feitos os testes de proliferação celular.

PROCOLO DE DEPOSIÇÃO:

Cortou-se a amostra de PVDF com as dimensões pretendidas (5 × 5 cm) e colocou-se numa solução de EtOH:dH₂O (1:5) até que a fibra se tornasse totalmente transparente.

Num gobelé colocaram-se 14 mM de Py e 14 mM de NaCl em 37,5 mL dH₂O e homogenizou-se (solução 1). Ao mesmo tempo, num balão volumétrico de 25 mL foi dissolvido 30 mM de FeCl₃ em dH₂O (solução 2).

Retirou-se a fibra da solução aquosa de EtOH e colocou-se na solução 1 e deixou-se incubar por cerca de 10 minutos à temperatura ambiente. A 4 °C, adicionou-se a solução 2 à solução 1 e deixou-se incubar por 24 horas a essa temperatura. No final, as fibras apresentavam uma cor preta e sem a presença de agregados. Posteriormente, a fibra revestida foi lavada com dH₂O e EtOH a 70% várias vezes até que a solução a desperdiçar se mantivesse incolor e livre de resíduos. A amostra foi seca à temperatura ambiente.

3.4 TÉCNICAS DE CARATERIZAÇÃO

3.4.1 MICROSCOPIA ELETRÓNICA DE VARRIMENTO

A microscopia eletrónica de varrimento (SEM do inglês *Scanning Electron Microscope*) é uma técnica de imagem microscópica. As fibras de PVDF O e NO sem revestimento e as revestidas com polímero condutor foram analisadas através desta técnica com magnificação de ×1K, ×5K e ×10K e uma voltagem de 2 kV.

Foram também analisadas as fibras submetidas a estiramento utilizando a máquina de teste universal AG-IS da Shimadzu no modo tensão com uma célula de carga de 50 N. As imagens de SEM com magnificação de ×1K, ×5K e ×20K e voltagem de 2 kV foram tiradas na região do centro das amostras onde as mudanças causadas pelo estiramento eram mais prováveis de serem observadas.

Todas as amostras foram recobertas com ouro e analisadas por SEM (Quanta 650, FEI). Procedeu-se depois à medição dos diâmetros das fibras pelo programa ImageJ.

3.4.2 ESPETROSCOPIA DE INFRAVERMELHO COM TRANSFORMADAS DE FOURIER E REFLEÇÃO TOTAL ATENUADA

A espectroscopia de infravermelho com transformadas de Fourier e reflexão total atenuada (FTIR-ATR, do inglês *Fourier transformed infrared-attenuated total reflectance*) permite distinguir as diversas formas cristalinas do PVDF [28]. A amostra foi medida no intervalo entre 600 e 4000 cm⁻¹, mas o intervalo de interesse avaliado foi de 600 a 1100 cm⁻¹.

A partir dos resultados obtidos no FTIR é possível calcular a quantidade relativa de fase α ($F(\alpha)$) e fase β ($F(\beta)$) presentes nas amostras de fibras orientadas e não orientadas de PVDF através da equação 1.

$$F(\beta) = \frac{A_{\beta}}{(K_{\beta}/K_{\alpha})A_{\alpha} + A_{\beta}}, \quad \text{Equação 1}$$

onde $F(\beta)$ representa o conteúdo da fase β , A_{α} e A_{β} representam a absorvância a 766 e 840 cm^{-1} sendo que estes números de onda correspondem à $F(\alpha)$ e $F(\beta)$ do material respetivamente, K_{α} e K_{β} são os coeficientes de absorção dos números de onda e os valores são $6,1 \times 10^4$ e $7,7 \times 10^4 \text{ cm}^2/\text{mol}$, respetivamente [90].

As amostras analisadas por FTIR-ATR foram as fibras de PVDF O e NO não revestidas.

3.4.3 CALORIMETRIA DIFERENCIAL DE VARRIMENTO

A análise de um material utilizando a calorimetria diferencial de varrimento (DSC, do inglês *Differential scanning calorimetry*) permite avaliar as transições de fase que o material sofre, permitindo recolher informações relativas às propriedades físicas do mesmo tais como o grau de cristalinidade. Para efetuar a medição, em cadinhos de alumínio é colocada uma quantidade de amostra com um peso semelhante entre si e, que depois de devidamente selados, foram colocados no forno. O procedimento iniciou com o aquecimento da amostra e posterior arrefecimento no intervalo de temperatura entre 40 °C e 220 °C. Esta técnica permite a medição do grau de cristalinidade (ΔX_c) da amostra (equação 2), em conjunto com os valores obtidos no FTIR-ATR.

$$\Delta X_c = \frac{\Delta H}{x\Delta H_{\alpha} + y\Delta H_{\beta}}, \quad \text{Equação 2}$$

onde ΔH é a entalpia de fusão da amostra em consideração, ΔH_{α} e ΔH_{β} são a entalpia de fusão de uma amostra 100% cristalina na $F(\alpha)$ e $F(\beta)$ com os valores de 93,07 J/g e 103,4 J/g respetivamente, e x e y é a quantidade da $F(\alpha)$ e $F(\beta)$ presente na amostra respetivamente sendo os valores obtidos por medições de FTIR-ATR.

3.4.4 CARATERIZAÇÃO MECÂNICA E ELETROMECCÂNICA

A caracterização mecânica das fibras de PVDF foi realizada através de testes mecânicos que permitiram a obtenção de curvas de tensão-deformação, o tipo de ruptura que as fibras apresentam e o cálculo do módulo de Young (módulo de elasticidade que permite medir a rigidez do material) para cada tipo de fibra.

As amostras de PVDF O e NO foram cortadas em retângulos de $2,5 \times 1$ cm e medida a sua espessura. No caso das fibras O foram cortadas amostras em três direções diferentes (0° , 45° e 90°) como demonstra a figura 6. As fibras depositadas com polímero condutor também foram avaliadas mecanicamente, mas apenas as fibras O na direção a 0° .

As amostras foram estiradas utilizando o equipamento Linkam TST350 (Linkam Scientific Instruments, Surrey, UK) com cargas de 20 N e 200 N (no caso das fibras orientadas a 0°).

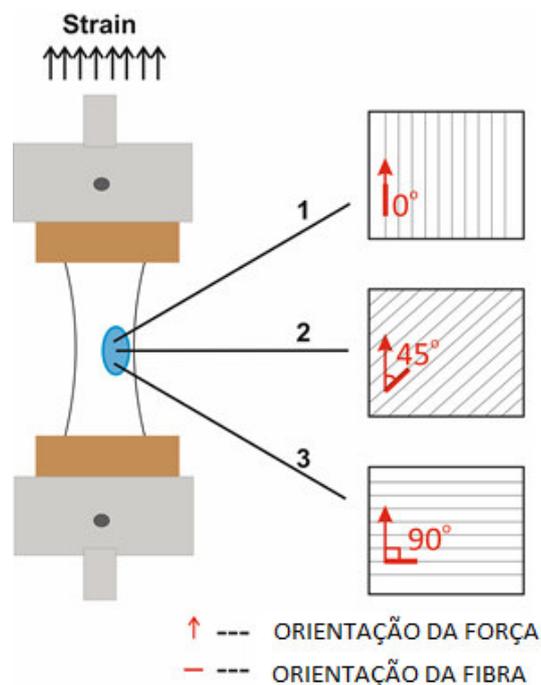


Figura 6 - Estiramento das fibras de PVDF O nas diferentes direções (0° , 45° e 90°) de acordo com a orientação das fibras.

Na tabela 2 encontram-se todas as denominações das amostras estiradas. Para cada ensaio foram realizadas 3 réplicas.

Tabela 2 - Designação das amostras estiradas.

Fibras de PVDF	Ângulo de estiramento	Significado	Designação da amostra	Carga da célula (N)
0	0°	Estiramento das fibras na direção da orientação das fibras	O_0°	200
	45°	Estiramento das fibras 45° da orientação das fibras	O_45°	20
	90°	Estiramento dá-se 90° da orientação das fibras	O_90°	20
NO	Orientação não definida	-	NO	20
O com revestimento	0°	Estiramento das fibras na direção da orientação das fibras		20

Para os testes eletromecânicos foram utilizadas as fibras revestidas com polímero condutor que foram cortadas com um tamanho de 3 × 1 cm, medida a sua espessura e de seguida foram colocados elétrodos em cada uma das pontas. Utilizou-se a máquina de teste universal AG-1S da Shimadzu com uma carga de 50 N no modo tensão (ciclos) e mediu-se a resistência utilizando o multímetro da Agilent. Procedeu-se à medição dos ciclos (com 1%, 2% e 5% de deformação) após um estiramento inicial de 10% da amostra.

3.4.5 ÂNGULOS DE CONTACTO

A molhabilidade das fibras de PVDF 0, NO e revestidas com um polímero condutor foi determinada pela medição de ângulos de contacto. Colocou-se uma gota de 3 µL de dH₂O na superfície do material à temperatura ambiente e utilizou-se o instrumento de análise OCA15 Daphysics para medir o ângulo de contacto que a gota faz com a superfície do material. Foram realizadas 6 medições por cada amostra em diferentes locais e depois calculada a média.

3.4.6 RESISTIVIDADE ELÉTRICA DA SUPERFÍCIE

A resistividade da superfície (R_s) foi medida como previamente descrita em [80]. Foram utilizados dois elétrodos colocados a 1 cm um do outro e a resistência foi medida utilizando um multímetro (Extech Instruments). A resistividade da superfície foi medida através da fórmula apresentada na equação 3.

$$R_s = R \times \frac{C}{D}, \quad \text{Equação 3}$$

onde R é a resistência medida entre os dois elétrodos, C o comprimento da amostra e D a distância entre os dois elétrodos, sendo as unidades ohm por quadrado (Ω/sq).

3.4.7 CITOTOXICIDADE

A avaliação da citotoxicidade das amostras produzidas foi realizada de acordo com a norma ISO 10993-5.

Na cultura celular, as células utilizadas foram os mioblastos de rato C2C12 e foram colocadas em expansão em frascos de cultura celular de 75 cm² com meio modificado *Eagle* da Dulbecco (DMEM do inglês *Dulbecco's modified Eagle's medium*, Gibco), contendo 4,5 g/L de glucose suplementado com 10% de soro fetal bovino (FBS do inglês *Fetal bovine serum*, Biochrom) e 1% penicilina/estreptomicina (P/S do inglês *penicillin/streptomycin*, Biochrom). As células foram incubadas sob condições *standard* a 37 °C com ar humidificado a 95% contendo uma atmosfera de 5% de CO₂. O meio de cultura foi mudado a cada dois dias até que as células chegassem a uma confluência de 60%-70% e então tripsinizadas com 0,05% de tripsina-EDTA.

As fibras com e sem revestimento foram cortadas com uma área de 3 cm² e esterilizadas com 3 lavagens de solução salina de fosfato tampão (PBS do inglês *Phosphate-buffered saline*, Gibco) por 5 minutos. As amostras foram colocadas numa placa de cultura celular de 24 poços de poliestireno com DMEM, contendo 4,5 g/L de glucose juntamente com 10% de FBS e 1% P/S de sob condições de cultura *standard* (37 °C e 95% de ar humidificado contendo 5% CO₂) e incubadas por 24 horas.

Ao mesmo tempo, as células C2C12 foram semeadas numa placa de 96 poços de poliestireno com uma densidade de 1,5 x 10⁴ células/mL e incubadas por 24 horas para permitir a adesão celular à placa.

Após 24 horas, o meio de cultura da placa de 96 poços que continha as células foi removido e substituído pelo meio extraído da placa contendo as amostras (100 µL/poço). De seguida, as células foram incubadas por 24 e 72 horas e após cada tempo de incubação, o número de células viáveis foi quantificado por brometo de 3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio (MTT, Sigma Aldrich), um ensaio colorimétrico. O MTT, que é um composto amarelo, é reduzido metabolicamente pelas células viáveis a cristais de formazano de cor azul violeta. O número de células viáveis correlaciona-se com a intensidade da cor determinada pelas medições fotométricas depois da dissolução dos cristais de formazano em álcool. Neste ensaio, o meio em contacto com as células é retirado e substituído por uma solução de MTT (5 mg/mL de MTT dissolvido em DMEM na proporção de 1:10) e incubado no escuro a 37 °C por 3 horas. Depois disso, a solução de MTT foi removida e o formazano precipitado foi dissolvido em 100 µL de dimetilsulfóxido (DMSO) por cada poço. A quantificação foi feita através da medição da absorvância a 570 nm usando um leitor de placas espectralfotométrico (Biotech Synergy HT).

Todos os resultados foram obtidos a partir de 4 réplicas por cada tipo de amostra (n=2) e analisados como a viabilidade média ± desvio padrão (SD do inglês standard deviation). A percentagem da viabilidade celular foi calculada através da equação 4, em que o controlo negativo representa as células nos poços que continham meio de cultura (isto é, que não estiveram em contacto com as amostras).

$$Viabilidade\ celular\ (\%) = \frac{Absorbância\ da\ amostra}{Absorbância\ do\ controlo\ negativo} \times 100, \quad \text{Equação 4}$$

3.4.8 CULTIVO ESTÁTICO – PROLIFERAÇÃO CELULAR

Para o ensaio de proliferação celular foram cultivadas células C2C12 nas fibras com e sem revestimento numa placa de 24 poços a uma concentração de 1×10^5 células/mL. As fibras foram cortadas em círculos com 13 mm de diâmetro e a esterilização das amostras foi igual à realizada nos ensaios citotóxicos.

Após 24 e 72 horas, foi avaliada a proliferação celular, assim como a morfologia celular nos diferentes substratos.

Em relação à proliferação celular, essa foi quantificada com 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazólio (MTS, CellTiter 96-Aqueous one solution reagent, Promega). Nesse ensaio, o MTS (inicialmente amarelo) é bio-reduzido, através de NADPH ou NADP

produzido por enzimas mitocondriais encontradas nas células metabolicamente ativas, a um produto castanho, o formazano, que é solúvel no meio de cultura. O sobrenadante foi removido após cada tempo de incubação e as amostras lavadas com PBS. De seguida, DMEM sem fenol vermelho e FBS foi adicionado à solução de MTS numa mistura com uma razão de 1:5 e incubadas a 37 °C com 5% de CO₂. Após 3 horas de incubação, foi transferido 100 mL de cada poço em triplicado para uma placa de 96 poços e a densidade ótica foi medida a 490 nm. A quantidade de formazano produzido é proporcional ao número de células viáveis e conseqüentemente uma avaliação indireta de proliferação celular.

Relativamente à morfologia celular, após a incubação o meio foi retirado e as amostras foram lavadas com PBS. Posteriormente, as fibras foram fixadas com 4% de formalaldeído (Sigma) em PBS por 1 hora a temperatura ambiente. As células foram lavadas novamente com PBS e desidratadas com um gradiente de etanol (10, 30, 50, 60, 70, 80, 90 e 100% de etanol em dH₂O). Posteriormente, as amostras foram secas a temperatura ambiente, depositado ouro e avaliadas no SEM.

CAPÍTULO IV: RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 ANÁLISE DAS PROPRIEDADES DAS FIBRAS PURAS DE PVDF

Numa primeira fase foram analisadas as fibras puras de PVDF produzidas por *electrospinning* de forma a caracterizá-las relativamente à sua estrutura, morfologia e propriedades mecânicas.

4.1.1 ANÁLISE ESTRUTURAL DAS FIBRAS DE PVDF

A análise dos resultados obtidos através das técnicas de DSC e FTIR permitiu analisar a estrutura do PVDF nomeadamente a cristalinidade e a quantidade de $F(\alpha)$ e $F(\beta)$ das fibras de PVDF O e NO (tabela 3).

A técnica de DSC permite concluir sobre as propriedades físicas de diferentes materiais e como estas se alteram em função da temperatura e do tempo permitindo o estudo de pontos de fusão, cristalinidade, fases de transição, entre outros [91]. Neste trabalho, o DSC foi empregue com o objetivo de investigar a percentagem de cristalinidade das fibras de PVDF O e NO. A importância desta característica no PVDF reflete-se na influência que possuiu na piezoelectricidade do material visto que a interfase entre a fase cristalina e amorfa é importante na ocorrência de fenómenos piezoelétricos [92].

De acordo com a literatura, os valores de cristalinidade das fibras de PVDF encontram-se entre 50-60% [90]. Os valores obtidos estão de acordo com estudos anteriores (tabela 3). Através da observação do gráfico de DSC (figura 7) é possível verificar que as curvas de fluxo de calor entre as fibras O e NO são semelhantes assim como os picos de temperatura – indicativos das temperaturas de fusão do polímero (O = 164 °C, NO = 163 °C) que comparativamente aos valores teóricos se situam nos 167 °C [13].

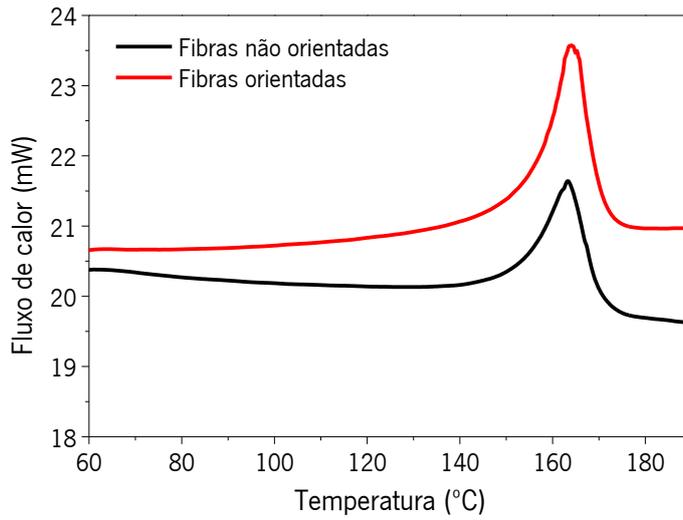


Figura 7 - Gráfico de DSC das amostras de PVDF O e NO.

Estudos feitos com filmes de β -PVDF indicam um valor de cristalinidade de 47% e os picos de temperatura encontram-se por volta dos 157 °C [93] indicando diferenças estruturais entre os filmes e fibras do PVDF.

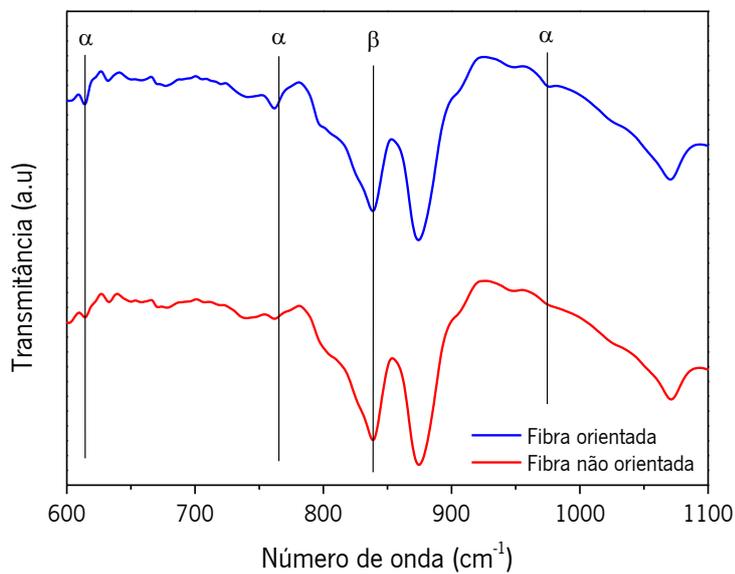


Figura 8 - Gráfico do espectro de FTIR-ATR das amostras de PVDF O e NO.

A percentagem de $F(\beta)$ indica a quantidade de piezoelectricidade presente na amostra. Através da técnica de FTIR é possível caracterizar a quantidade de $F(\alpha)$ e $F(\beta)$ através da análise dos picos característicos de cada fase (figura 8). Os valores encontrados na literatura para as fibras produzidas por *electrospinning* com uma tensão aplicada de 15 kV apontam percentagens de $F(\beta)$ na ordem dos 86% [50].

Tabela 3 - Quantidade obtida da $F(\alpha)$, $F(\beta)$ e cristalinidade das fibras de PVDF orientadas e não orientadas.

		%
PVDF orientado	$F(\alpha)$	16,4
	$F(\beta)$	83,6
	ΔX_c	51,5
PVDF não orientado	$F(\alpha)$	5,8
	$F(\beta)$	94,2
	ΔX_c	52,1

Ao analisar os resultados obtidos, verifica-se que as fibras O e NO encontram-se próximas desses valores, com 83,6% para as fibras O e 94,2% para as fibras NO (tabela 3), o que está de acordo com os valores encontrados na literatura. O erro do instrumento pode influenciar os valores em $\pm 5\%$.

4.1.2 ANÁLISE MORFOLÓGICA DAS FIBRAS DE PVDF

A morfologia das amostras obtidas foi analisada por SEM. Através das imagens obtidas foi possível observar a topografia da amostra, a direção que as fibras apresentam, a uniformidade do diâmetro das fibras, o aparecimento de outras morfologias nas fibras durante a produção das mesmas (por exemplo, a presença de *beads*) e calcular o diâmetro médio para cada amostra.

Pela observação da figura 9 verifica-se que ambas as fibras de PVDF (O e NO) são bastante uniformes e não se observa em nenhuma a presença de *beads*. Nas fibras O consegue-se definir uma orientação contrariamente às fibras NO, em que as direções que seguem são aleatórias, o que está de acordo com o previsto.

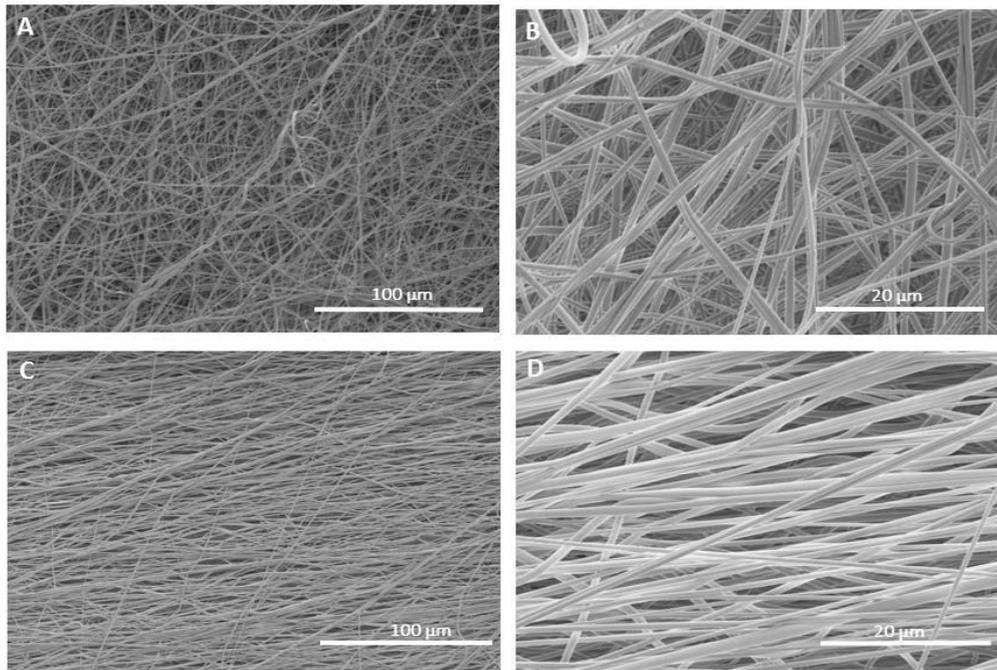


Figura 9 - Imagens de SEM das fibras de PVDF. A e B – Fibras NO com uma ampliação de 100 μm e 20 μm, respectivamente, e C e D – Fibras O com uma ampliação de 100 μm e 20 μm, respectivamente.

A orientação das fibras é um requisito importante pois vários estudos revelam que alguns tipos de células (como por exemplo os mioblastos) quando cultivadas em fibras com uma orientação definida proliferam e diferenciam melhor do que as cultivadas em fibras que possuem uma orientação aleatória [94, 95].

Outro parâmetro avaliado foi o diâmetro médio das fibras obtidas (figura 10). As fibras NO possuem um diâmetro médio de 721 ± 89 nm e as fibras O apresentam um diâmetro médio de 761 ± 124 nm. As fibras O possuem um desvio maior o que pode dever-se ao movimento do coletor rotativo que induz a formação de fibras com diâmetros mais dispersos. O diâmetro das fibras é um fator relevante para os cultivos celulares pois as células são capazes de terem a percepção do diâmetro das fibras podendo alterar o seu comportamento com consequências na forma como ocorre a adesão e o crescimento celular no *scaffold* [96].

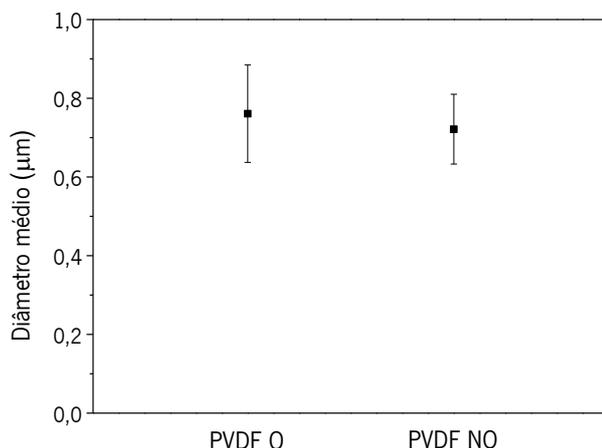


Figura 10 - Diâmetro médio das amostras de PVDF O e NO.

A molhabilidade das amostras também foi avaliada através da medição dos ângulos de contacto nas fibras obtidas.

As amostras de PVDF O e NO possuem um comportamento hidrofóbico de acordo com os valores obtidos (tabela 4). Contudo, a avaliação da hidrofobicidade das fibras produzidas por *electrospinning* só poderá ser feita qualitativamente e não quantitativamente pois devido à superfície rugosa das fibras, as gotas não fazem um contacto total com a superfície e, por isso, os valores apresentados não refletem o verdadeiro grau de hidrofobicidade do polímero [97].

Tabela 4 - Valores da média dos ângulos de contacto das diferentes amostras.

	Média de ângulos de contacto
PVDF O	145,2 ± 2,6°
PVDF NO	133,4 ± 3,2°

4.1.3 PROPRIEDADES MECÂNICAS DAS FIBRAS PURAS DE PVDF

As propriedades mecânicas de um material estão dependentes da sua composição e da sua estrutura química e é um dos requisitos na escolha de certos materiais para uma determinada aplicação. Um material quando sujeito a um estímulo mecânico apresenta um determinado comportamento e é a partir deste que se podem estudar diferentes parâmetros, como por exemplo, a resistência, a rigidez e o módulo de elasticidade.

As fibras de PVDF O e NO foram submetidas a uma força de tensão e o seu comportamento mecânico foi estudado através da avaliação de gráficos de tensão-deformação e do cálculo do módulo de Young.

As fibras O_{45°}, O_{90°} e NO apresentam curvas de tensão-deformação bastante similares entre si, com a exceção das fibras O_{0°} como se pode observar na figura 11 A. As propriedades mecânicas das fibras de O_{45°}, O_{90°} e NO são mais baixas que as fibras O_{0°} e, por isso, as últimas suportam valores de tensão maiores, ou seja, necessitam da aplicação de uma tensão maior para que ocorra deformação tanto a nível elástico como plástico.

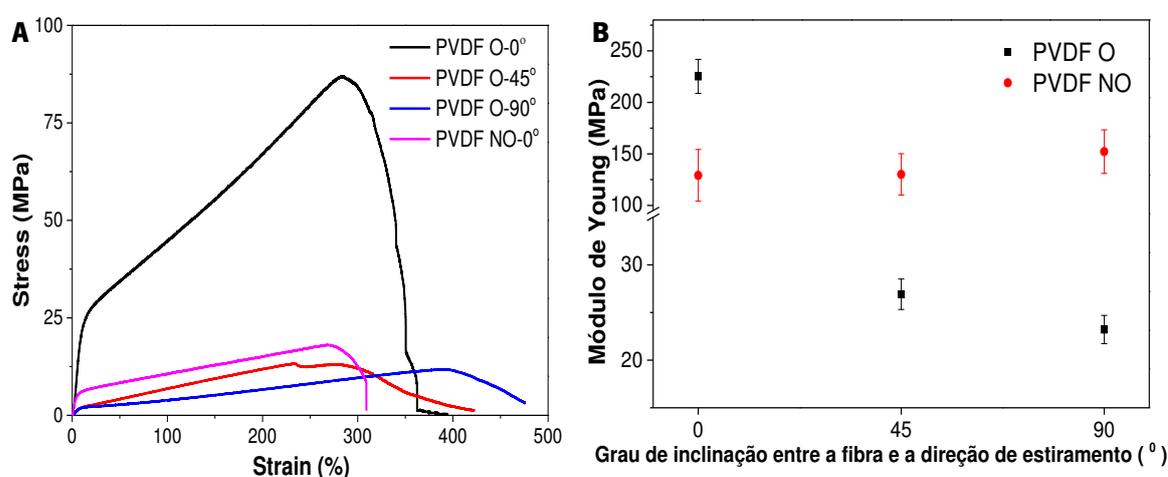


Figura 11 - Gráficos das propriedades mecânicas das fibras de PVDF: A – Curvas de tensão-deformação e B - Módulo de Young relativamente ao grau de inclinação entre a fibra e direção de estiramento das fibras de PVDF puras O e NO.

Quanto aos módulos de Young, através da figura 11 B é possível verificar que nas fibras O estas dependem do grau de inclinação entre a fibra e a direção de estiramento. Contrariamente observa-se, como seria esperado, que o módulo de Young das fibras NO é independente do grau de inclinação, uma vez que essas não possuem nenhuma orientação definida e, por isso, em qualquer grau de inclinação são esperados valores semelhantes.

As fibras O_{0°} possuem o valor de módulo mais elevado com 225 ± 16 MPa que diminuiu nas fibras de O_{45°} (27 ± 2 MPa) e de O_{90°} (23 ± 2 MPa). Estes resultados são consistentes com o trabalho realizado por Heo et al/ que verificou que as fibras de PCL produzidas por *electrospinning*, quando submetidas a uma caracterização mecânica semelhante, os módulos de elasticidade diminuíam à medida que o ângulo entre a direção de estiramento e a direção das fibras aumenta [98]. Ao analisar o valor do módulo de Young das fibras NO (aproximadamente 129 ± 25 MPa), verifica-se que esse é superior ao das fibras O_{45°} e das O_{90°}. Este

comportamento poderá dever-se ao facto de existir uma maior quantidade de fibras na direção de estiramento nas fibras NO do que nas fibras O nas outras direções.

Para testar a hipótese colocada e confirmar qual o fenómeno associado às variações das fibras quando aplicada uma tensão em diferentes direções, foi feito um estudo da sua morfologia após o estiramento das fibras a 3% (fase elástica), a 16% (fase plástica) e a 100% (altas deformações) tanto nas fibras O nas diferentes direções como nas fibras NO (figura 12). Através das imagens de SEM obtidas, é possível observar, em todas as amostras, uma reorientação das fibras na direção do estiramento. Esse é menos acentuado nas amostras O_0°, uma vez que a maioria das fibras já se encontra alinhadas na direção do estiramento. A reorientação das fibras, principalmente nas fibras com direções diferentes, tende a formar aglomerados de fibras, como se pode ver nitidamente nas fibras O_90°.

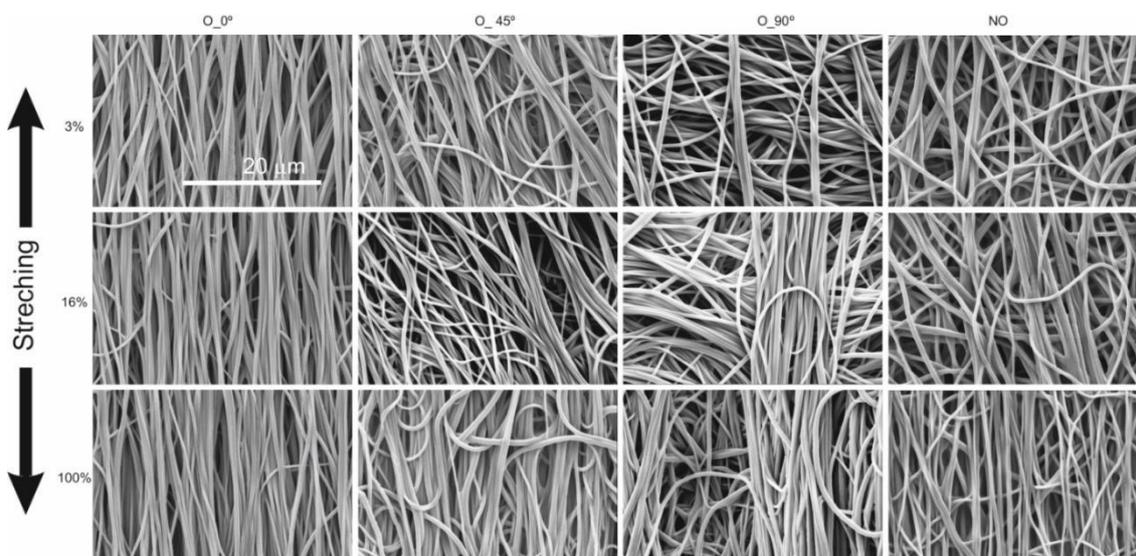


Figura 12 - Imagens de SEM da orientação das fibras de PVDF O_90° com diferentes graus de estiramento 0%, 3%, 16% e 100%.

Pela observação das imagens da figura 12, as fibras NO parecem reorientar-se mais rapidamente que as fibras O a 45 e 90°. Este comportamento confirma a hipótese acima referida de existir uma maior quantidade de fibras que estão na direção de estiramento nas fibras NO comparativamente às fibras O a 45 e 90°. Estes resultados vão de encontro ao demonstrado na literatura em que foi comprovado que um aumento do número das fibras de PCL alinhadas na direção de estiramento podia aumentar o Módulo de Young por 125% e o limite de elasticidade por 150% [99].

Para comprovar a mudança de direção das fibras foi também medida a orientação das fibras com e sem estiramento. A figura 13 representa a medição da orientação de fibras O_{90° , uma vez que é a amostra que sofre maior reorientação de todas, visto a direção das fibras ser totalmente perpendicular à direção em que é aplicada a tensão. Após a análise dos gráficos, verifica-se o aumento do número de fibras aproximarem-se da direção oposta à inicialmente, à medida que o estiramento da amostra continua a aumentar. As fibras vão se reorientando na direção em que está a ser aplicada a tensão, verificando-se que, quando chega a 100% de deformação, a maioria das fibras já se encontra na sua maioria reorientada. Pode-se observar o mesmo comportamento nas fibras NO e O_{45° e com menor incidência nas O_{0° .

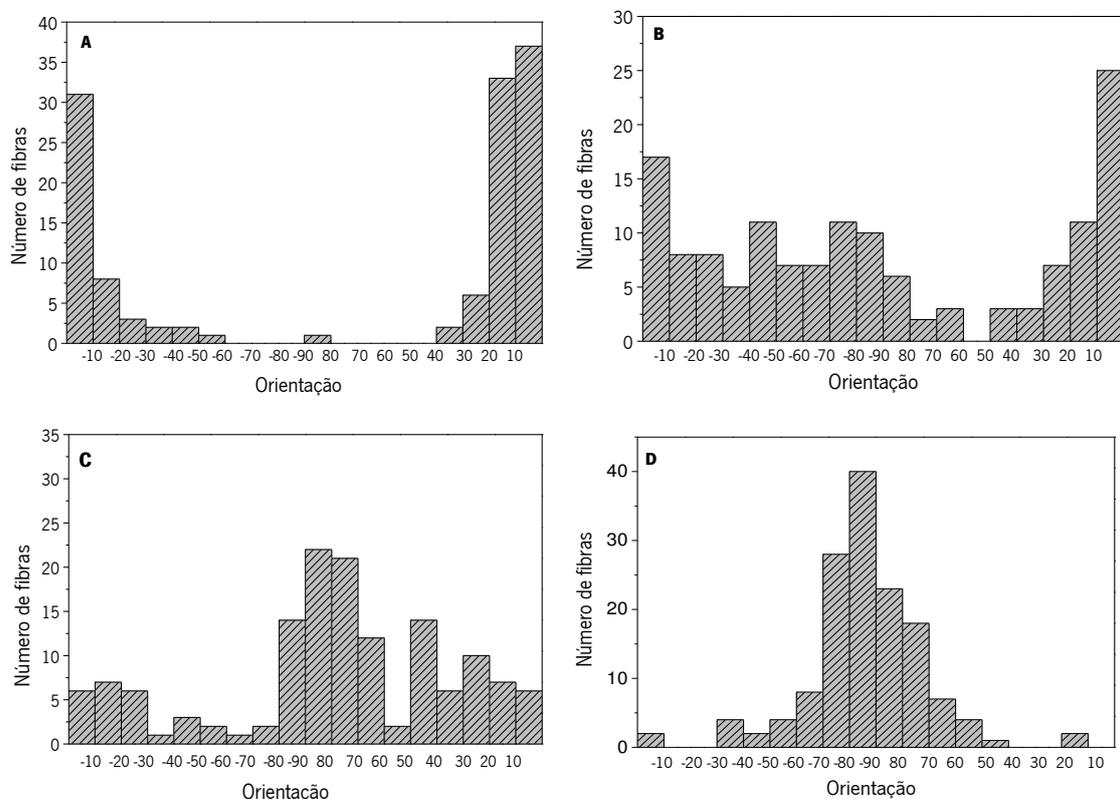


Figura 13- Medição da orientação das fibras O_{90° nos diferentes graus de estiramento, A - 0%, B - 3%, C - 16% e D - 100%.

A variação do diâmetro médio das fibras com o grau de estiramento foi também estudada (figura 14). Antes do estiramento, as fibras NO apresentam um valor de diâmetro médio de 954 ± 90 nm e as fibras O de 794 ± 198 nm. Na figura 14, é possível observar que o diâmetro médio das fibras varia quando a tensão aplicada e o grau de estiramento aumentam, verificando-se uma diminuição do tamanho médio.

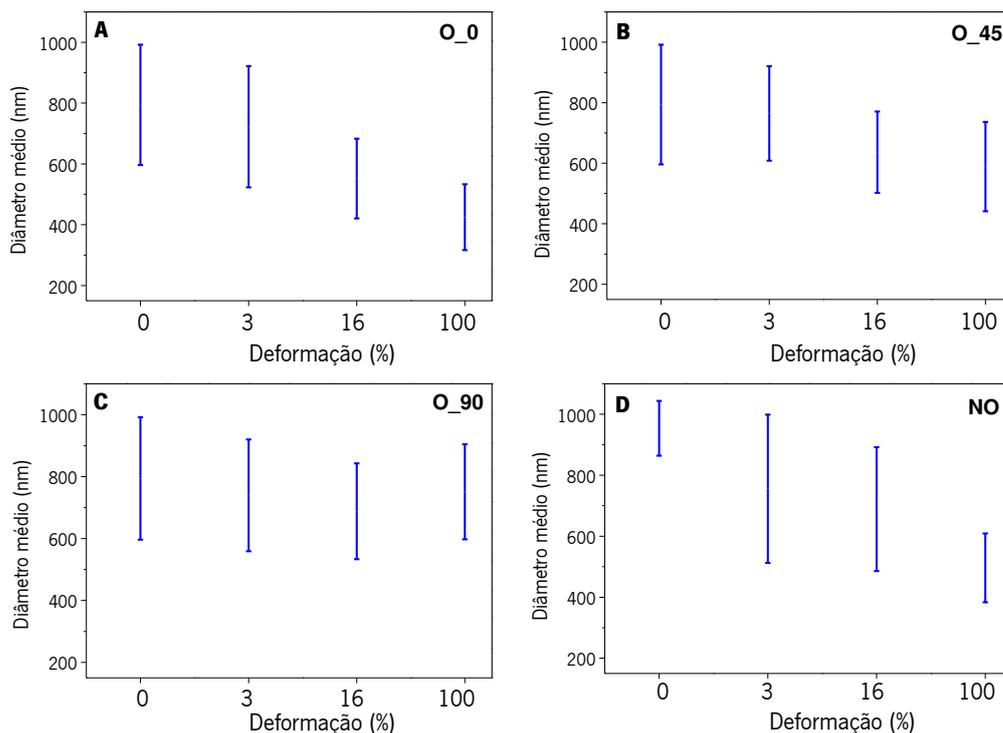


Figura 14 - Valores médios de diâmetro das diferentes fibras de PVDF A) O_0°, B) O_45°, C) O_90° e D) NO nas diferentes orientações estiradas a 3, 16 e 100%.

Nas deformações mais elevadas (100%), a diminuição do diâmetro é mais acentuada nas amostras a O_0° (425 ± 108 nm) reduzindo para quase metade do seu valor inicial. A diminuição não é tão elevada nas fibras O_45° (589 ± 148 nm) e O_90° (751 ± 153 nm), pois a tensão aplicada tem uma maior influência na reorientação das fibras. Comparando com as fibras NO (496 ± 113 nm) estas possuem uma maior diminuição do que as fibras O a 45 e 90°.

As propriedades mecânicas do PVDF permitem concluir que as fibras deste polímero possuem um comportamento anisotrópico quando possuem uma orientação definida. Quando submetidos a uma tensão verifica-se que há uma reorientação das fibras que é maior quanto maior for o ângulo de inclinação entre a direção das fibras e a direção de estiramento. Estes fatores são importantes porque estudos revelaram que a orientação e a direção das fibras são fatores importantes para a proliferação e a diferenciação celular pois esses podem mudar a expressão de genes nas células [98].

4.2 FIBRAS REVESTIDAS COM POLÍMERO CONDUTOR

A análise da morfologia das fibras de PVDF e o estudo das suas propriedades mecânicas permite que se compreenda como a deposição de polímero condutor poderá afetar as suas características e numa fase seguinte poderá influenciar o comportamento celular e a aplicação de estímulos.

4.2.1 CONDUTIVIDADE E CITOTOXICIDADE

Na deposição de polímero condutor foram testados diferentes polímeros condutores e diferentes oxidantes e dopantes de forma a escolher as amostras mais adequadas tendo em conta o objetivo proposto. Os fatores decisivos eram a condutividade que a amostra possuía e a sua biocompatibilidade celular determinada por testes de citotoxicidade. Após a escolha, as amostras foram alvo de um estudo de caracterização mais apropriado, passando para os testes de citotoxicidade, e a amostra mais consensual foi escolhida para testes de proliferação celular.

Na tabela 5 encontram-se os resultados das amostras em que foi registada a presença de condutividade através da medição da resistividade elétrica da superfície. Quanto maior for a resistividade da superfície menor será a condutividade da amostra.

Tabela 5 - Amostras produzidas e a respetiva resistividade elétrica (R_s) da superfície.

Fibras de PVDF com deposição de	R_s (Ω/sq)	Fibras de PVDF com deposição de	R_s (Ω/sq)
PPy (Py+Oxidante+Dopante)		PANI (ANI ou N-PPDA+Oxidante+Dopante)	
Py + FeCl ₃ + NaCl	$2,9 \times 10^5$	ANI + FeCl ₃ + HCl	$1,5 \times 10^4$
Py + FeCl ₃ + HCl	×	ANI + FeCl ₃ + SA	$5,2 \times 10^6$
Py + FeCl ₃ + SA	×	ANI + FeCl ₃ + CSA	×
Py + FeCl ₃ + CSA	×	ANI + H ₂ O ₂ + HCl	$3,3 \times 10^6$
Py + H ₂ O ₂ + HCl	×	ANI + H ₂ O ₂ + SA	$2,4 \times 10^6$
Py + H ₂ O ₂ + SA	×	ANI + H ₂ O ₂ + CSA	$3,8 \times 10^6$
Py + H ₂ O ₂ + CSA	×	N-PPDA + H ₂ O ₂ + HCl	$12,7 \times 10^6$
		N-PPDA + H ₂ O ₂ + SA	$12,8 \times 10^6$
		N-PPDA + H ₂ O ₂ + CSA	×

Legenda: × – Não mensurável

As amostras que possuíam valores mensuráveis de resistividade de superfície foram escolhidas para os testes de citotoxicidade. Esses testes permitem compreender se a amostra liberta substâncias tóxicas ou altera substancialmente o meio, o que pode desencadear a morte celular. Os resultados do teste de citotoxicidade encontram-se apresentados na figura 15. Considera-se o controlo negativo o controlo com 100% de viabilidade celular e o controlo positivo em que as células se encontram mortas (20% de DMSO).

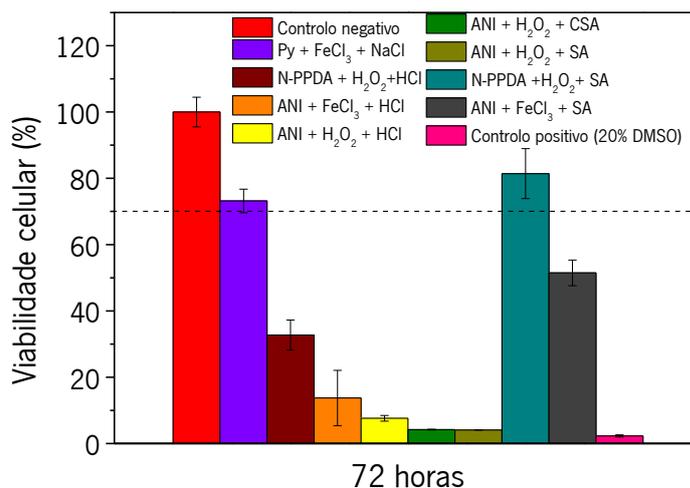


Figura 15 - Viabilidade celular das diferentes amostras de PVDF revestidas após 72 horas.

De acordo com a ISO 10993-5 são consideradas amostras não citotóxicas, as amostras que apresentam uma viabilidade celular acima de 70%. Sendo assim, as amostras que preencheram os requisitos de condutividade e ao mesmo tempo não foram consideradas citotóxicas foram: o PVDF revestido com PPy tendo o FeCl₃ como agente oxidante e o NaCl como agente dopante, e o PVDF revestido com PANI a partir do N-PPDA tendo o H₂O₂ como agente oxidante e o SA como agente dopante. Estas duas amostras foram escolhidas para testes de caracterização mais aprofundados e foram avaliadas a sua morfologia, hidrofobicidade e propriedades mecânicas.

4.2.2 MORFOLOGIA E HIDROFOBICIDADE DAS AMOSTRAS

As fibras revestidas com polímero condutor foram observadas através da técnica de SEM para serem retiradas ilações de como ocorria a deposição de polímero condutor nas fibras e se havia alterações significativas na sua morfologia. Como se pode analisar pela figura 16 é possível

observar que as fibras de PVDF revestidas com Ppy (figura 16 A) e com PANI (figura 16 B) possuem uma camada em volta das fibras mais rugosa comparativamente às fibras sem revestimento. Para verificar que existe um revestimento em volta das fibras individualmente foi medido o diâmetro médio de cada. As fibras revestidas com Ppy possuíam um diâmetro de 802 ± 103 nm enquanto as fibras revestidas com PANI possuíam um diâmetro de 849 ± 129 nm, verificando-se um aumento do tamanho do diâmetro médio comparativamente às fibras sem revestimento.

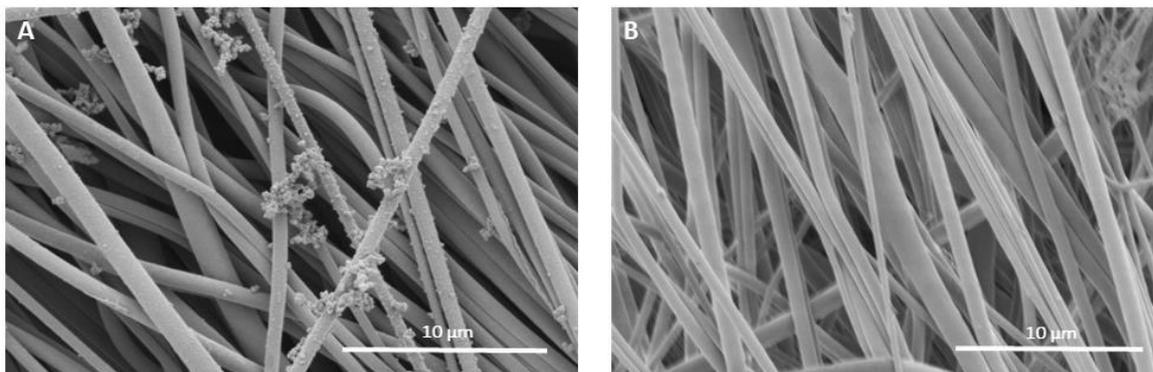


Figura 16 - SEM das fibras de PVDF revestida com A) Ppy e B) PANI.

O comportamento hidrofóbico das fibras revestidas foi avaliado pela medição de ângulos de contacto de forma a averiguar se houve alterações relativamente às fibras sem revestimento. Os valores dos ângulos de contacto (tabela 6) indicam que não houve uma alteração significativa entre as amostras revestidas com Ppy. Contudo, as fibras recobertas com PANI tornaram-se extremamente hidrofílicas sendo impossível realizar a medição de ângulo de contacto, pois a fibra era completamente permeável à água. Como foi acima referido, a medição de ângulos de contacto de fibras só pode ser feita qualitativamente e não quantitativamente. No entanto, pode-se considerar que as fibras revestidas com PPy são hidrofóbicas e as fibras revestidas com PANI hidrofílicas.

Tabela 6 - Ângulos de contacto das fibras de PVDF O revestidas com polímero condutor.

	Média de ângulos de contacto
PVDF O + Py + FeCl ₃ + NaCl	$142,3 \pm 9,0^\circ$
PVDF NO + Py + FeCl ₃ + NaCl	$139,3 \pm 5,5^\circ$
PVDF O + N-PPDA + H ₂ O ₂ + SA	Não calculável

4.2.3 COMPORTAMENTO MECÂNICO DAS FIBRAS REVESTIDAS DE PVDF

O comportamento mecânico das fibras revestidas foi investigado para averiguar se o revestimento com o polímero condutor prejudica ou reforça a estrutura. Foram apenas estudadas as fibras 0_0° visto que nesta direção é que as fibras possuem um módulo de Young maior e suportam uma maior tensão. Os resultados encontram-se representados na tabela 7.

Tabela 7 - Módulos de Young das fibras revestidas com diferentes polímeros condutores.

	Módulo de Young (MPa)
PVDF 0_0°	225 ± 16
PVDF 0_0° + Py + FeCl ₃ + NaCl	140 ± 3
PVDF 0_0° + N-PPDA + H ₂ O ₂ + SA	56 ± 8

As fibras revestidas com polímero condutor têm as suas propriedades mecânicas alteradas. Comparando os módulos de Young, verifica-se que as fibras reduzem a sua capacidade elástica em relação ao PVDF sem revestimento estirado na mesma direção. As fibras revestidas com Ppy reduzem para menos de metade o módulo de Young, enquanto as fibras revestidas com PANI diminuem mais do triplo para o mesmo parâmetro. Ou seja, verifica-se que há uma alteração das propriedades das fibras, e essa é superior nas fibras revestidas com N-PPDA do que as revestidas com Ppy, pois são menos resistentes sob tensões elevadas e mais frágeis ao estiramento. Por esta razão, os estudos eletromecânicos só foram realizados com as fibras revestidas com Ppy pois estão menos alteradas pela deposição do polímero condutor além de possuírem uma maior condutividade.

4.2.4 COMPORTAMENTO ELETROMECAÂNICO DAS FIBRAS REVESTIDAS DE PVDF

O estudo do comportamento eletromecânico de um material permite estudar como a resistência elétrica varia quando as fibras são submetidas a ciclos de carga-descarga (figura 17 A) e determinar o valor do *Gauge Factor* em cada ciclo de carga-descarga (figura 17 B).

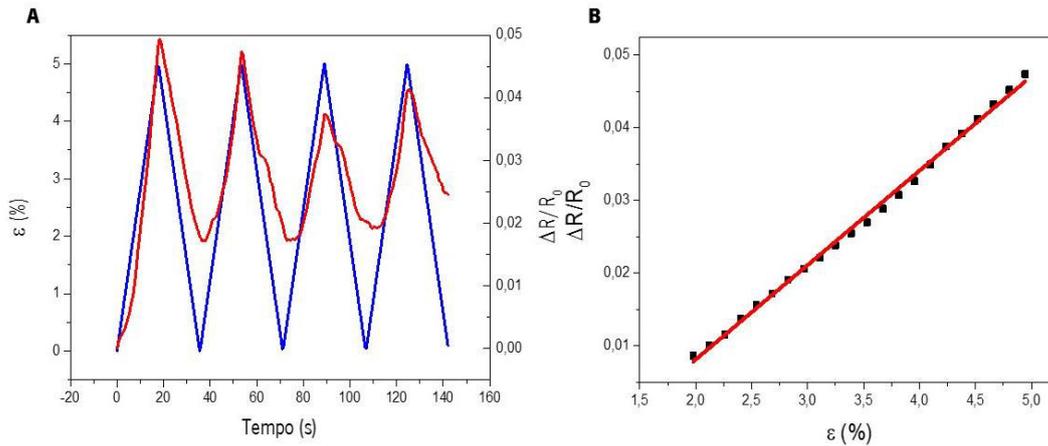


Figura 17 - A - Medições eletromecânicas das fibras de PVDF O revestidas com PPy com uma pré-deformação de 10% e com um ciclo de 5% de deformação; e B – Variação relativa da resistência elétrica com a deformação aplicada.

Após a análise dos gráficos, observa-se que a resistência acompanha a deformação das fibras, ou seja, ela aumenta linearmente com o aumento do estiramento e diminui quando as fibras relaxam. Verifica-se que, após o primeiro ciclo, a variação da resistência torna-se menor, pois o material pode já não retornar ao seu estado inicial (alguma deformação plástica é aplicada para estas deformações). Através da variação relativa da resistência com a deformação aplicada (figura 17 B) é possível calcular o *Gauge Factor*. Este valor indica a sensibilidade eletromecânica da amostra e apresenta um valor médio para todos os ciclos de $\approx 0,59 \pm 0,19$. O comportamento linear demonstra que esta amostra poderá ser estudada como sensor eletromecânico [100].

4.2.5 PROLIFERAÇÃO CELULAR DAS FIBRAS REVESTIDAS DE PVDF

O estudo da proliferação celular foi realizado nas amostras de PVDF O e NO com e sem revestimento com PPy dopadas com NaCl (figura 18).

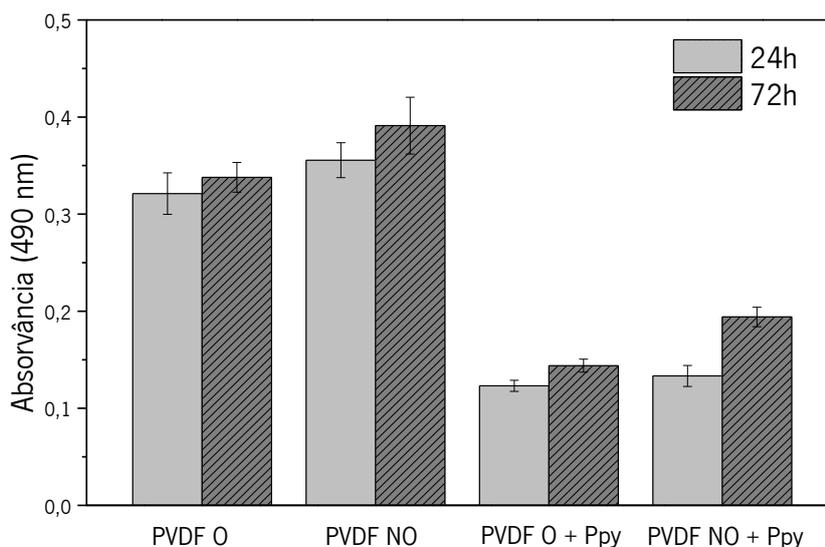


Figura 18 - Avaliação da proliferação celular às 24 h e 72 h das amostras de PVDF O e NO com e sem revestimento de Ppy.

A proliferação celular foi avaliada através do ensaio com MTS. Pelo gráfico da figura 18, é possível comprovar que a taxa de proliferação aumentou em todas as fibras após 72 horas. A diferença verificada nos valores de absorvância entre as fibras com revestimento e as fibras sem revestimento pode dever-se a uma diminuição da adesão celular às amostras. Existem várias razões apontadas para a diminuição da adesão: as condições de síntese e do dopante que podem alterar quimicamente a superfície, as células utilizadas ou a topografia do material que se encontra modificada [101].

Ao analisar os resultados de caracterização, as hipóteses mais prováveis são a mudança da topografia da amostra que pode influenciar as propriedades do material, como a hidrofobicidade e a rugosidade ou alguma alteração química que pode fazer com que as proteínas existentes no meio não adsorbem à amostra e, conseqüentemente, que haja uma menor taxa de adesão celular à amostra. Lakard *et al.* obteve resultados semelhantes, em que verificou uma menor proliferação celular nos filmes de Ppy comparativamente a outros polímeros [102]. Gilmore *et al.* produziu diferentes filmes de Ppy dopados com diferentes compostos da MEC e observou que a rugosidade e conseqüentemente, a hidrofobicidade tinha um papel importante na adesão e proliferação celular de mioblastos, observando-se uma menor adesão celular em compostos mais rugosos [103].

Verifica-se que as fibras de PVDF NO revestidas com Ppy cresceram mais que nas fibras O revestidas com Ppy, o que pode ser explicado pela diferença do diâmetro das fibras. As fibras de PVDF NO com Ppy possuem um diâmetro de 1047 ± 180 nm enquanto as fibras de PVDF O

revestidas possuem um diâmetro de 802 ± 103 nm. Segundo alguns estudos da literatura, um maior diâmetro nas fibras pode levar a uma maior proliferação celular ao permitir a infiltração celular e assim a formação de tecido, enquanto tamanhos menores podem impedir a ocorrência deste fenômeno [104].

Contudo, estes resultados permitem concluir que as fibras de PVDF revestidas com Ppy promovem a proliferação celular, no entanto, as células aderem menos que nas fibras de PVDF sem revestimento.

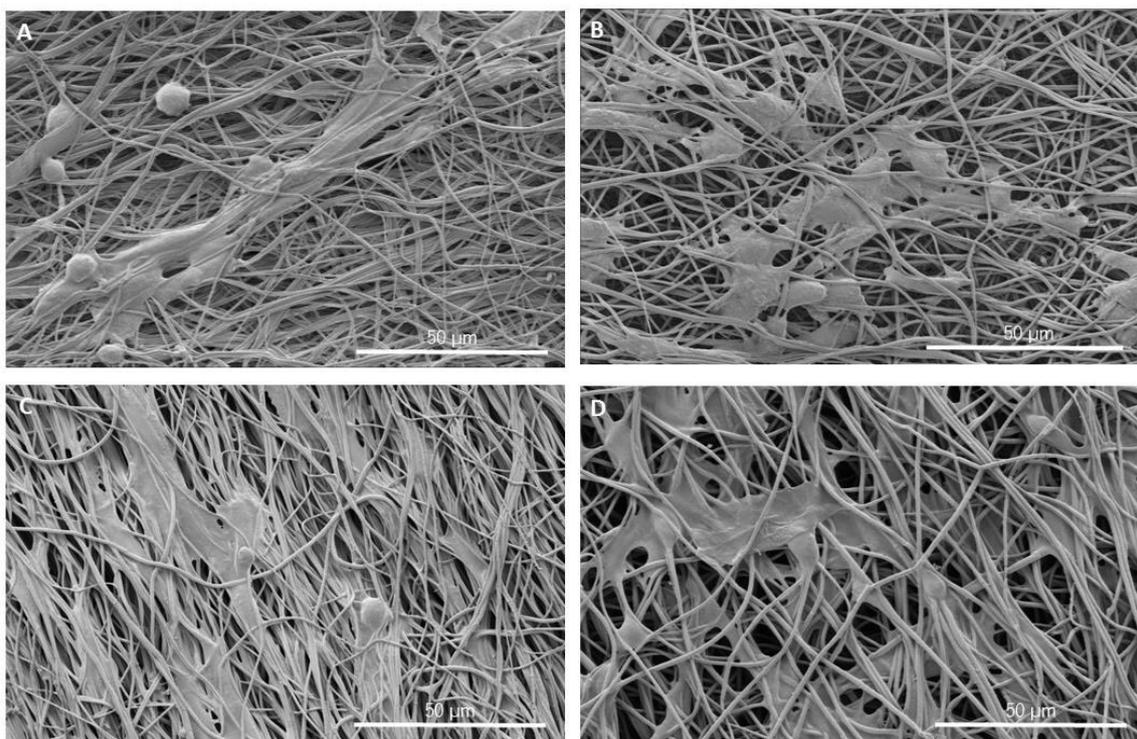


Figura 19 - Morfologia das células C2C12 semeadas nas diferentes amostras de PVDF após 3 dias de cultivo celular: A - O sem revestimento, B - NO sem revestimento, C - O revestidas com Ppy e D - NO revestidas com Ppy.

Na figura 19 é possível observar a morfologia celular após 3 dias e confirmar, em conjunto com os resultados apresentados na figura 18, que as células aderiram e proliferaram em todas as amostras. Na figura 19 A e 19 C, as fibras O sem e com revestimento respectivamente, é possível ver que as células começaram a alongar-se ao longo da direção das fibras. Já nas figuras 19 B e 19 D, fibras NO sem e com revestimento de Ppy respectivamente, apesar de existir proliferação as células não adquirem nenhuma orientação definida espalhando-se sobre as fibras. Este tipo de células tem tendência a orientar-se ao longo das fibras como já visto na literatura [12].

CAPÍTULO V: CONCLUSÕES E TRABALHO FUTURO

5.1 CONCLUSÕES

A Engenharia de tecidos é uma área em crescimento e que nas próximas décadas se tornará uma das maiores áreas em expansão na ciência com vista a diminuir as necessidades de órgãos e tecidos para substituição na saúde e aplicada indiretamente na descoberta e desenvolvimento de curas menos prejudiciais ao ser humano e no conhecimento do ser humano.

A utilização de polímeros permite avanços maiores na construção de *scaffolds* não só pela sua fácil manipulação, mas também à diversidade.

É importante ter a máxima que a estrutura produzida tem de mimetizar o mais possível o ambiente encontrado no organismo humano e oferecer as mesmas condições estimulantes que o ambiente celular. A piezoelectricidade e a condutividade surgem como duas propriedades importantes a considerar pois os estímulos mecânicos e elétricos são fundamentais para células ósseas, musculares e nervosas.

O PVDF é um dos materiais com maior coeficiente piezoelétrico e permite utilizar este material para estudar esta propriedade na entrega de estímulos elétricos e mecânicos nas células. Contudo, este material contém uma baixa condutividade e com vista a aumentar as suas propriedades elétricas depositou-se um polímero condutor que permite controlar o estímulo elétrico dado.

A produção de fibras por *electrospinning* permitiu a produção de fibras orientadas O e NO. A caracterização das fibras puras de PVDF a nível das suas propriedades mecânicas permitiu descobrir um comportamento anisotrópico em relação à aplicação de uma tensão numa determinada direção das fibras orientadas. Esta descoberta é útil aquando da utilização destas fibras em diferentes aplicações em que seja necessário estimular mecanicamente as fibras.

Diversos processos de deposição de polímeros condutores foram realizados e diferentes amostras obtiveram valores de resistividade elétrica da superfície baixos, o que revela um aumento da condutividade das amostras. Contudo, nem todos os processos de revestimento de polímero condutor permitem a sua aplicação em engenharia de tecidos devido à sua toxicidade. Duas amostras permitiram continuar os testes de caracterização, uma amostra revestida com Ppy e outra com PANI, que possuíam a biocompatibilidade e condutividade necessárias à continuação do trabalho.

Estas amostras foram caracterizadas morfologicamente e apresentaram um revestimento uniforme em volta das fibras enquanto a nível mecânico verificou-se uma diminuição das suas propriedades mecânicas em ambas as amostras, mas com maior acentuação nas fibras de PANI.

Por essa razão, os testes eletromecânicos e de proliferação celular foram realizados apenas nas fibras revestidas com Ppy. Em relação aos testes eletromecânicos, estes demonstraram que as fibras possuem um comportamento piezoresistivo, ou seja, com o aumento da deformação existe um aumento da resistência elétrica que diminuiu quando a fibra relaxa.

Os testes de proliferação indicam que apesar desta ocorrer nas amostras revestidas com Ppy, a adesão é menor que nas fibras de PVDF sem revestimento. Através das imagens obtidas por SEM consegue-se observar que nas fibras O as células seguem a direção das fibras contrariamente ao que acontece nas fibras NO.

5.2 TRABALHO FUTURO

Esta dissertação abriu novas possibilidades de investigação de polímeros inteligentes e a sua utilização conjunta.

Um próximo passo será testar estas amostras num bioreator e estimulá-las elétrica, mecânica e eletromecanicamente com células e perceber como os diferentes estímulos afetam o material e, por conseguinte, se permitem uma melhoria na proliferação e diferenciação celular.

Poderão ser produzidas novos materiais através de outros métodos, como por exemplo, *blending*, eletrodeposição ou através da alteração dos reagentes da reação.

BIBLIOGRAFIA

- [1] J.P. Vacanti, C.A. Vacanti, Chapter 1 - The History and Scope of Tissue Engineering, Principles of Tissue Engineering (Fourth Edition), Academic Press, Boston, 2014, pp. 3-8.
- [2] Y. Shimazono, The state of the international organ trade: a provisional picture based on integration of available information, Bulletin of the World Health Organization 85(12) (2007) 955-962.
- [3] J.H. Helderma, S. Goral, Gastrointestinal complications of transplant immunosuppression, Journal of the American Society of Nephrology : JASN 13(1) (2002) 277-87.
- [4] R. Langer, J. Vacanti, Tissue engineering, Science 260(5110) (1993) 920-926.
- [5] B.D. MacArthur, R.O.C. Oreffo, Chapter 3 - From Mathematical Models to Clinical Reality A2 - Lanza, Robert, in: R. Langer, J. Vacanti (Eds.), Principles of Tissue Engineering (Fourth Edition), Academic Press, Boston, 2014, pp. 25-39.
- [6] D. Howard, L.D. Buttery, K.M. Shakesheff, S.J. Roberts, Tissue engineering: strategies, stem cells and scaffolds, Journal of anatomy 213(1) (2008) 66-72.
- [7] F.J. O'Brien, Biomaterials & scaffolds for tissue engineering, Materials Today 14(3) (2011) 88-95.
- [8] A. Raya-Rivera, D.R. Esquiliano, J.J. Yoo, E. Lopez-Bayghen, S. Soker, A. Atala, Tissue-engineered autologous urethras for patients who need reconstruction: an observational study, The Lancet 377(9772) (2011) 1175-1182.
- [9] H. Naderi, M.M. Matin, A.R. Bahrami, Review paper: critical issues in tissue engineering: biomaterials, cell sources, angiogenesis, and drug delivery systems, Journal of biomaterials applications 26(4) (2011) 383-417.
- [10] G.P. Chen, T. Ushida, T. Tateishi, Scaffold design for tissue engineering, Macromolecular Bioscience 2(2) (2002) 67-77.
- [11] A.J. Salgado, O.P. Coutinho, R.L. Reis, Bone tissue engineering: state of the art and future trends, Macromolecular bioscience 4(8) (2004) 743-65.
- [12] C. Ribeiro, D.M. Correia, S. Ribeiro, V. Sencadas, G. Botelho, S. Lanceros-Méndez, Piezoelectric poly(vinylidene fluoride) microstructure and poling state in active tissue engineering, Engineering in Life Sciences 15(4) (2015) 351-356.
- [13] C. Ribeiro, V. Sencadas, J.L.G. Ribelles, S. Lanceros-Méndez, Influence of Processing Conditions on Polymorphism and Nanofiber Morphology of Electroactive Poly(vinylidene fluoride) Electrospun Membranes, Soft Materials 8(3) (2010) 274-287.
- [14] S. Tarafder, V.K. Balla, N.M. Davies, A. Bandyopadhyay, S. Bose, Microwave-sintered 3D printed tricalcium phosphate scaffolds for bone tissue engineering, Journal of tissue engineering and regenerative medicine 7(8) (2013) 631-41.
- [15] R.M. Nerem, S.C. Schutte, Chapter 2 - The Challenge of Imitating Nature, Principles of Tissue Engineering (Fourth Edition), Academic Press, Boston, 2014, pp. 9-24.
- [16] A. Samadikuchaksaraei, S. Lecht, P.I. Lelkes, A. Mantalaris, J.M. Polak, Chapter 4 - Stem Cells as Building Blocks A2 - Lanza, Robert, in: R. Langer, J. Vacanti (Eds.), Principles of Tissue Engineering (Fourth Edition), Academic Press, Boston, 2014, pp. 41-55.
- [17] J.J. de Damborenea, M.A. Larosa, M.A. Arenas, J.M. Hernández-López, A.L. Jardini, M.C.F. Ierardi, C.A.C. Zavaglia, R.M. Filho, A. Conde, Functionalization of Ti6Al4V scaffolds produced by direct metal laser for biomedical applications, Materials & Design 83 (2015) 6-13.
- [18] J.P. Li, P. Habibovic, M. van den Doel, C.E. Wilson, J.R. de Wijn, C.A. van Blitterswijk, K. de Groot, Bone ingrowth in porous titanium implants produced by 3D fiber deposition, Biomaterials 28(18) (2007) 2810-20.
- [19] S. Wu, X. Liu, T. Hu, P.K. Chu, J.P. Ho, Y.L. Chan, K.W. Yeung, C.L. Chu, T.F. Hung, K.F. Huo, C.Y. Chung, W.W. Lu, K.M. Cheung, K.D. Luk, A biomimetic hierarchical scaffold: natural growth of nanotitanates on three-dimensional microporous Ti-based metals, Nano Lett 8(11) (2008) 3803-8.
- [20] D. Müller, J.S. Mandelli, J.A. Marins, B.G. Soares, L.M. Porto, C.R. Rambo, G.M.O. Barra, Electrically conducting nanocomposites: preparation and properties of polyaniline (PAni)-coated bacterial cellulose nanofibers (BC), Cellulose 19(5) (2012) 1645-1654.

- [21] I. Tognarini, S. Sorace, R. Zonefrati, G. Galli, A. Gozzini, S. Carbonell Sala, G.D. Thyrión, A.M. Carossino, A. Tanini, C. Mavilia, C. Azzari, F. Sbaiz, A. Facchini, R. Capanna, M.L. Brandi, In vitro differentiation of human mesenchymal stem cells on Ti6Al4V surfaces, *Biomaterials* 29(7) (2008) 809-24.
- [22] J.P. St-Pierre, M. Gauthier, L.P. Lefebvre, M. Tabrizian, Three-dimensional growth of differentiating MC3T3-E1 pre-osteoblasts on porous titanium scaffolds, *Biomaterials* 26(35) (2005) 7319-28.
- [23] L.L. Hench, Bioceramics - from Concept to Clinic, *Journal of the American Ceramic Society* 74(7) (1991) 1487-1510.
- [24] C. Vitale-Brovarone, E. Verne, L. Robiglio, P. Appendino, F. Bassi, G. Martinasso, G. Muzio, R. Canuto, Development of glass-ceramic scaffolds for bone tissue engineering: characterisation, proliferation of human osteoblasts and nodule formation, *Acta biomaterialia* 3(2) (2007) 199-208.
- [25] L. Chen, D. Zhai, C. Wu, J. Chang, Poly(d, l-lactic)-reinforced akermanite bioceramic scaffolds: Preparation and characterization, *Ceramics International* 40(8) (2014) 12765-12775.
- [26] S.C. Cox, J.A. Thornby, G.J. Gibbons, M.A. Williams, K.K. Mallick, 3D printing of porous hydroxyapatite scaffolds intended for use in bone tissue engineering applications, *Materials science & engineering. C, Materials for biological applications* 47 (2015) 237-47.
- [27] A. Bakopoulou, E. Papachristou, M. Bousnaki, C. Hadjichristou, E. Kontonasaki, A. Theocharidou, L. Papadopoulou, N. Kantiranis, G. Zachariadis, G. Leyhausen, W. Geurtsen, P. Koidis, Human treated dentin matrices combined with Zn-doped, Mg-based bioceramic scaffolds and human dental pulp stem cells towards targeted dentin regeneration, *Dental materials : official publication of the Academy of Dental Materials* 32(8) (2016) e159-75.
- [28] C. Ribeiro, V. Sencadas, D.M. Correia, S. Lanceros-Mendez, Piezoelectric polymers as biomaterials for tissue engineering applications, *Colloids and surfaces. B, Biointerfaces* 136 (2015) 46-55.
- [29] H.R. Hoogenkamp, M.W. Pot, T.G. Hafmans, D.M. Tiemessen, Y. Sun, E. Oosterwijk, W.F. Feitz, W.F. Daamen, T.H. van Kuppevelt, Scaffolds for whole organ tissue engineering: Construction and in vitro evaluation of a seamless, spherical and hollow collagen bladder construct with appendices, *Acta biomaterialia* 43 (2016) 112-21.
- [30] A. Salerno, M. Fernández-Gutiérrez, J. San Román del Barrio, C. Domingo, Bio-safe fabrication of PLA scaffolds for bone tissue engineering by combining phase separation, porogen leaching and scCO₂ drying, *The Journal of Supercritical Fluids* 97 (2015) 238-246.
- [31] V.J. Mkhabela, S.S. Ray, Fabrication of polylactide nanocomposite scaffolds for bone tissue engineering applications, *AIP Conference Proceedings* 1664(1) (2015) 070009.
- [32] H.-Y. Mi, M.R. Salick, X. Jing, B.R. Jacques, W.C. Crone, X.-F. Peng, L.-S. Turng, Characterization of thermoplastic polyurethane/polylactic acid (TPU/PLA) tissue engineering scaffolds fabricated by microcellular injection molding, *Materials Science and Engineering: C* 33(8) (2013) 4767-4776.
- [33] D. Ronca, F. Langella, M. Chierchia, U. D'Amora, T. Russo, M. Domingos, A. Gloria, P. Bartolo, L. Ambrosio, Bone Tissue Engineering: 3D PCL-based Nanocomposite Scaffolds with Tailored Properties, *Procedia CIRP* 49 (2016) 51-54.
- [34] J.E. Kim, J.B. Lee, W.J. Lee, D.N. Heo, M.S. Bae, S.A. Park, W. Kim, S. In Jeong, Y.-M. Yim, I.K. Kwon, Development of poly(ϵ -caprolactone) scaffold loaded with simvastatin and beta-cyclodextrin modified hydroxyapatite inclusion complex for bone tissue engineering, *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine* 12(2) 496-497.
- [35] B.M. Bailey, R. Fei, D. Munoz-Pinto, M.S. Hahn, M.A. Grunlan, PDMS(star)-PEG hydrogels prepared via solvent-induced phase separation (SIPS) and their potential utility as tissue engineering scaffolds, *Acta biomaterialia* 8(12) (2012) 4324-33.
- [36] K.R. Stevens, J.S. Miller, B.L. Blakely, C.S. Chen, S.N. Bhatia, Degradable hydrogels derived from PEG-diacrylamide for hepatic tissue engineering, *Journal of Biomedical Materials Research Part A* 103(10) (2015) 3331-3338.
- [37] B.V. Sridhar, J.L. Brock, J.S. Silver, J.L. Leight, M.A. Randolph, K.S. Anseth, Tissue Engineering: Development of a Cellularly Degradable PEG Hydrogel to Promote Articular Cartilage Extracellular Matrix Deposition (*Adv. Healthcare Mater.* 5/2015), *Advanced healthcare materials* 4(5) (2015) 635-635.

- [38] S. Kim, J.H. Kim, O. Jeon, I.C. Kwon, K. Park, Engineered polymers for advanced drug delivery, *European journal of pharmaceutics and biopharmaceutics : official journal of Arbeitsgemeinschaft fur Pharmazeutische Verfahrenstechnik e.V* 71(3) (2009) 420-30.
- [39] B. Jeong, A. Gutowska, Lessons from nature: stimuli-responsive polymers and their biomedical applications, *Trends in Biotechnology* 20(7) (2002) 305-311.
- [40] Y. Bar-Cohen, Y. Bar-Cohen, EAP as artificial muscles: progress and challenges, 5385 (2004) 10.
- [41] E. Fukada, I. Yasuda, On the Piezoelectric Effect of Bone, *J Phys Soc Jpn* 12(10) (1957) 1158-1162.
- [42] A. Marino, R.O. Becker, Piezoelectric effect and growth control in bone, *Nature* 228(5270) (1970) 473-4.
- [43] W.S. Williams, L. Breger, Piezoelectricity in tendon and bone, *J Biomech* 8(6) (1975) 407-13.
- [44] J.C. Goes, S.D. Figueiro, J.A.C. de Paiva, I.F. de Vasconcelos, A.S.B. Sombra, On the piezoelectricity of anionic collagen films, *J Phys Chem Solids* 63(3) (2002) 465-470.
- [45] A.A. Marino, B.D. Gross, Piezoelectricity in cementum, dentine and bone, *Archives of Oral Biology* 34(7) (1989) 507-509.
- [46] M.M. Schwartz, *Encyclopedia of smart materials*, J. Wiley 2002.
- [47] Y. Ikada, Y. Shikinami, Y. Hara, M. Tagawa, E. Fukada, Enhancement of bone formation by drawn poly(L-lactide), *J Biomed Mater Res* 30(4) (1996) 553-8.
- [48] E. Fukada, Y. Ando, Piezoelectric properties of poly- β -hydroxybutyrate and copolymers of β -hydroxybutyrate and β -hydroxyvalerate, *International Journal of Biological Macromolecules* 8(6) (1986) 361-366.
- [49] H. Kawai, The Piezoelectricity of Poly (vinylidene Fluoride), *Japanese Journal of Applied Physics* 8(7) (1969) 975-976.
- [50] C. Ribeiro, V. Sencadas, J.L.G. Ribelles, S. Lanceros-Mendez, Influence of Processing Conditions on Polymorphism and Nanofiber Morphology of Electroactive Poly(vinylidene fluoride) Electrospun Membranes, *Soft Materials* 8(3) (2010) 274-287.
- [51] C. Ribeiro, S. Moreira, V. Correia, V. Sencadas, J.G. Rocha, F.M. Gama, J.L. Gómez Ribelles, S. Lanceros-Méndez, Enhanced proliferation of pre-osteoblastic cells by dynamic piezoelectric stimulation, *RSC Advances* 2(30) (2012) 11504.
- [52] N. Royo-Gascon, M. Wininger, J.I. Scheinbeim, B.L. Firestein, W. Craelius, Piezoelectric Substrates Promote Neurite Growth in Rat Spinal Cord Neurons, *Annals of biomedical engineering* 41(1) (2013) 112-122.
- [53] Y.-S. Lee, G. Collins, T. Livingston Arinzeh, Neurite extension of primary neurons on electrospun piezoelectric scaffolds, *Acta biomaterialia* 7(11) (2011) 3877-3886.
- [54] E.G. Fine, R.F. Valentini, R. Bellamkonda, P. Aebischer, Improved nerve regeneration through piezoelectric vinylidene fluoride-trifluoroethylene copolymer guidance channels, *Biomaterials* 12(8) (1991) 775-780.
- [55] P.M. Martins, S. Ribeiro, C. Ribeiro, V. Sencadas, A.C. Gomes, F.M. Gama, S. Lanceros-Méndez, Effect of poling state and morphology of piezoelectric poly(vinylidene fluoride) membranes for skeletal muscle tissue engineering, *RSC Advances* 3(39) (2013) 17938.
- [56] K.D. McKeon-Fischer, J.W. Freeman, Characterization of electrospun poly(L-lactide) and gold nanoparticle composite scaffolds for skeletal muscle tissue engineering, *Journal of tissue engineering and regenerative medicine* 5(7) (2011) 560-568.
- [57] T.J. Rivers, T.W. Hudson, C.E. Schmidt, Synthesis of a novel, biodegradable electrically conducting polymer for biomedical applications, *Advanced Functional Materials* 12(1) (2002) 33-37.
- [58] L. Ghasemi-Mobarakeh, M.P. Prabhakaran, M. Morshed, M.H. Nasr-Esfahani, H. Baharvand, S. Kiani, S.S. Al-Deyab, S. Ramakrishna, Application of conductive polymers, scaffolds and electrical stimulation for nerve tissue engineering, *Journal of tissue engineering and regenerative medicine* 5(4) (2011) e17-35.
- [59] R. Balint, N.J. Cassidy, S.H. Cartmell, Conductive polymers: towards a smart biomaterial for tissue engineering, *Acta biomaterialia* 10(6) (2014) 2341-53.
- [60] T.y.V. Vernitskaya, O.N. Efimov, Polypyrrole: a conducting polymer; its synthesis, properties and applications, *Russian Chemical Reviews* 66(5) (1997) 443-457.

- [61] A. Seyfoddin, A. Chan, W.T. Chen, I.D. Rupenthal, G.I. Waterhouse, D. Svirskis, Electro-responsive macroporous polypyrrole scaffolds for triggered dexamethasone delivery, *European journal of pharmaceuticals and biopharmaceutics : official journal of Arbeitsgemeinschaft fur Pharmazeutische Verfahrenstechnik e.V* 94 (2015) 419-26.
- [62] B.S. Spearman, A.J. Hodge, J.L. Porter, J.G. Hardy, Z.D. Davis, T. Xu, X. Zhang, C.E. Schmidt, M.C. Hamilton, E.A. Lipke, Conductive interpenetrating networks of polypyrrole and polycaprolactone encourage electrophysiological development of cardiac cells, *Acta biomaterialia* 28 (2015) 109-20.
- [63] V.B. Bueno, S.H. Takahashi, L.H. Catalani, S.I. de Torresi, D.F. Petri, Biocompatible xanthan/polypyrrole scaffolds for tissue engineering, *Materials science & engineering. C, Materials for biological applications* 52 (2015) 121-8.
- [64] J. Thunberg, T. Kalogeropoulos, V. Kuzmenko, D. Hägg, S. Johannesson, G. Westman, P. Gatenholm, In situ synthesis of conductive polypyrrole on electrospun cellulose nanofibers: scaffold for neural tissue engineering, *Cellulose* 22(3) (2015) 1459-1467.
- [65] A. Miodek, N. Mejri-Omrani, R. Khoder, H. Korri-Yousoufi, Electrochemical functionalization of polypyrrole through amine oxidation of poly(amidoamine) dendrimers: Application to DNA biosensor, *Talanta* 154 (2016) 446-454.
- [66] L. Tian, M.P. Prabhakaran, J. Hu, M. Chen, F. Besenbacher, S. Ramakrishna, Synergistic effect of topography, surface chemistry and conductivity of the electrospun nanofibrous scaffold on cellular response of PC12 cells, *Colloids and surfaces. B, Biointerfaces* 145 (2016) 420-9.
- [67] P. Humpolicek, V. Kasparkova, P. Saha, J. Stejskal, Biocompatibility of polyaniline, *Synthetic Metals* 162(7-8) (2012) 722-727.
- [68] E. Archibong, A. Foster, K. Caldwell, A. Lita, B. Mochona, N. Mateeva, Synthesis, characterization, and electrospinning of novel polyaniline-peptide polymers, *Applied Materials Today* 4 (2016) 78-82.
- [69] S.Y. Hong, Y.H. Lee, H. Park, S.W. Jin, Y.R. Jeong, J. Yun, I. You, G. Zi, J.S. Ha, Stretchable Active Matrix Temperature Sensor Array of Polyaniline Nanofibers for Electronic Skin, *Advanced materials* 28(5) (2016) 930-935.
- [70] G.F. Yu, X. Yan, M. Yu, M.Y. Jia, W. Pan, X.X. He, W.P. Han, Z.M. Zhang, L.M. Yu, Y.Z. Long, Patterned, highly stretchable and conductive nanofibrous PANI/PVDF strain sensors based on electrospinning and in situ polymerization, *Nanoscale* 8(5) (2016) 2944-50.
- [71] Z.B. Anna, B. Patrycja, J. Petr, E. Petrovsky, B. Pavel, H. Daniel, Magnetoconductive maghemite core/polyaniline shell nanoparticles: Physico-chemical and biological assessment, *Colloids and surfaces. B, Biointerfaces* 141 (2016) 382-9.
- [72] L. Zhang, Z. Zhang, P.A. Kilmartin, J. Travas-Sejdic, Hollow Polyaniline and Indomethacin Composite Microspheres for Controlled Indomethacin Release, *Macromolecular Chemistry and Physics* 212(24) (2011) 2674-2684.
- [73] P.R. Bidez, S. Li, A.G. MacDiarmid, E.C. Venancio, Y. Wei, P.I. Lelkes, Polyaniline, an electroactive polymer, supports adhesion and proliferation of cardiac myoblasts, *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition* 17(1-2) (2006) 199-212.
- [74] A. Borriello, V. Guarino, L. Schiavo, M.A. Alvarez-Perez, L. Ambrosio, Optimizing PANi doped electroactive substrates as patches for the regeneration of cardiac muscle, *Journal of materials science. Materials in medicine* 22(4) (2011) 1053-62.
- [75] D.K. Cullen, R.P. A, J.F. Doorish, D.H. Smith, B.J. Pfister, Developing a tissue-engineered neural-electrical relay using encapsulated neuronal constructs on conducting polymer fibers, *Journal of neural engineering* 5(4) (2008) 374-84.
- [76] M.A. Whitehead, D. Fan, G.R. Akkaraju, L.T. Canham, J.L. Coffey, Accelerated calcification in electrically conductive polymer composites comprised of poly(ϵ -caprolactone), polyaniline, and bioactive mesoporous silicon, *Journal of Biomedical Materials Research Part A* 83A(1) (2007) 225-234.
- [77] R. Goncalves, P. Martins, X. Moya, M. Ghidini, V. Sencadas, G. Botelho, N.D. Mathur, S. Lanceros-Mendez, Magnetolectric CoFe₂O₄/polyvinylidene fluoride electrospun nanofibres, *Nanoscale* 7(17) (2015) 8058-61.

- [78] V. Karagkiozaki, P.G. Karagiannidis, M. Gioti, P. Kavatzikidou, D. Georgiou, E. Georgaraki, S. Logothetidis, Bioelectronics meets nanomedicine for cardiovascular implants: PEDOT-based nanocoatings for tissue regeneration, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects* 1830(9) (2013) 4294-4304.
- [79] A. Laforgue, L. Robitaille, Deposition of Ultrathin Coatings of Polypyrrole and Poly(3,4-ethylenedioxythiophene) onto Electrospun Nanofibers Using a Vapor-Phase Polymerization Method, *Chemistry of Materials* 22(8) (2010) 2474-2480.
- [80] J.Y. Lee, C.A. Bashur, A.S. Goldstein, C.E. Schmidt, Polypyrrole-coated electrospun PLGA nanofibers for neural tissue applications, *Biomaterials* 30(26) (2009) 4325-35.
- [81] S. Aznar-Cervantes, M.I. Roca, J.G. Martinez, L. Meseguer-Olmo, J.L. Cenis, J.M. Moraleda, T.F. Otero, Fabrication of conductive electrospun silk fibroin scaffolds by coating with polypyrrole for biomedical applications, *Bioelectrochemistry* 85 (2012) 36-43.
- [82] M. Li, Y. Guo, Y. Wei, A.G. MacDiarmid, P.I. Lelkes, Electrospinning polyaniline-contained gelatin nanofibers for tissue engineering applications, *Biomaterials* 27(13) (2006) 2705-2715.
- [83] Z. Ma, M. Kotaki, R. Inai, S. Ramakrishna, Potential of nanofiber matrix as tissue-engineering scaffolds, *Tissue engineering* 11(1-2) (2005) 101-9.
- [84] T. Ondarçuhu, C. Joachim, Drawing a single nanofibre over hundreds of microns, *EPL (Europhysics Letters)* 42(2) (1998) 215.
- [85] C.R. Martin, Membrane-Based Synthesis of Nanomaterials, *Chemistry of Materials* 8(8) (1996) 1739-1746.
- [86] P.X. Ma, R. Zhang, Synthetic nano-scale fibrous extracellular matrix, *Journal of biomedical materials research* 46(1) (1999) 60-72.
- [87] G.M. Whitesides, B. Grzybowski, Self-assembly at all scales, *Science* 295(5564) (2002) 2418-2421.
- [88] F. Anton, Process and apparatus for preparing artificial threads, Google Patents, 1934.
- [89] J. Doshi, D.H. Reneker, Electrospinning process and applications of electrospun fibers, *Industry Applications Society Annual Meeting, 1993., Conference Record of the 1993 IEEE, 1993*, pp. 1698-1703 vol.3.
- [90] P. Martins, A.C. Lopes, S. Lanceros-Mendez, Electroactive phases of poly(vinylidene fluoride): Determination, processing and applications, *Progress in Polymer Science* 39(4) (2014) 683-706.
- [91] P. Gill, T.T. Moghadam, B. Ranjbar, Differential scanning calorimetry techniques: applications in biology and nanoscience, *J Biomol Tech* 21(4) (2010) 167-93.
- [92] J.S. Nunes, Electrical and Microstructural Changes of β -PVDF under Uniaxial Stress Studied by Scanning Force Microscopy.
- [93] S. Lanceros-Méndez, J.F. Mano, A.M. Costa, V.H. Schmidt, Ftir and Dsc Studies of Mechanically Deformed β -Pvdf Films, *Journal of Macromolecular Science, Part B* 40(3) (2001) 517-527.
- [94] J. Gerardo-Nava, T. Fuhrmann, K. Klinkhammer, N. Seiler, J. Mey, D. Klee, M. Moller, P.D. Dalton, G.A. Brook, Human neural cell interactions with orientated electrospun nanofibers in vitro, *Nanomedicine (Lond)* 4(1) (2009) 11-30.
- [95] Y. Liu, Y. Ji, K. Ghosh, R.A. Clark, L. Huang, M.H. Rafailovich, Effects of fiber orientation and diameter on the behavior of human dermal fibroblasts on electrospun PMMA scaffolds, *Journal of biomedical materials research. Part A* 90(4) (2009) 1092-106.
- [96] K. Sisson, C. Zhang, M.C. Farach-Carson, D.B. Chase, J.F. Rabolt, Fiber diameters control osteoblastic cell migration and differentiation in electrospun gelatin, *Journal of biomedical materials research. Part A* 94(4) (2010) 1312-20.
- [97] D.R. Nisbet, A.E. Rodda, D.I. Finkelstein, M.K. Horne, J.S. Forsythe, W. Shen, Surface and bulk characterisation of electrospun membranes: problems and improvements, *Colloids and surfaces. B, Biointerfaces* 71(1) (2009) 1-12.
- [98] S.J. Heo, N.L. Nerurkar, B.M. Baker, J.W. Shin, D.M. Elliott, R.L. Mauck, Fiber stretch and reorientation modulates mesenchymal stem cell morphology and fibrous gene expression on oriented nanofibrous microenvironments, *Annals of biomedical engineering* 39(11) (2011) 2780-90.
- [99] H.M. Pauly, D.J. Kelly, K.C. Popat, N.A. Trujillo, N.J. Dunne, H.O. McCarthy, T.L. Haut Donahue, Mechanical properties and cellular response of novel electrospun nanofibers for ligament tissue engineering:

Effects of orientation and geometry, *Journal of the mechanical behavior of biomedical materials* 61 (2016) 258-70.

[100] B.F. Gonçalves, P. Costa, J. Oliveira, S. Ribeiro, V. Correia, G. Botelho, S. Lanceros-Mendez, Green solvent approach for printable large deformation thermoplastic elastomer based piezoresistive sensors and their suitability for biomedical applications, *Journal of Polymer Science, Part B: Polymer Physics* 54(20) (2016) 2092-2103.

[101] D.D. Ateh, H.A. Navsaria, P. Vadgama, Polypyrrole-based conducting polymers and interactions with biological tissues, *Journal of The Royal Society Interface* 3(11) (2006) 741-752.

[102] S. Lakard, G. Herlem, A. Propper, A. Kastner, G. Michel, N. Valles-Villarreal, T. Gharbi, B. Fahys, Adhesion and proliferation of cells on new polymers modified biomaterials, *Bioelectrochemistry* 62(1) (2004) 19-27.

[103] K.J. Gilmore, M. Kita, Y. Han, A. Gelmi, M.J. Higgins, S.E. Moulton, G.M. Clark, R. Kapsa, G.G. Wallace, Skeletal muscle cell proliferation and differentiation on polypyrrole substrates doped with extracellular matrix components, *Biomaterials* 30(29) (2009) 5292-304.

[104] A.S. Badami, M.R. Kreke, M.S. Thompson, J.S. Riffle, A.S. Goldstein, Effect of fiber diameter on spreading, proliferation, and differentiation of osteoblastic cells on electrospun poly(lactic acid) substrates, *Biomaterials* 27(4) (2006) 596-606.