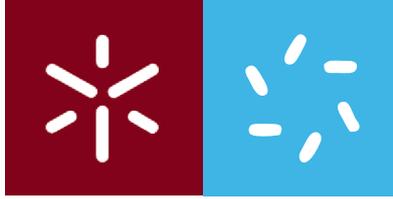


Universidade do Minho
Escola de Ciências

Luis Amaro Ribeiro Martins

Materiais Piezoelétricos Biodegradáveis para aplicações em Engenharia de Tecidos



Universidade do Minho
Escola de Ciências

Luís Amaro Ribeiro Martins

**Materiais Piezoelétricos Biodegradáveis
para aplicações em Engenharia de Tecidos**

Tese de Mestrado
Mestrado em Biofísica e Bionanossistemas

Trabalho efetuado sob a orientação da
**Professora Doutora Maria Gabriela Coutinho Soares
Lema Botelho**

e sob co-orientação da
Doutora Clarisse Marta de Oliveira Ribeiro

Declaração

Nome: Luís Amaro Ribeiro Martins

Endereço eletrónico: pg28881@alunos.uminho.pt

Título da Tese de Mestrado: Materiais Piezoelétricos Biodegradáveis para aplicações em Engenharia de Tecidos.

Orientador: Professora Doutora Maria Gabriela Coutinho Soares Lema Botelho e Doutora Clarisse Marta de Oliveira Ribeiro

Ano de conclusão: Fevereiro de 2018

Designação do mestrado: Dissertação de Mestrado em Biofísica e Bionanossistemas

É AUTORIZADA A REPRODUÇÃO INTEGRAL DESTA TESE/TRABALHO APENAS PARA EFEITOS DE INVESTIGAÇÃO, MEDIANTE DECLARAÇÃO ESCRITA DO INTERESSADO, QUE A TAL SE COMPROMETE;

Universidade do Minho, ___/___/_____

Assinatura: _____

Agradecimentos

Este trabalho resulta não só de esforço pessoal, mas também da contribuição de diversas pessoas sem o apoio e suportes das quais, nos mais diversos sentidos, não teria sido possível.

Quero inicialmente agradecer aos meus orientadores Doutora Clarisse Ribeiro e Professora Doutora Gabriela Botelho o voto de confiança em terem aceite a minha orientação e por todos os conhecimentos que me transmitiram ao longo deste processo, imprescindíveis para a sua conclusão.

Ao Professor Doutor Senentxu Lanceros-Méndez um agradecimento especial. Porque me abriu as portas do grupo e deu todas as oportunidades, mas o maior agradecimento pelas conversas, confiança e palavras amigas no momento certo.

Tenho também que dar um agradecimento especial à Doutora Daniela Correia não só pela orientação, mas também pelos valores humanos que me marcaram. Por maior que seja o agradecimento não fará jus a toda a sua dedicação e amizade.

Ao Doutor Alberto Maceiras pela orientação, acolhimento e bons momentos enquanto no País Vasco.

Quero também agradecer ao grupo ESM todo apoio e aconselhamento, tanto profissional como pessoal, foram fundamentais.

Não podia faltar o agradecimento a todas as pessoas da UPV e BCM pelo apoio durante a minha estadia e pelos conhecimentos transmitidos, mas acima de tudo, pela empatia, amizade, momentos e memórias.

Um obrigado a todos os meus amigos. A alguns pelos bons conselhos e água ultra-pura, a outros por me ouvirem mesmo sem fazerem ideia do que estava a dizer. A amizade e bons momentos foram fundamentais para ultrapassar este desafio.

Por fim o maior agradecimento para a família pois foi a peça maior importante em toda esta etapa com todo o seu apoio e suporte, como sempre...

Resumo

O poli(hidroxibutirato-co-hidroxivalerato), PHBV, é um biopolímero biodegradável, biocompatível e piezoelétrico características que fazem dele um material interessante para aplicações em engenharia de tecidos. A incorporação de partículas magnéticas, tais como ferrites de cobalto, na sua matriz permite a produção de materiais magnetoelétricos através do acoplamento entre os efeitos piezoelétrico do polímero e magnetostritivo das partículas. Quando utilizado na produção de suportes para engenharia de tecidos, este material possibilita a geração de potenciais elétricos através de solicitações mecânicas e/ou magnéticas, importantes no desenvolvimento de tecidos.

Dado que as características morfológicas dos *scaffolds* para engenharia de tecidos desempenham um papel muito relevante, em função do tipo de célula, os novos materiais compósitos foram processados sob diversas morfologias, incluído microesferas, fibras, filmes e *scaffolds* 3D.

A estrutura e características morfológicas das amostras processadas foram analisada por microscopia eletrônica. Realizaram-se análises das propriedades físico-químicas, térmicas e magnéticas dos compósitos em função da morfologia dos mesmos e a presença de nanopartículas magnetostritivas, não se tendo verificado alterações significativas das características do polímero.

A aplicabilidade foi também avaliada por meio de testes de citotoxicidade e degradação. O ensaio de citotoxicidade indireta revelou resultados positivos, não se verificando diminuição da viabilidade celular. A degradação foi avaliada pela imersão das amostras em fluido humano simulado à temperatura fisiológica, a perda de massa ao longo do processo foi monitorizada, indicando que as primeiras alterações significativas se verificaram entre as semanas 4 e 6.

Deste modo, foi concluído que os novos materiais magnetoelétricos formados a partir de PHBV e ferrites de cobalto, apresentam características apropriadas para serem aplicados em engenharia de tecidos.

Abstract

Poly(hydroxybutyrate-co-hydroxyvalerate), PHBV, it's a biodegradable biopolymer, biocompatible and piezoelectric, properties that make it an interesting material for tissue engineering applications. The incorporation of magnetic particles, like cobalt ferrites, in its matrix allows the production of magnetoelectric materials through coupling of the polymers piezoelectric and the particles magnetostrictive effects. When used to produce tissue engineering supports, this material allows the generation of electric potentials, important in tissue development, through mechanic or magnetic solicitation.

Since the morphological characteristics of tissue engineering scaffold's play an important role, according to the cell line, the new composite materials were processed under several morphologies, including microspheres, fibers, films and 3D scaffolds.

The structure and morphological characteristics of the processed samples were assayed through electron microscopy. Analysis of the physico-chemical, thermal and magnetic properties of the composites were performed according to their morphology and the presence of magnetostrictive nanoparticles, without record of meaningful alteration of polymer properties.

Applicability was also evaluated through cytotoxicity and degradation assays. An indirect cytotoxicity assay revealed positive results without notice of a decrease in cell viability. Degradation was evaluated through the sample's immersion in simulated body fluid at physiological temperature. The mass loss was monitored along the process, indicating that first significant changes were verified between weeks 4 and 6.

This way, it was concluded that the new magnetoelectric materials made from PHBV and cobalt ferrites possess suitable properties for tissue engineering applications.

Índice

Agradecimentos	iii
Resumo	v
Abstract	vii
Índice	ix
Índice de figuras	xiii
Índice de tabelas	xvii
Lista de abreviaturas e símbolos	xviii
Capítulo 1 - Introdução	1
1.1 Motivação	3
1.2 Objetivos do trabalho	4
1.3 Organização da tese	4
Capítulo 2 - Estado da Arte.....	7
2.1 Engenharia de tecidos.....	9
2.2 Biomateriais	10
2.3 Design de um <i>scaffold</i>	12

2.4 Polímeros inteligentes	13
2.5 Compósito magnetoelétricos	14
2.6 Piezoeletricidade	16
2.7 Piezoeletricidade no corpo humano	17
2.8 Trabalhos relevantes realizados com polímeros inteligentes	19
2.9 Poli(hidroxitirato-co-hidroxitirato)	22
2.9.1 Propriedades físico-químicas	23
2.9.2 Degradação.....	24
2.9.3 Propriedades térmicas.....	25
Capítulo 3 - Materiais e métodos	27
3.1 Materiais, reagentes e solventes	31
3.1.1 Material	31
3.1.2 Reagentes e solventes	31
3.2 Técnicas de processamento	32
3.2.1 Solvent casting.....	32
3.2.2 Solvent casting / Particulate leaching	34
3.2.3 Emulsão óleo-água	35
3.2.4 Eletrospinning	36
3.3 Técnicas de caracterização	39
3.3.1 Microscopia eletrônica de varrimento.....	40
3.3.2 Avaliação da molhabilidade	42
3.3.3 Espectroscopia infravermelho com transformada de Fourier - Refletância total atenuada	44
3.3.4 Calorimetria diferencial de varrimento.....	47

3.3.5 Termogravimetria analítica	49
3.3.6 Magnetometria de amostra vibratória.....	51
3.4 Ensaio de degradação	54
3.4.1 Preparação da solução SBF	55
3.4.2 Metodologia de degradação.....	56
3.5 Ensaio de citotoxicidade	56
3.5.1 Preparação dos meios e cultura celular	57
3.5.2 Metodologia de avaliação da citotoxicidade	57
Capítulo 4 - Resultados e discussão.....	59
4.1 Caracterização morfológica.....	55
4.1.1 Caracterização das microesferas	55
4.1.2 Caracterização dos filmes.....	56
4.1.3 Caracterização das fibras	58
4.1.4 Caracterização dos <i>scaffolds</i>	60
4.2 Avaliação da molhabilidade.....	62
4.3 Avaliação das propriedades físico-químicas	62
4.3.1 Espectroscopia de infravermelho	62
4.3.2 Calorimetria diferencial de varrimento.....	63
4.3.3 Termogravimetria analítica	65
4.3.4 Magnetometria de amostra vibratória.....	67
4.4 Estudo da degradação <i>in vitro</i>	69
4.5 Avaliação da citotoxicidade	71
Capítulo 5 - Conclusões	75

Capítulo 6 - Sugestões para trabalhos futuros	79
Capítulo 7 - Referências bibliográficas	83

Índice de figuras

Figura 2.1 – Ilustração das duas abordagens mais frequentes para reparação de tecidos in vivo em engenharia de tecidos, adaptado de [11].	10
Figura 2.2 – Diversas morfologias de matrizes e sua aplicação em engenharia de tecidos.	13
Figura 2.3 – Representação esquemática do efeito magnetostritivo.	14
Figura 2.4 – Acoplamento dos efeitos piezoelétrico e magnetostritivo em materiais magnetoelétricos.	15
Figura 2.5 – Disposição das partículas magnetostritivas num composto magnetoelétrico particulado, adaptado de [38].	16
Figura 2.6 – Efeito de stress mecânico na estrutura de um cristal piezoelétrico, adaptado de [43].	17
Figura 2.7 – Representação da localização dos tecidos onde sinais elétricos e piezoelétricos são mais relevantes.	19
Figura 2.8 – Estrutura química do PHBV, “x” e “y” representam as proporções de monómeros HB e HV respetivamente, adaptado de [82].	23
Figura 3.1 – Extensor utilizado na preparação dos filmes poliméricos.	30
Figura 3.2 – Esquematização do processamento de filmes por solvent casting.	31
Figura 3.3 – Esquematização do processamento de <i>scaffolds</i> por solvent casting/particulate leaching.	32
Figura 3.4 – Esquematização do processamento de microesferas por emulsão óleo-água.	33
Figura 3.5 – Esquematização do Setup de eletrospinning, adaptado de [98].	33
Figura 3.6 – Evolução do cone de Taylor com aumento da voltagem aplicada, adaptado de [102].	34
Figura 3.7 – Coletores utilizados durante o processamento de fibras por eletrospinning: A estático e B rotativo.	36
Figura 3.8 – Esquematização do processamento de fibras por eletrospinning.	36
Figura 3.9 – Esquematização dos componentes principais do SEM, adaptado de [104].	37
Figura 3.10 – Efeito da interação entre feixe de eletrões e amostra, adaptado de [104].	38
Figura 3.11 – Esquema representativo de um goniómetro telescópico, adaptado de [114].	39
Figura 3.12 – Representação de ângulo de contacto entre as interfaces sólida/líquida e líquida/gasosa, adaptado de [108].	40
Figura 3.13 – Ilustração da lei de Lambert-Beer, adaptado de [120].	41
Figura 3.14 – Representação dos vários mecanismos vibracionais, adaptado de [122].	42

Figura 3.15 – Espectro de absorção IV do PHBV, adaptado de [123].	42
Figura 3.16 – Esquema do aparelho de DSC, adaptado de [127]......	43
Figura 3.17 – Curva típica de DSC, adaptado de [131]......	44
Figura 3.18 – Esquema de um aparelho de TGA, adaptado de [136]......	46
Figura 3.19 – Termograma de PHBV, adaptado de [137].	46
Figura 3.20 – Esquema dos componentes do instrumento de VSM, adaptado de [139].	48
Figura 3.21 – Gráfico de uma curva de histerese, adaptado de [146].	48
Figura 4.1 – Imagem de SEM das microesferas de PHBV A - sem e C - com ferrites de cobalto; e respectivos histogramas da sua distribuição de tamanhos, B e D	56
Figura 4.2 – Imagem de SEM da A - superfície e B - corte transversal do filme de PHBV; e da C - superfície e D - corte transversal do filme de PHBV com ferrites de cobalto.	57
Figura 4.3 – Imagem de SEM das fibras: A - Fibras NO; C - Fibras O; E - Fibras NO Co e G - Fibras O Co, e respectivos histogramas da distribuição de diâmetros das fibras B , D , F e H . ..	59
Figura 4.4 – Imagem de SEM do corte transversal do A - Scaffold e C - Scaffold Co, e respectivos histogramas da distribuição de tamanhos dos poros, B e D	61
Figura 4.5 – Espectros de infravermelho das diferentes morfologias de PHBV com e sem Co: A - microesferas, B - filmes, C - fibras orientadas e não orientadas e D - <i>scaffolds</i>	63
Figura 4.6 – Termogramas obtidos para as diferentes morfologias de PHBV com e sem Co A - microesferas, B - filmes, C - fibras orientadas e não orientadas e D - <i>scaffolds</i>	64
Figura 4.7 – Curvas de perda de massa obtidas para as diferentes morfologias de PHBV com e sem ferrites A - Microesferas, B - Filmes, C - Fibras orientadas e não orientadas e D - <i>Scaffolds</i>	66
Figura 4.8 – Curva de magnetização das ferrites de cobalto puras.	68
Figura 4.9 – Curvas de histerese obtidas para as diferentes morfologias de PHBV com Co: A - microesferas, B - filme, C - fibras orientadas e não orientadas e D - <i>scaffolds</i>	68
Figura 4.10 – Gráfico de perda de massa das diversas morfologias em SBF, A – Filmes com e sem Co, B – Fibras com e sem Co e C – Scaffolds com e sem Co.	70
Figura 4.11 – Evolução das diversas morfologias durante o ensaio de degradação, A - Filme, B - Filme Co, C – Fibra NO, D – Fibra NO Co, E – Scaffold e F – Scaffold Co, os números representam o tempo (semanas) de exposição ao SBF.	71
Figura 4.12 – Ensaio de viabilidade celular com as células MC3T3-E1 após 24 e 72 h em contacto com meio exposto às diversas amostras.	72

Índice de tabelas

Tabela 2.1 – Exemplos de trabalhos relevantes realizados com polímeros piezoelétricos e compósitos magnetoelétricos.	21
Tabela 2.2 – Principais bandas de absorção IV do PHBV [83].	24
Tabela 2.3 – Propriedades térmicas do PHBV [23,86–88].	25
Tabela 3.1 – Reagentes utilizados na atividade experimental e características mais relevantes.	29
Tabela 3.2 – Propriedades do clorofórmio.	30
Tabela 3.3 – Parâmetros e efeitos do processo de eletrospinning [97,100].	35
Tabela 3.4 – Comparação das concentrações de vários íons presentes no plasma e em SBF [147].	49
Tabela 3.5 – Reagentes utilizados na preparação do SBF [147].	50
Tabela 4.1 – Abreviatura, composição, descrição e técnicas utilizadas no processamento dos diferentes materiais.	55
Tabela 4.2 – Ângulos de contacto medidos para as várias amostras (média ± desvio padrão).	62
Tabela 4.3 – Propriedades térmicas das diversas morfologias de PHBV.	65
Tabela 4.4 – Temperaturas e percentagem de massa perdida no processo de degradação térmica para as diferentes morfologias.	67
Tabela 4.5 – Magnetização e grandezas associadas para as diferentes morfologias de PHBV.	69

Lista de abreviaturas e símbolos

A - Absorvância

ATR - Refletância total atenuada

CF - Clorofórmio

D - Indução elétrica

ΔH_c - Entalpia de cristalização

ΔH_m - Entalpia de fusão

ΔH_m^e - Entalpia de fusão do polímero 100% cristalino

d_{ij} - Coeficiente piezoelétrico direto

DMEM - Meio de Eagle modificado por Dulbecco

DMSO - Dimetilsulfóxido

DSC - Calorimetria diferencial de varrimento

ϵ - Voltagem

E - Força do campo elétrico

EDX - Espectroscopia de raios X por dispersão de energia

e_{ij} - Coeficiente piezoelétrico indireto

Φ - Fluxo magnético

FBS - Serum fetal bovino

FTIR - Espectrometria infravermelho com transformadas de Fourier

γ_{lg} - Energia interfacial entre líquido e gasoso

γ_{sg} - Energia interfacial entre sólido e gasoso

γ_{sl} - Energia interfacial entre sólido e líquido

HA - Hidroxiapatite

HB - Hidroxibutirato

HV - Hidroxivalerato

I - Radiação absorvida

I_0 - Radiação incidente

IV - Infravermelho

MTT - Brometo de 3-(4,5-dimetiliazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio

PBS - Tampão fostato salino

PE - Poli(etileno)

PGA - Poli(ácido glicólico)
PGCL - Poli(ácido glicólico-co- ϵ -caprolactona)
PHA - Poli(hidroxiálcanoato)
PHB - Poli(hidroxi butirato)
PHBV - Poli(hidroxi butirato-co-hidroxi valerato)
PLA - Poli(ácido láctico)
PLGA - Poli(ácido láctico-co-glicólico)
PLLA - Poli(ácido-L-láctico)
PP - Poli(propileno)
PPC - Poli(propileno-carbonato)
PVA - Poli(álcool vinílico)
PVDF - Poli(fluoreto de vinilideno)
 θ - Ângulo de contacto
SBF - Solução de simulação de fluido corporal
SEM - Microscopia eletrónica de varrimento
VSM - Magnetometria de amostra vibratória

Capítulo 1

Introdução

Neste capítulo é feita inicialmente uma breve descrição do seu conteúdo. Seguidamente, é feita uma contextualização da problemática e temas no qual se insere, bem como o seu contributo científico. São posteriormente descritos os objetivos propostos para esta tese sendo por fim descrita a organização da mesma.

1.1 Motivação

A necessidade de órgãos e tecidos de substituição é um problema crescente. O aumento da esperança média de vida leva a que haja uma maior necessidade de órgãos de substituição. Todas as formas de previsão indicam que o desfasamento continuará a aumentar [1]. A taxa de mortalidade para pacientes em lista de espera para receber um órgão chega aos 25% em países do terceiro mundo. Alargando a estatística à escala global, e considerando todos os casos em que a substituição ou reparação de um órgão implica uma larga melhoria da qualidade de vida da população, a questão ganha um maior relevo [1].

Adicionalmente, a falha ou perda de um órgão é atualmente um dos mais dispendiosos e frequentes problemas dos serviços de saúde humana. É por isso esperado que o desenvolvimento de métodos para regeneração ou reconstrução de órgãos e tecidos humanos na sua totalidade, por meio de engenharia de tecidos, tenha uma influência importante em diversas especialidades médicas no futuro [2].

A engenharia de tecidos encarrega-se da criação artificial de órgãos e tecidos para futura implantação ou promoção da remodelação de tecidos de forma ativa. É reconhecida a interação entre fatores físicos e químicos no desenvolvimento, organização e expressão funcional de tecidos [3]. O sucesso das terapias de transplantação celular é dependente do desenvolvimento de substratos adequados para culturas de tecidos, tanto *in vitro* como *in vivo*, que possam providenciar simultaneamente um estímulo biofísico adequado e atuar como material de suporte físico [3]. A biodegradabilidade é uma característica importante para aplicação *in vivo*, uma vez que o *scaffold* deve ser progressivamente degradado dando lugar/ sendo substituído pelo novo tecido [4].

As matrizes são assim construídas recorrendo a polímeros inteligentes com o intuito de emular características bioativas da matriz nativa do tecido a ser formado, simulando o seu microambiente. Adicionalmente, estes podem ser processados sob diversas morfologias, permitindo a construção de matrizes com características morfológicas similares à matriz nativa ou em outros casos

adequadas à aplicação específica. Os polímeros inteligentes demonstram-se assim como um recurso valioso para aplicações em engenharia de tecidos [5,6].

1.2 Objetivos do trabalho

Os objetivos deste trabalho são:

- Processamento de Poli(hidroxibutirato-co-hidroxivalerato) (PHBV) e compósito (PHBV com adição de partículas magnéticas) sob diversas morfologias: microesferas, filmes, fibras orientadas e não orientadas e *scaffolds* 3D.
- Análise da morfologia, propriedades físico-químicas e magnéticas das diversas amostras produzidas, e avaliação da alteração das mesmas com o processamento assim como a quantificação de partículas magnéticas.
- Estudo da degradação das amostras produzidas, e consequente análise das alterações de massa e morfologia durante esse processo.
- Estudo da citotoxicidade das diversas morfologias produzidas.

1.3 Organização da tese

A tese está organizada em 6 capítulos: Introdução, Estado da arte, Materiais e métodos, Resultados e discussão, Conclusões e Sugestões para trabalhos futuros.

No primeiro capítulo, Introdução, é inicialmente descrita a motivação por de trás deste trabalho assim como a problemática na qual se enquadra e uma breve descrição da abordagem proposta.

O segundo capítulo é composto por uma pesquisa bibliográfica das áreas nas quais o trabalho se insere, como engenharia de tecidos, biomateriais, piezoelectricidade, polímeros inteligentes e por fim o polímero utilizado, o PHBV. O capítulo pretende deixar implícito o conceito biofísico subjacente ao trabalho bem como este se enquadra nas diversas áreas, resultando simultaneamente de uma conjugação de conceitos das mesmas.

O terceiro capítulo, materiais e métodos, apresenta as propriedades físico-químicas dos materiais e reagentes utilizados durante a parte experimental do trabalho. São também descritas as técnicas utilizadas para o processamento dos materiais bem como uma introdução/descrição à técnica de *electrospinning* uma vez que apresenta maior complexidade técnica. São descritas seguidamente as diversas metodologias utilizadas na análise dos materiais, SEM (do inglês “*Scanning Electron Microscopy*”), FTIR-ATR (do inglês “*Fourier Transformed Infrared Spectroscopy*” - “*Attenuated Total*

Reflectance”), DSC (do inglês “*Direct Scanning Calorimetry*”), TGA (do inglês “*Thermogravimetric Analysis*”) e VSM (do inglês “*Vibrating Sample Magnetometer*”), bem como o seu princípio de funcionamento e descrição dos instrumentos e parâmetros de análise utilizados. As metodologias relativas aos ensaios de degradação e citotoxicidade são descritas na parte final do capítulo.

No quarto capítulo são apresentados e analisados os resultados experimentais recolhidos através das técnicas descritas no capítulo anterior. Estes são discutidos ao longo do capítulo de forma paralela à apresentação e quando necessário comparados com a bibliografia.

O quinto capítulo consiste na apresentação das conclusões gerais mais relevantes do trabalho desenvolvido. É feito um balanço do trabalho efetuado e resultados obtidos relativamente aos objetivos iniciais.

No sexto capítulo apresentam-se perspectivas de continuidade e melhoria ao trabalho desenvolvido.

Capítulo 2

Estado da arte

2.1 Engenharia de tecidos

A engenharia de tecidos é uma área interdisciplinar da investigação que se ocupa das alternativas regenerativas à transplantação [7]. O seu objetivo é a construção de substitutos biológicos capazes de reparar, manter ou melhorar a função de tecidos [7,8]. O paradigma da engenharia de tecidos consiste no isolamento de células específicas do paciente para que cresçam sob condições de cultura controladas [9]. Estas são posteriormente depositadas num suporte tridimensional e estimuladas a formar e/ou reparar tecidos ou órgãos [4].

As abordagens em engenharia de tecidos partem de três componentes principais para que ocorra a formação de tecidos [4]:

- Células, que poderão sofrer processos de diferenciação celular dando origem ao novo tecido [4,7].
- Suporte tridimensional que sirva de molde e suporte físico ao tecido a formar-se [4,7,9].
- Fatores indutores e estimuladores da diferenciação celular e formação de tecidos. E podem ser de origem bioquímica, como fatores de crescimento e marcadores específicos, ou de origem biofísica como a estimulação mecânica ou elétrica [10].

Surgem assim duas abordagens diferentes:

- *In vivo*, através do implante do suporte no paciente para que este cumpra uma função tanto estrutural como indutora da formação de novo tecido através da aplicação de estímulos biofísicos e libertação de fatores de crescimento [4,10].
- *In vitro*, como sistema de suporte e estimulação para que as células do paciente sejam cultivadas externamente, e uma vez formado o tecido este possa ser inserido no mesmo [10]. No entanto, as abordagens não são mutuamente exclusivas e podem ser facilmente combinadas [10].

Assim, as abordagens em engenharia de tecidos são uma combinação dos três fatores essenciais numa plataforma que possa ser aplicada num paciente, ou mesmo utilizada externamente, auxiliando na formação de tecidos sem causar reações biológicas adversas; que seja biocompatível; e que seja biodegradável, para que possa servir de molde e estimular a formação de tecidos enquanto se degrada dando lugar a um novo tecido [7,9]. Na **Figura 2.1** estão representadas as duas abordagens mais frequentes em engenharia de tecidos, a cultura em biorreator e futuro implante do tecido, ou o implante direto do *scaffold* [6].

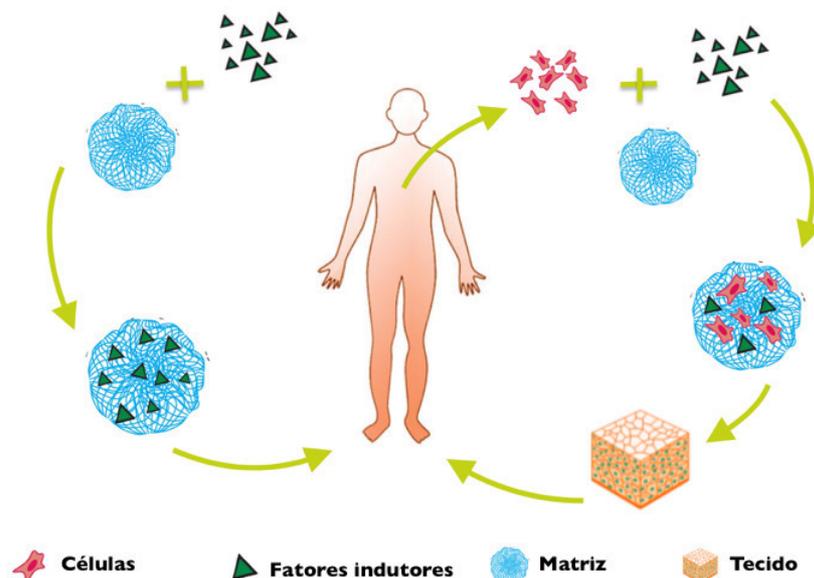


Figura 2.1 – Ilustração das duas abordagens mais frequentes para reparação de tecidos *in vivo* em engenharia de tecidos, adaptado de [11].

2.2 Biomateriais

Os biomateriais desempenham um papel importante na grande maioria das estratégias de engenharia de tecidos [4]. Além de servir de molde tridimensional ao tecido a ser formado, o suporte fornece o microambiente para a regeneração celular, adesão de células de suporte, proliferação, diferenciação e gênese do novo tecido [7]. Deste modo, a composição química, estrutura física e funcionalidade biológica mostram-se importantes atributos dos materiais para aplicação em engenharia de tecidos [7].

Para uma eficaz aplicação do biomaterial este deve ser adequado à aplicação em causa, uma vez que cada material possui propriedades físico-químicas e mecânicas próprias e a capacidade de estimular respostas específicas, salientando-se a importância da adaptação do material à aplicação específica [4,12]. A utilização de materiais osteocondutores, como a cerâmica, promove processos de diferenciação e proliferação de osteoblastos [4,12].

Os biomateriais para aplicação em engenharia de tecidos dividem-se em três grupos principais: metais, cerâmicos e polímeros sintéticos e naturais [7,9,12]. Os metais são largamente utilizados em aplicações biomédicas devido às suas ótimas propriedades mecânicas [7]. No entanto a sua reduzida atividade biológica, ausência de biodegradabilidade e o difícil processamento em

estruturas altamente porosas reduzem a sua aplicabilidade em engenharia de tecidos [7]. Materiais cerâmicos como a hidroxiapatite (HA) ou fosfato de cálcio possuem boa osteocondutividade contraposta pela reduzida processabilidade e resistência mecânica [7]. Já os polímeros sintéticos como o poli(ácido láctico) (PLA), poli(hidroxiacanoato) (PHA), poli(hidroxibutirato) (PHB) e copolímeros, possuem uma elevada flexibilidade de *design* e fácil processabilidade [12]. Os polímeros naturais, como o colagénio, possuem ótimas propriedades de adesão celular e biocompatibilidade, no entanto apresentam baixas propriedades mecânicas [7,9,12].

Os biopolímeros aliam as características vantajosas dos polímeros sintéticos aos dos materiais de origem biológica [13–15]. Adicionalmente às características gerais dos polímeros como a flexibilidade de processamento e manipulação das propriedades do material, aliam-se a sua elevada biocompatibilidade, biodegradabilidade e bioatividade devido à sua origem biológica [15].

Além disso, as similaridades dos biopolímeros com a matriz celular e boa interação celular, aliados às características anteriormente referidas, tornam-nos potenciais candidatos para aplicações em engenharia de tecidos [13,14].

No entanto, na grande maioria das vezes, o material puro não reúne as características necessárias, daí a crescente necessidade em produzir materiais compósitos de forma a reunir um conjunto de características mais adequadas para a aplicação em causa [16–18]. É comum a mistura de diversos polímeros como PLA, PHB e PHBV com HA, vidro bioativo ou colagénio e fosfato de cálcio de modo a estimular a formação de tecido ósseo [18–22]. A mistura de diversos polímeros, de modo a criar um compósito, é uma prática frequente na construção de matrizes para aplicações em engenharia de tecidos, como por exemplo misturas de poli(etilenoglicol) (PEG)/PHB, poli(ácido-L-láctico) (PLLA)/PHBV, poli(propileno-carbonato) (PPC)/PHBV e misturas de poli(ácido glicólico-co-ε-caprolactona) (PGCL)/PHBV e PHBV com alginato e fibronectina para regeneração de tecido neuronal, entre outras [4,7,12].

Cada material ou compósito possui características próprias mais apropriadas para utilizações específicas. No entanto, há requisitos gerais para a construção de matrizes que todos os biomateriais devem cumprir [4,7,9,12]. Características como biocompatibilidade, biodegradabilidade, bioatividade e propriedades mecânicas favoráveis são imperativas uma vez que estas são essenciais e transversais para a construção de uma estrutura eficaz de suporte à formação de tecidos [7,9].

A biodegradabilidade de uma matriz é um requisito para grande parte das aplicações em engenharia de tecidos [7]. O rácio de degradação do *scaffold* deve acompanhar o rácio de formação do novo tecido de modo a servir idealmente a função de suporte [9]. A biocompatibilidade é também

um fator indispensável uma vez que não é possível a aplicação de um *scaffold* que resulte numa resposta imunitária adversa [9]. Por fim, as propriedades mecânicas são também importantes uma vez que o *scaffold* não pode colapsar durante o manuseamento ou as atividades normais do paciente [9].

2.3 Design de um *scaffold*

Um *scaffold* em engenharia de tecidos é desenhado para funcionar como suporte estrutural e molde ao tecido a ser formado. O seu *design* é um processo complexo e desafiante, uma vez que a sua funcionalidade é influenciada por um elevado número de fatores quer geométricos/morfológicos, quer físico-químicos [7,9].

Uma abordagem biomimética foca-se em materiais desenhados para influenciar o ambiente físico, químico e biológico que envolve a população celular [7,10]. Para desempenhar uma função de matriz extracelular temporária, pode ser vantajoso emular certas características naturais da mesma [7]. No entanto, a sua total simulação pode ser complicada e desnecessária uma vez que ocorrem processos de regeneração acelerados comparativamente aos processos naturais de desenvolvimento [7].

A geometria da matriz é um fator importante em engenharia de tecidos, uma vez que os atributos físicos podem modular a resposta celular [4]. A construção de *scaffolds* tenta por isso seguir uma abordagem biomimética de modo a simular a geometria da matriz extracelular através da construção de estruturas porosas ou fibrosas, **Figura 2.2** [4,7].

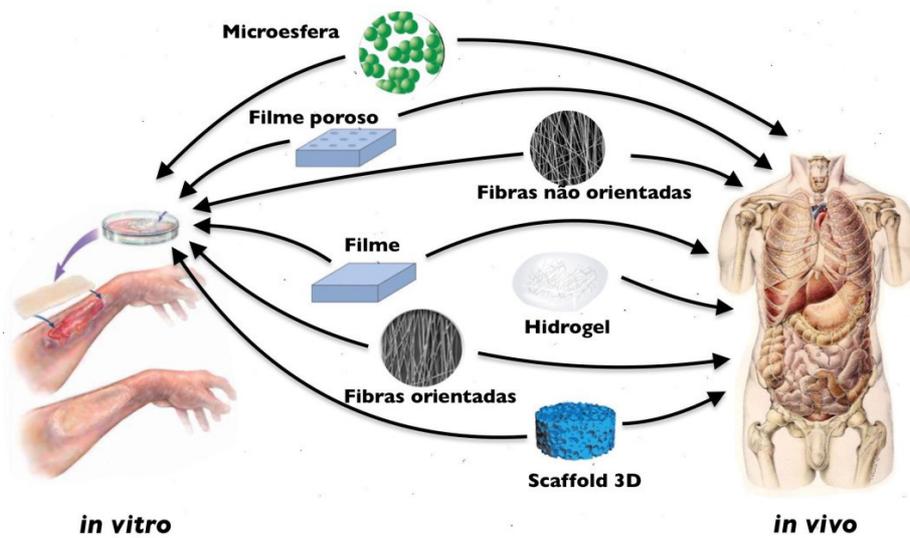


Figura 2.2 – Diversas morfologias de matrizes e sua aplicação em engenharia de tecidos.

Uma elevada porosidade com dimensão adequada e boa interligação são fatores importantes de modo a permitir uma fácil penetração de células pela totalidade da matriz, boa circulação de fluidos e eficaz vascularização [7,9].

A inserção de fármacos e fatores indutores de crescimento e diferenciação é outro aspecto importante a ter em conta na fabricação de um suporte uma vez que estes fatores são capazes de modular a atividade celular são muitas vezes insuficientes para reparações de grandes danos [4,7,9]. A presença dos fatores é tida como um elemento essencial em engenharia de tecidos [4,7].

2.4 Polímeros inteligentes

Define-se por polímeros inteligentes, materiais que adicionalmente a serem poliméricos apresentem variações reprodutíveis, significativas e estáveis de pelo menos uma propriedade quando sujeitos a estímulos externos [6]. Os polímeros inteligentes são atualmente alvo de estudo e a sua aplicação distribui-se pelas diversas áreas, desde sensores e atuadores até engenharia de tecidos [6,23].

Os polímeros piezoelétricos merecem particular destaque para aplicações em engenharia de tecidos devido aos efeitos estimuladores nos processos de crescimento e diferenciação celular atribuídos à presença de potenciais elétricos [5,6]. Estes apresentam uma vantagem ao permitir a

aplicação de estímulos elétricos de forma menos evasiva, evitando cabos e fontes de alimentação externa uma vez que a geração de potenciais é uma propriedade nativa deste material [5].

A utilização de polímeros piezoelétricos demonstrou ser particularmente vantajosa na regeneração e diferenciação de tecido ósseo, que também é piezoelétrico, vindo a sua aplicação de encontro a uma abordagem biomimética, emulando o suporte às propriedades nativas do tecido e às suas condições de utilização [5,6,24].

Por outro lado, a aplicação de um material piezoelétrico permite a geração de uma corrente alternada, quer *in vivo* através do movimento natural do paciente quer *in vitro*, através de vibração, compressão ou estiramento [5,6,24]. Este facto é de particular interesse uma vez que, contrariamente a outros tecidos, os potenciais gerados no osso são alternados devido aos movimentos humanos comprimirem o tecido ósseo de forma dinâmica e intermitente [5,24].

2.5 Compósito magnetoelétricos

Um problema decorrente da utilização de polímeros piezoelétricos é que muitas vezes a estimulação mecânica pode não ser possível, como em caso de imobilização do paciente, por exemplo. Este problema surge particularmente em pacientes de fraturas ósseas, que levam ao acamamento e reduzida mobilidade do local fraturado Assim, compósitos de polímeros piezoelétricos com partículas magnetostritivas permitem a geração de potenciais elétricos na ausência de estimulação mecânica e podem ser uma possível solução [25–27].

A magnetostricção é uma propriedade dos materiais ferromagnéticos [27]. que demonstram uma deformação mecânica na presença de campos magnéticos [27]. Quando sujeitos a um campo elétrico ocorre um realinhamento dos domínios magnéticos no interior do material de modo a minimizar a energia livre [28]. O realinhamento dos domínios causa uma reorganização estrutural interna refletindo-se em deformação mecânica do material como representado na **Figura 2.3** [28].

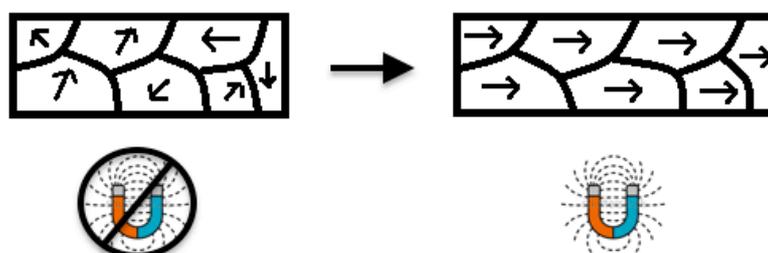


Figura 2.3 – Representação esquemática do efeito magnetostritivo.

A inserção de partículas magnetostritivas na matriz de um polímero piezoelétrico permite o acoplamento das duas propriedades, estes compostos definem-se de magnetoelétricos [27]. As partículas magnetostritivas no interior do polímero são deformadas através de estimulação magnética [29]. Com a vibração das partículas, o polímero é deformado, que por sua vez, sendo piezoelétrico, é gerado um potencial elétrico na superfície do material [27]. Capacita-se assim a transformação de um estímulo magnético em estímulo elétrico, **Figura 2.4** [29]. Os compostos magnetoelétricos permitem desta forma a passagem direta de um estímulo magnético para a produção de potenciais elétricos [27].

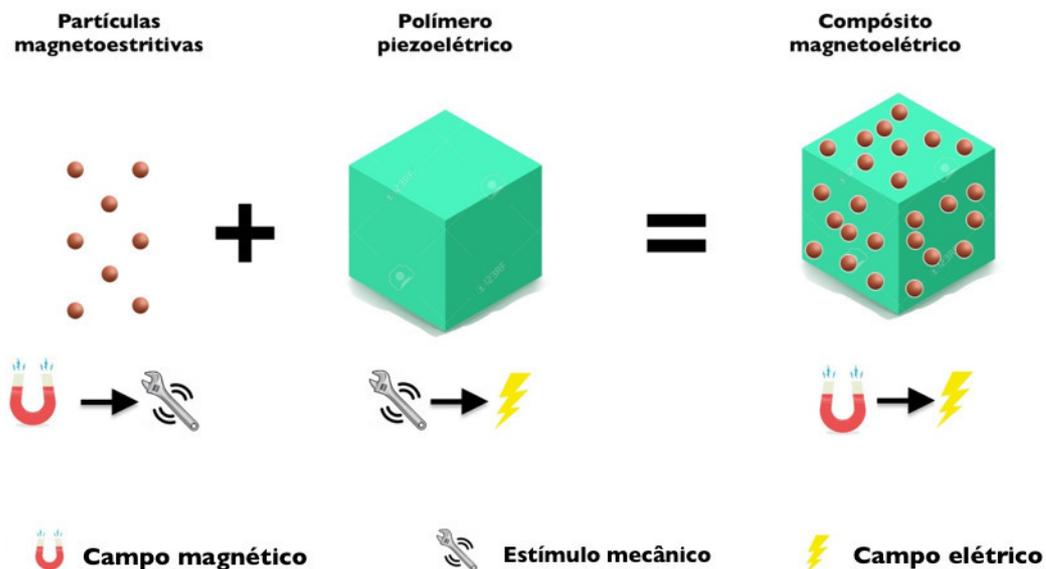


Figura 2.4 – Acoplamento dos efeitos piezoelétrico e magnetostritivo em materiais magnetoelétricos.

O composto formado, é um composto particulado, consistindo em partículas magnéticas dispersas numa matriz polimérica [30], **Figura 2.5**. São possíveis outros tipos de interface entre partículas e polímero (laminados e fibrosos), mas embora os compostos particulados possuam baixas propriedades magnetoelétricas, estes possuem algumas vantagens comparativamente aos restantes [30,31]. O seu processamento é relativamente simples permitindo que sejam processadas diversas morfologias comparativamente com outros tipos de arranjo/disposição/organização [31]. Adicionalmente, permite uma maior manutenção da interface magnetostritiva/piezoelétrica durante a

degradação do compósito fazendo esta conformação ideal para aplicações em engenharia de tecidos [31].

Uma grande diversidade de partículas pode ser utilizada como fase magnetostritiva para o fabrico de um composto magnetoelétrico, como ferrites, manganites, metais, ligas de transição e ligas terrosas raras [25,32,33]. No entanto, para a produção de compostos magnetoelétricos particulados as ferrites de níquel e cobalto são maioritariamente utilizadas devido aos seus elevados coeficientes magnetostritivos (220 ppm para as ferrites de cobalto (CoFe_2O_4)) [35–37]. Além dessas, o Terfenol-D é também largamente utilizado devido à boa biocompatibilidade [31,32].

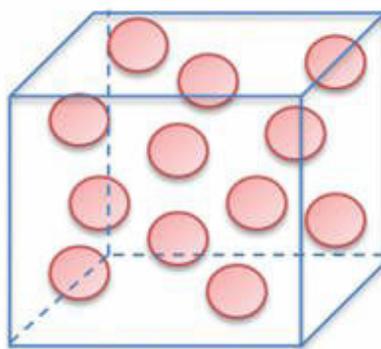


Figura 2.5 – Disposição das partículas magnetostritivas num compósito magnetoelétrico particulado, adaptado de [37].

2.6 Piezoelectricidade

O efeito piezoeétrico define uma propriedade de certos materiais em que a polarização pode ser induzida/modificada por *stress*/tensão mecânica [25,39,40]. A polarização resultante é um efeito macroscópico causado, no entanto, por uma redistribuição microscópica das cargas elétricas das suas moléculas [38].

Ao nível macroscópico o efeito é descrito por um vetor macroscópico de polarização, sendo por isso independente da configuração superficial [38–40]. Este efeito tem origem na estrutura cristalina dos materiais [6,24,38]. A alteração das posições relativas dos momentos dipolares atômicos na matriz cristalina provoca uma reorientação das cargas resultando num efeito macroscópico de polarização [24,38–40]. Este efeito verifica-se em cristais não centrossimétricos [6,24,41].

O efeito piezoeétrico funciona de forma recíproca e linearmente proporcional [38,41]. Pode verificar-se como efeito piezoeétrico direto, em que um estímulo mecânico ou deformação resulta em

polarização do material [38,40]. Uma vez revertida a carga aplicada ocorre a inversão da polarização [38,41]. O efeito pode também demonstrar-se pelo efeito piezoelétrico inverso, em que a aplicação de um potencial elétrico/polarização resulta em deformação mecânica do material [38,40,41]. Na **Figura 2.6** encontram-se representados os efeitos piezoelétrico direto e inverso.

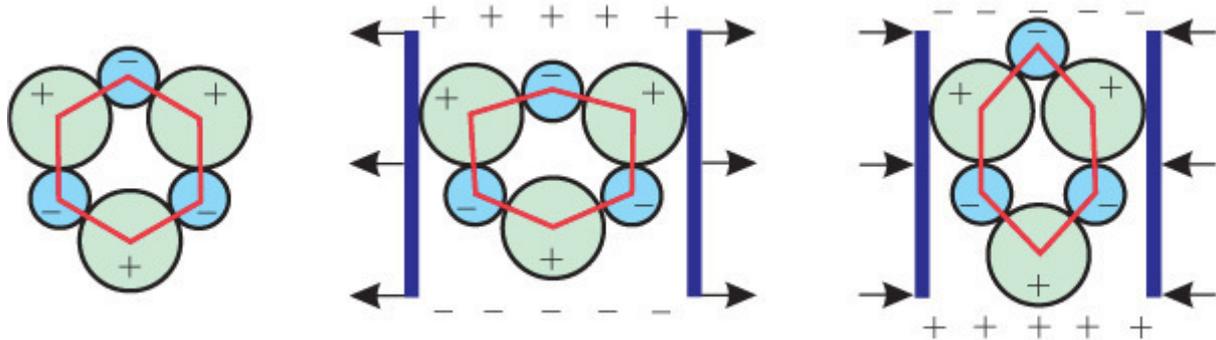


Figura 2.6 – Efeito de stress mecânico na estrutura de um cristal piezoelétrico, adaptado de [42].

A forma mais comum de descrever o efeito piezoelétrico é pelo efeito direto, onde o coeficiente piezoelétrico d_{ij} é descrito pela **Equação 2.1** [6].

$$d_{ij} = \left(\frac{\partial D_i}{\partial X_j} \right)^E = \left(\frac{\partial x_i}{\partial E_j} \right)^X \quad \text{Equação 2.1}$$

onde a variável “D” representa a indução elétrica, “E” a força do campo elétrico, “X” o stress mecânico e “x” a deformação [6]. Deste modo, o efeito piezoelétrico pode ser observado como a relação entre as variáveis elétricas “D” e “E” e os parâmetros mecânicos “X” e “x” [6]. A **Equação 2.2** descreve o efeito piezoelétrico inverso, de coeficiente e_{ij} [6].

$$e_{ij} = \left(\frac{\partial D_i}{\partial x_j} \right)^E = - \left(\frac{\partial X_i}{\partial E_j} \right)^x \quad \text{Equação 2.2}$$

2.7 Piezoeletricidade no corpo humano

O efeito piezoelétrico está presente em grande parte dos tecidos biológicos [41,43]. Este foi encontrado em tendões, pele, lã, madeira, osso, colagénio, conchas de bivalves e otólitos de peixes,

ácidos nucleicos, elementos contráteis, entre outros [23,40,43]. Os tecidos humanos com propriedades elétricas e piezoelétricas encontram-se representados na **Figura 2.7**.

O impacto biológico da piezoelectricidade ganha relevo aliando o conhecimento de que grande parte dos processos fisiológicos são governados por sinais elétricos à potencial presença do efeito em grande parte dos tecidos biológicos [23,40,41]. A sua presença em tecidos vivos foi já alvo de largo estudo por parte de diversos investigadores [40]. No entanto, o seu impacto biológico não é ainda totalmente conhecido [44].

O facto de grande parte dos tecidos ser piezoelétrico implica que a modulação e controlo de vários processos fisiológicos possam ser mediados por fatores mecânicos [41]. O primeiro impacto da produção local de potenciais elétricos será a movimentação de iões [5]. Postula-se que estes potenciais influenciem a movimentação de fatores de crescimento e recetores, controlem o pH, influenciem a orientação de moléculas e a ativação e supressão de enzimas [5,24]. Adicionalmente, os campos elétricos podem também influenciar processos de migração, proliferação e diferenciação celular e podem modular a atividade sintética celular, embora estes mecanismos não sejam ainda completamente compreendidos [5,24]. A associação da indução mecânica aos diversos fenômenos biológicos pode estar na base das respostas tácteis como a audição e o tato [41]. Postula-se, adicionalmente, que este efeito possa ser determinante na manutenção da homeostasia [41].

Dos tecidos humanos que apresentam comportamento piezoelétrico, o osso é um dos mais estudados, nomeadamente o efeito da estimulação elétrica nos processos de osteogénese [5,23,41,43]. O impacto biológico do efeito como modulador da rigidez óssea é facilmente observado [44]. Corredores ou halterofilistas possuem densidade óssea mais elevada, contrariamente, astronautas em órbita ou pacientes acamados experienciam perda de massa óssea, efeitos decorrentes da presença/ausência de potenciais resultantes da compressão do osso [24,44]. A estimulação elétrica é já uma prática médica consolidada para auxiliar na regeneração de tecido ósseo [5,6].

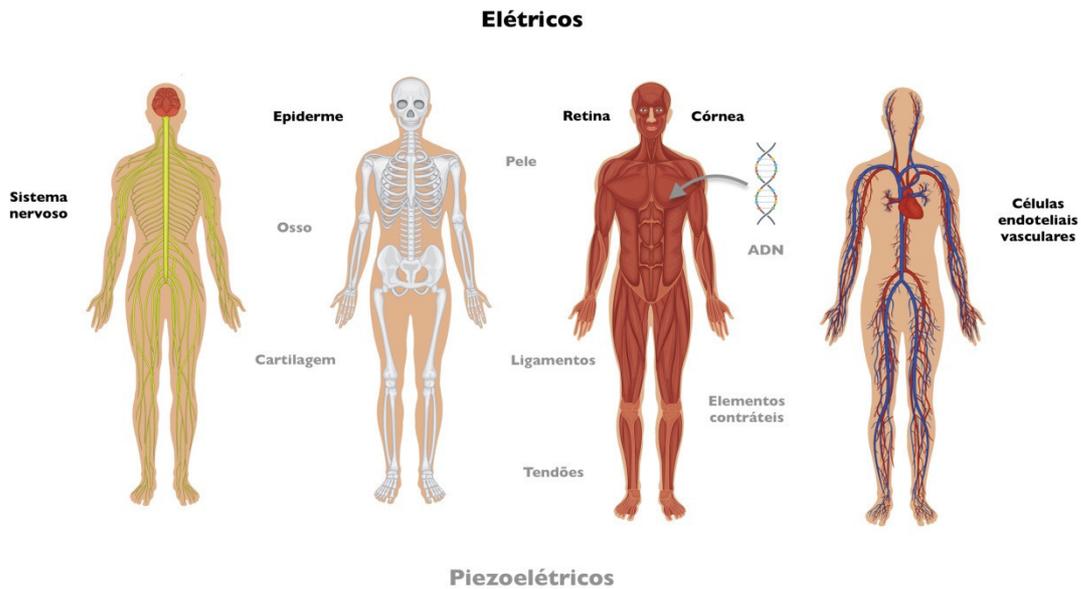


Figura 2.7 – Representação da localização dos tecidos onde sinais elétricos e piezoelétricos são mais relevantes.

2.8 Trabalhos relevantes realizados com polímeros inteligentes

A aplicação de materiais poliméricos piezoelétricos e compósitos magnetoelétricos, em engenharia de tecidos, foca-se maioritariamente na regeneração de 3 tipos de tecidos: ósseo, muscular e neuronal [6]. Alguns trabalhos mais relevantes encontram-se listados na **Tabela 2.1**.

PLLA e copolímeros, juntamente com fluoreto de poli(fluoreto de vinilideno) (PVDF) são os polímeros piezoelétricos mais utilizados para o fabrico de suportes para engenharia de tecidos. Estes polímeros têm sido processados sob diversas morfologias de modo a simular a morfologia e características da matriz extracelular. Processaram-se maioritariamente sob o formato de fibras, *scaffolds* porosos tridimensionais e filmes [45].

Tabela 2.1 – Exemplos de trabalhos relevantes realizados com polímeros piezoelétricos e compósitos magnetoelétricos.

Tecido	Polímero	Morfologia	Propriedades	Referência
Ósseo	PVDF(TrFE)/ Terfenol-D	Filme	Magnetoelétrico	[6]
	PVDF/Ti	Filme	Piezoelétrico	[46]

Capítulo 2 – Estado da Arte

	PVDF	Filme	Piezoelétrico	[47,48]
	PVDF(TrFE)/ BaTiO ₂	Filme	Magnetoelétrico	[49]
	PLLA	<i>Scaffold</i> 3D	Polarizado/ Biodegradável	[50]
	PLLA/PGA	Filme	Polarizado/ Biodegradável	[51]
	PHB/PHBV	Filme	Piezoelétrico/ Biodegradável	[17,52]
	PHBV	<i>Scaffold</i> 3D	Piezoelétrico/ Biodegradável	[17]
	Metglas/PVDF	Filme	Magnetoelétrico	[53]
	PVDF	Filme	Piezoelétrico	[54,55]
	PVDF-TrFE	Fibras	Piezoelétrico	[56,57]
Nervoso	PLLA	Fibras	Polarizado/ Biodegradável	[58]
	PHB	<i>Scaffold</i> 3D	Piezoelétrico/ Biodegradável	[59]
	PHBV	Microesfera	Piezoelétrico/ Biodegradável	[59]
	PHB/PHBV	Fibras	Piezoelétrico/ Biodegradável	[60]
	PVDF-TrFE	Fibras	Piezoelétrico	[61]
Muscular	PLLA	Fibras	Polarizado/ Biodegradável	[62]
	PHBV	Fibras	Piezoelétrico/ Biodegradável	[63,64]
Cartilaginoso	PGA	Fibras	Polarizado/ Biodegradável	[21,65,66]

Um polímero muito promissor para a regeneração de tecidos é o PVDF devido à sua eletroatividade e biocompatibilidade [67]. Trabalhos anteriores com culturas de osteoblastos MC3T3-E1 em filmes de PVDF demonstram uma maior adesão e proliferação quando realizados em filmes positivamente carregados [46]. Por outro lado, estudos realizados com células musculares (da linha C2C12) demonstram que superfícies negativamente carregadas podem encorajar a sua adesão e proliferação [54]. Adicionalmente, a polarização em filmes de PVDF pode influenciar a hidrofobicidade de substratos induzindo mudanças conformacionais de proteínas adsorvidas à matriz extracelular, que podem por sua vez ser utilizadas para a regulação da adesão de células estaminais e direção da

diferenciação osteogénica [47,48]. Neurónios de espinal medula de ratos eletricamente estimulados num filme de PVDF exibem um aumento da densidade neuronal e número de neurites com mais do dobro das ramificações observadas em substratos não eletricamente estimulados, indicando assim o potencial da estimulação elétrica no crescimento e ramificação de neurites [55]. Trabalhos de diversos autores reforçam as potencialidades do PVDF na construção de suportes celulares para engenharia de tecido neuronal tendo sido verificada uma boa adesão celular, orientação pelo *scaffold* e diferenciação em tecido neuronal [56,57].

Os compostos magnetoelétricos permitem a estimulação elétrica do suporte por meio de um campo magnético. A eficácia dos materiais magnetoelétricos como suporte para engenharia de tecidos foi demonstrada por [31], onde foi utilizado um material compósito magnetoelétrico Terfenol-D/PVDF(TrFE) para o crescimento de pré-osteoblastos MC3T3-E1, verificando-se um aumento da proliferação após estimulação mecânica e elétrica.

Outro dos polímeros promissores para a construções de suportes poliméricos para engenharia de tecidos é o PLLA. Este polímero é piezoelétrico quando polarizado não possuindo a forte resposta piezoelétrica do PVDF, no entanto apresenta a vantagem de ser biodegradável. Células neonatais de cerebelo de rato, da linha C172.2, foram cultivadas em diferentes suportes de PLLA, fibras orientadas e *scaffolds* porosos [53,68]. Ambas apresentaram uma forte interação entre a matriz e as células, havendo uma boa adesão, proliferação e diferenciação celular em todo o suporte [53,68]. Verifica-se que, no caso das fibras, as células apresentam uma orientação preferencialmente paralela [68]. A mesma linha celular foi cultivada em PLGA processado sob diversas morfologias, filmes, fibras e *scaffold* poroso. Observou-se uma resposta celular similar ao caso do PLLA, com boa adesão e diferenciação celular [45]. As potencialidades da aplicabilidade do PLLA na regeneração de tecido nervoso demonstraram-se adicionalmente através de ensaios *in vivo*, onde se verificou a regeneração eficaz do tecido aliada a uma boa resposta de tecido ao suporte [50,58]. PLLA e PLGA foram também utilizados com sucesso para engenharia de tecido ósseo, sob a forma de *scaffolds* porosos e filmes com boa adesão da cultura ao suporte, diferenciação celular e adesão de proteínas [50,51]. O poli(ácido glicólico) (PGA) é também promissor na regeneração de tecido cartilaginoso [51,65,66]. Estudos demonstram uma boa adesão, diferenciação e resposta celular aos suportes, quer *in vivo*, quer *in vitro* [51,65,66]. O PLLA foi também utilizado como suporte para a engenharia de tecido muscular. Foram produzidas fibras e a sua resposta quando em contacto com células endoteliais e de músculo liso foi avaliada. Ambas as linhas celulares demonstraram uma boa adesão e proliferação pelo *scaffold* [62]. A potencialidade da aplicação de um *scaffold* poroso *in vivo* para engenharia de

tecido muscular liso foi testada. Quando aplicado juntamente com mioblastos, verificou-se a formação de novo tecido e de vascularização demonstrando a capacidade do complexo fibras/mioblastos para sobreviver, reorganizar e gerar estruturas similares a tecidos [69].

Os PHA's, nomeadamente PHB e PHBV, são potenciais materiais para a produção de suportes para engenharia de tecidos aliando biodegradabilidade com piezoelectricidade. As propriedades relacionadas com a biocompatibilidade parecem ser similares entre PHB e PHBV [70]. Um estudo revelou que diversas culturas celulares; fibroblastos, células endoteliais e hepatócitos isolados, quando cultivadas em filmes de PHB e PHBV exibem altos níveis de adesão ao substrato. Tecido ósseo foi diferenciado *in vitro* com sucesso num suporte de PHB poroso revelando boa adesão e diferenciação celular [59]. Quando aplicados *in vivo*, PHB e PHBV, os resultados são igualmente animadores demonstrando estimulação da formação de tecido ósseo ausente de resposta inflamatória [17] e [52]. Diversos estudos comprovam também as potencialidades de PHB e PHBV na regeneração de tecido neuronal. Foram utilizadas várias morfologias, como microesferas, fibras e filmes, verificando-se uma boa adesão celular, crescimento e alongamento de neurites e manutenção da atividade metabólica [59,60]. O PHB e PHBV demonstram também fortes potencialidades para aplicação em tecido muscular. Os suportes de fibras demonstram uma boa proliferação celular, tal como a expressão de genes de marcadores chave da contração e marcadores da matriz extracelular [63,64]. Adicionalmente, não há menção bibliográfica, até onde se sabe, de um suporte magnetoelétrico e biodegradável.

2.9 Poli(hidroxi-butirato-co-hidroxi-valerato)

Os polihidroxicanoatos (PHA's) são uma família de polímeros naturais [71–73]. Estes poliésteres alifáticos são produzidos por bactérias sob condições de cultura controladas ou plantas geneticamente modificadas [71–75]. Um meio de cultura rico em carbono mas limitado em azoto induz a fermentação do polímero [17,75]. Estes possuem, por isso, a função biológica de substância de reserva de carbono [17,76]. Possuem também uma larga gama de aplicações, merecendo especial destaque as aplicações biomédicas, como mecanismo de libertação controlada de fármacos e em engenharia de tecidos devido às suas características de elevada biocompatibilidade, biodegradabilidade e termoprocessabilidade [18,74]. No entanto, uma desvantagem dos polímeros de PHA é a sua disponibilidade limitada, e extração lenta de culturas bacterianas [74,77].

Durante os últimos anos, esta família de polímeros tem recebido especial destaque, nomeadamente o poli(hidroxi-butirato) (PHB) e copolímeros[18,74]. A sua grande aplicabilidade advém

da elevada biodegradabilidade e ótima biocompatibilidade aliadas às propriedades mecânicas favoráveis equiparadas às dos ácidos poliláticos [18,74]. Estes foram utilizados para a produção de variados dispositivos biomédicos, incluindo suturas, emplastos cardiovasculares, curativos de feridas, *scaffolds* de medula óssea, entre outros [18,74]. No entanto, o homopolímero apresenta alguns problemas relativamente à aplicabilidade como a sua extrema fragilidade, elevada cristalinidade e difícil processamento [76–79]. Estas desvantagens fomentam o crescente interesse nos copolímeros de PHB com hidroxivalerato (HV) devido à sua resistência e instabilidade de fusão superiores, melhorando assim a sua aplicabilidade e processabilidade relativamente ao PHB [75–77]. O copolímero poli(hidroxibutirato-co-hidroxivalerato) (PHBV) é produzido naturalmente por microrganismos através da manipulação das condições de cultura com adição de ácido propiónico [72,75,79]. Tal como o PHB, é um poliéster alifático, termoprocessável e altamente hidrofóbico [77,80]. Diversos estudos comprovaram a sua biodegradabilidade, biocompatibilidade e bioatividade, que aliadas às suas propriedades mecânicas o tornam um material promissor para aplicações em engenharia de tecidos [75,77,78].

2.9.1 Propriedades físico-químicas

Do ponto de vista físico-químico, o PHBV é um poliéster termoplástico alifático [77,80]. Este co-polímero é constituído por percentagens variáveis dos monómeros de hidroxibutirato (HB) e hidroxivalerato (HV), cuja estrutura está representada na **Figura 2.8**.

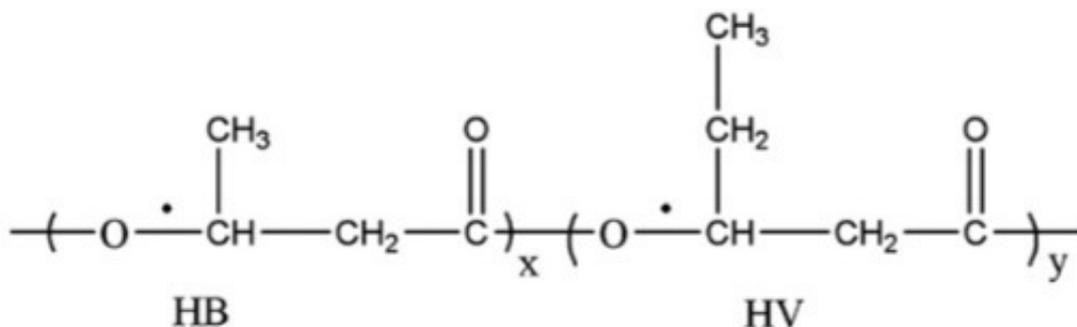


Figura 2.8 – Estrutura química do PHBV, “x” e “y” representam as proporções de monómeros HB e HV respetivamente, adaptado de [81].

Na **Tabela 2.2** encontram-se representados os números de onda correspondentes às bandas de absorção infravermelho (IV) dos grupos funcionais do PHBV. A sua degradação ocorre por um mecanismo hidrolítico, sendo o seu rácio de hidrólise baixo levando a uma degradação lenta [75].

Tabela 2.2 – Principais bandas de absorção IV do PHBV [82].

Banda de absorção	
Número de onda (cm⁻¹)	Grupo funcional
826 - 979	C-H Vibração (Alifático)
1057	C-O Vibração
1133	C-O Vibração
1183	C-O Vibração
1227 - 1478	C-H Vibração (Alifático)
1720	C=O Estiramento

2.9.2 Degradação

A crescente atenção dada ao PHBV provém das suas superiores propriedades mecânicas relativamente ao homopolímero PHB [75–77]. Os co-polímeros compostos por hidroxivalerato (HV) são menos cristalinos, mais flexíveis e podem ser processados com maior rapidez e facilidade do que o próprio PHB [71]. As suas propriedades mecânicas são equiparadas aos termoplásticos convencionais como o poli(etileno) (PE) e o poli(propileno) (PP) [79].

A degradação *in vivo* do PHBV ocorre por um mecanismo hidrolítico que, tratando-se de um polímero semicristalino, ocorre em duas fases [83,84]. Na primeira fase, a água penetra na superfície, degradando as cadeias da fase amorfa em cadeias menores até se formarem fragmentos solúveis [83]. Consequentemente, ocorre uma redução inicial da massa molar da fase amorfa sem perda das propriedades físicas, uma vez que a coesão da matriz é mantida pela fase cristalina [83]. Numa segunda fase, ocorre a perda das propriedades físicas e a água passa a fragmentar a amostra, verificando-se uma redução da massa [83]. Um aumento da porosidade da amostra facilita a difusão da água no seu interior e a remoção dos produtos da biodegradação acelerando, deste modo o processo [84].

A degradação lenta, relativamente a outros biopolímeros biocompatíveis permite que este mantenha a sua integridade estrutural/mecânica até ao crescimento de tecido suficiente para garantir um suporte estrutural [78]. Durante o processo ocorre uma redução da rigidez, resistência e massa

física, o que se apresenta como uma vantagem, uma vez que permite que o suporte vá sendo gradualmente substituído pelo tecido, adquirindo o seu papel fisiológico [17]. Este efeito é ideal quando aplicado na reparação de longas fraturas e defeitos ósseos [17].

2.9.3 Propriedades térmicas

O PHBV possui uma maior estabilidade térmica e permite um processamento mais rápido e fácil relativamente ao homopolímero PHB [71,75]. A inclusão de monómeros HV pretende solucionar desvantagens do PHB, como a elevada fragilidade abaixo da temperatura de transição vítrea e a fácil degradação acima da temperatura de fusão [77]. Uma baixa resistência à degradação térmica implica um menor tempo de residência nos equipamentos de processamento [76]. Adicionalmente, o PHBV possui, face ao PHB, um maior distanciamento entre as temperaturas de fusão e de degradação térmica [80]. A utilização do PHBV surge como modo de ultrapassar a natureza instável do PHB durante a fase de fusão e elevada cristalinidade reduzindo as limitações do seu processamento [76].

No entanto, o PHBV apresenta um rácio de cristalização reduzido comparativamente aos processos industriais de modelação e fabrico. A baixa velocidade de cristalização está relacionada com uma baixa velocidade de nucleação e um baixo crescimento linear resultante da inclusão de unidades HV na matriz cristalina [75]. As propriedades térmicas do PHBV, como a temperatura de transição vítrea (T_g), cristalização (T_c), fusão (T_m), de degradação inicial (T_i), final (T_f) e máxima (T_{max}) e entalpia de fusão (ΔH_m) estão sumarizadas na **Tabela 2.3**.

Tabela 2.3 – Propriedades térmicas do PHBV [22,85–87].

T_g (°C)	T_c (°C)	T_m (°C)	ΔH_m (J/g)	T_i (°C)	T_f (°C)	$T_f - T_i$ (°C)	T_{max} (°C)
-6,6	28,5	161,0	65,9	261,0	298,0	37,0	280,0

Capítulo 3

Materiais e métodos

A atividade experimental é composta por três etapas distintas. A primeira etapa consistiu no processamento de PHBV recorrendo a diferentes técnicas, de forma a obter diferentes morfologias.

A segunda etapa do trabalho consistiu num ensaio de degradação das diferentes amostras produzidas previamente. O polímero, processado sob diversas morfologias, foi submetido a uma solução de simulação de fluidos corporais (SBF, do inglês *Simulated Body Fluid*) à temperatura fisiológica. As amostras processadas foram imersas em solução durante diferentes períodos de modo a estudar a degradação de cada tipo de morfologia ao longo do tempo.

A terceira, e última fase da atividade, consistiu na caracterização e análise das amostras produzidas, sem degradação e ao longo dos vários tempos de degradação. Diversas análises foram realizadas, tanto morfológicas como relativas às propriedades físico-químicas da amostra.

3.1 Materiais, reagentes e solventes

3.1.1 Material

O material utilizado foi o poli(hidroxibutirato-co-hidroxivalerato), com uma percentagem de copolímero de 3% (mol/mol). O polímero foi adquirido na *Natureplast*, possuindo um grau de pureza de 99% e massa molecular de 560,64 g/mol.

As ferrites de cobalto foram adquiridas na *Nanoamor*. O seu tamanho situa-se entre os 35 e 55 nm e o grau de pureza é superior a 98%.

3.1.2 Reagentes e solventes

Na **Tabela 3.1** encontram-se indicados os reagentes utilizados durante o procedimento experimental e as principais propriedades químicas.

Tabela 3.1 – Reagentes utilizados na atividade experimental e características mais relevantes.

Reagentes	Fórmula molecular	Massa molecular (g/mol)	Grau de pureza (%)	Fabricante	Referência
Cloreto de Sódio	NaCl	58,44	99	<i>Fisher</i>	S/3160/60
Clorofórmio	CHCl ₃	119,38	99	<i>Fisher</i>	C/4960/17

Álcool Polivinílico	$[\text{CH}_2\text{CHOH}]_n$	13,00-23,00	98	<i>Aldrich</i>	348406-500G
Ferrites de Cobalto	CoFe_2O_4	234,62	98	<i>Nanoamor</i>	1510FY

Na Tabela 3.2 estão indicadas as propriedades do clorofórmio (CF), o solvente utilizado para o processamento das diversas amostras de PHBV.

Tabela 3.2 – Propriedades do clorofórmio.

Solvente	Ponto de fusão (°C)	Ponto de ebulição (°C)	Densidade (g.cm^{-3})	Momento dipolar (Debye)	Constante dielétrica (ϵ_r)
Clorofórmio	-63,5	61,15	1,49	1,15	4,81

3.2 Técnicas de processamento

3.2.1 *Solvent casting*

A técnica de *solvent casting*, é provavelmente a técnica de processamento de materiais mais simples para a produção de filmes poliméricos [88].

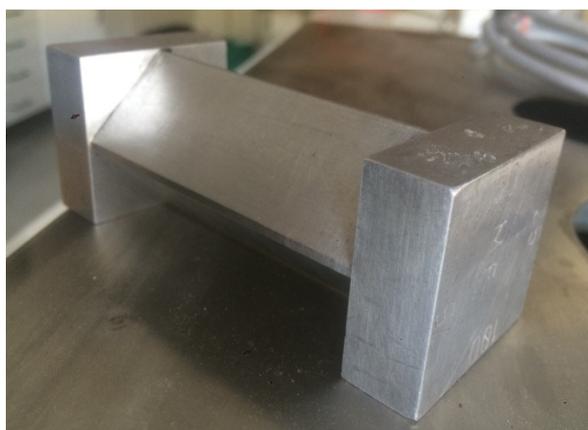


Figura 3.1 – Extensor utilizado na preparação dos filmes poliméricos.

Para a produção dos filmes preparou-se uma solução de PHBV em CF com uma concentração de 10% (m/v). Durante a dissolução a solução foi mantida sob uma agitação moderada a 40 °C de modo a acelerar o processo sem que ocorra perda excessiva do solvente, T_b CF = 62 °C.

Para a preparação dos filmes contendo ferrites de cobalto, adicionou-se 10% (m/m) das mesmas, relativamente à massa final, ao CF. De seguida, essa solução foi mantida sob sonicação durante 1,5 h de modo a atingir uma boa dispersão das ferrites no solvente. Posteriormente, o solvente com ferrites de cobalto dispersas foi utilizado normalmente para a dissolução do polímero (os passos seguintes são comuns ao processamento de filmes de PHBV e compósitos). Uma alíquota da solução polimérica foi vertida sob uma placa de vidro e espalhado com o extensor da **Figura 3.1**. A placa de vidro foi mantida à temperatura ambiente durante 48 h para que ocorresse a evaporação do solvente. O filme foi depois destacado do substrato. A **Figura 3.2** esquematiza o processamento de filmes por *solvent casting*.

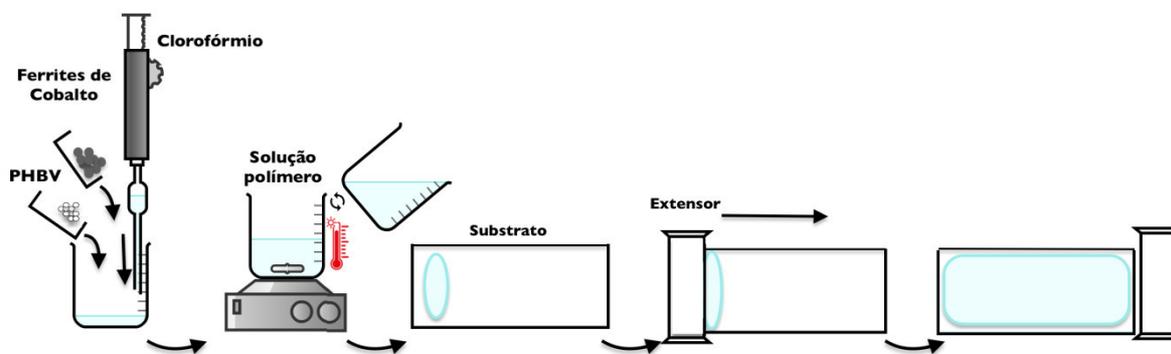


Figura 3.2 – Esquematização do processamento de filmes por *solvent casting*.

3.2.2 *Solvent casting/ Particulate leaching*

A técnica de *solvent casting/particulate leaching* adequa-se à produção de *scaffolds* 3D de elevada porosidade [89].

Para a produção do *scaffold* poroso partiu-se de uma solução polimérica como preparada no ponto 3.2.1. Colocou-se 10 mL de solução numa caixa de Petri contendo 10 g de NaCl e homogeneizou-se manualmente. Deixou-se repousar à temperatura ambiente durante 48 h para que o solvente evaporasse na totalidade. O *scaffold* foi posteriormente imerso em água de modo a dissolver o NaCl. A água foi trocada diariamente para evitar a saturação. Após a dissolução do NaCl o *scaffold* foi retirado e deixado novamente à temperatura ambiente durante uma semana até que a água tivesse sido totalmente evaporada. A **Figura 3.3** esquematiza o processamento de *scaffolds* por *solvent casting/particulate leaching*.

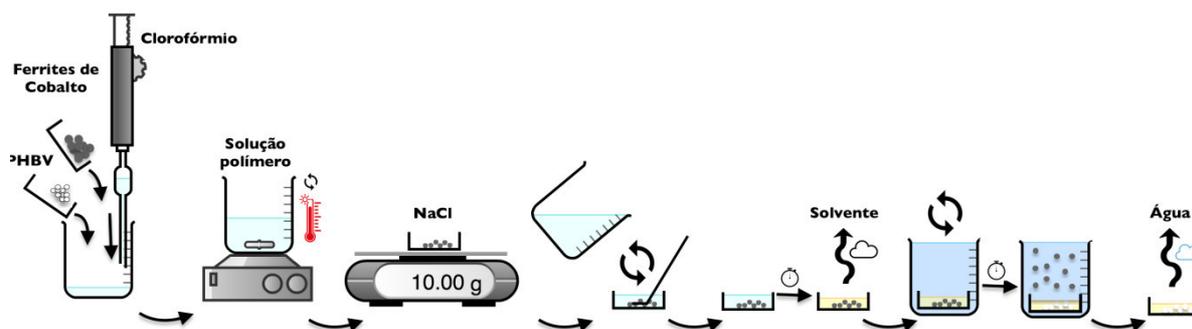


Figura 3.3 – Esquemática do processamento de *scaffolds* por *solvent casting/particulate leaching*.

3.2.3 Emulsão óleo-água

A técnica de emulsão óleo água utiliza os princípios de solvente/não solvente de modo a produzir microesferas poliméricas [90]. Embora a produção de microesferas poliméricas seja possível por técnicas diversas, no entanto, o método utilizado apresenta elevada simplicidade quer técnica, quer relativa aos materiais e reagentes utilizados. Adicionalmente, a alteração dos parâmetros, concentração da solução, percentagem de tensoativo e velocidade de rotação permite o controlo do tamanho das microesferas [91,92].

Para a produção das microesferas usou-se como ponto de partida um protocolo para a produção de microesferas de PLLA para aplicações biomédicas [93]. Preparou-se uma solução polimérica de modo similar ao ponto 3.2.1, no entanto com uma concentração ajustada para 3% (m/v).

Paralelamente, preparou-se uma solução de 0,5% (m/V) através da dissolução de álcool polivinílico (PVA) em água ultrapura a 90 °C.

A solução de água ultrapura com PVA, fase aquosa, foi colocada num balão de vidro sob agitação, 1000 rpm. A solução polimérica, fase oleosa/orgânica, verteu-se lentamente para o interior do balão. Utilizou-se 16,7 mL de solução polimérica e 167 mL de solução aquosa de modo a atingir uma razão de 1:10 entre as fases. O balão foi mantido em agitação durante 24 h para que ocorresse a formação das microesferas.

Uma vez formadas, adicionou-se 334 mL de água ultrapura ao balão sob agitação, o volume de água ultrapura adicionada relativamente ao volume no interior do balão perfaz um rácio de 2:1. O balão foi mantido em agitação por mais 2 h, sendo posteriormente mantido em repouso durante 24 h para que as esferas precipitassem.

O sobrenadante é depois retirado e o conteúdo do balão vertido para um goblé permanecendo este novamente em repouso até evaporada a totalidade da água. As microesferas podem depois ser recolhidas. A **Figura 3.4** esquematiza o processamento de microesferas pelo método de emulsão óleo-água.

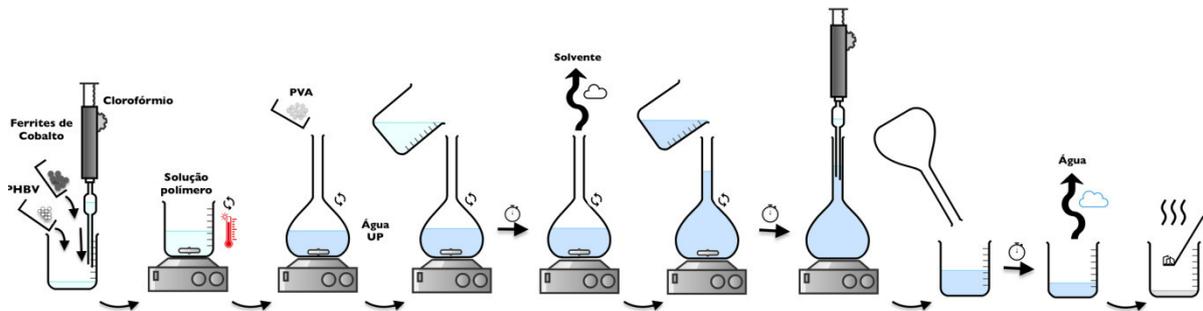


Figura 3.4 – Esquemática do processamento de microesferas por emulsão óleo-água.

3.2.4 Eletrospinning

Na técnica de *eletrospinning*, uma solução polimérica é eletricamente carregada até que uma fibra seja produzida por meio de uma força eletrostática [94,95].

Os elementos básicos são um capilar, comumente uma seringa, onde é mantida a solução polimérica, uma fonte de alimentação, responsável pela geração do potencial elétrico e um coletor de modo a coletar as fibras processadas, **Figura 3.5** [96].

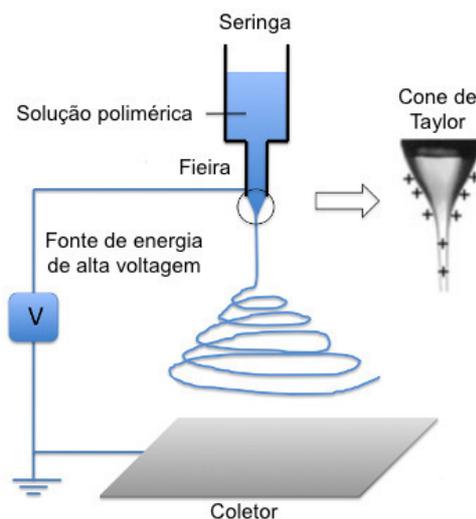


Figura 3.5 – Esquemática do Setup de *eletrospinning*, adaptado de [97].

O fluido no interior da seringa é expelido por compressão mecânica, ar pressurizado ou gravidade [94,96]. Na extremidade da seringa é normalmente acoplada uma agulha metálica, um eletrodo é colocado na agulha [96].

Ao coletor, feito de material condutor, encontra-se acoplado outro eletrodo produzindo um campo elétrico entre solução e coletor [96]. Coletores planos são utilizados para a deposição aleatória de fibras, enquanto os rotativos produzem fibras paralelamente orientadas [95,96].

Quando tensão elétrica é aplicada, ocorre repulsão entre partículas igualmente carregadas da gota na extremidade do capilar. Contrariamente, uma força atrativa é gerada entre as cargas opostas da solução e coletor [94–96].

À medida que a tensão aplicada aumenta, as forças eletrostáticas aumentam relativamente à tensão superficial do líquido [94]. Uma vez superada a tensão superficial, um jato de fluido eletricamente carregado é projetado em direção ao coletor eletrificado [94]. Durante a projeção o jato sofre um movimento de oscilação e estiramento, o solvente evapora, sendo já coletado sob a forma de uma fibra [95]. No orifício por onde o fluido é expelido ocorre a formação de uma estrutura denominada cone de Taylor. Este forma-se devido à força eletrostática gerada no fluido. Inicialmente tem a forma de uma gota que se vai achatando, formando um cone, mediante o aumento da tensão aplicada, **Figura 3.6** [94,95].

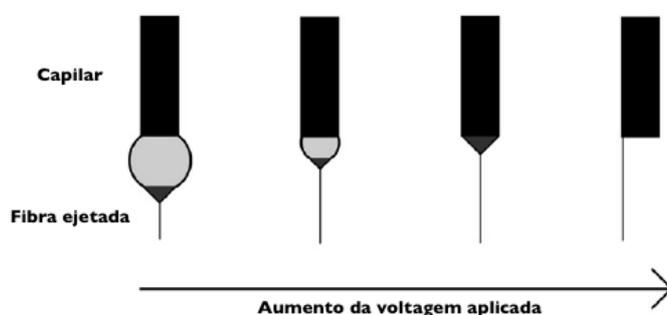


Figura 3.6 – Evolução do cone de Taylor com aumento da voltagem aplicada, adaptado de [102].

O processo de *eletrospinning* é influenciado por um elevado número de parâmetros relativos às condições de processamento, às características da solução ou mesmo ambientais [100,101]. Os diversos parâmetros e respetivos efeitos no produto final apresentam-se de forma resumida na **Tabela 3.3**.

Tabela 3.3 – Parâmetros e efeitos do processo de *eletrospinning* [96,98].

Parâmetros	Efeito na morfologia da fibra
Parâmetros da solução	
Viscosidade	Aumento do diâmetro da fibra com aumento da viscosidade
Concentração do polímero	Aumento do diâmetro da fibra com aumento da concentração
Peso molecular do polímero	Redução do número de gotas com aumento do peso molecular
Condutividade	Diminuição do diâmetro das fibras com aumento da condutividade
Tensão superficial	Elevada tensão provoca instabilidade no jato
Parâmetros de processamento	
Tensão aplicada	Diminuição do diâmetro da fibra com aumento da tensão aplicada
Distância ao coletor	Diminuição do diâmetro da fibra com aumento da distância
Taxa de fluxo	Aumento do diâmetro das fibras com aumento da taxa de fluxo
Parâmetros ambientais	
Humidade	Elevada humidade resulta em poros circulares nas fibras
Temperatura	Aumento da temperatura resulta na diminuição do diâmetro das fibras

Para a produção das fibras utilizou-se a mesma solução do ponto 3.2.1 A solução foi depois carregada numa seringa e esta colocada na bomba. A distância entre a agulha e o coletor ajustada para 20 cm, a potência da fonte de alimentação para 20 kV e o fluxo da bomba para 2 mL/h.

Para o processamento de fibras não orientadas utilizou-se um coletor estático e para as fibras orientadas, um rotativo como representado na **Figura 3.7**. Todos os outros parâmetros se mantiveram inalterados.



Figura 3.7 – Coletores utilizados durante o processamento de fibras por *eletrospinning*: A - estático e B - rotativo.

A Figura 3.8 esquematiza o processamento de fibras por *eletrospinning*.

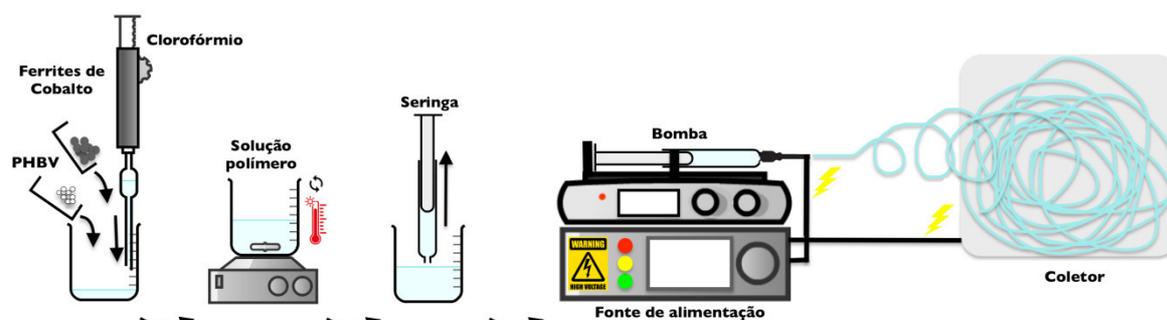


Figura 3.8 – Esquematização do processamento de fibras por *eletrospinning*.

3.3 Técnicas de caracterização

Neste capítulo serão descritas as diversas técnicas utilizadas para a caracterização das morfologias obtidas. Serão descritos os princípios teóricos e componentes principais das técnicas de Microscopia eletrônica de varrimento, Gota séssil, Espetroscopia de infravermelho, Calorimetria diferencial de varrimento, Termogravimetria analítica e Magnetometria de amostra vibratória. Adicionalmente, serão também indicados os princípios básicos do seu funcionamento tal como as condições de análise utilizadas para cada uma das técnicas.

3.3.1 Microscopia eletrônica de varrimento

A microscopia eletrônica de varrimento (SEM do inglês *Scanning Electron Microscopy*) é, atualmente, umas das técnicas mais utilizadas para a caracterização morfológica de superfícies nas áreas de processamento de materiais, biologia, ciências forenses e semi-condutores [99]. Permite a

visualização de uma grande diversidade de materiais com elevada resolução e profundidade de campo chegando, em alguns casos a 0,7 nm [100].

O método mais comum de obtenção de imagens é a detecção de eletrões secundários. No entanto, o equipamento pode recolher sinais distintos através da utilização de módulos complementares como detetores de eletrões Auger, eletrões retrodifundidos, catodoluminescência ou raios-X (EDX), que permite uma análise complementar da composição química da amostra [100,101].

Na **Figura 3.9** está representado um microscópio eletrónico de varrimento. É composto por um canhão de eletrões, o elemento onde ocorre a produção do feixe [100,101]. O aparelho possui também um ânodo e uma lente condensadora, estes componentes são responsáveis pela concentração do feixe de eletrões [100,101]. Uma lente eletromagnética defletora controla a direção do feixe possibilitando o varrimento controlado da amostra [100,101]. Os detetores são posteriormente responsáveis pela detecção dos eletrões [100]. O sinal dos detetores é processado digitalmente criando-se uma imagem tridimensional. A análise necessita ser realizada numa câmara de vácuo de modo a isolar os eletrões de possíveis interações com partículas presentes no ar [99,100].

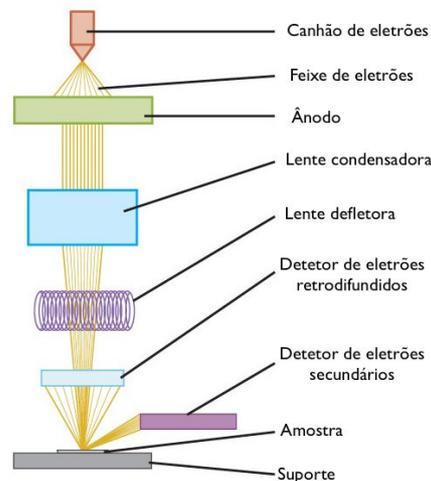


Figura 3.9 – Esquematização dos componentes principais do SEM, adaptado de [102].

3.3.1.1 Medição e análise

De modo a produzir uma imagem morfológica da amostra, esta é varrida por um feixe de eletrões de elevada intensidade. Quando o feixe incide na amostra provoca um conjunto de interações com os eletrões à sua superfície **Figura 3.10**. Desta interação resultam eletrões Auger, eletrões

secundários, elétrons retro difundidos, raios-X e fótons de variadas energias enquanto os elétrons do feixe, os elétrons primários são dispersos [100,101]. A detecção de elétrons secundários produz imagens com maior resolução devido à grande proximidade entre o detetor e a amostra [100,101].

Quando um feixe de elétrons de elevada intensidade irradia a amostra ocorre excitação dos átomos superficiais levando à emissão de elétrons da banda de valência, os elétrons secundários [100,101]. A topografia da superfície da amostra leva a que estes sejam emitidos com diferentes intensidades. Enquanto a amostra é varrida pelo feixe, um detetor recolhe o sinal dos elétrons secundários. O sinal é processado digitalmente e mediante a intensidade detetada em cada ponto da superfície da amostra é possível uma reconstituição digital da sua superfície [99,100].

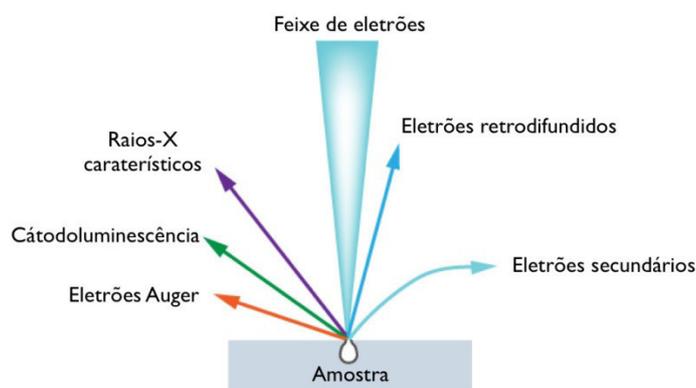


Figura 3.10 – Efeito da interação entre feixe de elétrons e amostra, adaptado de [102].

De modo a obter-se uma imagem, elétrons sejam emitidos da superfície da amostra, esta necessita ser condutora. [103,104]. Quando a capacidade de condução da superfície é reduzida procede-se ao seu revestimento com um filme fino de material condutor [103,104]. Algumas amostras podem não resistir ao vácuo e temperatura elevada do interior da câmara de análise [103] [104]. A fixação e preparação da amostra pode ser importante para garantir que esta permanece ilesa durante a amostragem [104].

3.3.1.2 Condições de análise

A análise superficial por SEM foi realizada num instrumento FEG-SEM Hitachi S4100 com uma aceleração de 3kV.

As amostras foram revestidas com uma fina camada de ouro por *sputtering* numa câmara Polaron SC502.

3.3.2 Avaliação da molhabilidade

A medição de ângulos de contacto é a técnica padrão para a avaliar a resposta hidrofóbica e molhabilidade de superfícies [105–107]. É uma ferramenta comum para a caracterização e controlo de qualidade de materiais e superfícies nas áreas têxtil, semicondutores, polímeros e plásticos, inseticidas, química, metalurgia, entre outras [105,107–109].

O método mais comum para a avaliação da molhabilidade é a medição direta do ângulo de contacto pela técnica da gota séssil recorrendo a um goniómetro telescópico como esquematizado na **Figura 3.11** [105]. O instrumento é composto por uma plataforma, um dispensador, uma luz e uma câmara. A plataforma é a base onde a amostra é colocada. Uma seringa é acoplada ao dispensador que remotamente liberta uma gota na superfície da amostra. Uma luz é feita incidir na amostra para que a câmara capte uma imagem da interface entre gota, material e ar. A posição relativa dos componentes é ajustável para que haja um bom enquadramento e luminosidade e seja conseguida uma boa imagem. O goniómetro é ligado a um computador onde a informação é processada digitalmente o ângulo de contacto [108,110,111].

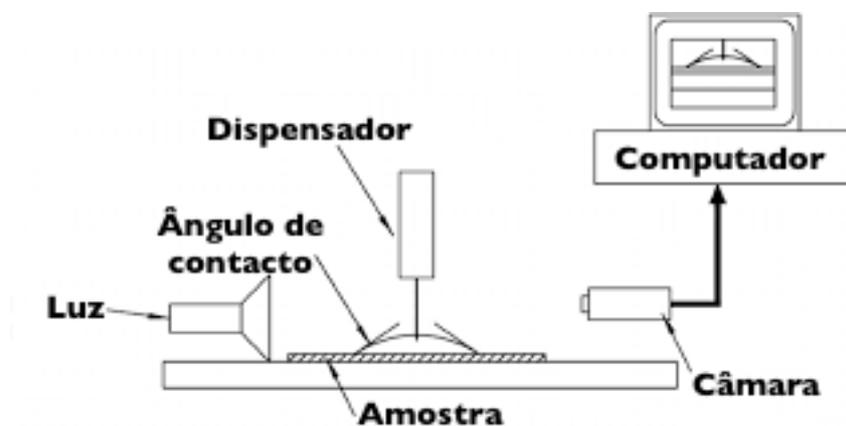


Figura 3.11 – Esquema representativo de um goniómetro telescópico, adaptado de [112].

3.3.2.1 Medição e análise

O grau de molhabilidade é determinado pela medição do ângulo de contacto entre as interfaces líquida, sólida e gasosa. Quando uma gota é colocada numa superfície sólida pode permanecer como uma gota de área finita ou pode espalhar-se indefinidamente pela superfície. A condição para o espalhamento é que a energia ganha pela formação de uma unidade de área da interface líquido-sólido exceda a necessária para formar uma unidade de área da interface líquido-gasosa [113]. O ângulo de contacto θ é assim resultado da relação entre as diversas energias

interfaciais de acordo com a **Equação 3.1**, onde γ_{sg} representa a energia interfacial entre as interfaces sólida e gasosa, γ_{sl} sólida e líquida e γ_{lg} líquida e gasosa [105,113].

$$\gamma_{lg} \cos \theta = \gamma_{sg} - \gamma_{sl} \quad \text{Equação 3.1}$$

Deste modo existe uma relação de proporcionalidade direta entre o ângulo de contacto e a hidrofobicidade da superfície medida, resultante de interações entre interfaces nos 3 estados da matéria, **Figura 3.12** [107,114]. As superfícies são consideradas hidrofílicas para valores de θ inferiores a 90° e hidrofóbicas para valores superiores a 90° [106].

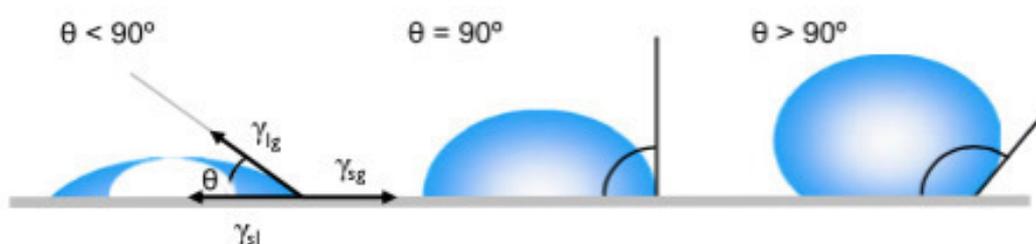


Figura 3.12 – Representação de ângulo de contacto entre as interfaces sólida/líquida e líquida/gasosa, adaptado de [106].

3.3.2.2 Condições de análise

Para a medição dos ângulos de contacto utilizou-se uma gota de 3 ml de água destilada à temperatura ambiente, num instrumento OCA15 Dataphysics contact angle analyser. Para cada amostra foram realizadas 6 medições em locais diferentes.

3.3.3 Espetroscopia infravermelho com transformadas de Fourier - Refletância total atenuada

A técnica de Espetroscopia de infravermelho com transformadas de Fourier (FTIR do inglês *Fourier Transformed Infrared Spectroscopy*) é a única técnica que permite, através da análise das vibrações moleculares de grupos funcionais, caracterizar a estrutura molecular de um composto [115].

Através da medição da energia absorvida pela amostra a diferentes números de onda na gama IV, os grupos funcionais presentes na amostra podem ser identificados uma vez que absorvem níveis de energia específicos [115,116].

3.3.3.1 Medição e análise

A obtenção de um espectro infravermelho passa inicialmente por fazer incidir na amostra um feixe de radiação dentro da gama. Na extremidade oposta encontra-se um detetor. A energia do feixe incidente é variada percorrendo todo o espectro da gama IV, correspondente à região da radiação eletromagnética compreendida entre os 4000 cm⁻¹ e os 400 cm⁻¹ [115,116].

Comparando a intensidade dos feixes incidente e detetado é possível determinar a fração transmitida, através da qual se calcula a transmitância (T), I/I_0 , verificando-se a lei de Lambert-Beer, **Figura 3.13** [116].

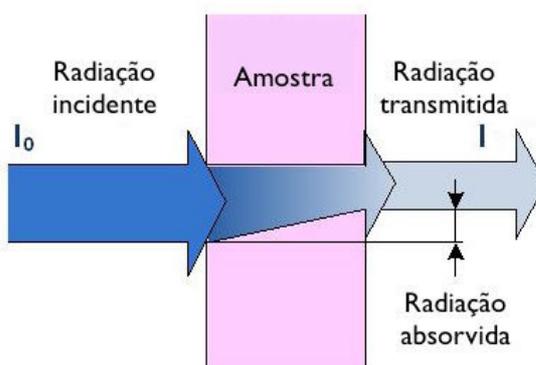


Figura 3.13 – Ilustração da lei de Lambert-Beer, adaptado de [117].

Através da transmitância pode deduzir-se a absorvância pela **Equação 3.2**, uma vez que esta não pode ser medida diretamente pela técnica [118].

$$A = \log \left(\frac{I_0}{I} \right) \qquad \text{Equação 3.2}$$

Para que ocorra absorção de energia é necessária uma alteração do momento dipolar da ligação química ou grupo funcional decorrente da sua rotação ou vibração decorrentes [116]. A vibração pode ter origem na alteração do comprimento da ligação, estiramento, variação do ângulo de ligação ou deformação, **Figura 3.14** [116].

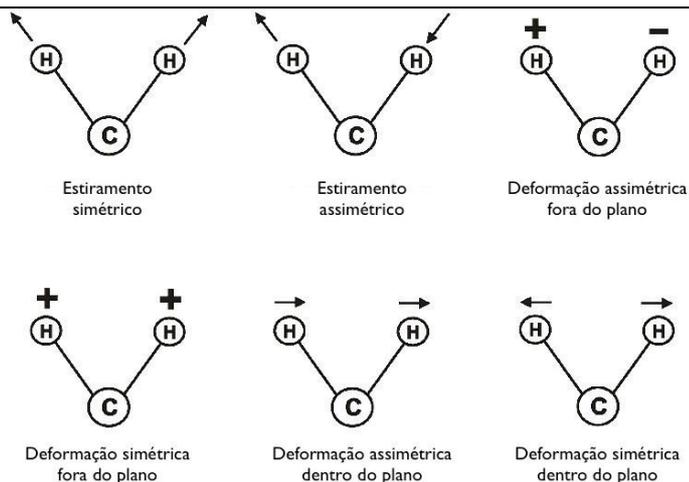


Figura 3.14 – Representação dos vários mecanismos vibracionais, adaptado de [119].

Uma vez que os grupos funcionais possuem níveis de energia bem definidos pode determinar-se a composição química qualitativa do material, ou alterações da mesma, através da comparação dos picos do seu espectro de absorção IV com uma base de dados, **Figura 3.15** [115,116,118].

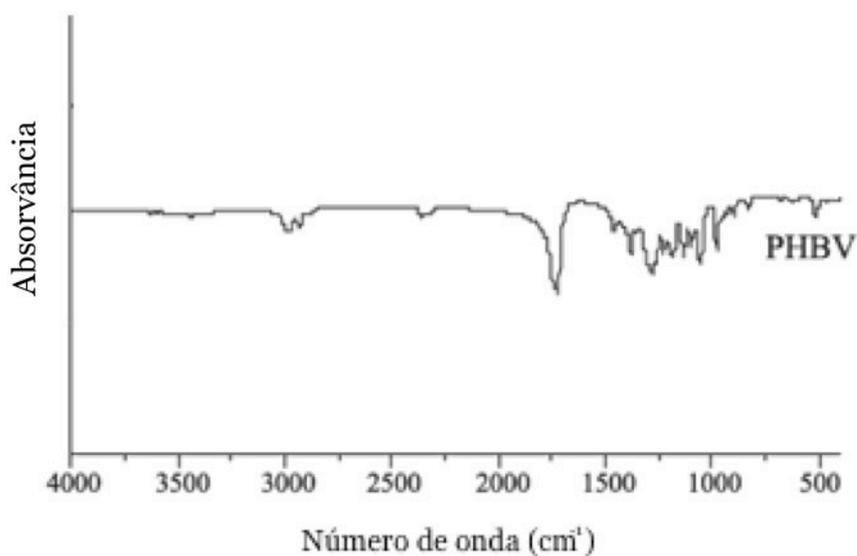


Figura 3.15 – Espectro de absorção IV do PHBV, adaptado de [120].

3.3.3.2 Condições de análise

A análise foi realizada num aparelho Jasco FT/IR 4100 com transformadas de Fourier, com uma resolução de 4 cm^{-1} na região compreendida entre os 4000 e os 600 cm^{-1} .

O espectro foi obtido através de 64 varrimentos.

3.3.4 Calorimetria diferencial de varrimento

A calorimetria diferencial de varrimento (DSC do inglês *Direct Scanning Calorimetry*) é uma técnica termoanalítica simples e rápida, tanto na preparação de amostras como na utilização da instrumentação, justificando assim a sua alargada aplicação [121].

É capaz de medir as alterações térmicas e a temperatura a que ocorrem através do aquecimento, arrefecimento ou manutenção isotérmica da amostra, permitindo a sua caracterização térmica através da determinação e caracterização dos processos de vitrificação, cristalização e fusão [121,122].

A grandeza principal medida é o fluxo de calor da amostra em função da temperatura ou tempo, por convenção exprime-se em mW no eixo vertical [121,122].

O aparelho de DSC é constituído por duas câmaras, a da amostra e a de referência como demonstrado na **Figura 3.16**. Ambas são mantidas à mesma temperatura e aquecidas a um ritmo constante. Devido à distinta capacidade calorífica entre amostra e referência o fluxo de calor fornecido é diferente. Através da variação do fluxo da amostra as transições térmicas são determinadas. [121,122].

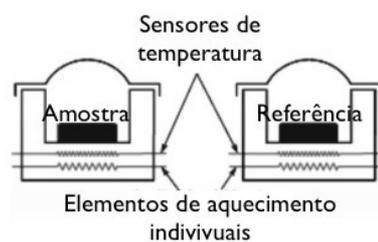


Figura 3.16 – Esquema do aparelho de DSC, adaptado de [123].

3.3.4.1 Medição e análise

A análise dos termogramas de DSC permite a caracterização térmica da amostra. A transição vítrea (T_g) é observada pelo aumento do fluxo de calor, reflexo do aumento da capacidade térmica decorrente da maior mobilidade das cadeias poliméricas. [121,122]. Ocorre dentro dum intervalo de temperaturas, convencionando-se a T_g como o ponto médio [121,122].

As entalpias (ΔH_c e ΔH_m) e temperaturas (T_c e T_m) de cristalização e fusão, respetivamente, podem ser determinadas pela análise do termograma [121,122]. Sendo a cristalização um processo

exotérmico, assume a forma de um pico acompanhado por uma diminuição do fluxo de calor [121,122]. O processo de fusão, endotérmico, é registado sob a forma de um pico acompanhado por um aumento do fluxo de calor. [121,122]. Em ambos os casos as temperaturas são determinadas pelo máximo/mínimo do pico e respetivas entalpias calculadas através do valor do seu integral, **Figura 3.17** [121].

A análise de DSC permite também estimar a grau de cristalinidade do polímero através da **Equação 3.3**, uma vez que as fases cristalina e amorfa diferem na entalpia de fusão [121,124].

$$X_c = (\Delta H_m - \Delta H_c) / \Delta H_m^0 \quad \text{Equação 3.3}$$

Sendo, X_c o grau de cristalinidade, ΔH_c a entalpia de fusão, ΔH_m a entalpia de fusão medida experimentalmente e ΔH_m^0 a entalpia de fusão do polímero 100% cristalino, em que ΔH_m^0 (PHBV) = 146,6 J/g [121,124–126].

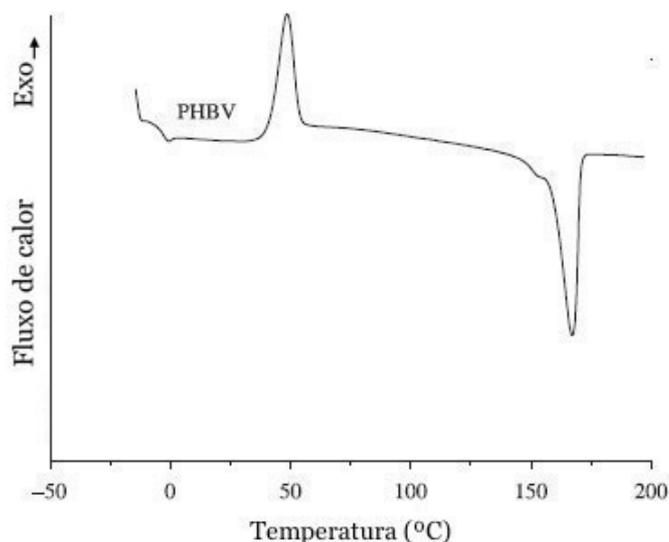


Figura 3.17 – Curva típica de DSC, adaptado de [127].

3.3.4.2 Condições de análise

A análise de DSC foi realizada num aparelho Mettler Toledo DSC822^o, entre 0 e 200 °C a uma velocidade de aquecimento de 10 °C/min em atmosfera de azoto e recipientes de alumínio. O *software* de aquisição foi o Mettler Toledo STAR^o.

Utilizou-se uma atmosfera de azoto líquido uma vez que é um gás inerte e permitir iniciar a análise a uma temperatura inferior à ambiente.

3.3.5 Termogravimetria analítica

A análise termogravimétrica (TGA do inglês *Thermogravimetric Analysis*) é um método instrumental de análise calorimétrica. A técnica permite seguir a variação de massa da amostra em função da sua temperatura. Esta pode estar relacionada com fenómenos de oxidação, desidratação ou degradação do material [128].

Utiliza-se frequentemente como técnica complementar ao DSC sendo maioritariamente utilizada para determinação da estabilidade térmica ou oxidativa de materiais poliméricos [129,130].

A técnica de TGA permite quantificar reações de perda de solvente/água, percentagens de incorporação e perda de plastificador, reações de descarboxilação, pirolise, oxidação, decomposição entre outras aplicações [129,130]. A maioria das análises é realizada durante o aquecimento havendo, no entanto, ensaios onde informação pode ser retirada do processo de arrefecimento [129].

3.3.5.1 Medição e análise

A grandeza medida pela técnica é a massa da amostra. Um termograma de TGA exprime a massa das amostras no eixo vertical, em mg ou %, em função da temperatura ou tempo [131].

A balança é o elemento responsável pela medição da grandeza e possui acoplado à sua haste um sensor de temperatura [128].

Adicionalmente o aparelho possui uma fornalha que cobre a amostra e cria uma atmosfera controlada no seu interior [128]. O sistema possui um gás de purga, geralmente inerte, de modo a evitar reações com a amostra e melhorar a condução de calor [129]. A seleção de um gás de purga permite adicionalmente análises em atmosferas oxidantes/redutoras, de modo a caracterizar reações *redox*, [129]. A **Figura 3.18** esquematiza os principais componentes do instrumento de TGA.

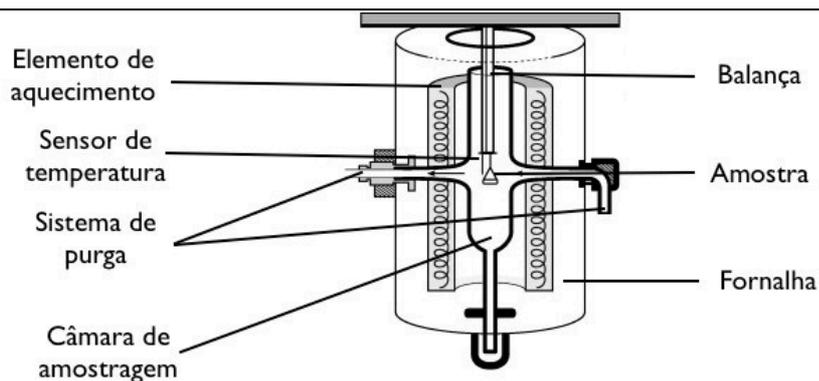


Figura 3.18 – Esquema de um aparelho de TGA, adaptado de [132].

Através da análise do termograma de TGA, **Figura 3.19** várias elações podem ser retiradas relativamente à amostra. Em primeira instância, pode aferir-se a estabilidade térmica do material [131]. Os pontos de decréscimo e estabilização da massa indicam intervalo de temperaturas de degradação [131]. O declive da curva indicia a rapidez da degradação [131].

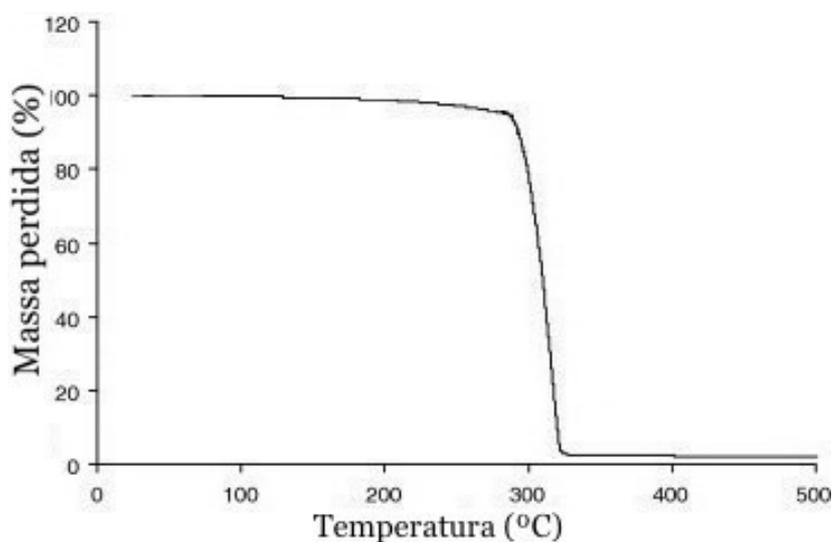


Figura 3.19 – Termograma de PHBV, adaptado de [133].

3.3.5.2 Condições de análise

A análise de TGA foi realizada num aparelho Mettler Toledo TGA/SDTA 851^o Thermobalance, entre 25 e 900 °C a uma velocidade de aquecimento de 10 °C/min em atmosfera de azoto em recipientes de alumina. O *software* de aquisição foi o Mettler Toledo STAR^e.

3.3.6 Magnetometria de amostra vibratória

O magnetómetro de amostra vibratória (VSM do inglês *Vibrating Sample Magnetometer*) é um instrumento capaz de realizar medições do momento magnético de uma amostra [134]. É uma técnica direta uma vez que envolve a medição macroscópica de propriedades magnéticas provocadas pela oscilação da amostra [135].

Permite medições de curvas de magnetização, momentos de saturação, suscetibilidade magnética e anisotropia de pequenas amostras ferromagnéticas com elevada sensibilidade e simplicidade e em função de temperatura, campo magnético ou orientação cristalográfica [134,136].

3.3.6.1 Medição e análise

Os mecanismos de medições magnéticas de indução, como o VSM, envolvem a observação da voltagem induzida numa bobina de deteção pela alteração do fluxo quando o campo magnético, o posicionamento das bobinas ou da amostra é alterado [134,137]. Este tipo de mecanismo de indução baseia-se na lei da indução de Faraday, segundo a qual a voltagem ε induzida na bobina é proporcional à variação do fluxo magnético Φ , ao longo do tempo t **Equação 3.4** [138,139].

$$\varepsilon = -\left(\frac{d\phi}{dt}\right) \qquad \text{Equação 3.4}$$

Na técnica de VSM a alteração é causada pela vibração da amostra a uma frequência e fase conhecidas quando sujeita a um campo magnético uniforme gerado pelos eletroímãs. A vibração da amostra provoca uma distorção do campo magnético. As bobinas de deteção, detetam as distorções do campo magnético convertendo-as num sinal elétrico permitindo que este seja registado e manipulado digitalmente [135,137]. O sinal detetado é assim uma função da posição da amostra [137].

A **Figura 3.20** representa um esquema dos componentes principais do VSM.

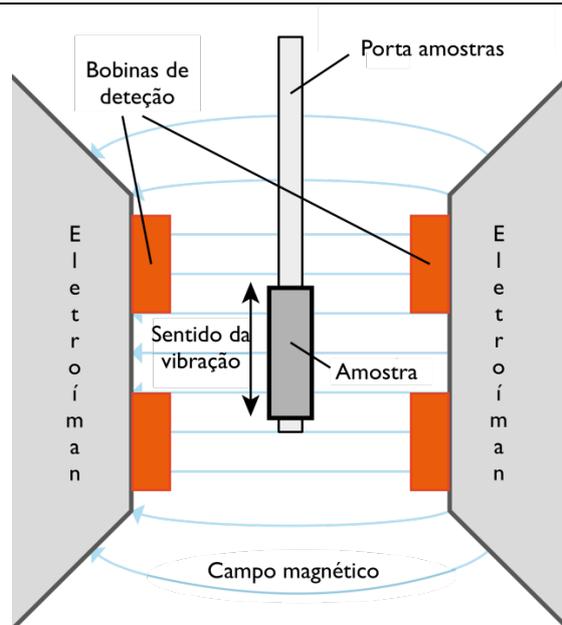


Figura 3.20 – Esquema dos componentes do instrumento de VSM, adaptado de [135].

Um gráfico de histerese pode ser obtido por VSM [140]. A amostra é sujeita a um campo magnético intenso até que seja atingida a saturação, com os dipolos magnéticos orientados com o campo, **Figura 3.21**.

O momento de saturação é perceptível no gráfico da histerese. Uma vez que o declive da curva de magnetização se aproxima de zero, um aumento da intensidade do campo aplicado não se reflete numa maior magnetização da amostra uma vez que todos os seus dipolos estão já alinhados [140,141].

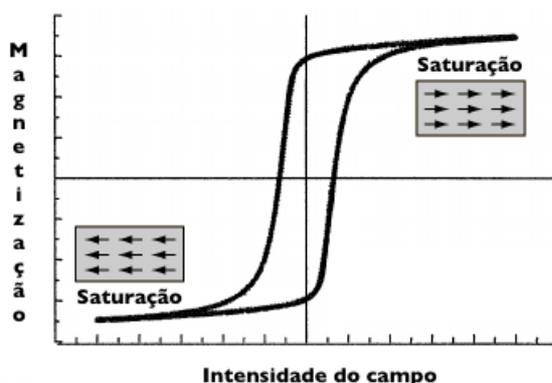


Figura 3.21 – Gráfico de uma curva de histerese, adaptado de [142].

Conhecendo a natureza dos componentes magnéticos presentes numa amostra a sua massa pode ser quantificada recorrendo à análise gráfica da curva de histerese uma vez que o valor da magnetização das partículas seja conhecido. Uma vez atingido o ponto de saturação, o valor da magnetização é proporcional à massa de partículas magnéticas presentes na amostra [140].

Conhecendo simultaneamente a massa da amostra e a massa de partículas magnéticas presentes na mesma possibilita-se a dedução da proporção de partículas magnéticas na amostra e eficiência de incorporação.

3.3.6.2 Condições de análise

A análise foi realizada num magnetómetro de amostra vibrante MicroSense EZ7-VSM.

Para a obtenção do gráfico de histerese foram realizadas medições até uma magnetização máxima de 18000 Oersted (Oe) a temperatura ambiente.

Entre 18000 e 3000 Oe realizaram-se medições a cada 1000 Oe, entre 2900 e -2900 Oe a cada 100 Oe, de -3000 a -18000 Oe a cada 1000 Oe, dos -18000 aos -3000 Oe a cada 1000 Oe, entre os -2900 a 2900 Oe a cada 100 Oe e dos 3000 aos 18000 Oe a cada 1000 Oe.

3.4 Ensaio de degradação

Realizou-se um ensaio de degradação de modo a simular as condições encontradas pelas amostras após o implante *in vivo*, acompanhando o processo e a variação de massa. Para tal, preparou-se um fluido de simulação do plasma humano (SBF do inglês *Simulated body fluid*), **Tabela 3.4**, no qual as amostras foram mantidas a temperatura fisiológica e retiradas em intervalos regulares.

Tabela 3.4 – Comparação das concentrações de vários iões presentes no plasma e em SBF [143].

Iões	Concentração (mM)		
	Plasma		SBF
	Total	Dissociado	
Na ⁺	142,0	142,0	142,0

K ⁺	5,0	5,0	5,0
Mg ²⁺	1,5	1,0	1,5
Ca ²⁺	2,5	1,3	2,5
Cl ⁻	103,0	103,0	147,8
HCO ₃ ⁻	27,0	27,0	4,2
HPO ₄ ²⁻	1,0	1,0	1,0
SO ₄ ²⁻	0,5	0,5	0,5

3.4.1 Preparação da solução SBF

O fluido de simulação corporal (SBF do inglês *Simulated body fluid*) foi preparado de acordo com [143]. Os constituintes foram colocados pela ordem indicada na **Tabela 3.5** em 700 mL de água ultrapura num recipiente de 1 L mantido sob agitação magnética a 37 °C. Cada um dos constituintes foi adicionado após a total dissolução do componente precedente. Uma vez dissolvidos na totalidade, o pH foi ajustado pela adição de ácido clorídrico (HCl) 1 M até se atingir o pH do plasma, 7,4. A solução foi depois transferida para um balão volumétrico de 1 L e o seu volume perfeito através da adição de água ultrapura. Transferiu-se a solução para um recipiente apropriado e armazenou-se a 4 °C. A solução possui uma validade máxima de 1 mês antes que ocorra alguma alteração da concentração de iões.

Tabela 3.5 – Reagentes utilizados na preparação do SBF [143].

Reagente	Nomenclatura	Pureza (%)	Quantidade (g; mL)	Massa molecular (g/mol)
NaCl	Cloreto de sódio	99,5	8,04	58,44
NaHCO ₃	Hidrogenocarbonato de sódio	99,5	0,36	84,01
KCl	Cloreto de potássio	99,5	0,23	74,55

$K_2HPO_3 \cdot H_2O$	Fosfato dipotássico trihidratado	99,0	0,23	228,22
$MgCl_2 \cdot 6H_2O$	Cloreto de magnésio hexahidratado	98,0	0,31	203,30
HCl (1 M)	Ácido Clorídrico	-	39	-
$CaCl_2$	Cloreto de cálcio	95,0	0,29	110,98
Na_2SO_4	Sulfato de Sódio	99,0	0,07	142,04
brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazol	Tris(hidroximetil) aminometano	99,0	6,12	121,14

3.4.2 Metodologia de degradação

As diferentes amostras (filmes, *scaffolds* e fibras não orientadas, com e sem ferrites de cobalto) foram cortadas em pequenos pedaços (1 cm^2) e as suas massas medidas. Posteriormente foram colocadas em placas de 12 poços, aos quais se adicionou um volume de 3 mL de SBF. A solução foi substituída semanalmente de modo a manter a concentração iónica e pH constantes. As amostras foram mantidas em atmosfera controlada a $37 \text{ }^\circ\text{C}$. Estas foram colocadas simultaneamente e retiradas em intervalos regulares de 2, 4, 6 e 8 semanas [144–147].

Após cada tempo definido, as amostras foram retiradas e colocadas a temperatura ambiente até à total evaporação do fluido e as suas massas medidas novamente. As microesferas e fibras orientadas não foram utilizadas, as primeiras devido à impossibilidade de renovar o meio de cultura sem provocar perda do material, as segundas uma vez que diferem das fibras orientadas unicamente na orientação.

Realizaram-se quatro réplicas para cada um dos tempos e para cada tipo de morfologia.

3.5 Ensaio de citotoxicidade

Foi realizado um ensaio de avaliação indireta de citotoxicidade, adaptado do método padrão ISO 10993-5 [148]. A citotoxicidade foi avaliada através do cálculo da viabilidade celular pelo ensaio colorimétrico brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio (MTT). O ensaio permite avaliar a atividade metabólica mitocondrial que reflete o número de células viáveis, quantificáveis através da sua leitura num espectralfluorímetro [149,150].

3.5.1 Preparação dos meios e cultura celular

Preparou-se inicialmente um meio de extração (meio em contacto com as diferentes amostras) por imersão das amostras (discos de 13 mm de diâmetro) em 500 µL de meio de cultura em placas de cultura celular de 24 poços, incubadas durante 24 h a 37 °C em atmosfera de 5% de CO₂ com 95% de humidade. Utilizou-se como meio DMEM (do inglês *Dulbecco's modified Eagle's medium*, Gibco) com concentração de glucose de 1 g/L suplementado com 10% de FBS (do inglês *Fetal bovine serum*, Biochrom). Para o controlo positivo utilizou-se uma solução de 20% dimetilsulfoxido (DMSO) e para o controlo negativo meio de cultura celular.

Paralelamente à preparação do meio de extração, realizou-se uma cultura celular pré-osteoblástica da linha MC3T3-E1. As células foram colocadas em expansão em placas de cultura de tecidos de 96 poços com um volume de 100 µL de meio DMEM (Gibco) com concentração de glucose de 1 g/L suplementado com 10% de FBS (Biochrom) e uma densidade celular de 2x10⁴ células/mL durante 24 h. As células foram incubadas sob condições standardizadas, isto é a uma temperatura de 37 °C em atmosfera com 95% de humidade e 5% de CO₂.

3.5.2 Metodologia de avaliação da citotoxicidade

Após a preparação paralela do meio de extração e da cultura celular indicados no ponto anterior, o meio da cultura celular foi descartado tendo sido substituído por 100 µL do meio de extração. Após isso, procedeu-se à incubação da cultura durante períodos de 24 h e 72 h a 37 °C em atmosfera com 95% de humidade e 5% de CO₂.

Após cada tempo, o meio foi substituído por um novo meio contendo 10% de solução de MTT (solução stock contendo 5 mg/mL de MTT em PBS). Depois de incubação durante 2 h, os cristais de MTT foram dissolvidos em DMSO e a densidade ótica medida a 570 nm [148]. Os resultados foram obtidos a partir de 4 réplicas por amostra e controlo tendo sido analisada a viabilidade celular e desvio padrão de acordo com a **Equação 3.5** [148].

$$Viabilidade\ celular\ (\%) = \frac{Absorv\ancia\ da\ amostra}{Absorv\ancia\ do\ controlo\ negativo} \times 100 \quad \text{Equação 3.5}$$

Capítulo 4

Resultados e discussão

Neste capítulo serão apresentados e discutidos os resultados obtidos durante a análise experimental. Serão inicialmente apresentados e discutidos resultados relativos à caracterização físico-química dos materiais, os resultados dos ensaios de degradação dos materiais e por fim os resultados dos ensaios de citotoxicidade.

Para uma melhor e mais fácil interpretação dos resultados a nomenclatura das diversas morfologias tal como a sua composição, descrição e técnicas utilizadas para o seu processamento estão listadas na **Tabela 4.1**.

Tabela 4.1 – Abreviatura, composição, descrição e técnicas utilizadas no processamento dos diferentes materiais.

Nomenclatura	Composição	Morfologia	Técnica
Microesfera	PHBV	Microesfera	Emulsão óleo/água
Microesfera Co	PHBV, CoFe ₂ O ₄		
Filme	PHBV	Filme	<i>Solvent-casting</i>
Filme Co	PHBV, CoFe ₂ O ₄		
Fibra NO	PHBV	Fibras não orientadas	<i>Eletrospinning</i>
Fibra NO Co	PHBV, CoFe ₂ O ₄		
Fibra O	PHBV	Fibras orientadas	<i>Solvent-casting/</i>
Fibra O Co	PHBV, CoFe ₂ O ₄		
<i>Scaffold</i>	PHBV	<i>Scaffold 3D</i>	<i>Particulate leaching</i>
<i>Scaffold Co</i>	PHBV, CoFe ₂ O ₄		

4.1 Caracterização morfológica

A caracterização morfológica envolve o registo e observação detalhada da superfície das amostras. Adicionalmente, várias características morfológicas podem ser determinadas, nomeadamente o registo das dimensões das várias morfologias processadas.

4.1.1 Caracterização das microesferas

Na Figura 4.1A encontra-se apresentada uma imagem da superfície das microesferas de PHBV obtida por SEM. As microesferas apresentam uma forma esférica com poucas irregularidades na sua superfície.

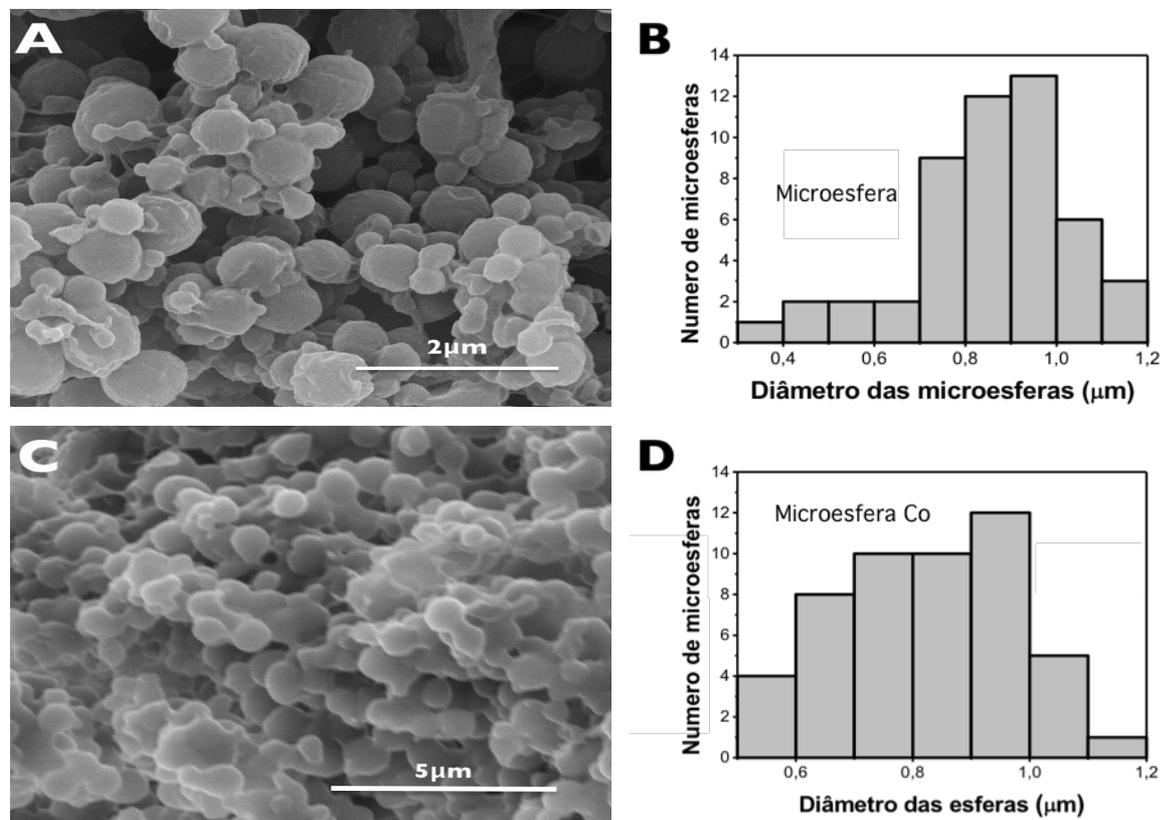


Figura 4.1 – Imagem de SEM das microesferas de PHBV A - sem e C - com ferrites de cobalto; e respectivos histogramas da sua distribuição de tamanhos, B e D.

Através da observação dos histogramas (Figura 4.1B e D) pode retirar-se elações sobre a distribuição. Foram realizadas 50 medições, e é possível observar que os tamanhos das microesferas obtidas variam entre 0,4 e 1,2 μm. No entanto, as microesferas situam-se maioritariamente entre 0,7 e 1,1 μm, sendo a média de tamanhos de $0,8 \pm 0,2 \mu\text{m}$. Os tamanhos das microesferas com ferrites de cobalto situam-se entre 0,6 e 1,2 μm, verificando-se que a maioria das microesferas encontra-se entre 0,6 e 1,0 μm, com um diâmetro médio de $0,8 \pm 0,2 \mu\text{m}$.

Verifica-se que a adição de ferrites de cobalto não provocou alteração do tamanho médio das microesferas. O mesmo foi verificado em microesferas poliméricas de PLLA e PVDF com incorporação de partículas similares [93,151].

4.1.2 Caracterização dos filmes

Na **Figura 4.2** encontram-se apresentadas as imagens da superfície superior e de corte transversal dos filmes de PHBV com e sem ferrites de cobalto.

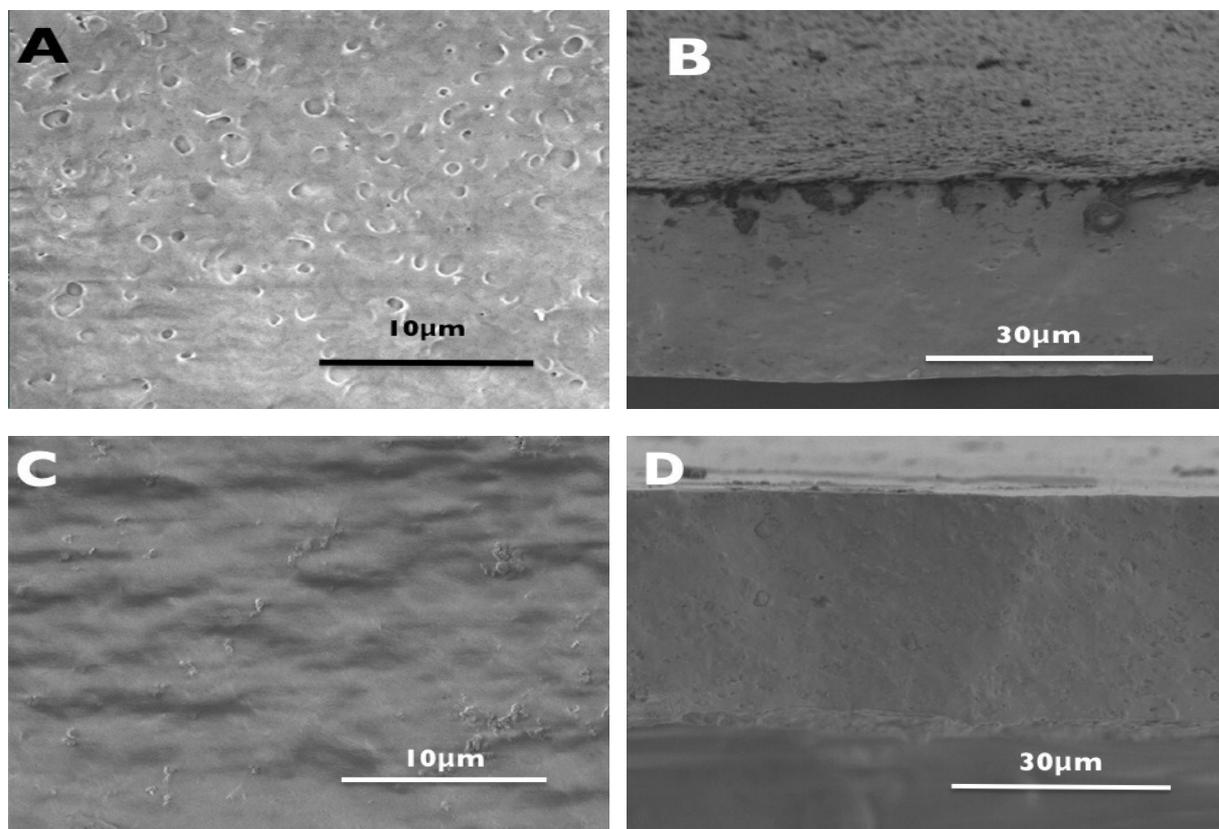


Figura 4.2 – Imagem de SEM de: **A** - superfície e **B** - corte transversal do filme de PHBV; e da **C** - superfície e **D** - corte transversal do filme de PHBV com ferrites de cobalto.

Pode observar-se que nas **Figura 4.2A** e **C** a superfície apresenta-se plana com uma textura lisa repleta de pequenas porosidades superficiais devido à evaporação do solvente.

Na **Figura 4.2B** e **D** verifica-se que o interior do filme é homogéneo e sem defeitos aparentes. Pode verificar-se que o filme é sólido e ausente de porosidades.

Na **Figura 4.2C** e **D** a presença de ferrites de cobalto pode ser observada tanto na imagem superficial como no corte. As partículas apresentam uma distribuição uniforme e dispersa pela matriz do filme sem a presença de aglomerados, adicionalmente aparenta estar totalmente cobertas por uma fina camada de polímero.

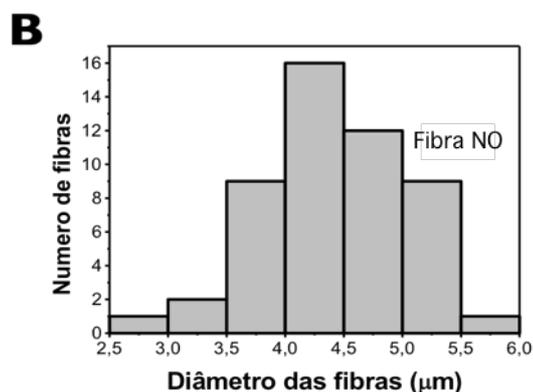
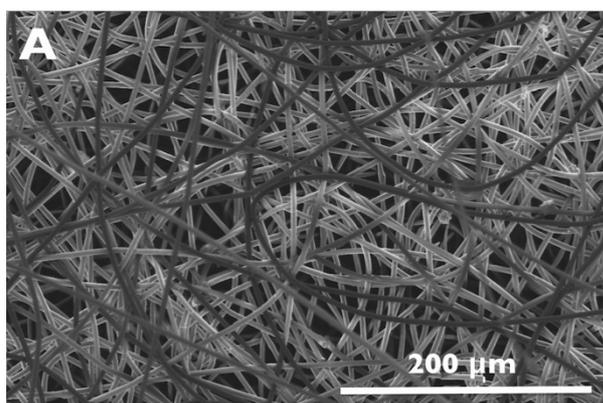
A espessura média para o filme de PHBV é de $31,3 \pm 0,9 \mu\text{m}$ e para o filme de PHBV com ferrites de cobalto de $33,2 \pm 1,0 \mu\text{m}$.

As observações feitas são concordantes com a bibliografia uma vez que mais do que uma vez já foi reportado que o polímero, quando processado segundo a técnica referida no capítulo anterior (3.2.1), origina filmes sólidos ausentes de porosidades [87].

4.1.3 Caracterização das fibras

Na **Figura 4.3** encontram-se apresentadas imagens da superfície das fibras de PHBV processadas por *eletrospinning* juntamente com os histogramas das respectivas distribuições de tamanhos.

As fibras No e O (**Figura 4.3A e C**) apresentam uma superfície lisa e homogênea. A superfície das fibras NO Co (**Figura 4.3E**) e das fibras O Co (**Figura 4.3G**) apresenta uma superfície rugosa e texturizada, tal pode ser atribuído à presença de ferrites de cobalto na sua superfície. Na **Figura 4.3E** pode verificar-se a presença de aglomerados de ferrites de cobalto. As ferrites de cobalto, à exceção dos aglomerados, não são visíveis superficialmente tendo ficado cobertas pelo polímero. As fibras NO (**Figura 4.3A**) e NO Co (**Figura 4.3E**) apresentam uma orientação aleatória sem a presença notória de fibras quebradas. Nos casos das fibras O (**Figura 4.3C**) e O Co (**Figura 4.3G**), as fibras apresentam um alinhamento paralelo como previsto.



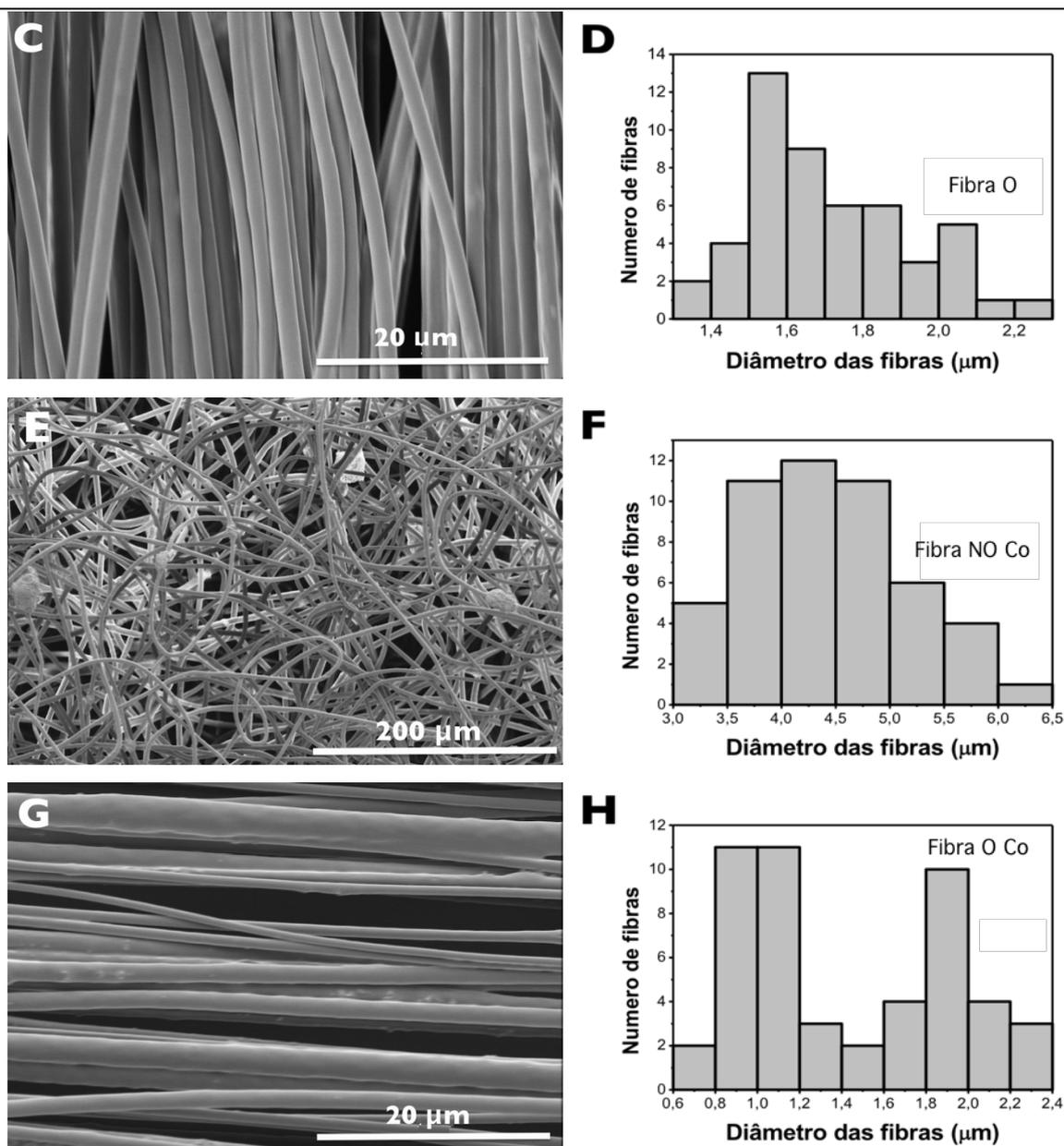


Figura 4.3 – Imagem de SEM das fibras: A - Fibra NO; C - Fibra O; E - Fibra NO Co e G - Fibra O Co, e respectivos histogramas da distribuição de diâmetros das fibras B, D, F e H.

As fibras NO apresentam um diâmetro entre 3,5 e 5,5 μm, com um diâmetro médio de $4,4 \pm 0,6$ μm. O diâmetro médio das fibras O ($1,7 \pm 0,2$ μm) é inferior ao das fibras NO, com valores de fibras entre 3,5 e 5,5 μm. As fibras NO Co situam-se entre 3 e 6 μm com um diâmetro médio de $4,4 \pm 0,7$ μm. Como aconteceu com as fibras O, as fibras O Co apresentam um diâmetro médio inferior ao das fibras NO Co ($1,4 \pm 0,5$ μm), com valores entre 0,8 e 1,2 μm e também entre 1,8 e 2 μm.

Pela observação dos histogramas representativos da distribuição de tamanhos das fibras de PHBV verifica-se inicialmente um menor diâmetro médio das fibras orientadas comparativamente às

fibras não orientadas. Tal efeito pode ser atribuído ao processo de estiramento causado pela rotação do coletor no momento do seu processamento. Considerando que o aumento da distância entre agulha e coletor aumenta a cristalinidade e o estiramento causa alinhamento das cadeias moleculares ao longo do eixo da fibra [152–155].

A distribuição de tamanhos foi também maior no caso de fibras NO e fibras NO Co cujo tamanho oscila em aproximadamente 3,5 μm .

Comparando os casos de fibras com e sem partículas magnéticas não se verificam diferenças notórias relativamente ao diâmetro médio bem como à distribuição de tamanhos. A presença de partículas com uma concentração de 10% (m/m) não provoca alterações morfológicas notórias durante o processamento.

A ligeira diferença de tamanho entre os diâmetros das fibras com e sem ferrites de cobalto pode ser explicado pela maior condutividade devido à presença das partículas aumentar a velocidade de projeção das fibras. Um fator com influência no diâmetro das fibras [96].

Dada uma aplicação em engenharia de tecidos como suporte celular tridimensional, menor diâmetro médio das fibras seria mais adequado, especialmente no caso das fibras não orientadas. Menores diâmetros permitem uma melhor fixação das células ao suporte devido a uma relação de tamanhos mais vantajosa [156]. Ultimamente, o objetivo seria o mimetismo das características da matriz extracelular, cujos diâmetros rondam a escala nanométrica [157].

Futuramente poderiam ser produzidas fibras com tamanhos menores pela otimização das condições de processamento e características da solução processada [156,158].

4.1.4 Caracterização dos *scaffolds*

Na **Figura 4.4** encontra-se apresentada uma imagem de um corte transversal dos *scaffolds* obtidos e respetivos histogramas.

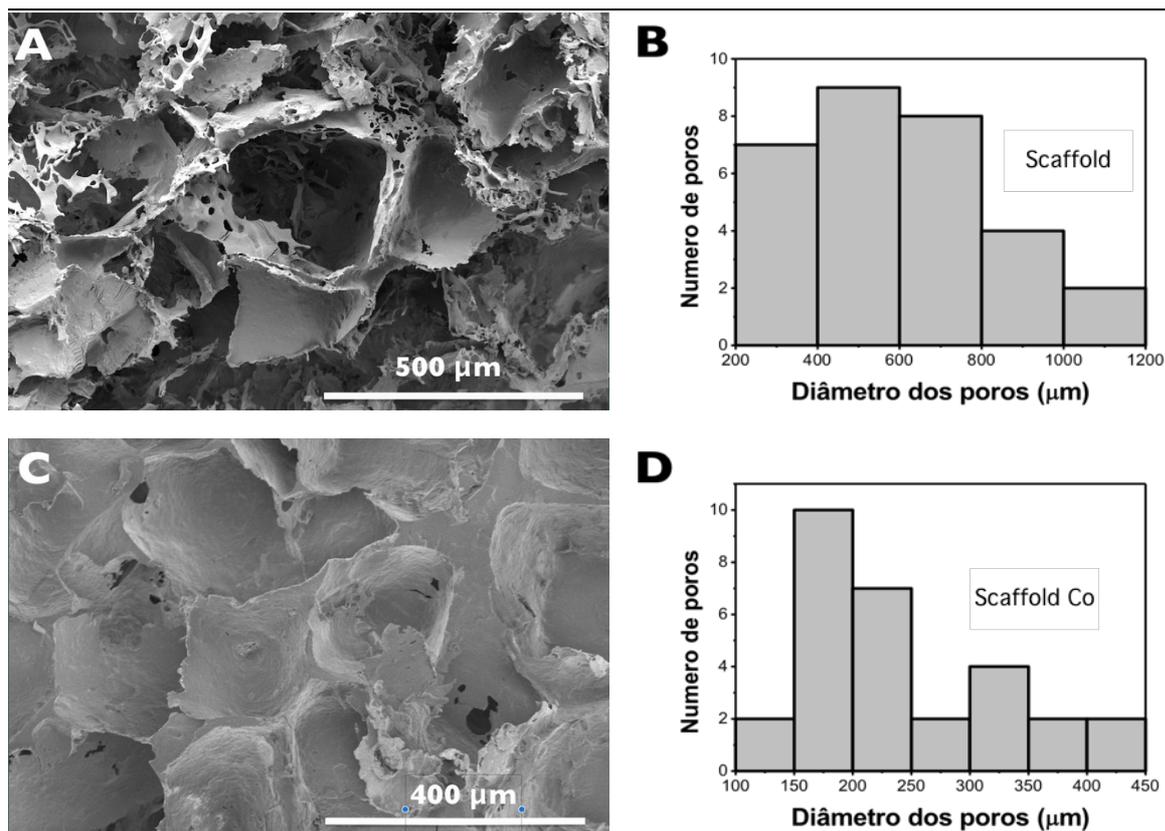


Figura 4.4 – Imagem de SEM do corte transversal do **A** - *Scaffold* e **C** - *Scaffold Co*, e respetivos histogramas da distribuição de tamanhos dos poros, **B** e **D**.

Primeiramente, pela observação da **Figura 4.4** não se verifica a presença de ferrites de cobalto, facto que aponta para uma distribuição uniforme das partículas pelo *scaffold*, totalmente revestidas e ausente de agregados. Este tipo de estrutura apresenta elevada porosidade e conexão interporos, características desejáveis para a aplicação como suporte em engenharia de tecidos uma vez que permitem a circulação livre de fluidos e células pelo *scaffold* e uma boa adesão celular [9,157].

As partículas de sal sofreram dissolução na sua totalidade não se verificando a sua presença no *scaffold* após a lavagem.

Pela análise dos histogramas, **Figura 4.4A** e **C**, verifica-se a presença de poros de dimensão entre 100 e 1200 µm. O tamanho médio dos poros do *scaffold* situa-se entre 200 e 800 µm, com tamanho médio de 605 ± 232 µm. O *scaffold Co* apresenta poros de dimensão média entre 150 e 250 µm, com tamanho médio de 232 ± 73 µm. Diâmetros relativamente maiores do que os indicados pela empresa para o tamanho médio das partículas de sal, entre 262 e 360 µm, que podem ser atribuídos a uma ligeira contração do polímero durante o processo de evaporação do solvente. Os poros apresentam um diâmetro inferior ao ótimo para cultura de células ósseas, >300 µm [159].

4.2 Avaliação da molhabilidade

A molhabilidade das diversas amostras foi avaliada. O ensaio realizou-se pela medição do ângulo de contacto através do método da gota séssil. Os resultados da medição encontram-se representados na **Tabela 4.2**.

Tabela 4.2 – Ângulos de contacto medidos para as várias amostras (média \pm desvio padrão).

Filme	Filme Co	Fibras NO	Fibras NO Co	Fibras O	Fibras O Co	Scaffold	ScaffoldC
90	96	125	128	103	119	97	106
\pm	\pm	\pm	\pm	\pm	\pm	\pm	\pm
12°	4°	2°	2°	11°	5°	13°	9°

Pela análise dos ângulos de contacto, verifica-se que todas as superfícies apresentam um ângulo superior a 90°, sendo por isso consideradas hidrofóbicas [106]. As amostras com ferrites de cobalto apresentaram valores ligeiramente superiores às amostras sem ferrites de cobalto. Tal facto deve-se provavelmente à presença de partículas na superfície que lhe conferem uma microestrutura, sendo um aspeto importante das propriedades de molhabilidade [160]. As fibras apresentam o comportamento mais hidrofóbico de todas, com valores de $128 \pm 2^\circ$, contrariamente aos filmes poliméricos com valores de $90 \pm 13^\circ$. A diferença entre as várias amostras pode ser explicada pelas diferenças morfológicas entre as mesmas, como área superficial e de contacto. Para aplicações biológicas, onde é de interesse a adesão de proteínas e células, são aconselháveis ângulos de contacto inferiores, da ordem dos 60 – 70° [161,162].

4.3 Avaliação das propriedades físico-químicas

Após a avaliação da morfologia e molhabilidade das diferentes estruturas nas quais o polímero PHBV foi processado, foi efetuada a avaliação das suas propriedades físico-químicas de modo a verificar se os diferentes métodos de processamento induziram alterações na estrutura química do polímero e nas suas propriedades térmicas.

4.3.1 Espectroscopia de infravermelho

A análise do espectro infravermelho e consequente determinação dos picos de absorção e comparação com valores bibliográficos de referência permite determinar se o processamento do material provocou alterações nas suas ligações químicas.

Na **Figura 4.5** estão apresentadas as curvas de infravermelho obtidas para as diferentes morfologias.

Tal como se pode visualizar pela **Figura 4.5**, os diferentes métodos de processamento não alteraram as propriedades químicas do polímero. Além disso, comparando a **Tabela 2.2** com os espectros obtidos para as diversas morfologias, as bandas características do polímero foram identificadas, 826 – 979 cm^{-1} e 1227 – 1478 cm^{-1} correspondente à vibração C-H, 1057 cm^{-1} , 1133 cm^{-1} e 1183 cm^{-1} correspondentes à vibração C-O [82].

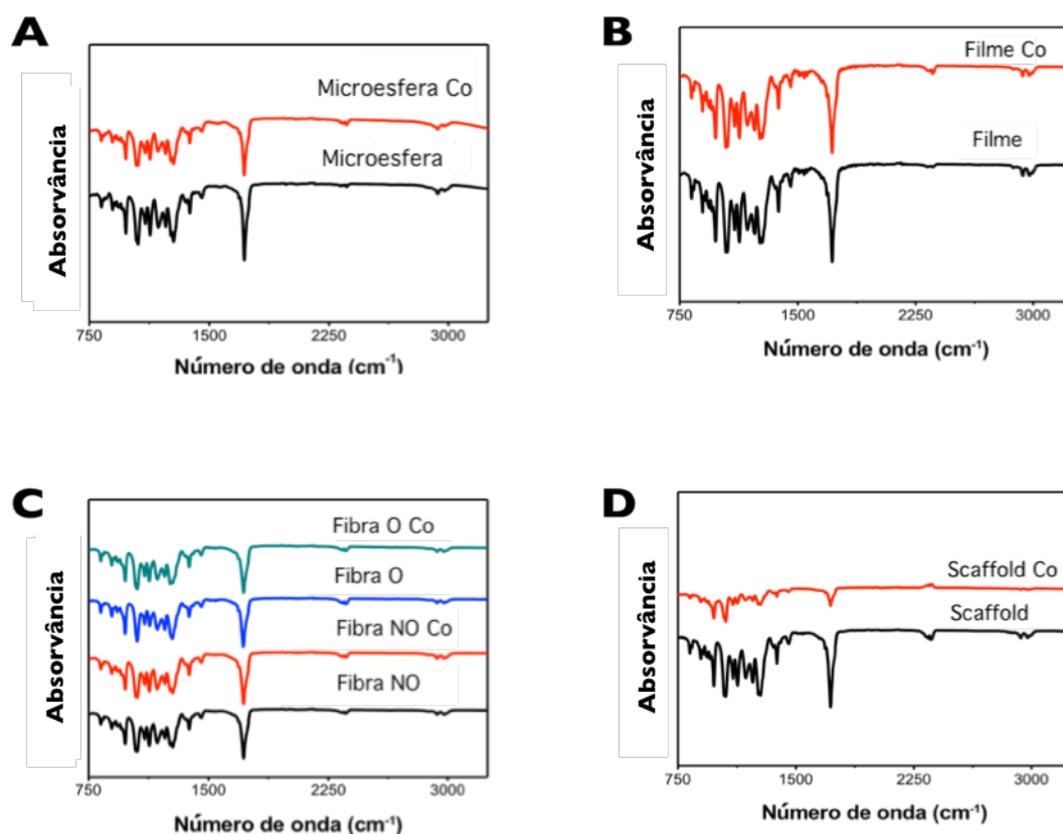


Figura 4.5 – Espectros de infravermelho das diferentes morfologias de PHBV com e sem Co: **A** - microsferas, **B** - filmes, **C** - fibras orientadas e não orientadas e **D** - *scaffolds*.

4.3.2 Calorimetria diferencial de varrimento

A análise dos termogramas de DSC permite compreender se o processamento dos polímeros nas diversas morfologias provocou alteração das suas propriedades térmicas.

Na Figura 4.6 estão representados os termogramas obtidos para as diferentes morfologias de PHBV.

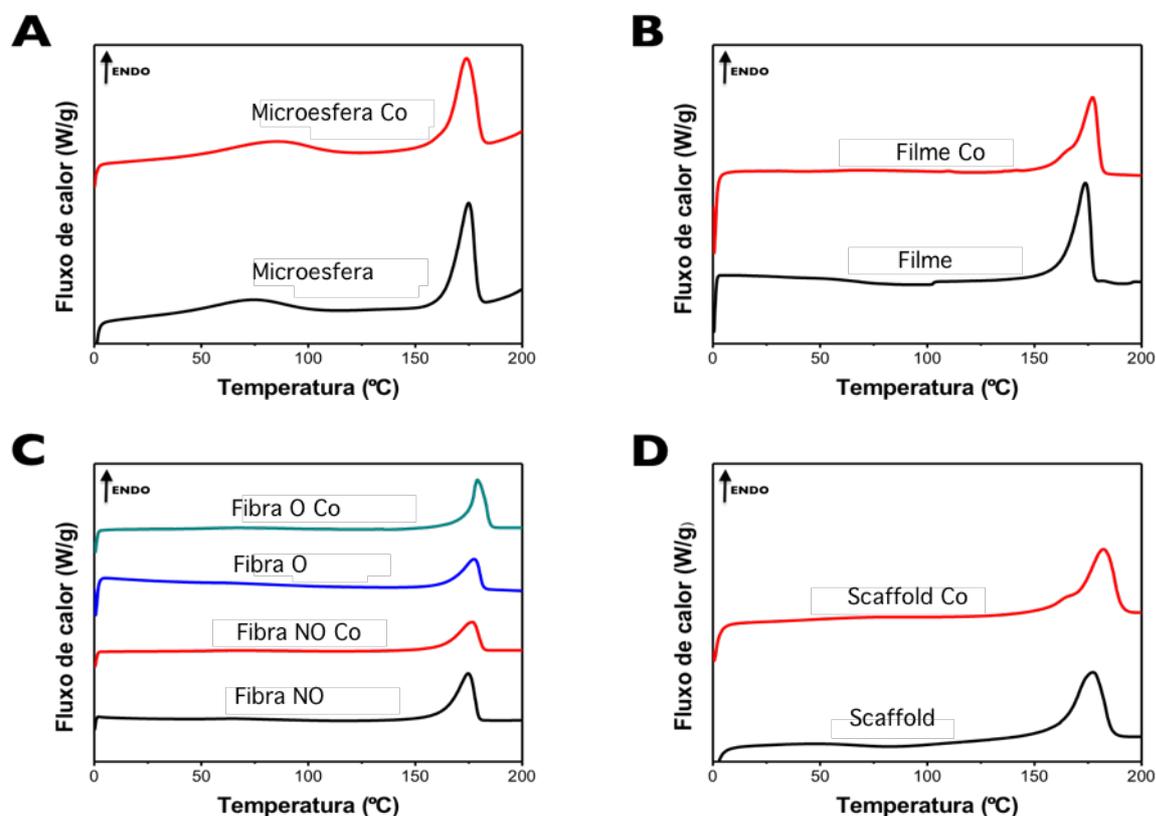


Figura 4.6 – Termogramas obtidos para as diferentes morfologias de PHBV com e sem Co A - microsferas, B - filmes, C - fibras orientadas e não orientadas e D - *scaffolds*.

Na Tabela 4.3 encontram-se sumarizadas as principais propriedades térmicas obtidas pela análise dos respectivos termogramas.

Analisando a Tabela 4.3 é possível observar que a temperatura de fusão não sofreu alteração significativa, quer entre a utilização de polímero puro ou compósito quer com o método de processamento. No entanto, os compósitos apresentaram em todos os casos, à exceção das microsferas, uma temperatura superior à do polímero puro. A maior variação verifica-se no *scaffold* Co com uma magnitude de 4,5 °C. Por outro lado, a entalpia de fusão sofreu variação mais notória. Os compósitos apresentam uma redução mais marcada relativamente ao polímero puro. Em alguns casos chegando a uma redução de 31 °C. A percentagem de cristalização demonstrou diminuir com a presença de partículas magnéticas. A diferença é bastante notória chegando à ordem dos 28%. Era esperada uma diminuição dos valores uma vez que é já referenciado que a presença de partículas

numa matriz polimérica impede a formação de cristalites de maiores dimensões levando à redução verificada [87,163].

Tabela 4.3 – Propriedades térmicas das diversas morfologias de PHBV.

Morfologia	T_m (°C)	ΔH_m (J/g)	X_c (%)
Filme	174	82	56
Filme Co	177	70	48
Fibras NO	175	98	67
Fibras NO Co	177	67	46
Fibras O	177	65	45
Fibras O Co	179	79	54
Microesfera	175	57	39
Microesfera Co	174	57	39
<i>Scaffold</i>	177	63	43
<i>Scaffold Co</i>	182	61	42

Pela observação dos termogramas não se verifica uma alteração notória das propriedades térmicas entre a utilização de polímero ou polímero com partículas magnéticas.

Pode-se assim concluir que a presença de 10% (w/w) de partículas magnéticas, assim como os diferentes métodos de processamento, não provocam nenhuma influência notória nas propriedades térmicas do polímero.

4.3.3 Termogravimetria analítica

A análise termogravimétrica permite seguir a alteração da massa da amostra como consequência da alteração da temperatura. Adicionalmente, pode determinar-se diversos parâmetros relativos à degradação térmica da amostra.

Na **Figura 4.7** encontram-se representadas as curvas de perda de massa obtidas para as diferentes morfologias de PHBV com e sem ferrites de cobalto.

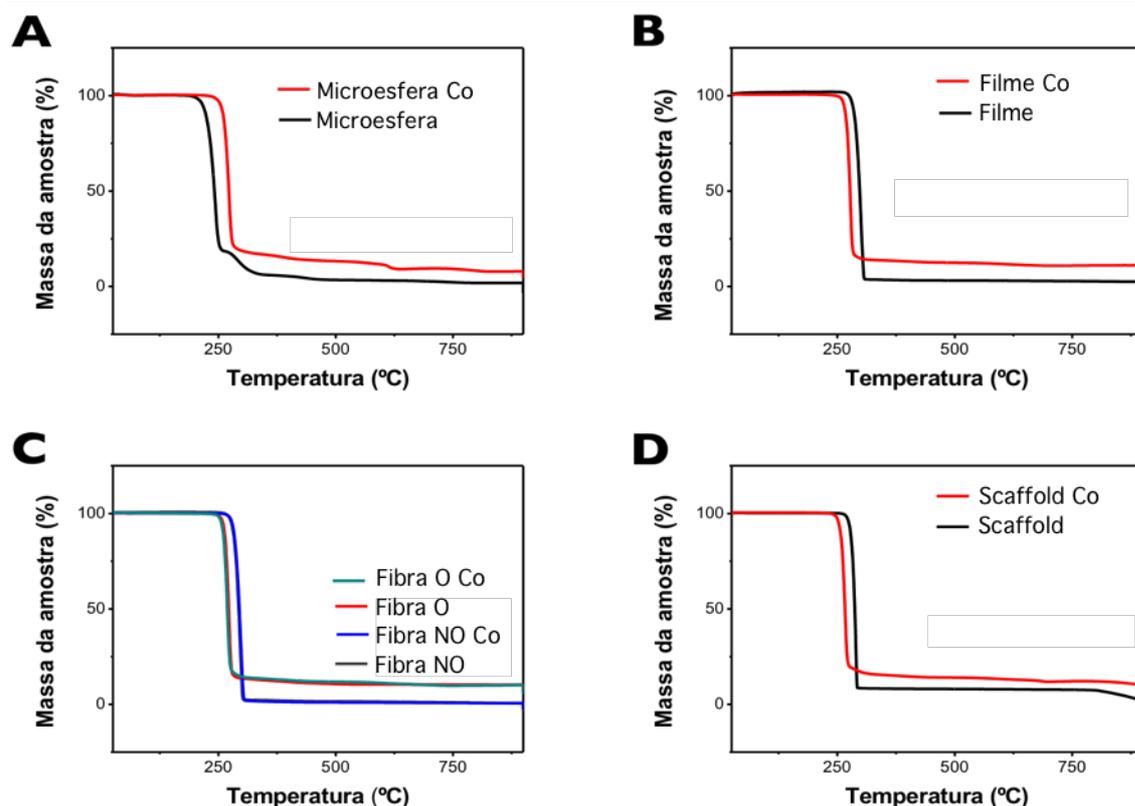


Figura 4.7 – Curvas de perda de massa obtidas para as diferentes morfologias de PHBV com e sem ferrites de cobalto **A** - Microesferas, **B** - Filmes, **C** - Fibras orientadas e não orientadas e **D** - *Scaffolds*.

Na **Tabela 4.4** encontram-se sumarizadas as temperaturas referentes à curva de degradação térmica das várias morfologias. Apresenta-se também a percentagem de massa perdida durante o processo.

Pela análise da tabela pode verificar-se que a temperatura inicial e final de degradação é menor na presença de ferrites de cobalto. Isto deve-se provavelmente à condução térmica superior das partículas presentes ou à maior estabilidade térmica consequente da menor percentagem de cristalização [164,165].

A variação da temperatura inicial e final não demonstrou ser significativamente diferente entre as diversas morfologias. As variações podem ser atribuídas às diferentes morfologias possuírem áreas superficiais diferentes melhorando a condução térmica na amostra ou ao efeito da cristalinidade na estabilidade térmica. A degradação ocorreu num intervalo curto de temperaturas rondando em média os 19 °C.

A perda de massa vai novamente de encontro ao previsto. No caso das morfologias de polímero puro esta é próxima dos 100%. No caso dos compósitos, esta ronda os 90% uma vez que as

partículas magnéticas, que representam 10% da massa total, não se degradam no intervalo de temperatura da análise [166,167].

Tabela 4.4 – Temperaturas e percentagem de massa perdida no processo de degradação térmica para as diferentes morfologias.

Morfologias	T_i (°C)	T_{f-i} (°C)	T_f (°C)	T_{max} (°C)	Massa perdida (%)
Filme	277	24	301	299	98
Filme Co	259	16	275	276	89
Fibra NO	279	24	303	294	99
Fibra NO Co	263	13	276	271	90
Fibra O	288	16	304	296	99
Fibra O Co	260	16	276	268	90
Microesfera	213	35	247	241	98
Microesfera Co	261	20	281	271	92
<i>Scaffold</i>	275	14	290	286	98
<i>Scaffold Co</i>	255	17	272	265	89

4.3.4 Magnetometria de amostra vibratória

A análise das propriedades magnéticas permite inicialmente observar a curva de histerese das partículas magnéticas determinando assim as suas propriedades magnéticas. Através da análise da magnetização pode determinar-se a quantidade de partículas magnéticas, ferrites de cobalto, presentes na amostra. A partir dessa informação é possível deduzir a percentagem de partículas presentes na amostra obtida, demonstrando a eficiência de encapsulação/incorporação das partículas.

Na **Figura 4.8** encontra-se representada a curva de histerese das ferrites de cobalto puras. A magnetização de saturação é de 40 emu/g, e verifica-se um comportamento ferromagnético.

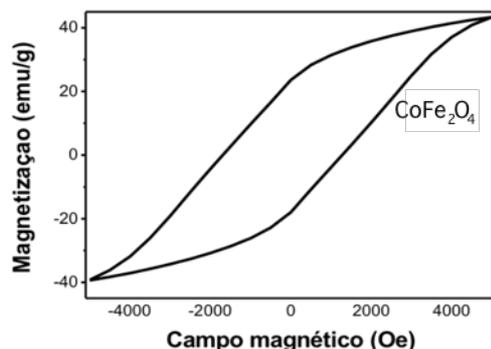


Figura 4.8 – Curva de magnetização das ferrites de cobalto puras.

Na Figura 4.9 encontram-se representadas as curvas de histerese obtidas para as diferentes morfologias de PHBV com Co.

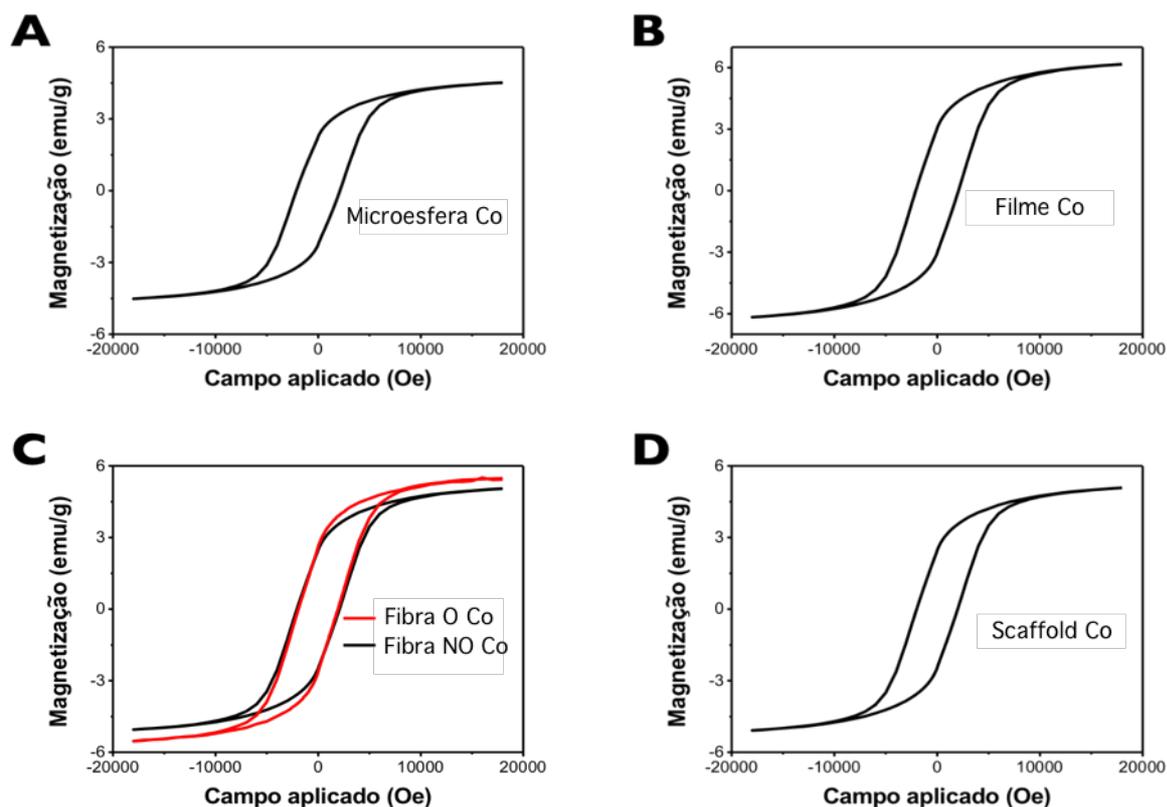


Figura 4.9 – Curvas de histerese obtidas para as diferentes morfologias de PHBV com Co: **A** - microesferas, **B** - filme, **C** - fibras orientadas e não orientadas e **D** - *scaffolds*.

Pela análise inicial das curvas de histerese observa-se um comportamento ferromagnético e uma curva similar à obtida para as ferrites de cobalto puras. A magnetização de saturação das ferrites de cobalto puras é de 40 emu/g, aproximadamente 10X superior à magnetização de saturação das

amostras compósitas. Os valores vão de encontro ao esperado uma vez que as ferrites de cobalto representam 10% da massa total das amostras.

A percentagem de ferrites de cobalto detetada na amostra aponta para uma elevada eficiência de encapsulação. Em algumas amostras a percentagem de ferrites de cobalto determinada é superior a 10%, no entanto os valores encontram-se dentro do limite do erro do aparelho, aproximadamente 2%. A diferença entre a percentagem de ferrites de cobalto nas várias morfologias pode ser atribuída às diferentes condições a que o material está sujeito durante o processamento, que poderá permitir maior perda ou aglomeração de ferrites de cobalto.

Na **Tabela 4.5** encontra-se sumariado a magnetização máxima para cada uma das amostras e a percentagem de ferrites incorporada.

Tabela 4.5 – Magnetização e grandezas associadas para as diferentes morfologias de PHBV.

Morfologias	Magnetização (emu)	Massa ferrites (g)	Massa amostra (g)	Percentagem ferrites (%)
Filme Co	8×10^{-3}	2×10^{-5}	1×10^{-3}	14
Fibras NO Co	4×10^{-3}	9×10^{-5}	8×10^{-4}	12
Fibras O Co	7×10^{-3}	2×10^{-5}	1×10^{-3}	13
Microesfera Co	8×10^{-2}	4×10^{-7}	2×10^{-2}	9
<i>Scaffold Co</i>	7×10^{-3}	2×10^{-4}	2×10^{-3}	10

4.4 Estudo da degradação *in vitro*

O estudo de degradação permite uma previsão rebuscada do comportamento das diversas morfologias durante o processo. A massa da amostra foi medida ao longo do processo de modo a avaliar a sua variação. Através da informação recolhida construiu-se os gráficos da **Figura 4.10** que relacionam a perda de massa com o tempo de degradação.

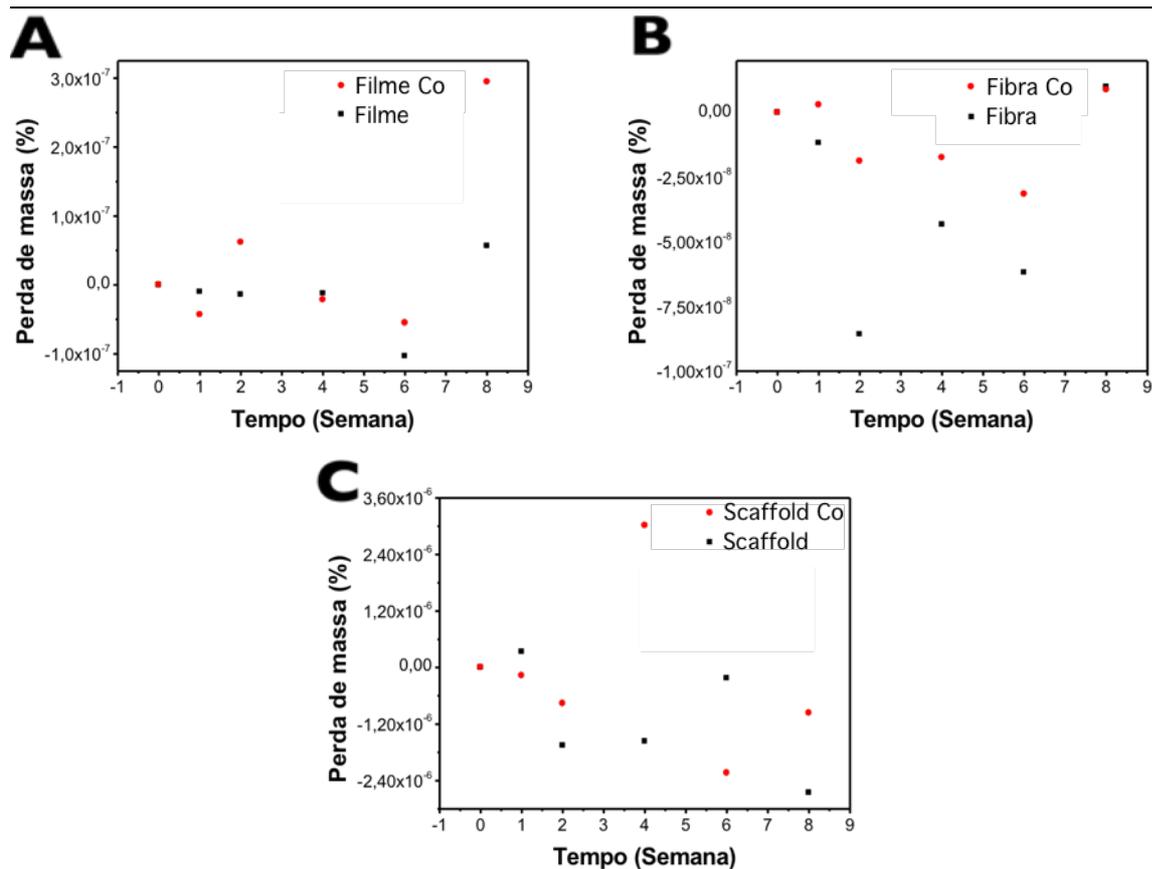


Figura 4.10 – Gráfico de perda de massa das diversas morfologias em SBF, **A** - Filmes com e sem Co, **B** - Fibras com e sem Co e **C** - *Scaffolds* com e sem Co.

Pela análise dos gráficos de perda de massa, verifica-se inicialmente um aumento da massa, isto é uma perda de massa negativa. Foi tomado o cuidado de medir as massas unicamente após a total evaporação do fluido de degradação. O aumento pode ser atribuído à presença de solução ou componentes da solução inseridos na matriz polimérica. Após a sexta semana começa a verifica-se alguma perda de massa, com a exceção do *scaffold*.

Visualmente, pela observação direta das amostras da **Figura 4.11** não foram verificadas mudanças aparentes no aspeto da morfologia durante as primeiras 4 semanas. Durante as semanas 6 e 8, todas as amostras demonstraram uma degradação aparente. As fibras apresentaram a degradação mais pronunciada verificando-se, já na semana 4, uma perda da consistência mecânica/física. Seguiram-se os *scaffold* e depois os filmes. A degradação acelerada pode ser atribuída à elevada área superficial das amostras facilitando o ataque do solvente e remoção das porções solúveis.

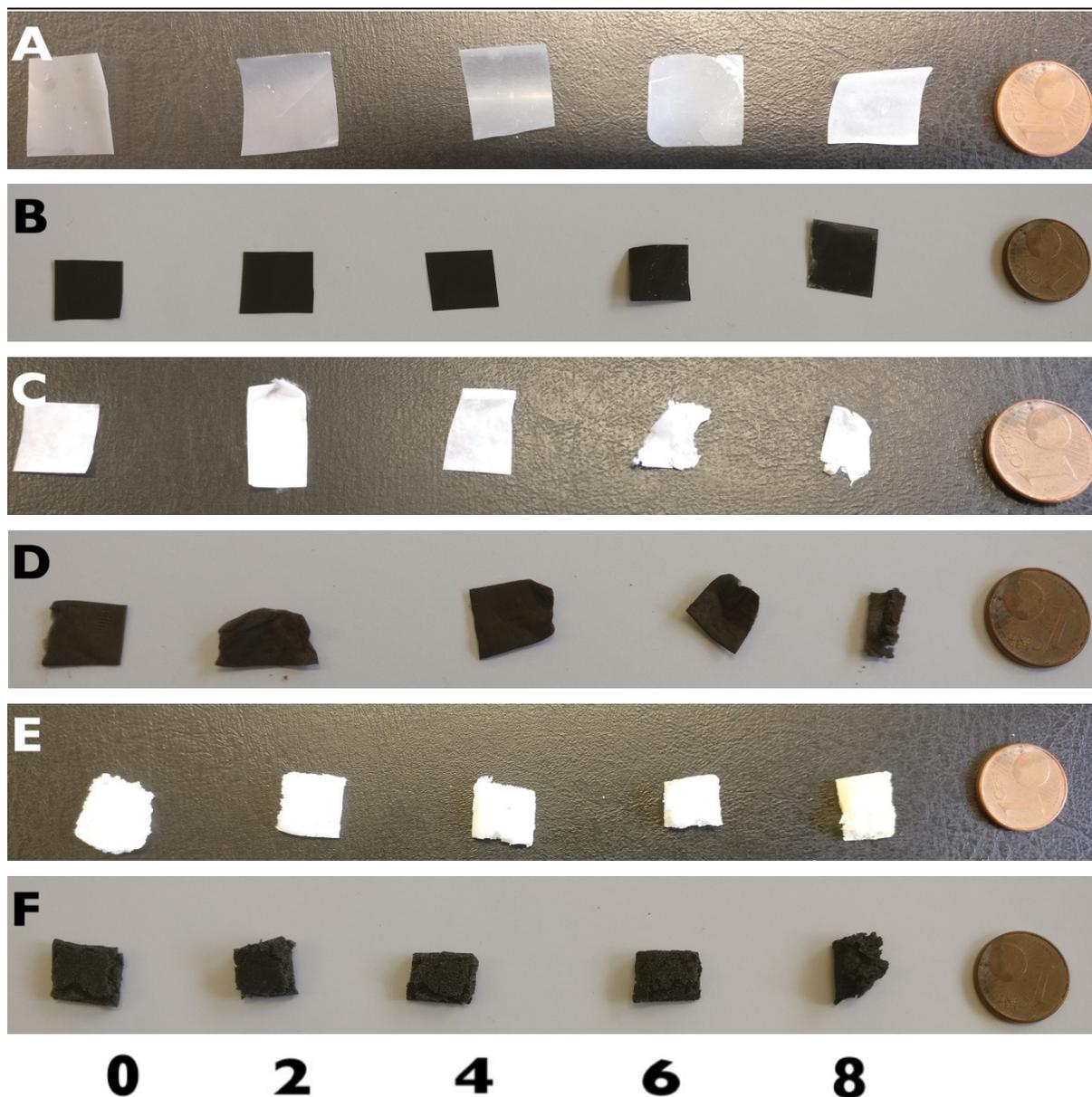


Figura 4.11 – Evolução das diversas morfologias durante o ensaio de degradação, **A** - Filme, **B** - Filme Co, **C** – Fibra NO, **D** – Fibra NO Co, **E** – Scaffold e **F** – Scaffold Co, os números representam o tempo (semanas) de exposição ao SBF.

Através da observação das amostras não foi observada diferença notória entre as morfologias poliméricas ou compósitas, concluindo-se assim que a presença de ferrites de cobalto não influenciou o processo de degradação. Embora não observada, pode ocorrer alguma diferença uma vez que o processo de degradação é influenciado pelo grau de cristalinidade e este, por sua vez, pela presença de partículas no interior do material [168,169].

Os dados observados são consistentes com o mecanismo de degradação do polímero.

4.5 Avaliação da citotoxicidade

O ensaio de citotoxicidade indireta permite avaliar se ocorre alteração da viabilidade celular quando em contacto com os diversos materiais. Realizou-se um ensaio indireto por períodos de 24 h e 72 h, sendo a viabilidade posteriormente avaliada por MTT e comparada com o controlo.

A Figura 4.12 representa os valores de viabilidade celular referentes a cada uma das amostras, relativamente ao controlo negativo.

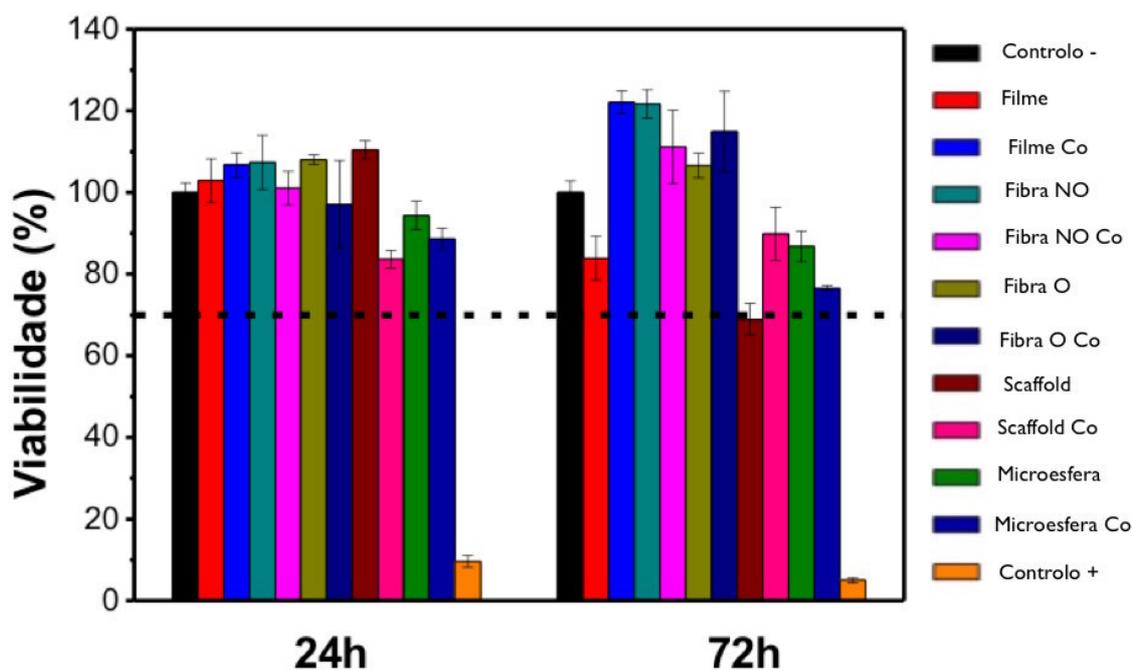


Figura 4.12 – Ensaio de viabilidade celular com as células MC3T3-E1 após 24 e 72 h em contacto com meio exposto às diversas amostras.

Pela análise do histograma verifica-se que, à exceção do *scaffold*, todas as amostras passaram no ensaio de citotoxicidade, apresentando valores de viabilidade celular superiores a 70%. Esta diferença pode ser atribuída à presença de resíduos de solvente que devido à forma porosa do *scaffold* se liberta com maior dificuldade relativamente às outras amostras.

A presença de ferrites de cobalto foi acompanhada por um aumento da viabilidade celular relativamente a algumas amostras sem ferrites. O aumento é negligenciável e pode atribuir-se a uma flutuação natural dos resultados devido à presença de maior número de células uma vez que as ferrites de cobalto apresentam elevada citotoxicidade para sistemas biológicos [170,171].

Pode assim concluir-se que as ferrites foram encapsuladas com eficiência, encontrando-se cobertas por uma camada de polímero evitando assim a contaminação do meio de cultura.

Alguma flutuação dos valores das diversas amostras relativamente ao controlo é esperada uma vez que se trata de organismos biológicos, possuindo assim alguma variabilidade inerente.

Capítulo 5

Conclusões

Primeiramente, pode concluir-se que os diversos objetivos propostos inicialmente foram cumpridos.

Verificou-se inicialmente, pela análise morfológica, que as diversas morfologias apresentaram uma superfície lisa e ausente de imperfeições. No caso dos materiais compósitos foi possível observar a presença de ferrites bem dispersas na matriz polimérica, não se verificando a sua exposição nas superfícies exteriores indicando assim um bom recobrimento.

As microesferas apresentam uma superfície regular e formato esférico com diâmetro médio de $0,8 \pm 0,2 \mu\text{m}$ para ambas as microesferas concluindo-se assim que a adição de 10% de ferrites de cobalto não provocou alteração do tamanho.

Os filmes apresentaram uma estrutura sólida e compacta ausente de porosidades com uma espessura média de $31,3 \pm 0,9 \mu\text{m}$ e $33,2 \pm 1,0 \mu\text{m}$ para os filmes com e sem ferrites de cobalto, respetivamente. Não se verificou diferença notória entre o filme compósito e o filme polimérico com a adição de 10% de ferrites de cobalto.

As fibras apresentaram diâmetro elevado relativamente ao tamanho ótimo para aplicações em engenharia de tecidos. Obtiveram-se fibras orientadas com diâmetros de $4,4 \pm 0,6 \mu\text{m}$ e $4,4 \pm 0,7 \mu\text{m}$ (com ferrites de cobalto), e não orientadas com diâmetros entre $1,7 \pm 0,2 \mu\text{m}$ e $1,7 \pm 0,5 \mu\text{m}$ (com ferrites de cobalto). A adição de 10% de ferrites de cobalto não provou alteração notória nos diâmetros médios das fibras, no entanto os diferentes coletores produzem efeitos pronunciados no diâmetro das fibras.

Os *scaffolds* apresentaram reduzida interconexão entre os poros e um tamanho de poros elevado no caso do *scaffold* polimérico e reduzido no caso do compósito $605 \pm 323 \mu\text{m}$ e $232 \pm 73 \mu\text{m}$, respetivamente.

Avaliou-se a molhabilidade através da medição do ângulo de contacto, todas as morfologias apresentam um comportamento hidrofóbico, $\theta > 90^\circ$ variando desde 90° para os filmes a 128° para as fibras NO Co. Verificou-se que a presença de 10% de ferrites aumenta a hidrofobicidade das amostras.

Relativamente à análise físico-química verificou-se que o processamento do material não causa alterações significativas das propriedades físico-químicas e térmicas.

Pela análise de FTIR verificou-se a presença das bandas características do polímero, $826 - 979 \text{ cm}^{-1}$ e $1227 - 1478 \text{ cm}^{-1}$ correspondentes ao grupo C-H e 1057 cm^{-1} , 1133 cm^{-1} e 1183 cm^{-1} relativas

ao grupo C-O. A inclusão de 10% de partículas, tal como as várias técnicas de processamento utilizadas não provocaram alteração da estrutura química das amostras.

A análise térmica não revelou grandes alterações das propriedades do polímero com o processamento no que respeita à T_m , com valores entre 174 e 182 °C, ΔH_m , entre 57 e 98 J/g, X_c entre 39 e 57%, T_i , entre 255 e 288 °C, T_f entre 272 e 305 °C e T_{max} entre 270 e 300 °C, a massa perdida ronda valores dos 90% para as amostras com ferrites de cobalto (10%) e 100% para as poliméricas. A adição de ferrites de cobalto, 10%, é acompanhada de um aumento da T_m e redução da ΔH_m , X_c , T_i , T_f e T_{max} .

Pode deduzir-se pela análise das propriedades magnéticas que as partículas magnéticas, 10%, foram inseridas na matriz polimérica com elevada eficiência, como demonstrado pela quantificação instrumental das partículas entre 9 e 14%.

Durante o ensaio de degradação, as amostras não revelaram nenhuma alteração morfológica e de massa notória até às 6 semanas. A partir da semana 6 foram observadas mudanças tanto morfológicas como de massa verificando-se perda das propriedades mecânicas (amostras perdiam consistência mecânica, observado visualmente).

Todas as amostras obtiveram valores de viabilidade celular superiores a 70% considerando-se por isso que as amostras não apresentam citotoxicidade, podendo ser utilizadas em aplicações de engenharia de tecidos.

Capítulo 6

Sugestões para trabalhos
futuros

A presente dissertação constitui um trabalho de investigação inicial que visa o processamento de um polímero biocompatível, bioativo e biodegradável, o PHBV, sob diversas morfologias. A alteração das propriedades físico-químicas com o processamento foi avaliada assim como a resposta citotóxica e a degradação *in vitro*.

Fica inicialmente por explorar o efeito do estímulo elétrico produzido pelos *scaffolds* em culturas celulares estáticas e dinâmicas recorrendo à utilização de um biorreactor

Tendo em consideração os trabalhos realizados e os resultados obtidos, as sugestões posteriormente mencionadas visam o melhoramento das propriedades das morfologias para futura aplicação em engenharia de tecidos.

Dada a aplicação, pode através da otimização das condições de processamento das fibras reduzir o diâmetro das fibras melhorando a resposta celular às mesmas.

A conexão interporos é uma condição importante dos *scaffolds* porosos, o melhoramento do parâmetro é possível através da fusão prévia do porogénio.

Com o intuito de melhorar/aumentar/estimular a resposta celular às diversas morfologias, uma diversidade de materiais pode ser incorporada na matriz polimérica. A incorporação de hidroxiapatite para estimulação dos processos de calcificação e estimulação da diferenciação celular. Adicionalmente, é possível a incorporação de fármacos ou sinalizadores químicos indutores dos processos de diferenciação na matriz, ou estes podem ser incorporados em partículas que podem posteriormente ser inseridas no polímero previamente ao processamento. A adição de proteínas mediadoras da adesão celular é também uma possibilidade.

A possibilidade de incorporação de componentes nas diversas morfologias e os seus efeitos no processamento e propriedades físico-químicas do *scaffold* é um tema com grande potencialidade para futura exploração.

A hidrofobicidade do *scaffold* é um fator importante para aplicações em engenharia de tecidos, esta pode ser alterada através de diversos tratamentos de superfície de modo a melhorar a resposta celular.

Outro aspecto a ser investigado é o ajuste da degradabilidade dos suportes uma vez que estes devem degradar a um ritmo paralelo ao da formação de tecido de modo a que este seja progressivamente substituído por novo tecido. O ajuste pode ser feito através da alteração da multitude de parâmetros que influenciam a degradabilidade do material.

Fica por investigar também a forma como as propriedades das morfologias alteram durante o processo de degradação e qual a resposta celular. Seria importante/interessante a análise das

propriedades físico-químicas e ensaios de citotoxicidade a vários estados durante o processo de degradação.

Capítulo 7

Referências bibliográficas

-
- [1] Yang S, Leong KF, Du Z, Chua CK. The design of scaffolds for use in tissue engineering. *Tissue Eng* 2001;7:679–89. doi:10.1089/107632701753337645.
- [2] Laschke MW, Harder Y, Amon M, Martin I, Farhadi J, Ring A, et al. Angiogenesis in Tissue Engineering: Breathing Life into Constructed Tissue Substitutes. *Tissue Eng* 2006;12:2093–104. doi:10.1089/ten.2006.12.2093.
- [3] Nerem RM, Sambanis A. Tissue Engineering: From Biology to Biological Substitutes. *Tissue Eng* 1995;1:3–13. doi:10.1089/ten.1995.1.3.
- [4] Shin H, Jo S, Mikos AG. Biomimetic materials for tissue engineering. *Biomaterials* 2003;24:4353–64. doi:10.1016/S0142-9612(03)00339-9.
- [5] Rajabi AH, Jaffe M, Arinzeh TL. Piezoelectric materials for tissue regeneration: A review. *Acta Biomater* 2015;24:12–23. doi:10.1016/j.actbio.2015.07.010.
- [6] Ribeiro C, Sencadas V, Correia DM, Lanceros-Mendez S. Piezoelectric polymers as biomaterials for tissue engineering applications. *Colloids Surfaces B Biointerfaces* 2015;136:46–55. doi:10.1016/2015.08.043.
- [7] Ma PX. Biomimetic materials for tissue engineering. *Adv Drug Deliv Rev* 2008;60:184–98. doi:10.1016/j.addr.2007.08.041.
- [8] Khademhosseini A, Langer R, Borenstein J, Vacanti JP. Tissue Engineering Special Feature: Microscale technologies for tissue engineering and biology. *Proc Natl Acad Sci* 2006;103:2480–7. doi:10.1073/pnas.0507681102.
- [9] Rezwani K, Chen QZ, Blaker JJ, Boccaccini AR. Biodegradable and bioactive porous polymer/inorganic composite scaffolds for bone tissue engineering. *Biomaterials* 2006;27:3413–31. doi:10.1016/j.biomaterials.2006.01.039.
- [10] Howard D, BATTERY LD, Shakesheff KM, Roberts SJ, Anatom Soc Great B, Ireland. Tissue engineering: strategies, stem cells and scaffolds. *Int. Conf. Adv. Stem Cell Biol.*, vol. 213, 2007, p. 66–72. doi:10.1111/j.1469-7580.2008.00878.x.
- [11] Korolj A, Wang EY, Civitarese RA, Radisic M. Biophysical stimulation for in vitro engineering of functional cardiac tissues. *Clin Sci* 2017;131:1393–404. doi:10.1042/CS20170055.
- [12] O'Brien FJ. Biomaterials & scaffolds for tissue engineering. *14* (2011) 88–95. doi:10.1016/S1369-7021(11)70058-X. *Mater Today* 2011;14:88–95. doi:10.1016/S1369-7021(11)70058-X.
- [13] Malafaya PB, Silva GA, Reis RL. Natural-origin polymers as carriers and scaffolds for biomolecules and cell delivery in tissue engineering applications. *Adv Drug Deliv Rev* 2007;59:207–33.
- [14] Dang JM, Leong KW. Natural polymers for gene delivery and tissue engineering. *Adv Drug Deliv Rev* 2006;58:487–99.
- [15] Hashaikeh R, Krishnamachari P, Samad YA. Nanomanifestations of cellulose: Applications for biodegradable composites. *Handb. Polym. Nanocomposites. Process. Perform. Appl.*, Springer; 2015, p. 229–48.
- [16] Peter SJ, Miller MJ, Yasko AW, Yaszemski MJ, Mikos AG. Polymer concepts in tissue engineering. *J Biomed Mater Res Part A* 1998;43:422–7.
- [17] Doyle C, Tanner ET, Bonfield W. In vitro and in vivo evaluation of polyhydroxybutyrate and of polyhydroxybutyrate reinforced with hydroxyapatite. *Biomaterials* 1991;12:841–7. doi:10.1016/0142-9612(91)90072-I.
- [18] Chen GQ, Wu Q. The application of polyhydroxyalkanoates as tissue engineering materials. *Biomaterials* 2005;26:6565–78. doi:10.1016/j.biomaterials.2005.04.036.
- [19] Novikov LN, Novikova LN, Mosahebi A, Wiberg M, Terenghi G, Kellerth J-O. A novel
-

- biodegradable implant for neuronal rescue and regeneration after spinal cord injury. *Biomaterials* 2002;23:3369–76.
- [20] Borkenhagen M, Stoll RC, Neuenschwander P, Suter UW, Aebischer P. In vivo performance of a new biodegradable polyester urethane system used as a nerve guidance channel. *Biomaterials* 1998;19:2155–65.
- [21] Freed LE, Vunjak-Novakovic G, Biron RJ, Eagles DB, Lesnoy DC, Barlow SK, et al. Biodegradable polymer scaffolds for tissue engineering. *Nat Biotechnol* 1994;12:689–93.
- [22] Tao J, Song C, Cao M, Hu D, Liu L, Liu N, et al. Thermal properties and degradability of poly (propylene carbonate)/poly (β -hydroxybutyrate-co- β -hydroxyvalerate)(PPC/PHBV) blends. *Polym Degrad Stab* 2009;94:575–83.
- [23] Fukada E. Piezoelectric properties of biological polymers. *Q Rev Biophys* 1983;16:59–87. doi:10.1017/S0033583500004923.
- [24] Bassett CAL. Biological significance of piezoelectricity. *Calcified Tissue Research* 1967;1:252–72. doi:10.1007/BF02008098.
- [25] Srinivasan G. Magnetolectric Composites. *Annu Rev Mater Res* 2010;40:78–157. doi:10.1146/070909-104459.
- [26] Gil S, Mano JF. Magnetic composite biomaterials for tissue engineering. *Biomater Sci* 2014;2:812–8.
- [27] Martins P, Lanceros-Méndez S. Polymer-based magnetolectric materials. *Adv Funct Mater* 2013;23:3371–85.
- [28] James RD, Wuttig M. Magnetostriction of martensite. *Philos Mag A* 1998;77:1273–99.
- [29] Cho K-H, Bichurin MI, Petrov VM, Bhalla A, Priya S. Magnetolectric Laminate Composite: Effect of Piezoelectric Layer on Magnetolectric Properties. *Ferroelectrics* 2014;473:110–28.
- [30] Hu J-M, Nan T, Sun NX, Chen L-Q. Multiferroic magnetolectric nanostructures for novel device applications. *MRS Bull* 2015;40:728–35.
- [31] Ribeiro C, Correia V, Martins P, Gama FM, Lanceros-Mendez S. Proving the suitability of magnetolectric stimuli for tissue engineering applications. *Colloids Surfaces B Biointerfaces* 2016;140:430–6.
- [32] Ryu J, Priya S, Carazo AV, Uchino K, Kim H. Effect of the Magnetostrictive Layer on Magnetolectric Properties in Lead Zirconate Titanate/Terfenol-D Laminate Composites. *J Am Ceram Soc* 2001;84:2905–8.
- [33] Nan C-W, Bichurin MI, Dong S, Viehland D, Srinivasan G. Multiferroic magnetolectric composites: historical perspective, status, and future directions. *J Appl Phys* 2008;103:1.
- [34] Patankar KK, Joshi SS, Chougule BK. Dielectric behaviour in magnetolectric composites. *Phys Lett A* 2005;346:337–41.
- [35] Lopatin S, Lopatina I, Lisnevskaya I. Magnetolectric PZT/ferrite composite material. *Ferroelectrics* 1994;162:63–8.
- [36] Ryu J, Carazo AV, Uchino K, Kim H-E. Piezoelectric and magnetolectric properties of lead zirconate titanate/Ni-ferrite particulate composites. *J Electroceramics* 2001;7:17–24.
- [37] Zhou Y, Maurya D, Yan Y, Srinivasan G, Quandt E, Priya S. Self-biased magnetolectric composites: An overview and future perspectives. *Energy Harvest Syst* 2016;3:1–42.
- [38] Yang J. An introduction to the theory of piezoelectricity. *Adv. Mech. Math.*, 2005, p. 299. doi:10.1038/015526a0.
- [39] Martin RM. Piezoelectricity. *Phys Rev B* 1972;5:1607–13. doi:10.1103/PhysRevB.5.1607.
- [40] Hayakawa R, Wada Y. Piezoelectricity and related properties of polymer films. *Fortschritte der Hochpolym.*, Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 1973, p. 1–55. doi:10.1007/3-540-06054-5_10.
- [41] Shamos M, Lavine L. Piezoelectricity as a Fundamental Property of Biological Tissues. *Nature*
-

-
- 1967;213:267–9.
- [42] Erhart J. Experiments to demonstrate piezoelectric and pyroelectric effects. *Phys Educ* 2013;48:438.
- [43] Fukada E. Piezoelectricity in polymers and biological materials. *Ultrasonics* 1968;6:229–34. doi:10.1016/0041-624X(68)90132-7.
- [44] Ahn AC, Grodzinsky AJ. Relevance of collagen piezoelectricity to “Wolff’s Law”: A critical review. *Med Eng Phys* 2009;31:733–41. doi:10.1016/j.medengphy.2009.02.006.
- [45] Yang F, Murugan R, Wang S, Ramakrishna S. Electrospinning of nano/micro scale poly (L-lactic acid) aligned fibers and their potential in neural tissue engineering. *Biomaterials* 2005;26:2603–10.
- [46] Ribeiro C, Moreira S, Correia V, Sencadas V, Rocha JG, Gama FM, Gómez Ribelles JL, Lanceros-Méndez S. Enhanced proliferation of pre-osteoblastic cells by dynamic piezoelectric stimulation. *Rsc Adv* 2012;2:11504–9.
- [47] Ribeiro C, Pärssinen J, Sencadas V, Correia V, Miettinen S, Hytönen VP, Lanceros-Méndez S. Dynamic piezoelectric stimulation enhances osteogenic differentiation of human adipose stem cells. *J Biomed Mater Res Part A* 2015;103:2172–5.
- [48] Pärssinen J, Hammarén H, Rahikainen R, Sencadas V, Ribeiro C, Vanhatupa S, Miettinen S, Lanceros-Méndez S, Hytönen VP. Enhancement of adhesion and promotion of osteogenic differentiation of human adipose stem cells by poled electroactive poly (vinylidene fluoride). *J Biomed Mater Res Part A* 2015;103:919–28.
- [49] Teixeira LN, Crippa GE, Trabuco AC, Gimenes R, Zaghete MA, Palioto DB, Oliveira PT, Rosa AL, Beloti MM. In vitro biocompatibility of poly (vinylidene fluoride–trifluoroethylene)/barium titanate composite using cultures of human periodontal ligament fibroblasts and keratinocytes. *Acta Biomater* 2010;6:979–89.
- [50] Woo KM, Chen VJ, Ma PX. Nano-fibrous scaffolding architecture selectively enhances protein adsorption contributing to cell attachment. *J Biomed Mater Res Part A* 2003;67:531–7.
- [51] Rahman MS, Tsuchiya T. Enhancement of chondrogenic differentiation of human articular chondrocytes by biodegradable polymers. *Tissue Eng* 2001;7:781–90.
- [52] Köse GT, Korkusuz F, Korkusuz P, Hasirci V. In vivo tissue engineering of bone using poly (3-hydroxybutyric acid-co-3-hydroxyvaleric acid) and collagen scaffolds. *Tissue Eng* 2004;10:1234–50.
- [53] Wickens A, Robinson J. Magnetolectric Neural Modulation. *Biophys J* 2017;112:286a.
- [54] Martins PM, Ribeiro S, Ribeiro C, Sencadas V, Gomes AC, Gama FM, Lanceros-Méndez S. Effect of poling state and morphology of piezoelectric poly (vinylidene fluoride) membranes for skeletal muscle tissue engineering. *Rsc Advances* 2013;3:17938–44.
- [55] Royo-Gascon N, Wininger M, Scheinbeim JI, Firestein BL, Craelius W. Piezoelectric substrates promote neurite growth in rat spinal cord neurons. *Ann Biomed Eng* 2013;41:112–22.
- [56] Lee Y-S, Arinzeh TL. The influence of piezoelectric scaffolds on neural differentiation of human neural stem/progenitor cells. *Tissue Eng Part A* 2012;18:2063–72.
- [57] Lee Y-S, Collins G, Arinzeh TL. Neurite extension of primary neurons on electrospun piezoelectric scaffolds. *Acta Biomater* 2011;7:3877–86.
- [58] Evans GRD, Brandt K, Widmer MS, Lu L, Meszlenyi RK, Gupta PK, Mikos AG, Hodges J, Williams J, Gurlek A, Nabawi A, Lohman R, Patrick Jr CW. In vivo evaluation of poly (L-lactic acid) porous conduits for peripheral nerve regeneration. *Biomaterials* 1999;20:1109–15.
- [59] Khorasani MT, Mirmohammadi SA, Irani S. Polyhydroxybutyrate (PHB) scaffolds as a model for nerve tissue engineering application: fabrication and in vitro assay. *Int J Polym Mater* 2011;60:562–75.
- [60] Masaeli E, Morshed M, Nasr-Esfahani MH, Sadri S, Hilderink J, van Apeldoorn A, van
-

-
- Blitterswijk CA, Moroni L. Fabrication, characterization and cellular compatibility of poly (hydroxy alkanoate) composite nanofibrous scaffolds for nerve tissue engineering. *PLoS One* 2013;8:e57157.
- [61] Marques L, Holgado LA, Simões RD, Pereira JDAS, Floriano JF, Mota LSLS, et al. Subcutaneous tissue reaction and cytotoxicity of polyvinylidene fluoride and polyvinylidene fluoride-trifluoroethylene blends associated with natural polymers. *J Biomed Mater Res Part B Appl Biomater* 2013;101:1284–93.
- [62] Mo XM, Xu CY, Kotaki M, Ramakrishna S. Electrospun P (LLA-CL) nanofiber: a biomimetic extracellular matrix for smooth muscle cell and endothelial cell proliferation. *Biomaterials* 2004;25:1883–90.
- [63] Kuppan P, Sethuraman S, Krishnan UM. Interaction of human smooth muscle cells on random and aligned nanofibrous scaffolds of PHBV and PHBV-gelatin. *Int J Polym Mater Polym Biomater* 2016;65:816–25.
- [64] Kuppan P, Sethuraman S, Krishnan UM. In vitro co-culture of epithelial cells and smooth muscle cells on aligned nanofibrous scaffolds. *Mater Sci Eng C* 2017;81:191–205.
- [65] Freed LE, Grande DA, Lingbin Z, Emmanuel J, Marquis JC, Langer R. Joint resurfacing using allograft chondrocytes and synthetic biodegradable polymer scaffolds. *J Biomed Mater Res Part A* 1994;28:891–9.
- [66] Freed LE, Marquis JC, Nohria A, Emmanuel J, Mikos AG, Langer R. Neocartilage formation in vitro and in vivo using cells cultured on synthetic biodegradable polymers. *J Biomed Mater Res Part A* 1993;27:11–23.
- [67] Vamvakaki M, Schneider H-J, Badylak SF, Shahinpoor M, Zhao Q, Coffey JL, et al. *Smart Materials for Tissue Engineering*. Royal Society of Chemistry; 2017.
- [68] Yang F, Murugan R, Ramakrishna S, Wang X, Ma Y-X, Wang S. Fabrication of nano-structured porous PLLA scaffold intended for nerve tissue engineering. *Biomaterials* 2004;25:1891–900.
- [69] Saxena AK, Marler J, Benvenuto M, Willital GH, Vacanti JP. Skeletal muscle tissue engineering using isolated myoblasts on synthetic biodegradable polymers: preliminary studies. *Tissue Engineering* 1999;5:525–31.
- [70] Shishatskaya EI, Volova TG. A comparative investigation of biodegradable polyhydroxyalkanoate films as matrices for in vitro cell cultures. *J Mater Sci Mater Med* 2004;15:915–23.
- [71] Sokolsky-Papkov M, Agashi K, Olaye A, Shakesheff K, Domb AJ. Polymer carriers for drug delivery in tissue engineering. *Adv Drug Deliv Rev* 2007;59:187–206. doi:10.1016/j.addr.2007.04.001.
- [72] Baran ET, Özer N, Hasirci V. Poly(hydroxybutyrate-co-hydroxyvalerate) nanocapsules as enzyme carriers for cancer therapy: An in vitro study. *J Microencapsul* 2002;19:363–76. doi:10.1080/02652040110105355.
- [73] Zonari A, Martins TMM, Paula ACC, Boeloni JN, Novikoff S, Marques AP, et al. Polyhydroxybutyrate-co-hydroxyvalerate structures loaded with adipose stem cells promote skin healing with reduced scarring. *Acta Biomater* 2015;17:170–81. doi:10.1016/j.actbio.2015.01.043.
- [74] Rezwan K, Chen QZ, Blaker JJ, Boccaccini AR. Biodegradable and bioactive porous polymer/inorganic composite scaffolds for bone tissue engineering. *Biomaterials* 2006;27:3413–31.
- [75] Choi WM, Kim TW, Park OO, Chang YK, Lee JW. Preparation and characterization of poly(hydroxybutyrate-co-hydroxyvalerate)-organoclay nanocomposites. *J Appl Polym Sci* 2003;90:525–9. doi:10.1002/app.12702.
- [76] Kulkarni SO, Kanekar PP, Nilegaonkar SS, Sarnaik SS, Jog JP. Production and characterization of a biodegradable poly (hydroxybutyrate-co-hydroxyvalerate) (PHB-co-PHV) copolymer by
-

- moderately haloalkalitolerant *Halomonas campisalis* MCM B-1027 isolated from Lonar Lake, India. *Bioresour Technol* 2010;101:9765–71. doi:10.1016/j.biortech.2010.07.089.
- [77] Chun YS, Kim WN. Thermal properties of poly(hydroxybutyrate-co-hydroxyvalerate) and poly(epsilon-caprolactone) blends. *Polymer (Guildf)* 2000;41:2305–8.
- [78] Sultana N, Wang M. Fabrication and characterisation of polymer and composite scaffolds based on polyhydroxybutyrate and polyhydroxybutyrate-co-hydroxyvalerate. *Key Eng. Mater.*, vol. 334, Trans Tech Publ; 2007, p. 1229–32.
- [79] Luo S, Netravali AN. A study of physical and mechanical properties of poly(hydroxybutyrate-co-hydroxyvalerate) during composting. *Polym Degrad Stab* 2003;80:59–66. doi:10.1016/S0141-3910(02)00383-X.
- [80] Lai M, Li J, Yang J, Liu J, Tong X, Cheng H. The morphology and thermal properties of multi-walled carbon nanotube and poly(hydroxybutyrate-co-hydroxyvalerate) composite. *Polym Int* 2004;53:1479–84. doi:10.1002/ 1566.
- [81] Weng YX, Wang Y, Wang XL, Wang YZ. Biodegradation behavior of PHBV films in a pilot-scale composting condition. *Polymer Testing* 2010;29:579–87. doi:10.1016/ 2010.04.002.
- [82] Jack KS, Velayudhan S, Luckman P, Trau M, Grøndahl L, Cooper-White J. The fabrication and characterization of biodegradable HA/PHBV nanoparticle–polymer composite scaffolds. *Acta Biomater* 2009;5:2657–67.
- [83] Middleton JC, Tipton AJ. Synthetic biodegradable polymers as orthopedic devices. *Biomaterials* 2000;21:2335–46.
- [84] Bucci DZ. Avaliação de embalagens de PHB (poli (ácido 3-hidroxibutírico)) para alimentos 2003.
- [85] Choi JS, Park WH. Effect of biodegradable plasticizers on thermal and mechanical properties of poly(3-hydroxybutyrate). *Polymer Testing* 2004;23:455–60. doi:10.1016/2003.09.005.
- [86] Rossa LV. Avaliação das propriedades de compósitos de poli (hidroxibutirato-co-valerato) reforçado com fibras de curauá 2014.
- [87] Ferreira BMP, Zavaglia CAC, Duek EAR. Films of PLLA/PHBV: Thermal, morphological, and mechanical characterization. *J Appl Polym Sci* 2002;86:2898–906.
- [88] Kuila BK, Nandi AK. Physical, mechanical, and conductivity properties of poly (3-hexylthiophene)– montmorillonite clay nanocomposites produced by the solvent casting method. *Macromolecules* 2004;37:8577–84.
- [89] Correia DM. Three dimensional scaffolds based on electroactive polymers for tissue engineering applications 2016.
- [90] Jeffery H, Davis SS, O’hagan DT. The preparation and characterisation of poly (lactide-co-glycolide) microparticles. I: Oil-in-water emulsion solvent evaporation. *Int J Pharm* 1991;77:169–75.
- [91] Chen G, Tao D. An experimental study of stability of oil–water emulsion. *Fuel Process Technol* 2005;86:499–508.
- [92] Kemala T, Budianto E, Soegiyono B. Preparation and characterization of microspheres based on blend of poly (lactic acid) and poly (ε-caprolactone) with poly (vinyl alcohol) as emulsifier. *Arab J Chem* 2012;5:103–8.
- [93] Correia DM, Sencadas V, Ribeiro C, Martins PM, Martins P, Gama FM, et al. Processing and size range separation of pristine and magnetic poly (l-lactic acid) based microspheres for biomedical applications. *J Colloid Interface Sci* 2016;476:79–86.
- [94] Doshi J, Reneker DH. Electrospinning process and applications of electrospun fibers. *J Electrostat* 1995;35:151–60.
- [95] Nuraje N, Khan WS, Lei Y, Ceylan M, Asmatulu R. Superhydrophobic electrospun nanofibers. *J Mater Chem A* 2013;1:1929–46.
- [96] Sill TJ, von Recum HA. Electrospinning: applications in drug delivery and tissue engineering.

- Biomaterials 2008;29:1989–2006.
- [97] Li F, Zhao Y, Song Y. Core-shell nanofibers: nano channel and capsule by coaxial electrospinning. *Nanofibers*, InTech; 2010.
- [98] Bhardwaj N, Kundu SC. Electrospinning: a fascinating fiber fabrication technique. *Biotechnol Adv* 2010;28:325–47.
- [99] Egerton RF. *Physical principles of electron microscopy*. Springer; 2005.
- [100] Russell P, Batchelor D, Thornton J. SEM and AFM: complementary techniques for high resolution surface investigations. *Veeco Instruments Inc, AN46, Rev A* 2001;1:2004.
- [101] Watt IM. *The principles and practice of electron microscopy*. Cambridge University Press; 1997.
- [102] Bell DC, Erdman N. *Low voltage electron microscopy: principles and applications*. John Wiley & Sons; 2012.
- [103] Bozzola JJ, Russell LD. *Electron microscopy: principles and techniques for biologists*. Jones & Bartlett Learning; 1999.
- [104] Goldstein JI. *Scanning electron microscopy and x-ray microanalysis* 1979.
- [105] Mittal KL. *Contact angle, wettability and adhesion*. vol. 4. CRC Press; 2006.
- [106] Yuan Y, Lee TR. *Contact angle and wetting properties*. *Surf. Sci. Tech.*, Springer; 2013, p. 3–34.
- [107] Grodzka J, Pomianowski A. Wettability versus hydrophilicity. *Physicochem Probl Miner Process* 2006;40:5–18.
- [108] Schuster JM, Schvezov CE, Rosenberger MR. Influence of experimental variables on the measure of contact angle in metals using the sessile drop method. *Procedia Mater Sci* 2015;8:742–51.
- [109] Öner D, McCarthy TJ. Ultrahydrophobic surfaces. Effects of topography length scales on wettability. *Langmuir* 2000;16:7777–82.
- [110] Shastry A, Taylor D, Bohringer KF. Micro-structured surface ratchets for droplet transport. *Solid-State Sensors, Actuators Microsystems Conf. 2007. TRANSDUCERS 2007. Int., IEEE*; 2007, p. 1353–6.
- [111] Ihrig JL, Lai DYF. Contact angle measurement. *J Chem Educ* 1957;34:196.
- [112] Kakar MR, Hamzah MO, Akhtar MN, Woodward D. Surface free energy and moisture susceptibility evaluation of asphalt binders modified with surfactant-based chemical additive. *J Clean Prod* 2016;112:2342–53.
- [113] Cassie ABD. Contact angles. *Discuss Faraday Soc* 1948;3:11–6.
- [114] Fowkes FM. *Dispersion force contributions to surface and interfacial tensions, contact angles, and heats of immersion*, ACS Publications; 1964.
- [115] Doyle WM. Principles and applications of Fourier transform infrared (FTIR) process analysis. *Process Control Qual* 1992;2:11–41.
- [116] Siesler HW, Ozaki Y, Kawata S, Heise HM. *Near-infrared spectroscopy: principles, instruments, applications*. John Wiley & Sons; 2008.
- [117] Harun SW, Arof H. *Current developments in optical fiber technology*. InTech; 2013.
- [118] Gauglitz G, Vo-Dinh T. *Handbook of spectroscopy*. John Wiley & Sons; 2006.
- [119] Nawrocka A, Lamorska J. Determination of food quality by using spectroscopic methods. *Adv. agrophysical Res.*, InTech; 2013.
- [120] Farago P V, Raffin RP, Pohlmann AR, Guterres SS, Zawadzki SF. Physicochemical characterization of a hydrophilic model drug-loaded PHBV microparticles obtained by the double emulsion/solvent evaporation technique. *J Braz Chem Soc* 2008;19:1298–305.
- [121] Gabbott P. *Principles and applications of thermal analysis*. John Wiley & Sons; 2008.
- [122] Gregorova A. Application of differential scanning calorimetry to the characterization of biopolymers. *Appl. Calorim. a Wide Context. Scanning Calorimetry, Isothermal Titration Calorim.*
-

-
- Microcalorim., InTech; 2013.
- [123] Klančnik G, Medved J, Mrvar P. Differential thermal analysis (DTA) and differential scanning calorimetry (DSC) as a method of material investigation Diferenčna termična analiza (DTA) in diferenčna vrstična kalorimetrija (DSC) kot metoda za raziskavo materialov. *RMZ–Materials and Geoenvironment* 2010;57:127–42.
- [124] Kong Y, Hay JN. The measurement of the crystallinity of polymers by DSC. *Polymer (Guildf)* 2002;43:3873–8.
- [125] Caballero NED. Desenvolvimento de novos compostos biodegradáveis baseados em poli (3-hidroxi-butirato-co-hidroxi-valerato) e lignosulfonatos 2005.
- [126] Yu H, Qin Z, Zhe Z. Cellulose nanocrystals as green fillers to improve crystallization and hydrophilic property of poly (3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate). *Prog Nat Sci Mater Int* 2011;21:478–84.
- [127] Thiré RM da SM, Arruda LC, Barreto LS. Morphology and thermal properties of poly (3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate)/attapulgitite nanocomposites. *Mater Res* 2011;14:340–4.
- [128] Haines PJ. Thermal methods of analysis: principles, applications and problems. Springer Science & Business Media; 2012.
- [129] Nielsen SS. Food analysis. Springer; 2010.
- [130] Gaisford S, Kett V, Haines P. Principles of thermal analysis and calorimetry. Royal society of chemistry; 2016.
- [131] Sichina WJ. Characterization of polymers using TGA. Bost Perkin Elmer 2001.
- [132] MacKenzie KJ, Dunens OM, Harris AT. Insights into carbon nanotube growth using an automated gravimetric apparatus. *Carbon N Y* 2013;59:344–65.
- [133] Singh S, Mohanty AK, Sugie T, Takai Y, Hamada H. Renewable resource based biocomposites from natural fiber and polyhydroxybutyrate-co-valerate (PHBV) bioplastic. *Compos Part A Appl Sci Manuf* 2008;39:875–86.
- [134] Foner S. Versatile and sensitive vibrating-sample magnetometer. *Rev Sci Instrum* 1959;30:548–57.
- [135] Foner S. Review of magnetometry. *IEEE Trans Magn* 1981;17:3358–63.
- [136] Smith DO. Development of a Vibrating-Coil Magnetometer. *Rev Sci Instrum* 1956;27:261–8.
- [137] Krishnan R V, Banerjee A. Harmonic detection of multipole moments and absolute calibration in a simple, low-cost vibrating sample magnetometer. *Rev Sci Instrum* 1999;70:85–91.
- [138] Caruso MJ, Bratland T, Smith CH, Schneider R. A new perspective on magnetic field sensing. *SENSORS-PETERBOROUGH-* 1998;15:34–47.
- [139] Galili I, Kaplan D, Lehavi Y. Teaching Faraday's law of electromagnetic induction in an introductory physics course. *Am J Phys* 2006;74:337–43.
- [140] Dodrill BC, Cryotronics LS. Magnetic media measurements with a VSM. Lake Shore Cryotronics, Westerv 1999;575.
- [141] Chikazumi S, Graham CD. Physics of Ferromagnetism 2e. vol. 94. Oxford University Press on Demand; 2009.
- [142] Altpeter I, Dobmann G, Katerbau K-H, Schick M, Binkele P, Kizler P, et al. Copper precipitates in 15 NiCuMoNb 5 (WB 36) steel: material properties and microstructure, atomistic simulation, and micromagnetic NDE techniques. *Nucl Eng Des* 2001;206:337–50.
- [143] Oyane A, Kim H, Furuya T, Kokubo T, Miyazaki T, Nakamura T. Preparation and assessment of revised simulated body fluids. *J Biomed Mater Res Part A* 2003;65:188–95.
- [144] Li H, Chang J. In vitro degradation of porous degradable and bioactive PHBV/wollastonite composite scaffolds. *Polym Degrad Stab* 2005;87:301–7.
- [145] Sultana N, Khan TH. In vitro degradation of PHBV scaffolds and nHA/PHBV composite scaffolds containing hydroxyapatite nanoparticles for bone tissue engineering. *J Nanomater*
-

- 2012;2012:1.
- [146] Liu H, Pancholi M, Stubbs J, Raghavan D. Influence of hydroxyvalerate composition of polyhydroxy butyrate valerate (PHBV) copolymer on bone cell viability and in vitro degradation. *J Appl Polym Sci* 2010;116:3225–31.
- [147] Casarin SA. *Blendas de PHBV e PCL para uso em dispositivos de osteossíntese* 2010.
- [148] Fischer D, Li Y, Ahlemeyer B, Krieglstein J, Kissel T. In vitro cytotoxicity testing of polycations: influence of polymer structure on cell viability and hemolysis. *Biomaterials* 2003;24:1121–31.
- [149] van Meerloo J, Kaspers GJL, Cloos J. Cell sensitivity assays: the MTT assay. *Cancer Cell Cult Methods Protoc* 2011:237–45.
- [150] Gerlier D, Thomasset N. Use of MTT colorimetric assay to measure cell activation. *J Immunol Methods* 1986;94:57–63.
- [151] Gonçalves R, Martins P, Correia DM, Sencadas V, Vilas JL, León LM, et al. Development of magnetoelectric CoFe₂O₄/poly (vinylidene fluoride) microspheres. *RSC Adv* 2015;5:35852–7.
- [152] Jin-Shan T, Yun-Ze L, Meng-Meng L. Preparation of aligned polymer micro/nanofibres by electrospinning. *Chinese Phys Lett* 2008;25:3067.
- [153] Tomaszewski W, Swieszkowski W, Szadkowski M, Kudra M, Ciechanska D. Simple methods influencing on properties of electrospun fibrous mats. *J Appl Polym Sci* 2012;125:4261–6.
- [154] Ero-Phillips O, Jenkins M, Stamboulis A. Tailoring crystallinity of electrospun plla fibres by control of electrospinning parameters. *Polymers (Basel)* 2012;4:1331–48.
- [155] Baji A, Mai Y-W, Wong S-C, Abtahi M, Chen P. Electrospinning of polymer nanofibers: effects on oriented morphology, structures and tensile properties. *Compos Sci Technol* 2010;70:703–18.
- [156] Pham QP, Sharma U, Mikos AG. Electrospinning of polymeric nanofibers for tissue engineering applications: a review. *Tissue Eng* 2006;12:1197–211.
- [157] Li W, Laurencin CT, Caterson EJ, Tuan RS, Ko FK. Electrospun nanofibrous structure: a novel scaffold for tissue engineering. *J Biomed Mater Res Part A* 2002;60:613–21.
- [158] Tong H, Wang M. An investigation into the influence of electrospinning parameters on the diameter and alignment of poly (hydroxybutyrate-co-hydroxyvalerate) fibers. *J Appl Polym Sci* 2011;120:1694–706.
- [159] Murphy CM, Haugh MG, O'Brien FJ. The effect of mean pore size on cell attachment, proliferation and migration in collagen–glycosaminoglycan scaffolds for bone tissue engineering. *Biomaterials* 2010;31:461–6.
- [160] Sun T, Feng L, Gao X, Jiang L. Bioinspired surfaces with special wettability. *Acc Chem Res* 2005;38:644–52.
- [161] Lee JH, Khang G, Lee JW, Lee HB. Interaction of different types of cells on polymer surfaces with wettability gradient. *J Colloid Interface Sci* 1998;205:323–30.
- [162] Tamada Y, Ikada Y. Cell adhesion to plasma-treated polymer surfaces. *Polymer (Guildf)* 1993;34:2208–12.
- [163] Luo S, Netravali AN. Mechanical and thermal properties of environment-friendly “green” composites made from pineapple leaf fibers and poly (hydroxybutyrate-co-valerate) resin. *Polymer Composites* 1999;20:367–78.
- [164] Perego G, Cella GD, Bastioli C. Effect of molecular weight and crystallinity on poly (lactic acid) mechanical properties. *Journal of Applied Polymer Scienc* 1996;59:37–43.
- [165] Mazuera D, Perales O, Suarez M, Singh S. Synthesis, characterization and thermal analysis of polyimide–cobalt ferrite nanocomposites. *Mater Sci Eng A* 2010;527:6393–9.
- [166] Aaron W, August F, Walter K. Growth of ferrous-free cobalt ferrite single crystals. *J App Phys* 1968;34:388.
- [167] Ferretti A, Arnott RJ, Delaney E, Wold A. Cobalt ferrite single crystals. *J Appl Phys* 1961;32:905.
-

- [168] Zhou Q, Xanthos M. Nanoclay and crystallinity effects on the hydrolytic degradation of polylactides. *Polym Degrad Stab* 2008;93:1450–9.
- [169] Li S, Garreau H, Vert M. Structure-property relationships in the case of the degradation of massive poly (α -hydroxy acids) in aqueous media. *J Mater Sci Mater Med* 1990;1:198–206.
- [170] Kim D-H, Lee S-H, Kim K-N, Kim K-M, Shim I-B, Lee Y-K. Cytotoxicity of ferrite particles by MTT and agar diffusion methods for hyperthermic application. *J Magn Magn Mater* 2005;293:287–92.
- [171] Di Guglielmo C, López DR, De Lapuente J, Mallafre JML, Suárez MB. Embryotoxicity of cobalt ferrite and gold nanoparticles: a first in vitro approach. *Reprod Toxicol* 2010;30:271–6.