

Universidade do Minho
Escola de Ciências

Estela Marisa Oliveira Carvalho

Desenvolvimento de hidrogéis biodegradáveis carregados com microsferas eletroativas para aplicação em Engenharia de Tecidos



Estela Marisa Oliveira Carvalho

**Desenvolvimento de hidrogéis biodegradáveis
carregados com microsferas eletroativas para
aplicação em Engenharia de Tecidos**

Dissertação de Mestrado
Mestrado em Biofísica e Bionanossistemas

Trabalho efetuado sob orientação
da **Professora Doutora Maria Gabriela Coutinho
Soares Lema Botelho**
e
do **Professor Doutor Senentxu Lanceros-Méndez**

Dezembro 2017

Declaração

Nome

Estela Marisa Oliveira Carvalho

Endereço de correio eletrónico: estela.carvalhoo@hotmail.com

Telefone: 934071987

Numero de identificação civil: 14550965

Titulo da dissertação de mestrado

Desenvolvimento de hidrogéis biodegradáveis carregados com microsferas eletroativas para aplicação em Engenharia de Tecidos

Orientadores

Professora Doutora Maria Gabriela Coutinho Soares Lema Botelho e Professor Doutor Senentxu Lanceros-Méndez

Ano de conclusão: 2017

Designação do mestrado

Mestrado em Biofísica e Bionanossistemas

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

Universidade do Minho, ___ / ___ / ___

Assinatura: _____

Agradecimentos

Esta dissertação foi resultado de um extenso e árduo trabalho que culminou com a concretização do objetivo a que me propus. Porém, nada seria conseguido sem a ajuda e o apoio pessoal ou profissional de várias pessoas.

Nesta sequência, e primeiramente, gostaria de agradecer aos meus orientadores, Professora Doutora Gabriela Botelho e Professor Doutor Senentxu Lanceros-Méndez, por aceitarem imediatamente a orientação deste projeto, pelo conhecimento científico que me transmitiram, bem como pela inteira dedicação e disponibilidade. Agradeço ainda a exímia orientação da Doutora Clárisse Ribeiro, que embora não possuindo o oficial encargo de orientador, acompanhou-me exemplarmente em todo este ano letivo. Um sincero obrigada aos três.

Agradeço também ao grupo de investigação ESM pelo vasto conhecimento que tão prontamente partilharam e, essencialmente, pelo espírito de equipa que disseminam. Em especial à Daniela, que para além da ajuda com o seu conhecimento científico, é detentora de uma dedicação e preocupação incondicional. Ainda no grupo, não é possível esquecer um agradecimento ao meu colega de secretária, Luís, por proporcionar momentos de partilha e descontração ao longo deste ano.

Um enorme agradecimento aos meus amigos, aos amigos de sempre que me abstrairam sempre do trabalho e das preocupações. E às amigas de Braga/Vila Real – à Rita e à Ana – que me acompanharam e ampararam em toda a caminhada aqui na universidade.

Um agradecimento, especialíssimo, à Bea e à Teresa, pela amizade, companheirismo, entreajuda, paciência, boa disposição... que me deram, não só este ano, mas sempre! Sou uma sortuda por ter estas duas sempre comigo.

Ao Miguel, agradeço todo o amor, carinho, compreensão e a capacidade de me fazer autovalorizar e acreditar nas minhas capacidades.

Por fim, aos meus pais e ao Rui, não só por este ano, mas também pelos restantes 22 anos de ensinamentos e amor absoluto.

A todos um sincero muito obrigada!

Resumo

O sucesso da engenharia de tecidos depende em grande medida do suporte celular (*scaffold*) utilizado. A capacidade de adesão, proliferação e diferenciação celular é influenciada pelas propriedades intrínsecas dos biomateriais utilizados na produção dos *scaffolds*. Neste sentido, a escolha de materiais magnetostritivos, para além das capacidades mencionadas, providenciam simultaneamente estímulos biofísicos necessários para os processos celulares.

Os materiais magnetostritivos deformam-se na presença de um campo magnético, sendo por isso utilizados para mimetizar as solicitações mecânicas que as células osteoblásticas participam num corpo em movimento. A magnetostrição permite remotamente a geração de um estímulo mecânico, através da aplicação de um campo magnético, importante em casos de impossibilidade de movimento.

No presente trabalho, foram desenvolvidas microsferas poliméricas de poli (*L*-ácido láctico) (PLLA) e microsferas compósitas, PLLA com nanopartículas magnetostritivas (ferrites de cobalto (CoFe_2O_4)). Posteriormente, foram inseridas num hidrogel, escolhido devido à capacidade de recriar o ambiente hidratado dos tecidos celulares e, simultaneamente, funcionar como uma matriz de suporte para as microsferas e para as células.

De forma a avaliar a eficácia da técnica de processamento, analisaram-se as propriedades físico-químicas das microsferas. Desta forma, foi determinado o diâmetro médio das mesmas, sendo que as de PLLA apresentaram um valor de $1,3 \pm 0,4 \mu\text{m}$ e as compósitas de $3 \pm 1 \mu\text{m}$. Adicionalmente, concluiu-se que as propriedades nativas do polímero não são alteradas com a adição de CoFe_2O_4 , e que a histerese magnética é semelhante nas microsferas compósitas e nas nanopartículas de CoFe_2O_4 . Destes resultados, foi ainda possível determinar a composição de CoFe_2O_4 no interior da matriz polimérica (6,4% (p/p)). Complementarmente, foi avaliada a citotoxicidade, de onde se concluiu que as microsferas não são citotóxicas.

Após a inserção das microsferas no hidrogel, foram realizados ensaios de adesão e proliferação de osteoblastos, em culturas em condições estáticas e dinâmicas. Concluiu-se que quando as células são sujeitas a um estímulo mecânico, numa cultura dinâmica, proliferam mais, ao contrário do que acontece numa cultura estática. Paralelamente, quando as células são cultivadas em monocamada sobre o hidrogel denota-se uma proliferação superior, comparativamente com o crescimento celular no interior deste. Assim sendo, foi demonstrado que a utilização de microsferas magnetoativas num hidrogel é promissora na regeneração óssea.

Abstract

Scaffolds play a relevant crucial role in the success of tissue engineering approaches. Their intrinsic properties are known to influence cellular processes such as adhesion, proliferation and differentiation, thus it is relevant to take into consideration the bioactivity of the scaffolds. Polymer-based magnetostrictive materials have the needed bioactivity for effective tissue engineering while simultaneously providing biophysical stimuli capable of improving cellular processes.

Magnetostrictive materials deform when subjected to a magnetic field. These materials are used in order to mimic the mechanical solicitations generated during natural body motion, and to which osteoblastic cells are subjected. By the application of magnetic field these materials allow the remote generation of such important stimuli in situations when movement is not possible.

In the present work, poly (*L*-lactic acid) (PLLA) microspheres and composite microspheres, PLLA with magnetostrictive cobalt ferrites (CoFe_2O_4), were produced. Subsequently, both composite and polymer microspheres were introduced into a hydrogel, selected due to its ability to simulate the hydrated environment of tissues while simultaneously acting as a support matrix for both microspheres and cells.

In order to evaluate the effects of processing techniques, the chemical, physical, magnetic and morphological properties of the microspheres were analyzed. Polymer microspheres showed an average diameter of $1.3 \pm 0.4 \mu\text{m}$ and the composite ones a diameter of $3 \pm 1 \mu\text{m}$. Physical-chemical analysis revealed that PLLA properties were not affected/alterd during processing and/or with the addition of magnetic particles (CoFe_2O_4). Magnetic measurements revealed similar hysteresis loops for the pure particles and the composites, the fillers representing 6.4% (w/w) of the mass. Cytotoxicity tests were also performed and results were positive for both microspheres.

After insertion in the hydrogel, adhesion and proliferation assays were performed under static and dynamic culturing conditions using osteoblasts. Increased proliferation was observed with dynamic conditions when compared to static, and with cells deposited on the hydrogel's surface rather than its interior. Thus, it was demonstrated that the use of magnetoactive microspheres in a hydrogel is a viable/promising option for bone tissue regeneration.

Índice

<u>Agradecimentos</u>	<u>I</u>
<u>Resumo</u>	<u>III</u>
<u>Abstract</u>	<u>V</u>
<u>Lista de Figuras</u>	<u>IX</u>
<u>Lista de Tabelas</u>	<u>XI</u>
<u>Lista de abreviaturas</u>	<u>XIII</u>
<u>1. Introdução</u>	<u>1</u>
1.1 Enquadramento teórico	3
1.2 Objetivos	4
1.3 Estrutura da dissertação	4
<u>2. Estado da arte</u>	<u>7</u>
2.1 Engenharia de Tecidos	9
2.1.1 Propriedades dos <i>scaffolds</i>	10
2.1.2 Fisiologia do osso	11
2.2 Biomateriais poliméricos	14
2.2.1 Poli (<i>L</i> -ácido láctico), como polímero piezoelétrico	15
2.3 Compósitos magnéticos como biomateriais	19
2.3.1 Compósitos magnetoelétricos	20
2.4 Hidrogel	21
2.5 Biorreator	24
2.6 Estudos relevantes no contexto do presente trabalho	25
<u>3. Material e Métodos</u>	<u>29</u>
3.1 Processamento de microesferas de poli (<i>L</i> -ácido láctico) puras e compósitas	31
3.2 Preparação das amostras para culturas celulares	32

3.3	Caracterização das microsferas produzidas	35
3.3.1	Análise morfológica e de tamanhos	35
3.3.2	Caracterização físico-química e térmica	37
3.3.3	Análise das propriedades magnéticas	40
3.4	Avaliação da citotoxicidade das microsferas	41
3.5	Avaliação da adesão celular	42
3.6	Avaliação da proliferação celular	42
4.	<u>Resultados e Discussão</u>	45
4.1	Análise morfológica e de tamanhos	47
4.2	Caracterização físico-química e térmica	49
4.3	Análise das propriedades magnéticas	54
4.4	Avaliação da citotoxicidade das microsferas	56
4.5	Culturas celulares com hidrogéis e microsferas	57
4.5.1	Avaliação da adesão celular	57
4.5.2	Avaliação da proliferação celular	58
5.	<u>Conclusão</u>	61
5.1	Sugestões para trabalhos futuros	64
6.	<u>Referências</u>	65

Lista de Figuras

Figura 2.1: Esquema representativo da tríade da engenharia de tecidos: fatores de crescimento (substâncias bioativas), células (diferenciadas ou indiferenciadas) e <i>scaffolds</i>	9
Figura 2.2: Representação dos mecanismos intervenientes na reparação osteogénica. Ampliado estão representados os eventos desencadeados após um estímulo mecânico nos osteoblastos. (1) Abertura dos canais de cálcio que resulta na ativação de enzimas intracelulares e despolarização da membrana com subsequente abertura de mais canais de cálcio dependentes de voltagem, simultaneamente, é gerado ATP – a – e passado à célula seguinte. (2) As integrinas são ativadas após deformação do colagénio. (3) Ativação das proteínas G. (4) O citoesqueleto é deformado, proporcionando locais de sinalização – b – e ativação dos mesmos eventos no osteoblasto seguinte. Adaptado de [33].	13
Figura 2.3: Esquema representativo de polímeros ativos.	15
Figura 2.4: Estereoisómeros do ácido láctico (a) e isómeros díméricos (b). Após polimerização obtém-se os polímeros (c). Adaptado de [50].	17
Figura 2.5: Representação gráfica de uma emulsão óleo água. Adaptado de [56].	18
Figura 2.6: Representação ilustrativa de partículas magnéticas com encapsulamento polimérico.	21
Figura 2.7: Relação entre a densidade de reticulação do hidrogel e algumas propriedades como o rácio volumétrico de inchamento (Q), o módulo de cisalhamento (G) e o coeficiente de difusão (D). Adaptado de [75].	21
Figura 2.8: Esquema representativo de diferentes biorreatores utilizados em diferentes cultivos celulares, consoante a finalidade: (a) Tanque agitado; (b) Tanque tubular; (c) Fibra oca. Adaptado de [87].	24
Figura 2.9: Biorreator com estímulo magnético para cultivos celulares dinâmicos.	25
Figura 3.1: Representação esquemática do processamento de microsferas de PLLA e PLLA/CoFe ₂ O ₄	32
Figura 3.2: Representação das duas condições utilizadas nas culturas celulares.	33
Figura 3.3: Diagrama representativo de uma partícula carregada negativamente, com as camadas duplas elétricas [105].	39
Figura 4.1: Morfologia das microsferas de a) PLLA e c) PLLA/CoFe ₂ O ₄ . Distribuição de tamanhos das microsferas de b) PLLA e d) PLLA/CoFe ₂ O ₄ , obtida com o <i>software ImageJ</i>	48
Figura 4.2: Distribuição de tamanhos das microsferas de PLLA obtida por DLS.	49
Figura 4.3: Espectro infravermelho das microsferas de PLLA e PLLA/CoFe ₂ O ₄	50
Figura 4.4: Análise calorimétrica por DSC de microsferas de PLLA e PLLA/CoFe ₂ O ₄	52
Figura 4.5: Análise calorimétrica por DSC das microsferas de PLLA e PLLA/CoFe ₂ O ₄ , depois do tratamento térmico.	53

Figura 4.6: Análise por Potencial Zeta das microsferas de PLLA e PLLA/CoFe ₂ O ₄ a diferentes pH's.	54
Figura 4.7: Comportamentos magnéticos das microsferas de PLLA/CoFe ₂ O ₄ e das nanopartículas de CoFe ₂ O ₄ , avaliados através de VSM.....	55
Figura 4.8: Viabilidade celular de células 3T3 que cresceram durante 24 e 72 h em contacto com o meio exposto às microsferas de PLLA e PLLA/CoFe ₂ O ₄ e controlos, através de medições com o ensaio MTT.	56
Figura 4.9: Microscopia ótica de hidrogéis com microsferas de a) PLLA e b) PLLA/CoFe ₂ O ₄	57
Figura 4.10: Ensaio de imunocitoquímica em pré-osteoblastos MC3TE-E1 cultivados em hidrogéis com microsferas de a) PLLA e b) PLLA/ CoFe ₂ O ₄ após 24 h de cultura em condições estáticas.	58
Figura 4.11: Proliferação celular de pré-osteoblastos MC3T3-E1 cultivados em hidrogéis com microsferas de PLLA e PLLA/CoFe ₂ O ₄ numa cultura em condições estáticas, após 72 h e em ambas as condições de estudo.	59
Figura 4.12: Proliferação celular de pré-osteoblastos MC3T3-E1 cultivados em hidrogéis com microsferas de PLLA/CoFe ₂ O ₄ numa cultura em condições estáticas e dinâmicas, após 72 h e em ambas as condições de estudo	60

Lista de Tabelas

Tabela 2.1: Características do hidrogel utilizado. Adaptado de [81-83].	23
Tabela 2.2: Diferentes trabalhos desenvolvidos com hidrogéis para aplicação na área biomédica.	26
Tabela 4.1: Bandas de absorção características do PLLA presentes nas microsferas de PLLA e PLLA/CoFe ₂ O ₄ .	51

Lista de abreviaturas

ΔX_c – Grau de cristalinidade

ΔH_m – Entalpia de fusão,

ΔH_{cc} – Entalpia de cristalização

ΔH°_m – Entalpia de fusão de uma amostra 100% cristalina

BSE – Eletrões retrodifundidos

DAPI – 4,6-diamidino-2-fenilindole

DLS – Dispersão dinâmica da luz (do inglês *Dynamic Light Scattering*)

DMEM – Meio modificado *Eagle* da *Dulbecco*

DMSO – Dimetilsulfóxido

DSC – Calorimetria diferencial de varrimento (do inglês *Differential Scanning Calorimetry*)

EBSE – Eletrões retrodifundidos difratados

FBS – Soro fetal bovino

FTIR-ATR – Espectroscopia de Infravermelho com Transformadas de Fourier em modo reflexão total atenuada (do inglês *Attenuated total reflectance-Fourier transform infrared spectroscopy*)

H_c – Campo coercivo

M_r – Magnetização remanescente

M_s – Magnetização de saturação

MTT – Brometo de 3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio

MTS – 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazolium

PAA – Poli (ácido acrílico)

PBS – Tampão fosfato salino

PCL – Poli (caprolactona)

PDI – Índice de polidispersão

PDLA – Poli (*D*-ácido láctico)

PEG – Poli (etilenoglicol)

PEO – Poli (óxido de etileno)

PGA – Poli (ácido glicólico)

PLA – Poli (ácido láctico)

PLGA – Poli (ácido láctico-co-glicólico)

PLLA – Poli (*L*-ácido láctico)

P/S – Penicilina/estreptomicina

PVA – Poli (vinil álcool)

PVDF – Poli (fluoreto de vinilideno)

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

SE – Eletrões secundários

SEM – Microscopia eletrônica de varrimento (do inglês *Scanning Electron Microscopy*)

T_c – Temperatura de cristalização

T_g – Temperatura de transição vítrea

T_m – Temperatura de fusão

TRITC – Tetrametilrodamina

VSM – Magnetómetro de amostra vibrante (do inglês *Vibrating Sample Magnetometer*)

1. Introdução

1.1 Enquadramento teórico

Os serviços médicos deparam-se constantemente com problemas inflamatórios, degenerativos e malformações congénitas em tecidos/órgãos que desencadeiam lesões e danos irreparáveis. Desta forma, desde cedo, surgiram estratégias como a transplantação, inserção de próteses e terapias farmacológicas, que visam colmatar estas enfermidades. Porém, as desvantagens inerentes, como a biodisponibilidade, a transmissão de doenças e a suscetibilidade para infeções, despoletam a procura por novas alternativas. A engenharia de tecidos surge assim como uma estratégia inovadora.

A engenharia de tecidos é uma tríade biomédica que combina células, estímulos externos e suportes celulares (do inglês *scaffolds*), para reparar ou substituir órgãos. Consoante o tecido a regenerar, existem propriedades mecânicas, estruturais e bioquímicas que tem de ser mantidas para garantir uma boa interação material-célula. Neste sentido a escolha dos materiais utilizados na produção de *scaffolds* é um aspeto crucial.

Os materiais inteligentes e funcionais são a aposta mais viável e com mais sucesso nos últimos anos. Estes reúnem características que lhes permite responder reversivelmente a estímulos externos e assim ajustar o estímulo à aplicação que se pretende. Dentro deste grupo de materiais estão os polímeros piezoelétricos, que geram cargas elétricas superficiais após a aplicação de uma tensão mecânica, e vice-versa. Para além destes, existem também os materiais magnetostritivos que têm a capacidade de produzir uma deformação física quando lhe é aplicado um campo magnético. Adicionalmente, os compósitos magnetoelétricos que aliam a piezoelectricidade à magnetostricção e formam materiais que alteram a sua polaridade em resposta a campos magnéticos. Posto isto, os materiais inteligentes são explorados no âmbito da criação de suportes tridimensionais com um papel ativo nos sistemas nos quais são introduzidos, influenciando ativamente a proliferação e diferenciação celular através de criação de estímulos presentes no ambiente natural *in vivo*.

Neste trabalho, pretende-se utilizar um exemplo ilustrativo de um *scaffold* tridimensional – o hidrogel – na regeneração óssea. O hidrogel tem a capacidade de providenciar um microambiente extremamente hidratado que recria a matriz extracelular, permitindo a preservação do fenótipo das células encapsuladas. Para além disso, tenciona-se tirar partido desta matriz para o encapsulamento de microsferas poliméricas e compósitas com propriedades magnetostritivas, que mimetizem estímulos mecânicos semelhantes aos sentidos no osso diariamente. Para o

desencadeamento do estímulo mecânico, utilizar-se-á um biorreator capaz de fornecer o estímulo magnético necessário.

1.2 Objetivos

Com base na problemática descrita no subcapítulo anterior, esta dissertação pretende mostrar que compósitos magnetostritivos biocompatíveis encapsulados numa matriz passível de ser injetada diretamente no osso que se pretende regenerar, influenciam positivamente a proliferação celular de pré-osteoblastos.

Serão estudados dois tipos de microsferas: microsferas poliméricas e microsferas compósitas. Para tal, escolheu-se o poli (*L*-ácido láctico) (PLLA) para a componente polimérica e as ferrites de cobalto (CoFe_2O_4) para fornecer a componente magnetostritiva nas microsferas compósitas. Paralelamente, o hidrogel escolhido foi Mimsys® G, um hidrogel comercial com reconhecida potencialidade em cultivos celulares.

Durante a execução do trabalho objetiva-se cumprir as seguintes tarefas:

- ✓ Desenvolvimento de microsferas de PLLA e PLLA/ CoFe_2O_4 , através do método de emulsão óleo-água;
- ✓ Caracterização completa dos materiais produzidos, relativamente às propriedades estruturais, físicas, químicas e magnéticas;
- ✓ Preparação de hidrogéis com microsferas;
- ✓ Avaliação da citotoxicidade das microsferas desenvolvidas;
- ✓ Avaliação da influência dos hidrogéis com as microsferas encapsuladas na resposta biológica, nas culturas em condições estáticas e dinâmicas, em biorreatores magnéticos.

1.3 Estrutura da dissertação

Esta dissertação está organizada em quatro capítulos: Introdução, Estado da arte, Material e métodos, Resultados e discussão e Conclusão.

No primeiro capítulo é feito um pequeno enquadramento teórico do trabalho executado. Adicionalmente, é apresentada a motivação para a realização do trabalho assim como os objetivos

primordiais propostos, seguida da estrutura da tese por capítulos e uma breve descrição de cada um deles.

O segundo capítulo prende-se com a apresentação de uma pesquisa bibliográfica do tema do trabalho. Este está dividido em vários subcapítulos que apresentam os conceitos relativos a engenharia de tecidos, a biomateriais, com especial ênfase nos materiais piezoelétricos e compósitos magnetoelétricos, assim como noções relativas a hidrogéis. Por fim, é feito um resumo do estado da arte existente nesta mesma temática.

O terceiro capítulo retrata os materiais e a metodologia utilizada nas atividades laboratoriais realizadas, bem como as condições e a explicação teórica que está subjacente às diferentes técnicas de caracterização e ensaios celulares.

No quarto capítulo estão expostos os resultados consequentes da caracterização dos materiais e dos ensaios celulares. Além disso, é feita uma análise desses mesmos resultados e respetiva discussão, recorrendo a fontes bibliográficas.

Por fim, o quinto capítulo tira ilações sobre as conclusões mais relevantes da dissertação de acordo com o capítulo anterior. Paralelamente, é feito um balanço do cumprimento dos objetivos propostos no primeiro capítulo e são apresentadas algumas sugestões de trabalhos a realizar no futuro, de modo a completar o presente trabalho.

2. Estado da arte

2.1 Engenharia de Tecidos

A transplantação tem evoluído constantemente com o objetivo de tratar doenças relacionadas com órgãos lesados ou danificados. A principal limitação reside na biodisponibilidade de órgãos para os pacientes, não existindo forma de responder à procura, face à oferta existente. Para além disso, existe o problema da rejeição crónica do órgão por parte do sistema imunológico do paciente, que leva a um desequilíbrio imunomodulação-imunosupressão. As opções de tratamentos convencionais disponíveis, ao invés do transplante, contemplam a reparação cirúrgica, as próteses, os dispositivos mecânicos e a terapia com fármacos. Paralelamente, surge o uso de técnicas de medicina regenerativa, na qual se insere a engenharia de tecidos [1, 2].

A engenharia de tecidos envolve a combinação de uma matriz de suporte com células vivas e/ou moléculas biologicamente ativas, ocasionalmente designadas de fatores de crescimento, com o propósito de regenerar tecidos lesados ou danificados e assim restabelecer a dinâmica biológica e a funcionalidade do mesmo. A matriz de suporte, conhecida também por *scaffold*, funciona como um molde que reúne características que permitam o crescimento tecidular [3]. Uma vez no *scaffold*, as células são colocadas num biorreator que providencia estímulos biofísicos mimetizando assim o sistema biológico [4]. Esta combinação dinâmica é usualmente designada de tríade da Engenharia de Tecidos (Figura 2.1).

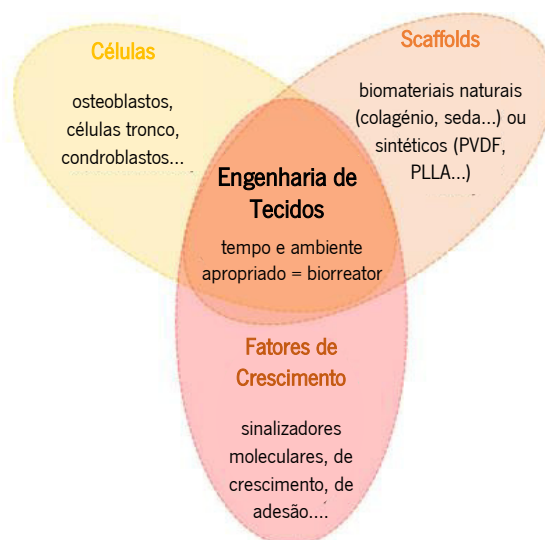


Figura 2.1: Esquema representativo da tríade da engenharia de tecidos: fatores de crescimento (substâncias bioativas), células (diferenciadas ou indiferenciadas) e *scaffolds*.

A engenharia de tecidos tira partido da capacidade regenerativa inerente dos tecidos e órgãos, e utiliza-a em situações distintas: na construção *in vitro* de tecido bioartificial, a partir de células do dador cultivadas num biorreator, quando se pretende substituir os tecidos ou órgãos com defeito; ou em situações que requerem a modificação *in vivo* do crescimento e/ou função das células, o que implica uma regeneração *in situ* [5].

2.1.1 Propriedades dos *scaffolds*

A seleção de materiais adequados para a construção de um *scaffold* constitui uma etapa fundamental para o sucesso da regeneração tecidual. As características dos materiais permitirão prever a forma como se irão comportar quando aplicados como suportes.

Posto isto, os materiais inteligentes constituem a melhor solução, uma vez que são materiais com a capacidade de produzir uma variação numa das suas propriedades físico-químicas (reproduzível, de magnitude suficientemente para ser utilizada) em resposta consoante o estímulo externo que lhe é aplicado [6, 7]. Os estímulos externos podem ser vários: variações do pH, campo elétrico e magnético, temperatura, luminosidade, variações químicas do meio ou mesmo alterações mecânicas [6]. A resposta a estes estímulos classifica o material, exemplo disso são os materiais piezoelétricos que produzem uma voltagem quando uma força mecânica é aplicada, e vice-versa; os materiais com memória de forma (do inglês *shape memory*) que têm a capacidade de, depois de ser sujeitas a deformações, voltar ao seu estado inicial como resultado do aumento de temperatura, de pressão ou outras condições de tensão; entre outros exemplos [8]. Desta forma, ter perceção da relação estímulo-resposta é uma mais-valia para que seja possível utilizar um *scaffold* com as características adequadas ao tipo de tecido a regenerar, construindo assim um suporte personalizado.

Existem padrões de escolha que têm de ser tidos em conta, independentemente do tipo de tecido a regenerar: (i) a exequibilidade de fabrico, (ii) capacidade de transformação no produto final, (iii) propriedades mecânicas, (iv) habilidade de ligação a compostos ativos, (v) a capacidade de possuir uma libertação controlada, (vi) devem ainda ter capacidade de resistência, de forma a não colapsarem, e a fim de garantirem a conservação da estrutura tridimensional durante o processo de desenvolvimento do tecido *in vitro* e *in vivo* [9]. Imperativamente, não podem ser citotóxicos, ou seja, tem de ser biocompatíveis e preferencialmente biodegradáveis, de modo que permitam às células produzir a sua própria matriz extracelular e que os produtos da degradação

não sejam tóxicos, coexistindo com o corpo humano sem que interfiram com as funções fisiológicas [10]. A degradação do biomaterial ocorre simultaneamente com a formação do novo tecido, ativando uma reposta inflamatória controlada combinada com fluxo de macrófagos para o local [4, 11, 12]

Todas as propriedades dos *scaffold* são importantes, mas quando se trata de tecidos ósseos ou cartilagem vários desafios são colocados. Nestes casos, as propriedades mecânicas são muito específicas (tamanho dos poros, grau de porosidade, conectividade entre poros e permeabilidade) [13-15]. Requer-se um *scaffold* que possua poros suficientemente grandes para permitir a migração celular dentro do mesmo, mas que não sejam em demasia para que se obtenha uma superfície específica o suficiente, o que leva a uma densidade mínima de ligandos e uma eficiente ligação entre os *scaffolds* e as células. Portanto, os *scaffolds* não possuem um diâmetro crítico para os poros, variam consoante o tipo de células utilizadas e o tecido a manipular [13-16]. Também a conexão entre poros e o grau de porosidade são essenciais para melhorar a penetração celular, difusão dos nutrientes necessários e, por outro lado, a difusão dos resíduos provenientes da atividade celular [4].

Para além destas características macro, a microarquitetura também desempenha um papel importante. A adesão celular está intimamente relacionada com as características superficiais do *scaffold* e estas variam consoante a rugosidade do material [17]. A rugosidade está diretamente relacionada, por sua vez, com o grau de cristalinidade, sendo que, estes não produzem a mesma reposta em todas as linhas celulares. Diferentes linhas celulares respondem de forma diferente à rugosidade/cristalinidade do material, exemplos disso são os fibroblastos e osteoblastos, em que os primeiros proliferam melhor num *scaffold* com maior grau de cristalinidade (elevada rugosidade) e os segundos comportam-se de forma contrária [18, 19].

2.1.2 Fisiologia do osso

Em 1892, Julius Wolff [20] sugeriu que uma tensão imposta no osso gera modificações no seu tamanho, forma e densidade. Com base nesta teoria desenvolveu a Lei de Wolff. A partir daí, a remodelação na arquitetura do osso passou a ser considerada como um encargo das tensões mecânicas, facto que se reflete no osso mais denso dos braços de tenistas e na perda de densidade óssea dos astronautas [20]. Mais tarde, Yasuda [21] descreveu a resposta piezoelétrica no osso e, já com Fukada [22], concluiu que não eram as células os responsáveis pela resposta.

Desta forma, atribuíram o comportamento ao colagénio, um denso e alinhado conjunto de fibrilas contendo cristais de hidroxiapatite, que contêm cálcio na sua estrutura e são anisotrópicos. Quando comprimidos, os cristais sofrem deformação e geram uma voltagem que atrai iões de cálcio para a estrutura óssea estimulada mecanicamente. Posteriormente, Fukuda e os seus colaboradores implantaram e testaram um material piezoelétrico. Os resultados mostraram que há formação de osso por baixo de um filme piezoelétrico, e esta formação foi considerada como uma consequência do desenvolvimento de cargas por deformação dos filmes [23, 24]. Similarmente, outros estudos *in vivo* reportaram que, após uma fratura, o lado concavo do osso (área sobre compressão) fica carregado negativamente e o lado oposto, convexo, fica carregado positivamente. A área de compressão (eletronegativa) dá lugar à área de formação/remodelação do novo tecido ósseo [25-27].

Ao longo da história, muitos autores [25-27] reportaram a piezoelectricidade do osso. Posteriormente, num estudo mais recente de Dadsetan e dos seus colaboradores [28], foi comprovado o mesmo nas células condrocíticas. Foram fabricados *scaffolds* a partir de hidrogéis carregados negativamente e estes apresentaram propriedades favoráveis para a ligação das células e da expressão/produção da sua matriz, ao contrário do que acontece quando utilizados hidrogéis carregados positivamente ou neutros [28].

A influência dos estímulos internos e externos na homeostasia do osso é importante hoje e no futuro, quer para a cura de fraturas como para a possível exploração humana do espaço. Deste modo, surgem constantemente estudos que tentam entender quais os estímulos certos a aplicar no osso. Para além da piezoelectricidade, também os estímulos mecânicos, sejam eles a gravidade, a compressão ou a deformação por cisalhamento pelos próprios fluidos humanos, são alvos de estudo [29]. Sabe-se agora que as células existentes no tecido ósseo respondem por si só a estímulos mecânicos. O efeito mecanotransdutor inerente a este tecido permite-lhe converter tensões mecânicas em sinais elétricos e bioquímicos e assim desencadear processos internos que lhes permite proliferar e intervir na restituição óssea [30, 31].

Os osteoblastos, células que segregam matriz óssea, são umas das células que participam mais ativamente na remodelação do osso, uma função essencial para a manutenção da sua integridade estrutural. A atividade destas células resulta de uma série de sinalizações interligadas com outras células, nomeadamente os osteoclastos (células que removem a matriz antiga), de modo que o processo seja completo e bem-sucedido (Figura 2.2) [32]. Acredita-se que os quatro mecanossensores diretamente relacionados com a mecanoestimulação de osteoblastos sejam (i)

a abertura de canais de cálcio; (ii) a ativação das integrinas por deformação do, por exemplo, colagénio, (iii) ativação das proteínas G da bicamada lipídica; e (iv) a deformação do citoesqueleto (Figura 2.2). Estes sensores da membrana celular desencadeiam uma resposta bioquímica no interior da célula que se traduz na segregação de fatores de crescimento, superexpressão (do inglês *overexpressing*) de osteoblastos, entre outros eventos celulares que são considerados principais reguladores locais da osteogénese [30, 33].

Depois de renovarem a matriz óssea, os osteoblastos ficam envolvidos na mesma formando os osteócitos. Estes são também mecanotransdutores e conseguem traduzir o estímulo mecânico numa resposta eficaz na renovação do tecido ósseo, através do desencadeamento da osteoblastogénese, e assim se repete o ciclo [34]. A remodelação do tecido é ativa de várias formas, sendo que esta é uma das mais eficazes [32].

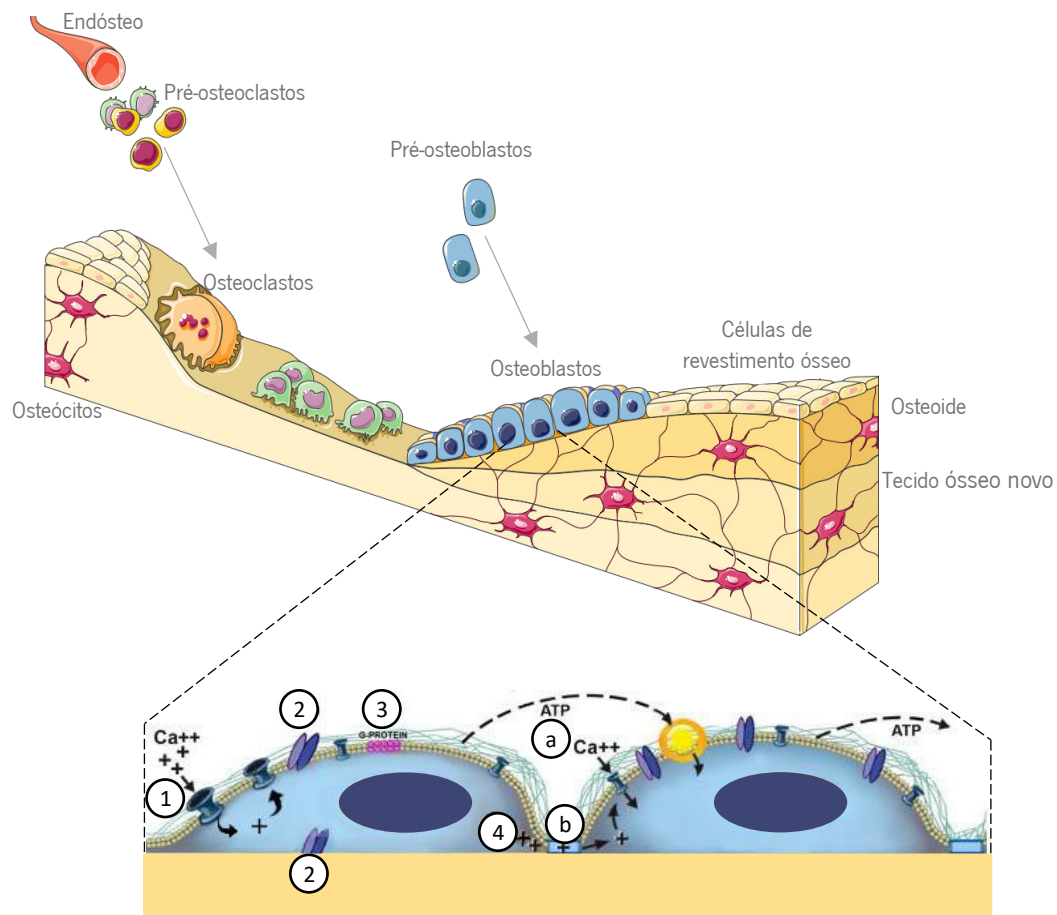


Figura 2.2: Representação dos mecanismos intervenientes na reparação osteogénica. Ampliado estão representados os eventos desencadeados após um estímulo mecânico nos osteoblastos. (1) Abertura dos canais de cálcio que resulta na ativação de enzimas intracelulares e despolarização da membrana com subsequente abertura de mais canais de cálcio dependentes de voltagem, simultaneamente, é gerado ATP – a – e passado à célula seguinte. (2) As integrinas são ativadas após deformação do colagénio. (3) Ativação das proteínas G. (4) O citoesqueleto é deformado, proporcionando locais de sinalização – b – e ativação dos mesmos eventos no osteoblasto seguinte. Adaptado de [33].

Posto isto, é de realçar que o tecido ósseo é particularmente dinâmico. Desta forma, *in vitro* uma cultura celular capaz de biomimetizar os estímulos sentidos pelo osso diariamente, potencia a proliferação e diferenciação de linhas osteogénicas. É neste conceito que assenta a conhecida engenharia de tecidos ativa [8].

2.2 Biomateriais poliméricos

Nas últimas décadas, uma variedade de polímeros com propriedades químicas, físicas e estruturais bem definidas tem emergido como potenciais biomateriais. Estes estão divididos em duas grandes categorias: naturais ou sintéticos. Os naturais são atrativos pelo facto de serem obtidos de fontes naturais, exibindo propriedades semelhantes às dos tecidos originários o que facilita algumas etapas da regeneração celular, como a capacidade de adesão, proliferação e infiltração celular no *scaffold* [35]. Por outro lado, são desvantajosos na medida que não possuem propriedades mecânicas e elétricas favoráveis e apresentam dificuldades na manipulação *in vitro*, não permitindo adaptá-los à aplicação [36]. Entre estes estão as proteínas (colagénio, seda, fibrinogénio, elastina, queratina, alumina), os polissacáridos (agarose, amido, dextrano, alginato, derivados do ácido hialurónico e quitina) e os polinucleótidos (DNA e RNA) [37, 38].

Como forma de ultrapassar as limitações dos polímeros naturais surgem os polímeros sintéticos, em particular o poli (ácido glicólico) (PGA), o poli (ácido láctico) (PLA), o poli (*L*-ácido láctico) (PLLA), o poli (ácido láctico-co-glicólico) (PLGA), o poli (caprolactona) (PCL), o poli (etilenoglicol) (PEG) e o poli (fluoreto de vinilideno) (PVDF), que possuem especial relevo em engenharia de tecidos [39]. O uso de polímeros sintéticos acompanha o avanço da ciência e da engenharia dos materiais, o que permite otimizar e melhorar os polímeros para obter biomateriais inteligentes adequados às necessidades das diversas áreas da ciência [40].

A “inteligência” dos polímeros torna-os, generalizadamente, polímeros ativos. Assim, dependendo do mecanismo de transdução, estes podem ser classificados como polímeros não deformáveis eletricamente, quando o estímulo não é elétrico, mas sim luz, pH e temperatura; ou polímeros eletroativos, quando há um mecanismo eletromecânico envolvido [41]. Por sua vez, os polímeros eletroativos podem ser divididos em iónicos e eletrónicos – como mostra a Figura 2.3– em que os primeiros são acionados pelo movimento de iões através do polímero quando aplicado um campo elétrico, e os segundos sofrem deformação pela aplicação de um campo elétrico que altere a orientação dos momentos dipolares [42, 43]. Os polímeros eletrónicos mantêm-se

deformados à temperatura ambiente e sofrem esta modificação de forma muito rápida (milissegundos), no entanto necessitam da aplicação de campos elétricos na ordem dos 150 MV/m. Contrariamente, os iônicos são mais lentos a atuar, mas requerem voltagens baixas (1 V e 2 V) [44].

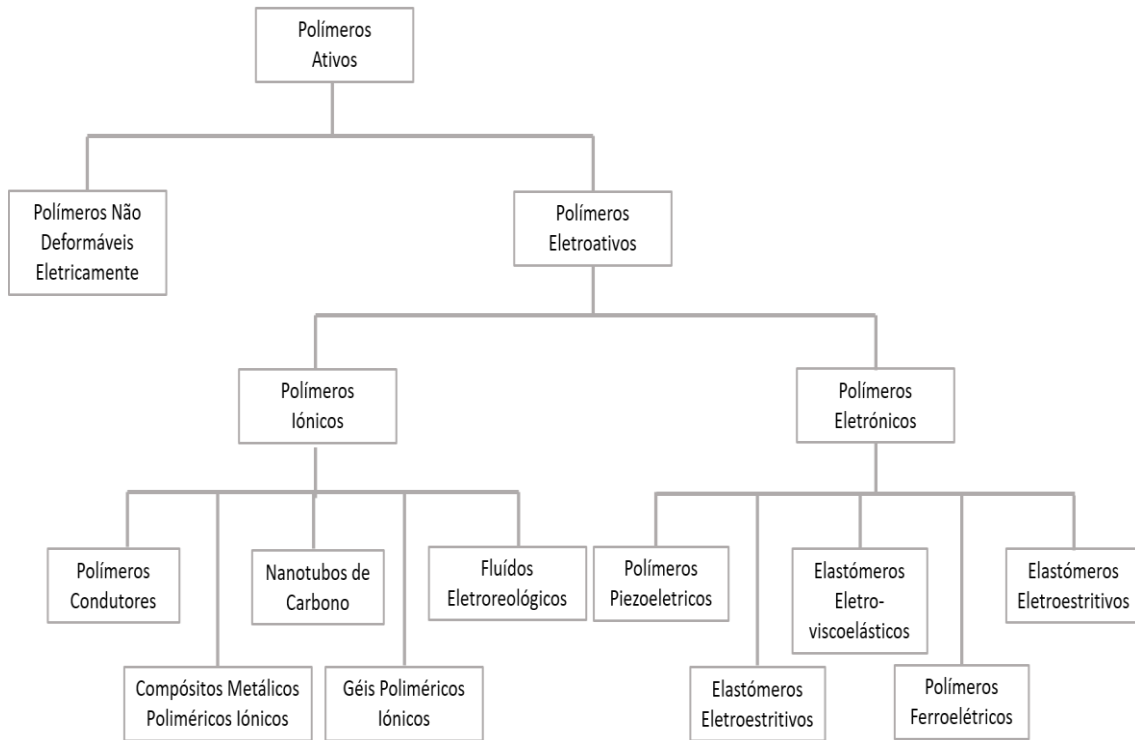


Figura 2.3: Esquema representativo de polímeros ativos.

Os polímeros eletroativos são facilmente manobráveis e adaptáveis o que permite projetar diferentes geometrias que estiquem, encolham, dobrem, entre outras. Deste modo tornam-se polímeros interessantes na classe de materiais inteligentes em inúmeras aplicações como sensores, atuadores e como biomateriais no campo da biomedicina [45, 46].

Em engenharia de tecidos, utilizar um polímero sintético dotado das características que advém da eletroatividade é uma mais-valia, uma vez que permite prever a forma como se comporta como *scaffold in vivo*.

2.2.1 Poli (L-ácido láctico), como polímero piezoelétrico

Os materiais piezoelétricos são apropriados para aplicações biomédicas específicas, como a regeneração óssea. Nestes encontra-se a interessante característica de variar a carga superficial

quando uma carga mecânica é aplicada sem que haja uma fonte de alimentação externa ou fios de ligação [47]. Desta forma, o uso de polímeros piezoelétricos intrinsecamente carregados como matrizes extracelulares, em culturas de tecidos, fornece uma forma de expor as células diretamente a estímulos elétricos locais, que podem variar no tempo, e assim melhorar a resposta.

O efeito piezoelétrico pode ser direto ou inverso. Caso o polímero sofra variações na carga elétrica superficial devido à aplicação de tensões mecânicas, diz-se que o efeito é direto, e pelo contrário, se o polímero estiver sujeito a um campo elétrico e sofrer uma deformação mecânica como resposta, estamos perante um efeito inverso [48]. Uma vez que os sinais elétricos são uns dos principais estímulos físicos presentes no corpo humano, e em particular, os sinais eletromecânicos, o efeito direto terá maior importância para aplicações biomédicas como sensores, e o inverso como atuador [7].

Por definição, os efeitos piezoelétricos podem ser descritos por coeficientes de piezoelectricidade: d_{ij} (para o efeito direto, Equação 2.1) e e_{ij} (para o efeito inverso, Equação 2.2).

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

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

Estas equações relacionam características elétricas (em que D representa a indução elétrica e E a intensidade do campo elétrico) e os parâmetros mecânicos (em que X mostra a tensão mecânica e x a deformação).

Particularizando, um polímero piezoelétrico muito conhecido é o PLA, um poliéster alifático linear termoplástico, produzido a partir de recursos renováveis e tem sido exaustivamente estudado devido à sua baixa densidade, facilidade de síntese, estabilidade dimensional, biodegradabilidade e baixa citotoxicidade [49].

O monómero ácido láctico na forma isolada é cristalino higroscópico e existe como mistura racémica, formada por dois estereoisómeros, a forma L- e a forma D- (Figura 2.4 a.) A presença de átomos de carbono assimétricos gera particularidades estruturais, tornando os polímeros derivados de ácido láctico especiais quando comparados com outros polímeros. Devido à quiralidade da unidade lactilo, os dímeros cíclicos do ácido láctico existem em três formas

diastereoisoméricas diferentes: o L-lático, o D-lático e o meso-lático - nesta última a unidade em anel é composta pela forma D- e L- (Figura 2.4 b.).

Quando existe uma mistura equimolar de D- e L-lático denomina-se DL-lático racémica. As propriedades mecânicas, térmicas e de biodegradação do PLA são conhecidas por depender da escolha e da distribuição dos estereoisômeros [49].

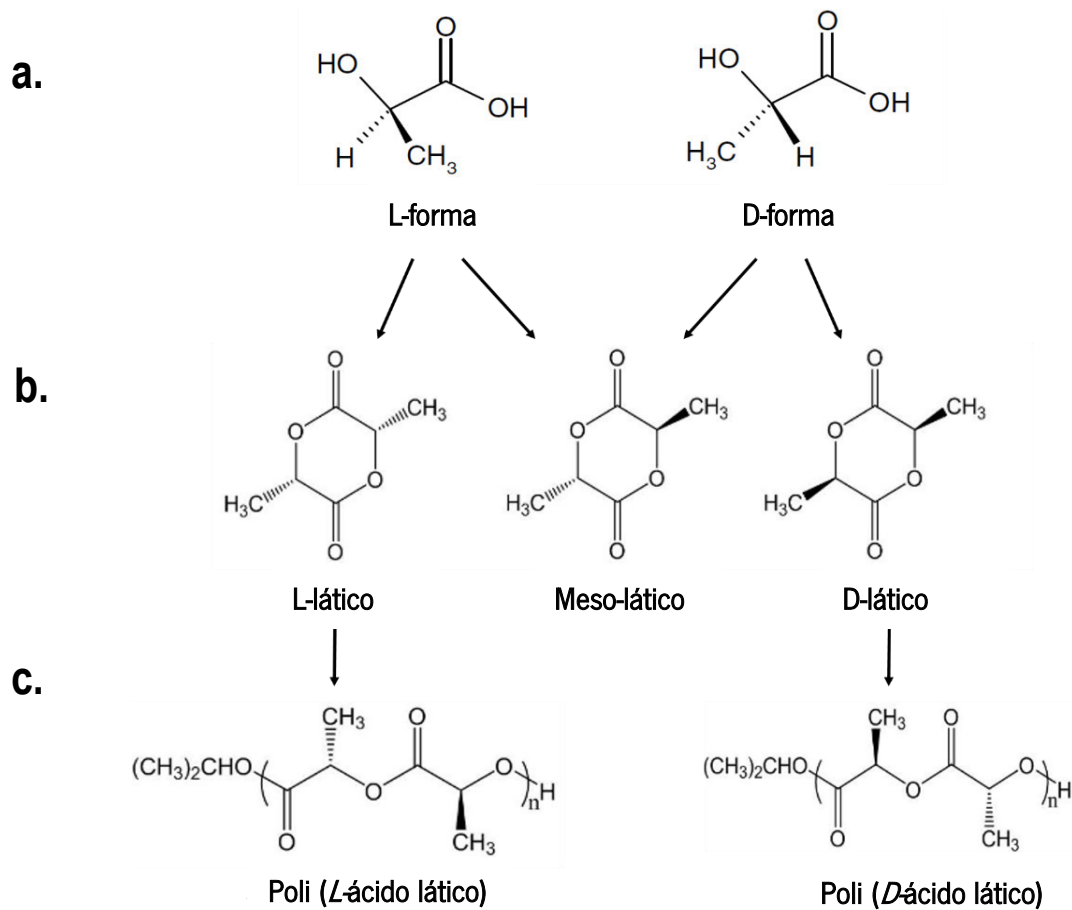


Figura 2.4: Estereoisômeros do ácido láctico (a) e isômeros díméricos (b). Após polimerização obtêm-se os polímeros (c). Adaptado de [50].

O L- e D-lático com elevada pureza formam o PLLA e o Poli (*D*-ácido láctico) (PDLA) (Figura 2.4 c.), respetivamente, através da polimerização dos isômeros díméricos do ácido láctico. Estes são polímeros isotáticos estereorregulares, ou seja, o grupo funcional está apenas localizado num dos lados do monómero. Para além disso, são semi-cristalinos com cristalinidade aproximadamente de 37% [49, 51].

Segundo a literatura, o PLLA possui um ponto de fusão de 170-183 °C e uma temperatura de transição vítrea de 55-65 °C [51, 52]. Este polímero é dos mais requisitados devido à sua estrutura compacta com, conseqüentemente, melhores características mecânicas e maior tempo de serviço/uso. Para além disto, as propriedades piezoelétricas são uma mais-valia. Com um coeficiente piezoelétrico de 10 pC.N⁻¹, este permite a estimulação do tecido por transdução eletromecânica de modo a que haja a implantação ativa de *scaffolds*, e não só o suporte passivo de células [8].

Filmes, membranas e microesferas são algumas das morfologias possíveis de desenvolver com o PLLA [53-55]. Enfatizando as microesferas, estas podem ser produzidas por diversos procedimentos baseados em diferentes métodos físico-químicos: (i) evaporação do solvente formando uma emulsão, (ii) agregação por ajuste do pH ou calor, (iii) coacervação (separação de fases), (iv) polimerização interfacial, (v) *ionic gelation*, (vi) *electrospray*, (vii) secagem por pulverização e o método de (viii) evaporação emulsão-solvente [40].

A finalidade é imperativa quando se decide o método de processamento, porém, a evaporação emulsão-solvente é usada com muita frequência no caso das microesferas de PLLA [55]. É um método facilmente reproduzível e permite gerar partículas de dimensões capazes de ser ajustadas, consoante a aplicação. Neste processo, a solução que contém o polímero dissolvido é emulsionada numa fase não solvente (fase contínua/aquosa), na presença de um agente estabilizante, usando métodos físicos como homogeneização e sonicação (Figura 2.5). O estabilizante comumente utilizado é o poli (vinil álcool) (PVA) – um polímero surfactante que permite uma distribuição uniforme de tamanho [56].

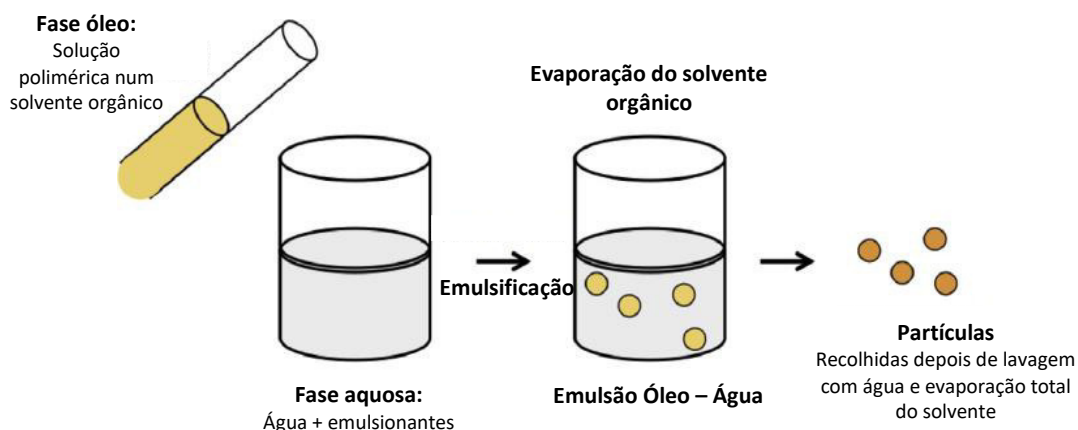


Figura 2.5: Representação gráfica de uma emulsão óleo água. Adaptado de [56].

2.3 Compósitos magnéticos como biomateriais

A estimulação externa influencia a proliferação, diferenciação e regeneração celular quer em condições estáticas [57] quer em condições dinâmicas [8, 58]. No entanto, em casos de regeneração óssea *in vivo*, o maior rendimento desta nova geração de *scaffolds* produzidos a partir de estruturas eletronicamente ativas, está condicionado por problemas relacionados com a terapêutica, nomeadamente, quando o movimento do paciente não é possível. Para contrapor este problema, Cartmell [59] mostrou que a estimulação mecânica de osteoblastos primários humanos pode ser recriada por partículas magnéticas. Desta forma, promove-se a regeneração da matriz óssea segundo um campo magnético.

Para além da regeneração óssea, também estudos de administração de fármacos e de focalização biomolecular tem mostrado o potencial de uma série de nanopartículas magnéticas na área biomédica [53, 60, 61].

As nanopartículas magnéticas exibem um comportamento superparamagnético quando o seu diâmetro está abaixo dos 20 nm, isto é, não retêm qualquer magnetização remanescente após a remoção do campo magnético, prevenindo a agregação e permitindo a rápida dispersão depois de retirado o campo [62, 63]. Acoplada à vantagem do seu reduzido tamanho, está (i) a grande área de superfície das partículas, (ii) a boa difusão nos tecidos, (iii) a redução da interação dipolo-dipolo, e, essencialmente, (iv) a capacidade de funcionalização com outros materiais, o que possibilita por si só a interação e a ligação específica a entidades biológicas. Desta forma, está sustentada a aplicabilidade na área biomédica. [63]. A magnetite (Fe_2O_4) e a maguemita ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$) são os óxidos de ferro mais usados devido à baixa toxicidade e elevada magnetização à temperatura ambiente [64].

Após a funcionalização das nanopartículas, criam-se compósitos magnéticos detentores de todas as vantagens mencionadas. Posto isto, é possível a criação de *scaffolds* superparamagnéticos que são ativados através da aplicação de um campo magnético externo. O campo atua nas nanopartículas ao longo do vetor gradiente, produzindo forças compressivas ou de tensão que são sentidas pelas células no *scaffold*. As forças necessárias para ativar os canais mecanossensitivos através de deformações na membrana celular são muito pequenos (na ordem dos picoNewtons) [65]. Desta forma, acredita-se que os *scaffolds* magnéticos podem fornecer os sinais necessários para a estimulação da diferenciação das células.

2.3.1 Compósitos magnetoelétricos

Um compósito magnetoelétrico é constituído por dois tipos de materiais juntos, um material piezoelétrico e outro magnetostritivo [66]. Por sua vez, um material magnetostritivo é um material que sofre uma deformação quando sujeito a um campo magnético. Desta forma, um compósito magnetoelétrico têm a capacidade de alterar a sua polaridade quando sujeito a um campo magnético (efeito magnetoelétrico direto) ou a sua magnetização quando sujeito a um campo elétrico (efeito magnetoelétrico inverso) [67]. Uma vez aplicado um campo magnético no compósito, é induzida uma tensão na fase magnetostritiva. A tensão é transmitida à componente piezoelétrica que por sua vez sofre uma alteração na polarização elétrica. De modo semelhante, pode ocorrer o efeito inverso: é aplicado um campo elétrico no compósito que induz uma tensão, desta vez na fase piezoelétrica que é transmitida à fase magnetostritiva, desencadeando uma mudança na magnetização [68]. Posto isto, o acoplamento dos dois materiais promove uma estreita sinergia entre as respostas. Em engenharia de tecidos, esta sinergia é aproveitada para melhoramento de *scaffolds*, controlando remotamente, com apenas um campo magnético, a proliferação celular.

Existem diferentes tipos de compósitos magnetoelétricos com base polimérica na literatura: os compósitos laminados, particulados e os fibrosos [69]. Realçando os compósitos particulados, estes apresentam-se como favoráveis para o desenvolvimento de geometrias apropriadas para esferas. As esferas magnetoelétricas, por sua vez, têm comprovada aplicabilidade em engenharia de tecidos [55].

De entre as várias partículas magnetostritivas, estudos referem que as partículas de ferrite de cobalto (CoFe_2O_4) são exploradas em aplicações biomédicas [55]. Estas partículas apresentam elevada citotoxicidade, no entanto, podem ser funcionalizadas por um composto polimérico, de modo a torná-las biocompatíveis (Figura 2.6). Para além disso, revestimento polimérico confere estabilidade coloidal ao compósito. Vantajosamente, as partículas de CoFe_2O_4 possuem uma temperatura de Curie e um efeito anisotrópico elevado, uma magnetização de saturação moderada, e são as ferrites que apresentam maior coeficiente de magnetostricção, assim podem ser usadas para libertação de fármacos ou em engenharia de tecidos [5, 55, 70].

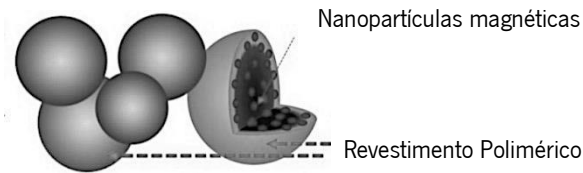


Figura 2.6: Representação ilustrativa de partículas magnéticas com encapsulamento polimérico.

2.4 Hidrogel

Os hidrogéis têm mostrado o seu potencial numa série de aplicações biomédicas e biológicas, incluindo em engenharia de tecidos (como *scaffold* tridimensional), sistemas de libertação controlada de fármacos, sensores biológicos/dispositivos de diagnóstico, *microarrays*, imagiologia e atuadores [71]

Por definição, um hidrogel é uma rede polimérica tridimensional de origem sintética e/ou natural, que apresenta propriedades hidrofílicas. É capaz de absorver grandes quantidades de água ou fluídos biológicos, sem que apresente solubilidade, e desta forma aumentar o seu volume [72, 73]. Geralmente atingem a estabilidade volumétrica quando ocorre um balanço entre as forças osmóticas e as forças coesivas exercidas pelas cadeias poliméricas do interior do hidrogel. As forças coesivas resistem à expansão do hidrogel que dependem, em particular, da densidade de reticulação (ρ_c) [74].

Tal como mostra a Figura 2.7, a densidade de reticulação está intimamente relacionada com outras propriedades do hidrogel. Assim, quanto maior a densidade, menor será a capacidade de inchamento, a capacidade de difusão entre gel e solvente e também a mobilidade molecular. Paralelamente, maior serão as forças de ligação e o módulo de cisalhamento [75].

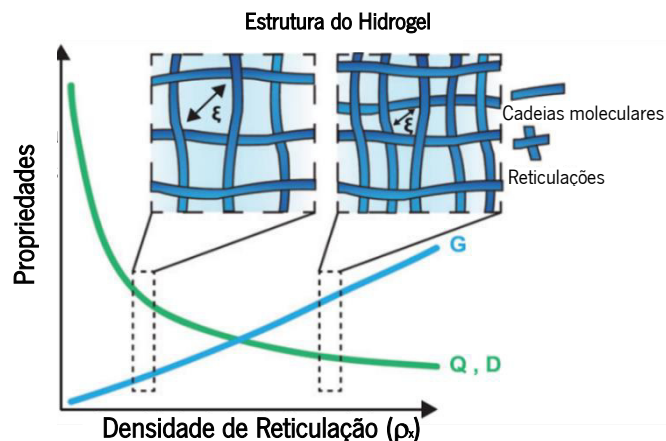


Figura 2.7: Relação entre a densidade de reticulação do hidrogel e algumas propriedades como o rácio volumétrico de inchamento (Q), o módulo de cisalhamento (G) e o coeficiente de difusão (D). Adaptado de [75].

Existem diferentes tipos de hidrogéis, no entanto dividem-se em dois grupos: físicos/reversíveis ou químicos/permanentes. Nos físicos, as redes são mantidas juntas por enredos moleculares ou forças secundárias, incluindo forças iónicas e ligações de hidrogénio [76]. Relativamente aos químicos, estes são gerados por reticulação de polímeros solúveis em água ou por conversão de polímeros hidrofóbicos em polímeros hidrofílicos e posterior reticulação, quando necessária [77, 78]. Nem os hidrogéis físicos, nem os químicos são homogéneos, contêm regiões de menor inchamento, e de elevada densidade de reticulação, chamados *clusters*, que são dispersados dentro de regiões de inchamento elevado, e menor densidade de reticulação. Isto acontece devido à agregação hidrofóbica dos agentes de reticulação, levando a *clusters* de elevada densidade de reticulação [77].

Quimicamente, estes *scaffolds* interagem naturalmente com as células, como faz, por exemplo, o colagénio; ou então podem ser funcionalizados com péptidos de adesão celular que potenciem essa interação. Podem ser combinados com moléculas bioativas e assim ter inúmeras aplicações biomédicas [77, 79].

Mecanicamente, conferem suporte estrutural pelo facto de fornecerem preenchimento e adotarem a forma do meio onde forem colocados. A integridade estrutural do hidrogel é determinada pelas propriedades intrínsecas do polímero da cadeia principal e as características das reticulações (isto é, a quantidade, o tipo e o tamanho das moléculas intervenientes nas ligações cruzadas), bem como as condições ambientais, de modo que condiciona a seleção e a síntese de materiais [78]. Por exemplo, os *scaffolds* desenhados para encapsular células têm de ser capazes de gelificar sem danificar as células, não podem ser tóxicos e têm de permitir a difusão de nutrientes e metabolitos para e das células encapsuladas e tecidos circundantes. Para além disso, têm de ter integridade e resistência mecânica suficiente para suportar as manipulações associadas à implantação e existência *in vivo* [73].

O sucesso de um *scaffold* em engenharia de tecidos está associado ao transporte apropriado de gases, nutrientes, proteínas, células e aos produtos residuais para dentro, para fora e/ou dentro do *scaffold*. Nos hidrogéis, a propriedade de transporte de massa esta intimamente relacionada com a difusão e esta, por sua vez, é determinada pelas nanoestruturas porosas formadas no gel. Moléculas de baixo peso molecular difundem livremente, como é o caso da glucose e o oxigénio, porém, moléculas de elevado peso molecular, como a albumina e o fibrogénio não são capazes de difundir [77, 78].

Os hidrogéis são processados sob condições pouco severas em que a base pode ser sintética ou biológica. Os materiais sintéticos compreendem o PVA, poli (ácido acrílico) (PAA) e poli (óxido de etileno) (PEO) enquanto os biológicos são o quitosano, colagénio, alginato e ácido hialurónico [80].

Neste trabalho foi utilizado um hidrogel comercial (Mimsys® G) constituído por um polissacárido aniónico solúvel em água, produzido pelas bactérias *Sphingomonas elodeas*, habitualmente designado de *Gellan Gum*. A gelificação deste hidrogel ocorre por reticulação iónica com catiões divalentes [81].

O Mimsys® G demonstra potencialidade em cultivos celulares, nomeadamente na formação de cartilagem funcional [82]. As principais vantagens apontadas a este hidrogel residem (i) na possibilidade de controlar a infiltração de células endoteliais e o crescimento de vasos sanguíneos, (ii) na aptidão mecânica ajustável e passível de ser melhorada, (iii) na gelificação *in situ* em poucos segundos [81-83], sendo que muitas outras características podem ser enumeradas. A Tabela 2.1 apresenta de forma resumida algumas das particularidades deste hidrogel.

Tabela 2.1: Características do hidrogel utilizado. Adaptado de [81-83].

Composição	<i>Gellan Gum</i> metacrilada
Aparência	Branco em pó e transparente em hidrogel
Solubilidade	Solúvel em água à temperatura ambiente e a 37°C
Gelificação	Reticulação iónica com catiões em 5 min ou foto-inibição com luz ultra-violeta
Biocompatibilidade	Sem xeno, não citotóxico e não imunogénico
Permeabilidade	Permite o fluxo de oxigénio e nutrientes (dependendo do tamanho)
Tipos de células testadas	Células estaminais humanas, células primárias humanas, células de linhas de mamíferos
Aplicações	Entrega de fármacos, modificações químicas e revestimento de superfícies em biomateriais.

2.5 Biorreator

O cultivo estático apresenta-se como o cultivo convencional, no qual as células são depositadas em suportes e são mantidas com uma solução contendo nutrientes necessários para o crescimento celular. Porém, mesmo com *scaffolds* apropriados, o cultivo estático pode apresentar limitações ao nível da semelhança com o sistema biológico, por exemplo na falta de uniformidade na distribuição de nutrientes. Desta forma, define-se como biorreator um sistema que possibilita a padronização e automatização de processos biológicos e bioquímicos à semelhança dos fisiológicos [84, 85].

Existem diversos tipos de biorreatores utilizados em cultura celular. Exemplos disso são os biorreatores de tanque agitado (*spin flasks*) que são vantajosos na medida que agitam eficazmente o meio para mimetizar tecidos cardíacos (Figura 2.8 a.) [86]; biorreatores de tanque tubular (*rotating wall vessel*) funcionais por explorarem a baixa tensão de corte simulando um ambiente rotacional de microgravidade (Figura 2.8 b.) [87]; e os biorreatores de fibra oca (*hollow-fiber bioreactors*), favoráveis na medida que providenciam um ambiente semelhante ao do fígado (Figura 2.8 c.) [88]. Uma série infindável de biorreatores pode ser enumerada consoante a finalidade e o *scaffold* utilizado.

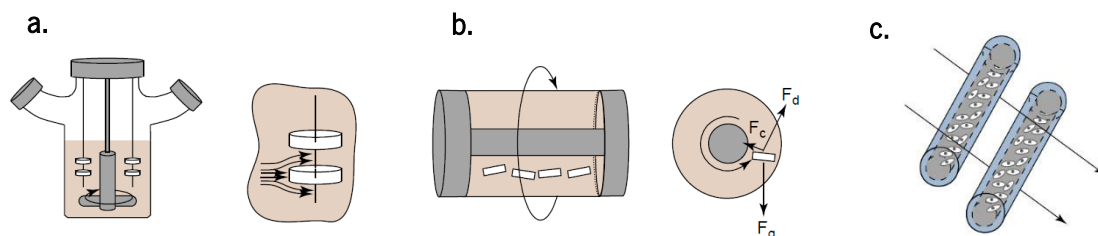


Figura 2.8: Esquema representativo de diferentes biorreatores utilizados em diferentes cultivos celulares, consoante a finalidade: (a) Tanque agitado; (b) Tanque tubular; (c) Fibra oca. Adaptado de [87].

No caso da regeneração óssea é crucial um estímulo mecânico que mimetize os movimentos do paciente, como referido anteriormente e como referem vários autores [5, 20, 89, 90]. Uma vez usados compósitos magnetoelétricos, o desafio passa por trocar o estímulo mecânico por um estímulo magnético.

Para fornecer um estímulo magnético externo que replique as condições sentidas *in vivo* é necessária a utilização de um biorreator magnético. Neste sentido, surge o uso do biorreator da Figura 2.9.



Figura 2.9: Biorreator com estímulo magnético para cultivos celulares dinâmicos.

Assim, a estimulação mecânica que o material vai providenciar às células, influencia a regulação de processos morfológicos e fenótipos envolvidos na proliferação e diferenciação celular, como referido anteriormente.

Concluindo, este sistema permite a criação de uma nova plataforma para estratégias inovadoras em engenharia de tecidos, permitindo a obtenção de resultados experimentais mais realistas e mais próximos dos que se poderiam obter em testes *in vivo*.

2.6 Estudos relevantes no contexto do presente trabalho

Diversas morfologias com polímeros sintéticos e naturais têm sido utilizadas, desde filmes, fibras, membranas e *scaffolds* tridimensionais como hidrogéis, de forma a mimetizar a arquitetura e o comportamento dos tecidos alvo.

As microsferas poliméricas são morfologias amplamente produzidas na atualidade. O PLLA e o PVDF são alguns dos polímeros escolhidos para o processamento destas estruturas através de métodos como emulsão óleo-água e *electrospray*, respetivamente [55, 91, 92]. Nestas investigações, foi provada a aplicabilidade destes materiais na área biomédica, para além disso, foi mostrada a capacidade de acoplar a componente magnetostritiva a este tipo de geometrias [92].

Relativamente à magnetostricção, diversas morfologias e com diferentes fins mostram constantemente o seu potencial na área biomédica. O desenvolvimento de sistemas de libertação controlada de fármacos sensível a estímulos físicos compreende um exemplo [53]. Nesse estudo, o fármaco foi encapsulado por zeólitos numa membrana de PLLA em que o componente sensível

ao estímulo magnético era o Terfenol-D, um material magnetostritivo [53]. Adicionalmente, o efeito magnetoelétrico apresenta-se como promissor em engenharia de tecidos. Ribeiro mostrou a aplicabilidade do efeito magnetoelétrico na regeneração de tecidos ósseos através do uso de compósitos magnetoelétricos, usando o Terfenol-D como componente magnetostritiva e o poli (fluoreto de vinilideno-trifluoretileno) (PVDF-TrFE) como piezoelétrica. Os pré-osteoblastos foram cultivados sobre estes compósitos em duas condições: estática e num biorreator magnético. Através de um estímulo magnético desencadeou-se uma resposta mecanoelétrica que mostrou ser a mais eficiente na proliferação celular, uma vez que nas condições estáticas verificou-se que havia menor proliferação celular [5].

Para além destes *scaffolds*, os hidrogéis têm dando mote a investigações diversificadas, porém, a aplicação em regeneração de tecidos direta ou indiretamente é evidente. A Tabela 2.2 mostra diferentes aplicações com diferentes polímeros explorados no processamento deste tipo de *scaffold* tridimensional.

Tabela 2.2: Diferentes trabalhos desenvolvidos com hidrogéis para aplicação na área biomédica.

Aplicação	Polímeros	Células	Refs
Doenças isquémicas	Quitosano	Células estaminais (ACS)	[93]
Doenças infecciosas	PE-CMC/HA	RAW 264.7	[94]
Pensos para feridas	PEGDA e PEGDTT	HT1080	[95]
Lentes de contacto infeções na córnea	ϵ -Polilisina	HCE-T	[96]
Crescimento tumoral	Fibroína da seda	Células HeLa	[97]
Reparação de cartilagem	PEGDA	Condrócitos articulares isolados	[98]

O hidrogel Mimsys® G, que utiliza a metacrilamida como componente principal, tem mostrado várias potencialidades na regeneração. Reitmaier e os seus colaboradores mostraram que este hidrogel possui competências no restauro dos discos intervertebrais [99]. Paralelamente, outros autores mostraram a capacidade de reparação deste hidrogel na cartilagem. Nestas experiências, foi desenvolvido um tecido semelhante à cartilagem dentro do hidrogel a partir de

células estaminais adiposas humanas [100, 101]. Deste modo, desenvolve-se uma abordagem complexa *in vitro* para avaliar o desempenho deste sistema no reparo focal da cartilagem.

A competência dos hidrogéis como *scaffolds* é constantemente exibida, porém, são poucos os experimentos que aliam outros componentes para potenciar a mimetização do ambiente fisiológico. Neste sentido, o uso de partículas magnetostritivas encapsuladas nestas matrizes, juntamente com o uso de biorreatores magnéticos, apresenta-se como uma mais-valia.

3. Materiais e Métodos

3.1 Processamento de microesferas de poli (*L*-ácido láctico) puras e compósitas

Materiais

Durante o processamento das microesferas utilizaram-se dois polímeros, o PLLA com peso molecular médio de 217.000 – 225.000 g.mol⁻¹ da *Purasorb PL18* e o PVA com peso molecular médio de 13.000 – 23.000 g.mol⁻¹, 98 % hidrolisado, da *Purac* e *Sigma Aldrich*, respetivamente. Como solvente do PLLA, utilizou-se o clorofórmio proveniente da *Merck* com um grau de pureza de 99%, e no caso do PVA foi necessária água ultrapura para a dissolução.

Relativamente à formação das microesferas compósitas, as nanopartículas de CoFe₂O₄ foram adquiridas através da *Nanoamor* com diâmetro entre 35 e 55 nm.

Processamento

As microsferas de PLLA sem e com CoFe₂O₄ (PLLA/CoFe₂O₄) foram obtidas pelo método de emulsão óleo-água. Para isso, foram criadas duas fases, uma contínua/aquosa e outra dispersa/orgânica compostas por soluções de PVA e PLLA, respetivamente.

O PVA foi dissolvido em água ultrapura numa concentração de 0,5% (p/v), com base em estudos anteriores [102] que otimizaram a quantidade de surfactante em função da quantidade de polímero, com o objetivo de evitar a coalescência das microesferas. Esta dissolução foi feita numa placa de aquecimento com agitação magnética a uma temperatura de 90 °C, durante 4 h.

Paralelamente, dissolveu-se completamente o PLLA em clorofórmio de modo a obter-se uma concentração polimérica de 3% (p/v). O clorofórmio foi usado devido à capacidade de solubilizar o polímero e por possuir baixa solubilidade com água, conduzindo a uma diminuição da quantidade de PVA absorvido na interface água-solvente [103].

Posteriormente e como mostra a Figura 3.1, a solução polimérica foi adicionada à emulsão de PVA num balão volumétrico, sob agitação magnética durante um período de 24 h, aproximadamente, de forma a evaporar o solvente e simultaneamente originar microesferas. A velocidade de agitação durante a formação das partículas é um parâmetro importante. Quanto maior a velocidade maior a energia transferida ao meio e conseqüentemente a fase orgânica é dispersa em pequenas partículas com tamanhos reduzidos. Neste processamento a velocidade utilizada foi de 1250 rpm. As microesferas resultantes foram lavadas com água ultrapura em agitação durante 3 h.

Por fim, e depois de um período de deposição de aproximadamente 12 h, obteve-se um sedimento ao qual foi retirado o sobrenadante. Este foi deixado à temperatura ambiente até evaporar toda a água existente. Desta forma, as microsferas ficaram reduzidas a um pó fino.

As microsferas compósitas foram também obtidas pelo método anteriormente descrito, acrescentando a adição de 10% (p/p) de nanopartículas de CoFe_2O_4 após a completa dissolução do PLLA.

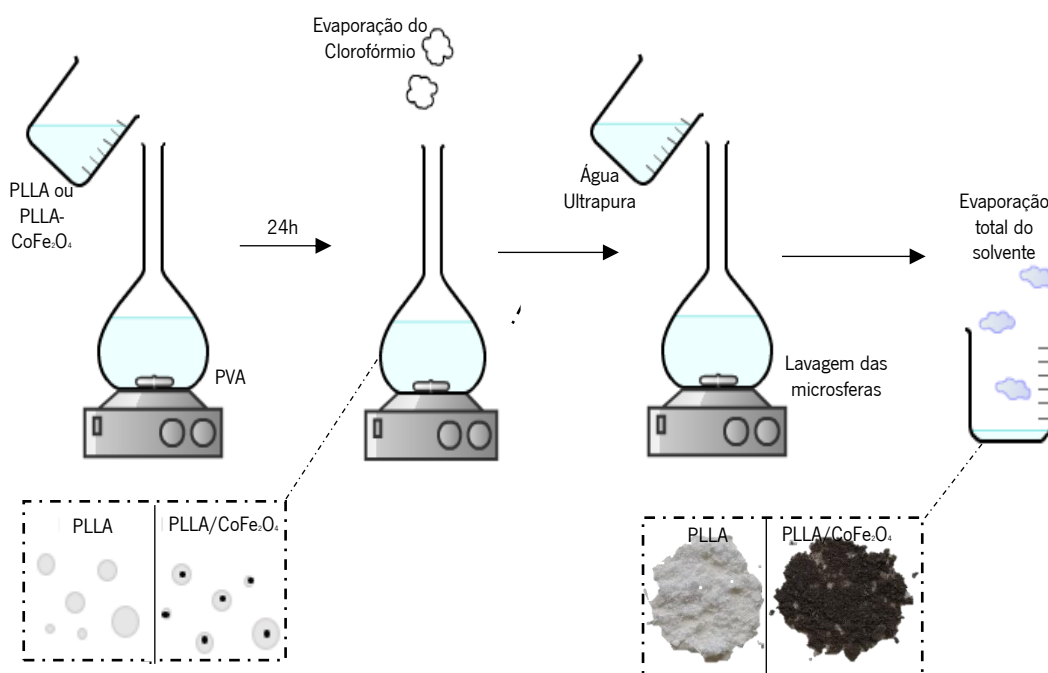


Figura 3.1: Representação esquemática do processamento de microsferas de PLLA e PLLA/CoFe₂O₄.

3.2 Preparação das amostras para culturas celulares

Para fins de cultura celular, é necessário proceder previamente à esterilização do material utilizado. Desta forma, as microsferas de PLLA e PLLA/CoFe₂O₄ foram expostas a radiação ultravioleta durante 2 h. Seguidamente, foram lavadas 5 vezes com uma solução de tampão fosfato salino (PBS do inglês *Phosphate-Buffered Saline*) durante 5 min, por cada lavagem.

O hidrogel não necessitava de esterilização uma vez que foi adquirido condições estéreis. Relativamente ao biorreator utilizado para a cultura em condições dinâmicas, este foi esterilizado também com radiação ultravioleta durante 2 h.

Com o objetivo de estimar qual o microambiente preferencial para a proliferação celular, foram estabelecidas duas condições. Como mostra a Figura 3.2, a condição 1 corresponde à

junção das microsferas de PLLA ou PLLA/CoFe₂O₄ com o hidrogel e as células; e a condição 2 diz respeito ao cultivo de células em monocamada sobre o hidrogel, anteriormente misturado com as microsferas de PLLA ou PLLA/CoFe₂O₄. Os experimentos foram realizados em placas de 24 poços. Cada poço possuía 50 µL de hidrogel, 5 mg de microsferas e 2×10^4 de células.

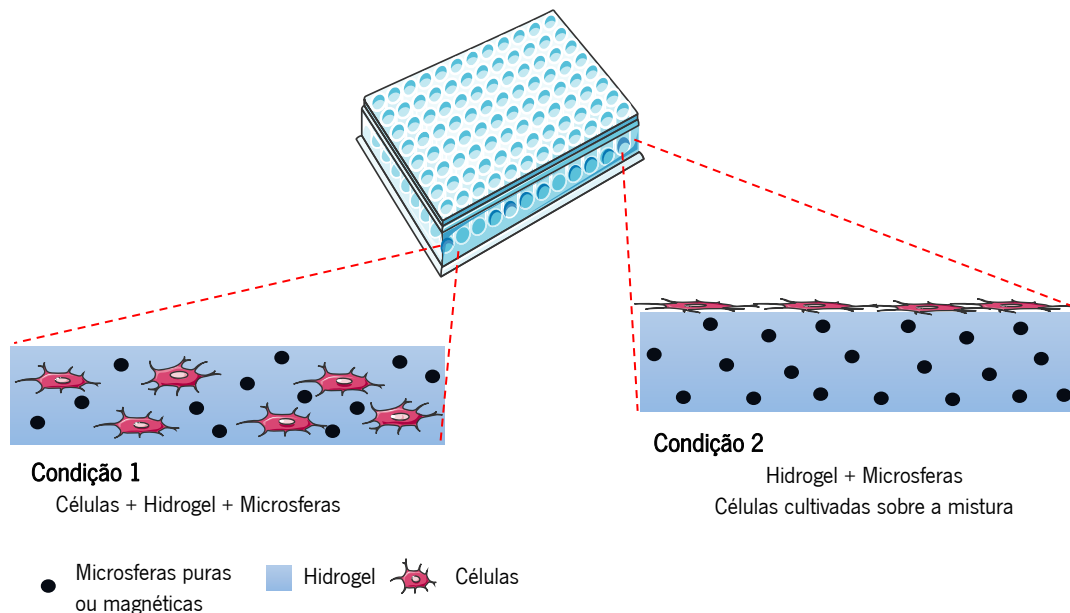


Figura 3.2: Representação das duas condições utilizadas nas culturas celulares.

Complementarmente, foram realizadas culturas estáticas e dinâmicas. O cultivo em condições estáticas refere-se ao cultivo tradicional, enquanto o dinâmico corresponde à cultura celular num biorreator com estímulos magnéticos. Estes estímulos possuíam o objetivo de mimetizar o comportamento mecânico que o corpo exerce, ao longo do dia, sobre o tecido ósseo. Deste modo, a cultura dinâmica possuía um estímulo durante 16 h e um tempo de repouso de 8 h. O estímulo não foi contínuo, atuava durante 5 min e parava 25 min, com a frequência de 0,2 Hz e com um intervalo de 20 mm (0,115 mV). O biorreator utilizado foi desenvolvido pelo grupo e utilizado em [117].

Ambas as condições experimentaram as culturas estática e dinâmica, sendo que na dinâmica apenas foram utilizadas microsferas de PLLA/CoFe₂O₄. Desta forma, após 24 h num cultivo em condições estáticas, avaliou-se a adesão celular e assumiu-se este tempo como T0. Posteriormente, para ambas as condições de cultura, estática e dinâmica, prolongou-se o ensaio por mais 72 h.

Depois de estabelecidas as condições a utilizar nas culturas celulares, foi preparado o hidrogel. Nesta preparação foi seguido o protocolo estabelecido para a encapsulação de células com o Mimsys® G.

Inicialmente, foi pesada a quantidade de hidrogel necessária para os cultivos celulares e adicionada água destilada numa concentração de 1,25% (m/v). A dissolução foi realizada à temperatura ambiente num período de 5 h a 250 rpm. Posto isto, para ambas as condições (Figura 3.2), foram misturadas microsferas de PLLA ou PLLA/CoFe₂O₄ com o hidrogel, numa concentração de 0,1 g.mL⁻¹. Posteriormente, utilizou-se o vórtex, durante aproximadamente 10 seg, para homogeneizar as soluções.

Relativamente às células utilizadas foram pré-osteoblastos MC3T3-E1 que foram colocadas em expansão em frascos de cultura celular de 75 cm² com meio modificado *Eagle* da *Dulbecco* (DMEM do inglês *Dulbecco's modified Eagle's medium, Biochrom*) suplementado com 1 g.L⁻¹ de glucose, 10% (v/v) de soro fetal bovino (FBS, *Biochrom*) e 1% (v/v) de penicilina/estreptomicina (P/S, *Biochrom*). As células foram incubadas sob condições *standard*, a 37 °C com ar humidificado a 95% contendo uma atmosfera de 5% de CO₂. O meio de cultura foi mudado a cada três dias até que as células chegassem à confluência de 70-90%, para depois serem tripsinizadas com 0,05% de tripsina-EDTA. Foi criada uma suspensão celular para cada condição, com uma concentração de 1,6 x 10⁶ células.mL⁻¹. No caso da condição 1, as microsferas foram colocadas nesta suspensão, sendo de seguida adicionada ao hidrogel e ressuspensa. No caso da condição 2, foi adicionada uma solução com DMEM (sem células) e as microsferas ao hidrogel. Nesta condição, as células foram cultivadas de modo a garantir a adesão celular apenas na zona superior do hidrogel, ou seja, não se procedeu à encapsulação das células no hidrogel. Após a adição da solução, obtém-se no final, em ambas as condições, um hidrogel com uma concentração de 1% (m/v). Foram ainda criadas réplicas com hidrogel e microsferas, apenas, de modo a funcionarem como controlos negativos dos ensaios.

Por fim, foi adicionado um volume de 500 µl de meio DMEM a cada réplica. Para além da função nutricional, o meio de cultura tem também a função de reticular o hidrogel.

3.3 Caracterização das microsferas produzidas

As microsferas de PLLA e PLLA/CoFe₂O₄ foram caracterizadas com recurso a várias técnicas de caracterização de forma a tirar ilações sobre o tamanho e morfologia, propriedades físico-químicas e térmicas, e ainda, sobre as propriedades magnéticas das microsferas compósitas.

3.3.1 Análise morfológica e de tamanhos

A microscopia eletrónica de varrimento (SEM do inglês *Scanning Electron Microscopy*) permite a observação superficial das amostras, com elevada resolução, e numa vasta gama de ampliações. Através dos eletrões secundários (SE do inglês *Secondary Electrons*), gerados a partir da superfície da amostra (a 500-2000 nm de profundidade), é possível obter informações topográficas de superfícies complexas e irregulares, com resolução entre 1-10 nm. Paralelamente, os eletrões retrodifundidos (BSE do inglês *Backscattered Electrons*), que resultam das interações elásticas, fornecem informações sobre o número atómico. Deste modo, permite que fases com números atómicos diferentes sejam reconhecidas, gerando contraste se existirem elementos com diferentes números atómicos [104].

Os SE e os BSE são os mais utilizados para a obtenção da imagem, no entanto existem ainda os eletrões retrodifundidos difratados (EBSE do inglês *Diffracted Backscattered Electrons*) que são utilizados para determinar a estrutura cristalina da amostra e a sua orientação.

Durante a preparação das amostras para visualização por SEM, existem etapas cruciais que dependem das características dos espécimes. Quando um material não é condutor, é feita a deposição, por pulverização catódica, de uma camada ultrafina de um material condutor, geralmente o ouro. O ouro permite a emissão de eletrões secundários com maior intensidade de sinal e resolução. Se a superfície não for condutora há uma acumulação de cargas na superfície, o que resulta na distorção da imagem obtida.

Neste trabalho, o microscópio usado foi o *Quanta 650 FEG, FEI*, equipado com o sistema *Everhart-Thornley Detector* (ETD) de elevado vácuo. A voltagem de aceleração foi de 1 kV. O equipamento usado no revestimento com ouro foi o *Polaron SC502*.

Adicionalmente, foi avaliada a distribuição de tamanhos das partículas em suspensão num solvente recorrendo à técnica da dispersão dinâmica da luz (DLS do inglês *Dynamic Light Scattering*). Esta técnica baseia-se no conceito de que as nanopartículas em suspensão movem-

se aleatoriamente devido às colisões com as moléculas de solvente e, por isso, a distância entre as partículas está constantemente a mudar no tempo. Este movimento, observado por Robert Brown, ficou conhecido como “movimento Browniano” [105].

Neste processo, faz-se incidir um feixe de luz monocromática numa célula que contém a amostra. Quando a luz atinge a partícula em movimento aleatório provoca um desvio de *Doppler*, alterando o comprimento de onda da luz que entra no detetor. A alteração está relacionada com o tamanho das partículas. A relação, por sua vez, é feita com base no coeficiente de difusão da partícula (*Equação de Stokes*).

Para além da medição do tamanho, o DLS tira conclusões sobre a homogeneidade da amostra através do índice de polidispersão (PDI do inglês *Polydispersity Index*). O PDI varia entre 0 e 1 consoante a gama de diâmetros encontrados em relação à média de diâmetros. Quanto maior o intervalo de diâmetros, mais dispares são os tamanhos, o que resulta num PDI elevado [105].

As amostras para DLS devem ser translúcidas e homogéneas e não devem precipitar no fundo da cuvete. Qualquer tipo de precipitação confirma a presença de partículas maiores que podem ser devidas a uma dispersão fraca, pH incorreto ou sonicação inadequada, comprometendo a experiência. A utilização de água desionizada também não é recomendada pois a ausência de iões não protege as interações de longa distância entre as partículas [105].

Posto isto, neste trabalho, as amostras foram centrifugadas a 2500 rcf durante 5 min, de modo a obter-se uma distribuição uniforme de tamanhos. Posteriormente, prepararam-se soluções com água ultrapura e com concentrações apropriadas. Por fim o pH foi ajustado para 7, com soluções de HCl (1 M) e NaOH (1 M), e procedeu-se à sonicação das amostras durante 1 hora.

O equipamento usado nas medições dos tamanhos das partículas e o PDI foi o *Zetasizer, NANO ZS -ZEN3600* da *Malvern (Malvern Instruments Limited, UK)*, com o laser He-Ne (633 nm) e um ângulo de deteção de 173 ° (*backscatter detection*). As amostras dispersas foram colocadas numa cuvete produzida pela *Malvern – folded capillary cell*. As medições foram realizadas a 25 °C e a média e o desvio padrão foram calculados a partir de 5 medições com o *software Zetazizer 7.11*.

3.3.2 Caracterização físico-química e térmica

A caracterização físico-química das microsferas passa pela análise das possíveis alterações químicas na estrutura do polímero utilizado. Nesse sentido, foi utilizada a técnica de espectroscopia de infravermelho com transformadas de *Fourier* em modo reflexão total atenuada (FTIR-ATR do inglês *Attenuated total reflectance-Fourier transform infrared spectroscopy*).

O FTIR-ATR, tal como o nome indica, possui uma região de análise na zona do infravermelho, 400 – 4000 cm^{-1} . A absorção desta radiação por uma molécula corresponde a variações nos movimentos vibracionais e/ou rotacionais dessa mesma molécula [106].

A absorção no infravermelho ocorre quando a frequência do campo elétrico alterado, associado à radiação incidente, coincide com uma possível mudança da frequência de vibração ou da rotação da molécula que esta a absorver essa radiação. Assim, quando a correspondência acontece a radiação eletromagnética é absorvida provocando uma alteração na amplitude da vibração ou no valor da rotação da ligação.

Os espectros infravermelhos são característicos de cada molécula, e grupos funcionais específicos originam bandas independentemente da estrutura do resto da molécula [107]. Desta forma, é possível tirar ilações sobre a composição de uma dada amostra, sendo que também é utilizada na deteção e identificação de impurezas. Uma vez que cada molécula possui um espectro característico, é conferido à técnica aplicabilidade essencialmente qualitativa. A análise quantitativa não é a mais utilizada pelo facto de apresentar desvantagens face aos restantes métodos analíticos [108].

Para a caracterização das microsferas através de FTIR-ATR, não existiu qualquer tipo de preparação prévia, apenas foram colocadas sobre a câmara de amostragem. Os espectros obtidos foram registados na região de número de onda entre 500-4000 cm^{-1} num espectralfotómetro da *Jasco 4100*. O número de varrimentos foi de 64 com a resolução de 4 cm^{-1} .

Posteriormente foi realizada a técnica de calorimetria diferencial de varrimento (DSC do inglês *Differential Scanning Calorimetry*). Esta refere-se a uma ferramenta de análise calorimétrica que indica como a capacidade térmica de um material é alterada com a variação da temperatura. Uma amostra de massa conhecida é aquecida e/ou arrefecida e as alterações na capacidade térmica são monitorizadas através de um fluxo de calor [109].

De forma resumida, o equipamento é composto por dois fornos com atmosferas controladas, possuindo na base um sensor de temperatura e uma resistência para o fornecimento

de calor. Em cada forno é colocado um cadinho, um referente à amostra e outro correspondente à referência (geralmente vazio). Para a análise, programa-se a temperatura do forno com velocidade de aquecimento ou arrefecimento controlada.

Em estudos com polímeros, o uso de DSC é muito frequente pelo facto de ser uma análise rápida e fácil que permite obter uma vasta gama de resultados, como a temperatura de transição vítrea (T_g), temperatura de fusão (T_m) e temperatura de cristalização (T_c). Com estes resultados é possível tirar ilações acerca dos comportamentos endotérmicos e exotérmicos, e posteriormente o grau de cristalinidade (ΔX_c) usando a Equação 3.1.

$$\Delta X_c = \frac{\Delta H_m - \Delta H_{cc}}{\Delta H^{\circ}m} \quad \text{Equação 3.1}$$

em que ΔH_m é a entalpia de fusão, ΔH_{cc} a entalpia de cristalização e $\Delta H^{\circ}m$ a entalpia de fusão de uma amostra de PLLA 100% cristalina, em que o valor teórico é $93,1 \text{ J.g}^{-1}$ [55, 110]. O grau de cristalinidade depende assim da história térmica do material.

Para a caracterização calorimétrica das microesferas poliméricas de PLLA e PLLA/CoFe₂O₄, o equipamento utilizado foi o *Mettler Toledo 823* com amostrador automático *T 50801RO sample robot*. As amostras, com $\approx 5 \text{ mg}$, foram colocadas em cadinhos de alumínio e submetidas a dois aquecimentos e dois arrefecimentos com uma velocidade de aquecimento de $10 \text{ }^{\circ}\text{C.min}^{-1}$ num intervalo de temperaturas entre $30 \text{ }^{\circ}\text{C}$ e $200 \text{ }^{\circ}\text{C}$.

A cristalinidade está relacionada com o tamanho das esferulites, que depende principalmente do número de cristais que crescem simultaneamente [111]. Partindo desta relação, é possível alterar a cristalinidade através de um tratamento térmico.

Depois de preparadas, as microesferas de PLLA e PLLA/CoFe₂O₄ foram expostas a temperaturas acima da temperatura de transição vítrea, numa estufa (*Heraeus vacutherm*). As temperaturas utilizadas foram $70 \text{ }^{\circ}\text{C}$, $90 \text{ }^{\circ}\text{C}$ e $140 \text{ }^{\circ}\text{C}$ e o tempo de exposição foi de 60 min , no caso das microesferas de PLLA. As microesferas de PLLA/CoFe₂O₄ apenas foram submetidas a $140 \text{ }^{\circ}\text{C}$, durante o mesmo período.

Depois do tratamento térmico, as amostras foram sujeitas a DSC nas condições anteriormente referidas.

Por fim, esta secção de caracterizações fica completa com a avaliação do potencial zeta (ζ), também conhecido como potencial eletrocinético. Este potencial é gerado por uma partícula

quando se move no plano sob um campo elétrico. É, assim, uma propriedade física encontrada nas partículas em suspensão [105].

Quando em contacto com um líquido, as partículas tendem a adquirir uma carga elétrica na sua superfície, formando-se duas camadas elétricas como mostra a Figura 3.3. Uma das camadas é denominada camada de *Stern*, onde os iões estão fortemente ligados, e a outra camada é designada camada difusa, que corresponde a uma camada onde os iões não estão firmemente unidos. Nesta última, há um limite onde os iões e as partículas formam uma entidade estável e desta forma, quando a partícula se move, somente os iões pertencentes a estas camadas se movem com ela [105]. O potencial zeta não é obtido de forma direta. São realizadas experiências de eletroforese nas amostras e a velocidade das partículas é medida através da equação de Henry, de forma a determinar-se a mobilidade eletroforética – velocidade das partículas segundo um campo elétrico [105]. Para que esta medição seja possível, a amostra em suspensão é colocada numa cuvette, com eléctrodos nas extremidades, onde é aplicado um campo elétrico. A diferença de potencial criada pelas cargas opostas nos dois eléctrodos faz com que as partículas carregadas se movam para o eléctrodo de carga oposta.

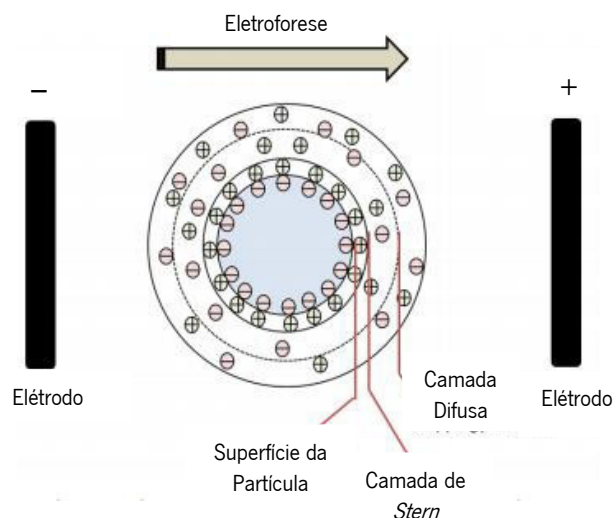


Figura 3.3: Diagrama representativo de uma partícula carregada negativamente, com as camadas duplas elétricas [105].

Neste trabalho, de modo a determinar qual o ambiente em que as partículas são mais estáveis, foram realizados experimentos com diferentes pHs: 2, 4, 7 e 9. O ajuste do pH foi feito com soluções de HCl (1 M) e NaOH (1 M). O equipamento utilizado foi o Zetasizer, *NANO ZS - ZEN3600* da *Malvern (Malvern Instruments Limited, UK)*. As amostras dispersas foram colocadas

numa cuvete produzida pela *Malvern – folded capillary cell*. A média dos potenciais e o desvio padrão foram obtidos através de 5 medições pelo *software Zetazizer 7.11*.

3.3.3 Análise das propriedades magnéticas

A avaliação do comportamento magnético de amostras, quer estas sejam pós, sólidos, líquidos, cristais ou filmes finos, pode ser realizada com recurso ao sistema de magnetómetro de amostra vibrante (VSM do inglês *Vibrating Sample Magnetometer*). Esta avaliação, realizada em função do campo magnético, temperatura e tempo, tem por base a lei de *Faraday* que diz que uma força eletromagnética é gerada numa bobina quando há uma alteração no fluxo da bobina [112].

Neste tipo de caracterização, a amostra é sujeita a uma vibração, e uma tensão alternada da mesma frequência é induzida nas bobinas de deteção que estão adequadamente posicionadas nas laterais da amostra. As alterações do fluxo magnético resultantes induzem uma tensão nas bobinas que é proporcional ao momento magnético da amostra [112]. O campo magnético pode ser gerado por um eletromagneto ou um magneto supercondutor e a variação da temperatura pode ser obtida usando criostatos e fornos [113].

Desta análise resultam curvas de histerese que fornecem a relação entre a magnetização e o campo aplicado. Os parâmetros extraídos a partir da histerese são frequentemente usados para caracterizar as propriedades magnéticas e incluem magnetização de saturação (M_s), magnetização remanescente (M_r) e o campo coercivo (H_c) [114]. Através destes dados é possível obter a massa de CoFe_2O_4 existente nas microsferas com o auxílio da Equação 3.2:

$$\text{CoFe}_2\text{O}_4 \text{ m \%} = \frac{M_s}{M_s \text{ do pó puro}} \times 100 \quad \text{Equação 3.2}$$

Para a execução desta análise utilizou-se o *MicroSense EZ7-VSM* para medição das curvas de histerese, à temperatura ambiente. O campo aplicado foi $|5100|$ Oe.

3.4 Avaliação da citotoxicidade das microsferas

Os ensaios celulares com biomateriais requerem uma avaliação da citotoxicidade dos mesmos. Neste caso, a citotoxicidade apenas foi avaliada nas microsferas, uma vez que o hidrogel já foi testado e não é tóxico para as células [83].

A avaliação indireta da toxicidade foi executada com adaptação do método de teste padrão ISO 10993-5. Como tal, utilizou-se um método colorimétrico que quantifica as células viáveis através do brometo de 3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio (MTT, *Sigma Aldrich*).

O MTT é um composto amarelo que, quando é reduzido metabolicamente pelas células viáveis, forma cristais de formazano de cor azul violeta. O número de células viáveis é diretamente proporcional à intensidade da cor da solução, determinada por medições fotométricas, após a dissolução dos cristais com uma solução de dimetilsulfóxido (DMSO, *Sigma Aldrich*) ou isopropanol. A quantificação é feita através da medição da absorvância a 570 nm usando um leitor de placas espectrofotométricas [115, 116].

Neste ensaio foram utilizadas células fibroblásticas 3T3. Estas cresceram nas mesmas condições que os pré-osteoblastos MC3T3-E1, porém o meio de cultura utilizado foi o DMEM suplementado com 4,5 g.L⁻¹ de glucose.

Depois dos materiais esterilizados, foram colocados em placas de cultura de poliestireno de 24 poços com o meio anteriormente descrito e nas mesmas condições *standard* durante 24 h. Adicionalmente, foram preparados os controlos do ensaio: o controlo positivo corresponde a uma solução de DMSO a 20% (v/v) com a mesma densidade celular e um controlo negativo composto por uma solução apenas de meio de cultura, DMEM, com a mesma quantidade de células.

Simultaneamente, foram cultivadas células em placas de 96 poços com uma densidade de 3×10^4 células.mL⁻¹ e incubadas durante 24 h, de modo a permitir a adesão celular. Após este período, o meio de cultura da placa de 96 poços foi removido e substituído por 100 µl/poço de meio que esteve em contacto com o material. Por fim, as células foram incubadas durante 24 e 72 h. Em cada um destes tempos, a viabilidade celular foi aferida através do ensaio colorimétrico explicado anteriormente, MTT. A quantidade de MTT adicionada à solução foi de 5 mg.mL⁻¹ dissolvidos numa proporção de 1:10 de DMEM. Depois da solução estar 3 h numa incubadora a 37 °C, os cristais de formazano foram dissolvidos em 100 µL de DMSO e procedeu-se à quantificação da absorvância usando um leitor de placas espectrofotométrico (*Biotech Synergy HT*).

Para cada condição existiam 4 réplicas (n=4). No final, todos os resultados foram analisados segundo a Equação 3.3 que expressou a viabilidade celular de cada amostra quando comparada com o controlo negativo (células desprovidas de contacto com o material em estudo).

$$\text{Viabilidade celular \%} = \frac{\text{Absorvância da amostra}}{\text{Absorvância do controlo negativo}} \times 100 \quad \text{Equação 3.3}$$

3.5 Avaliação da adesão celular

A adesão celular dos pré-osteoblastos MC3T3-E1 ao hidrogel foi garantida pelo método de imunocitoquímica após 24 h de cultivo (T0).

Primeiramente, o hidrogel foi transferido para uma nova placa e lavado com PBS a 1%, 3 vezes. De modo a fixar as células, foi adicionado formaldeído a 4% (v/v) (*Panreac*) durante 10 min e deixado a 37 °C na incubadora com ar humidificado a 95% contendo uma atmosfera de 5% de CO₂.

Depois das células fixadas, procedeu-se à lavagem das amostras com PBS a 1% (p/v) três vezes. Estas foram incubadas com uma solução de tetrametilrodamina (TRITC, *Sigma Aldrich*) numa concentração de 1 µg.mL⁻¹, e deixadas à temperatura ambiente durante 45 min. Posteriormente, as amostras foram novamente lavadas com PBS a 1% (p/v) e incubadas com uma solução de 4,6-diamidino-2-fenilindole (DAPI, *Sigma Aldrich*) numa concentração de 0.1 µg.mL⁻¹, durante 5 min, nas condições de incubação anteriormente referidas.

Por fim, as amostras foram lavadas uma última vez com PBS a 1% (p/v) e visualizadas no microscópio de fluorescência (*Olympus BX51 Microscope*).

3.6 Avaliação da proliferação celular

Para a avaliação da proliferação celular dos pré-osteoblastos utilizou-se o ensaio colorimétrico 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazolium (MTS, *Promega*).

O princípio subjacente ao MTS é similar ao MTT, ambos formam cristais de formazan pela redução do reagente MTS ou MTT, respetivamente, por parte das células viáveis. No entanto, os cristais formados a partir do MTS são solúveis em água e, portanto, não é necessário o uso de solventes orgânicos. Deste modo, o ensaio MTS é realizado pela adição do reagente diretamente

no meio de cultura, sem etapas intermitentes, e o restante procedimento é igual ao MTT [116]. Este é um ensaio utilizado para estimar indiretamente da proliferação celular, uma vez que se avalia a atividade metabólica das células ao longo do tempo, e se extrapola para o crescimento celular.

Neste ensaio, a proliferação celular foi avaliada ao fim 72 h. As amostras foram transferidas para uma placa nova e lavadas 2 vezes com PBS a 1% (p/v). Posteriormente, foram incubadas com MTS e DMEM, sem vermelho de fenol (*Biochrom*), numa proporção de 1:5, durante 3 h a 37 °C, no escuro. O sobrenadante foi usado para determinar a absorvância a 490 nm. Como controlo da experiência foi lida a absorvância de MTS+DMEM sem vermelho de fenol.

Para cada condição existiam 4 réplicas (n=4) que contribuíram para uma análise quantitativa apresentada sob a forma de média e desvio padrão.

4. Resultados e Discussão

4.1 Análise morfológica e de tamanhos

A morfologia das microsferas foi analisada através de SEM. As imagens obtidas, aliadas ao software *Image J*, permitiram avaliar a distribuição de tamanhos das microsferas e elaborar os respectivos histogramas de distribuição de tamanhos (Figura 4.1).

Nas Figura 4.1a. e 4.1c. foi possível observar-se microsferas de PLLA e PLLA/CoFe₂O₄ com superfícies esféricas, formas homogêneas e sem evidência de colapso, concavidades ou distorções, evidenciando o sucesso da técnica de emulsão óleo-água.

No caso das microsferas de PLLA (Figura 4.1a. e 4.1b.), o diâmetro médio corresponde a $1,3 \pm 0,4 \mu\text{m}$, variando entre $0,7 \mu\text{m}$ e $2,35 \mu\text{m}$. Através deste histograma é ainda possível visualizar que o intervalo $1-1,5 \mu\text{m}$ é o que regista maior número de eventos. Relativamente às microsferas de PLLA/CoFe₂O₄ (Figura 4.1c. e 4.1d.), estas possuem diâmetros superiores. O diâmetro médio é de $3 \pm 1 \mu\text{m}$, a variar entre $1,4 \mu\text{m}$ e $5,6 \mu\text{m}$, o que indica uma maior heterogeneidade de tamanhos.

As microesferas magnéticas possuem um diâmetro médio superior o que vai de encontro ao previsto, uma vez que se esperava que o polímero encapsulasse as nanopartículas magnéticas [106, 118].

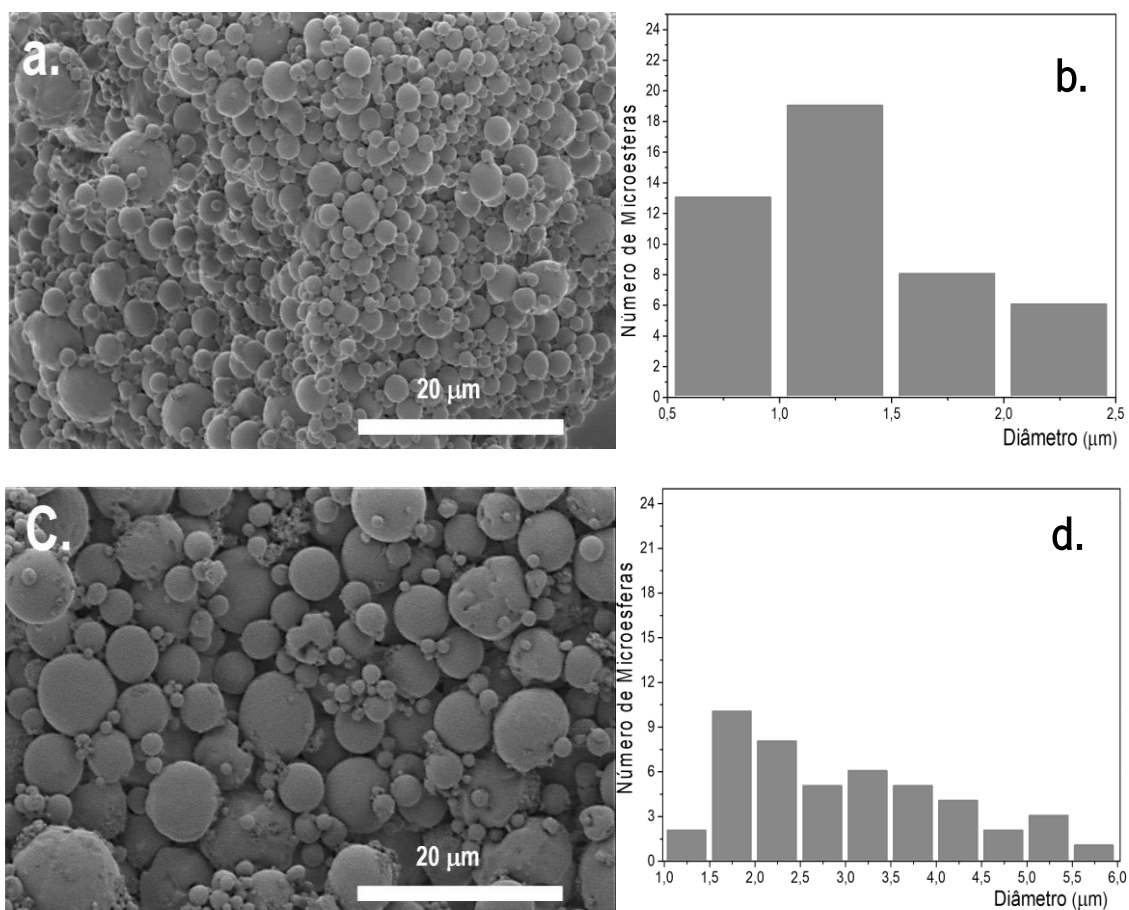


Figura 4.1: Morfologia das microsferas de a) PLLA e c) PLLA/CoFe₂O₄. Distribuição de tamanhos das microsferas de b) PLLA e d) PLLA/CoFe₂O₄, obtida com o *software ImageJ*

Os tamanhos das microsferas podem ser corroborados por DLS. Esta técnica é utilizada para precisar o raio hidrodinâmico das partículas em suspensão assim como a sua dispersividade [105].

O gráfico da Figura 4.2 representa o comportamento das microsferas de PLLA dispersas em água ultrapura, num pH igual a 7. O mesmo não foi possível para as partículas magnéticas, uma vez que estas possuem elevada tendência para agregação e sedimentação, impossibilitando as medições.

As microsferas de PLLA parecem distribuir-se em duas populações, como mostra a Figura 4.2. O raio hidrodinâmico médio corresponde a $1,39 \pm 0,02 \mu\text{m}$, um valor semelhante ao obtido através das medições dos diâmetros nos resultados de SEM ($1,3 \pm 0,4 \mu\text{m}$). Esta similaridade reflete a estabilidade hidrodinâmica das partículas num pH neutro. Por outro lado, o facto de as

microsfersas terem sido centrifugadas para o ensaio de DLS (relatado na secção anterior) pode ter originado um desvio padrão mais pequeno que as analisadas pelo SEM.

O DLS permite também determinar o PDI, o qual indica a homogeneidade da solução. As microsferas de PLLA apresentam um PDI de $0,21 \pm 0,03$, que sugere uma polidispersão moderada (entre 0,1 e 0,4) [105]. Posto isto, conclui-se que existe concordância entre as caracterizações e, ainda, que as microsferas produzidas são estáveis em suspensão num pH igual a 7.

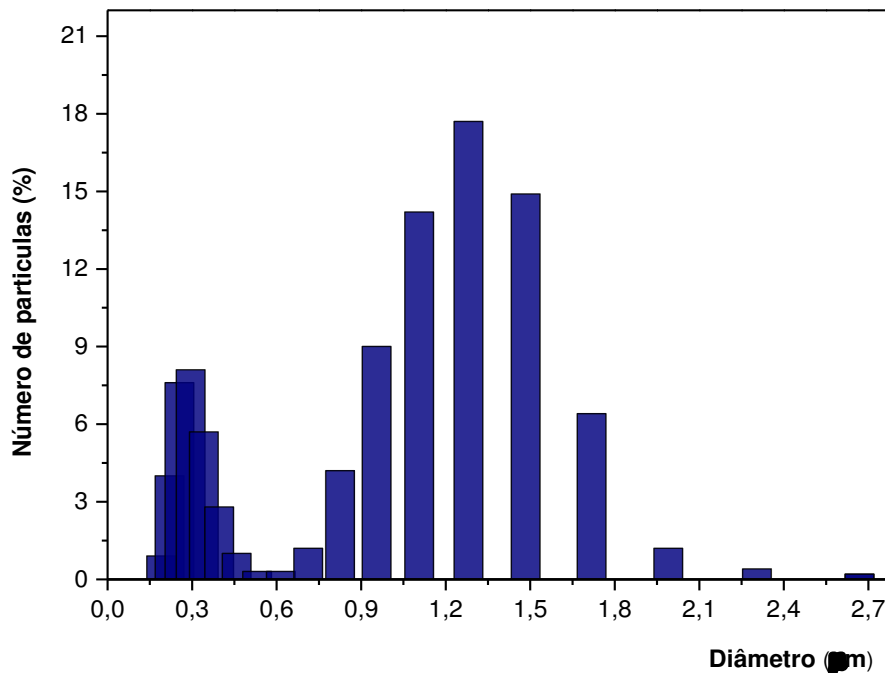


Figura 4.2: Distribuição de tamanhos das microsferas de PLLA obtida por DLS.

4.2 Caracterização físico-química e térmica

De forma a avaliar a possibilidade de ocorrerem modificações químicas na estrutura do PLLA durante o processamento das microsferas e/ou pela introdução de partículas magnéticas, procedeu-se à caracterização das microsferas puras e compósitas por FTIR-ATR (Figura 4.3).

Complementarmente, na Tabela 4.1 são apresentados os principais números de onda obtidos para as microsferas de PLLA e PLLA/CoFe₂O₄ e as respetivas bandas de absorção teóricas do PLLA puro.

Os espetros da Figura 4.3 possuem as mesmas bandas de absorção. Em ambos os espetros de absorção é possível visualizar dois picos a um número de onda 750 cm⁻¹ e 870 cm⁻¹, característicos da fase cristalina e amorfa, respetivamente [119]. A presença da banda de

absorção a 921 cm^{-1} remete para a presença de α -cristais. Esta banda corresponde ao acoplamento do estiramento do C–C da cadeia principal com a rotação do CH_3 [120]. As vibrações na banda a 1085 cm^{-1} coincidem com a vibração de estiramento do grupo metilo C–H [55]. Seguidamente, o pico de absorção a 1184 cm^{-1} corresponde ao estiramento assimétrico da ligação C–O–C com a rotação CH_3 [121]. As bandas que surgem próximo dos 1450 cm^{-1} são características de estiramentos do grupo metilo C–H [110]. Por fim, as regiões com maior frequência ilustram dois picos de maior relevância na zona dos 1750 e 2999 cm^{-1} , correspondentes ao estiramento da ligação (C=O) e ao estiramento do grupo CH_3 respetivamente [106].

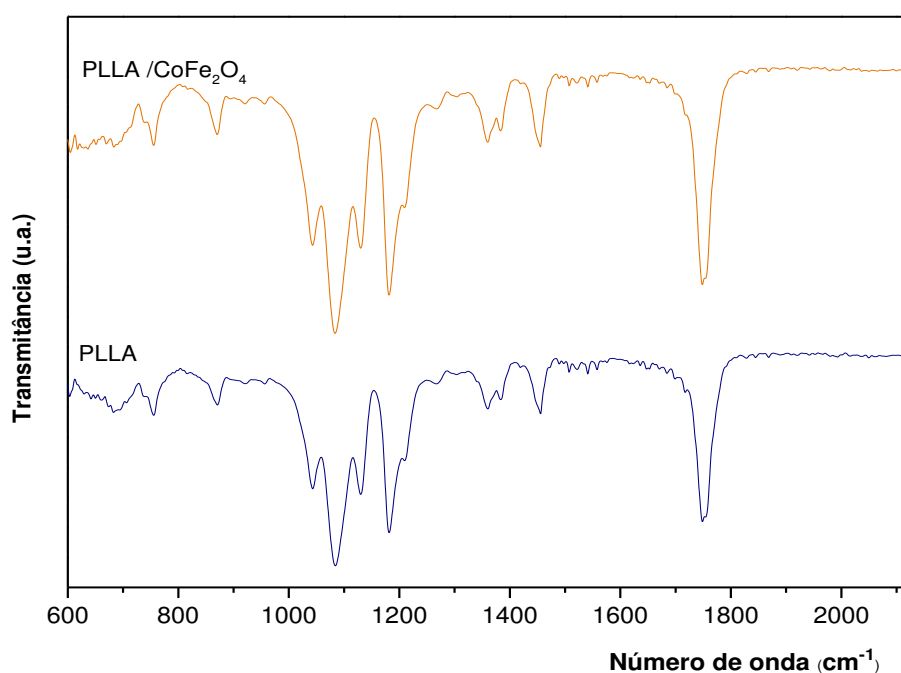


Figura 4.3: Espectro infravermelho das microsferas de PLLA e PLLA/CoFe₂O₄.

Uma vez que os picos existentes nestes espetros (Figura 4.3) e os da literatura (Tabela 4.1) são coincidentes comprovou-se, primeiramente, que o método de processamento não alterou as propriedades químicas do PLLA e, paralelamente, que não são notórios resíduos de PVA. Por fim, a introdução de nanopartículas na matriz polimérica também não provocou alteração nas propriedades nativas do material.

Tabela 4.1: Bandas de absorção características do PLLA presentes nas microsferas de PLLA e PLLA/CoFe₂O₄.

Numero de Onda (cm ⁻¹)	Fase	Bandas de absorção	Referências
750	α	δ (C=O)	[106, 119]
871	Amorfa	Rotação CH ₃	[106, 122]
921	α	Estiramento C–C + Rotação CH ₃	[122, 123]
1085	α' e α	Estiramento do grupo metilo (C–H)	[110, 124]
1184	Amorfa, α' e α	Estiramento assimétrico do C–O–C	[121, 124]
1357	Semicristalina	δ (CH) + δ_s (CH ₃)	[110, 124]
1453	Amorfa	Estiramento do grupo metilo (C–H)	[106, 110]
1749	α	Estiramento do éster (C=O)	[106, 125]
2999	α' e α	Estiramento assimétrico do CH ₃	[106]

Durante a síntese das microsferas, o polímero pode alterar propriedades como a morfologia de superfície, porosidade ou mesmo o grau de cristalinidade [111]. Desta forma, foi feita a caracterização térmica das amostras de PLLA e PLLA/CoFe₂O₄ com auxílio da técnica de DSC para avaliar possíveis alterações nas propriedades físico-químicas.

Através do termograma das microsferas de PLLA (Figura 4.4) é possível observar dois picos endotérmicos a ≈ 60 °C, correspondente à temperatura de transição vítrea do polímero e um pico de fusão a ≈ 179 °C. Relativamente à análise das partículas magnéticas (Figura 4.4 - PLLA/CoFe₂O₄), as temperaturas são muito semelhantes: a temperatura de transição vítrea assume 65 °C enquanto a temperatura de fusão atinge uma temperatura máxima de ≈ 181 °C.

Com a Equação 3.1 (apresentada no capítulo anterior) determinou-se o grau de cristalinidade (ΔX_c). As microsferas de PLLA apresentam um valor de 52,1%, enquanto as compósitas apresentam um valor de 49,3%. Uma vez que este valor difere em $\approx 3\%$, apenas, essa diferença pode estar associada ao erro do equipamento (2%). Desta forma, não é possível afirmar que a diferença entre as cristalinidades está associada às interações eletrostáticas entre as nanopartículas magnéticas e as cadeias poliméricas, contrariamente ao reportado na literatura [126].

Com esta análise calorimétrica é facilmente concluído que o método de síntese das microsferas não altera as temperaturas de transição vítrea e fusão, uma vez que os picos estão

no intervalo mencionado na literatura. Simultaneamente, o facto de não existirem mais picos remete para a ausência de impurezas.

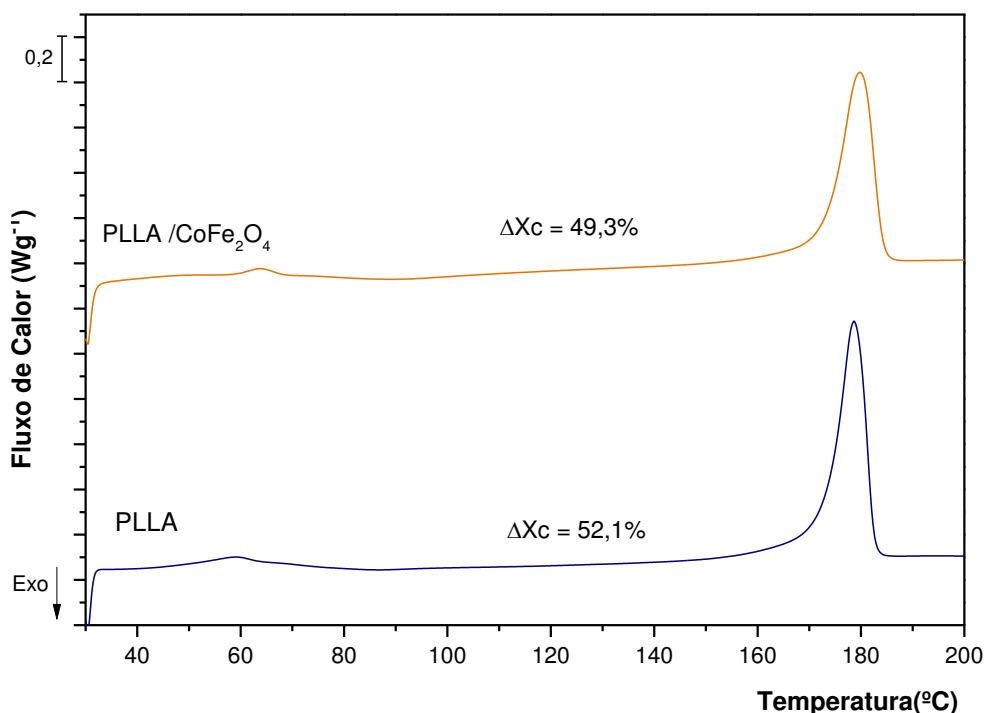


Figura 4.4: Análise calorimétrica por DSC de microsferas de PLLA e PLLA/CoFe₂O₄.

Quando as amostras estão sujeitas a um aumento da temperatura, as características térmicas do material podem sofrer alterações. Deste modo, foi realizado o ensaio por DSC nas amostras que sofreram tratamento térmico.

De acordo com a Figura 4.5, não se registam alterações significativas nos picos endotérmicos. A temperatura de fusão possui valores que oscilam entre os 178 °C e 181 °C para as partículas de PLLA/CoFe₂O₄ – 140 °C e de PLLA – 70 °C, respetivamente, um intervalo de valores pertencente ao intervalo do erro associado à técnica de medição (≈ 3%).

Através dos presentes resultados é possível concluir que o tipo de morfologia do material influencia a cristalinidade do polímero e, conseqüentemente, a eficácia dos tratamentos térmicos. Em filmes e membranas de PLLA, os tratamentos térmicos induziram um aumento no grau de cristalinidade de 20% para 50%, no máximo [110], contrariamente, em microsferas não foram sentidas alterações significativas.

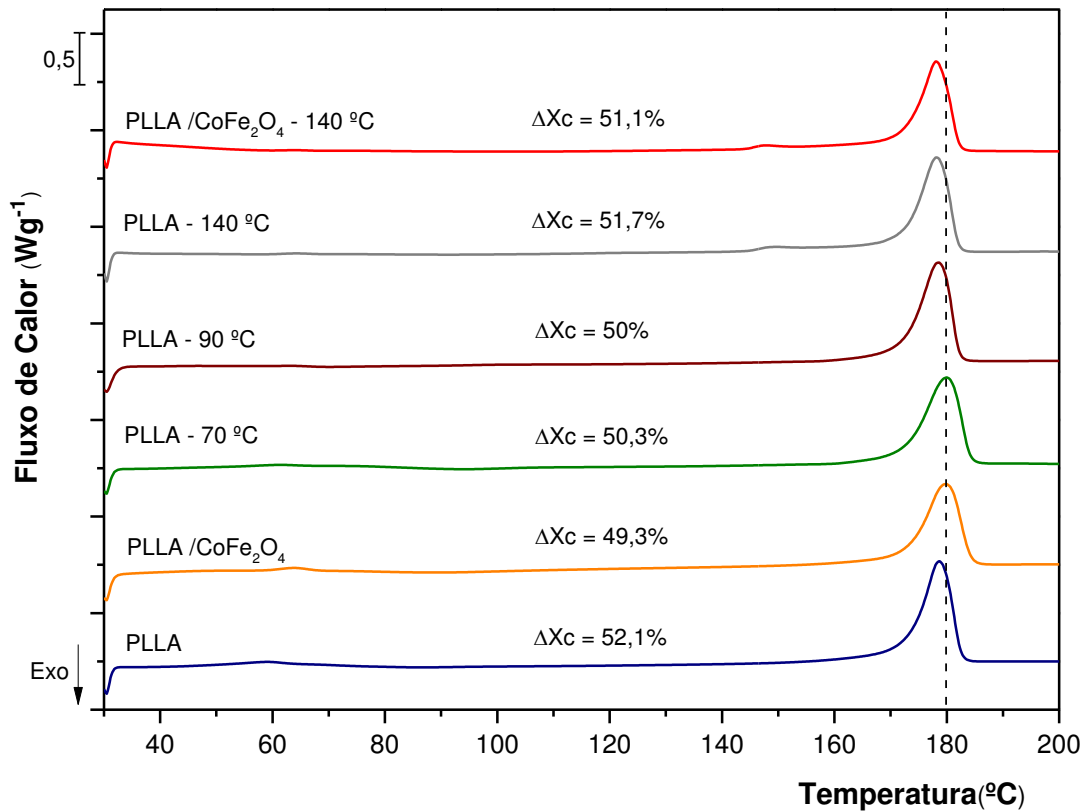


Figura 4.5: Análise calorimétrica por DSC das microsferas de PLLA e PLLA/CoFe₂O₄, depois do tratamento térmico.

Por fim, a caracterização físico-química fica completa com a avaliação do potencial zeta das microsferas. Esta caracterização é aplicada a partículas em suspensão e é um fator importante para determinar a estabilidade coloidal. Valores de potenciais a baixo de -30 mV ou acima de 30 mV são característicos de dispersões coloidais estáveis com menor tendência para agregarem [127].

A Figura 4.6 mostra o potencial zeta para diferentes pH's – 3, 5, 7 e 9. Todos os valores são negativos o que sugere que as microsferas possuem uma superfície carregada negativamente. Este facto deve-se à presença de grupo carboxilo ionizado do ácido láctico [128]. Em ambientes ácidos, as esferas formam agregados [128] devido à forte atração. Contrariamente em pH alcalino, as repulsões aumentam originando uma maior estabilidade das partículas.

Para as microsferas de PLLA a estabilidade é obtida a partir do pH 5, sendo que neste o potencial está muito próximo de -30 mV. Quando o pH é 7, o potencial zeta é de -53 mV. Por fim, a pH 9 é possível observar um potencial ligeiramente mais elevado em módulo (-55 mV).

Relativamente às microsferas magnéticas, estas apresentam um valor em módulo inferior ao das puras que pode ser atribuído à diferença de pesos entre ambas. Esta diferença leva a taxas de sedimentação maiores para as microsferas de PLLA/CoFe₂O₄.

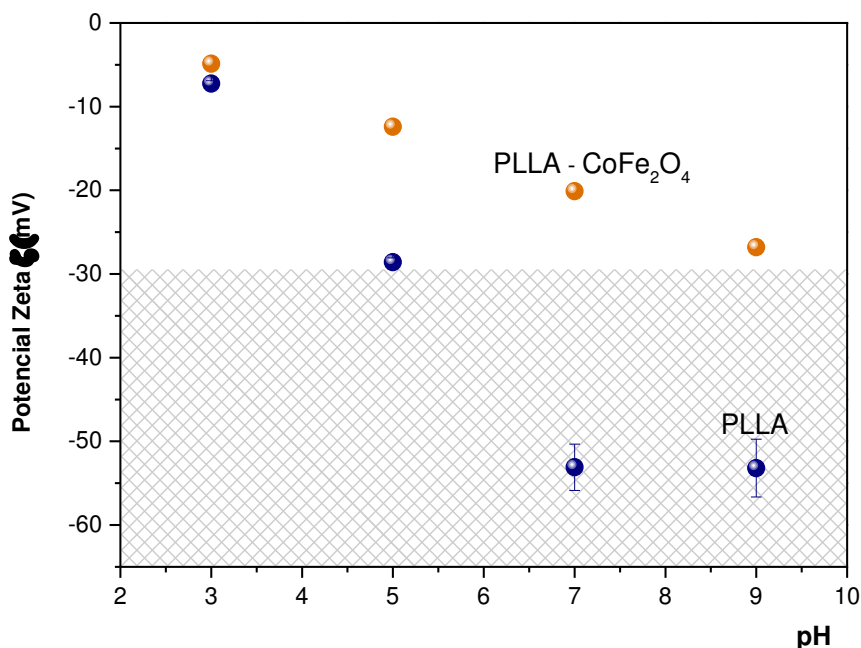


Figura 4.6: Análise por Potencial Zeta das microsferas de PLLA e PLLA/CoFe₂O₄ a diferentes pH's.

A sensibilidade das microsferas às variações do pH do meio permite tirar ilações relevantes para o uso de microformulações em terapia direcionada, liberação de fármacos, entre outros. Estudos com matrizes poliméricas dispersas em fluidos biológicos como saliva, suco gástrico e fluidos intestinais apresentaram resultados similares [129].

4.3 Análise das propriedades magnéticas

As curvas de magnetização das microsferas magnéticas foram determinadas à temperatura ambiente pelo método de VSM.

A Figura 4.7 mostra uma histerese magnética típica de um material ferromagnético [92]. Partindo do material desmagnetizado, à medida que o campo magnético aumenta, aumenta também a magnetização até uma magnetização de saturação máxima de 3,07 emu.g⁻¹. Entretanto, ao diminuir-se o campo, diminui lentamente a magnetização até atingir a magnetização remanescente de 1,31 emu.g⁻¹. Invertendo o sentido do campo magnético, a magnetização segue um percurso cruzando o momento em que se anula a magnetização e se obtém o campo coercivo, 1500 Oe. A magnetização de saturação das microsferas de PLLA/CoFe₂O₄ é consideravelmente menor que a do pó puro (47,9 emu.g⁻¹) uma vez que a

quantidade de CoFe_2O_4 adicionado à solução durante o processamento das microsferas foi de 10% (p/p) [130].

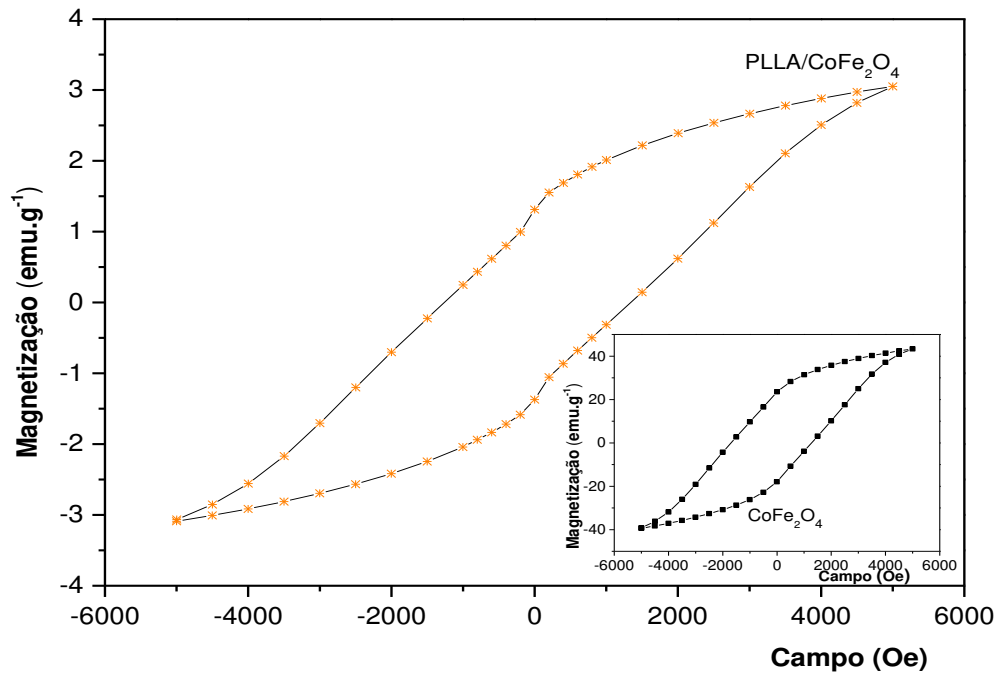


Figura 4.7: Comportamentos magnéticos das microsferas de PLLA/ CoFe_2O_4 e das nanopartículas de CoFe_2O_4 , avaliados através de VSM.

A Equação 3.2 (apresentada no capítulo anterior) permitiu determinar a percentagem relativa à quantidade de nanopartículas existentes na matriz das microsferas. Esta equação utiliza a magnetização de saturação do composto (Figura 4.7 – PLLA/ CoFe_2O_4) e relaciona-a com a magnetização de saturação das nanopartículas puras (Figura 4.7 – CoFe_2O_4).

Desta forma, foi possível concluir que a percentagem (p/p) de CoFe_2O_4 disperso na matriz polimérica é de 6,39. Este valor aponta para uma eficiência de encapsulamento de 64%, aproximadamente. Uma das justificações indicadas na literatura para a diminuição de CoFe_2O_4 encapsulado face ao adicionado, reside no facto de ser um material com densidade superior à densidade polimérica o que desencadeia um depósito mais rápido das primeiras, não permitindo, por sua vez, uma síntese uniforme [92].

4.4 Avaliação da citotoxicidade das microsferas

A citotoxicidade do biomaterial foi avaliada através de experimentos de viabilidade celular em células fibroblásticas 3T3. As células foram sujeitas a um ensaio de MTT ao fim de 24 e 72 h, e os resultados foram expostos no gráfico da Figura 4.8. Para este ensaio foram usados um controlo positivo (20% DMSO) e um negativo que representa o crescimento celular em condições *standard*, ao qual se fez corresponder 100% de viabilidade.

As células expostas ao meio que esteve anteriormente em contacto com as microsferas de PLLA exibem uma viabilidade celular de 99% e 92% ao fim de 24 e 72 h, respetivamente. Simultaneamente, a viabilidade celular dos fibroblastos colocados em contacto com o meio das microsferas de PLLA/CoFe₂O₄ apresenta valores de 85% e 80% depois de 24 e 72 h, respetivamente.

De acordo com a ISO 10993-5, apenas são consideradas citotóxicas as amostras que apresentem uma viabilidade celular abaixo dos 70%. Assim sendo, é possível aferir que os biomateriais utilizados não apresentam toxicidade celular e, indiretamente, que as nanopartículas de CoFe₂O₄ foram encapsuladas na matriz poliméricas.

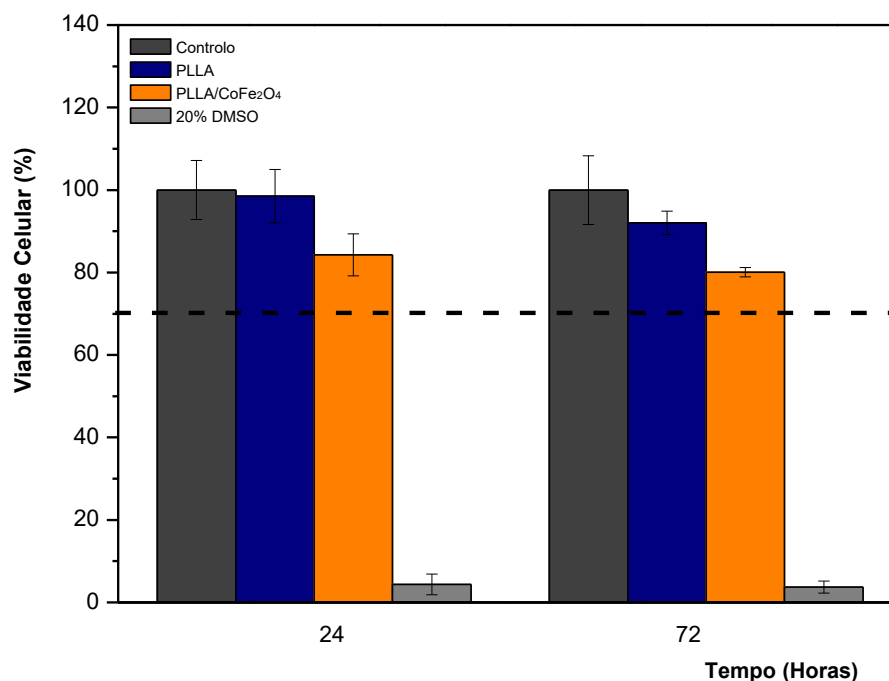


Figura 4.8: Viabilidade celular de células 3T3 que cresceram durante 24 e 72 h em contacto com o meio exposto às microsferas de PLLA e PLLA/CoFe₂O₄ e controlos, através de medições com o ensaio MTT.

4.5 Culturas celulares com hidrogéis e microsferas

Para dar início às culturas estáticas e dinâmicas, é necessário verificar se as microsferas estão bem dispersas no hidrogel. Desta forma, recorrendo ao microscópio ótico, foi possível observar que as microsferas de PLLA (Figura 4.9a.) e de PLLA/CoFe₂O₄ (Figura 4.9b.) se encontravam uniformemente dispersas no hidrogel.

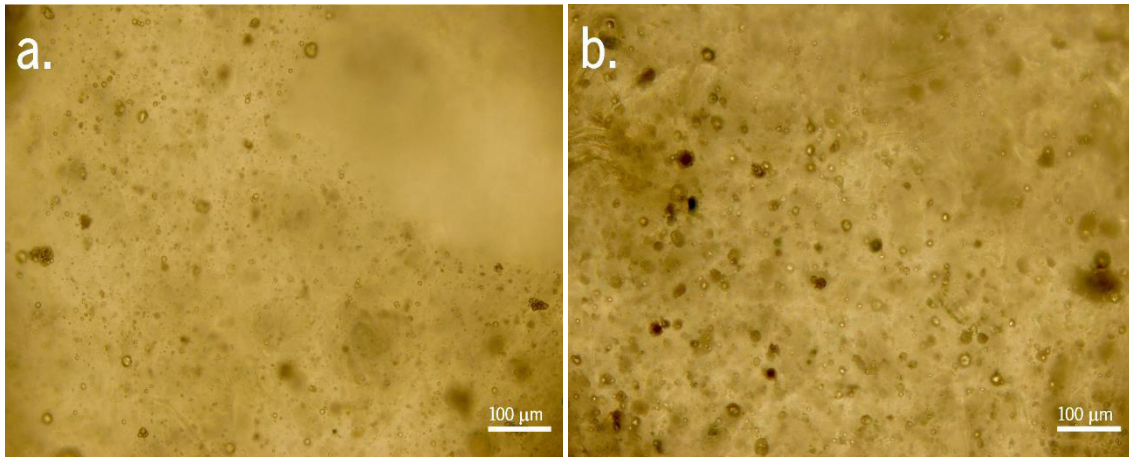


Figura 4.9: Microscopia ótica de hidrogéis com microsferas de a) PLLA e b) PLLA/CoFe₂O₄.

Posto isto, deu-se início aos cultivos estáticos e dinâmicos com pré-osteoblastos MC3T3-E1 em ambas as condições. Inicialmente, garantiu-se a adesão celular aos hidrogéis (24 h) e depois avaliou-se a proliferação celular ao fim de 72 h.

4.5.1 Avaliação da adesão celular

A adesão dos pré-osteoblastos ao hidrogel foi aferida no tempo T₀ em condições estáticas, através de um microscópio de fluorescência. Para tal, recorreu-se a ensaios de imunocitoquímica, como mencionado no capítulo anterior.

Na Figura 4.10a. e 10b. observam-se os pré-osteoblastos cultivados no hidrogel com microsferas de PLLA e PLLA/CoFe₂O₄, respetivamente. O núcleo dos pré-osteoblastos foi marcado com o marcador DAPI (azul) e o citoesqueleto com o TRICT (avermelhado). No entanto, não se distinguem as duas estruturas por existir sobreposição de cores. Esta sobreposição relata a forma esférica das células o que permite concluir, por sua vez, que as células não alongaram após 24 h

de cultura. Ao contrário do que acontece com *scaffolds* planos [131], em hidrogéis as células não estabelecem ligações imediatas com o substrato, demorando mais tempo a alongar.

Simultaneamente, é possível verificar que o hidrogel encapsulou as células em toda a sua estrutura tridimensional, uma vez que a fluorescência se encontrara uniformemente dispersa pelo plano principal captado pelo microscópio e, por outro lado, as sombras existentes remetem para a presença de fluorescência noutros planos.

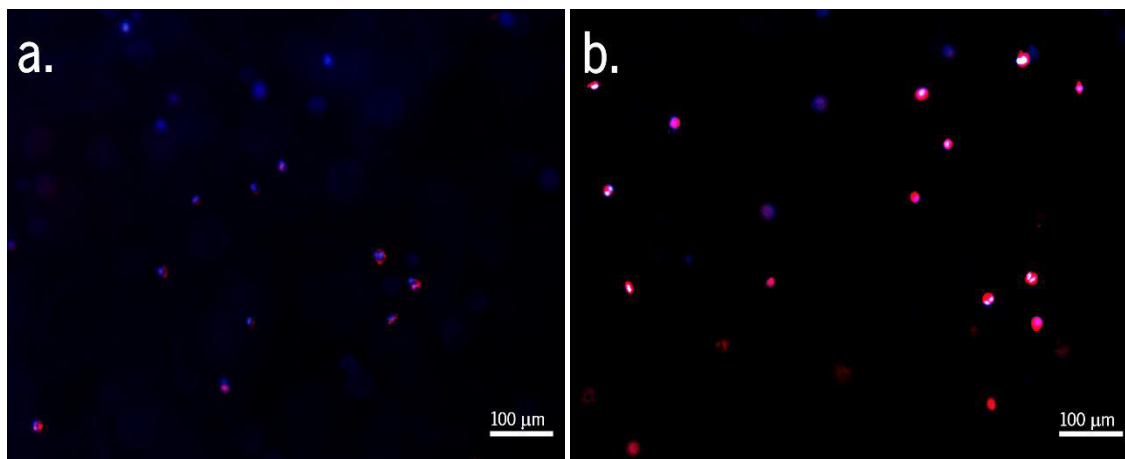


Figura 4.10: Ensaios de imunocitoquímica em pré-osteoblastos MC3TE-E1 cultivados em hidrogéis com microsferas de a) PLLA e b) PLLA/ CoFe₂O₄, após 24 h de cultura em condições estáticas.

4.5.2 Avaliação da proliferação celular

Após a adesão celular, foi também avaliada a proliferação celular. Para tal, as amostras foram sujeitas a um ensaio de MTS após 72 h de cultura em condições estáticas e dinâmicas.

A média das absorvâncias obtidas para as amostras com microsferas de PLLA e PLLA/CoFe₂O₄, numa cultura em condições estáticas, nas condições 1 e 2, estão representadas na Figura 4.11. Primeiramente, é possível observar que existe crescimento celular em ambas as condições e nas diferentes microsferas, uma vez que as absorvâncias correspondentes às 72 h são superiores às obtidas aquando a adesão celular no tempo T₀.

Relativamente às diferenças entre a proliferação celular nas condições 1 e 2, é possível observar que as médias das absorvâncias são superiores na condição 1. Porém, quando comparado o crescimento ao fim de 72 h com a absorvância das células aderidas (T₀) para a correspondente condição, observa-se que na condição 2 as células proliferaram mais $\approx 27\%$, em ambos os hidrogéis, quando comparadas com a condição 1.

Comparando o crescimento celular em amostras com microsferas de PLLA com microsferas de PLLA/CoFe₂O₄ ao fim de 72 h na cultura em condições estáticas, não se verificam diferenças significativas. Esta similaridade corrobora os resultados obtidos nas caracterizações das microsferas, uma vez que nestes não se obtiveram diferenças ao nível físico e químico das microsferas puras e compósitas. Desta forma, seria de esperar que as células em condições estáticas, sem qualquer tipo de estímulo externo, possuissem um comportamento semelhante.

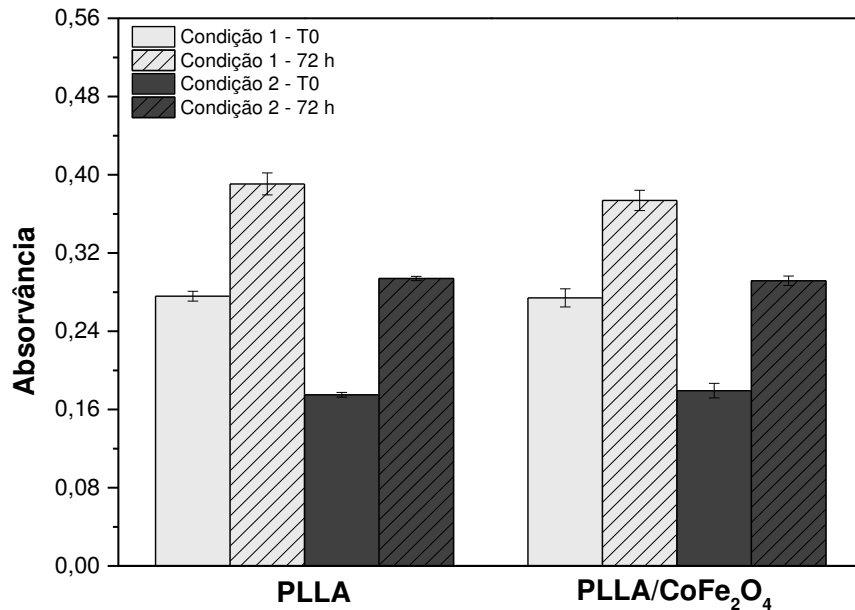


Figura 4.11: Proliferação celular de pré-osteoblastos MC3T3-E1 cultivados em hidrogéis com microsferas de PLLA e PLLA/CoFe₂O₄ numa cultura em condições estáticas, após 72 h e em ambas as condições de estudo.

A análise da proliferação celular em hidrogéis com microsferas de PLLA/CoFe₂O₄ num cultivo celular dinâmico está representada na Figura 4.12. Como mencionado nos capítulos anteriores, esta condição de cultura teve o propósito de recriar as tensões mecânicas sentidas nos osteoblastos ao longo do dia, devido ao movimento diário do ser humano. Por intermédio de um campo magnético exercido pelo biorreator, é fornecido o estímulo necessário à componente magnetostriativa das microsferas de modo a provocar uma deformação mecânica nas mesmas.

As absorvâncias referentes à condição 1 são superiores às da condição 2. No entanto, à semelhança do referido anteriormente, a proliferação celular é superior na condição 2 (≈35%).

Paralelamente, verifica-se que ao fim de 72 h existe uma maior proliferação no cultivo dinâmico, comparativamente com o estático, o que confirma a sensibilidade mecânica dos osteoblastos reportada na literatura [33].

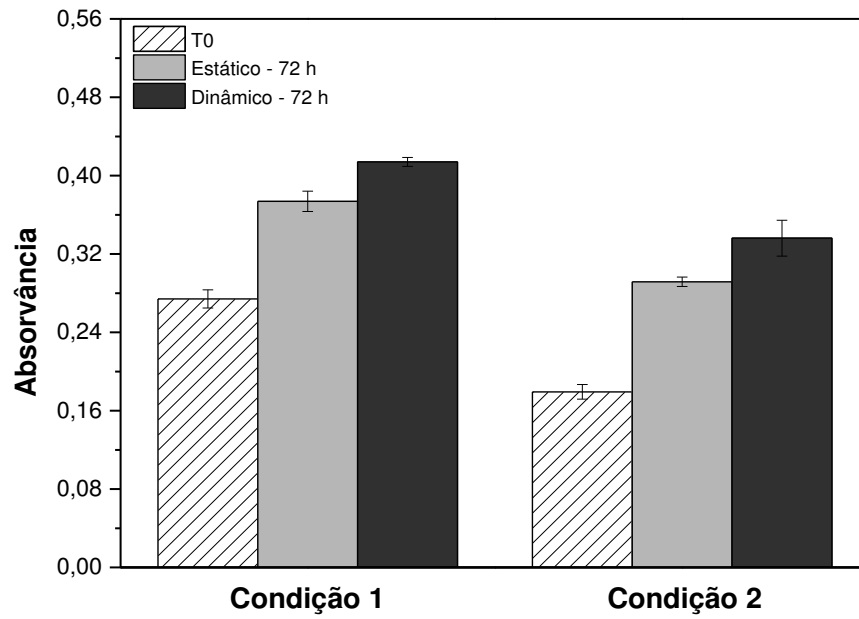


Figura 4.12: Proliferação celular de pré-osteoblastos MC3T3-E1 cultivados em hidrogéis com microsferas de PLLA/CoFe₂O₄ numa cultura em condições estáticas e dinâmicas, após 72 h e em ambas as condições de estudo.

5. Conclusão

Nesta dissertação desenvolverem-se microsferas poliméricas puras e compósitas pelo método de emulsão óleo-água, como tinha sido proposto. Este facto foi corroborado pelas imagens de SEM, nas quais se visualizaram partículas de PLLA e PLLA/CoFe₂O₄ de forma esférica, com diâmetros compreendidos entre 0,7 e 2,35 µm e 1,4 e 5,6 µm, respetivamente. Posteriormente, com o DLS averiguou-se a estabilidade e conclui-se que as partículas desenvolvidas são estáveis em suspensão, possuindo um PDI de 0,21±0,03.

Relativamente às caracterizações térmicas e físico-químicas, conclui-se, em primeira instância, que as microsferas de PLLA/CoFe₂O₄ apresentam as mesmas bandas de absorção que as de PLLA, similarmente ao que acontece na literatura com o polímero puro. No que se refere às características térmicas do polímero, as temperaturas de transição vítrea e de fusão existentes na literatura e as obtidas experimentalmente foram idênticas, não remetendo para a existência de impurezas. Relativamente ao grau de cristalinidade, as microesferas poliméricas puras e compósitas apresentaram valores de ≈ 52% e ≈ 49%, respetivamente. Desta forma, quando foram sujeitas ao tratamento térmico, não apresentaram variações significativas no grau de cristalinidade. Posto isto, conclui-se que o método de processamento e adição de CoFe₂O₄ à matriz polimérica não alterou as características nativas do polímero. Por fim, a medição do potencial eletrocinético a diferentes pH's demonstrou a estabilidade coloidal das partículas, remetendo para a aplicabilidade destas partículas em diferentes ambientes fluidicos.

Em relação às propriedades magnéticas das nanopartículas de CoFe₂O₄, observou-se que o valor de magnetização das microsferas compósitas aumenta com o aumento do campo magnético, possuindo um comportamento magnético semelhante ao registado para as nanopartículas puras. Simultaneamente, foi possível concluir acerca da quantidade de nanopartículas existentes nas microesferas – ≈ 6,4% (p/p) – face aos 10% (p/p) adicionados à solução, durante o processamento.

Por sua vez, os ensaios de citotoxicidade demonstraram que as microsferas, puras e compósitas, não são tóxicas, o que indiretamente mostra um encapsulamento eficaz das nanopartículas na matriz polimérica.

Os ensaios de proliferação celular, com células da linha osteogénica em hidrogéis com as microesferas desenvolvidas, mostraram que a condição 2 é mais eficiente. Isto é, quando as células se encontravam semeadas no exterior da matriz do hidrogel, a proliferação era superior à observada na outra condição testada. No que diz respeito à comparação entre as duas culturas, o cultivo dinâmico mostrou-se mais eficaz, o que permite concluir que o estímulo mecânico favorece,

efetivamente, a proliferação de células ósseas. Todos os resultados demonstraram a potencialidade dos materiais magnetostritivos acoplados a um hidrogel como suporte celular para aplicações em regeneração óssea.

Dito isto, todos os objetivos propostos neste trabalho de dissertação foram cumpridos, sendo, simultaneamente, proposta uma nova e promissora estratégia com aplicabilidade em engenharia de tecidos.

5.1 Sugestões para trabalhos futuros

Esta dissertação sugeriu a junção de duas estratégias promissoras nas investigações atuais: os hidrogéis, como suportes celulares tridimensionais e as microesferas, produzidas a partir de materiais inteligentes, como potenciadores da proliferação celular. Neste sentido, uma das sugestões para trabalhos futuros passa por entender se estes materiais acoplados podem ser precursores de linhas celulares osteogénicas a partir de células estaminais mesenquimais.

Complementarmente, sugere-se a polarização das microesferas de modo criar partículas magnetoelétricas, através da intensificação da componente piezoelétrica das microesferas compósitas. Desta forma, percebia-se se as células nestes sistemas proliferavam preferencialmente sob um efeito mecânico ou mecanoelétrico.

Relativamente ao hidrogel, a perspetiva futura prende-se com a execução de testes mecânicos e de injetabilidade do hidrogel com e sem as microesferas, de modo a entender a aplicabilidade *in vivo*, por exemplo, em casos de fratura óssea onde se injetaria o hidrogel *in situ*.

6. Referências

1. Lanza R.P., Langer R.S. and Vacanti J., *Principles of tissue engineering*. 3. ed. 2007, Amsterdam ; Boston: Elsevier / Academic Press. xxvii, 1307 s.
2. Ikada Y., *Challenges in tissue engineering*. Journal of the Royal Society Interface, 2016. **3**(10): p. 589-601.
3. Karp J.M., Dalton P.D. and Shoichet M.S., *Scaffolds for tissue engineering*. MRS Bulletin, 2003. **28**(4): p. 301-306.
4. O'brien F.J., *Biomaterials & scaffolds for tissue engineering*. Materials today, 2011. **14**(3): p. 88-95.
5. Ribeiro C., et al., *Proving the suitability of magnetoelectric stimuli for tissue engineering applications*. Colloids Surfaces B: Biointerfaces, 2016. **140**: p. 430-6.
6. Liu X. and Ma P.X., *Polymeric scaffolds for bone tissue engineering*. Annals of biomedical engineering, 2004. **32**(3): p. 477-486.
7. Rajabi A.H., Jaffe M. and Arinze T.L., *Piezoelectric materials for tissue regeneration: a review*. Acta Biomaterialia, 2015. **24**,3778: p. 12-23.
8. Ribeiro C., et al., *Piezoelectric polymers as biomaterials for tissue engineering applications*. Colloids Surfaces B: Biointerfaces, 2015. **136**: p. 46-55.
9. Barbanti S.H., Zavaglia C.A. and Duek E.A., *Polímeros bioreabsorvíveis na engenharia de tecidos*. Polímeros: Ciência e Tecnologia, 2005. **15**(1): p. 13-21.
10. Liu F., et al., *Progress in the production and modification of PVDF membranes*. Journal of membrane science, 2011. **375**(1): p. 1-27.
11. Babensee J.E., et al., *Immunoblot analysis of proteins associated with HEMA-MMA microcapsules: human serum proteins in vitro and rat proteins following implantation*. Biomaterials, 1998. **19**(7-9): p. 839-49.
12. Mikos A.G., et al., *Host response to tissue engineered devices*. Advanced Drug Delivery Rev, 1998. **33**(1-2): p. 111-139.
13. Murphy C.M., Haugh M.G. and O'Brien F.J., *The effect of mean pore size on cell attachment, proliferation and migration in collagen-glycosaminoglycan scaffolds for bone tissue engineering*. Biomaterials, 2010. **31**(3): p. 461-6.
14. Murphy C.M. and O'Brien F.J., *Understanding the effect of mean pore size on cell activity in collagen-glycosaminoglycan scaffolds*. Cell Adhesion and Migration, 2010. **4**(3): p. 377-81.
15. O'Brien F.J., et al., *The effect of pore size on cell adhesion in collagen-GAG scaffolds*. Biomaterials, 2005. **26**(4): p. 433-41.
16. Yannas I.V., et al., *Synthesis and characterization of a model extracellular matrix that induces partial regeneration of adult mammalian skin*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 1989. **86**(3): p. 933-7.
17. Anselme K., Ploux L. and Ponche A., *Cell/material interfaces: influence of surface chemistry and surface topography on cell adhesion*. Journal of Adhesion Science and Technology, 2010. **24**(5): p. 831-852.

18. Washburn N.R., et al., *High-throughput investigation of osteoblast response to polymer crystallinity: influence of nanometer-scale roughness on proliferation*. *Biomaterials*, 2004. **25**(7): p. 1215-1224.
19. Anselme K., et al., *Qualitative and quantitative study of human osteoblast adhesion on materials with various surface roughnesses*. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 2000. **49**(2): p. 155-166.
20. Wolff J., *Das Gesetz der Transformation der Knochen*. *Deutsche Medizinische Wochenschrift*, 1893. **19**(47): p. 1222-1224
21. Yasuda I., *On the piezoelectric activity of bone*. *Journal of the Physical Society of Japan*, 1954. **28**(3): p. 267.
22. Fukada E. and Yasuda I., *On the piezoelectric effect of bone*. *Journal of the Physical Society of Japan*, 1957. **12**(10): p. 1158-1162.
23. Fukada E., Takamatsu T., and Yasuda I., *Callus formation by electret*. *Japanese Journal of Applied Physics*, 1975. **14**(12): p. 2079.
24. Cochran G.V., et al., *Piezoelectric internal fixation devices: A new approach to electrical augmentation of osteogenesis*. *Journal of Orthopaedic Research*, 1985. **3**(4): p. 508-513.
25. Brighton C., et al., *Treatment of nonunion with constant direct current*. *Clinical Orthopaedics and Related Research*, 1977. **124**: p. 106-123.
26. Iannotti J.P. and Parker R., *The Netter Collection of Medical Illustrations: Musculoskeletal System, Volume 6, Part III-Musculoskeletal Biology and Systematic Musculoskeletal Disease E-Book*. 2013: Elsevier Health Sciences.
27. Ficat J., et al., *Piezoelectric induction of bone formation: Ultrastructural observations*. *Ferroelectrics*, 1984. **60**(1): p. 313-316.
28. Dadsetan M., et al., *The effects of fixed electrical charge on chondrocyte behavior*. *Acta biomaterialia*, 2011. **7**(5): p. 2080-2090.
29. Rutkovskiy A., Stenslkken K.-O, and. Vaage I.J, *Osteoblast Differentiation at a Glance*. *Medical Science Monitor Basic Research*, 2016. **22**: p. 95.
30. Papachroni K.K., et al., *Mechanotransduction in osteoblast regulation and bone disease*. *Trends in Molecular Medicine*, 2009. **15**(5): p. 208-216.
31. Robling A.G. and Turner C.H., *Mechanical signaling for bone modeling and remodeling*. *Critical Reviews in Eukaryotic Gene Expression*, 2009. **19**(4): p. 319.
32. Gasser J.A. and Kneissel M., *Bone Physiology and Biology*, in *Bone Toxicology*. 2017, Springer. p. 27-94.
33. Scott A., et al., *Mechanotransduction in human bone: in vitro cellular physiology that underpins bone changes with exercise*. *Sports Medicine*, 2008. **38**(2): p. 139-60.
34. Jacobs C.R., Temiyasathit S., and. Castillo A.B, *Osteocyte mechanobiology and pericellular mechanics*. *Annual Review of Biomedical Engineering*, 2010. **12**: p. 369-400.
35. Lu Q., et al., *Novel porous aortic elastin and collagen scaffolds for tissue engineering*. *Biomaterials*, 2004. **25**(22): p. 5227-5237.
36. Yoo H.S., Kim T.G. and. Park T.G, *Surface-functionalized electrospun nanofibers for tissue engineering and drug delivery*. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2009. **61**(12): p. 1033-1042.

37. Dang J.M. and Leong K.W., *Natural polymers for gene delivery and tissue engineering*. Advanced Drug Delivery Reviews, 2006. **58**(4): p. 487-499.
38. Hutmacher D.W., *Scaffolds in tissue engineering bone and cartilage*. Biomaterials, 2000. **21**(24): p. 2529-2543.
39. Liu C., Xia Z. and J. Czernuszka, *Design and development of three-dimensional scaffolds for tissue engineering*. Chemical Engineering Research and Design, 2007. **85**(7): p. 1051-1064.
40. Correia D.M., *Three dimensional scaffolds based on electroactive polymers for tissue engineering applications*. 2016.
41. Bar-Cohen Y. and Zhang Q., *Electroactive polymer actuators and sensors*. MRS Bulletin, 2008. **33**(03): p. 173-181.
42. Kim K.J. and Tadokoro S., *Electroactive polymers for robotic applications*. Artificial Muscles and Sensors, 2007.
43. Bar-Cohen Y., *Current and future developments in artificial muscles using electroactive polymers*. Expert Review of Medical Devices, 2005. **2**(6): p. 731-740.
44. Bar-Cohen Y., *Electroactive polymer (EAP) actuators as artificial muscles: reality, potential, and challenges*. Vol. 136. 2004. SPIE press.
45. Martins P., Lopes A. and Lanceros-Mendez S., *Electroactive phases of poly (vinylidene fluoride): determination, processing and applications*. Progress in Polymer Science, 2014. **39**(4): p. 683-706.
46. Ravichandran R., et al., *Advances in polymeric systems for tissue engineering and biomedical applications*. Macromolecular Bioscience, 2012. **12**(3): p. 286-311.
47. Ribeiro C., et al., *Enhanced proliferation of pre-osteoblastic cells by dynamic piezoelectric stimulation*. Royal Society of Chemistry Advances, 2012. **2**(30): p. 11504-11509.
48. Jean-Mistral C., Basrou S. and Chaillout J., *Comparison of electroactive polymers for energy scavenging applications*. Smart Materials and Structures, 2010. **19**(8): p. 085012.
49. Luckachan G.E. and Pillai C., *Biodegradable polymers-a review on recent trends and emerging perspectives*. Journal of Polymers and the Environment, 2011. **19**(3): p. 637-676.
50. Brannigan R.P. and Dove A.P., *Synthesis, properties and biomedical applications of hydrolytically degradable materials based on aliphatic polyesters and polycarbonates*. Biomaterials Science, 2017. **5**(1): p. 9-21.
51. Gupta A. and Kumar V., *New emerging trends in synthetic biodegradable polymers– Polylactide: A critique*. European Polymer Journal, 2007. **43**(10): p. 4053-4074.
52. Arias V., Odelius K. and A.C. Albertsson, *Nano-Stereocomplexation of Polylactide (PLA) Spheres by Spray Droplet Atomization*. Macromolecular Rapid Communications, 2014. **35**(22): p. 1949-1953.
53. Barbosa J., et al., *Magnetically Controlled Drug Release System through Magnetomechanical Actuation*. Advanced Healthcare Materials, 2016. **5**(23): p. 3027-3034.

54. Ribeiro C., et al., *Surface roughness dependent osteoblast and fibroblast response on poly (l-lactide) films and electrospun membranes*. Journal of Biomedical Materials Research Part A, 2015. **103**(7): p. 2260-2268.
55. Correia D.M., et al., *Processing and size range separation of pristine and magnetic poly (l-lactic acid) based microspheres for biomedical applications*. Journal of Colloid and Interface Science, 2016. **476**: p. 79-86.
56. Herrero-Vanrell R., et al., *The potential of using biodegradable microspheres in retinal diseases and other intraocular pathologies*. Progress in Retinal and Eye Research, 2014. **42**: p. 27-43.
57. Dias J.C., et al., *Influence of fiber diameter and crystallinity on the stability of electrospun poly (L-lactic acid) membranes to hydrolytic degradation*. Polymer Testing, 2012. **31**(6): p. 770-776.
58. Pärssinen J., et al., *Enhancement of adhesion and promotion of osteogenic differentiation of human adipose stem cells by poled electroactive poly (vinylidene fluoride)*. Journal of Biomedical Materials Research Part A, 2015. **103**(3): p. 919-928.
59. Cartmell S.H., et al., *Development of magnetic particle techniques for long-term culture of bone cells with intermittent mechanical activation*. IEEE Transactions on NanoBioscience, 2002. **99**(2): p. 92-97.
60. Arias J.L., et al., *Tegafur loading and release properties of magnetite/poly (alkylcyanoacrylate)(core/shell) nanoparticles*. Journal of Controlled Release, 2008. **125**(1): p. 50-58.
61. Zhang X., et al., *Effects of surface modification on the properties of magnetic nanoparticles/PLA composite drug carriers and in vitro controlled release study*. Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects, 2013. **431**: p. 80-86.
62. Gil S., Castro E. and Mano J.F., *Synthesis and characterization of stable dicarboxylic pegylated magnetite nanoparticles*. Materials Letters, 2013. **100**: p. 266-270.
63. Gil S. and Mano J.F., *Magnetic composite biomaterials for tissue engineering*. Biomaterials Science, 2014. **2**(6): p. 812-818.
64. Cunha C., et al., *Hybrid composites made of multiwalled carbon nanotubes functionalized with Fe₃O₄ nanoparticles for tissue engineering applications*. Nanotechnology, 2012. **23**(46): p. 465102.
65. Walker L.M., et al., *Mechanical manipulation of bone and cartilage cells with 'optical tweezers'*. FEBS letters, 1999. **459**(1): p. 39-42.
66. Gonçalves R., et al., *Synthesis and size dependent magnetostrictive response of ferrite nanoparticles and their application in magnetoelectric polymer-based multiferroic sensors*. Journal of Materials Chemistry C, 2016. **4**(45): p. 10701-10706.
67. Pinheiro J.M.F., *Desenvolvimento e teste de um sistema para caracterização de materiais magnetoelétricos*. 2013.
68. Martins P. and Lanceros-Méndez S., *Polymer-based magnetoelectric materials*. Advanced Functional Materials, 2013. **23**(27): p. 3371-3385.
69. Gonçalves R.F., *High performance magnetoelectric nanocomposite morphologies for advanced applications*. 2017.

70. Bibes M. and Barthélémy A., *Multiferroics: Towards a magnetoelectric memory*. Nature Materials, 2008. **7**(6): p. 425-426.
71. Mano J.F., *Stimuli-responsive polymeric systems for biomedical applications*. Advanced Engineering Materials, 2008. **10**(6): p. 515-527.
72. Peppas N.A., *Biomedical applications of hydrogels handbook*. 2010: Springer Science & Business Media.
73. Qazi T.H., et al., *Biomaterials based strategies for skeletal muscle tissue engineering: existing technologies and future trends*. Biomaterials, 2015. **53**: p. 502-521.
74. El-Sherbiny I.M. and Yacoub M.H., *Hydrogel scaffolds for tissue engineering: Progress and challenges*. Global Cardiology Science and Practice, 2013. p. 38.
75. Kirschner C.M. and Anseth K.S., *Hydrogels in healthcare: from static to dynamic material microenvironments*. Acta materialia, 2013. **61**(3): p. 931-944.
76. Sun T.L., et al., *Physical hydrogels composed of polyampholytes demonstrate high toughness and viscoelasticity*. Nature Materials, 2013. **12**(10): p. 932-937.
77. Hoffman A.S., *Hydrogels for biomedical applications*. Advanced Drug Delivery Reviews, 2012. **64**: p. 18-23.
78. Hoare T.R. and D.S. Kohane, *Hydrogels in drug delivery: progress and challenges*. Polymer, 2008. **49**(8): p. 1993-2007.
79. Lee K.Y. and Mooney D.J., *Hydrogels for tissue engineering*. Chemical Reviews, 2001. **101**(7): p. 1869-1880.
80. Drury J.L. and Mooney D.J., *Hydrogels for tissue engineering: scaffold design variables and applications*. Biomaterials, 2003. **24**(24): p. 4337-4351.
81. Silva-Correia J., et al., *Biocompatibility Evaluation of Ionic-and Photo-Crosslinked Methacrylated Gellan Gum Hydrogels: In Vitro and In Vivo Study*. Advanced Healthcare Materials, 2013. **2**(4): p. 568-575.
82. Oliveira J.T., et al., *Injectable gellan gum hydrogels with autologous cells for the treatment of rabbit articular cartilage defects*. Journal of Orthopaedic Research, 2010. **28**(9): p. 1193-1199.
83. Silva-Correia J., et al., *Angiogenic potential of gellan-gum-based hydrogels for application in nucleus pulposus regeneration: in vivo study*. Tissue Engineering Part A, 2012. **18**(11-12): p. 1203-1212.
84. Hansmann J., et al., *Bioreactors in tissue engineering—principles, applications and commercial constraints*. Biotechnology Journal, 2013. **8**(3): p. 298-307.
85. Plunkett N. and O'Brien F.J., *Bioreactors in tissue engineering*. Technology and Health Care, 2011. **19**(1): p. 55-69.
86. Vunjak-Novakovic G., et al., *Effects of mixing on the composition and morphology of tissue-engineered cartilage*. AIChE Journal, 1996. **42**(3): p. 850-860.
87. Martin I., Wendt D. and M. Heberer, *The role of bioreactors in tissue engineering*. Trends in Biotechnology, 2004. **22**(2): p. 80-86.
88. Jasmund I. and Bader A., *Bioreactor developments for tissue engineering applications by the example of the bioartificial liver*. Tools and Applications of Biochemical Engineering Science, 2002: p. 99-109.

89. Clarke B., *Normal bone anatomy and physiology*. Clinical Journal of the American Society of Nephrology, 2008. **3**(Supplement 3): p. S131-S139.
90. Jiang Z. and Hua Y., *Hydrogen sulfide promotes osteogenic differentiation of human periodontal ligament cells via p38-MAPK signaling pathway under proper tension stimulation*. Archives of Oral Biology, 2016. **72**: p. 8-13.
91. Correia D.M., et al., *Electrosprayed poly (vinylidene fluoride) microparticles for tissue engineering applications*. Royal Society of Chemistry Advances, 2014. **4**(62): p. 33013-33021.
92. Gonçalves R., et al., *Development of magnetoelectric CoFe₂O₄/poly (vinylidene fluoride) microspheres*. Royal Society of Chemistry Advances, 2015. **5**(45): p. 35852-35857.
93. Cheng N.-C., et al., *Sustained release of adipose-derived stem cells by thermosensitive chitosan/gelatin hydrogel for therapeutic angiogenesis*. Acta Biomaterialia, 2017. **51**: p. 258-267.
94. Huang Y.-C., et al., *Fabrication of Novel Hydrogel with Berberine-Enriched Carboxymethylcellulose and Hyaluronic Acid as an Anti-Inflammatory Barrier Membrane*. BioMed Research International, 2016. **2016**.
95. Cereceres S., et al., *Chronic wound dressings based on collagen-mimetic proteins*. Advances in Wound Care, 2015. **4**(8): p. 444-456.
96. Gallagher A.G., et al., *Development of a Poly-ε-Lysine Contact Lens as a Drug Delivery Device for the Treatment of Fungal Keratitis*. Investigative Ophthalmology & Visual Science, 2017. **58**(11): p. 4499-4505.
97. Yan L.-P., et al., *Tumor growth suppression induced by biomimetic silk fibroin hydrogels*. Scientific Reports, 2016. **6**: p. 31037.
98. Smeriglio P., et al., *3D hydrogel scaffolds for articular chondrocyte culture and cartilage generation*. Journal of Visualized Experiments: JoVE, 2015(104).
99. Reitmaier S., et al., *In vivo biofunctional evaluation of hydrogels for disc regeneration*. European Spine Journal, 2014. **23**(1): p. 19-26.
100. Morais A., et al., *A one-step combined therapy for cartilage repair: development and performance assessment*. Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine, 2014. **8**: p. 205-205.
101. Morais A.J.S., et al. *10th World Biomaterials Congress: Development & performance assessment of a new ATMP for cartilage tissue engineering*. Frontiers. Montreal, Canada: 2016.
102. Francis L., et al., *Controlled delivery of gentamicin using poly (3-hydroxybutyrate) microspheres*. International Journal of Molecular Sciences, 2011. **12**(7): p. 4294-4314.
103. Sahoo S.K., et al., *Residual polyvinyl alcohol associated with poly (D, L-lactide-co-glycolide) nanoparticles affects their physical properties and cellular uptake*. Journal of Controlled Release, 2002. **82**(1): p. 105-114.
104. Reimer L., *Scanning electron microscopy: physics of image formation and microanalysis*. 2. ed. Springer Science and Business Media. Berlin, Germany: 2000.
105. Bhattacharjee S., *DLS and zeta potential—What they are and what they are not?* Journal of Controlled Release, 2016. **235**: p. 337-351.

106. Garlotta D., *A literature review of poly (lactic acid)*. Journal of Polymers and the Environment, 2001. **9**(2): p. 63-84.
107. Dorling K.M. and Baker M.J., *Highlighting attenuated total reflection Fourier transform infrared spectroscopy for rapid serum analysis*. Trends in Biotechnology, 2013. **31**(6): p. 327.
108. Mozgawa W., *The influence of some heavy metals cations on the FTIR spectra of zeolites*. Journal of Molecular Structure, 2000. **555**(1): p. 299-304.
109. Menczel J.D. and Prime R.B., *Thermal analysis of polymers: fundamentals and applications*. John Wiley & Sons. Hoboken, New Jersey: 2014.
110. Ribeiro C., et al., *Tailoring the morphology and crystallinity of poly (L-lactide acid) electrospun membranes*. Science and Technology of Advanced Materials, 2011. **12**(1): p. 015001.
111. Martínez E.C., et al., *Effect of poly (L-lactide) surface topography on the morphology of in vitro cultured human articular chondrocytes*. Journal of Materials Science: Materials in Medicine, 2007. **18**(8): p. 1627-1632.
112. Dawber M., Farnan I. and J. Scott, *A classroom experiment to demonstrate ferroelectric hysteresis*. American Journal of Physics, 2003. **71**(8): p. 819-822.
113. Sachdev S., *Handbook of magnetism and advanced magnetic materials*. John Wiley & Sons. New York: 2006.
114. Lin W., et al., *Two-dimensional magnetic field vector sensor based on tilted fiber Bragg grating and magnetic fluid*. Journal of Lightwave Technology, 2013. **31**(15): p. 2599-2605.
115. Cheng Y.-L. and Chen F., *Preparation and characterization of photocured poly (ϵ -caprolactone) diacrylate/poly (ethylene glycol) diacrylate/chitosan for photopolymerization-type 3D printing tissue engineering scaffold application*. Materials Science and Engineering: C, 2017. **81**: p. 66-73.
116. Riss T.L., et al., *Assay Guidance Manual: Cell viability assays*. Eli Lilly & Company and the National Center for Advancing Translational Sciences. Bethesda, Maryland: 2016.
117. Correia V., et al., *Design and validation of a biomechanical bioreactor for cartilage tissue culture*. Biomechanics and Modeling in Mechanobiology, 2016. **15**(2): p. 471-8.
118. Freitas M. and Marchetti J., *Nimesulide PLA microspheres as a potential sustained release system for the treatment of inflammatory diseases*. International Journal of Pharmaceutics, 2005. **295**(1): p. 201-211.
119. Krikorian V. and Pochan D.J., *Crystallization behavior of poly (L-lactic acid) nanocomposites: nucleation and growth probed by infrared spectroscopy*. Macromolecules, 2005. **38**(15): p. 6520-6527.
120. Kiflie Z., Piccarolo S. and Vassileva E., *Influence of physical cross-links in amorphous PET on room temperature ageing*. Macromolecular Symposia, 2002. **185**: p. 11514.
121. Jing N., et al., *Attenuated total reflectance/Fourier transform infrared (ATR/FTIR) mapping coupled with principal component analysis for the study of in vitro degradation of porous polylactide/hydroxyapatite composite material*. Analytical Methods, 2014. **6**(15): p. 5590-5595.

122. Zhang J., et al., *Weak intermolecular interactions during the melt crystallization of poly (L-lactide) investigated by two-dimensional infrared correlation spectroscopy*. The Journal of Physical Chemistry B, 2004. **108**(31): p. 11514-11520.
123. Vasanthan N. and Ly O., *Effect of microstructure on hydrolytic degradation studies of poly (l-lactic acid) by FTIR spectroscopy and differential scanning calorimetry*. Polymer Degradation and Stability, 2009. **94**(9): p. 1364-1372.
124. Pan P., et al., *Polymorphic transition in disordered poly (L-lactide) crystals induced by annealing at elevated temperatures*. Macromolecules, 2008. **41**(12): p. 4296-4304.
126. Martins P., et al., *On the origin of the electroactive poly (vinylidene fluoride) β -phase nucleation by ferrite nanoparticles via surface electrostatic interactions*. CrystEngComm, 2012. **14**(8): p. 2807-2811.
127. Lasoń E., Sikora E. and Ogonowski J., *Influence of process parameters on properties of Nanostructured Lipid Carriers (NLC) formulation*. Acta Biochimica Polonica, 2013. **60**(4): p. 773-777.
128. Ruan G. and Feng S-S., *Preparation and characterization of poly (lactic acid)-poly (ethylene glycol)-poly (lactic acid)(PLA-PEG-PLA) microspheres for controlled release of paclitaxel*. Biomaterials, 2003. **24**(27): p. 5037-5044.
129. Lazzari S., et al., *Colloidal stability of polymeric nanoparticles in biological fluids*. Journal of Nanoparticle Research, 2012. **14**(6): p. 920.
130. Chen W., et al., *Magnetic and conducting particles: preparation of polypyrrole layer on Fe 3 O 4 nanospheres*. Applied Surface Science, 2003. **218**(1): p. 216-222.
131. Nunes-Pereira J., et al., *Nanodiamonds/poly (vinylidene fluoride) composites for tissue engineering applications*. Composites Part B: Engineering, 2017. **111**: p. 37-44.