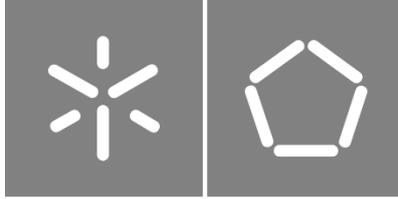


Universidade do Minho
Escola de Engenharia

Marta de Faria Rego e Bento Soares

Avaliação do potencial de materiais eletricamente ativos para o combate ao cancro muscular



Universidade do Minho

Escola de Engenharia

Marta de Faria Rego e Bento Soares

**Avaliação do potencial de materiais
eletricamente ativos para o combate ao
cancro muscular**

Dissertação de Mestrado
Mestrado Integrado em Engenharia Biomédica
Biomateriais, Reabilitação e Biomecânica

Trabalho realizado sob orientação do
Professor Doutor João Paulo Flores Fernandes
e do
Professor Doutor Senentxu Lanceros-Mendez

DIREITOS DE AUTOR E CONDIÇÕES DE UTILIZAÇÃO DO TRABALHO POR TERCEIROS

Este é um trabalho académico que pode ser utilizado por terceiros desde que respeitadas as regras e boas práticas internacionalmente aceites, no que concerne aos direitos de autor e direitos conexos. Assim, o presente trabalho pode ser utilizado nos termos previstos na licença abaixo indicada. Caso o utilizador necessite de permissão para poder fazer um uso do trabalho em condições não previstas no licenciamento indicado, deverá contactar o autor, através do RepositóriUM da Universidade do Minho.



Atribuição-NãoComercial-SemDerivações
CC BY-NC-ND

<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>

Agradecimentos

Esta dissertação foi o fruto de um longo ano de trabalho e envolveu a contribuição de várias pessoas, tanto a nível profissional como pessoal, às quais não podia deixar de expressar a minha profunda gratidão.

Primeiramente, gostaria de agradecer aos meus orientadores, Professor Doutor João Paulo Flores Fernandes e Professor Doutor Senentxu Lanceros-Mendez, por aceitarem a orientação deste projeto. Um enorme obrigada ao Professor Doutor Senentxu Lanceros-Mendez pela oportunidade de integrar este fantástico grupo, por possibilitar a minha ida para a Alemanha no âmbito do projeto Erasmus (ainda que a minha estadia tenha sido interrompida devido à pandemia) e pela motivação para atingir os meus objetivos.

De seguida, gostaria de reconhecer a importância da contribuição da Doutora Clarisse Ribeiro, que me acompanhou ao longo de todas as etapas, partilhou imenso conhecimento e sempre mostrou disponibilidade para me ajudar. Um sincero obrigada pelos conselhos e pela dedicação, pois estes tiveram um grande impacto no desenvolvimento deste projeto.

Gostaria também de agradecer a todo o grupo *Electroactive Smart Materials* pela ajuda que prestaram e pelo excelente ambiente de trabalho. Particularmente, agradeço à Rafaela pela simpatia, pelo acompanhamento e por todo o tempo disponibilizado no decorrer deste projeto. Também não poderia deixar de agradecer à Anabel pelo auxílio na tomada de certas decisões, mas acima de tudo, pelo companheirismo e boa disposição.

A todos os meus amigos, obrigado pela amizade e pelos bons momentos, os quais foram essenciais para me abstrair das preocupações e enfrentar as adversidades que iam surgindo com ânimo e otimismo.

Um agradecimento especial ao meu namorado António por todo o carinho, compreensão, paciência e amor demonstrados sobretudo neste ano. Para além de ser uma pessoa extremamente amável, sempre foi um colega excepcional, que me acompanhou durante todo o percurso universitário. Obrigado por estares sempre presente, principalmente nos momentos mais difíceis.

Por fim, gostaria de agradecer profundamente à minha mãe Rosa e à minha irmã Rita, pelo incentivo, afeto e apoio incondicional manifestado em todas as fases da minha vida. Sem elas, nenhuma das minhas conquistas pessoais e profissionais seriam possíveis.

DECLARAÇÃO DE INTEGRIDADE

Declaro ter atuado com integridade na elaboração do presente trabalho académico e confirmo que não recorri à prática de plágio nem a qualquer forma de utilização indevida ou falsificação de informações ou resultados em nenhuma das etapas conducente à sua elaboração.

Mais declaro que conheço e que respeitei o Código de Conduta Ética da Universidade do Minho.

Resumo

As metodologias atuais de tratamento de cânceros como o rhabdomyosarcoma (RMS) apresentam algumas limitações, tendo demonstrado ser pouco eficientes a prevenir a ocorrência de metástases e recidivas em alguns casos. Uma estratégia que tem sido investigada para combater o câncer é a aplicação de estímulos físicos, uma vez que estes são capazes de abrandar a proliferação de algumas células cancerígenas. Com esta finalidade, a utilização de materiais eletroativos, em particular os eletromecânicos, pode ser favorável e prática, pois estes permitem que a estimulação das células seja feita de forma localizada e pouco invasiva.

Nesta dissertação, foram produzidos filmes de poli(fluoreto de vinilideno) (PVDF) e poli(fluoreto de vinilideno-co-trifluoretileno) (P(VDF-TrFE)) com diferentes concentrações de nanopartículas de magnetite (Fe_3O_4) e ferrites de cobalto (CoFe_2O_4). Adicionalmente, foram fabricadas fibras de PVDF não orientadas e fibras de PVDF orientadas com e sem nanopartículas de Fe_3O_4 . Todos estes materiais foram caracterizados a nível morfológico, físico-químico, térmico, mecânico e magnético. Por fim, o efeito dos materiais desenvolvidos no comportamento das células de RMS (linha celular RD) foi avaliado através de ensaios celulares em condições estáticas e dinâmicas.

Com base na caracterização morfológica, verificou-se que os filmes apresentam uma estrutura compacta sem poros e que o alinhamento das fibras e a incorporação de nanopartículas nas mesmas induziu uma diminuição do seu diâmetro. A avaliação físico-química demonstrou que os filmes possuem uma fração da fase eletroativa β ($\approx 30\%$) inferior às fibras (80-90%). A partir da análise térmica e mecânica, comprovou-se que a incorporação de nanopartículas provocou uma ligeira diminuição da estabilidade térmica e um aumento do módulo de Young dos materiais. A caracterização magnética revelou que as nanopartículas de Fe_3O_4 são superparamagnéticas, as nanopartículas de CoFe_2O_4 são ferromagnéticas e estas possuem magnetizações de saturação de 68,3 e 59,4 emu/g, respetivamente.

Os ensaios celulares nos filmes demonstraram que a aplicação de estímulos mecânicos e/ou elétricos promoveu a proliferação celular. Nos filmes de PVDF, não existem diferenças significativas na resposta celular aos diferentes estados de polarização. Nos filmes compósitos, a incorporação de uma maior quantidade de nanopartículas resultou num aumento mais acentuado do crescimento celular. Nas fibras, observou-se que as células de RMS aderiram a todas as amostras. Porém, a adesão foi superior nas fibras não orientadas. Desta forma, comprovou-se que os materiais eletroativos desenvolvidos e os estímulos físicos por eles fornecidos têm a capacidade de influenciar o comportamento das células de RMS, revelando ter um efeito proliferativo neste tipo de células.

Palavras chave: Câncer, Microambiente celular, Nanopartículas magnéticas, Poli(fluoreto de vinilideno).

Abstract

The current treatment approaches for cancers such as rhabdomyosarcoma (RMS) present some limitations and have shown to lack efficiency in preventing the occurrence of metastasis and relapses in some cases. A strategy that has been investigated to combat cancer is the application of physical stimuli as those can slow down the proliferation of some cancer cells. For this purpose, the use of electroactive materials can be beneficial and practical since these materials allow the stimulation of cells to be local and minimally invasive.

In the present work, poly(vinylidene fluoride) (PVDF) and poly(vinylidene fluoride-co-trifluoroethylene) (P(VDF-TrFE)) films with different concentrations of magnetite nanoparticles (Fe_3O_4) and cobalt ferrites (CoFe_2O_4) were produced. Additionally, non-oriented PVDF fibers and oriented PVDF fibers with and without Fe_3O_4 nanoparticles were fabricated. All these materials were subjected to morphological, physical-chemical, thermal, mechanical and magnetic characterizations. Lastly, the effect of the developed materials on the behaviour of RMS cells (RD cell line) was evaluated through static and dynamic cellular assays.

The morphological characterization showed that the films have a compact structure without pores and the fibers alignment and the incorporation of nanoparticles in them induced a decrease in their diameter. The physical-chemical assessment demonstrated that the films possess a smaller electroactive β phase content ($\approx 30\%$) than the fibers (80-90%). Through thermal and mechanical analysis, it was confirmed that the incorporation of nanoparticles caused a reduction in the thermal stability and an increase in the Young modulus of the materials. The magnetic characterization revealed that the Fe_3O_4 nanoparticles are superparamagnetic, the CoFe_2O_4 nanoparticles are ferromagnetic and those have a saturation magnetization of 68,3 and 59,4 emu/g, respectively.

The cellular assays performed on the films demonstrated that the application of mechanical and mechano-electrical stimuli promoted the proliferation of RMS cells. Regarding the PVDF films, there were not significant variation in the cellular response to the different states of polarization. In terms of the composite films, the incorporation of a higher quantity of nanoparticles resulted in a greater increase of cell growth. Concerning the fibers, it was observed that the cells adhered to all samples. However, the cell adhesion was superior in the non-oriented fibers. Therefore, it was shown that the developed electroactive materials and the physical stimuli provided by them have the ability to influence the behaviour of RMS cells, revealing that they have a proliferative effect in this type of cells.

Keywords: Cancer, Cell microenvironment, Magnetic nanoparticles, Poly(vinylidene fluoride).

Índice

Agradecimentos	iii
Resumo	v
Abstract	vi
Lista de Figuras	ix
Lista de Tabelas.....	xii
Lista de Acrónimos	xiii
Lista de Símbolos	xv
1. Introdução	1
1.1. Contextualização.....	1
1.2. Objetivos e metodologia.....	2
1.3. Organização da dissertação	3
2. Estado da arte	5
2.1. Morfologia do músculo esquelético.....	5
2.2. Rabdomiossarcoma	6
2.3. Engenharia de tecidos	9
2.4. Biomateriais.....	12
2.4.1. Polímeros eletroativos.....	13
2.4.2. Compósitos magnetoelétricos	18
2.5. Biorreatores	21
2.6. Estudos relevantes	23
3. Materiais e Métodos.....	30
3.1. Materiais	30
3.2. Métodos	30
3.2.1. Processamento dos materiais eletroativos.....	30

3.2.1.1. <i>Solvent casting</i>	30
3.2.1.2. <i>Electrospinning</i>	32
3.2.2. Caracterização dos materiais produzidos.....	37
3.2.2.1. Microscopia eletrônica de varrimento.....	37
3.2.2.2. Medição do ângulo de contacto.....	40
3.2.2.3. Espetroscopia de infravermelho com transformadas de Fourier.....	41
3.2.2.4. Calorimetria diferencial de varrimento.....	43
3.2.2.5. Análise termogravimétrica.....	46
3.2.2.6. Ensaio mecânicos.....	48
3.2.2.7. Magnetometria de amostra vibrante.....	52
3.2.3. Avaliação da resposta celular.....	56
3.2.3.1. Esterilização das amostras.....	56
3.2.3.2. Cultura celular.....	56
3.2.3.3. Ensaio de proliferação celular.....	57
3.2.3.4. Microscopia de fluorescência.....	58
3.2.3.5. Ensaio de adesão celular.....	59
4. Resultados e discussão.....	60
4.1. Morfologia.....	60
4.2. Molhabilidade.....	63
4.3. Propriedades físico-químicas.....	64
4.4. Propriedades térmicas.....	67
4.5. Propriedades mecânicas.....	71
4.4. Propriedades magnéticas.....	75
4.5. Resposta celular.....	77
5. Conclusões e trabalhos futuros.....	83
Referências bibliográficas.....	87

Lista de Figuras

Figura 2.1. Representação da estrutura fibrilar hierárquica do músculo esquelético	6
Figura 2.2. Imagem histológica obtida através de microscopia ótica após marcação com miogenina de células de rabdomyosarcoma embrionário (a) e rabdomyosarcoma alveolar (b)	7
Figura 2.3. Esquema da tríade de engenharia de tecidos: os scaffolds funcionam como plataforma para a formação do novo tecido, promovendo a adesão, proliferação e diferenciação das células nele depositadas, através de estímulos bioquímicos e/ou biofísicos.	10
Figura 2.4. Representação esquemática do efeito piezoelétrico direto e inverso.....	15
Figura 2.5. Estrutura química do PVDF	16
Figura 2.6. Representação das conformações das cadeias na fase α e β	16
Figura 2.7. Estrutura química do P(VDF-TrFE).....	17
Figura 2.8. Representação das diferentes configurações dos compósitos magnetoelétricos	19
Figura 2.9. Representação de alguns biorreatores utilizados para garantir a circulação de meio pelos materiais de suporte celular, os quais incluem sistemas de agitação, sistemas de rotação ou sistemas de perfusão.....	22
Figura 3.1. Esquema das etapas da produção de filmes poliméricos por <i>solvent casting</i>	31
Figura 3.2. Esquema do sistema de <i>electrospinning</i> utilizado para a produção de fibras não orientadas e orientadas.....	33
Figura 3.3. Esquema de um equipamento de SEM e respetivos constituintes.....	38
Figura 3.4. Representação do ângulo de contacto de uma gota numa superfície sólida	40
Figura 3.5. Representação dos diferentes tipos de vibração de uma molécula quando é exposta a radiação infravermelha.....	41
Figura 3.6. Diagrama do funcionamento de um espectrofotómetro de FTIR	42

Figura 3.7. Esquema de um instrumento de DSC com compensação de potência	44
Figura 3.8. Representação das possíveis transições de um material polimérico numa curva de DSC..	45
Figura 3.9. Esquema de um equipamento de TGA	47
Figura 3.10. Exemplo de um termograma de TGA e respetiva derivada, obtidos a partir do aquecimento de um material polimérico.	47
Figura 3.11. Esquema do equipamento utilizado para os ensaios mecânicos.....	48
Figura 3.12. Curva de tensão-deformação típica de um material polimérico obtida a partir de um ensaio de tração	50
Figura 3.13. Esquema do tipo de ensaio mecânico dinâmico realizado e da variação da deformação durante os ciclos.....	51
Figura 3.14. Curva de histerese de um material viscoelástico comparativamente à curva de um material perfeitamente elástico	52
Figura 3.15. Esquema de uma parte do equipamento de VSM	53
Figura 3.16. Curva de magnetização típica de um material ferromagnético, paramagnético e superparamagnético	54
Figura 3.17. Representação esquemática dos ensaios celulares realizados em condições estáticas e dinâmicas.....	58
Figura 4.1. Imagens de SEM dos cortes transversais dos filmes com uma ampliação de x2,5k.....	60
Figura 4.2. Imagens de SEM das suas superfícies no modo BSE com uma ampliação de x2,0k	61
Figura 4.3. Imagens de SEM das fibras com uma ampliação de x500 e histogramas de distribuição dos seus diâmetros, respetivamente	62
Figura 4.4. Imagens de SEM no modo BSE das fibras PVDF/10FO O com uma ampliação de x1,5k e x5,0k	63
Figura 4.5. Ângulos de contacto das diferentes amostras.....	64

Figura 4.6. Espectros de FTIR-ATR dos filmes e das fibras	65
Figura 4.7. Curvas de DSC dos filmes e das fibras.....	68
Figura 4.8. Curvas de TGA dos filmes e das fibras.....	69
Figura 4.9. Curvas de tensão-deformação dos filmes e das fibras	71
Figura 4.10. Curvas de tensão-deformação e evolução do módulo de Young e da energia dissipada ao longo dos ciclos de tração uniaxial com uma amplitude de 2% de deformação aplicados nas fibras O. ..	73
Figura 4.11. Curvas de magnetização das amostras com nanopartículas de FO e CFO, assim como das respectivas nanopartículas puras.	75
Figura 4.12. Proliferação celular das células RD cultivadas nos filmes de PVDF com diferentes estados de polarização, após 72 h de cultura em condições estáticas e dinâmicas (biorreator mecânico)	78
Figura 4.13. Ensaios de imunocitoquímica em células RD cultivadas nos filmes de PVDF com diferentes estados de polarização, após 72 h de cultura em condições estáticas e dinâmicas (biorreator mecânico).	79
Figura 4.14. Proliferação celular das células RD cultivadas nos diferentes filmes compósitos produzidos, após 72 h de cultura em condições estáticas e dinâmicas (biorreator magnético).....	80
Figura 4.15. Adesão celular das células RD cultivadas nas fibras produzidas, após 24 h de cultura em condições estáticas	82

Lista de Tabelas

Tabela 2.1. Sumário dos estudos mais relevantes no contexto desta dissertação	23
Tabela 3.1. Designação e composição dos filmes produzidos por solvent casting.....	32
Tabela 3.2. Efeito dos parâmetros de electrospinning na morfologia das fibras	34
Tabela 3.3. Designação, composição e orientação das fibras produzidas por electrospinning.....	37
Tabela 4.1. Bandas de absorção características do PVDF puro presentes nos espectros amostras.....	65
Tabela 4.2. Fração de fase β das diferentes amostras.	66
Tabela 4.3. Temperatura de fusão (T_f), variação de entalpia (ΔH) e grau de cristalinidade (X_c) das diferentes amostras.....	69
Tabela 4.4. Temperatura inicial de degradação (T_{onset}) e percentagem da massa final das diferentes amostras.....	70
Tabela 4.5. Módulo de Young (E) das diferentes amostras.	72
Tabela 4.6. Magnetização de saturação (M_s), percentagem real de nanopartículas (%(p/p) real) e eficiência de imobilização das diferentes amostras.....	77

Lista de Acrónimos

ATR	Reflexão total atenuada (do inglês <i>Attenuated Total Reflectance</i>)
ARMS	Rabdomiossarcoma alveolar
BSE	Elétrões retrodifundidos (do inglês <i>Backscattered Electrons</i>)
CFO	CoFe_2O_4
COG	North American Children's Oncology Group
CT	Tomografia computadorizada (do inglês <i>Computed Tomography</i>)
DAPI	Dihidrocloreto de 4,6-diamidino-2-fenilindole
DMEM	Meio de Eagle modificado por Dulbecco (do inglês <i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>)
DSC	Calorimetria diferencial de varrimento (do inglês <i>Differential Scanning Calorimetry</i>)
DSPE-PEG	1,2-distearoil-snglicero-3-fosfatidiletanolamina-N-[metoxi(polietilenoglicol)-5000]
EpSSG	European Soft tissue Sarcoma Group
ERMS	Rabdomiossarcoma embrionário
EUA	Estados Unidos da América
FBS	Soro fetal bovino (do inglês <i>Fetal Bovine Serum</i>)
FITC	Isiotiocianato de fluoresceína (do inglês <i>Fluorescein Isothiocyanate</i>)
FO	Fe_3O_4
FTIR	Espectroscopia de infravermelho com transformadas de Fourier (do inglês <i>Fourier Transform Infrared Spectroscopy</i>)
IVA	Ifosfamida Vincristina Actinomicina D
LMS	Leiomiiossarcoma
MRI	Ressonância magnética (do inglês <i>Magnetic Resonance Imaging</i>)

MTS	3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazolium
PBS	Tampão de fosfato alcalino (do inglês <i>Phosphate Buffered Saline</i>)
PLGA	Poli(ácido lático-co-ácido glicólico)
P/S	Penicilina/estreptomicina
PVDF	Poli(fluoreto de vinilideno)
P(VDF-TrFE)	Poli(fluoreto de vinilideno-co-trifluoretileno)
RMS	Rabdomiossarcoma
SEM	Microscopia eletrônica de varrimento (do inglês <i>Scanning Electron Microscope</i>)
TGA	Análise termogravimétrica (do inglês <i>Thermogravimetric Analysis</i>)
UV	Radiação ultravioleta
VAC	Vincristina Actinomicina Ciclofosfamida
VSM	Magnetometria de amostra vibrante (do inglês <i>Vibrating Sample Magnetometer</i>)

Lista de Símbolos

A_{α}	Absorção a 763 cm^{-1}
A_{β}	Absorção a 840 cm^{-1}
E	Módulo de Young
F	Força
$F(\beta)$	Fração de fase β
H_C	Campo coercivo
K_{α}	Coefficiente de absorção a 763 cm^{-1}
K_{β}	Coefficiente de absorção a 840 cm^{-1}
l_0	Comprimento inicial
M_R	Magnetização remanescente
M_S	Magnetização de saturação
T_c	Temperatura de cristalização
T_f	Temperatura de fusão
T_g	Temperatura de transição vítrea
T_{onset}	Temperatura inicial de degradação
ΔH_c	Entalpia de transição da cristalização
ΔH_f	Entalpia de transição da fusão
ΔH_{100}	Entalpia de fusão docopolímero 100% cristalino

ΔH_{β}	Entalpia de fusão de uma amostra 100% cristalina na fase β
ΔX_c	Grau de cristalinidade
Δl	Variação do comprimento
ε	Deformação
σ	Tensão

1. Introdução

1.1. Contextualização

O cancro é uma doença associada a uma taxa de mortalidade alarmantemente elevada, sendo a principal causa de morte em diversos países desenvolvidos. O rhabdomiossarcoma (RMS) é um tipo de cancro que afeta o tecido muscular esquelético e se manifesta quase exclusivamente em crianças. Os tumores de RMS consistem num aglomerado de células precursoras musculares incapazes de sofrer diferenciação e que se proliferam indefinidamente. A metodologia atual de tratamento consiste na administração de quimioterapia, seguida de terapia local sob a forma de cirurgia e radioterapia. Porém, como a proliferação incontrolada destas células cancerígenas induz o alastramento rápido desta patologia, o tratamento do RMS a longo prazo é extremamente difícil. Consequentemente, o surgimento de metástases e a ocorrência de relapsos é bastante frequente. Para além dos problemas relacionados com a eficácia do tratamento em vigor, as abordagens terapêuticas implementadas atualmente estão associadas a vários efeitos nefastos, particularmente pelo facto das crianças serem a população mais afetada por este tipo de cancro e essas terapias poderem afetar o seu desenvolvimento. Por estas razões, a investigação de novas metodologias de tratamento de cancros como o RMS, que sejam mais eficazes e minimizem os impactos nocivos no organismo, é uma área com elevado interesse económico e social.

Uma estratégia promissora é o desenvolvimento de uma terapia com base nos conceitos da engenharia de tecidos, visto que estas estratégias possibilitam a modulação do comportamento celular através da implementação de estruturas que funcionam como suporte (denominadas *scaffolds*) e da aplicação de estímulos bioquímicos ou biofísicos. Para tal, o material de suporte celular deve ter determinadas propriedades morfológicas, mecânicas, biofísicas e bioquímicas para assegurar uma boa interação material-célula. Essas propriedades estão intimamente relacionadas com a escolha do biomaterial utilizado para o fabrico do *scaffold*.

Os materiais eletroativos são uma categoria de materiais que tem sido bastante explorada na área de engenharia de tecidos, uma vez que permitem que a estimulação das células seja feita a partir do próprio material de suporte (microambiente eletroativo). Esta abordagem é mais localizada, menos invasiva e mais prática do que os métodos de estimulação convencionais, pois exclui a necessidade de instrumentos como eléctrodos e cabos de alimentação. Adicionalmente, a estimulação proveniente de

materiais eletroativos tem demonstrado ter imenso potencial, influenciando diversos processos celulares como a adesão, proliferação e diferenciação.

Dos vários tipos de materiais eletroativos, os materiais piezoelétricos destacam-se pela facilidade de controlo da sua polarização através da aplicação de esforços mecânicos e vice-versa. Os polímeros piezoelétricos são os mais utilizados devido à sua facilidade de processamento, flexibilidade, maior disponibilidade e elevada reprodutibilidade. Contudo, uma limitação do uso de materiais piezoelétricos como fonte de estímulos é a impraticabilidade da aplicação de esforços mecânicos em certos cenários, tanto *in vivo* e como *in vitro*. Por isso, começaram a ser investigadas alternativas de controlar remotamente a estimulação celular proporcionada pelos polímeros piezoelétricos, concluindo-se que os compósitos magnetoelétricos são uma boa opção. Estes compósitos podem ser obtidos através da introdução de nanopartículas magnetostritivas em matrizes poliméricas piezoelétricas, o que possibilita o controlo do efeito piezoelétrico do polímero a partir de campos magnéticos. Quer nos polímeros piezoelétricos, quer nos compósitos magnetoelétricos, o estudo *in vitro* da influência dos seus estímulos no comportamento de um certo tecido requer a utilização de biorreatores capazes de manipular essa estimulação.

Tendo em consideração que alguns estudos comprovaram que a aplicação de estímulos físicos em células cancerígenas pode inibir a sua proliferação e assim melhorar o desempenho da quimioterapia, o principal foco desta dissertação é a análise do impacto da estimulação física proveniente de polímeros piezoelétricos e compósitos magnetoelétricos no comportamento de uma linha celular de RMS, com o intuito de determinar se os materiais eletroativos podem ser uma ferramenta auxiliar no combate ao cancro muscular.

1.2. Objetivos e metodologia

A principal finalidade desta dissertação é o desenvolvimento de materiais eletroativos com diferentes morfologias para estudar o seu efeito no comportamento de células de RMS de forma a explorar a viabilidade destes materiais para o desenvolvimento de novas abordagens terapêuticas. Para tal, definiram-se os seguintes objetivos:

- Desenvolvimento do estado da arte relativo ao rabiomiossarcoma e as suas metodologias de tratamento atuais, à engenharia de tecidos e as propriedades ideais dos *scaffolds*, aos materiais eletroativos e aos biorreatores que têm sido explorados ultimamente;

- Produção de materiais de suporte celular na forma de filmes e fibras através de *solvent casting* e *electrospinning*, respetivamente, utilizando polímeros piezoelétricos e compósitos magnetoelétricos;
- Caracterização dos filmes e das fibras a nível morfológico, físico-químico, térmico, mecânico e magnético;
- Avaliação da influência dos materiais desenvolvidos na resposta celular de uma linha de RMS em condições estáticas e dinâmicas, recorrendo a um biorreator mecânico e a um biorreator magnético.

1.3. Organização da dissertação

Para cumprir os objetivos definidos anteriormente, foram realizadas várias etapas, tendo-se iniciado por uma pesquisa bibliográfica, seguida da concretização das atividades laboratoriais. As informações teóricas mais pertinentes, os procedimentos executados, os resultados obtidos e as conclusões foram apresentadas em diferentes capítulos para facilitar a leitura. Desta forma, esta dissertação encontra-se organizada em cinco capítulos, os quais vão ser sumarizados de seguida.

Capítulo 1: Introdução

No primeiro capítulo, é feita uma contextualização da problemática que motivou a realização desta investigação, assim como uma breve descrição das abordagens atuais e das alternativas que têm demonstrado ter potencial. De seguida, é definida a principal finalidade deste projeto, os objetivos que se pretendem cumprir e a metodologia para os atingir. Por último, é apresentada a estrutura da dissertação e um breve resumo de cada um dos capítulos.

Capítulo 2: Estado da arte

No segundo capítulo, é feita uma revisão bibliográfica acerca dos temas mais importantes no âmbito deste projeto. Este encontra-se dividido em vários subcapítulos que contemplam conceitos relativos à morfologia do músculo esquelético, ao rabiomiossarcoma e as suas metodologias de tratamento atuais, à engenharia de tecidos e as propriedades ideais dos *scaffolds*, aos biomateriais disponíveis e aos biorreatores que têm sido explorados ultimamente. No último subcapítulo, são discutidos os estudos mais relevantes no contexto do presente trabalho.

Capítulo 3: Materiais e Métodos

No terceiro capítulo, são referidos os materiais utilizados e os procedimentos adotados durante todas as atividades laboratoriais, desde a preparação e caracterização dos materiais à avaliação da sua resposta celular. Para facilitar a interpretação dos resultados obtidos, são explicados os princípios de funcionamento das técnicas de processamento e de caracterização implementadas, bem como os métodos de análise do comportamento celular.

Capítulo 4: Resultados e Discussão

No quarto capítulo, são apresentados os resultados obtidos a partir da caracterização dos materiais e dos ensaios celulares. Para além disso, estes resultados são discutidos e comparados com o conhecimento pré-existente na literatura.

Capítulo 5: Conclusões

Por fim, no quinto capítulo, são resumidas as conclusões mais relevantes e propostas sugestões de trabalhos a realizar no futuro, de forma a complementar o que foi feito neste projeto.

2. Estado da arte

2.1. Morfologia do músculo esquelético

O corpo humano é constituído por uma variedade de músculos responsáveis por assegurar o movimento dos membros, a manutenção de uma postura correta, o funcionamento dos órgãos e a circulação de sangue. O músculo é um tecido mole altamente especializado capaz de sofrer contrações, alterando assim a sua forma e comprimento. Este tecido deriva da camada mesodermal das células do embrião e é formado através de um processo denominado miogénese [1].

É possível distinguir três tipos de músculo: o músculo liso, o músculo cardíaco e o músculo esquelético. O músculo liso encontra-se nos olhos e nas paredes de órgãos internos como os vasos sanguíneos, a bexiga, o útero e os órgãos do sistema digestivo. Estes músculos são controlados pelo sistema nervoso autónomo e, por isso, estão associados a uma contração involuntária [2]. Como o próprio nome indica, o músculo cardíaco localiza-se nas paredes do coração e tem como função manter o ritmo cardíaco, assim como o bombeamento do sangue para os vasos sanguíneos. Também é controlado pelo sistema nervoso autónomo, apresentando uma contração involuntária [2]. Por último, o músculo esquelético está ligado aos ossos através dos tendões e é controlado voluntariamente. Este tipo de músculo é responsável pelos movimentos do esqueleto e é considerado o órgão efetor do sistema locomotor [3]. O músculo esquelético e o músculo cardíaco são descritos como músculos estriados devido à sua aparência estriada quando observados ao microscópio. Essa aparência resulta da organização dos elementos contráteis subcelulares.

O músculo esquelético é constituído por células alongadas multinucleadas que se formam a partir da fusão dos mioblastos, as células precursoras do tecido muscular [1]. A disposição dessas células dá origem à estrutura fibrilar do músculo esquelético. Este possui várias unidades que estão organizadas de forma hierárquica (Figura 2.1): os miofilamentos, os sarcómeros, as miofibrilas, as fibras musculares e os fascículos [2]. As células musculares são compostas por miofilamentos de actina e miosina. Um conjunto desses miofilamentos dá origem a um sarcómero, a unidade contrátil. As miofibrilas são formadas por vários sarcómeros e possuem um diâmetro de 1-2 μm . As fibras musculares, por sua vez, são constituídas por múltiplas miofibrilas e possuem um diâmetro que pode variar entre 10 e 100 μm . A maior unidade do músculo é o fascículo, composto por várias fibras musculares [2]. O sarcómero é

composto por dois tipos de filamentos: os filamentos finos de actina (5 nm de diâmetro) e os filamentos grossos de miosina (15 nm de diâmetro) [2]. A organização destas proteínas filamentosas dá origem ao padrão estriado das fibras musculares.

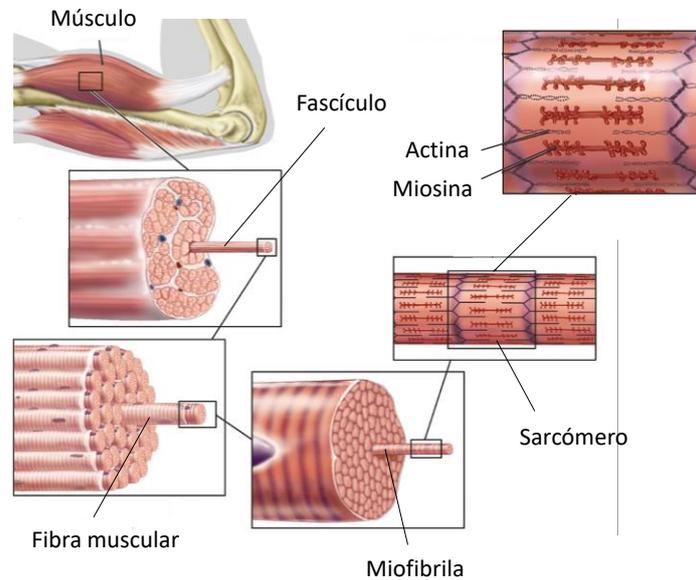


Figura 2.1. Representação da estrutura fibrilar hierárquica do músculo esquelético. Adaptada de [2].

2.2. Rbdomiossarcoma

O mioossarcoma é uma forma de cancro que afeta o músculo e corresponde a um tumor maligno derivado de células precursoras musculares [4]. Este possui duas variantes, o leiomiossarcoma (LMS) e o rbdomiiossarcoma (RMS), cuja diferença entre elas é o tipo de músculo que afeta. O LMS afeta as células precursoras do músculo liso, enquanto que o RMS afeta as células precursoras do músculo esquelético [4].

O RMS é a variante do mioossarcoma mais agressiva e está associado a um pior prognóstico [4], razão pela qual o desenvolvimento de novas terapias que atuem neste tipo de cancro é essencial. Este consiste num neoplasma de rbdomioblastos, células com características comuns às células precursoras do tecido muscular esquelético, mas que são incapazes de escapar o ciclo celular e se diferenciar, proliferando-se indefinidamente [5]. Por isso, estas células são incapazes de formar miotubos e originar a estrutura fibrosa característica do músculo esquelético.

Apesar de ser uma doença rara em adultos, o RMS corresponde a 5% dos cânceros em crianças e, mais especificamente, a aproximadamente 50% dos casos de sarcomas dos tecidos moles em pacientes dessa faixa etária [6]. A sua incidência média é, com base num estudo realizado nos Estados Unidos da América (EUA), cerca de 4,5 casos por milhão de indivíduos com idade inferior a 20 anos, o que equivale a cerca de 350 novos casos por ano [6]. A incidência do RMS aparenta ser semelhante na Europa, mas é inferior em alguns países da Ásia como o Japão, a Índia e a China [6].

Com base nas características histológicas do RMS, observáveis através de microscopia ótica, é possível distinguir dois subtipos: o RMS alveolar (ARMS), no qual as células se encontram distribuídas em redor de um espaço aberto central, e o RMS embrionário (ERMS), no qual as células parecem mioblastos esqueléticos imaturos [6]. O ERMS (Figura 2.2a) é o subtipo com maior incidência, afetando principalmente crianças nos primeiros 5 anos de vida, e costuma surgir na cabeça, pescoço, bexiga, vagina, testículos ou próstata [5]. O ARMS (Figura 2.2b), por sua vez, é mais comum em adolescentes e costuma surgir nos músculos do tronco, braços e pernas. Existe ainda outro subtipo, o RMS pleomórfico, cuja natureza é pouco compreendida [6].

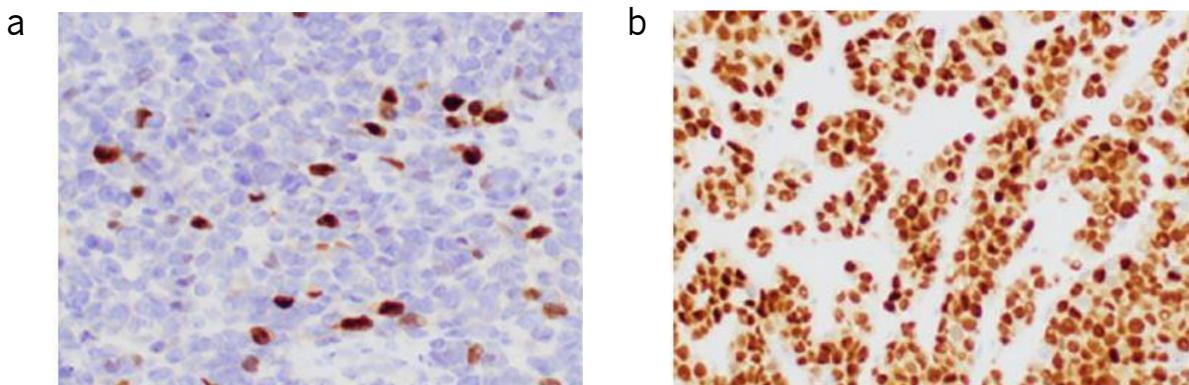


Figura 2.2. Imagem histológica obtida através de microscopia ótica após marcação com miogenina de células de rhabdomyosarcoma embrionário (a) e rhabdomyosarcoma alveolar (b). Adaptada de [6].

Grupos como o *European Soft tissue Sarcoma Group* (EpSSG) e o *North American Children's Oncology Group* (COG) investigaram quais as melhores diretrizes de tratamento do RMS através da realização de estudos clínicos. Ambos concluíram que a melhor metodologia corresponde à administração de quimioterapia, seguida de terapia local sob a forma de cirurgia e radioterapia [7].

A quimioterapia tem como objetivo erradicar as metástases e reduzir as sequelas a longo prazo. Os fármacos standard são agentes alquilantes que atuam nas fases do ciclo celular por se ligarem diretamente ao DNA, impedindo a divisão celular e eventualmente provocando a morte celular [8]. Nos estudos realizados com o COG, o tratamento corresponde à administração de vincristina, actinomicina e ciclofosfamida (VAC) [9]. No caso do EpSSG, a ciclofosfamida foi substituída pela ifosfamida, dado que a ifosfamida está associada a uma menor toxicidade gonadal, surgindo o tratamento IVA (ifosfamida vincristina, actinomicina D) [10]. Uma diferença relevante no protocolo dos dois grupos é a avaliação da resposta do tumor face à quimioterapia via ressonância magnética (MRI do inglês *Magnetic Resonance Imaging*) ou tomográfica computadorizada (CT do inglês *Computed Tomography*) nos estudos realizados pelo EpSSG. Essa análise é efetuada com o intuito de ajustar a dose dos fármacos, intensificando-a para as crianças com uma redução do volume do tumor inferior a 50% [10]. Nos estudos realizados pelo COG, essa avaliação não é feita [9].

Após conclusão da quimioterapia, é realizada uma cirurgia de excisão com o objetivo de remover totalmente o tumor, sem provocar perda de função ou problemas estéticos nos pacientes. No entanto, a remoção total nem sempre é possível [5]. Por isso, a cirurgia de excisão costuma ser complementada por radioterapia. No método de tratamento do COG, a radioterapia é sempre realizada e a dose de radiação é ajustada consoante a completitude da excisão, enquanto que no caso do EpSSG a radioterapia apenas é realizada se a excisão não for total e, nesse caso, são tidos em consideração outros fatores durante o ajuste da radiação, incluindo a histologia do tumor e a resposta do tumor à quimioterapia [5].

Apesar de, atualmente, a quimioterapia e radioterapia pertencerem às metodologias standard de tratamento do RMS, estas terapias possuem algumas desvantagens. Por um lado, o uso de agentes alquilantes está associado a toxicidade sistémica, a resistência por parte do organismo ao seu efeito antineoplásico e a desconforto do paciente (náuseas, vômitos e dores) [7]. Por outro lado, a radioterapia pode provocar alguns efeitos indesejados consoante o local no qual é aplicada, tais como alterações no tecido muscular esquelético ou outros tecidos moles em redor, rigidez das articulações, problemas no crescimento do esqueleto, complicações na tiroide e perda de audição [11]. Outro problema deste tipo de terapias é a ocorrência de relapsos após a conclusão do tratamento, o que se verifica em 43% dos casos na Europa e 22% dos casos nos EUA [4]. A taxa de ocorrência de relapsos é superior na Europa porque o EpSSG segue uma abordagem de tratamento que pretende minimizar a sobredosagem de quimioterapia e radioterapia e os seus efeitos nocivos no organismo, enquanto que o COG se foca num tratamento mais eficiente e, conseqüentemente, mais agressivo. Sendo assim, torna-se necessário determinar o balanço ideal entre a eficiência do tratamento e as suas conseqüências a longo prazo.

Por estas razões, uma área com elevado interesse económico e social é a investigação de novas formas de tratamento de cancros como o RMS que sejam eficazes e provoquem menos efeitos nefastos, proporcionando uma maior qualidade de vida aos pacientes com esta doença. Nesse sentido, uma terapia com base nos conceitos da engenharia de tecidos pode ser uma alternativa promissora.

2.3. Engenharia de tecidos

Segundo Langer e Vacanti [12], a engenharia de tecidos é “uma área de investigação interdisciplinar que aplica os princípios de engenharia e ciências da vida com o intuito de desenvolver substitutos biológicos que restaurem, mantenham ou melhorem a função de um tecido”.

A engenharia de tecidos é uma área que reúne conhecimentos de medicina, engenharia, ciência de materiais, genética e outras disciplinas com o intuito de desenvolver um ambiente propício à reparação de um tecido alvo [13]. O sucesso deste tipo de estratégia depende de três componentes essenciais (Figura 2.3), conhecidos como a tríade de engenharia de tecidos: *scaffolds*, células e estímulos [14]. Os *scaffolds* são estruturas biomiméticas que funcionam como material de suporte até o novo tecido estar completamente restaurado, promovendo a adesão, proliferação e diferenciação celular. As células, idealmente do próprio paciente, são depositadas nos *scaffolds* e cultivadas *in vitro* de forma a sintetizar um novo tecido que posteriormente será implantado no local da lesão ou o sistema composto pelo *scaffold* e pelas células é implantado diretamente no local da lesão, induzindo a regeneração do tecido *in vivo* através de mecanismos endógenos. Para melhor simular o ambiente nativo do tecido que se pretende regenerar, são utilizados estímulos bioquímicos (proteínas da matriz extracelular, fatores de crescimento) e/ou biofísicos (estímulos mecânicos, elétricos, magnéticos) [13, 14].

Propriedades dos *scaffolds*

Nos últimos anos, a disponibilidade de novos materiais e a evolução das técnicas de processamento possibilitou o fabrico de inúmeras estruturas de suporte celular, fomentando a investigação na área da engenharia de tecidos. Chegou-se à conclusão de que, independentemente do tecido alvo, existem alguns critérios que são importantes ter em consideração durante o *design* de um *scaffold* para garantir a sua adequabilidade e maximizar as interações material-célula.

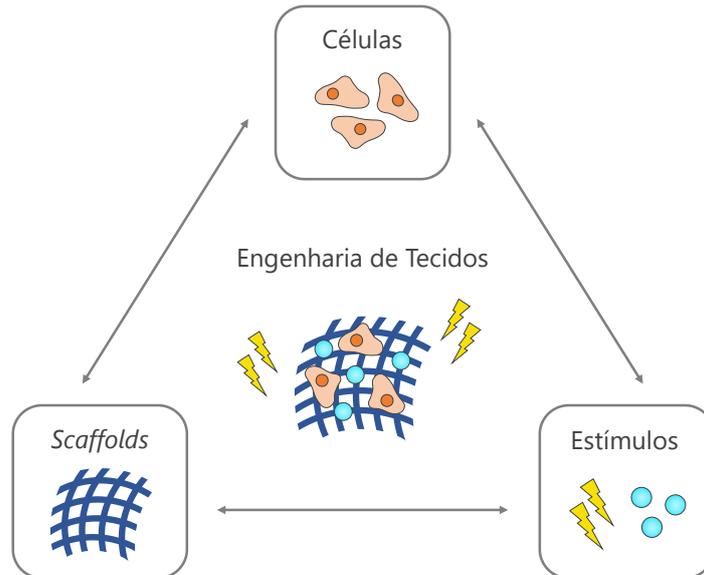


Figura 2.3. Esquema da tríade de engenharia de tecidos: os *scaffolds* funcionam como plataforma para a formação do novo tecido, promovendo a adesão, proliferação e diferenciação das células nele depositadas, através de estímulos bioquímicos e/ou biofísicos.

➤ Biocompatibilidade

O principal requisito de um *scaffold* para engenharia de tecidos é a biocompatibilidade, isto é, a capacidade de permitir que as células se desenvolvam de forma similar ao tecido nativo, promovendo a adesão à sua superfície, assim como a migração e proliferação no seu interior [15]. Para além disso, após implantação, o *scaffold* deve ser capaz de se integrar no tecido do paciente sem induzir uma resposta imunitária significativa, prevenindo assim reações inflamatórias que podem impedir a cicatrização e provocar a rejeição por parte do organismo [15, 16].

➤ Biodegradabilidade

O objetivo dos *scaffolds* não é serem implantes permanentes, mas sim uma plataforma biodegradável que mantenha a integridade estrutural enquanto ocorre o desenvolvimento do tecido e as células depositam a sua própria matriz extracelular [16, 17]. À medida que ocorre a remodelação do tecido, o material de suporte deve ser capaz de se degradar e os produtos da degradação devem ser não-tóxicos e facilmente eliminados do organismo sem interferir com outros tecidos e órgãos [16]. Desta forma, é importante considerar a velocidade de degradação do *scaffold* durante o seu *design*, assegurando que não é demasiado rápida ou demasiado lenta. No primeiro caso, o *scaffold* pode não

cumprir a função de suporte celular até o tecido estar completamente desenvolvido, enquanto que no segundo caso pode impedir a remodelação do tecido e até mesmo induzir inflamação e necrose [15].

➤ Morfologia

A morfologia dos materiais de suporte é outra propriedade muito importante para a engenharia de tecidos. A nível microscópico, devem ser consideradas as propriedades da superfície do *scaffold*, nomeadamente a rugosidade e a hidrofobicidade [17]. Estes parâmetros afetam a adsorção de proteínas que podem funcionar como pontos para as células se ligarem ou podem interagir com recetores celulares, modulando assim a adesão e a diferenciação. A nível macroscópico, a arquitetura do *scaffold* deve mimetizar a estrutura do tecido que se pretende regenerar, pois esta influencia simultaneamente a organização e a função das células [17]. Para além disso, a existência de uma porosidade elevada e poros interconectados é essencial para assegurar a penetração celular, a difusão de nutrientes e oxigénio, a deposição de matriz extracelular e a eliminação de produtos indesejados, quer do metabolismo celular, quer da degradação do *scaffold* [15, 16]. Este tipo de estrutura porosa também facilita a vascularização do novo tecido *in vivo*, o que contribui para uma melhor integração no organismo [16]. O tamanho dos poros é outro parâmetro relevante, uma vez que deve ser grande o suficiente para permitir a migração das células por toda a estrutura, mas pequeno o suficiente para proporcionar uma área de superfície elevada para ocorrer a adesão de um grande número de células [18].

➤ Propriedades mecânicas

Idealmente, os *scaffolds* devem possuir propriedades mecânicas consistentes com o local anatómico no qual vão ser implantados e, de uma perspetiva prática, ser resistentes o suficiente para permitir o manuseamento durante a implantação cirúrgica [16]. O *scaffold* deve ser capaz de suportar os esforços a que o tecido nativo está sujeito sem sacrificar a sua estrutura, podendo assim sustentar o novo tecido durante todo o processo de remodelação [18]. No entanto, a otimização de um material de suporte a nível mecânico geralmente implica o sacrifício de outras propriedades como a porosidade. Por esta razão, um dos maiores desafios da engenharia de tecidos é estabelecer um equilíbrio entre as propriedades mecânicas e a porosidade dos *scaffolds* que garanta o sucesso dos mesmos [16].

Uma etapa crucial durante o desenvolvimento de estruturas de suporte celular é a escolha do biomaterial com que estas são produzidas, uma vez que todas as propriedades anteriormente descritas dependem desse fator.

2.4. Biomateriais

Os biomateriais são de extrema importância para o sucesso da engenharia de tecidos, pois não só interagem com o local de implantação no organismo, mas também têm a capacidade de influenciar processos biológicos essenciais para a regeneração dos tecidos [19, 20]. Um biomaterial define-se como “um material destinado a interagir com sistemas biológicos de forma a avaliar, tratar, aumentar ou substituir qualquer tecido, órgão ou função do organismo” [20]. Em geral, os biomateriais podem ser divididos em quatro grupos consoante a sua composição: metais, cerâmicos, polímeros e compósitos; cada um com as suas vantagens e desvantagens específicas [19].

Os metais são materiais com boas propriedades mecânicas, o que pode ser atraente para a engenharia de tecidos. Normalmente, estes possuem um módulo de Young elevado, o que lhes permite resistir a cargas elevadas sem sofrer deformação [21]. No entanto, são pouco utilizados nesta área, pois apresentam muitas limitações a nível de biocompatibilidade. Por exemplo, têm uma estrutura muito distinta dos tecidos e a adesão celular à sua superfície é muito fraca. Ainda, os metais sofrem corrosão quando entram em contacto com os fluidos biológicos, o que resulta na perda de função desses materiais e na libertação de iões metálicos e partículas tóxicas [21].

Os materiais cerâmicos são compostos inorgânicos com uma estrutura policristalina que têm vindo a ser explorados para a regeneração do osso devido às suas semelhanças à fase mineral desse tecido [22]. Normalmente, possuem uma superfície dura, baixa elasticidade, elevada resistência à corrosão, baixa expansão térmica e elevada biocompatibilidade [22]. Embora os materiais cerâmicos tenham propriedades osteoindutoras, a sua fragilidade, degradação lenta e dificuldade de processamento são algumas desvantagens da sua utilização no fabrico de *scaffolds*, tendo-se revelado pouco adequados para a regeneração de tecidos moles [15].

Os polímeros de origem natural ou sintética são dos materiais mais utilizados na área de engenharia de tecidos. Os polímeros naturais, como o colagénio e a seda, destacam-se pela excelente biocompatibilidade e pela semelhança à estrutura da matriz extracelular de alguns tecidos, o que induz a adesão e proliferação celular [23]. Apesar de serem bioativos, estes materiais apresentam limitações como a dificuldade de processamento, baixa reprodutibilidade, rápida degradação e fracas propriedades mecânicas [24]. Os polímeros sintéticos surgem como alternativa aos polímeros naturais. Como são sintetizados em laboratório sob condições controladas, as suas propriedades são previsíveis, apresentam uma maior disponibilidade e reprodutibilidade, possuem um custo de produção inferior e são capazes de ser personalizados a nível químico e físico [24]. Para além disso, as suas propriedades mecânicas

são superiores e como são capazes de ser processados através de diferentes técnicas, torna-se mais fácil adaptá-los ao tecido que se pretende regenerar [23, 24]. Porém, como a sua origem é sintética e divergem da constituição natural dos tecidos, alguns destes polímeros possuem uma baixa bioatividade e as células podem ter dificuldade em aderir à sua superfície [24].

As limitações associadas aos tipos de materiais mencionados anteriormente fomentaram a utilização de materiais compósitos para o desenvolvimento de *scaffolds*. Estes são produzidos através da combinação de dois ou mais materiais, tornando possível a personalização das suas propriedades [15]. Por exemplo, a bioatividade dos polímeros sintéticos pode ser melhorada através da incorporação de polímeros naturais e as propriedades mecânicas dos polímeros naturais podem ser reforçadas com materiais cerâmicos [16]. Contudo, estes tipos de materiais podem ser difíceis de processar e apresentar pouca homogeneidade [15].

No momento da escolha de um biomaterial para o desenvolvimento de estruturas de suporte celular, é importante considerar não só a sua composição, mas também a sua funcionalidade. Nesta vertente, os polímeros inteligentes salientam-se pela capacidade de modificarem as suas características em função de um determinado estímulo, podendo ser, por isso, melhores a mimetizar o ambiente dinâmico dos diferentes órgãos. Os polímeros inteligentes, também conhecidos como polímeros responsivos a estímulos, são capazes de sofrer alterações de um modo controlado numa ou mais das suas propriedades físico-químicas como a solubilidade ou estrutura, em resposta a um ou múltiplos estímulos externos como a luz ou campos elétricos [25]. Consoante a relação estímulo-resposta, estes polímeros podem ser classificados em polímeros eletroativos se responderem a estímulos elétricos ou não eletroativos no caso contrário. Pela sua facilidade de controlo e adaptabilidade, os polímeros eletroativos têm vindo a ser explorados como forma menos invasiva de estimulação direta das células, sendo a mesma aplicada localmente [26].

2.4.1. Polímeros eletroativos

Os polímeros eletroativos são materiais que podem ser aplicados em diversas áreas, graças à sua capacidade de sofrer deformações estruturais como dilatação, retração ou flexão em resposta a um estímulo elétrico [26]. Tendo em consideração o seu mecanismo de ativação, estes podem ser divididos em polímeros eletroativos iónicos ou polímeros eletroativos eletrónicos. Nos polímeros eletroativos iónicos, as deformações são provocadas pela difusão de iões. A principal vantagem destes polímeros é serem ativados com baixas tensões, mas a sua resposta é muito lenta. Esta categoria inclui os compósitos polímero-metal e polímeros condutores [27]. Por sua vez, nos polímeros eletroativos

eletrônicos, as deformações são causadas por variações dipolares e interações eletrostáticas. Apesar de necessitarem de uma maior tensão para serem ativados, o tempo de resposta reduzido e a elevada eficiência e fiabilidade são propriedades bastante apelativas. Este grupo abrange os polímeros piezoelétricos, elastómeros dielétricos e polímeros eletrorestritivos [27].

A nível do fabrico de materiais de suporte celular, os polímeros piezoelétricos têm sido dos mais investigados, dado que são extremamente eficientes a simular os sinais elétricos e mecânicos presentes nos diferentes tecidos. No organismo, as células estão constantemente expostas a campos bioelétricos, gerados por canais e bombas de iões nas membranas plasmáticas, e a esforços biomecânicos que, através de mecanismos de mecanotransdução, são convertidos em sinais bioquímicos ou elétricos [28]. Dependendo do tecido, estes sinais têm diferentes efeitos no comportamento e na função das células, sendo essenciais para múltiplos processos celulares. Desta forma, os polímeros piezoelétricos podem atuar como fonte destes estímulos, tanto *in vitro* como *in vivo*, uma vez que têm a capacidade de converter energia mecânica em energia elétrica e vice-versa [28].

O efeito piezoelétrico define-se como a interação eletromecânica que resulta na variação da polarização de um material quando nele é aplicado um stress mecânico, sendo este um processo diretamente proporcional e reversível [29]. Quando um material piezoelétrico é submetido a um esforço mecânico, este sofre uma deformação que induz a reorientação ou formação de momentos dipolares no seu interior, despoletando um potencial elétrico. Este corresponde ao efeito piezoelétrico direto (Figura 2.4a) e foi descoberto por Jacques e Pierre Curie em 1880 [30]. Similarmente, quando estes materiais são expostos a um campo elétrico suficientemente forte, os dipolos no seu interior alinham-se na direção do campo aplicado, o que provoca a deformação do material. Este corresponde ao efeito piezoelétrico inverso (Figura 2.4b) e foi deduzido por Lippman em 1881, sendo mais tarde confirmado experimentalmente pelos irmãos Curie [30]. Para existir piezoelectricidade, é necessário ocorrer a formação de cargas locais que originam os dipolos elétricos, o que apenas se verifica em materiais com uma estrutura cristalina não centrossimétrica [29, 30].

Embora efeito piezoelétrico possa estar presente em alguns polímeros amorfos, este é menos intenso do que em polímeros semicristalinos, razão pela qual os últimos são mais utilizados [30]. O poli(fluoreto de vinilideno) (PVDF) é um polímero semicristalino piezoelétrico muito promissor para a engenharia de tecidos, visto que para além de ter uma elevada eletroatividade, é biocompatível [31]. Outra vantagem é a facilidade de processamento, tornando possível produzir *scaffolds* com diferentes morfologias, como por exemplo na forma de filmes [32], membranas [33] e fibras [34]. Adicionalmente,

estudos recentes demonstraram que este polímero é capaz de modular o comportamento das células do tecido cartilaginoso [35], osso [36], neuronal [37] e muscular [38].

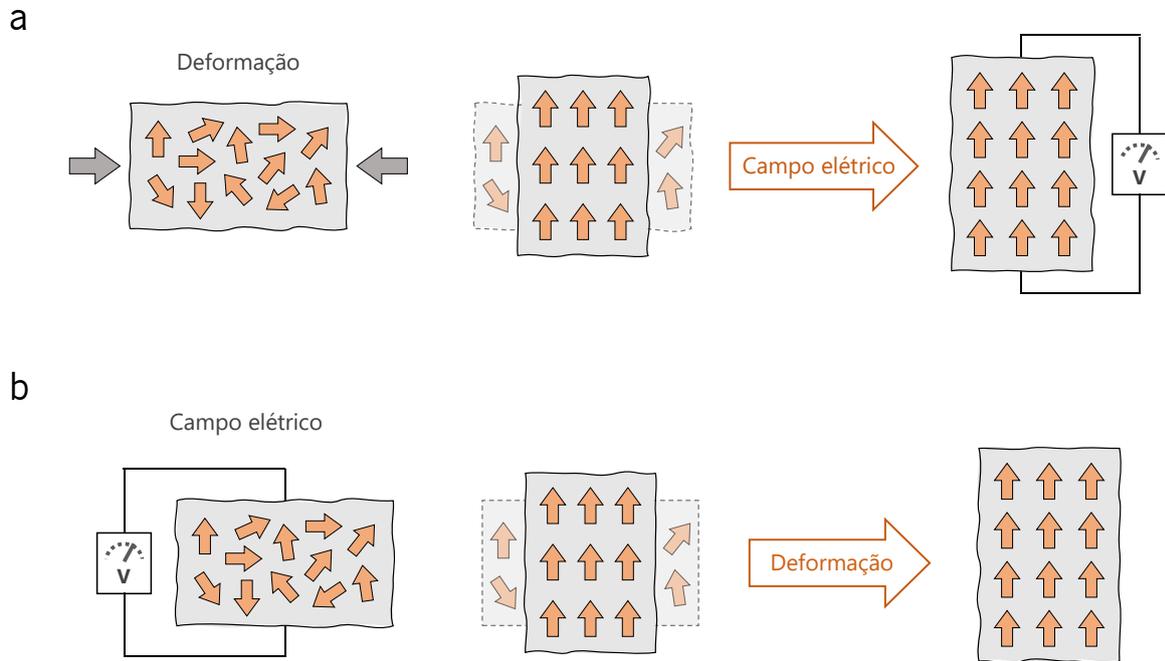


Figura 2.4. Representação esquemática do efeito piezoelétrico direto (a) e inverso (b).

Poli (fluoreto de vinilideno)

O PVDF é um polímero fluorado com longas macromoléculas, nas quais se estabelecem ligações carbono-carbono (C-C) fortes na cadeia principal e ligações carbono-flúor (C-F) estáveis entre a cadeia principal e os átomos adjacentes [39]. Graças a esta estrutura química (Figura 2.5), possui uma elevada estabilidade térmica, baixo coeficiente de fricção, baixa energia de superfície, boas propriedades mecânicas, uma elevada resposta dielétrica e solubilidade em solventes polares [40]. Porém, as características do PVDF podem ser influenciadas por muitos fatores, nomeadamente o peso molecular, a distribuição do peso molecular e os defeitos nas cadeias [39].

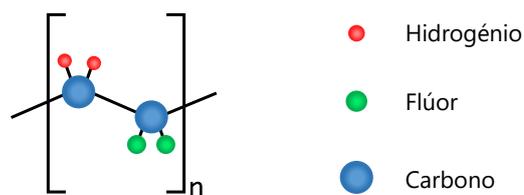
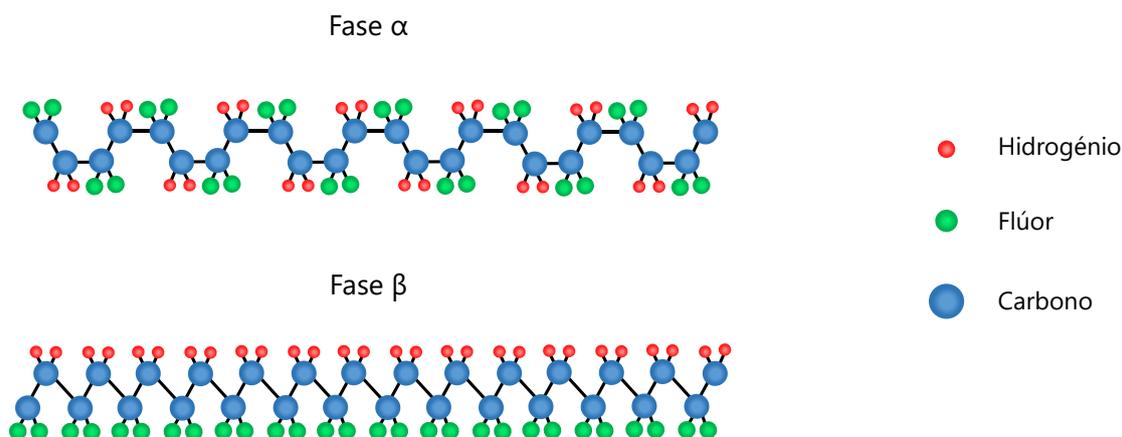


Figura 2.5. Estrutura química do PVDF. Adaptada de [41].

Quanto às propriedades térmicas, o PVDF apresenta uma temperatura de transição vítrea próxima dos $-35\text{ }^{\circ}\text{C}$ e uma temperatura de fusão entre 160 e $190\text{ }^{\circ}\text{C}$. Esta temperatura pode diferir porque a fusão do polímero depende da sua morfologia e cristalinidade [39, 40]. Geralmente, o PVDF cristaliza numa estrutura esferulítica composta por lamelas que crescem radialmente a partir do mesmo ponto, o centro da esferulite. A sua cristalinidade pode variar entre 35 e 70%, consoante o método de processamento [39, 40]. Todavia, umas das propriedades mais interessantes deste polímero é a existência de pelo menos cinco modificações polimórficas da sua fase cristalina (α , β , γ , δ e ϵ), as quais são definidas pela estrutura e pelo empacotamento das cadeias macromoleculares [41, 42]. As diferentes conformações são designadas *all trans* (TTT) planar zigzag para a fase β , *trans-gauche-trans-gauche* (TGTG') para as fases α e δ e T3GT3G' para as fases γ e ϵ . Diferentes conformações podem ser obtidas dependendo da reação de polimerização e das condições durante a cristalização [41, 42]. As fases α e β (Figura 2.6) são as mais comuns e, por isso, as mais investigadas.

Figura 2.6. Representação das conformações das cadeias na fase α e β . Adaptada de [41].

A principal diferença entre as duas fases é a disposição dos átomos de flúor nas cadeias moleculares. Estes átomos de flúor são os responsáveis pela geração de fortes momentos dipolares elétricos no monómero [43]. A fase α é uma fase apolar caracterizada pela organização antiparalela dos momentos dipolares, razão pela qual não apresenta eletroatividade. Contrariamente, a fase β é uma fase polar, na qual os dipolos estão distribuídos na mesma direção, o que lhe confere propriedades eletroativas. Deste modo, a fase β é a que possui maior utilidade numa ampla gama de aplicações biotecnológicas [43]. Por esta razão, foram desenvolvidas múltiplas estratégias para induzir a obtenção da fase β e melhorar a sua resposta piezoelétrica. Alguns exemplos são o estiramento mecânico ou a polarização da fase α , o processamento por *electrospinning* e a incorporação de *nanofillers* como titanato de bário (BaTiO_3), líquidos iónicos ou nanopartículas magnéticas [43]. Outra abordagem é o desenvolvimento de copolímeros de PVDF [30].

Um dos copolímeros mais estudados é o poli(fluoreto de vinilideno-co-trifluoretileno) (P(VDF-TrFE)), o qual possui uma estrutura química (Figura 2.7) que lhe permite cristalizar somente na fase β . Desta forma, não é necessário realizar tratamentos adicionais para obter essa fase, independentemente do processamento [43]. Como consequência da copolimerização, o P(VDF-TrFE) pode exibir algumas propriedades diferentes do homopolímero PVDF. Um exemplo é a diminuição da temperatura à qual ocorre a transição do comportamento ferroelétrico para paraelétrico (temperatura de Curie), atingindo valores inferiores à temperatura de fusão. A temperatura de Curie do copolímero depende da fração molar de TrFE, encontrando-se compreendida entre os 60 e os 135 °C [30]. Mesmo assim, o P(VDF-TrFE) tem um comportamento ferroelétrico à temperatura ambiente, tal como o PVDF. Por outro lado, a adição de monómeros de TrFE provoca um impedimento estérico que favorece a conformação *all trans*, o que induz um aumento da eficiência na conversão da energia mecânica em energia elétrica e, consequentemente, um aumento do coeficiente piezoelétrico em relação ao PVDF puro [30, 43].

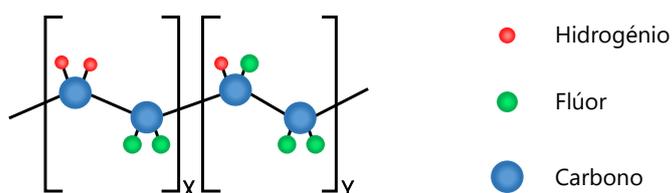


Figura 2.7. Estrutura química do P(VDF-TrFE). Adaptada de [41].

Tanto o PVDF como o P(VDF-TrFE) são polímeros com uma elevada resistência a químicos orgânicos e inorgânicos. Portanto, estes polímeros não sofrem degradação quando implantados no organismo, o que pode ser considerado uma desvantagem da sua utilização para o fabrico de *scaffolds*. No entanto, devido às elevadas propriedades piezoelétricas, estes polímeros continuam a ser bastante utilizados na área de engenharia de tecidos, especialmente em provas de conceito envolvendo a resposta de determinadas células a estímulos provenientes de materiais eletroativos [42].

2.4.2. Compósitos magnetoelétricos

Uma possível limitação do uso de polímeros piezoelétricos para a eletroestimulação celular é a impraticabilidade da aplicação de esforços mecânicos em alguns cenários, tanto *in vivo*, por exemplo quando o paciente tem de estar imobilizado, como *in vitro*, por exemplo quando o *scaffold* tem uma geometria incompatível com certos biorreatores mecânicos. Esta particularidade instigou a procura de novas alternativas que permitam que a estimulação seja ativada remotamente, tendo-se concluído que os materiais magnetoelétricos são uma opção com bastante potencial [28].

O efeito magnetoelétrico consiste na polarização elétrica de um material quando este é submetido a um campo magnético (efeito direto) ou na sua magnetização quando sujeito a um campo elétrico (efeito inverso) [44]. Os materiais magnetoelétricos podem ser materiais com apenas uma fase, a qual possui simultaneamente propriedades elétricas e magnéticas, ou materiais compósitos multifásicos, sendo cada fase distinta responsável por uma dessas propriedades [45]. O efeito magnetoelétrico pode surgir diretamente a partir de interações entre os dois parâmetros, como ocorre nos materiais com uma única fase, ou indiretamente via outros mecanismos, como acontece nos materiais compósitos multifásicos [44, 45]. Nos materiais com apenas uma fase, este efeito depende da coexistência de momentos magnéticos e elétricos pouco organizados, o que habitualmente não se verifica, de forma substancial, à temperatura ambiente. Porém, nos materiais compósitos, como a fase magnética e a fase elétrica são separadas, o efeito magnetoelétrico, mediado por deformações, é drasticamente superior (3 ordens de grandeza), ocorrendo à temperatura ambiente [46]. Outra vantagem dos materiais compósitos é a possibilidade de otimizar cada uma das fases à escala nanométrica, diminuindo as perdas na interface e potenciando assim o seu efeito [45]. Por estas razões, os compósitos magnetoelétricos têm sido mais estudados no âmbito de aplicações multifuncionais.

De modo geral, os compósitos magnetoelétricos são obtidos a partir da combinação de materiais piezoelétricos e materiais magnetostritivos. A magnetostrição define-se como a deformação de um material quando este é exposto a um campo magnético, como consequência da reorganização dos seus

momentos magnéticos na direção do campo aplicado [47]. Nos materiais compósitos, o efeito magnetoelétrico resulta da deformação do material magnetostritivo quando submetido a um campo magnético, o que provoca a deformação do material piezoelétrico e, conseqüentemente, a geração de um campo elétrico [45]. Desta forma, o fabrico de *scaffolds* a partir de compósitos magnetoelétricos possibilita a eletroestimulação das células através da aplicação de campos magnéticos externos, o que pode ser extremamente útil. Os compósitos magnetoelétricos podem apresentar diferentes configurações, dependendo da forma como as suas fases são organizadas [44]. Os compósitos particulados, laminados e fibrosos (Figura 2.8) são os mais comuns.

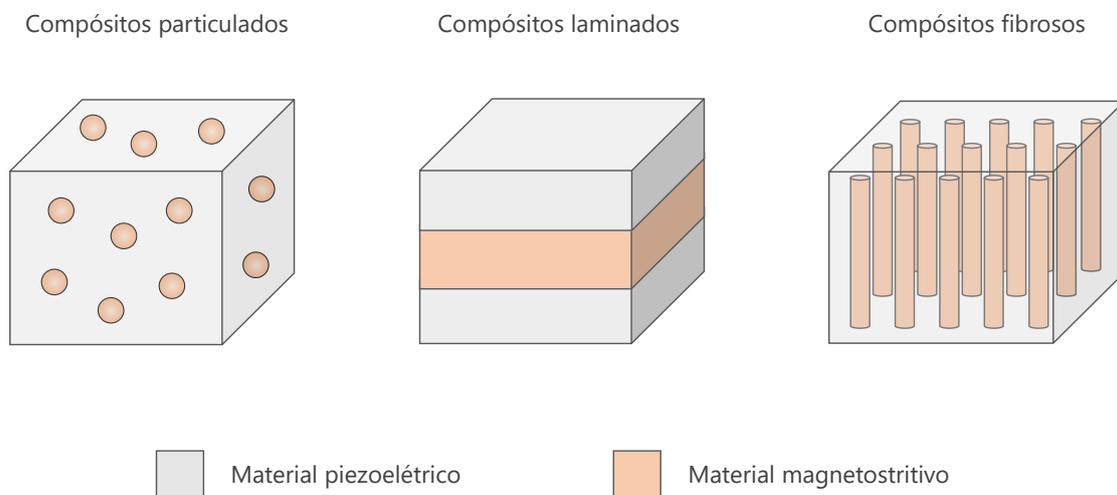


Figura 2.8. Representação das diferentes configurações dos compósitos magnetoelétricos. Adaptada de [45].

Consoante a aplicação, existem vantagens e desvantagens associadas a cada uma dessas estruturas. Os compósitos particulados são constituídos por uma matriz piezoelétrica e partículas magnetostritivas. A principal vantagem desta tipologia é a sua facilidade de fabrico. Por outro lado, esta apresenta baixas propriedades magnetoelétricas (3 ordens de grandeza inferiores) [44, 45]. Os compósitos laminados, constituídos por camadas alternadas do material piezoelétrico e do material magnetostritivo, apresentam uma resposta magnetoelétrica superior aos particulados. No entanto, a sua aplicabilidade pode ser limitada pela necessidade de usar um agente para acoplar as diferentes camadas, como uma cola, a qual costuma ser isoladora [46]. Por sua vez, os compósitos fibrosos, constituídos por uma matriz piezoelétrica e fibras magnetostritivas, possuem uma maior interação superficial entre as duas fases (embora que menor que nos particulados), induzindo uma boa conversão dos estímulos

magnéticos em estímulos elétricos. Contudo, a produção destes compósitos é muito complexa comparativamente aos restantes [44, 45]. Embora os compósitos particulados tenham um efeito magnetoelétrico inferior, estes são os mais utilizados como materiais de suporte celular, uma vez que são mais flexíveis e podem ser modulados em diferentes geometrias, nomeadamente na forma de fibras [48]. Geralmente, estes compósitos são constituídos por polímeros piezoelétricos e nanopartículas magnetostritivas. A utilização de polímeros piezoelétricos deve-se à facilidade de processamento dos mesmos, enquanto que o uso de partículas à escala nano é justificada pela elevada área de superfície, o que aumenta a interface entre as duas fases, induzindo uma boa resposta magnetoelétrica [45]. Para além de permitirem a ativação remota do efeito piezoelétrico do polímero, as nanopartículas magnéticas podem induzir um campo magnético local, o que pode melhorar a integração dos tecidos neste tipo de materiais [48].

Embora exista uma grande variedade de nanopartículas magnetostritivas, quando a sua aplicação envolve o contacto com tecidos vivos é imprescindível considerar a biocompatibilidade, a toxicidade e os efeitos a longo prazo das mesmas, o que limita a gama de materiais disponíveis [49]. No entanto, existe uma categoria de nanopartículas magnéticas que não induz efeitos nefastos no organismo, o que as torna promissoras para aplicações biomédicas como a engenharia de tecidos: as nanopartículas de óxido de ferro (FO), também conhecidas como ferrites, na forma de magnetite (Fe_3O_4) ou hematita (Fe_2O_3) [49, 50]. A segurança biológica destas nanopartículas tem sido extensivamente testada em ambiente laboratorial e clínico, o que culminou na aprovação de algumas formulações por agências reguladoras da Europa e dos Estados Unidos da América [51-54]. A sua biocompatibilidade advém do facto do corpo humano possuir mecanismos de processar, armazenar e utilizar o ferro, sendo este um componente essencial em múltiplos processos metabólicos, como por exemplo o transporte de oxigénio [49]. Porém, as nanopartículas de FO possuem uma baixa resposta magnética, especialmente em condições fisiológicas, o que fomentou a procura de formas de contornar essa restrição [55]. Uma hipótese é a introdução de catiões metálicos divalentes como iões de cobalto, originando nanopartículas denominadas ferrites de cobalto, cuja fórmula química é CoFe_2O_4 (CFO). Contrariamente às nanopartículas de magnetite ou hematita, as ferrites de cobalto possuem uma anisotropia magneto-cristalina, o que lhes confere melhores propriedades magnéticas [55]. Mais especificamente, este tipo de ferrites apresenta um maior coeficiente de magnetostricção (≈ 50 ppm), característica fulcral para potenciar a resposta dos compósitos magnetoelétricos [55]. Devido à incorporação de cobalto, uma substância tóxica para os humanos, as nanopartículas de CFO puras não são biocompatíveis. Contudo,

estas continuam a ser utilizadas para a engenharia de tecidos em contexto laboratorial, uma vez que o seu revestimento por uma matriz polimérica neutraliza/diminui a sua citotoxicidade [56, 57].

2.5. Biorreatores

Independentemente da área em que são utilizados, os biorreatores são definidos como dispositivos nos quais processos biológicos ou bioquímicos ocorrem sob monitorização constante e controlo restrito das condições ambientais e dos parâmetros de operação [58]. Como proporcionam elevada reprodutibilidade, manipulação e automação, estes equipamentos são utilizados em múltiplas indústrias que operam em grandes escalas, inclusivamente em fermentação industrial, tratamento de águas, processamento de comida e produção de fármacos e proteínas recombinantes [58]. No contexto da engenharia de tecidos, os biorreatores têm um papel semelhante. Estes permitem controlar as condições dos cultivos celulares, o que é essencial para melhorar a regeneração dos tecidos e estudar o seu comportamento em ambientes específicos. Outra aplicação bastante conveniente nesta área é a mimetização de estados patológicos como o cancro para o teste de agentes terapêuticos, de modo a simplificar o desenvolvimento de novos tratamentos e, quando aperfeiçoados, evitar os testes em animais [59]. Para além disso, numa perspetiva económica, o uso de biorreatores pode facilitar o fabrico de tecidos que apresentem uma certa reprodutibilidade e diminuir os custos associados a este processo, tornando viável a sua comercialização [59].

Os biorreatores podem desempenhar diferentes funções decisivas para o sucesso do desenvolvimento de um tecido *in vitro*. O design destes dispositivos é adaptado à sua funcionalidade, podendo esta ser a dispersão das células em *scaffolds* porosos, a manutenção do transporte de nutrientes e resíduos ou a estimulação física do tecido [60, 61].

Considerando que a organização das células em *scaffolds* tridimensionais tem um impacto significativo na estrutura e função do tecido produzido, a dispersão das células é uma das etapas cruciais para a engenharia de tecidos. Sendo assim, os biorreatores podem atuar como ferramenta para auxiliar a distribuição das células pela integridade dos *scaffolds*, antes de serem iniciadas culturas a longo prazo [60]. Quando se efetua a deposição de uma suspensão celular diretamente sobre o material de suporte, permitindo que as células assentem e infiltrem de forma autónoma, a sua distribuição não costuma ser uniforme, ocorrendo a deposição de uma elevada densidade de células na parte exterior do *scaffold*, enquanto que o interior permanece desocupado [61]. Este efeito é particularmente proeminente em *scaffolds* com arquiteturas complexas e elevada porosidade. Existem várias abordagens que podem ser

implementadas nos biorreatores para contornar esse problema, como o uso de vácuo, agitação, eletromagnetismo ou ondas acústicas [60].

Outro desafio que pode surgir na engenharia de tecidos é a conservação da viabilidade celular no interior do *scaffold*, a qual depende drasticamente do fornecimento de nutrientes e da remoção de resíduos nessa zona [59]. Devido a limitações na difusão do meio, os cultivos estáticos podem resultar no desenvolvimento de tecidos pouco homogêneos, como resultado da ocorrência de necrose na região central e do crescimento de camadas densas de células viáveis na periferia [61]. Para além disso, a típica cultura em recipientes é bastante exigente a nível laboral, uma vez que tanto a renovação dos nutrientes como a eliminação dos resíduos metabólicos requerem a substituição do meio de cultura manualmente. Por isso, a utilização de biorreatores responsáveis por estabelecer a circulação contínua de meio pelos *scaffolds* pode ser muito vantajosa, proporcionando simultaneamente a automatização e a otimização dos cultivos celulares. Nestes equipamentos, a circulação de meio pode ser assegurada através de diferentes metodologias. Atualmente, o mais comum é a implementação de sistemas de agitação, rotação ou perfusão (Figura 2.9) [58].

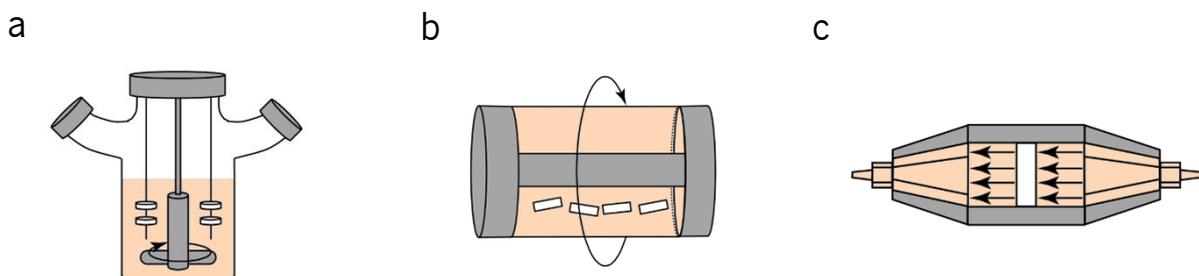


Figura 2.9. Representação de alguns biorreatores utilizados para garantir a circulação de meio pelos materiais de suporte celular, os quais incluem sistemas de agitação (a), sistemas de rotação (b) ou sistemas de perfusão (c). Adaptada de [58].

Para além da distribuição uniforme das células, do fornecimento de nutrientes e da eliminação de resíduos, a mimetização do ambiente dinâmico presente no tecido nativo é essencial para promover a adesão, proliferação e diferenciação celular *in vitro* [61]. Com esta finalidade, têm sido desenvolvidos diversos biorreatores inovadores que permitem a aplicação de um ou mais estímulos físicos nos *scaffolds*. Existe uma variedade de estímulos que podem ser aplicados, mas os que têm revelado mais potencial a nível do músculo esquelético são os estímulos mecânicos e elétricos [62]. No entanto, como a

electroestimulação pode ser complexa, devido à necessidade de recorrer a eléctrodos e sistemas com cabos de alimentação, os biorreatores responsáveis pela aplicação esforços mecânicos são preferíveis. Adicionalmente, inúmeros estudos demonstraram que, através de mecanismos de mecanotransdução, a aplicação de estímulos mecânicos em vários tecidos pode estimular a produção de matriz extracelular [63], melhorar a organização estrutural das células [64], promover a diferenciação celular [65] e induzir funcionalidade no tecido [66]. Desta forma, este tipo de biorreatores pode ser implementado para acelerar a regeneração de tecidos funcionais ou para estudar a influência de certos estímulos no comportamento de diferentes fenótipos celulares, inclusivamente em tecidos com patologias como o cancro [60].

2.6. Estudos relevantes

Uma etapa fundamental de qualquer projeto de investigação é o estudo do conhecimento já existente acerca do tópico que vai ser abordado, nomeadamente as abordagens e metodologias vigentes. Só assim é possível ter uma visão do panorama atual, identificar as carências da área em questão e desenvolver estratégias oportunas e promissoras. No contexto desta dissertação, é importante analisar o conhecimento previamente estabelecido acerca do impacto dos materiais eletroativos e dos estímulos físicos no comportamento de diferentes linhas celulares. Para tal, foram analisados os estudos mais relevantes acerca deste tema, os quais se encontram sumarizados na Tabela 2.1.

Tabela 2.1. Sumário dos estudos mais relevantes no contexto desta dissertação.

Tecido	Materiais	Natureza dos estímulos	Tipo de células	Principais resultados	Ref.
Tecidos saudáveis	Filmes de PVDF	Mecânico-elétrico	Células estaminais do tecido adiposo	A polarização e a aplicação de estímulos físicos aumentaram a diferenciação celular	[71]
	Filmes de PVDF	-	Mioblastos	A polarização dos filmes aumentou a proliferação celular	[38]

2. Estado da arte

Tabela 2.1. Sumário dos estudos mais relevantes no contexto desta dissertação (continuação).

Tecido	Materiais	Natureza dos estímulos	Tipo de células	Principais resultados	Ref.
Tecidos saudáveis	Fibras de P(VDF-TrFE)	Mecânico-elétrico	Osteoblastos	Os estímulos físicos promoveram a proliferação celular	[72]
	Fibras de PVDF	-	Mioblastos	A orientação das fibras influenciou a morfologia e a disposição das células	[38]
	Fibras de PLGA/Fe ₃ O ₄	-	Mioblastos	A incorporação de nanopartículas intensificou a proliferação celular	[73]
	Filmes de PVDF/CoFe ₂ O ₄	Mecânico-elétrico	Mioblastos	Os estímulos físicos favoreceram a diferenciação e a formação de miotubos	[74]
Tecidos cancerígenos	-	Eletromagnético	Melanoma Cancro da mama Cancro cervical	Redução da proliferação das células cancerígenas, sem influenciar as células saudáveis	[75]
	-	Mecânico	Cancro da mama	Inibição da proliferação das células cancerígenas, sem interferir com as células saudáveis	[76]
	Nanopartículas de BaTiO ₃	Mecânico-elétrico	Cancro da mama	Diminuição da atividade mitótica das células cancerígenas	[77]
	Nanopartículas de BaTiO ₃	Mecânico-elétrico	Glioblastoma	Efeito antiproliferativo dos estímulos físicos aumenta a eficácia da quimioterapia	[78]
	Hidrogel de colagénio tipo I	Mecânico	Cancro do ovário Carcionoma	Aumento do crescimento das células cancerígenas	[80, 81]

Os polímeros piezoelétricos como o PVDF e o seu copolímero P(VDF-TrFE) têm sido os materiais eletroativos mais utilizados para o desenvolvimento de *scaffolds*, principalmente a nível da regeneração

músculo-esquelética. Estes polímeros podem ser processados através de múltiplas técnicas, as quais possibilitam a obtenção de diferentes morfologias. Uma técnica de processamento que tem vindo a ser explorada é o *solvent casting*, a qual permite obter materiais de suporte celular na forma de filmes. O facto de a polarização dos filmes de PVDF melhorar as suas propriedades piezoelétricas é algo que já foi reportado várias vezes na literatura [67-70]. Contudo, o efeito da polarização desses filmes no comportamento de diferentes células apenas começou a ser investigado mais recentemente. Por exemplo, Ribeiro *et al.* [71] produziram filmes de PVDF polarizados e não polarizados e analisaram o seu efeito na diferenciação de células estaminais adiposas humanas (hASCs). Durante 15 dias, monitorizaram a atividade da fosfatase alcalina, um marcador frequentemente usado para quantificar a diferenciação osteogénica. Os ensaios foram realizados na ausência de estímulos (condições estáticas) e na presença de estímulos (condições dinâmicas) mediados por um biorreator mecânico. Este biorreator era responsável por induzir uma vibração vertical nas placas de cultura, a qual ativava o efeito piezoelétrico dos substratos de PVDF. A partir dos resultados obtidos, concluíram que as células cultivadas nos filmes polarizados sofreram uma maior diferenciação, a qual foi ainda mais elevada com a incorporação dos estímulos físicos. Um estudo semelhante foi feito por Martins *et al.* [38], mas relativamente ao tecido muscular. Estes produziram filmes de PVDF polarizados e não polarizados e analisaram a sua influência no comportamento de mioblastos (C2C12) em condições estáticas. Adicionalmente, realizaram dois ensaios distintos com os filmes polarizados: num deles as células foram depositadas sobre a superfície carregada negativamente e no outro sobre a superfície carregada positivamente. Verificaram que os filmes polarizados promoveram uma maior adesão e proliferação celular comparativamente aos filmes não polarizados, sendo esse aumento mais proeminente nas superfícies carregadas negativamente. Ambos estes estudos demonstram que os substratos de PVDF na forma de filmes são capazes de modificar o comportamento de diferentes células e que tanto a sua polarização como a incorporação de estímulos físicos pode ser útil para otimizar a sua performance.

O *electrospinning* é outra técnica de processamento que tem sido bastante aplicada no âmbito da engenharia de tecidos. Esta técnica permite a obtenção de membranas fibrosas, as quais são excecionalmente favoráveis nesta área, pois possuem uma elevada área de superfície, apresentam bastante porosidade e mimetizam a estrutura da matriz extracelular presente nos vários tecidos. Quando combinada com a utilização de polímeros inteligentes, o potencial desta técnica é ainda maior, tal como Wang *et al.* [72] demonstraram. Neste estudo, foi desenvolvida uma estratégia para regenerar o tecido ósseo com base na estimulação piezoelétrica fornecida por fibras de P(VDF-TrFE). Os ensaios consistiram na deposição de células precursoras dos osteoblastos (MC3T3-E1) sobre as fibras produzidas e posterior

estimulação mecânica desse conjunto através de vibrações verticais geradas por um biorreator. Essas vibrações ativaram o efeito piezoelétrico das fibras, resultando na estimulação mecânico-elétrica das células, o que provocou um aumento da sua proliferação. Outra vantagem do *electrospinning* é a capacidade de controlar a orientação das fibras produzidas, o que permite produzir scaffolds com fibras alinhadas na mesma direção. Este tipo de morfologia pode ser muito útil para guiar o crescimento das células, o que é particularmente importante na regeneração do tecido muscular, dado que este tecido consiste num conjunto de fibras alinhadas paralelamente, como foi mencionado no início deste capítulo. Por esta razão, têm sido realizados estudos para determinar se a orientação das fibras tem impacto no desenvolvimento das células musculares. O estudo realizado por Martins *et al.* [38] é um dos que se destaca no contexto desta dissertação, uma vez que implementaram polímeros piezoelétricos. Neste estudo, foram produzidas fibras de PVDF orientadas e não orientadas como material de suporte para a cultura de mioblastos (C2C12) em condições estáticas. Após 72 h de cultura, observaram que os mioblastos nas fibras orientadas apresentavam uma morfologia alongada e que estes se alinhavam na direção das fibras, o que não se verificou nas fibras sem orientação. Desta forma, os autores comprovaram que a orientação das fibras pode ter um papel importante no desenvolvimento das células musculares, o que, posteriormente, pode afetar a sua função.

Os materiais compósitos são outro tipo de materiais que tem sido utilizado para o fabrico de *scaffolds* capazes de estimular localmente as células. Os compósitos com uma matriz polimérica e nanopartículas magnéticas destacam-se dos restantes, uma vez que este tipo de nanopartículas possibilita a manipulação remota dos estímulos através de campos magnéticos. Ademais, as próprias nanopartículas magnéticas são capazes de melhorar a integração das células nos *scaffolds*, devido à sua capacidade de imitarem os campos magnéticos presentes no organismo. Por esta razão, Hu *et al.* [73] decidiram investigar o potencial dos *scaffolds* fibrosos compósitos na regeneração muscular. Para tal, produziram fibras de poli(ácido lático-co-ácido glicólico) (PLGA), orientadas e não orientadas, com e sem nanopartículas de magnetite. Estas atuaram como material de suporte durante a cultura de mioblastos (C2C12). Após 72 h de cultura, constataram que a proliferação dos mioblastos foi superior nas fibras orientadas e com nanopartículas. Por isso, concluíram que a combinação da incorporação de nanopartículas de magnetite e da orientação das fibras foi a melhor maneira de aumentar o desempenho dos *scaffolds*. Apesar deste estudo apenas ter sido realizado em condições estáticas, existem outros que aprofundam o conhecimento acerca da influência deste tipo de materiais na atividade celular em condições dinâmicas. No estudo realizado por Ribeiro *et al.* [74], foram desenvolvidos filmes de PVDF polarizados e não polarizados com ferrites de cobalto, os quais apresentavam boas propriedades

magnetoelétricas. De seguida, estes foram usados para a realização de ensaios de diferenciação com mioblastos (C2C12), em condições estáticas e dinâmicas. Nas condições dinâmicas, a estimulação foi feita recorrendo a um biorreator mecânico e a um biorreator magnético. Mais uma vez, concluíram que os filmes polarizados promoveram uma maior diferenciação em relação aos filmes não polarizados e que esta foi ainda superior quando foram adicionados os estímulos físicos, tanto no biorreator mecânico como no biorreator magnético. Essa diferenciação traduziu-se na formação de miotubos, as estruturas responsáveis pela funcionalidade do músculo, sendo o seu comprimento superior nas condições dinâmicas. Deste modo, os autores demonstraram que conseguiram controlar remotamente a estimulação celular proveniente de polímeros piezoelétricos através da incorporação de nanopartículas magnetostritivas e da aplicação de campos magnéticos. Para além disso, comprovaram que este tipo de estimulação é capaz de influenciar processos celulares como a diferenciação e a formação de miotubos.

Paralelamente à regeneração de tecidos, inúmeros estudos têm revelado as vantagens da aplicação de estímulos físicos no tratamento de diferentes patologias. Por essa razão, Buckner *et al.* [75] decidiram averiguar a influência de campos eletromagnéticos de baixa intensidade modulados por frequência no comportamento de diferentes linhas celulares cancerígenas: B16-BL6 (melanoma), MDA-MB-231 e MCF-7 (dois tipos de cancro da mama) e HeLa (cancro cervical). Os estímulos foram aplicados através de solenoides, em cenários *in vitro* e *in vivo* (em ratinhos), tendo ambos revelado que os campos eletromagnéticos provocaram uma diminuição da proliferação de todas células cancerígenas testadas, ainda que em diferentes magnitudes. Adicionalmente, verificaram que a aplicação destes estímulos não afetou o comportamento das células saudáveis, o que é extremamente positivo. Sendo assim, estes autores concluíram que os campos eletromagnéticos com determinados padrões podem ser usados como terapia anti-cancro, podendo esta ser particularmente benéfica devido à sua especificidade.

Outra classe de estímulos que tem sido explorada como forma de combater o cancro são os esforços mecânicos. Porém, a aplicação destes estímulos nem sempre é fácil. Uma possível abordagem é a utilização de ultrassons, uma vez que estas ondas são capazes de gerar tensões micromecânicas no citoesqueleto das células e desencadear mecanismos celulares ativados por mecanotransdução. O estudo realizado por Katiyar *et al.* [76] é um exemplo desta estratégia, no qual investigaram a influência da estimulação mecânica através de ultrassons na modulação do comportamento de células mamárias saudáveis (MCF-12A) e cancerígenas (T47D). A exposição a ultrassons foi feita durante 10 min e a proliferação foi avaliada 24 h após a estimulação. A partir dos resultados obtidos, os autores constataram que este tipo de estimulação inibiu a proliferação das células cancerígenas, mas o mesmo fenómeno não ocorreu nas células saudáveis. Mais uma vez, este estudo demonstrou o potencial de estímulos

físicos na inibição da proliferação de células cancerígenas e da possibilidade de controlar a especificidade do tratamento, tornando-o apenas direcionado aos tecidos patológicos.

Tal como na engenharia de tecidos, os materiais eletroativos podem ser utilizados como fonte de estímulos físicos para modular o comportamento das células cancerígenas. Neste sentido, Marino *et al.* [77] desenvolveram uma estratégia para inibir a proliferação de células do cancro da mama, com base na estimulação de origem piezoelétrica. Neste estudo, o efeito piezoelétrico dos materiais era ativado por ultrassons, o que resultava na estimulação mecânico-elétrica das células. Para tal, efetuaram o revestimento de nanopartículas piezoelétricas de titanato de bário (BaTiO_3) com 1,2-distearoil-sn-glicero-3-fosfatidiletanolamina-N-[metoxi(polietilenoglicol)-5000] (DSPE-PEG) para melhorar a sua dispersão no meio de cultura. Posteriormente, as nanopartículas revestidas foram colocadas em contacto com células SK-BR-3, uma linha celular utilizada como modelo *in vitro* do cancro da mama. A estimulação mediada por ultrassons foi realizada durante 1 hora por dia, ao longo de 4 dias. Durante esse período, monitorizaram diferentes parâmetros, nomeadamente a expressão génica, o ciclo celular, a organização dos componentes do citoesqueleto e o metabolismo celular. Observaram que houve uma redução evidente da proliferação, associada à interrupção do ciclo celular, a qual foi induzida pela alteração de vários processos: o aumento da transcrição de um gene que codifica um tipo de canais de potássio (Kir3.2), a perturbação da homeostase de Ca^{2+} e o distúrbio da organização do fuso acromático durante a mitose. Desta forma, comprovaram que a estimulação através de materiais piezoelétricos pode ser uma abordagem promissora para inibir a proliferação de células do cancro da mama.

Adicionalmente, Marino *et al.* [78] também estudaram a influência da estimulação proveniente de materiais piezoelétricos na proliferação de células de glioblastoma, um forma de cancro do cérebro. Similarmente, recobriram nanopartículas de BaTiO_3 com DSPE-PEG e colocaram-nas em contacto com células U-87, uma linha celular de glioblastoma humano primário que é utilizada frequentemente para o estudo de novos tratamentos para os cancros cerebrais. As condições de estimulação e os parâmetros monitorizados foram os mesmos do estudo anterior, tendo constatado que a proliferação celular diminuiu significativamente, pelas mesmas razões que este fenómeno ocorreu nas células do cancro da mama. Porém, a inovação deste estudo foi os autores investigarem uma nova vertente destes materiais. Já tinha sido demonstrado anteriormente em ensaios clínicos que a aplicação de campos eletromagnéticos juntamente com quimioterapia de manutenção aumentou a eficácia dessa terapia na prevenção de relapsos, melhorando a taxa de sobrevivência a longo prazo [79]. Tendo isso em consideração, os autores decidiram averiguar o impacto dos materiais desenvolvidos neste estudo na eficácia da quimioterapia. Para tal, implementaram a estimulação fornecida pelas nanopartículas piezoelétricas juntamente com a

temozolamida, um agente químico usado especificamente para o tratamento do glioblastoma. A partir dos resultados obtidos, concluíram que o efeito antiproliferativo da estimulação elétrica aumentou a sensibilidade das células cancerígenas à quimioterapia, potenciando o efeito apoptótico desta abordagem terapêutica. Este resultado demonstra que a aplicação de estímulos através de materiais piezoelétricos pode intensificar o efeito da quimioterapia, melhorando assim a metodologia de tratamento atual.

Embora os estudos anteriores tenham apresentado resultados promissores da estimulação física na inibição da proliferação de diferentes células cancerígenas, existem outros estudos que sustentam o efeito contrário. Um exemplo é o estudo realizado por Ma *et al.* [80], no qual células de carcinoma pulmonar de Lewis (C57BL) foram cultivadas em hidrogéis de colagénio do tipo 1 colocados sobre uma membrana flexível. Posteriormente, foram aplicados esforços mecânicos cíclicos nessa membrana, tendo concluído que esse tipo de estímulos aumentou a proliferação celular. Outro exemplo é o estudo efetuado por Novak *et al.* [81], no qual células do cancro do ovário foram cultivadas em hidrogéis de colagénio do tipo 1 e estimuladas mecanicamente através de um biorreator tridimensional. Esse biorreator era responsável por aplicar esforços mecânicos na forma de compressão, os quais também favoreceram a proliferação celular. Ambos estes estudos demonstram que a estimulação mecânica pode ter um efeito proliferativo em diferentes células cancerígenas. Uma hipótese que já foi formulada anteriormente e que é fomentada por estes estudos é que a existência de uma elevada pressão intersticial em certos tumores sólidos pode favorecer a proliferação excessiva das células cancerígenas, o que aumenta o carácter maligno e dificulta o tratamento deste tipo de patologia [82].

Através desta análise bibliográfica, verificou-se que existem estudos que confirmam a adequabilidade dos estímulos provenientes de materiais eletroativos na modulação do comportamento de células com e sem patologias e outros que sustentam a premissa de que o efeito antiproliferativo da estimulação física em células cancerígenas pode melhorar a eficácia da quimioterapia. Por outro lado, existem estudos que comprovam que a estimulação mecânica pode aumentar a capacidade de proliferação e invasão das células cancerígenas. No entanto, não foram encontradas informações relativas à aplicação de estímulos físicos em células de RMS, o que revela que o seu efeito neste tipo de cancro aparenta ser desconhecido. Por isso, o principal foco desta dissertação é a avaliação do impacto da estimulação física proporcionada por polímeros piezoelétricos e compósitos magnetoelétricos no comportamento de uma linha celular de RMS, com o intuito de determinar se estes materiais eletroativos podem auxiliar o combate ao cancro muscular.

3. Materiais e Métodos

3.1. Materiais

Os materiais desenvolvidos nesta dissertação têm como matriz polimérica o PVDF ou o P(VDF-TrFE). O PVDF (*Solef 6010*) foi adquirido na *Solvay* e o P(VDF-TrFE) (70/30% mol) foi adquirido na *ARKEMA*. Para preparar as soluções poliméricas, utilizou-se como solvente a dimetilformamida (DMF 99,8%) obtida na *PanReac AppliChem*. No caso dos materiais compósitos, foram utilizadas nanopartículas de Fe_3O_4 (≈ 30 nm) e CoFe_2O_4 (35-55 nm), ambas adquiridas na *Nanoamor*.

3.2. Métodos

3.2.1. Processamento dos materiais eletroativos

Os materiais eletroativos foram processados utilizando duas técnicas distintas: *solvent casting* para a obtenção de filmes e *electrospinning* para a obtenção de fibras. De seguida, serão abordados os conceitos básicos destas técnicas de processamento, assim como os procedimentos experimentais realizados.

3.2.1.1. *Solvent casting*

Solvent casting é uma técnica de processamento de polímeros usada maioritariamente para a produção de filmes finos que podem ser aplicados em múltiplas áreas, desde a eletrónica à engenharia de tecidos [83]. É uma técnica que tem vindo a ser muito explorada devido ao seu custo reduzido e ao tempo de preparação curto, mas principalmente devido à facilidade de manipulação e reprodução das condições. Desta forma, é possível adaptar as propriedades dos filmes obtidos à aplicação desejada e simultaneamente assegurar uma maior reprodutibilidade comparativamente a outras técnicas [83].

A produção de filmes poliméricos por *solvent casting* (Figura 3.1) é muito simples. Primeiro, o polímero é dissolvido num solvente formando uma solução polimérica que posteriormente é depositada num substrato como uma placa de vidro. Essa solução é distribuída uniformemente pela placa com o auxílio de um extensor que regula a espessura do filme. A seguir, permite-se que ocorra a total

evaporação do solvente, restando apenas a matriz polimérica cristalizada. Concluída essa etapa, é possível destacar cuidadosamente o filme [84].

É importante salientar que existem condições neste processo que afetam a cristalização do polímero e, por consequência, a sua morfologia, estrutura cristalina, propriedades de superfície e capacidade de deformação. Essas condições incluem o solvente utilizado e o ambiente em que se dá a evaporação do solvente [83]. No caso dos filmes de PVDF, se a evaporação do solvente for realizada numa estufa com temperatura superior a 70°C e à pressão atmosférica dá-se a formação de um filme sem porosidade, enquanto que se for realizada à temperatura ambiente, o filme obtido apresenta uma estrutura porosa [84].

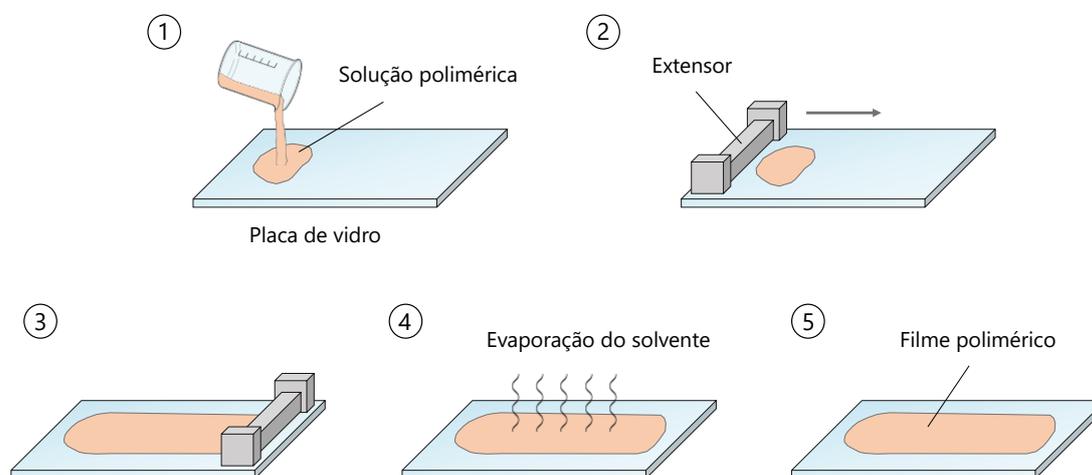


Figura 3.1. Esquema das etapas da produção de filmes poliméricos por *solvent casting*.

Procedimento experimental

Produziram-se quatro filmes distintos, com diferentes polímeros e nanopartículas, cuja designação e composição estão apresentadas na Tabela 3.1. Todas as soluções foram preparadas de forma a obter-se uma concentração de 15% (p/p) de polímero. Para tal, começou-se por dispersar as nanopartículas em DMF sob sonicação durante 3 horas. De seguida, o polímero foi adicionado e dissolvido sob agitação mecânica constante. Quando o polímero estava completamente dissolvido, verteu-se um pouco da solução polimérica na placa de vidro e esta foi distribuída uniformemente pela placa através de um extensor, de forma a obter filmes com uma espessura final de aproximadamente

50 μm . A evaporação do solvente foi feita numa estufa (*P>Selecta*) a 210 °C durante 10 min. Por fim, após arrefecimento à temperatura ambiente, os filmes foram destacados da placa de vidro.

Tabela 3.1. Designação e composição dos filmes produzidos por *solvent casting*.

Designação	Polímero	Nanopartículas	
		Tipo	% (p/p)
PVDF/10FO	PVDF	FO	10
PVDF/20FO	PVDF	FO	20
PVDF/20CFO	PVDF	CFO	20
P(VDF-TrFE)/20CFO	P(VDF-TrFE)	CFO	20

3.2.1.2. *Electrospinning*

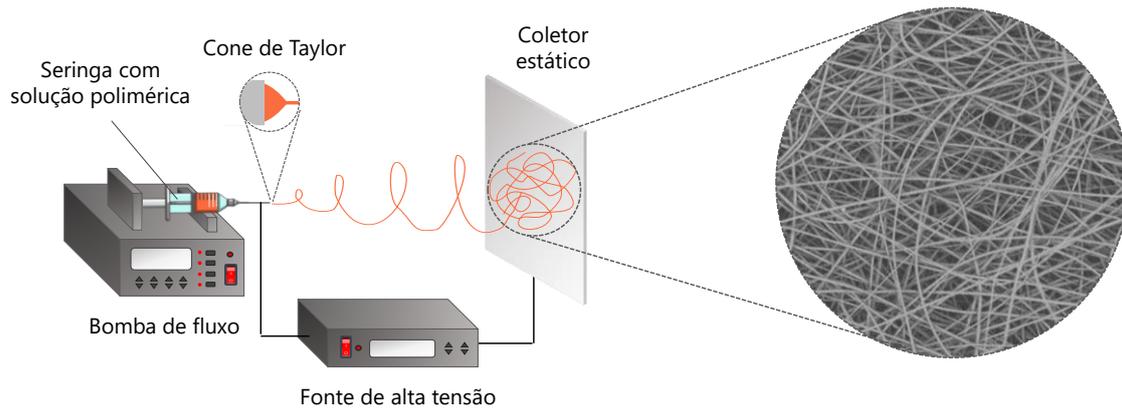
Electrospinning é uma técnica de processamento de polímeros, simples e económica, a partir da qual é possível obter fibras com diâmetros à escala micro ou nanométrica. Esta técnica despertou o interesse da comunidade científica e tem sido utilizada em diversas aplicações, visto que permite produzir membranas compostas por fibras extremamente finas, com uma elevada área de superfície e poros de pequena dimensão [85].

Os aparelhos necessários para a realização do *electrospinning* consistem numa fonte de alta tensão, uma seringa com agulha metálica contendo a solução polimérica (polímero e solvente), uma bomba de fluxo e um coletor condutivo (normalmente revestido por folha de alumínio) [85]. O coletor pode ser adaptado consoante os requisitos, utilizando-se um coletor estático para a obtenção de fibras não orientadas (Figura 3.2a) e um coletor rotativo para a obtenção de fibras orientadas (Figura 3.2b).

O processo baseia-se na aplicação de um campo elétrico cuja função é direcionar a solução polimérica desde a ponta da agulha da seringa até ao coletor, que se encontram sujeitos a cargas opostas [85]. Inicialmente, quando a bomba de fluxo é ativada, forma-se uma gota esférica na ponta da agulha graças à tensão superficial do fluido. A tensão aplicada na agulha metálica provoca o movimento dos iões no interior da solução polimérica. Simultaneamente, a repulsão entre esses iões origina uma força

electroestática que se opõe à tensão superficial. Quando essa força supera a tensão superficial, a gota adquire uma forma cônica (cone de Taylor) e a solução começa a ser ejetada em direção ao coletor, formando-se um jato. Durante o seu percurso até ao coletor, o campo elétrico e a evaporação do solvente promovem o estiramento e afinamento do jato, fazendo com que as fibras depositadas no coletor sejam extremamente finas [85].

a



b

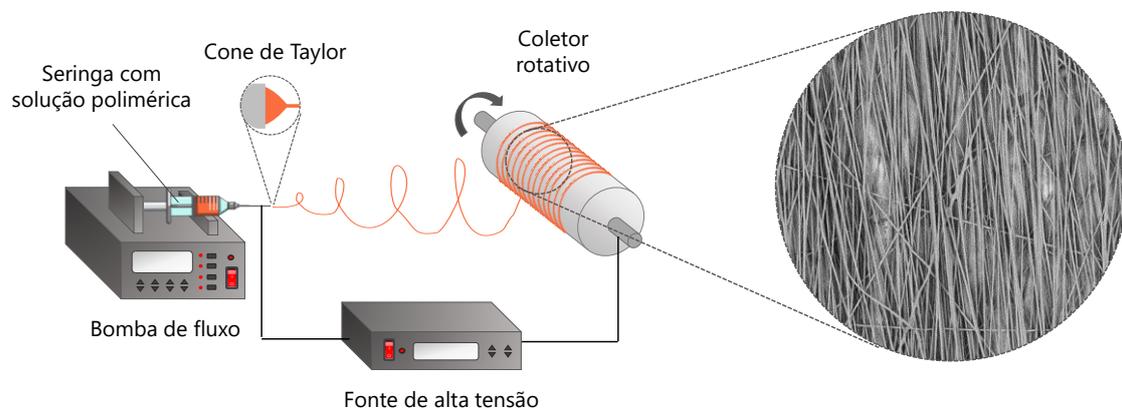


Figura 3.2. Esquema do sistema de *electrospinning* utilizado para a produção de fibras não orientadas (a) e orientadas (b).

Uma das principais vantagens do *electrospinning* é a sua adaptabilidade, uma vez que as propriedades das fibras podem ser ajustadas controlando determinados parâmetros. A Tabela 3.2 resume o efeito destes parâmetros na morfologia das fibras.

Tabela 3.2. Efeito dos parâmetros de *electrospinning* na morfologia das fibras [86-88].

Parâmetros		Efeito na morfologia das fibras
Parâmetros do processo	Tensão aplicada	Aumento da tensão aplicada → Diminuição do diâmetro das fibras
	Fluxo	Aumento do fluxo → Aumento do diâmetro e dos poros das fibras
	Distância da agulha ao coletor	Aumento da distância → Diminuição do diâmetro das fibras
Parâmetros da solução	Solvente	Aumento da volatilidade → Diminuição dos defeitos das fibras
	Concentração do polímero	Aumento da concentração → Aumento do diâmetro das fibras
	Condutividade	Aumento da condutividade → Diminuição do diâmetro das fibras
Parâmetros ambientais	Temperatura	Aumento da temperatura → Diminuição do diâmetro das fibras
	Humidade	Aumento da humidade → Diminuição do diâmetro das fibras

➤ Tensão aplicada

Investigações anteriores demonstraram que aplicação de uma tensão na solução polimérica através da agulha metálica é o fator responsável pela deformação da gota esférica na ponta da agulha originando o cone de Taylor e conseqüente formação de fibras ultrafinas. Este fenómeno apenas ocorre a partir de uma voltagem crítica, sendo que o valor dessa voltagem varia de polímero para polímero. Em geral, verificou-se que um aumento da tensão aplicada induz uma diminuição no diâmetro das fibras graças ao estiramento do jato devido à maior repulsão entre as cargas na solução polimérica [86]. No entanto, a aplicação de uma tensão muito superior ao valor crítico resulta na formação de fibras com defeitos, o que se deve ao aumento do tamanho do cone de Taylor e ao aumento da velocidade do jato para um mesmo valor de fluxo [87].

➤ Fluxo

O fluxo é um parâmetro crucial para o fabrico de fibras uniformes e sem defeitos. Um aumento do fluxo provoca um aumento da velocidade do jato, o que induz a deposição de fibras com um diâmetro superior e poros maiores [87]. Ainda, se o fluxo for demasiado elevado e a velocidade do jato não permitir a evaporação total do solvente, dá-se a formação de fibras molhadas e com defeitos [88].

➤ Distância da agulha ao coletor

A morfologia das fibras é facilmente afetada pela distância da agulha ao coletor, uma vez que esta influencia o tempo de deposição, a taxa de evaporação e o intervalo de instabilidade do jato [86, 88]. Desta forma, consoante a solução polimérica, existe uma distância ideal que permite a formação de fibras uniformes. Constatou-se que os sistemas com uma menor distância da agulha ao coletor têm tendência para gerar fibras molhadas e com defeitos, isto porque o intervalo de tempo que o jato demora a depositar-se pode não ser suficiente para permitir a evaporação total do solvente. Para além disso, uma diminuição dessa distância está associada à produção de fibras com um diâmetro superior, visto que o jato está sujeito a um menor estiramento [86].

➤ Solvente

A seleção do solvente é um fator essencial para o bom funcionamento do *electrospinning* visto que uma etapa importante do processo corresponde à evaporação do solvente durante o percurso do jato desde a agulha ao coletor. O solvente escolhido tem de ser capaz de dissolver o polímero a processar e possuir uma volatilidade adequada [86-88]. Se a volatilidade for muito elevada, o risco de a solução polimérica secar na ponta da agulha e obstruí-la é maior. Contudo, se a volatilidade for muito baixa, o solvente não evapora devidamente, ocorrendo a deposição de fibras molhadas e com defeitos [86].

➤ Concentração do polímero

A concentração do polímero está diretamente relacionada com a viscosidade e a tensão superficial da solução polimérica, fatores que afetam drasticamente a formação das fibras. Quando a concentração de polímero é baixa, ocorre a fragmentação das cadeias poliméricas antes destas atingirem o coletor devido ao efeito do campo elétrico aplicado e da tensão superficial da solução, comprometendo a continuidade e uniformidade das fibras [86]. Por outro lado, um aumento da concentração resulta num aumento da viscosidade da solução e num maior emaranhamento das cadeias poliméricas. Esse

emaranhamento supera o efeito do campo elétrico aplicado e da tensão superficial da solução e permite a deposição de fibras uniformes e contínuas [88]. Para além disso, o aumento da concentração e consequente aumento da viscosidade da solução origina um aumento do diâmetro das fibras [86-88].

➤ Condutividade

O *electrospinning* é um processo que depende das forças de Coulomb entre as cargas presentes na solução polimérica e da força que advém do campo elétrico aplicado. Todavia, se a solução polimérica não for condutora, não ocorre a acumulação de cargas à superfície da solução por ação do campo elétrico, não são geradas as forças eletrostáticas responsáveis pela formação do cone de Taylor e, consequentemente, a deposição de fibras não é possível [87]. Um aumento da condutividade da solução não só permite um aumento da acumulação de cargas à superfície da gota permitindo a formação do cone de Taylor, mas também provoca uma diminuição no diâmetro das fibras [86, 87].

➤ Temperatura e humidade

Para além dos parâmetros do processo e da solução, alguns estudos reportaram que as condições ambientais como a temperatura e a humidade também influenciam a morfologia das fibras. Um aumento da temperatura induz dois efeitos distintos: um aumento a taxa de evaporação do solvente e uma diminuição da viscosidade da solução. Ambos resultam numa diminuição do diâmetro das fibras [88]. Relativamente à humidade, esta controla a cristalização do polímero e, quanto maior for, menor será o diâmetro das fibras [87].

Procedimento experimental

Produziram-se três tipos de fibras distintos com e sem nanopartículas, cuja designação, composição e orientação estão apresentadas na Tabela 3.3. Para a preparação da solução polimérica sem nanopartículas, o PVDF foi dissolvido em DMF a 30 °C sob agitação magnética constante, de forma a obter uma solução com uma concentração de 15% (p/p) de polímero. Quando o polímero se encontrava completamente dissolvido, a solução foi transferida para uma seringa de 10 mL com uma agulha metálica de diâmetro 0,5 mm. O *electrospinning* foi realizado com uma fonte de alta tensão da *Matsusada* (modelo AU-30P1-L) a 14 kV e uma bomba da *Syringe Pump* (modelo NE-1000), na qual se definiu um fluxo de 0,3 mL/h. Recorreu-se a um coletor plano e estático de alumínio para a obtenção de

fibras não orientadas e um coletor cilíndrico de alumínio com uma rotação de 1500 rpm para a obtenção de fibras orientadas. Ambos os coletores foram colocados a 20 cm da ponta da agulha.

Tabela 3.3. Designação, composição e orientação das fibras produzidas por *electrospinning*.

Designação	Polímero	Nanopartículas		Orientação
		Tipo	% (p/p)	
PVDF NO	PVDF	-	-	Não orientadas
PVDF O	PVDF	-	-	Orientadas
PVDF/10FO O	PVDF	FO	10	Orientadas

Para a preparação da solução polimérica com nanopartículas, numa primeira fase, as nanopartículas foram dispersas em DMF sob sonicação durante 3 h. Posteriormente, o PVDF foi adicionado e dissolvido sob agitação mecânica constante. A solução foi preparada de forma a obter uma concentração de 15% (p/p) de polímero e 10% (p/p) de nanopartículas. O *electrospinning* foi realizado utilizando os mesmos equipamentos, aplicando uma tensão de 15 kV e um fluxo de 0,5 mL/h. Apenas foram produzidas fibras orientadas com o auxílio do mesmo coletor cilíndrico com uma rotação de 1500 rpm colocado a uma distância de 15 cm da ponta da agulha.

3.2.2. Caracterização dos materiais produzidos

Os materiais produzidos foram caracterizados através de microscopia eletrónica de varrimento, medição de ângulos de contacto, espectroscopia de infravermelho com transformadas de Fourier, calorimetria diferencial de varrimento, análise termogravimétrica, ensaios mecânicos e magnetometria de amostra vibrante. Cada uma destas técnicas será apresentada, expondo os princípios de funcionamento e as condições de análise utilizadas.

3.2.2.1. Microscopia eletrónica de varrimento

A microscopia eletrónica de varrimento (SEM do inglês *Scanning Electron Microscopy*) é uma técnica bastante versátil usada para analisar a superfície de materiais à escala micro e nanométrica.

3. Materiais e Métodos

Este tipo de microscopia permite a aquisição de imagens que fornecem informações acerca da topografia, morfologia e composição de uma amostra através da recolha e processamento de sinais que resultam da interação de um feixe de eletrões com um determinado volume de material [89]. Comparativamente à microscopia ótica, esta técnica permite obter imagens com uma resolução significativamente mais elevada [89-91].

Esta técnica requer a utilização de um equipamento complexo que possui vários componentes (Figura 3.3), cada um com uma função importante na obtenção das imagens. O canhão de eletrões no topo do equipamento corresponde à fonte de eletrões, no qual estes são emitidos a partir de um filamento aquecido que funciona como cátodo. O ânodo consiste num disco com um orifício que tem como função a acelerar o feixe emitido. As lentes convergentes são lentes magnéticas que reduzem o diâmetro do feixe de eletrões, garantindo que este incide apenas numa pequena área da amostra. As bobines defletoras provocam a deflexão do feixe de eletrões em múltiplas direções, fazendo com que este alcance diferentes pontos da amostra. As lentes objetivas alteram a posição vertical do feixe, sendo essenciais para focar imagem. Os detetores encontram-se na mesma câmara que a amostra, abaixo das lentes objetivas. Estes são responsáveis por capturar os sinais emitidos pela amostra e atuam como transdutores, transformando esses sinais em sinais elétricos. A amostra é colocada num suporte que possibilita ajustar a sua posição em múltiplas direções. A imagem é obtida por processamento computacional dos sinais emitidos pela amostra após o varrimento contínuo da sua superfície pelo feixe de eletrões [90].

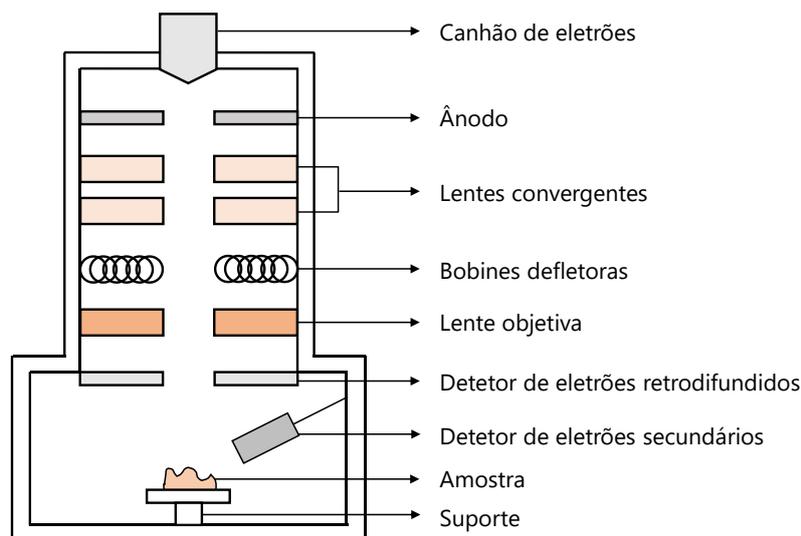


Figura 3.3. Esquema de um equipamento de SEM e respetivos constituintes. Adaptada de [91, 92].

A análise através de SEM apenas é possível se a amostra for preparada de uma forma correta. Amostras metálicas não necessitam de nenhuma preparação, uma vez que a natureza condutora dos metais permite o fluxo de corrente através da amostra após o bombardeamento por elétrons. No entanto, as amostras cerâmicas, poliméricas e especialmente as biológicas necessitam de ser revestidas por uma camada fina de um material condutor para evitar a acumulação de cargas à superfície que impossibilita a obtenção da imagem [91]. Normalmente, estas amostras são preparadas através da deposição de uma camada de ouro ou de uma liga de ouro e paládio por pulverização catódica [89, 91]. Para além da preparação das amostras, a obtenção de imagens por SEM apenas é possível se o vácuo for mantido no interior do equipamento, uma vez que os elétrons apenas são capazes de percorrer uma distância muito pequena através do ar [90, 91].

A interação entre o feixe de elétrons e o material resulta na emissão de diferentes sinais, nomeadamente elétrons retrodifundidos, elétrons secundários, raios-X característicos, elétrons de Auger, entre outros [90]. Os sinais mais utilizados na obtenção de imagens de SEM são os elétrons retrodifundidos e os elétrons secundários. Os elétrons retrodifundidos resultam da interação elástica do feixe com os átomos da amostra e são emitidos na mesma direção do feixe, com uma perda de energia reduzida e elevada velocidade. Os elementos químicos com um número atômico maior emitem um maior número de elétrons retrodifundidos que os elementos químicos com um número atômico menor, o que permite diferenciar fases da amostra compostas por elementos diferentes. Geralmente, os átomos com um número atômico mais elevado aparecem mais claros nas imagens de SEM, enquanto que os átomos com um número atômico mais baixo aparecem mais escuros [92]. Os elétrons secundários resultam da interação inelástica do feixe com os elétrons de valência dos átomos da amostra, provocando a ejeção desses elétrons. Comparativamente aos elétrons retrodifundidos, os elétrons secundários possuem uma menor energia, velocidade reduzida e não fornecem informação acerca da composição, apenas da topografia [90, 92]. As imagens de SEM podem ser formadas com base num único sinal, correspondendo a uma análise mais rápida, ou combinando múltiplos sinais, sendo uma análise mais demorada que permite obter uma melhor resolução [92].

Condições de análise

As amostras foram preparadas para análise através da deposição de uma camada fina de ouro por pulverização catódica no aparelho *Quorum Emitech K550 Sputter Coater*. As imagens de SEM foram recolhidas no equipamento *Hitachi S-4800* com uma aceleração de 10 kV. A distribuição dos diâmetros

das fibras produzidas foi calculada através da medição de 50 fibras usando imagens com uma ampliação de x5.0k e o software *ImageJ*.

Para avaliar o encapsulamento e a dispersão das nanopartículas, foram utilizadas amostras sem deposição de ouro e o equipamento Hitachi S-3400 no modo de detecção de elétrons retrodifundidos (BSE), com uma aceleração de 20 kV.

3.2.2.2. Medição do ângulo de contacto

A medição do ângulo de contacto permite avaliar a molhabilidade de uma superfície por um líquido. Normalmente, o líquido utilizado é a água e, desta forma, é possível determinar a hidrofobicidade do material [93]. Para efetuar a medição, é depositada uma gota com um volume definido sobre a amostra. Após o repouso da gota, é capturada uma imagem e, através de um software informático, a linha de contorno da gota é definida. De seguida, o ângulo de contacto (Figura 3.4) é calculado, correspondendo ao ângulo entre a tangente à linha de contorno da gota (interface entre o líquido e o vapor) e a tangente à superfície da amostra (interface entre o sólido e o líquido). A superfície é considerada hidrofílica se o ângulo de contacto for inferior a 90° e hidrofóbica se for superior a 90° [93].

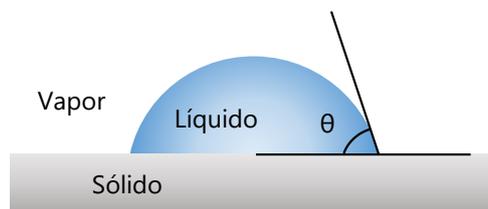


Figura 3.4. Representação do ângulo de contacto (θ) de uma gota numa superfície sólida. Adaptada de [93].

Condições de análise

O equipamento e o software utilizados para a medição do ângulo de contacto foram o *Dataphysics Contact Angle System OCA* e o *SCA 20*, respetivamente. O volume definido para cada gota foi $3 \mu\text{L}$, o líquido escolhido foi água ultrapura à temperatura ambiente e foram realizadas 6 medições em pontos diferentes para cada amostra.

3.2.2.3. Espetroscopia de infravermelho com transformadas de Fourier

A espectroscopia de infravermelho com transformadas de Fourier (FTIR do inglês *Fourier Transform Infrared Spectroscopy*) é uma técnica de caracterização que fornece informações acerca da composição e estrutura molecular de uma amostra, permitindo identificar os grupos funcionais nela presentes [94].

O FTIR baseia-se no facto das ligações químicas possuírem frequências e amplitudes de vibração específicas que dependem de vários fatores, incluindo os átomos envolvidos [92]. Quando uma molécula é exposta à radiação infravermelha, esta absorve as gamas da radiação com uma energia igual à necessária para provocar a vibração das suas ligações químicas [94]. Os movimentos vibracionais de uma molécula podem envolver alterações a nível do comprimento (estiramento) ou do ângulo (flexão) das ligações químicas, existindo múltiplas variações (Figura 3.5). No entanto, apenas as vibrações assimétricas, capazes de provocar uma alteração do momento dipolar da molécula, são identificadas através de infravermelhos [94, 95].

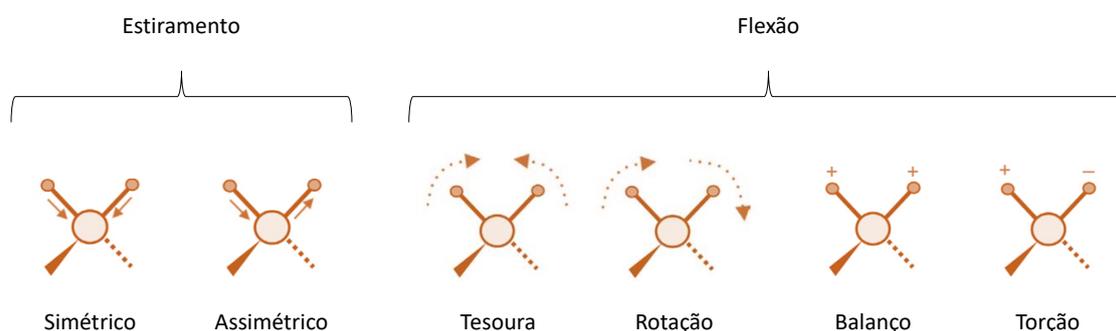


Figura 3.5. Representação dos diferentes tipos de vibração de uma molécula quando é exposta a radiação infravermelha. Adaptada de [92].

Um espectrofotómetro de FTIR (Figura 3.6) possui uma fonte responsável por emitir um feixe de radiação infravermelha que contém os comprimentos de onda que se pretende analisar. Esse feixe é direcionado para um interferómetro, um dispositivo composto por vários espelhos, sendo um deles movido por um motor. Após atravessar o interferómetro, o feixe de radiação interage com a amostra, sofrendo transmissão ou reflexão consoante o tipo de análise efetuada. Após a absorção das gamas características por parte da amostra, o feixe de radiação resultante atinge o detetor, que tem como função transmitir os dados para o computador. Os dados brutos correspondem ao interferograma, que relaciona

a intensidade do sinal detetado com a posição do espelho. Por fim, o interferograma é convertido num espectro através de um algoritmo que implementa transformadas de Fourier [96]. Geralmente, o espectro é apresentado sob a forma de um gráfico que expressa a transmitância em percentagem (energia da radiação que não foi absorvida pela amostra) por número de onda em cm^{-1} (inverso do comprimento de onda). Como a maioria dos grupos funcionais são responsáveis pela absorção de radiações infravermelhas com um número de onda compreendido entre os 4000 e 400 cm^{-1} , essa é a gama mais utilizada nesta técnica [95, 96].

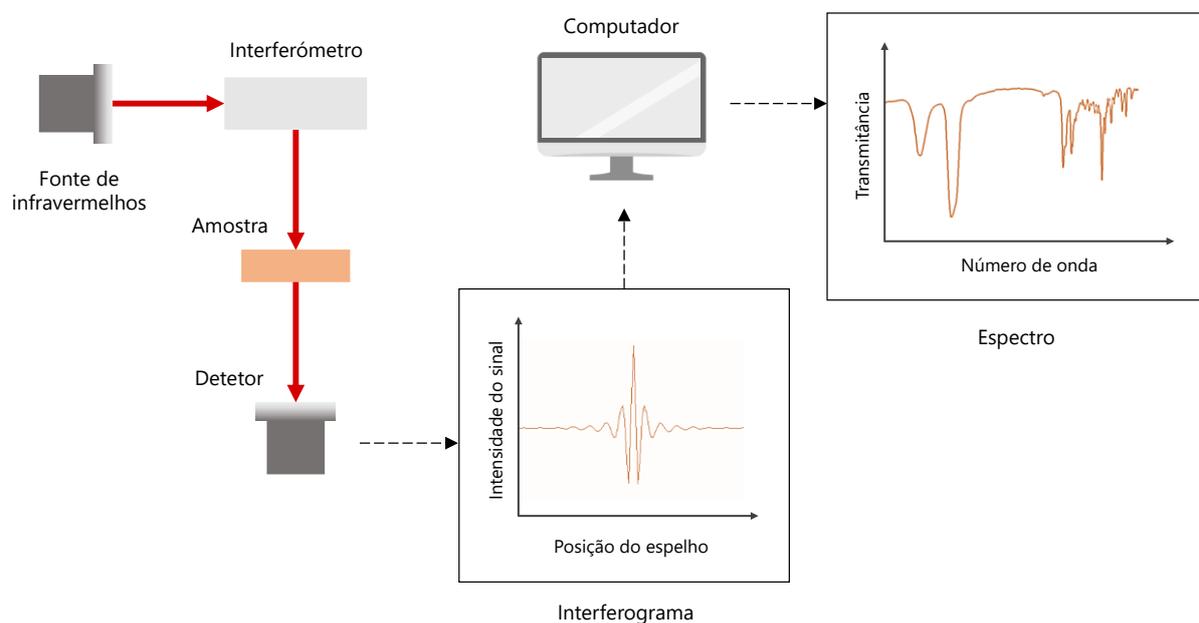


Figura 3.6. Diagrama do funcionamento de um espectrofotômetro de FTIR. Adaptada de [95].

Após a descoberta desta técnica, os cientistas estudaram a absorção de radiação infravermelha de múltiplas substâncias, identificando as bandas de absorção características de vários grupos funcionais e moléculas [96]. Uma vez obtido o espectro de absorção de uma amostra, é possível detetar as bandas de absorção (picos do gráfico) e compará-las com a literatura de forma a determinar a sua constituição.

Para além da identificação das fases de PVDF presentes numa amostra, o FTIR também permite a determinação da quantidade relativa de fase β . Segundo Gregorio *et al.* [97], a fração de fase β numa amostra contendo as fases α e β do PVDF pode ser calculada a partir da equação 3.1, na qual $F(\beta)$

representa a fração de fase β , A_α e A_β a absorção a 763 e 840 cm^{-1} , K_α e K_β os coeficientes de absorção naqueles números de onda, cujos valores são $6,2 \times 10^4$ e $7,7 \times 10^4$ cm^2/mol , respetivamente.

$$F(\beta) = \frac{A_\beta}{(K_\beta/K_\alpha) A_\alpha + A_\beta} \quad (3.1)$$

Condições de análise

O espectro de absorção das amostras foi obtido utilizando o espectrofotómetro *Bruker FTIR Spectrometer ALPHA II* e o respetivo sistema acessório de reflexão total atenuada (ATR do inglês *Attenuated Total Reflectance*). A análise foi feita num intervalo compreendido entre os 600 e os 4000 cm^{-1} , com uma resolução de 4 cm^{-1} , realizando-se 64 varrimentos para cada amostra.

3.2.2.4. Calorimetria diferencial de varrimento

A calorimetria diferencial de varrimento (DSC do inglês *Differential Scanning Calorimetry*) é uma técnica de análise térmica que permite medir o fluxo de calor associado às transições de um material em função da sua temperatura [98]. Para tal, é necessária uma amostra do material que pretendemos analisar e um material de referência, os quais são colocados no interior de um cadinho feito de um material com uma elevada condutividade térmica [99]. Normalmente, a referência costuma ser o ar, utilizando-se um cadinho vazio. A análise é feita num instrumento que pode ser de dois tipos: DSC de fluxo de calor e DSC com compensação de potência [100]. No caso do DSC de fluxo de calor, o instrumento possui apenas uma câmara na qual se coloca tanto o cadinho da amostra e como o cadinho da referência. A amostra e a referência são aquecidas a partir do mesmo sistema de aquecimento, medindo-se a diferença de temperatura entre elas através de sensores de temperatura acoplados aos cadinhos. Posteriormente, o software do sistema converte a diferença de temperatura medida em fluxo de calor e gera um gráfico do fluxo de calor em função da temperatura da amostra [99, 100]. O princípio de funcionamento de DSC com compensação de potência (Figura 3.7) é semelhante, mas o instrumento possui duas câmaras, uma para a amostra e outra para a referência, cada uma com um sistema de aquecimento independente. Durante a análise, o instrumento atua de forma a que a diferença de temperatura entre a amostra e a referência seja sempre nula. Quando ocorre uma transição térmica na amostra, a potência do sistema de aquecimento da amostra tem de ser ajustada, de forma a manter a

temperatura da amostra igual à da referência. Esta diferença de potência é medida e equivale à energia do fluxo de calor que ocorre na amostra [100].

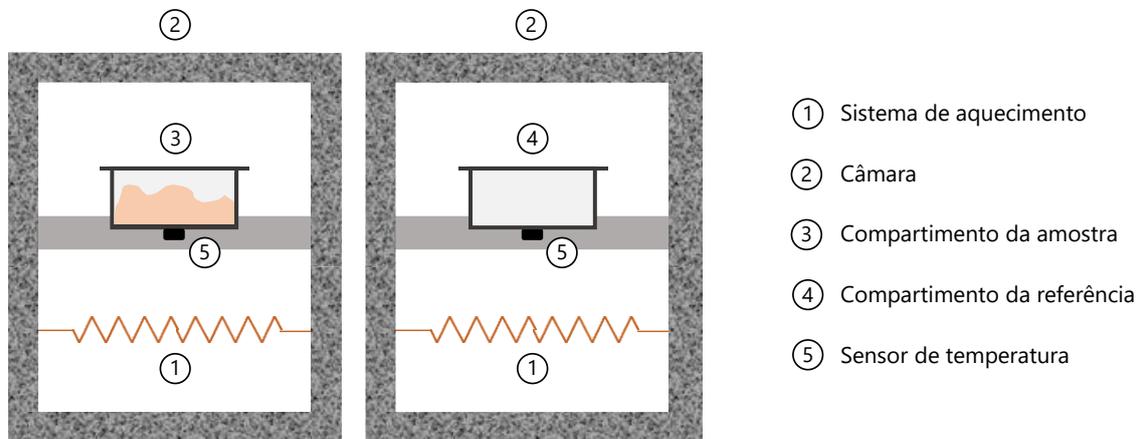


Figura 3.7. Esquema de um instrumento de DSC com compensação de potência. Adaptada de [100].

Durante este tipo de análise, o aquecimento do material origina diferentes transições que se traduzem de uma forma característica na curva de DSC (Figura 3.8). Dependendo da natureza da transição térmica, o fluxo de calor associado pode ser do exterior para a amostra (endotérmico) ou da amostra para o exterior (exotérmico) [99]. Para uma correta interpretação da curva de DSC, é essencial sinalizar a direção na qual se observa um fluxo endotérmico, que geralmente é na direção positiva do eixo vertical. A primeira transição que se pode detetar num material polimérico é a transição vítrea, ocorrendo apenas em materiais amorfos, a baixas temperaturas. Esta corresponde a um aumento da mobilidade das cadeias poliméricas, fazendo com que o material passe de um estado frágil (vidro) para um estado mais viscoso (borracha). Esta transição consiste num processo endotérmico que se traduz numa subida da linha base da curva de DSC [101]. Após a transição vítrea, o aumento da temperatura pode induzir a cristalização a frio de certos materiais. Este tipo de cristalização ocorre devido à elevada mobilidade das cadeias poliméricas, que se organizam de forma compacta e estruturada, resultando na libertação de energia por parte do material. Este processo exotérmico traduz-se num pico negativo na curva de DSC, cuja área é proporcional à entalpia de transição da cristalização a frio (ΔH_c). Por fim, o aquecimento adicional do material provoca a sua fusão, um processo endotérmico que se reflete num pico positivo na curva de DSC, cuja área é proporcional à entalpia de transição da fusão (ΔH_f) [101].

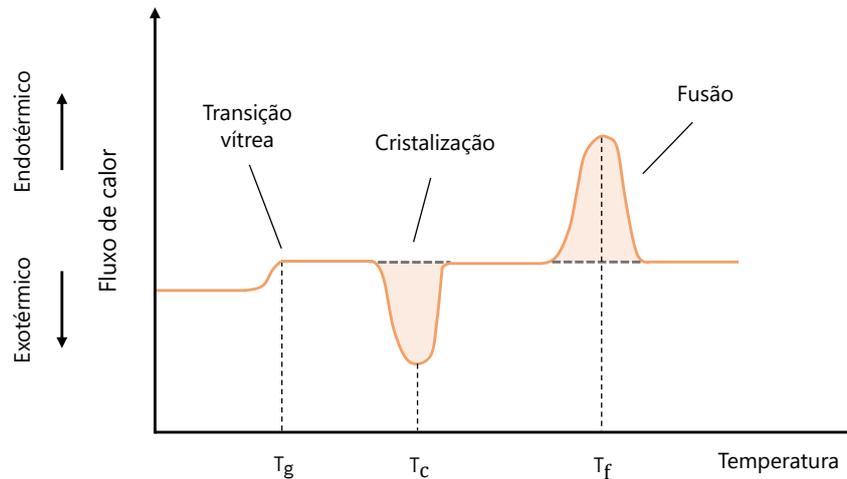


Figura 3.8. Representação das possíveis transições de um material polimérico numa curva de DSC. T_g - Temperatura de transição vítrea. T_c - Temperatura de cristalização. T_f - Temperatura de fusão. Adaptada de [101].

Para além da determinação das temperaturas de transição vítrea, de cristalização e de fusão, esta técnica de caracterização também permite calcular o grau de cristalinidade de um material. Para amostras compostas por ambas as fases α e β do PVDF, o grau de cristalinidade pode ser calculado a partir da equação 3.2, na qual ΔX_c representa o grau de cristalinidade, ΔH_f a entalpia de fusão da amostra, x e y a quantidade de fase α e β , respetivamente, e ΔH_α e ΔH_β as entalpias de fusão de uma amostra 100% cristalina na fase α e β , cujos valores são 93,07 e 103,4 J/g, respetivamente [102].

$$\Delta X_c = \frac{\Delta H_f}{x \Delta H_\alpha + y \Delta H_\beta} \quad (3.2)$$

No caso de amostras de P(VDF-TrFE), como este copolímero apenas é constituído pela fase β , o grau de cristalinidade é calculado a partir de uma equação diferente (equação 3.3), na qual ΔX_c representa o grau de cristalinidade, ΔH_f a entalpia de fusão da amostra e ΔH_{100} a entalpia de fusão do copolímero 100% cristalino, cujo valor é 66 J/g [103].

$$\Delta X_c = \frac{\Delta H_f}{\Delta H_{100}} \quad (3.3)$$

Condições de análise

A análise das amostras por DSC foi realizada num equipamento *Perkin-Elmer DSC 8000*, cujo princípio de funcionamento é o DSC com compensação de potência. O varrimento das temperaturas foi feito entre os 0 e os 200 °C, a uma velocidade de 10 °C/min, numa atmosfera de azoto. Utilizaram-se cadinhos de alumínio de 30 µL, sendo a referência um cadinho vazio.

3.2.2.5. Análise termogravimétrica

A análise termogravimétrica (TGA do inglês *Thermogravimetric Analysis*) é uma técnica que permite avaliar a estabilidade térmica de um material através da determinação de variações na massa em função da temperatura [98, 99]. Os principais componentes de um equipamento de TGA (Figura 3.9) são uma balança com elevada sensibilidade e uma fornalha programável para regular a taxa de aquecimento da amostra. A balança encontra-se acima da fornalha e está termicamente isolada. No interior da fornalha encontra-se uma câmara de forma cilíndrica com o sistema de aquecimento em redor das suas paredes. Um arame é suspenso da balança para o interior dessa câmara, encontrando-se no final do arame um suporte para colocar a amostra. Um sensor de temperatura é colocado abaixo da amostra, com o objetivo de garantir o gradiente de temperatura desejado. Durante a análise, o sistema de purga é responsável pela entrada e saída de um gás na câmara com o objetivo de manter a atmosfera inerte. Para além disso, o equipamento encontra-se ligado a um computador capaz de gerar um termograma, que consiste num gráfico com a percentagem de massa da amostra em função da temperatura [100, 104].

Um termograma de TGA (Figura 3.10) fornece informações relevantes acerca da degradação do material analisado. A temperatura inicial de degradação (T_{onset}) é a temperatura a partir da qual o material começa a sofrer degradação e, conseqüentemente, se verifica uma diminuição súbita na massa [92, 100]. Esta temperatura corresponde ao ponto de interseção entre o prolongamento da porção da curva antes da degradação e a tangente à porção da curva onde se verifica a diminuição mais acentuada da massa da amostra [92]. Para facilitar a interpretação, usualmente é aplicada uma derivada de primeira ordem na curva do termograma. Através dessa derivada, é possível analisar as diferentes taxas de degradação, correspondendo o pico da derivada ao ponto no qual a variação da massa é mais acentuada [92, 100]. A massa residual obtida no final do TGA corresponde à massa das cinzas resultantes do processo de pirólise [92].

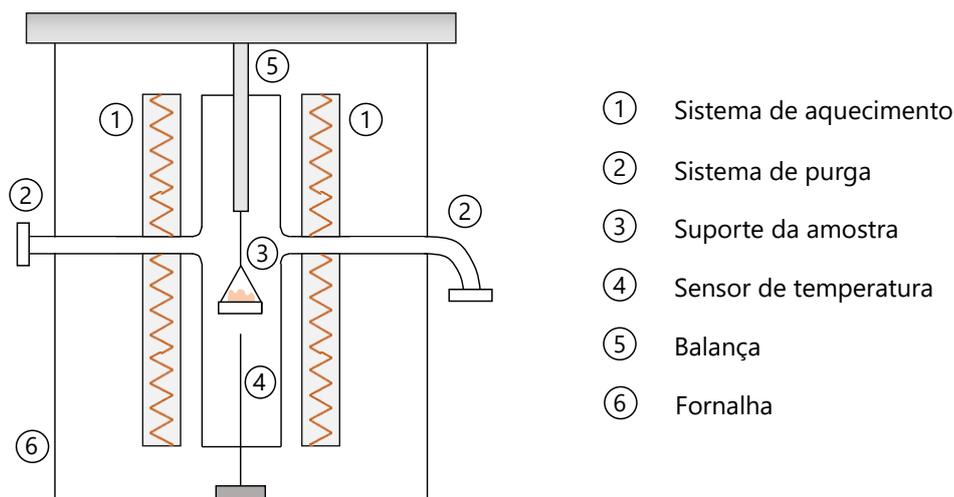


Figura 3.9. Esquema de um equipamento de TGA. Adaptada de [100].

Condições de análise

A análise termogravimétrica foi realizada no equipamento *Mettler Toledo TGA/SDTA851*, utilizando cadinhos de cerâmica. Os ensaios foram feitos entre os 25 e 900 °C, com uma taxa de aquecimento de 10 °C/min numa atmosfera de azoto.

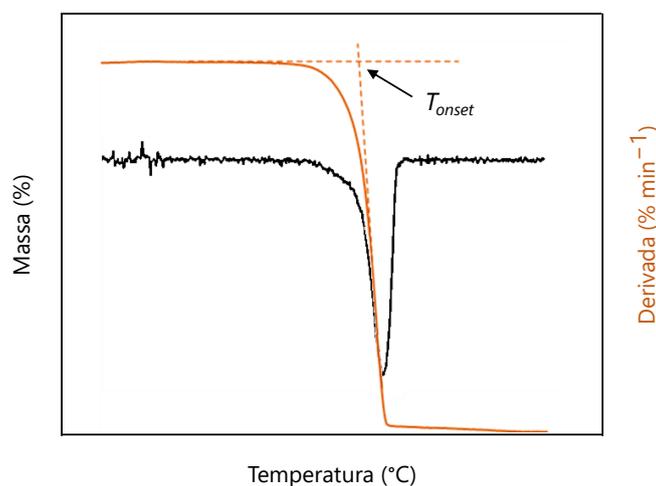


Figura 3.10. Exemplo de um termograma de TGA e respectiva derivada, obtidos a partir do aquecimento de um material polimérico. T_{onset} - Temperatura inicial de degradação. Adaptada de [92].

3.2.2.6. Ensaio mecânicos

A determinação das propriedades mecânicas de um material é importante para avaliar a sua adequabilidade à aplicação proposta. Estas propriedades podem ser determinadas através de ensaios mecânicos nos quais são aplicados esforços sobre o material e a sua resposta é monitorizada. A seleção do teste mais apropriado depende não só da propriedade mecânica que se pretende determinar, mas também da natureza do material e respetiva aplicação. No caso de materiais de suporte celular, uma propriedade mecânica relevante é a elasticidade, uma vez que esta pode influenciar a proliferação e diferenciação das células, nomeadamente das células musculares [105-107].

Um dos ensaios mecânicos mais utilizados para determinar a elasticidade de um material é o ensaio de tração. Neste tipo de ensaio, é utilizado um equipamento (Figura 3.11) capaz de aplicar uma tensão uniaxial na amostra até à sua rutura [108]. Para tal, a amostra é fixa ao equipamento através de duas garras. De seguida, uma das extremidades da amostra permanece fixa e a outra extremidade é tracionada, ocorrendo um estiramento.

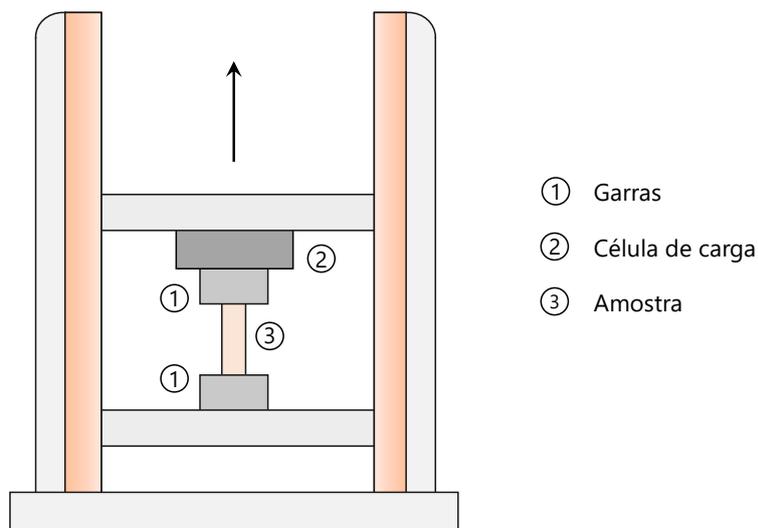


Figura 3.11. Esquema do equipamento utilizado para os ensaios mecânicos.

Durante o ensaio, a intensidade da força aplicada é medida por uma célula de carga. Sabendo a área da secção transversal da amostra, é possível determinar a tensão aplicada segundo a equação 3.4, na qual σ representa a tensão, F a força aplicada medida pela célula de carga e S_0 a área da secção transversal inicial da amostra [109].

$$\sigma = \frac{F}{S_0} \quad (3.4)$$

Para além da tensão, medindo as variações no comprimento da amostra ao longo do ensaio e sabendo o comprimento inicial, é possível determinar a deformação da amostra através da equação 3.5, na qual ε representa a deformação, Δl a variação do comprimento da amostra (diferença entre o comprimento naquele instante e o comprimento inicial) e l_0 o comprimento inicial [109].

$$\varepsilon = \frac{\Delta l}{l_0} \quad (3.5)$$

Estes resultados são obtidos recorrendo a um software, sendo possível a partir deles gerar um gráfico que expressa a tensão aplicada em função da deformação da amostra [108].

Durante este tipo de ensaio, os materiais podem exibir dois tipos de comportamento: elástico e plástico. O comportamento elástico está associado a uma deformação reversível, sendo o material capaz retomar à sua forma e dimensões iniciais quando o esforço deixa de ser aplicado. O comportamento plástico verifica-se quando o limite de elasticidade do material é ultrapassado e a deformação torna-se permanente e irreversível [109]. Estes dois comportamentos manifestam-se de forma distinta na curva de tensão-deformação (Figura 3.12), sendo facilmente identificados. Numa fase inicial, verifica-se que a curva apresenta uma forma linear, sendo a tensão proporcional à deformação. Essa linearidade está associada ao comportamento elástico e pode ser descrita pela lei de Hooke (equação 3.6), na qual σ representa a tensão, ε a deformação e E o módulo de Young do material, podendo também ser denominado módulo de elasticidade.

$$\sigma = E \varepsilon \quad (3.6)$$

O módulo de Young corresponde ao declive da região linear da curva de tensão-deformação e consiste numa medida da resistência do material à deformação elástica [108]. O limite de elasticidade do material corresponde ao ponto da curva a partir do qual deixa de existir uma proporcionalidade entre a tensão e a deformação, passando o material a apresentar um comportamento plástico [108, 110]. Uma vez ultrapassado o limite de elasticidade, o material continua a deformar como consequência do aumento da tensão aplicada, até se dar a rutura do mesmo [110].

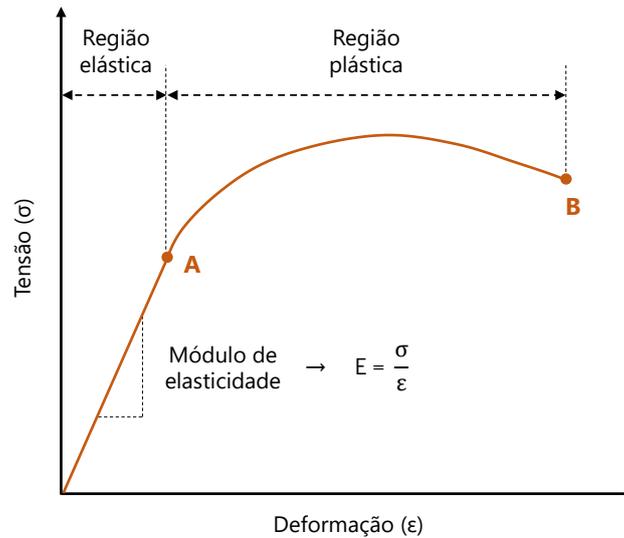


Figura 3.12. Curva de tensão-deformação típica de um material polimérico obtida a partir de um ensaio de tração. Ponto A - Limite de elasticidade. Ponto B - Rutura do material. Adaptada de [108].

Para além do ensaio de tração, os ensaios mecânicos dinâmicos são outra forma de caracterização interessante para avaliar a evolução do comportamento de um material sujeito a tensões ou deformações que oscilam durante um determinado período de tempo. Este tipo de ensaio é importante porque a aplicação de esforços repetidamente sobre um material pode alterar as suas propriedades e induzir a sua falha para valores de tensões e de deformação inferiores aos esperados, fenómeno que se designa de fadiga [92, 108]. Este ensaio complementar foi efetuado como prova de conceito para trabalhos futuros, uma vez que este tipo de esforços podem ser aplicados nos materiais de suporte celular através de um biorreator como forma de estimulação mecânico-elétrica das células [111].

Durante os ensaios mecânicos dinâmicos, o material é submetido a esforços cíclicos que podem ser de diferentes naturezas (tração, compressão, flexão, torção) e seguir diferentes padrões (onda sinusoidal, onda quadrada, onda triangular) [92, 112]. Neste trabalho, os ensaios foram realizados no modo de tração uniaxial (Figura 3.13a) de forma a que, durante cada ciclo, a amostra fosse estirada até um determinado valor de deformação e de seguida retornasse ao ponto inicial, mantendo a velocidade sempre constante (Figura 3.13b). Tal como no ensaio de tração, as tensões e deformações a que a amostra estava sujeita foram monitorizadas, o que permitiu elaborar curvas de tensão-deformação para os vários ciclos e avaliar a resposta do material.

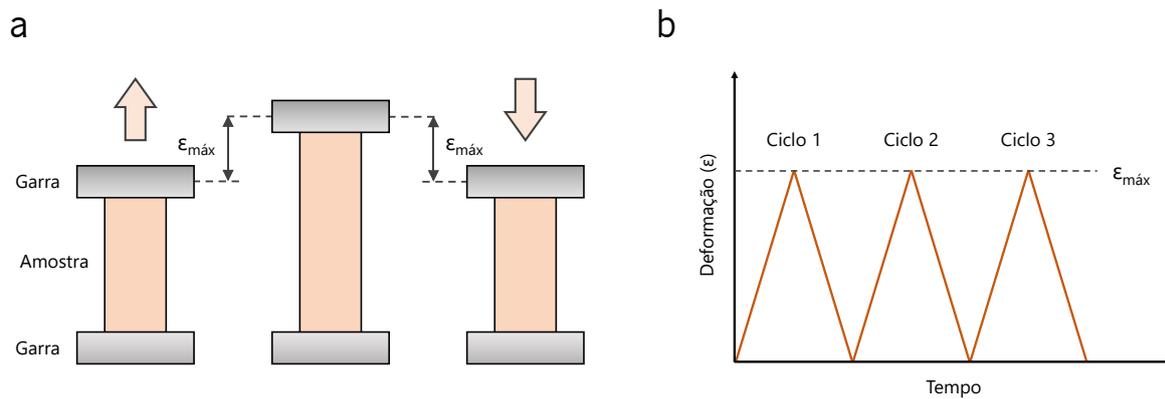


Figura 3.13. Esquema do tipo de ensaio mecânico dinâmico realizado (a) e da variação da deformação durante os ciclos (b).

Nos materiais poliméricos, a relação linear entre a tensão e a deformação, descrita pela lei de Hooke (equação 3.6), apenas se verifica em condições muito específicas e para deformações muito pequenas como as que se observam no início do ensaio de tração. No entanto, os polímeros são materiais tipicamente com um comportamento inelástico que está relacionado com a sua natureza viscoelástica [113]. Os materiais viscoelásticos possuem propriedades mecânicas com uma componente elástica, responsável pela acumulação de energia, e uma componente viscosa, associada a uma dissipação de energia [113]. Por esta razão, quando submetidos a esforços cíclicos, os polímeros não apresentam um comportamento perfeitamente elástico, o que se manifesta na curva de tensão-deformação (Figura 3.14). Neste tipo de ensaios, durante a aplicação do esforço (fase de carga), o material absorve energia e quando o esforço deixa de ser aplicado (fase de descarga), a totalidade ou uma parte dessa energia é libertada. A quantificação da energia absorvida e libertada pode ser feita através da área abaixo da curva de tensão-deformação durante a fase de carga e de descarga, respetivamente [112, 113]. No caso dos materiais perfeitamente elásticos, as curvas na fase de carga e descarga são coincidentes, o que significa que a energia absorvida e libertada pelo material são iguais, verificando-se uma recuperação total [114]. Por sua vez, nos materiais viscoelásticos, as curvas na fase de carga e descarga são diferentes, surgindo uma histerese que evidencia a diferença entre a energia absorvida e libertada pelo material. Essa diferença deve-se à dissipação de energia através de mecanismos internos como a fricção provocada pelo movimento das cadeias poliméricas. A energia dissipada durante este processo corresponde à área no interior da curva. Ainda, nestes materiais, a amostra pode recuperar as suas dimensões iniciais no

final de um ciclo tal como um material perfeitamente elástico ou sofrer uma deformação residual que pode ser recuperada com o tempo ou tornar-se permanente [114].

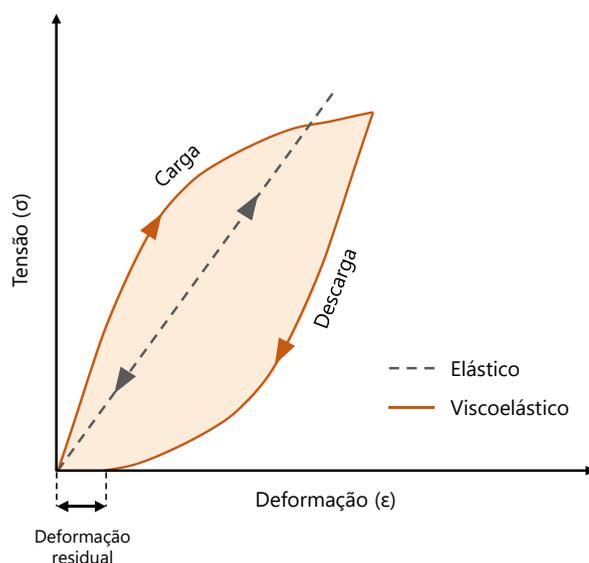


Figura 3.14. Curva de histerese de um material viscoelástico comparativamente à curva de um material perfeitamente elástico. Adaptada de [114].

Condições de análise

Os ensaios mecânicos foram efetuados no equipamento *Shimadzu AG-IS* e os dados foram recolhidos através do software *Trapezium*. As amostras foram recortadas numa geometria retangular com dimensões de 30x10 mm. Todos os ensaios foram realizados no modo de tensão, com uma velocidade de 1 mm/min e à temperatura ambiente. Nos primeiros ensaios, todas as amostras foram estiradas até à sua rutura, enquanto que nos ensaios dinâmicos foram aplicados 1000 ciclos com 0,5%, 1% e 2% de deformação apenas às fibras de PVDF orientadas (PVDF O). É importante salientar que as fibras orientadas foram estiradas paralelamente à sua orientação. O módulo de Young foi sempre calculado entre os valores de 0 e 0,5% de deformação.

3.2.2.7. Magnetometria de amostra vibrante

A magnetometria de amostra vibrante (VSM do inglês *Vibrating Sample Magnetometry*) é uma técnica que permite medir a magnetização de uma amostra exposta a um determinado campo

magnético. Este tipo de caracterização é importante para determinar as propriedades magnéticas de um material e estimar o seu comportamento em determinadas condições, as quais podem ser utilizadas numa aplicação específica.

Esta técnica é realizada num equipamento (Figura 3.15) composto por dois eletroímãs responsáveis por gerar um campo magnético. O seu princípio de funcionamento tem como base a Lei de Faraday acerca da indução magnética [115]. Durante a medição, a amostra é fixa na extremidade de um suporte, posicionada entre os eletroímãs e sujeita a uma vibração constante ao longo do eixo vertical. A alteração do campo magnético é proporcional à magnetização da amostra, induzindo uma diferença de potencial que é detetada por um conjunto de bobines situadas junto aos eletroímãs. Posteriormente, o sinal associado a essa diferença de potencial é processado através de um amplificador, permitindo obter a magnetização da amostra. Desta forma, é possível gerar uma curva que relaciona a magnetização da amostra com a intensidade do campo magnético aplicado [115, 116].

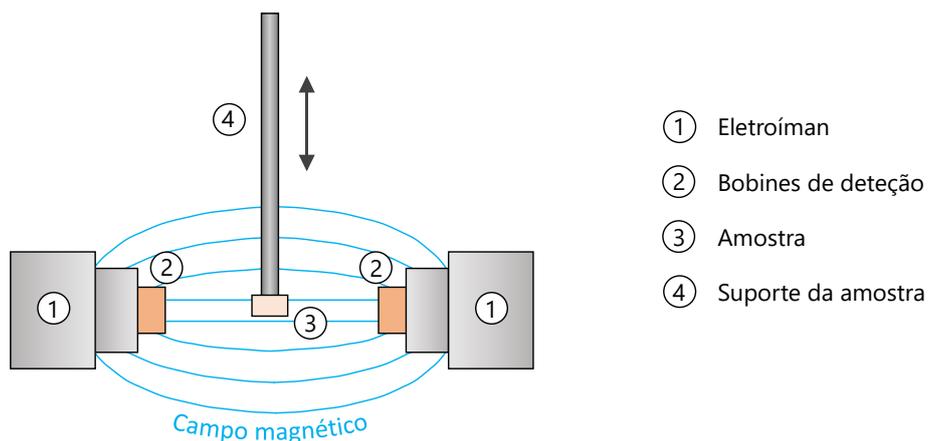


Figura 3.15. Esquema de uma parte do equipamento de VSM. Adaptada de [116].

Em geral, os materiais magnéticos possuem momentos que se alinham paralelamente quando submetidos a um campo magnético, surgindo uma magnetização no mesmo sentido desse campo [117]. À medida que a intensidade do campo aumenta, ocorre o alinhamento de um maior número de momentos, até se encontrarem todos alinhados e se atingir a magnetização de saturação (M_S) [118]. No entanto, consoante a sua composição, tamanho e estrutura, os materiais magnéticos podem apresentar algumas características distintas. No caso dos materiais compósitos poliméricos com nanopartículas magnetostritivas, as nanopartículas são a fase responsável pelas propriedades magnéticas. Estas

costumam possuir um comportamento ferromagnético, paramagnético ou superparamagnético [119], o qual pode ser identificado a partir da sua curva de magnetização (Figura 3.16).

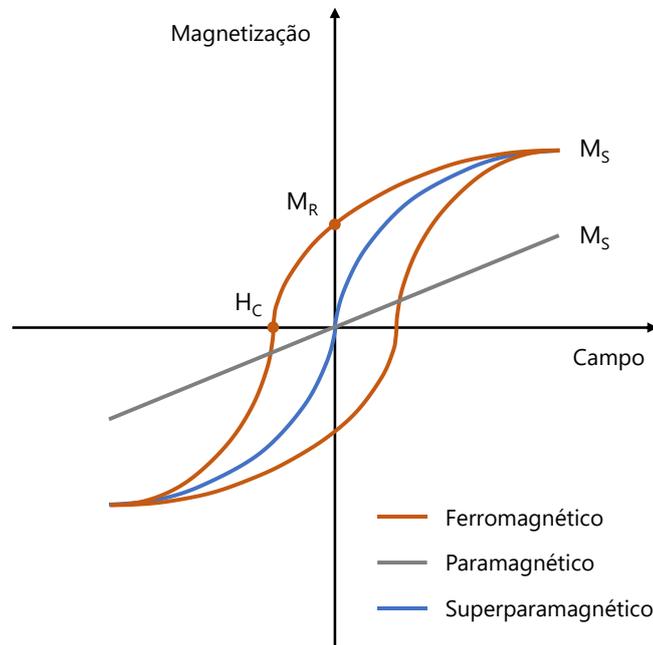


Figura 3.16. Curva de magnetização típica de um material ferromagnético, paramagnético e superparamagnético. M_S – Magnetização de saturação. M_R – Magnetização remanescente. H_C – Campo coercivo. Adaptada de [118].

Os materiais ferromagnéticos diferenciam-se dos restantes pela capacidade de permanecerem magnetizados quando o campo magnético deixa de estar presente. Porém, nem todos os momentos mantêm a sua configuração na ausência do campo, sendo a magnetização remanescente (M_R) proporcional à fração de momentos que permanecem alinhados [118]. O campo coercivo (H_C) é o campo magnético que é necessário aplicar para essa fração de momentos ficar novamente desalinhada e o material perder toda a magnetização. Este tipo de comportamento reflete-se numa curva de magnetização específica, na qual é possível observar uma histerese que é consequência da energia perdida pelo material [118].

Os materiais paramagnéticos, por sua vez, são incapazes de manter a sua magnetização na ausência de um campo magnético. Quando este deixa de ser aplicado, o alinhamento dos momentos é perturbado por processos térmicos que aumentam a entropia do material, ocorrendo a sua desmagnetização [120]. Por esta razão, a curva de magnetização destes materiais não apresenta histerese, assemelhando-se a uma reta. Para além disso, os momentos dos materiais paramagnéticos

têm uma maior tendência para permanecerem desalinhados, sendo por isso mais difíceis de magnetizar, conferindo ao material uma menor magnetização de saturação comparativamente aos materiais ferromagnéticos [120].

Os materiais superparamagnéticos possuem algumas características semelhantes aos materiais paramagnéticos, como a incapacidade de manter a sua magnetização na ausência de um campo magnético e consequente inexistência de histerese na curva de magnetização. Contudo, estes materiais possuem algumas particularidades. Usualmente, o comportamento superparamagnético surge em nanopartículas magnéticas com dimensões bastante reduzidas e que possuem apenas um único domínio de magnetização, isto é, nas quais os momentos se encontram alinhados na mesma direção por toda a sua estrutura e reorientam-se de acordo com o campo magnético aplicado de forma uniforme e quase instantânea [119]. À temperatura ambiente, estes materiais encontram-se em equilíbrio termodinâmico e magnetizam-se muito rapidamente. Contudo, a sua magnetização pode ser facilmente invertida de forma aleatória quando são submetidos a variações de temperatura [119]. Outra característica importante dos materiais superparamagnéticos é estes possuírem uma suscetibilidade magnética superior aos materiais paramagnéticos, apresentando, por isso, uma magnetização de saturação mais elevada quando submetidos a campos magnéticos com a mesma intensidade [119].

Para além de identificar o tipo de comportamento dos materiais magnéticos, as curvas de magnetização permitem determinar a quantidade real de nanopartículas presente nos compósitos poliméricos, uma vez que a magnetização de saturação é proporcional a esse valor. Sendo assim, sabendo a magnetização de saturação das nanopartículas puras, a quantidade real de nanopartículas na amostra pode ser calculada a partir da equação 3.7, na qual $\%(p/p)$ real corresponde à percentagem real de nanopartículas presente na amostra, $M_s(\text{amostra})$ à magnetização de saturação da amostra e $M_s(\text{NP puras})$ à magnetização de saturação das nanopartículas puras. É importante salientar que ambas as M_s devem de ser determinadas para o mesmo valor de campo magnético de saturação.

$$\% (p/p) \text{ real} = \frac{M_s(\text{amostra})}{M_s(\text{NP puras})} \times 100 \quad (3.7)$$

Condições de análise

As propriedades magnéticas das amostras e das nanopartículas puras foram avaliadas usando o equipamento *Microsense 2.2 Tesla VSM*. A medição foi feita à temperatura ambiente, recorrendo a

uma cápsula de gelatina transparente e aplicando ciclos de magnetização com uma intensidade máxima de 18 kOe.

3.2.3. Avaliação da resposta celular

Para determinar a influência dos materiais produzidos no comportamento das células de RMS, foi utilizada a linha celular RD, uma das linhas celulares mais usadas na investigação deste tipo de cancro e que deriva da biópsia do ERMS pélvico de uma paciente de 7 anos [121]. Não foram realizados ensaios de citotoxicidade, uma vez que existem múltiplos estudos que demonstram a não toxicidade de amostras de PVDF e P(VDF-TrFE), assim como de amostras com nanopartículas de FO e CFO imobilizadas em matrizes poliméricas (apresentados no subcapítulo 2.6). Nestes ensaios celulares, para além dos materiais produzidos, foram utilizados filmes de PVDF puro não polarizados (NP) e polarizados (P) comerciais (*Measurement Specialties*), uma vez que este tipo de filmes já foi extensivamente caracterizado, mas o seu efeito neste tipo de células não foi estudado anteriormente.

3.2.3.1. Esterilização das amostras

Inicialmente, cortaram-se os filmes em círculos de 13 mm de diâmetro e as fibras em quadrados de 10x10 mm, de maneira a ser possível colocar as amostras nas placas de cultura. De seguida, estas foram esterilizadas através de radiação ultravioleta (UV) durante um total de 2 h, 1 h em cada lado. Por fim, as amostras foram sujeitas a 5 lavagens de 5 min cada com uma solução tampão de fosfato alcalino (PBS do inglês *Phosphate-Buffered Saline, Biochrom*) a 1%.

3.2.3.2. Cultura celular

As células de RMS (RD, *Sigma Aldrich*) foram colocadas em expansão em frascos de cultura de 75 cm² utilizando meio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM do inglês *Dulbecco's Modified Eagle Medium, Biochrom*) contendo 4,5 g/L de glucose suplementado com 10% de soro fetal bovino (FBS do inglês *Fetal Bovine Serum, Biochrom*) e 1% de penicilina/estreptomicina (P/S do inglês *Penicillin-Streptomycin, Biochrom*). A incubação das células foi realizada sob condições padrão, a 37 °C numa atmosfera humidificada a 95% contendo 5% de CO₂. Os meios de cultura foram mudados a cada 2 dias e as células foram passadas para subculturas quando atingiram 60-70% de confluência.

3.2.3.3. Ensaios de proliferação celular

Nos filmes, foram efetuados ensaios de proliferação celular com a duração de 72 h em condições estáticas e dinâmicas. Para tal, as amostras previamente esterilizadas foram colocadas em duas placas de cultura. As células RD foram adicionadas às placas, com uma densidade de 4×10^4 células/mL. A seguir, as placas foram incubadas durante 24 h nas mesmas condições padrão utilizadas para a cultura celular, permitindo assim que ocorra a adesão das células aos materiais. Após essas 24 h, uma das placas foi mantida nas mesmas condições (ensaio estático - cultura celular sem aplicação de estímulos), enquanto que a outra placa foi transferida para um biorreator (ensaio dinâmico - cultura celular com aplicação de estímulos mecânicos ou magnéticos) por mais 72 h (Figura 3.17). Os parâmetros da estimulação foram os mesmos utilizados por Ribeiro *et al.* [74], uma vez que esse estudo demonstrou que esses parâmetros tinham um efeito positivo em células musculares saudáveis.

As culturas efetuadas nos filmes comerciais de PVDF NP e P foram submetidas a estímulos mecânicos através de vibração vertical (biorreator mecânico), os quais induzem a estimulação mecânica e mecânico-elétrica das células. Nos filmes P, foram realizados dois ensaios distintos: num as células foram depositadas sobre a superfície carregada negativamente (P-) e no outro foram depositadas sobre a superfície carregada positivamente (P+). As culturas efetuadas nos filmes compósitos desenvolvidos foram sujeitas a estímulos magnéticos (biorreator magnético), os quais promovem a estimulação magneto-mecânica e magneto-elétrica das células.

Uma vez completadas as 72 h, as amostras foram transferidas para uma nova placa e lavadas com PBS a 1%. A avaliação da proliferação celular foi efetuada recorrendo ao ensaio calorimétrico com 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfopenil)-2H-tetrazolium (MTS, *Promega*).

O ensaio MTS tem como princípio base a bio-redução do composto MTS em formazano. Esta reação química é induzida pela enzima desidrogenase, a qual reside nas mitocôndrias das células [122]. Os cristais de formazano formados conferem uma coloração ao meio de cultura, sendo a intensidade da cor proporcional à quantidade de cristais e, conseqüentemente, proporcional ao metabolismo celular. A quantificação dos cristais de formazano pode ser realizada através de espectrofotometria, medindo a absorvância a 490 nm, correspondendo este ao pico de absorção máximo. Desta forma, este método permite analisar a atividade metabólica mitocondrial, a qual reflete o número de células viáveis presentes na amostra. Como este número está relacionado com o crescimento celular, é possível estimar de forma indireta a proliferação celular.

3. Materiais e Métodos

Após a lavagem, as amostras foram incubadas num meio contendo MTS e DMEM sem vermelho de fenol (*Biochrom*), numa proporção de 1:5, durante 2 h a 37 °C numa atmosfera humidificada a 95% contendo 5% de CO₂ no escuro. O sobrenadante foi utilizado para determinar a absorvância a 490 nm, através de um espectrofotómetro. Para cada condição, foram realizadas 4 réplicas (n = 4) que contribuíram para uma análise quantitativa apresentada sob a forma de média e desvio padrão.

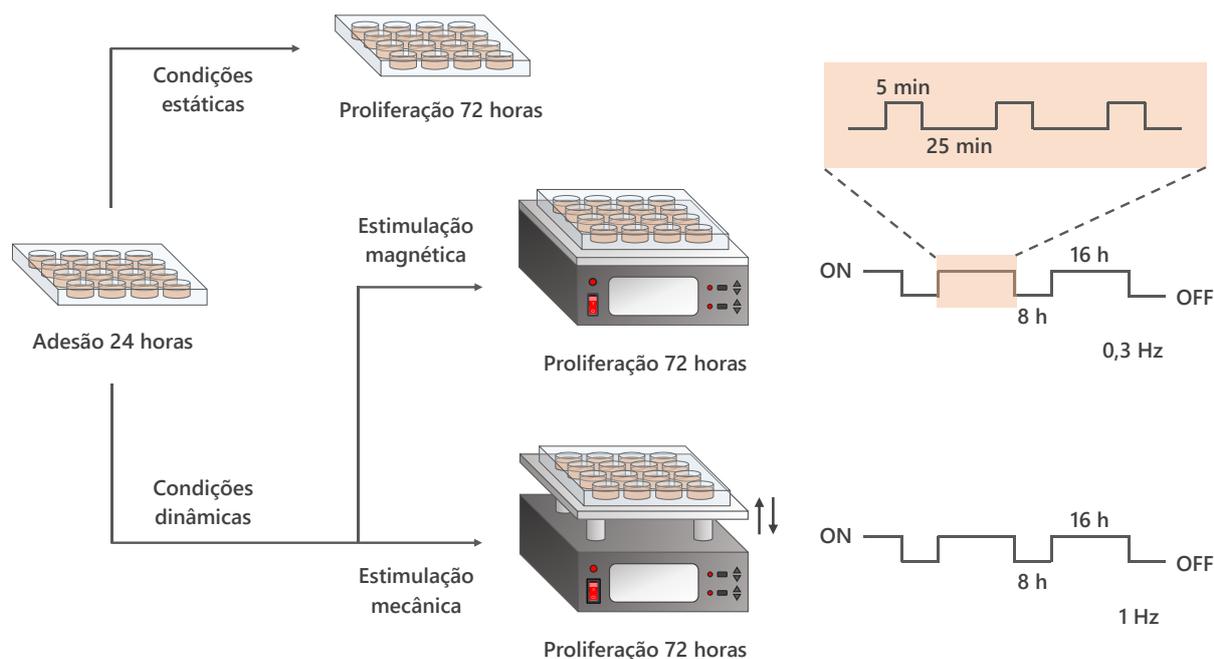


Figura 3.17. Representação esquemática dos ensaios celulares realizados em condições estáticas e dinâmicas. Em ambos os biorreatores (magnético e mecânico), durante as 72 h do ensaio, as amostras foram submetidas a ciclos de 16 h de estimulação intercalados por 8 h de repouso. No caso do biorreator magnético, durante as 16 h de estimulação, os estímulos foram aplicados em intervalos de 5 min alternados por 25 min de ausência de estímulos, tal como foi realizado no esquema.

3.2.3.4. Microscopia de fluorescência

Para examinar a morfologia das células nos filmes de PVDF NP e P após as 72 h de cultura, essas amostras foram preparadas para visualização por imunofluorescência. Esta técnica depende da utilização de marcadores fluorescentes que permitem destacar diferentes constituintes da cultura celular. Os marcadores mais utilizados são o isotiocianato de fluoresceína (FITC, *Sigma Aldrich*) e dihidrocloreto

de 4,6-diamidino-2-fenilindole (DAPI, *Sigma Aldrich*), sendo o primeiro capaz de destacar a verde as proteínas secretadas pelas células [123] e o segundo de destacar a azul os núcleos celulares [124].

No final dos ensaios de proliferação celular, após lavagem das amostras, as células foram fixadas com formaldeído a 4% (*Panreac*) e incubadas durante 10 min nas condições padrão mencionadas anteriormente (subcapítulo 3.3.2). Posteriormente, as amostras foram novamente lavadas com PBS a 1% e incubadas com 1 µg/mL de FITC (1:200 em PBS 1x) durante 45 min à temperatura ambiente. Após os 45 min de incubação, as células foram lavadas com PBS a 1% e incubadas numa solução de DAPI (1:1000 em PBS x1) durante 5 min à temperatura ambiente. Por fim, as amostras foram lavadas uma última vez com PBS a 1% e depois com água destilada, colocadas em lâminas e visualizadas no microscópio de fluorescência *Olympus BX51 Microscope*.

3.2.3.5. Ensaios de adesão celular

Nas fibras, foram realizados ensaios de adesão celular com a duração de 24 h em condições estáticas. Para tal, as amostras previamente esterilizadas foram colocadas numa placa de cultura e as células RD foram colocadas através do método da gota de maneira a evitar a propagação das células na placa. Para isso, foi colocada uma gota de 120 µL contendo 15000 células na superfície de cada amostra e deixou-se durante 30 min para permitir a adesão celular. Depois desse tempo, foi adicionado DMEM para perfazer os 500 µL. A seguir, as placas foram incubadas durante 24 h a 37 °C numa atmosfera humidificada a 95% contendo 5% de CO₂. Uma vez completadas as 24 h de cultura, as amostras foram transferidas para uma nova placa e lavadas com PBS a 1%. Por fim, a avaliação da adesão celular foi efetuada recorrendo, mais uma vez, ao ensaio calorimétrico com MTS.

4. Resultados e discussão

4.1. Morfologia

A morfologia das amostras foi analisada através de SEM. Na Figura 4.1, encontram-se representadas as imagens de SEM dos cortes transversais dos filmes com diferentes matrizes poliméricas e diferentes nanopartículas.

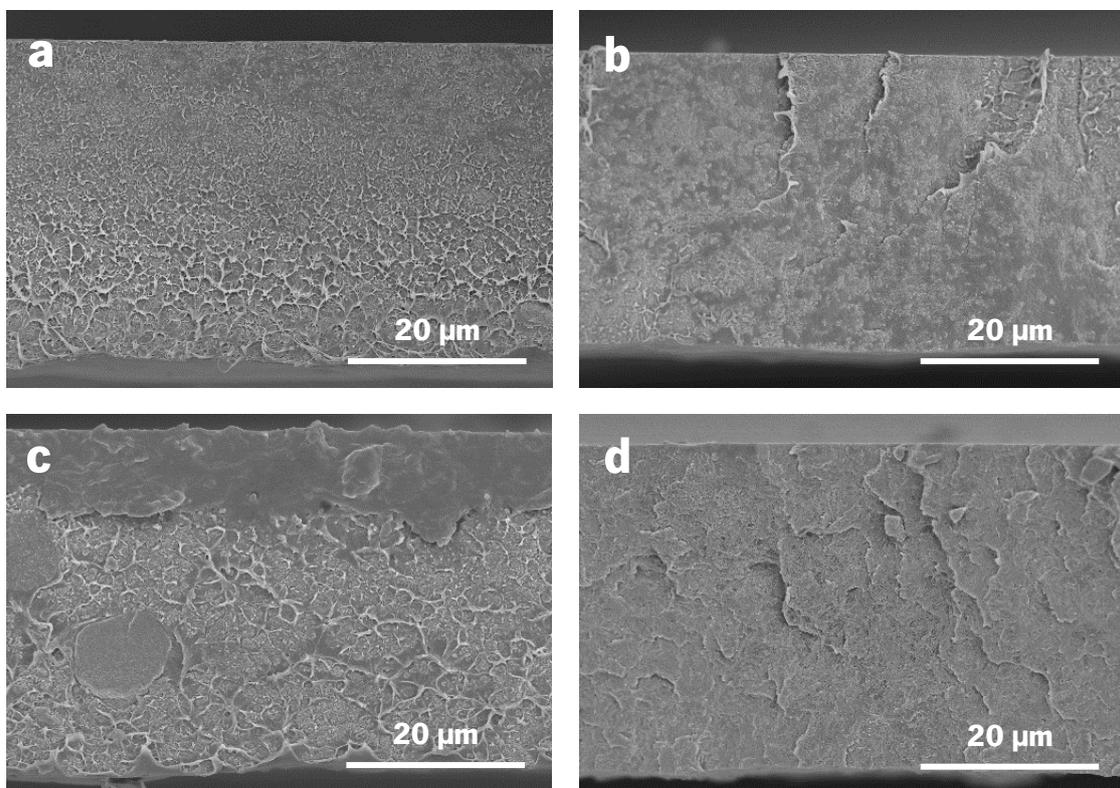


Figura 4.1. Imagens de SEM dos cortes transversais dos filmes com uma ampliação de $\times 2,5k$: PVDF/10FO (a), PVDF/20FO (b), PVDF/20CFO (c) e P(VDF-TrFE)/20CFO (d).

A partir das imagens de SEM dos cortes transversais, verificou-se que todos os filmes apresentam uma estrutura compacta e com ausência de poros, tal como seria de esperar tendo em consideração o procedimento experimental que foi realizado. Durante o processamento, a evaporação do solvente foi feita rapidamente a temperaturas elevadas, o que resulta na formação de filmes não porosos [84].

Para avaliar a dispersão das nanopartículas nas amostras, foram recolhidas imagens da superfície dos filmes no modo BSE, que se encontram representadas na Figura 4.2.

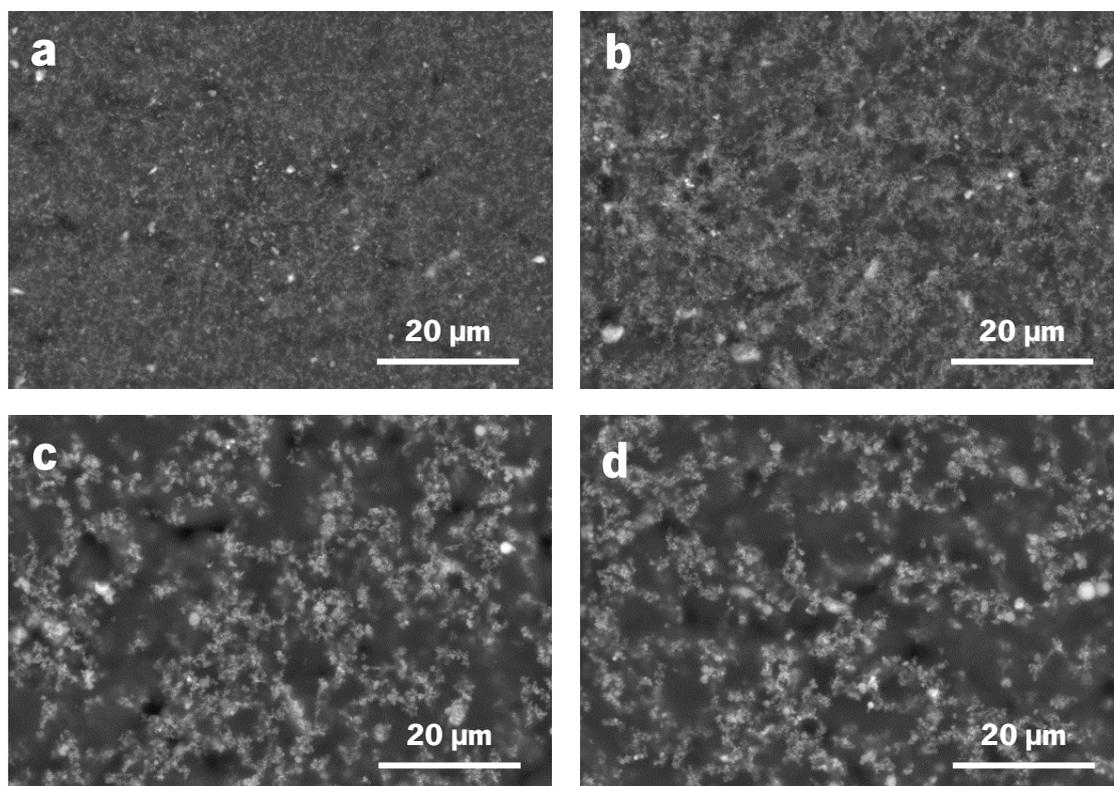


Figura 4.2. Imagens de SEM das suas superfícies no modo BSE com uma ampliação de $\times 2,0k$: PVDF/10FO (a), PVDF/20FO (b), PVDF/20CFO (c) e P(VDF-TrFE)/20CFO (d).

Devido à elevada área de superfície em relação ao volume, as nanopartículas são estruturas que estabelecem interações eletrostáticas fortes entre si e, por isso, têm tendência para se agregar, o que dificulta a sua dispersão em matrizes poliméricas [125]. Através das imagens da superfície dos filmes no modo BSE, é possível observar que, embora as nanopartículas estejam distribuídas por toda a amostra, ocorreu a formação de alguns agregados de pequenas dimensões. Nos filmes com nanopartículas de FO, o aumento da concentração de nanopartículas provocou um aumento da sua aglomeração, formando agregados um pouco maiores. Comparativamente, nos filmes com nanopartículas de CFO, a distribuição das nanopartículas é menos uniforme e a aglomeração é mais notória, o que se pode dever ao tamanho ligeiramente superior das nanopartículas. Para além disso, a dispersão das nanopartículas de CFO é semelhante independentemente de a matriz polimérica ser PVDF ou P(VDF-TrFE).

4. Resultados e Discussão

A análise morfológica das fibras também foi realizada, encontrando-se representadas as imagens de SEM das fibras e os histogramas com a distribuição dos seus diâmetros na Figura 4.3.

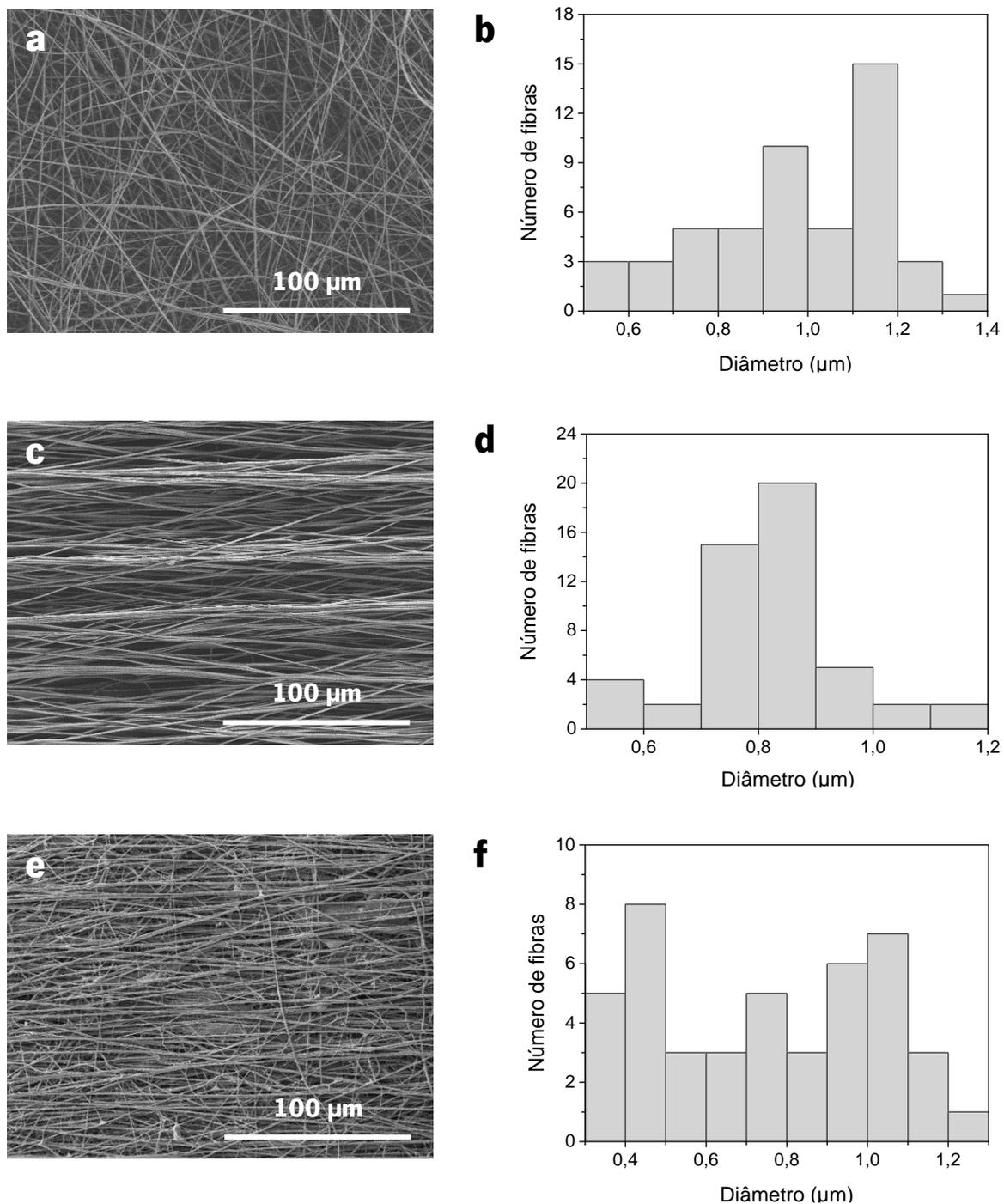


Figura 4.3. Imagens de SEM das fibras com uma ampliação de x500 e histogramas de distribuição dos seus diâmetros, respetivamente: PVDF NO (a, b), PVDF O (c, d) e PVDF/10FO O (e, f).

Existe uma clara distinção entre a morfologia das fibras não orientadas (NO), que se depositaram umas sobre as outras de forma completamente aleatória, e das fibras orientadas (O), que sofrem um alinhamento na direção da rotação do coletor. Relativamente às suas dimensões, o diâmetro médio das fibras NO é $0,97 \pm 0,20 \mu\text{m}$, enquanto que o das fibras O é $0,82 \pm 0,13 \mu\text{m}$. Esta diminuição deve-se ao estiramento das fibras promovido pela rotação do coletor durante o processamento [2]. A introdução de nanopartículas também promoveu uma diminuição do diâmetro médio das fibras para $0,69 \pm 0,31 \mu\text{m}$, provocado pelo aumento da condutividade da solução e às fortes interações eletrostáticas entre as nanopartículas e as cadeias poliméricas [126].

Para avaliar a dispersão das nanopartículas nas fibras compósitas, também foram recolhidas imagens de SEM no modo BSE, que se encontram representadas na Figura 4.4.

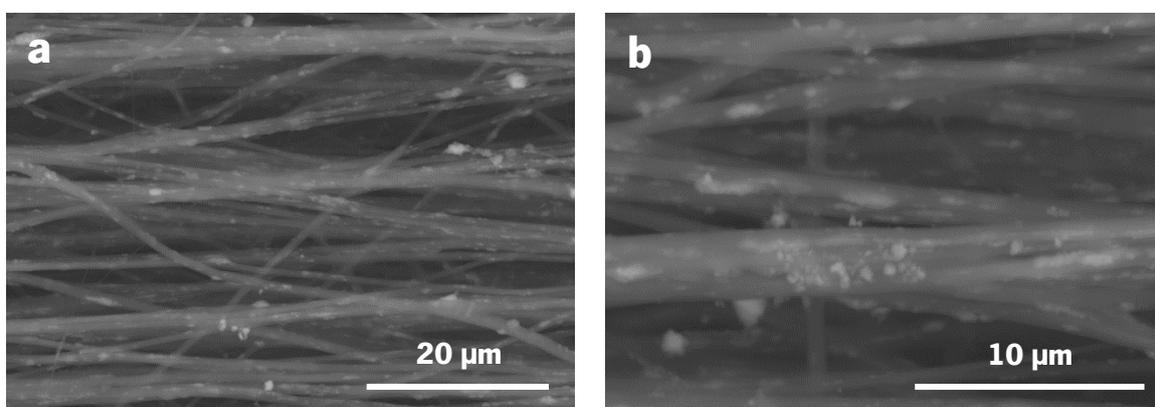


Figura 4.4. Imagens de SEM no modo BSE das fibras PVDF/10FO O com uma ampliação de x1,5k (a) e x5,0k (b).

Através das imagens de SEM no modo BSE das fibras compósitas, conclui-se que as nanopartículas se encontram distribuídas pelas fibras, mas ocorreu a formação de alguns aglomerados de pequenas dimensões, tal como nos filmes. Contudo, as nanopartículas aparentam estar revestidas pelo polímero.

4.2. Molhabilidade

Para analisar a influência da morfologia das amostras na sua molhabilidade, foi realizada a medição dos ângulos de contacto. Posteriormente, calcularam-se os valores médios e respetivos desvios padrão, os quais se encontram apresentados na Figura 4.5.

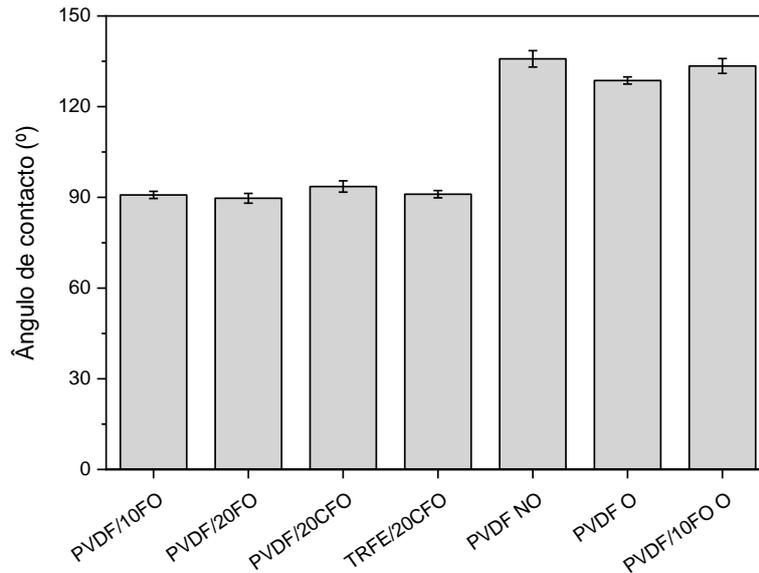


Figura 4.5. Ângulos de contacto das diferentes amostras.

Os resultados obtidos demonstram que os ângulos de contacto são semelhantes entre as amostras na forma de filmes e entre as amostras na forma de fibras. A molhabilidade dos filmes mantém-se aproximadamente constante, independentemente da quantidade e do tipo de nanopartículas adicionadas, refletindo-se num ângulo de contacto próximo dos 90°. Em relação às fibras, a orientação e a incorporação de nanopartículas também não alterou significativamente a sua molhabilidade, possuindo todas um ângulo de contacto que ronda os 130°. Estes valores são idênticos aos referenciados na literatura, tanto para filmes [127, 128] como para fibras [129, 130] à base de PVDF. Os ângulos de contacto são superiores nas fibras do que nos filmes, o que é indicativo de que as fibras possuem uma menor molhabilidade. Este fenómeno está relacionado a deposição das fibras umas sobre as outras durante o *electrospinning* originar uma superfície com uma maior rugosidade à escala nanométrica, diminuindo a sua molhabilidade, o que é conhecido como o efeito de lótus [131].

4.3. Propriedades físico-químicas

Para avaliar se existiram alterações na estrutura do polímero e determinar a fração de fase β das amostras, procedeu-se à análise das propriedades físico-químicas por FTIR-ATR. Os espectros obtidos encontram-se apresentados na Figura 4.6.

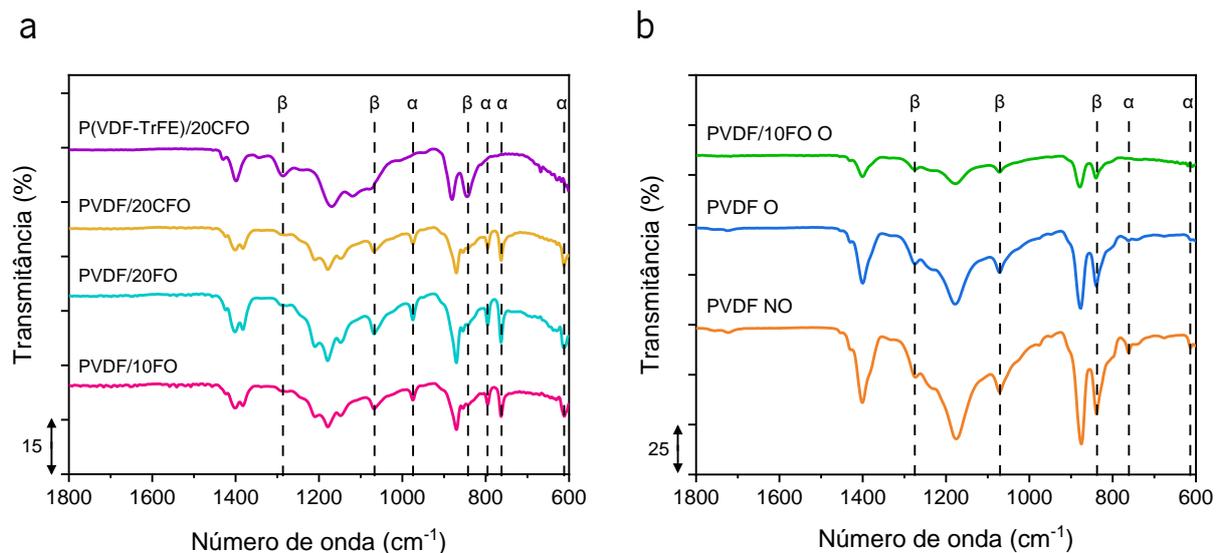


Figura 4.6. Espectros de FTIR-ATR dos filmes (a) e das fibras (b).

Na Tabela 4.1, estão apresentadas as bandas de absorção associadas aos principais movimentos vibracionais do PVDF puro que se encontram presentes nos espectros das amostras.

Tabela 4.1. Bandas de absorção características do PVDF puro presentes nos espectros das amostras.

Banda de absorção (cm ⁻¹)	Características	Ref.
614	Fase α, flexão CF ₂	[9,10]
763	Fase α	[9-11]
795	Fase α	[9]
840	Fase β, vibração CH ₂	[9-11]
880	Vibração e estiramento C-F, vibração CH ₂	[12]
976	Fase α	[9-11]
1068	Fase β, estiramento simétrico C-F	[10, 11]
1183	Ligação C-C	[12]
1279	Fase β	[9]
1404	Vibração e estiramento C-F	[12]

4. Resultados e Discussão

Tanto os filmes como as fibras possuem espectros análogos, o que seria espectável, visto que são compostos por polímeros da mesma família e que possuem uma constituição físico-química idêntica. Todas as amostras possuem bandas de absorção características do PVDF (840, 880, 1068, 1183 e 1404 cm^{-1}), mesmo as amostras com nanopartículas, o que significa que a introdução desses *fillers* não afetou a estrutura do polímero.

No caso dos filmes, existem algumas diferenças nos espectros das amostras com diferentes matrizes poliméricas. Nos filmes de PVDF, as bandas de absorção típicas da fase β (840, 1068, 1279 cm^{-1}) possuem uma baixa intensidade, sendo as bandas da fase α (614, 763, 795, 976 cm^{-1}) mais proeminentes. Contrariamente, no filme de P(VDF-TrFE), não é possível detetar movimentos vibracionais típicos da fase α e as bandas da fase β são mais acentuadas devido a dois efeitos distintos: à existência do terceiro átomo de Fluor do monómero de TrFe [41] e à capacidade de nucleação da fase β das ferrites de cobalto [136]. No caso das fibras, verifica-se que, apesar das bandas associadas à fase α estarem presentes, as da fase β são mais intensas em todas as amostras.

Utilizando a equação 3.1 (subcapítulo 3.2.3), determinou-se a quantidade de fase β em cada uma das amostras, estando os valores apresentados na Tabela 4.2.

Tabela 4.2. Fração de fase β das diferentes amostras.

Morfologia	Amostra	Fração de fase β (%)
Filmes	PVDF/10FO	29
	PVDF/20FO	30
	PVDF/20CFO	26
Fibras	PVDF NO	82
	PVDF O	87
	PVDF/10FO O	97

As diferenças entre a intensidade das bandas de absorção de cada uma das fases nos filmes estão de acordo com o facto de os filmes de PVDF apresentarem apenas uma fração de fase β próxima de 30% e o copolímero possuir uma conformação quase total nessa fase. Na literatura, já foi relatado

que o processamento de PVDF por *solvent casting* permite a obtenção de filmes maioritariamente na fase α e que para induzir a formação da fase β é necessário realizar um estiramento mecânico ou uma polarização após a produção dos mesmos [84]. No entanto, outros estudos concluíram que a introdução de nanopartículas de ferrite favorece a nucleação da fase β , através do estabelecimento de interações eletrostáticas com as cadeias do polímero. Desta forma, é possível obter filmes com uma fração próxima de 90% com a adição de apenas 5 %(p/p) de nanopartículas, comparativamente à ausência dessa fase nos filmes de PVDF puro [136, 137]. Nos filmes compósitos que foram produzidos, verificou-se que existe a formação de fase β , mas numa proporção inferior aos valores mencionados nesses estudos, facto que poderá estar relacionado com a alteração da carga superficial das nanopartículas, mas que não tem qualquer tipo de consequência nas suas propriedades magnéticas.

Em relação às fibras, constatou-se que as amostras são constituídas maioritariamente pela fase β , o que evidencia que o processamento de PVDF através de *electrospinning* permite a obtenção da sua fase mais eletroativa, como consequência da tensão aplicada durante esse processo [138]. Adicionalmente, a fração de fase β é superior nas fibras O do que nas NO, o que se deve ao facto de o estiramento provocado pela rotação do coletor durante o processo de *electrospinning* promover a formação dessa fase [138, 139]. A introdução de nanopartículas nas fibras também resultou num aumento da fração de fase β , uma vez que se estabelecem o mesmo tipo de interações mencionadas anteriormente que potenciam a nucleação dessa fase [140].

4.4. Propriedades térmicas

Recorrendo à técnica de DSC, efetuou-se a caracterização calorimétrica das amostras com o intuito de determinar as suas temperaturas de fusão e os seus graus de cristalinidade. Na Figura 4.7, encontram-se apresentados os termogramas obtidos.

A partir das curvas obtidas, é possível observar que os filmes e as fibras possuem termogramas semelhantes, com a presença de um pico endotérmico associado à fusão do polímero. A única amostra com um termograma distinto é o filme com uma matriz de P(VDF-TrFE), que possui dois picos endotérmicos, um correspondente à temperatura de fusão e outro menos acentuado associado à temperatura de Curie, a temperatura a partir da qual existe uma transição no comportamento do polímero de ferroelétrico para paraelétrico. Esse filme apresenta uma temperatura de fusão de 152 °C e uma temperatura de Curie de 107 °C, ambas próximas dos valores esperados [141, 142]. Nos restantes

filmes, os quais possuem uma matriz de PVDF, as temperaturas de fusão estão próximas dos 170 °C, encontrando-se incluídas na gama de temperaturas de fusão previstas para o PVDF (165-175 °C) [143].

Nas fibras, as temperaturas de fusão são um pouco inferiores, o que pode ser resultado da maior área de superfície e conseqüente aumento da condução térmica das amostras. Também é possível observar um ligeiro aumento da temperatura de fusão nas fibras com nanopartículas de FO, o que pode ser explicado pelo maior conteúdo de fase β , visto que a fusão dessa fase ocorre a temperaturas um pouco superiores à fase α [144].

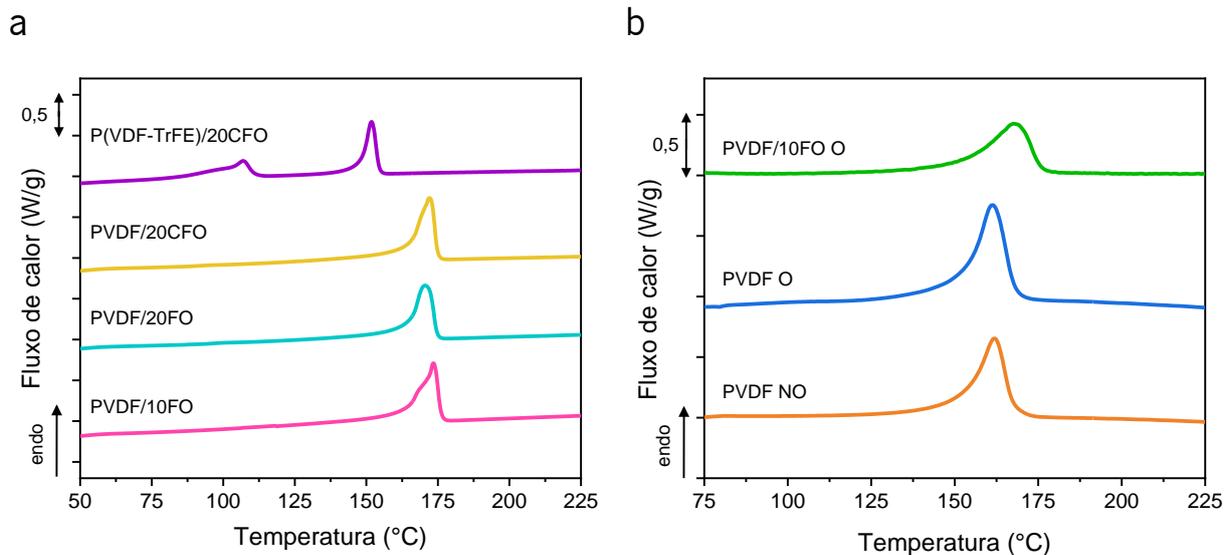


Figura 4.7. Curvas de DSC dos filmes (a) e das fibras (b).

Na Tabela 4.3 estão sumarizados os da temperatura e entalpia de fusão e do grau de cristalinidade das diferentes amostras, o qual foi calculado a partir das Equações 3.2 e 3.3 (subcapítulo 3.2.4). A cristalinidade dos filmes com uma matriz de PVDF é idêntica (próxima dos 50%), enquanto que no filme composto pelo copolímero esse valor é inferior ($\approx 32\%$). Estes valores são semelhantes aos mencionados na literatura em relação a filmes de PVDF e P(VDF-TrFE) com diferentes *fillers* [145, 146]. Nas fibras, o grau de cristalinidade das fibras O é superior ao das fibras NO. Uma possível explicação é estiramento das cadeias poliméricas provocado pela rotação do coletor poder induzir o aumento da cristalização do polímero [147]. Para além disso, a introdução de nanopartículas nas fibras resultou numa diminuição do grau de cristalinidade, visto que as nanopartículas atuam como defeitos durante a cristalização e impedem o crescimento das esferulites [148, 149].

4. Resultados e Discussão

Tabela 4.3. Temperatura de fusão (T_f), variação de entalpia (ΔH) e grau de cristalinidade (X_c) das diferentes amostras.

Morfologia	Amostra	T_f (°C)	ΔH (J/g)	X_c (%)
Filmes	PVDF/10FO	173	46,3	48
	PVDF/20FO	171	43,8	51
	PVDF/20CFO	172	45,9	53
	P(VDF-TrFE)/20CFO	152	20,9	32
Fibras	PVDF NO	162	48,7	48
	PVDF O	161	54,1	55
	PVDF/10FO O	168	44,1	44

Para avaliar a estabilidade térmica das amostras, efetuou-se a caracterização através da técnica de TGA, encontrando-se os termogramas obtidos apresentados na Figura 4.8. Os valores da temperatura inicial de degradação e da percentagem de massa final das amostras estão sumarizados na Tabela 4.4.

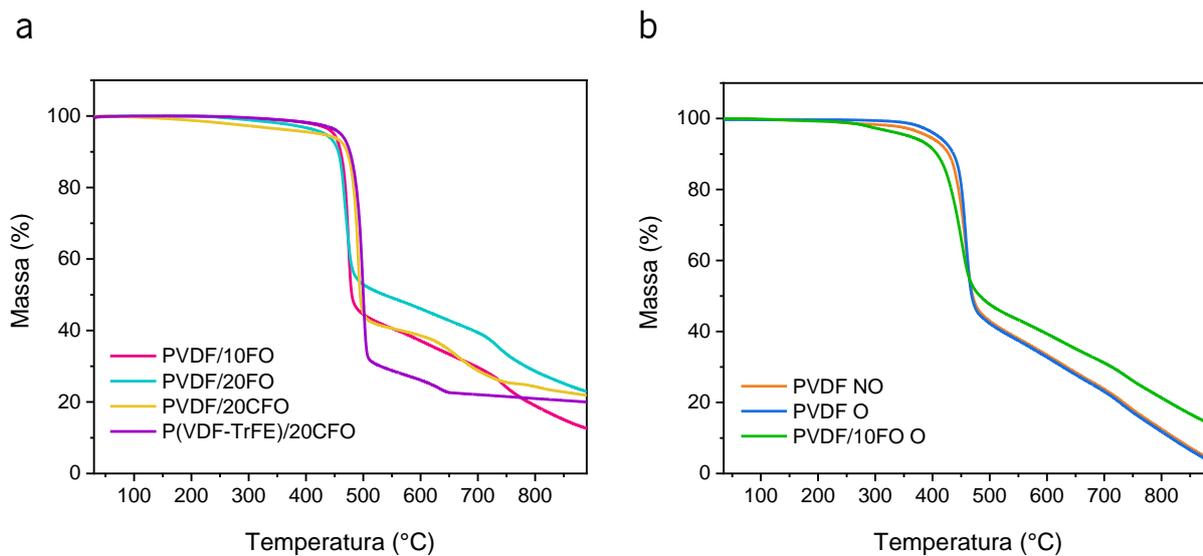


Figura 4.8. Curvas de TGA dos filmes (a) e das fibras (b).

4. Resultados e Discussão

Tabela 4.4. Temperatura inicial de degradação (T_{onset}) e percentagem da massa final das diferentes amostras.

Morfologia	Amostra	T_{onset} (°C)	Massa final (%)
Filmes	PVDF/10FO	463	13
	PVDF/20FO	458	23
	PVDF/20CFO	475	22
	P(VDF-TrFE)/20CFO	483	20
Fibras	PVDF NO	431	4
	PVDF O	443	3
	PVDF/10FO O	416	14

O PVDF é um polímero com uma elevada estabilidade térmica, apresentando apenas um patamar de degradação. Segundo Botelho *et al.* [150], este patamar de degradação encontra-se entre os 400 e os 500 °C e deve-se à quebra das ligações carbono-hidrogénio (C-H) e carbono-flúor (C-F) presentes no polímero, originando ácido fluorídrico (HF) e polienos ($C_4H_3F_3$) como produtos de degradação. Todas as amostras apresentam apenas um patamar de degradação, com uma temperatura inicial compreendida no intervalo previsto. Os polienos formados durante a primeira fase de degradação são macromoléculas instáveis e continuam a sofrer degradação, formando estruturas aromáticas, até se dar a carbonização do polímero [150, 151]. Por essa razão, apesar de não ser tão acentuada, as amostras continuam a exibir uma perda de massa depois dos 500 °C.

Acerca da temperatura inicial de degradação, é possível notar que as fibras degradam mais cedo do que os filmes, o que indica que têm uma estabilidade térmica um pouco inferior. Tal como na análise por DSC, esta diminuição da estabilidade nas fibras pode estar associada à maior área de superfície e consequente aumento da condução térmica das amostras. Nas fibras, verificou-se que a introdução de nanopartículas diminui um pouco a sua temperatura inicial de degradação. O aumento da concentração das nanopartículas de FO teve o mesmo efeito nos filmes. Esta diminuição da estabilidade pode ser atribuída à maior condutividade térmica das amostras devido à presença das nanopartículas [152]. Todavia, esse efeito não foi tão substancial nas amostras com nanopartículas de CFO, visto que estas têm uma temperatura inicial de degradação mais elevada. Esta diferença pode dever-se ao facto de as

nanopartículas de CFO serem maiores e estas amostras possuírem uma maior aglomeração, como foi detetado através das imagens de SEM, e subseqüentemente existir uma menor área de contacto entre as nanopartículas e o polímero.

Em relação à perda de massa, as fibras de PVDF puro degradam-se completamente, restando apenas uma pequena percentagem de massa no final do ensaio que corresponde à massa de cinzas resultantes da pirólise do polímero. Nas fibras com nanopartículas, a perda de massa é um pouco inferior, permanecendo 14% da massa da amostra no final do ensaio. Essa percentagem corresponde à massa de cinzas e de nanopartículas, uma vez que as ferrites não sofrem degradação no intervalo de temperaturas de análise e estas eram cerca de 10 %(p/p) da amostra [153]. O mesmo ocorreu nos filmes, visto que estes apresentam uma massa final próxima da quantidade de nanopartículas adicionada durante o processamento de cada uma das amostras.

4.5. Propriedades mecânicas

Para determinar as propriedades mecânicas, foram realizados ensaios de tração até à rutura das amostras, encontrando-se as curvas de tensão-deformação obtidas apresentadas na Figura 4.9.

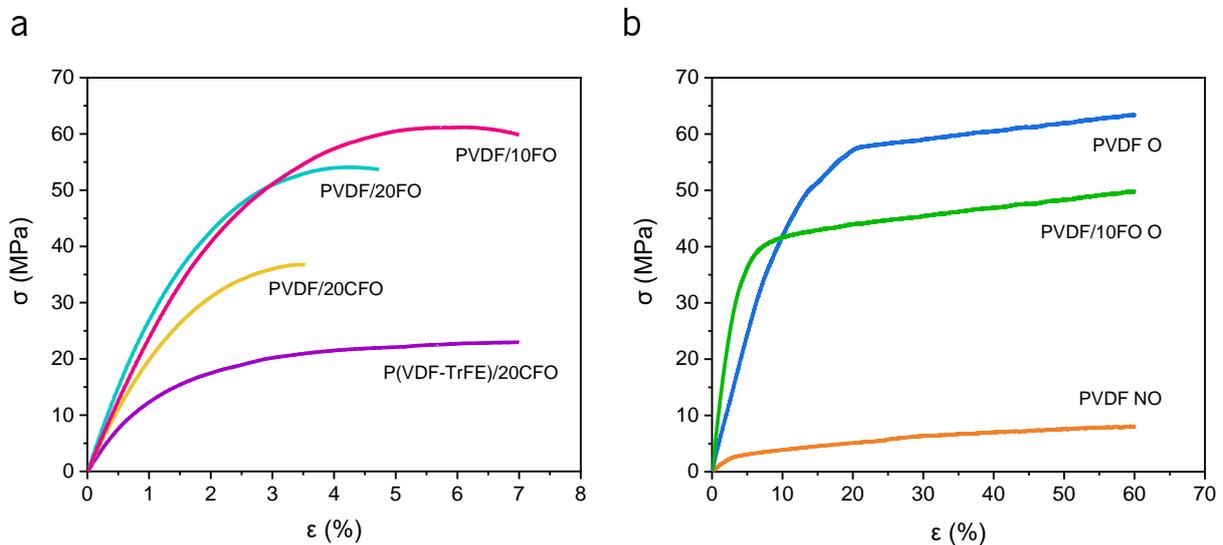


Figura 4.9. Curvas de tensão-deformação dos filmes (a) e das fibras (b).

A partir da lei de Hooke (equação 3.6 do subcapítulo 3.2.6), calculou-se o módulo de Young das amostras, cujos valores estão apresentados na Tabela 4.5.

Tabela 4.5. Módulo de Young (E) das diferentes amostras.

Morfologia	Amostra	E (MPa)
Filmes	PVDF/10FO	2475 ± 110
	PVDF/20FO	2988 ± 62
	PVDF/20CFO	2173 ± 102
	P(VDF-TrFE)/20CFO	1475 ± 81
Fibras	PVDF NO	101 ± 11
	PVDF O	563 ± 11
	PVDF/10FO O	1162 ± 44

Analisando as curvas de tensão-deformação, conclui-se que a forma das curvas é semelhante entre as amostras na forma de filmes e entre as amostras na forma de fibras, o que indica que as amostras com a mesma morfologia apresentam comportamentos mecânicos idênticos. No entanto, os filmes são mais resistentes à deformação, o que também já se verificou noutros estudos [154].

Nos materiais compósitos, a incorporação de nanopartículas usualmente diminui a cedência da matriz polimérica, melhorando as suas propriedades mecânicas [155, 156]. Nos filmes, o aumento da concentração de nanopartículas de FO induz um aumento do módulo de Young, tornando a amostras mais resistentes à deformação. Como a quantidade de nanopartículas incorporadas duplica, existe um maior reforço da matriz polimérica [155, 157]. Contudo, a amostra com nanopartículas de CFO possui um módulo de Young inferior. As nanopartículas de FO possuem um tamanho inferior às de CFO e, conseqüentemente, uma maior área de superfície, o que pode melhorar a união entre essas nanopartículas e o polímero, atenuando melhor as deformações dessa amostra [158]. Ainda, a maior aglomeração das nanopartículas de CFO resulta numa redução da sua área de contacto com o polímero, o que potencia esse efeito. Relativamente à matriz polimérica, apesar das amostras possuírem a mesma concentração de nanopartículas de CFO, a amostra de PVDF apresenta um maior módulo de Young do que a amostra de P(VDF-TrFE). Fu-Chang Sun *et al.* [159] estudou o efeito da fração de TrFE nas propriedades mecânicas do copolímero, tendo verificado que o módulo de Young diminui com o aumento

da fração de TrFE. Desta forma, os resultados obtidos estão em conformidade com o facto do copolímero apresentar uma resistência mecânica inferior ao PVDF.

Quanto às amostras na forma de fibras, tanto a orientação como a adição de nanopartículas provocaram alterações nas suas propriedades mecânicas. Por um lado, as fibras NO têm uma menor resistência à deformação do que as fibras O. A reorientação das fibras NO na direção do estiramento induz uma deformação elevada para um valor mais reduzido de tensão, o que se traduz num menor módulo de Young. Nas fibras orientadas isso não se verifica, dado que a maior parte das fibras já se encontra alinhada na direção do estiramento. Este fenómeno já foi reportado em estudos anteriores, nos quais se concluiu que quanto maior o número de fibras orientadas na direção do estiramento, maior é o módulo de Young [126, 160]. Por outro lado, a introdução de nanopartículas nas fibras resultou num aumento do módulo de Young das fibras, o que está de acordo com o que foi mencionado anteriormente acerca das nanopartículas atuarem como reforço da matriz polimérica [155, 156].

Como prova de conceito para trabalhos futuros, foram realizados ensaios mecânicos cíclicos para determinar se as fibras O são capazes de resistir a ciclos de tração uniaxial, uma vez que este tipo de esforços pode ser aplicados nos materiais de suporte celular através de um biorreator como forma de estimulação mecânico-elétrica das células. As curvas de tensão-deformação e a evolução do módulo de Young e da energia dissipada ao longo dos ciclos com uma amplitude de 2% de deformação encontram-se apresentadas na Figura 4.10.

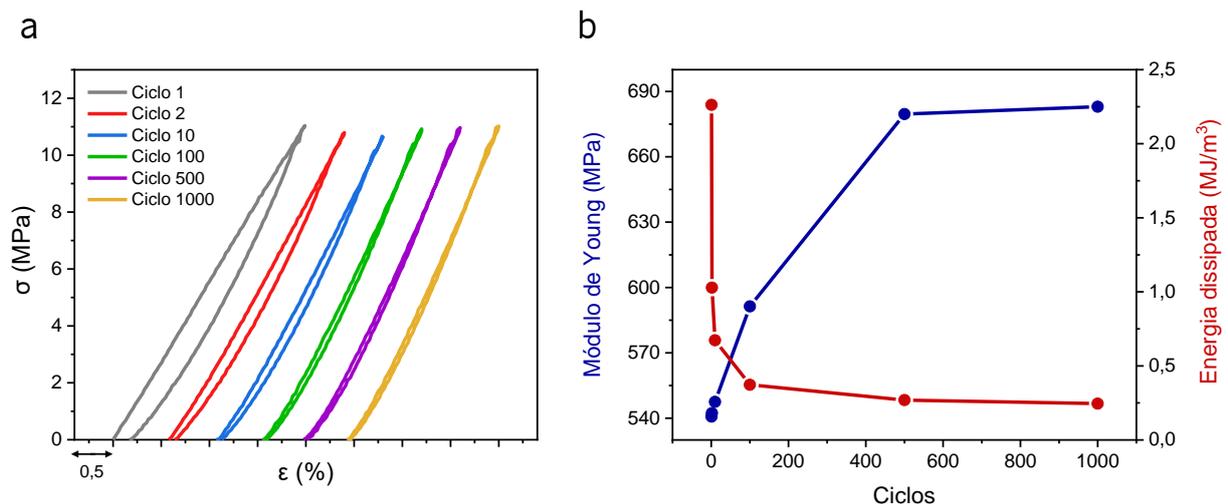


Figura 4.10. Curvas de tensão-deformação (a) e evolução do módulo de Young e da energia dissipada (b) ao longo dos ciclos de tração uniaxial com uma amplitude de 2% de deformação aplicados nas fibras O.

Apesar de terem sido aplicados ciclos com uma amplitude de 0,5%, 1% e 2% de deformação, apenas são apresentados sob a forma gráfica os resultados associados à última amplitude, uma vez que para os outros valores não se observaram alterações significativas nas propriedades mecânicas. Nos ciclos com uma amplitude de 0,5% e 1% de deformação, a histerese das curvas de tensão-deformação é tão reduzida que é indetetável pela célula de carga do equipamento e o módulo de Young praticamente não se altera durante todo o ensaio. Porém, nos ciclos com uma amplitude de 2% de deformação, já existem alterações nas propriedades mecânicas da amostra.

Nas curvas de tensão-deformação, observa-se que as fibras apresentam um comportamento viscoelástico, que se reflete numa diferença entre a curva da fase de carga e a fase de descarga. Ao longo dos ciclos, existe uma diminuição dessa histerese, sendo esta diminuição mais acentuada nos primeiros ciclos. Este fenómeno torna-se mais evidente no gráfico da energia dissipada, que corresponde à área no interior da curva. Entre o ciclo 1 e o ciclo 2 existe uma diminuição abrupta dessa energia, enquanto que a partir do ciclo 100 a diferença é menos notória e a partir do ciclo 500 os valores permanecem aproximadamente constantes. A evolução da energia perdida ao longo dos ciclos pode dever-se ao seu mecanismo de dissipação. Durante o estiramento de um material polimérico, as suas cadeias sofrem uma reorganização, sendo a fricção entre elas responsável pela dissipação de energia sob a forma de calor [112]. À medida que uma amostra polimérica vai sendo estirada múltiplas vezes, o movimento das cadeias vai sendo cada vez menor, uma vez que estas vão permanecendo alinhadas na direção da tensão aplicada. Consequentemente, existe uma fricção cada vez menor entre elas, o que resulta numa diminuição da energia dissipada. Este comportamento inelástico reflete-se na presença de uma deformação residual no final de cada ciclo, a qual vai também diminuindo ao longo dos ciclos. Com o intuito de avaliar se a deformação da amostra era permanente, mediu-se o seu comprimento no final do ensaio, tendo-se averiguado que este era igual ao comprimento inicial. Apesar de a deformação residual ser detetável nas curvas de tensão-deformação, o seu valor é tão reduzido (cerca de 0,17% no primeiro ciclo, o que equivale a 36 μm) que se torna imensurável recorrendo um paquímetro convencional. Para além das variações da energia dissipada e da deformação residual, constatou-se que o módulo de Young aumenta até ao ciclo 500, a partir do qual se mantém constante até ao final do ensaio. Em geral, estas fibras possuem um comportamento mecânico semelhante a outros polímeros processados por *electrospinning* submetidos a ensaios desta tipologia [161, 162].

Com base nestes resultados, é possível concluir que as propriedades mecânicas das fibras orientadas de PVDF sofrem poucas alterações nos primeiros 500 ciclos, mantendo-se inalteradas a partir

desse ponto. Sendo assim, este ensaio demonstra a viabilidade da utilização destas fibras para diferentes tipos de estudos celulares que requeiram estimulação mecânica durante períodos mais longos.

4.4. Propriedades magnéticas

A caracterização das amostras por VSM foi efetuada com a intenção de analisar as propriedades magnéticas das amostras com nanopartículas. As curvas de magnetização obtidas encontram-se apresentadas na Figura 4.11.

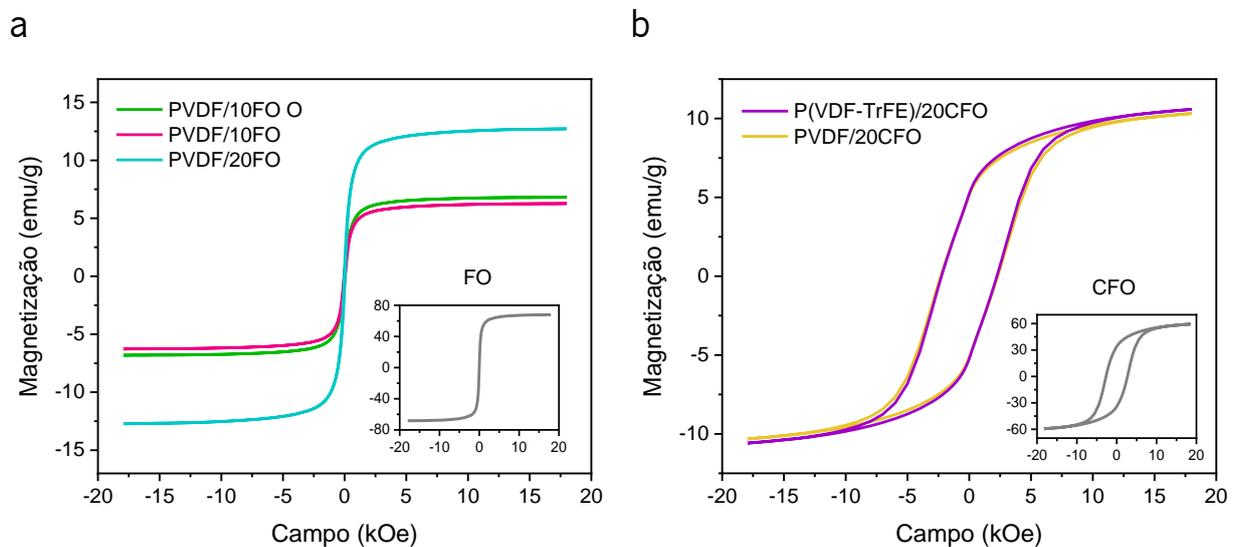


Figura 4.11. Curvas de magnetização das amostras com nanopartículas de FO (a) e CFO (b), assim como das respectivas nanopartículas puras.

Pela análise das curvas de magnetização, observa-se que, tanto nas nanopartículas puras de FO como nas amostras com essas nanopartículas, a histerese é praticamente inexistente, sem presença de remanescência e coercividade, o que é característico do comportamento superparamagnético. Em contraste, nas nanopartículas de CFO e nas amostras com essas nanopartículas, a presença de histerese, remanescência e coercividade é inequívoca e reveladora do seu comportamento ferromagnético. Estes resultados estão em conformidade com outros estudos [163]. Um dos principais fatores que influencia o comportamento das nanopartículas magnéticas, para além da composição, é a sua dimensão. As nanopartículas com um tamanho mais reduzido sofrem magnetização de forma uniforme por toda a sua estrutura, mas os seus momentos são mais instáveis e têm uma maior tendência para serem desmagnetizados. Consequentemente, as nanopartículas mais pequenas costumam possuir um

comportamento superparamagnético [119]. Quando o diâmetro das nanopartículas excede um valor crítico, estas deixam de sofrer magnetização de forma uniforme e o alinhamento dos momentos passa a ocorrer por zonas denominadas domínios de magnetização. Na ausência de um campo magnético, alguns domínios são capazes de manter os seus momentos alinhados, enquanto que outros sofrem desmagnetização. Desta forma, as nanopartículas com um tamanho superior geralmente apresentam um comportamento ferromagnético [119]. Sendo assim, uma possível explicação para a diferença entre o comportamento das duas nanopartículas pode ser a dimensão, visto que as nanopartículas de CFO possuem um diâmetro um pouco superior, o que pode ser suficiente para que a sua magnetização passe a ocorrer por domínios, contrariamente às nanopartículas de FO. Outra justificação pode ser a diferente composição. Contrariamente às nanopartículas de FO, as nanopartículas de CFO são constituídas por iões de cobalto, os quais são responsáveis por aumentar a coercividade devido à anisotropia cristalina resultante da junção das rotações dos iões de cobalto e de ferro [164].

Relativamente às amostras com um comportamento ferromagnético, as curvas de magnetização apresentam uma histerese semelhante, uma vez que todas possuem o mesmo tipo de nanopartículas. As nanopartículas puras apresentam uma magnetização remanescente de 32,3 emu/g e um campo coercivo de 2 kOe. As restantes amostras possuem uma magnetização remanescente de aproximadamente 5 emu/g e um campo coercivo por volta dos 2 kOe. Apesar do campo coercivo ser idêntico, a magnetização remanescente das amostras é substancialmente inferior à das nanopartículas puras, o que é coerente com a quantidade de nanopartículas presentes nas amostras ser mais reduzida. Adicionalmente, é possível observar que, apesar das diferentes matrizes poliméricas, as curvas de magnetização das amostras são similares, apresentado valores de magnetização de saturação, magnetização remanescente e campo coercivo praticamente iguais. Isso indica que o polímero (PVDF ou P(VDF-TrFE)) não influencia as propriedades magnéticas das nanopartículas, tal como é indicado na literatura [165].

A magnetização de saturação das nanopartículas puras de FO foi de 68,3 emu/g e de CFO foi de 59,4 emu/g. A partir desses valores e da magnetização de saturação das amostras, calculou-se a quantidade real de nanopartículas utilizando a equação 3.7 (subcapítulo 3.2.7) e a eficiência da sua imobilização na matriz polimérica. Todos estes valores encontram-se sumarizados na Tabela 4.6.

Analisando os valores obtidos, constatou-se que a eficiência de imobilização nos filmes com nanopartículas de FO é bastante elevada, excedendo os 90% em ambas as amostras. Nos filmes com nanopartículas de CFO, a eficiência de imobilização diminuiu ligeiramente, atingindo valores entre os 85 e os 90%. Esse efeito pode dever-se à maior densidade das nanopartículas de CFO, o que resulta numa

maior deposição das mesmas durante a preparação das soluções poliméricas. Os valores da densidade das nanopartículas foram consultados nos *data sheets* disponibilizadas pelo fabricante (*Nanoamor*). Nas fibras, a quantidade real de nanopartículas é próxima da quantidade esperada de 10 %(p/p) e a eficiência de imobilização é quase 100%, o que significa que não foram perdidas nanopartículas durante a preparação das soluções poliméricas e o processo de *electrospinning*.

Tabela 4.6. Magnetização de saturação (M_s), percentagem real de nanopartículas %(p/p) real) e eficiência de imobilização das diferentes amostras.

Morfologia	Amostra	M_s (emu/g)	%(p/p) real	Eficiência (%)
Filmes	PVDF/10FO	6,3	9	91
	PVDF/20FO	12,7	19	93
	PVDF/20CFO	10,3	15	86
	P(VDF-TrFE)/20CFO	10,6	16	89
Fibras	PVDF/10FO O	6,8	9,9	99

4.5. Resposta celular

Com o intuito de avaliar o efeito dos materiais eletroativos no comportamento das células de RMS, foram realizados diferentes ensaios com a linha celular RD. No caso dos filmes comerciais, foram efetuados ensaios de proliferação celular em condições estáticas e dinâmicas, recorrendo a um biorreator mecânico. Os resultados obtidos após 72 h de cultura encontram-se apresentados na Figura 4.11.

Nas condições estáticas, devido à ausência de estímulos, é possível analisar a influência das propriedades da superfície do material no comportamento das células. Sendo assim, através dos resultados obtidos nessas condições, constatou-se que a presença ou ausência de polarização não afetou o crescimento celular. Relativamente aos filmes polarizados, não existem diferenças significativas entre as duas amostras, o que indica que as células não demonstram preferência pelas cargas positivas ou negativas da superfície. Este resultado evidencia o comportamento distinto destas células em relação a outras linhas celulares, como por exemplo os mioblastos C2C12, os quais apresentam maior proliferação na superfície carregada negativamente dos filmes de PVDF polarizados [38].

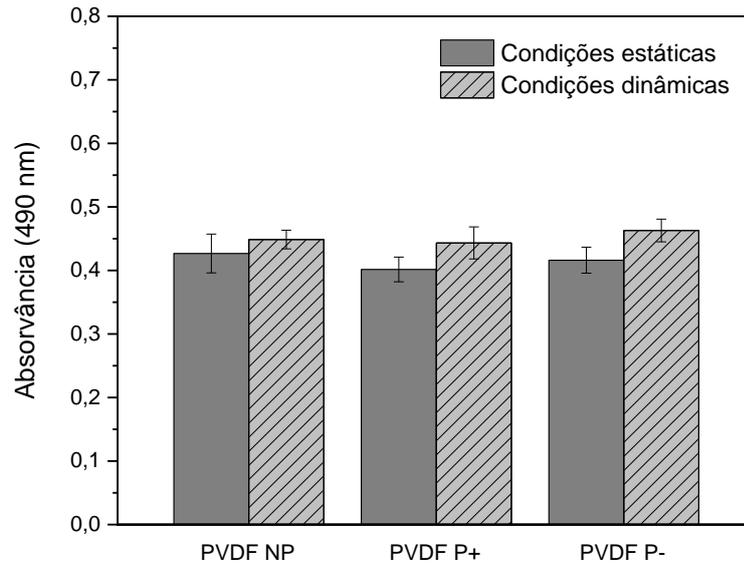


Figura 4.12. Proliferação celular das células RD cultivadas nos filmes de PVDF com diferentes estados de polarização, após 72 h de cultura em condições estáticas e dinâmicas (biorreator mecânico).

Nas condições dinâmicas, verificou-se que a estimulação fornecida pelo polímero piezoelétrico e controlada pelo biorreator mecânico induziu um aumento da proliferação das células RD em todas as amostras, comparativamente às condições estáticas. Nos filmes NP, o crescimento celular entre as condições estáticas e dinâmicas aumentou cerca de 5%. Porém, o variação da proliferação celular foi ligeiramente mais notória nos filmes P+ e P-, tendo sofrido um aumento de aproximadamente 10% em ambos os casos, o que indica que estas células reagem aos estímulos mecânico-elétricos. Isso significa que as células apresentam um maior crescimento nos filmes polarizados, mas não demonstram preferência pelas cargas positivas ou negativas da superfície, tal como foi comprovado nos ensaios estáticos. Relativamente à polarização, este comportamento é um pouco diferente do apresentado na literatura para outros tipos de células, nomeadamente para as células estaminais adiposas humanas (hASCs), as quais proliferam mais na superfície carregada negativamente dos filmes de PVDF polarizados em condições dinâmicas [31]. Contudo, quanto à proliferação celular, já foi demonstrado anteriormente que a estimulação mecânica pode ter um efeito proliferativo nas células cancerígenas [80, 81].

Dado que não se verificaram alterações substanciais a nível da proliferação celular, procedeu-se à análise das células através de microscopia de fluorescência, para averiguar se existiam diferenças na sua morfologia. Para tal, foram recolhidas imagens dos filmes de PVDF após 72 h de cultura, as quais estão apresentadas na Figura 4.13.

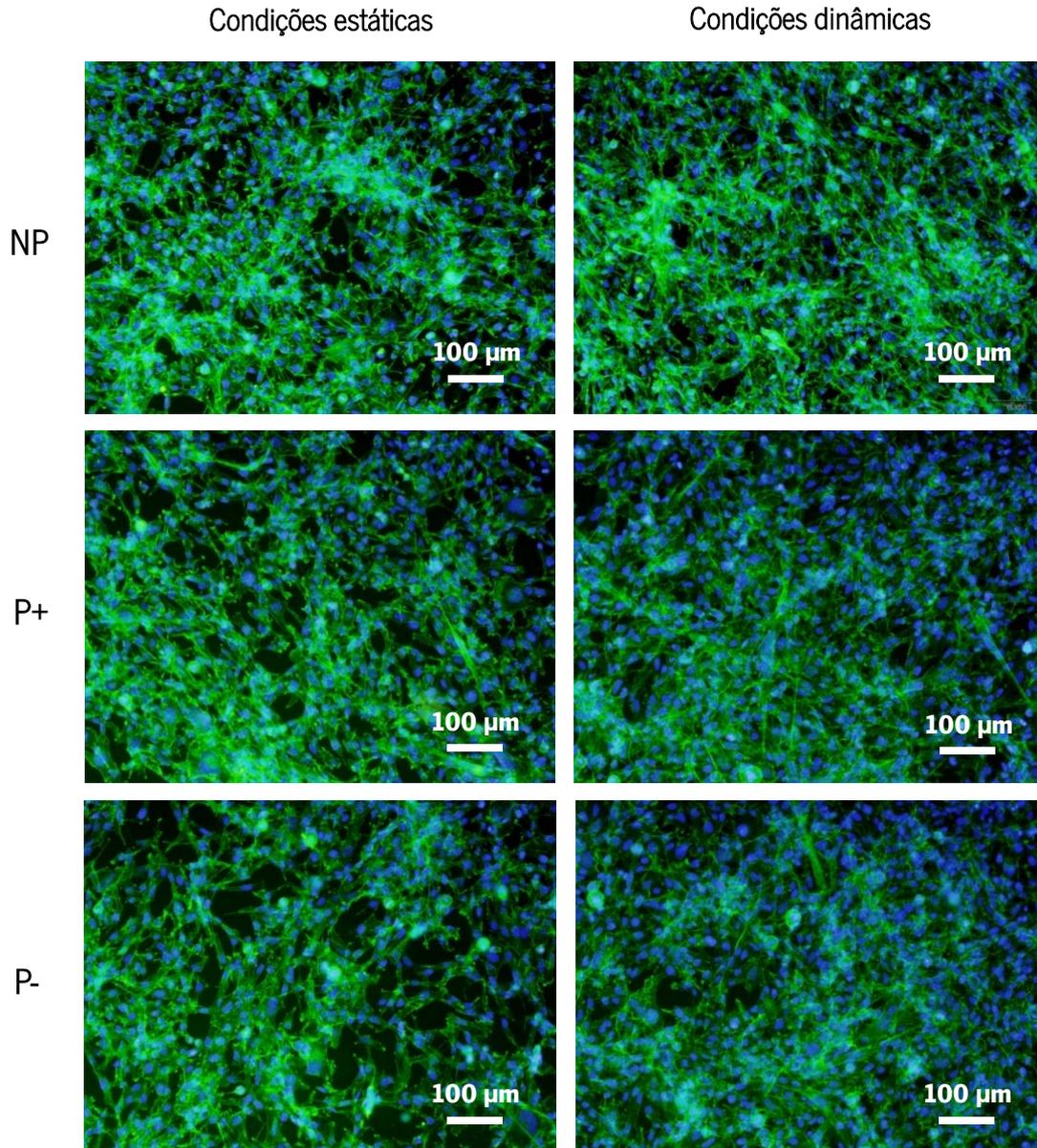


Figura 4.13. Ensaio de imunocitoquímica em células RD cultivadas nos filmes de PVDF com diferentes estados de polarização, após 72 h de cultura em condições estáticas e dinâmicas (biorreator mecânico).

Nas imagens de imunofluorescência, o FITC é responsável por destacar a verde as proteínas que constituem o citoesqueleto ou que são secretadas pelas células. Um exemplo de proteínas que podem ser marcadas neste tipo de ensaio são as proteínas da matriz extracelular que são depositadas à medida que as células vão aderindo ao substrato. Sendo assim, é possível constatar que ocorreu a deposição de matriz extracelular em todas as amostras, o que significa que as células aderiram a todos os filmes, independentemente da polarização e da estimulação. O DAPI, por sua vez, é uma substância

que marca a azul os núcleos das células. Desse modo, verificou-se que existem células em todas as amostras, sendo este número superior nas condições dinâmicas, o que está de acordo com a maior proliferação na presença dos estímulos (Figura 4.12). Outra observação importante é que nem os materiais nem os estímulos alteraram a morfologia das células, uma vez que estas apresentam a sua morfologia típica, semelhante a mioblastos imaturos que se dispersam aleatoriamente e não apresentam o citoesqueleto alongado (característica dos mioblastos saudáveis) [6].

Dado que a polarização dos filmes não revelou ter um efeito considerável no comportamento desta linha celular, optou-se por não realizar a polarização dos filmes compósitos desenvolvidos. Os ensaios de proliferação celular nestas amostras também foram realizados em condições estáticas e dinâmicas, mas utilizou-se um biorreator magnético devido às propriedades magnetoelétricas dos filmes produzidos. Os resultados obtidos após 72 h de cultura encontram-se apresentados na Figura 4.14.

Nas condições estáticas, a proliferação celular foi semelhante em todas as amostras. Tal como foi mencionado anteriormente (subcapítulo 4.2), os filmes compósitos produzidos apresentam valores de ângulo de contacto idênticos, um indicador de que essas amostras possuem propriedades de superfície semelhantes. Desse modo, é espectável que tenham o mesmo impacto no crescimento celular na ausência de estímulos, o que se verificou experimentalmente.

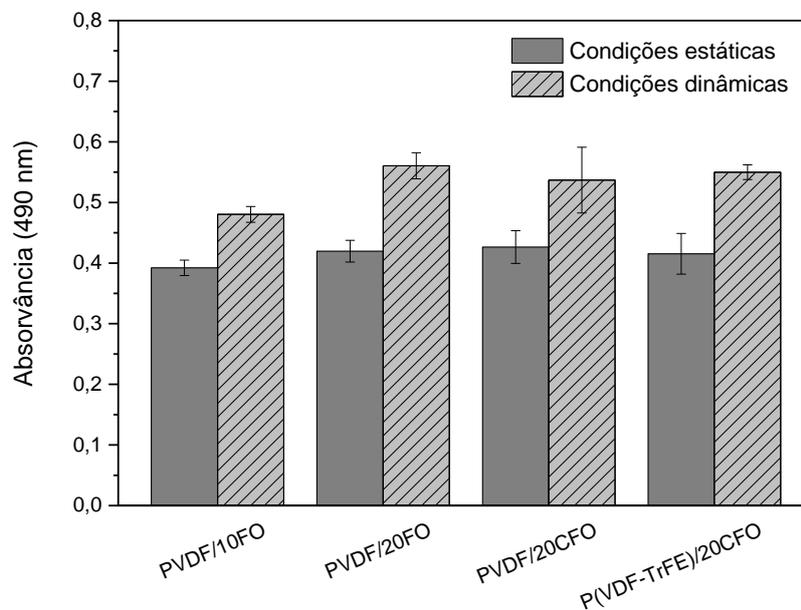


Figura 4.14. Proliferação celular das células RD cultivadas nos diferentes filmes compósitos produzidos, após 72 h de cultura em condições estáticas e dinâmicas (biorreator magnético).

Nas condições dinâmicas, já é possível observar algumas alterações relevantes. Novamente, houve um aumento da proliferação celular em todas as amostras na presença da estimulação mediada pelo biorreator magnético, comparativamente às condições estáticas. Além disso, comprovou-se que o aumento do crescimento celular foi superior nas amostras com 20 % (p/p) de nanopartículas, rondando os 30%, enquanto que na amostra com 10 % (p/p) de FO, o aumento foi aproximadamente 20%. Este resultado está em conformidade com o facto de uma quantidade superior de nanopartículas magnetostritivas nas amostras resultar numa maior estimulação das células, tendo, por isso, um maior efeito na sua proliferação. Porém, não é possível observar variações significativas entre a amostra com nanopartículas de FO e as amostras com nanopartículas de CFO, assim como entre a amostra de PVDF e a amostra de P(VDF-TrFE), o que revela que o tipo de nanopartículas incorporado e a composição da matriz polimérica não afetaram o desempenho desses materiais na estimulação celular, sendo a concentração das nanopartículas o parâmetro mais relevante. Estes resultados estão de acordo com o previsto, uma vez que os dois tipos de nanopartículas apresentam magnetizações de saturação semelhantes, como se constatou anteriormente nos ensaios de VSM (subcapítulo 4.4). Tendo uma magnetização similar, os estímulos fornecidos serão da mesma magnitude, o que induz uma resposta idêntica nas células, tal como se verificou. Comparando com outros estudos, as células RD manifestaram neste ensaio um comportamento semelhante aos mioblastos C2C12, os quais apresentam uma maior proliferação e diferenciação sob estimulação magnética, quando cultivados sobre substratos de P(VDF-TrFE) e CFO [74].

Comparando as duas formas de estimulação, verificou-se que houve um maior aumento (10 a 20% superior) na proliferação celular entre as condições estáticas e dinâmicas nos ensaios realizados usando o biorreator magnético e os filmes compósitos do que usando o biorreator mecânico e os filmes de PVDF. Para além dos resultados revelarem que o controlo da estimulação mecânica e/ou elétrica fornecida pelos polímeros piezoelétricos pode ser realizado através da incorporação de nanopartículas e da exposição a campos magnéticos, também demonstram que essa abordagem teve um maior impacto na resposta das células de RMS.

Com o intuito de estudar o efeito da morfologia dos materiais neste tipo de células, foram realizados ensaios de adesão celular com uma duração de 24 h em condições estáticas nas fibras produzidas, estando os resultados obtidos apresentados na Figura 4.15. A partir do ensaio calorimétrico realizado, é possível concluir que as células aderiram em todas as amostras. Relativamente à orientação das fibras, verificou-se que as células apresentam uma maior adesão nas fibras NO do que nas fibras O, o que pode dever-se à maior área de superfície das fibras não orientadas. Tendo em consideração que

a adesão celular foi inferior nas fibras orientadas, procedeu-se à incorporação de nanopartículas de FO nesse tipo de fibras para determinar o efeito desse componente na resposta das células. Contudo, observou-se que não existem diferenças significativas entre a adesão celular nas fibras orientadas com e sem essas nanopartículas. Este resultado está em conformidade com o facto de essas fibras possuírem valores de ângulo de contacto idênticos (subcapítulo 4.2), o que revela que essas amostras possuem propriedades de superfície semelhantes, razão pela qual seria de esperar apresentarem uma adesão celular similar em condições estáticas.

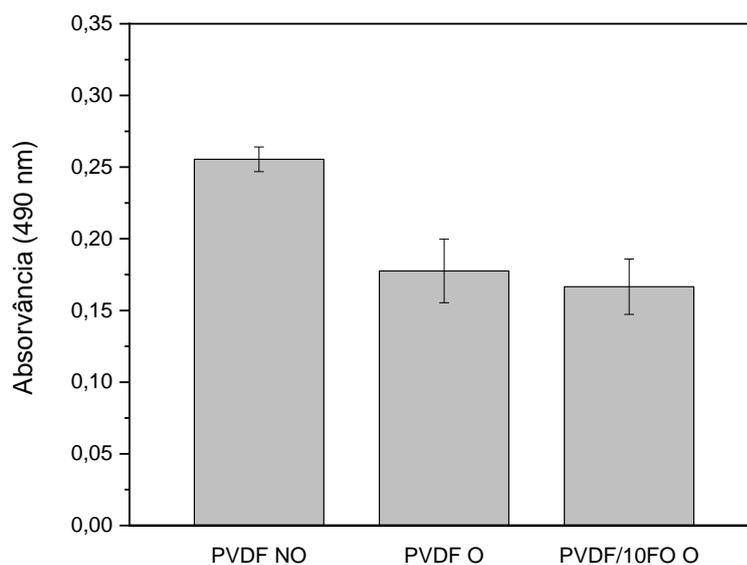


Figura 4.15. Adesão celular das células RD cultivadas nas fibras produzidas, após 24 h de cultura em condições estáticas.

5. Conclusões e trabalhos futuros

Nesta dissertação, foram produzidos filmes compósitos de PVDF e P(VDF-TrFE) com diferentes concentrações de nanopartículas de FO e CFO. Para além disso, foram fabricadas fibras de PVDF não orientadas e fibras de PVDF orientadas com e sem nanopartículas de FO. Inicialmente, foi realizada a caracterização a nível morfológico, físico-químico, térmico, mecânico e magnético dos materiais desenvolvidos, sendo posteriormente avaliado o seu efeito no comportamento das células de RMS através de ensaios celulares em condições estáticas e dinâmicas.

A partir das imagens de SEM, constatou-se que a morfologia dos filmes se manteve uniforme em todas as amostras, apresentando uma estrutura compacta e com ausência de poros. Embora as nanopartículas estejam distribuídas por toda a amostra, ocorreu a formação de alguns aglomerados de pequenas dimensões em todos os filmes. Em relação às fibras, observou-se que, como previsto, as fibras não orientadas se depositaram de forma aleatória e possuem um diâmetro médio de $0,97 \pm 0,20 \mu\text{m}$, enquanto que as fibras orientadas sofreram um alinhamento na direção do coletor e apresentam um diâmetro de $0,82 \pm 0,13 \mu\text{m}$. A introdução de nanopartículas nas fibras orientadas promoveu uma diminuição do diâmetro médio das fibras para $0,69 \pm 0,31 \mu\text{m}$. A análise da dispersão das nanopartículas revelou que estas se encontram distribuídas pelas fibras, mas, tal como nos filmes, ocorreu a formação de alguns aglomerados de pequenas dimensões. Contudo, as nanopartículas aparentam estar bem encapsuladas pelo polímero.

A avaliação da molhabilidade demonstrou que, apesar das diferentes composições, os filmes possuem uma molhabilidade semelhante, apresentando ângulos de contacto próximos dos 90° . O mesmo se observou nas fibras, as quais apresentam ângulos de contacto que rondam os 130° . Paralelamente, comprovou-se que as fibras apresentam uma menor molhabilidade do que os filmes.

Pela análise dos espectros de FTIR-ATR, concluiu-se que tanto os filmes como as fibras apresentam bandas de absorção características do PVDF, o que indica que o método de processamento e a incorporação de nanopartículas não alterou as propriedades físico-químicas do polímero. Como seria de esperar, no filme de P(VDF-TrFE), as bandas de absorção associadas à fase β são mais intensas, visto que este copolímero cristaliza quase totalmente nessa fase. Contrariamente, nos restantes filmes, as bandas de absorção associadas à fase α são mais proeminentes, o que está de acordo com a fração de fase β ser inferior, a qual ronda os 30%. Quanto às fibras, as amostras são constituídas maioritariamente

pela fase β . Adicionalmente, o alinhamento das fibras e a incorporação de nanopartículas promoveu o aumento da fase β nas fibras produzidas.

Através das curvas de DSC, verificou-se que os filmes e as fibras de PVDF apresentam apenas um pico endotérmico associado à fusão do polímero e situado próximo dos 170 °C nos filmes e dos 160°C nas fibras. Todavia, a incorporação de nanopartículas de FO nas fibras induziu um ligeiro aumento da temperatura de fusão. Em contraste, o filme de P(VDF-TrFE) apresenta dois picos endotérmicos, um correspondente à temperatura de Curie nos 107 °C e outro correspondente à temperatura de fusão nos 152 °C. Relativamente ao grau de cristalinidade, os valores obtidos nos filmes de PVDF são idênticos e rondam os 50%, enquanto que no filme de P(VDF-TrFE) esse valor é inferior e aproximadamente igual a 32%. Nas fibras, o grau de cristalinidade é superior nas fibras orientadas (55%) do que nas fibras não orientadas (48%). Por outro lado, a adição de nanopartículas provocou uma diminuição no grau de cristalinidade das fibras orientadas para 44%.

A análise por TGA demonstrou que todas as amostras possuem apenas um único patamar de degradação situado entre os 400 e os 500 °C, seguido de uma perda de massa menos acentuada. Observou-se também que a temperatura inicial de degradação das fibras é um pouco inferior à dos filmes e que a incorporação de nanopartículas nas fibras e o aumento da concentração de nanopartículas nos filmes diminui a estabilidade térmica das amostras.

A respeito das propriedades mecânicas, averiguou-se que os filmes são mais resistentes à deformação do que as fibras. Nos filmes, o aumento de 10% (p/p) na concentração das nanopartículas induziu um aumento do módulo de Young das amostras de 2475 para 2988 MPa. Além disso, o filme de PVDF possui um maior módulo de Young (2173 MPa) do que o filme de P(VDF-TrFE) (1475 MPa). Nas fibras, constatou-se que as fibras não orientadas têm uma menor resistência à deformação (101 MPa) comparativamente às fibras orientadas (563 MPa) e que, similarmente ao que ocorre nos filmes, a incorporação de nanopartículas aumentou o módulo de Young das fibras orientadas para 1162 MPa.

Nos ensaios mecânicos cíclicos, apenas foi possível observar alterações nas propriedades das fibras de PVDF orientadas nos ciclos com uma amplitude de 2% de deformação. Nesse caso, durante a primeira metade do ensaio, a histerese entre a curva de carga e de descarga vai-se tornando mais notória, o que se traduz num aumento da energia dissipada. Adicionalmente, o módulo de Young diminui mais acentuadamente durante os primeiros ciclos, sendo esse aumento menos evidente nos seguintes. Apesar das propriedades mecânicas destas fibras sofrerem pequenas alterações nos primeiros 500 ciclos, estas mantêm-se constantes a partir desse ponto, o que demonstra a viabilidade da utilização destas fibras para diferentes tipos de estudos celulares que requeiram estimulação mecânica prolongada.

A caracterização magnética das amostras revelou que as nanopartículas de FO exibem um comportamento superparamagnético, enquanto que as nanopartículas de CFO exibem um comportamento ferromagnético. Nas amostras com propriedades ferromagnéticas, constatou-se que o campo coercivo é aproximadamente 2 kOe, idêntico às nanopartículas puras. No entanto, a magnetização remanescente dessas amostras (5 emu/g) é substancialmente inferior às nanopartículas puras (32,3 emu/g). Similarmente, a magnetização de saturação de todas as amostras é inferior à magnetização de saturação das respectivas nanopartículas puras e proporcional à quantidade de nanopartículas presente na amostra. Para além disso, as nanopartículas puras apresentam magnetizações de saturação similares, sendo 68,3 emu/g nas nanopartículas de FO e 59,4 nas nanopartículas de CFO. Quanto à eficiência de imobilização das nanopartículas, esta é próxima dos 100% nas fibras, varia entre os 90 e 95% nos filmes com nanopartículas de FO e varia entre os 85 e os 90% nos filmes com nanopartículas de CFO.

Nos ensaios celulares, para além dos materiais desenvolvidos, foram analisados filmes comerciais de PVDF com diferentes estados de polarização. Nas condições estáticas, após 72 h de cultura, a proliferação celular foi muito semelhante em todos os filmes de PVDF puro, independentemente da polarização. Nas condições dinâmicas (biorreator mecânico), a presença de estímulos resultou num aumento da proliferação em todas as amostras, sendo este aumento um pouco mais acentuado nos filmes polarizados (10%) do que no filme não polarizado (5%). A análise através de microscopia de fluorescência demonstrou que estes materiais não influenciaram a morfologia das células, uma vez que estas apresentam a sua morfologia típica. No caso dos filmes produzidos, após 72 h de cultura em condições estáticas, a proliferação celular foi idêntica em todas as amostras, apesar das diferentes composições. Nas condições dinâmicas (biorreator magnético), a estimulação resultou num aumento do crescimento celular em todas as amostras. Porém, este aumento foi mais pronunciado nas amostras com 20 %(p/p) de nanopartículas (30%) comparativamente à amostra com 10 %(p/p) de nanopartículas (20%). A partir destes resultados, é possível constatar que o controlo da estimulação mecânica e/ou elétrica fornecida pelos polímeros piezoelétricos através da incorporação de nanopartículas e da exposição a campos magnéticos foi feito com sucesso. Paralelamente, concluiu-se que os filmes compósitos em combinação com o biorreator magnético tiveram um maior impacto (10 a 20% superior) no crescimento das células de RMS do que os filmes de PVDF puro conjugados com o biorreator mecânico. Relativamente às fibras, verificou-se que, após 24 h de cultura, a adesão celular foi superior nas fibras não orientadas do que nas fibras orientadas e que a incorporação de nanopartículas não afetou a adesão celular nas fibras orientadas.

Com base nos ensaios celulares, conclui-se que os materiais eletroativos desenvolvidos e os estímulos físicos (mecânicos e/ou elétricos) por eles fornecidos têm a capacidade de influenciar o comportamento das células de RMS, revelando ter um efeito proliferativo neste tipo de células. Tendo isso em consideração, sugerem-se os seguintes trabalhos futuros:

- prosseguir com a análise do efeito das fibras produzidas no comportamento desta linha celular em condições dinâmicas, nomeadamente aplicando esforços mecânicos cíclicos;
- testar o impacto de outras condições de estimulação (diferentes tempos de estimulação e de repouso, diferentes amplitudes) na resposta destas células;
- avaliar o efeito dos estímulos fornecidos por este tipo de materiais noutras linhas celulares cancerígenas;
- realizar ensaios celulares dinâmicos em células cancerígenas e saudáveis, para averiguar se é possível regular a especificidade destes estímulos;
- avaliar as modificações que as diferentes condições de cultivo induzem a nível celular em termos de proteómica e genómica.

Referências bibliográficas

- [1] W. Kilarski, Chapter 2 - Functional Morphology of the Striated Muscle, in: J.A. Zoladz (Ed.), *Muscle and Exercise Physiology*, Academic Press (2019).
- [2] T. Firat, Chapter 8 - Architecture of muscle tissue and its adaptation to pathological conditions, in: S. Angin, I.E. Şimşek (Eds.), *Comparative Kinesiology of the Human Body*, Academic Press (2020).
- [3] P. Hopkins, Skeletal muscle physiology, *Continuing Education in Anaesthesia, Critical Care & Pain* 6 (2006).
- [4] D.A. Vodanovich, P.F. M Choong, Soft-tissue Sarcomas, *Indian Journal of Orthopaedics* 52(1) (2018).
- [5] R. Dasgupta, J. Fuchs, D. Rodeberg, Rhabdomyosarcoma, *Seminars in Pediatric Surgery* 25(5) (2016).
- [6] S.X. Skapek, A. Ferrari, A.A. Gupta, P.J. Lupo, E. Butler, J. Shipley, F.G. Barr, D.S. Hawkins, Rhabdomyosarcoma, *Nature reviews. Disease primers* 5(1) (2019).
- [7] A.T. Wasti, H. Mandeville, S. Gatz, J.C. Chisholm, Rhabdomyosarcoma, *Paediatrics and Child Health* 28(4) (2018).
- [8] R. Ralhan, J. Kaur, Alkylating agents and cancer therapy, *Expert Opinion on Therapeutic Patents* 17 (2007).
- [9] S. Malempati, D.S. Hawkins, Rhabdomyosarcoma: review of the Children's Oncology Group (COG) Soft-Tissue Sarcoma Committee experience and rationale for current COG studies, *Pediatric blood & cancer* 59(1) (2012).
- [10] T.M. Dantonello, C. Int-Veen, D. Harms, I. Leuschner, B.F. Schmidt, M. Herbst, H. Juergens, H.G. Scheel-Walter, S.S. Bielack, T. Klingebiel, R. Dickerhoff, S. Kirsch, I. Brecht, R. Schmelzle, M. Greulich, H. Gadner, J. Greiner, I. Marky, J. Treuner, E. Koscielniak, Cooperative trial CWS-91 for localized soft tissue sarcoma in children, adolescents, and young adults, *Journal of clinical oncology: official journal of the American Society of Clinical Oncology* 27(9) (2009).
- [11] S.A. Terezakis, M.D. Wharam, Radiotherapy for rhabdomyosarcoma: indications and outcome, *Clinical oncology (Royal College of Radiologists (Great Britain))* 25(1) (2013).
- [12] R. Langer, J.P. Vacanti, Tissue engineering, *Science* 260(5110) (1993).
- [13] E. Bell, Tissue Engineering In Perspective, in: R.P. Lanza, R. Langer, J. Vacanti (Eds.), *Principles of Tissue Engineering (Second Edition)*, Academic Press, San Diego (2000).
- [14] G. Khang, S. J. Lee, M. S. Kim, H. B. Lee, Biomaterials: Tissue Engineering and Scaffolds, *Encyclopedia of Medical Devices and Instrumentation* (2006).

- [15] A. Dolcimascolo, G. Calabrese, S. Conoci, R. Parenti, Innovative Biomaterials for Tissue Engineering, Biomaterial-supported Tissue Reconstruction or Regeneration, (2019).
- [16] F.J. O'Brien, Biomaterials & scaffolds for tissue engineering, *Materials Today* 14(3) (2011).
- [17] H.-I. Chang, Y. Wang, Cell Responses to Surface and Architecture of Tissue Engineering Scaffolds (2011).
- [18] D.W. Hutmacher, T.B.F. Woodfield, P.D. Dalton, Chapter 10 - Scaffold Design and Fabrication, in: C.A.V. Blitterswijk, J. De Boer (Eds.), *Tissue Engineering (Second Edition)*, Academic Press, Oxford (2014).
- [19] A. Hudecki, G. Kiryczyński, M.J. Łos, Chapter 7 - Biomaterials, Definition, Overview, in: M.J. Łos, A. Hudecki, E. Wiecheć (Eds.), *Stem Cells and Biomaterials for Regenerative Medicine*, Academic Press (2019).
- [20] T. Tateishi, Biomaterial-Tissue Interfaces, *Advances in Biomaterials* 10 (1992).
- [21] G. Thandapani, E. Radha, J. Jayashri, J. Annie Kamala Florence, P.N. Sudha, 4 - Bioactive metallic surfaces for bone tissue engineering, in: P. Balakrishnan, S. M S, S. Thomas (Eds.), *Fundamental Biomaterials: Metals*, Woodhead Publishing (2018).
- [22] J. Huang, S. Best, 1 - Ceramic biomaterials for tissue engineering, in: A.R. Boccaccini, P.X. Ma (Eds.), *Tissue Engineering Using Ceramics and Polymers (Second Edition)*, Woodhead Publishing (2014).
- [23] T.J. Keane, S.F. Badylak, Biomaterials for tissue engineering applications, *Seminars in Pediatric Surgery* 23(3) (2014).
- [24] O.S. Manoukian, N. Sardashti, T. Stedman, K. Gailiunas, A. Ojha, A. Penalosa, C. Mancuso, M. Hobert, S.G. Kumbar, Biomaterials for Tissue Engineering and Regenerative Medicine, in: R. Narayan (Ed.), *Encyclopedia of Biomedical Engineering*, Elsevier, Oxford (2019).
- [25] V.F. Cardoso, C. Ribeiro, S. Lanceros-Mendez, 3 - Metamorphic biomaterials, in: L. Rodrigues, M. Mota (Eds.), *Bioinspired Materials for Medical Applications*, Woodhead Publishing (2017).
- [26] V. Guarino, S. Zuppolini, A. Borriello, L. Ambrosio, Electro-Active Polymers (EAPs): A Promising Route to Design Bio-Organic/Bioinspired Platforms with on Demand Functionalities, *Polymers (Basel)* 8(5) (2016).
- [27] H. Palza, P.A. Zapata, C. Angulo-Pineda, Electroactive Smart Polymers for Biomedical Applications, *Materials (Basel, Switzerland)* 12(2) (2019).
- [28] S. Ribeiro, C. García Astrain, M. Fernandes, S. Lanceros-Méndez, C. Ribeiro, Multidimensional Biomechanics Approaches Through Electrically and Magnetically Active Microenvironments (2019).
- [29] N. Soin, S.C. Anand, T.H. Shah, 12 - Energy harvesting and storage textiles, in: A.R. Horrocks, S.C. Anand (Eds.), *Handbook of Technical Textiles (Second Edition)*, Woodhead Publishing (2016).
- [30] J. Nunes-Pereira, P. Costa, S. Lanceros-Méndez, 3.9 Piezoelectric Energy Production (2018).

- [31] C. Ribeiro, J. Pärssinen, V. Sencadas, V. Correia, S. Miettinen, V.P. Hytönen, S. Lanceros-Méndez, Dynamic piezoelectric stimulation enhances osteogenic differentiation of human adipose stem cells, *Journal of biomedical materials research. Part A* 103(6) (2015).
- [32] V.F. Cardoso, G. Minas, S. Lanceros-Méndez, Multilayer spin-coating deposition of poly(vinylidene fluoride) films for controlling thickness and piezoelectric response, *Sensors and Actuators A: Physical* 192 (2013).
- [33] V.F. Cardoso, G. Botelho, S. Lanceros-Méndez, Nonsolvent induced phase separation preparation of poly(vinylidene fluoride-co-chlorotrifluoroethylene) membranes with tailored morphology, piezoelectric phase content and mechanical properties, *Materials & Design* 88 (2015).
- [34] D.M. Correia, C. Ribeiro, V. Sencadas, G. Botelho, S.A.C. Carabineiro, J.L.G. Ribelles, S. Lanceros-Méndez, Influence of oxygen plasma treatment parameters on poly(vinylidene fluoride) electrospun fiber mats wettability, *Progress in Organic Coatings* 85 (2015).
- [35] M. Dadsetan, M. Pumberger, M.E. Casper, K. Shogren, M. Giuliani, T. Ruesink, T.E. Hefferan, B.L. Currier, M.J. Yaszemski, The effects of fixed electrical charge on chondrocyte behavior, *Acta biomaterialia* 7(5) (2011).
- [36] C. Ribeiro, S. Moreira, V. Correia, V. Sencadas, J.G. Rocha, F. Gama, J.L. Gomez Ribelles, S. Lanceros-Méndez, Enhanced proliferation of pre-osteoblastic cells by dynamic piezoelectric stimulation, *RSC Advances* 2(30) (2012).
- [37] Y.S. Lee, G. Collins, T.L. Arinze, Neurite extension of primary neurons on electrospun piezoelectric scaffolds, *Acta biomaterialia* 7(11) (2011).
- [38] P. Martins, S. Ribeiro, C. Ribeiro, V. Sencadas, A. Gomes, F. Gama, S. Lanceros-Méndez, Effect of poling state and morphology of piezoelectric poly(vinylidene fluoride) membranes for skeletal muscle tissue engineering, *RSC Advances* 3(39) (2013).
- [39] S. Ebnesajjad, *Introduction to Vinylidene Fluoride Polymers, Introduction to Fluoropolymers*, William Andrew Publishing, Oxford (2013).
- [40] D.W. Grainger, 1.3.2C - Fluorinated Biomaterials, in: W.R. Wagner, S.E. Sakiyama-Elbert, G. Zhang, M.J. Yaszemski (Eds.), *Biomaterials Science (Fourth Edition)*, Academic Press (2020).
- [41] P. Martins, A.C. Lopes, S. Lanceros-Mendez, Electroactive phases of poly(vinylidene fluoride): Determination, processing and applications, *Progress in Polymer Science* 39(4) (2014).
- [42] C. Ribeiro, D. Correia, S. Ribeiro, V. Sencadas, G. Botelho, S. Lanceros-Méndez, Piezoelectric poly(vinylidene fluoride) microstructure and poling state in active tissue engineering, *Engineering in Life Sciences* 15 (2014).
- [43] V. Cardoso, D. Correia, C. Ribeiro, M. Fernandes, S. Lanceros-Méndez, Fluorinated Polymers as Smart Materials for Advanced Biomedical Applications, *Polymers* 10 (2018).
- [44] N. Ortega, A. Kumar, J. Scott, R. Katiyar, Multifunctional Magnetoelectric Materials for Device Applications, *Journal of Physics: Condensed Matter* 27 (2014).

- [45] Y. Wang, J. Hu, Y. Lin, C.-W. Nan, Multiferroic magnetoelectric composite nanostructures, *NPG Asia Materials* 2(2) (2010).
- [46] H. Palneedi, A. Venkateswarlu, S.J. Priya, J. Ryu, Status and Perspectives of Multiferroic Magnetoelectric Composite Materials and Applications, *Actuators* 5 (2016).
- [47] E. Hristoforou, A. Ktena, Magnetostriction and magnetostrictive materials for sensing applications, *Journal of Magnetism and Magnetic Materials* 316(2) (2007).
- [48] C. Ribeiro, V. Correia, P. Martins, F.M. Gama, S. Lanceros-Mendez, Proving the suitability of magnetoelectric stimuli for tissue engineering applications, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 140 (2016).
- [49] S. Savliwala, A. Chiu-Lam, M. Unni, A. Rivera-Rodriguez, E. Fuller, K. Sen, M. Threadcraft, C. Rinaldi, Chapter 13 - Magnetic nanoparticles, in: E.J. Chung, L. Leon, C. Rinaldi (Eds.), *Nanoparticles for Biomedical Applications*, Elsevier (2020).
- [50] K. Girigoswami, Toxicity of Metal Oxide Nanoparticles, *Advances in experimental medicine and biology* 1048 (2018).
- [51] S. Deger, K. Taymoorian, D. Boehmer, T. Schink, J. Roigas, A.H. Wille, V. Budach, K.-D. Wernecke, S.A. Loening, Thermoradiotherapy Using Interstitial Self-Regulating Thermosteds: An Intermediate Analysis of a Phase II Trial, *European Urology* 45(5) (2004).
- [52] K. Hiraiwa, M. Ueda, H. Takeuchi, T. Oyama, T. Irino, T. Yoshikawa, A. Kondo, Y. Kitagawa, Sentinel node mapping with thermoresponsive magnetic nanoparticles in rats, *The Journal of surgical research* 174(1) (2012).
- [53] K. Maier-Hauff, F. Ulrich, D. Nestler, H. Niehoff, P. Wust, B. Thiesen, H. Orawa, V. Budach, A. Jordan, Efficacy and safety of intratumoral thermotherapy using magnetic iron-oxide nanoparticles combined with external beam radiotherapy on patients with recurrent glioblastoma multiforme, *Journal of Neuro-Oncology* 103(2) (2011).
- [54] Z. Zhou, H. Chen, M. Lipowska, L. Wang, Q. Yu, X. Yang, D. Tiwari, L. Yang, H. Mao, A dual-modal magnetic nanoparticle probe for preoperative and intraoperative mapping of sentinel lymph nodes by magnetic resonance and near infrared fluorescence imaging, *Journal of Biomaterials Applications* 28(1) (2013).
- [55] S.Y. Srinivasan, K.M. Paknikar, D. Bodas, V. Gajbhiye, Applications of cobalt ferrite nanoparticles in biomedical nanotechnology, *Nanomedicine* 13(10) (2018).
- [56] A. Bigham, A.H. Aghajanian, S. Behzadzadeh, Z. Sokhani, S. Shojaei, Y. Kaviani, S.A. Hassanzadeh-Tabrizi, Nanostructured magnetic Mg₂SiO₄-CoFe₂O₄ composite scaffold with multiple capabilities for bone tissue regeneration, *Materials Science and Engineering: C* 99 (2019).
- [57] M.M. Fernandes, D.M. Correia, C. Ribeiro, N. Castro, V. Correia, S. Lanceros-Mendez, Bioinspired Three-Dimensional Magnetoactive Scaffolds for Bone Tissue Engineering, *ACS Applied Materials & Interfaces* 11(48) (2019).

- [58] I. Martin, D. Wendt, M. Heberer, The role of bioreactors in tissue engineering, *Trends in Biotechnology* 22(2) (2004).
- [59] C. Selden, B. Fuller, Role of Bioreactor Technology in Tissue Engineering for Clinical Use and Therapeutic Target Design, *Bioengineering* (Basel, Switzerland) 5(2) (2018).
- [60] K.J. Blose, J.T. Krawiec, J.S. Weinbaum, D.A. Vorp, Chapter 13 - Bioreactors for Tissue Engineering Purposes, in: G. Orlando, J. Lerut, S. Soker, R.J. Stratta (Eds.), *Regenerative Medicine Applications in Organ Transplantation*, Academic Press, Boston (2014).
- [61] D. Wendt, N. Timmins, J. Malda, F. Janssen, A. Ratcliffe, G. Vunjak-Novakovic, I. Martin, Chapter 16 - Bioreactors for tissue engineering, in: C.v. Blitterswijk, P. Thomsen, A. Lindahl, J. Hubbell, D.F. Williams, R. Cancedda, J.D.d. Bruijn, J. Sohier (Eds.), *Tissue Engineering*, Academic Press, Burlington (2008).
- [62] C. Handschin, A. Mortezaei, J. Plock, D. Eberli, External physical and biochemical stimulation to enhance skeletal muscle bioengineering, *Advanced drug delivery reviews* 82-83 (2015).
- [63] O. Démarteau, D. Wendt, A. Braccini, M. Jakob, D. Schäfer, M. Heberer, I. Martin, Dynamic compression of cartilage constructs engineered from expanded human articular chondrocytes, *Biochemical and biophysical research communications* 310(2) (2003).
- [64] A. Nieponice, T.M. Maul, J.M. Cumer, L. Soletti, D.A. Vorp, Mechanical stimulation induces morphological and phenotypic changes in bone marrow-derived progenitor cells within a three-dimensional fibrin matrix, *Journal of biomedical materials research. Part A* 81(3) (2007).
- [65] G.H. Altman, R.L. Horan, I. Martin, J. Farhadi, P.R. Stark, V. Volloch, J.C. Richmond, G. Vunjak-Novakovic, D.L. Kaplan, Cell differentiation by mechanical stress, *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 16(2) (2002).
- [66] S. Grad, C.R. Lee, K. Gorna, S. Gogolewski, M.A. Wimmer, M. Alini, Surface motion upregulates superficial zone protein and hyaluronan production in chondrocyte-seeded three-dimensional scaffolds, *Tissue Engineering* 11(1-2) (2005).
- [67] P. Harnischfeger, B.-J. Jungnickel, Features and origin of the dynamic and the nonlinear piezoelectricity in poly(vinylidene fluoride), 1(2) (1990).
- [68] V.V. Kochervinskii, Mechanism of polarization and piezoelectric behavior in crystallizable ferroelectric polymers from the standpoint of propagation of soliton waves, *Polymer Science Series C* 48(1) (2006).
- [69] V. Sencadas, C. Costa, V. Moreira, J. Monteiro, S.K. Mendiratta, J.F. Mano, S. Lanceros-Méndez, Poling of β -poly(vinylidene fluoride): Dielectric and IR spectroscopy studies, *e-Polymers* 5 (2005).
- [70] T. Yamada, Piezoelectricity of a vinylidene fluoride-trifluoroethylene copolymer, *Journal of Applied Physics*, 53(9) (1982).
- [71] C. Ribeiro, J. Pärssinen, V. Sencadas, V. Correia, S. Miettinen, V. Hytonen, S. Lanceros-Méndez, Dynamic piezoelectric stimulation enhances osteogenic differentiation of human adipose stem cells, *Journal of Biomedical Materials Research Part A* 103 (2014).

- [72] A. Wang, M. Hu, L. Zhou, X. Qiang, Self-Powered Well-Aligned P(VDF-TrFE) Piezoelectric Nanofiber Nanogenerator for Modulating an Exact Electrical Stimulation and Enhancing the Proliferation of Preosteoblasts, *Nanomaterials* 9 (2019).
- [73] H. Hu, W. Jiang, F. Lan, X. Zeng, S. Ma, Y. Wu, Z. Gu, Synergic effect of magnetic nanoparticles on the electrospun aligned superparamagnetic nanofibers as a potential tissue engineering scaffold, *RSC Advances* 3(3) (2012).
- [74] S. Ribeiro, C. Ribeiro, E. O. Carvalho, C. Tubio, N. Castro, N. Pereira, V. Correia, A. Gomes, S. Lanceros-Méndez, Magnetically Activated Electroactive Microenvironments for Skeletal Muscle Tissue Regeneration, *ACS Applied Bio Materials* (2020).
- [75] C. Buckner, A. Buckner, S. Koren, M. Persinger, R. Lafrenie, Inhibition of Cancer Cell Growth by Exposure to a Specific Time-Varying Electromagnetic Field Involves T-Type Calcium Channels, *Plos One* 10 (2015).
- [76] A. Katiyar, J. Osborn, M. DasBanerjee, L.G. Zhang, K. Sarkar, K.P. Sarker, Inhibition of Human Breast Cancer Cell Proliferation by Low-Intensity Ultrasound Stimulation, *Journal of Ultrasound in Medicine* 39(10) (2020).
- [77] A. Marino, M. Battaglini, D. De Pasquale, A. Degl'Innocenti, G. Ciofani, Ultrasound-Activated Piezoelectric Nanoparticles Inhibit Proliferation of Breast Cancer Cells, *Scientific Reports* 8(1) (2018).
- [78] A. Marino, E. Almici, S. Migliorin, C. Tapeinos, M. Battaglini, V. Cappello, M. Marchetti, G. de Vito, R. Cicchi, F.S. Pavone, G. Ciofani, Piezoelectric barium titanate nanostimulators for the treatment of glioblastoma multiforme, *Journal of Colloid and Interface Science* 538 (2019).
- [79] R. Stupp, S. Taillibert, A.A. Kanner, S. Kesari, D.M. Steinberg, S.A. Toms, L.P. Taylor, F. Lieberman, A. Silvani, K.L. Fink, G.H. Barnett, J.J. Zhu, J.W. Henson, H.H. Engelhard, T.C. Chen, D.D. Tran, J. Sroubek, N.D. Tran, A.F. Hottinger, J. Landolfi, R. Desai, M. Caroli, Y. Kew, J. Honnorat, A. Idhahbi, E.D. Kirson, U. Weinberg, Y. Palti, M.E. Hegi, Z. Ram, Maintenance Therapy With Tumor-Treating Fields Plus Temozolomide vs Temozolomide Alone for Glioblastoma: A Randomized Clinical Trial, *Jama* 314(23) (2015).
- [80] D. Ma, H. Lu, L. Xu, X. Xu, W. Xiao, Mechanical loading promotes Lewis lung cancer cell growth through periostin, *In vitro cellular & developmental biology. Animal* 45(8) (2009).
- [81] C.M. Novak, E.N. Horst, E. Lin, G. Mehta, Compressive Stimulation Enhances Ovarian Cancer Proliferation, Invasion, Chemoresistance, and Mechanotransduction via CDC42 in a 3D Bioreactor, *Cancers* 12(6) (2020).
- [82] M. Hofmann, M. Guschel, A. Bernd, J. Bereiter-Hahn, R. Kaufmann, C. Tandi, H. Wiig, S. Kippenberger, Lowering of Tumor Interstitial Fluid Pressure Reduces Tumor Cell Proliferation in a Xenograft Tumor Model, *Neoplasia* 8(2) (2006).
- [83] F. Wahid, T. Khan, Z. Hussain, H. Ullah, 30 - Nanocomposite scaffolds for tissue engineering; properties, preparation and applications, in: Inamuddin, A.M. Asiri, A. Mohammad (Eds.), *Applications of Nanocomposite Materials in Drug Delivery*, Woodhead Publishing (2018).

- [84] C. Ribeiro, C.M. Costa, D.M. Correia, J. Nunes-Pereira, J. Oliveira, P. Martins, R. Gonçalves, V.F. Cardoso, S. Lanceros-Méndez, Electroactive poly(vinylidene fluoride)-based structures for advanced applications, *Nature Protocols* 13(4) (2018).
- [85] C.J. Angamma, S.H. Jayaram, Fundamentals of electrospinning and processing technologies, *Particulate Science and Technology* 34(1) (2016).
- [86] V. Jacobs, R.D. Anandjiwala, M. Maaza, The influence of electrospinning parameters on the structural morphology and diameter of electrospun nanofibers, *Journal of Applied Polymer Science* 115(5) (2010).
- [87] N.H.A. Ngadiman, N. Mohd Yusof, A. Idris, D. Kurniawan, Effect of Electrospinning Parameters Setting towards Fiber Diameter, *Advanced Materials Research* 845 (2013).
- [88] A. Haider, S. Haider, I.-K. Kang, A comprehensive review summarizing the effect of electrospinning parameters and potential applications of nanofibers in biomedical and biotechnology, *Arabian Journal of Chemistry* 11(8) (2018).
- [89] S. Henning, R. Adhikari, Chapter 1 - Scanning Electron Microscopy, ESEM, and X-ray Microanalysis, in: S. Thomas, R. Thomas, A.K. Zachariah, R.K. Mishra (Eds.), *Microscopy Methods in Nanomaterials Characterization*, Elsevier (2017).
- [90] M. de Assumpção Pereira-da-Silva, F.A. Ferri, 1 - Scanning Electron Microscopy, in: A.L. Da Róz, M. Ferreira, F. de Lima Leite, O.N. Oliveira (Eds.), *Nanocharacterization Techniques*, William Andrew Publishing (2017).
- [91] A.M. Paredes, MICROSCOPY | Scanning Electron Microscopy, in: C.A. Batt, M.L. Tortorello (Eds.), *Encyclopedia of Food Microbiology (Second Edition)*, Academic Press, Oxford (2014).
- [92] R. Machado, V. Sencadas, 7 - Advanced techniques for characterizing bioinspired materials, in: L. Rodrigues, M. Mota (Eds.), *Bioinspired Materials for Medical Applications*, Woodhead Publishing (2017).
- [93] T. Huhtamäki, X. Tian, J. Korhonen, R. Ras, Surface-wetting characterization using contact-angle measurements, *Nature Protocols* 13 (2018).
- [94] M. Dendisová, A. Jenišťová, A. Parchaňská-Kokaislová, P. Matějka, V. Prokopec, M. Švecová, The use of infrared spectroscopic techniques to characterize nanomaterials and nanostructures: A review, *Analytica Chimica Acta* 1031 (2018).
- [95] C. Berthomieu, R. Hienerwadel, Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopy, *Photosynthesis Research* 101(2) (2009).
- [96] M.A. Mohamed, J. Jaafar, A.F. Ismail, M.H.D. Othman, M.A. Rahman, Chapter 1 - Fourier Transform Infrared (FTIR) Spectroscopy, in: N. Hilal, A.F. Ismail, T. Matsuura, D. Oatley-Radcliffe (Eds.), *Membrane Characterization*, Elsevier (2017).
- [97] J.R. Gregorio, M. Cestari, Effect of crystallization temperature on the crystalline phase content and morphology of poly(vinylidene fluoride), *Journal of Polymer Science Part B: Polymer Physics* 32(5) (1994).
- [98] S. Ebnesajjad, 4 - Surface and Material Characterization Techniques, in: S. Ebnesajjad (Ed.), *Handbook of Adhesives and Surface Preparation*, William Andrew Publishing, Oxford (2011).

- [99] U.W. Gedde, Thermal Analysis of Polymers, in: U.W. Gedde (Ed.), Polymer Physics, Springer Netherlands, Dordrecht (1999).
- [100] Y. Leng, Thermal Analysis, Materials characterization: Introduction to microscopic and spectroscopic methods, Second edition (2013).
- [101] D.E. Heath, S.L. Cooper, Chapter I.2.2 - Polymers: Basic Principles, in: B.D. Ratner, A.S. Hoffman, F.J. Schoen, J.E. Lemons (Eds.), Biomaterials Science (Third Edition), Academic Press (2013).
- [102] J. Gomes, J. Nunes, V. Sencadas, S.J.S.M. Lancers-Méndez, Structures, Influence of the β -phase content and degree of crystallinity on the piezo- and ferroelectric properties of poly(vinylidene fluoride), 19 (2010).
- [103] G. Teyssedre, C. Lacabanne, Study of the thermal and dielectric behavior of P(VDF-TrFE) copolymers in relation with their electroactive properties, Ferroelectrics 171 (1995).
- [104] M. Rauma, A new technique to assess dermal absorption of volatile chemicals in vitro by thermal gravimetric analysis, Toxicology in Vitro (2006).
- [105] P. Gilbert, K.L. Havenstrite, K. Magnusson, A. Sacco, N.A. Leonardi, P. Kraft, N.K. Nguyen, S. Thrun, M.P. Lutolf, H. Blau, Substrate Elasticity Regulates Skeletal Muscle Stem Cell Self-Renewal in Culture, Science (New York, N.Y.) 329 (2010).
- [106] V. Hosseini, S. Ahadian, S. Ostrovidov, G. Camci-Unal, S. Chen, H. Kaji, M. Ramalingam, A. Khademhosseini, Engineered contractile skeletal muscle tissue on a microgrooved methacrylated gelatin substrate, Tissue Engineering (2012).
- [107] N. Jiwwat, E. Lynch, B. Napiwocki, A. Stempien, R. Ashton, T. Kamp, W. Crone, M. Suzuki, Micropatterned substrates with physiological stiffness promote cell maturation and Pompe disease phenotype in human induced pluripotent stem cell-derived skeletal myocytes, Biotechnology and Bioengineering 116 (2019).
- [108] W.D. Callister, Mechanical Behavior of Polymers, Materials Science and Engineering: An Introduction, 7th Edition (2006).
- [109] J.P. Mercier, G. Zambelli, W. Kurz, Chapter 11 - Tensile behaviour of materials, in: J.P. Mercier, G. Zambelli, W. Kurz (Eds.), Introduction to Materials Science, Elsevier, Oxford (2002).
- [110] K. Deshmukh, T. Kovářik, A. Muzaffar, M. Basheer Ahamed, S.K. Khadheer Pasha, Chapter 4 - Mechanical analysis of polymers, in: M.A.A. AlMaadeed, D. Ponnamma, M.A. Carignano (Eds.), Polymer Science and Innovative Applications, Elsevier (2020).
- [111] Somers SM, Spector AA, DiGirolamo DJ, Grayson WL, Biophysical Stimulation for Engineering Functional Skeletal Muscle, Tissue Eng Part B Rev. 23(4) (2017).
- [112] A. J. Lesser, Fatigue Behavior of Polymers, Encyclopedia of Polymer Science and Technology (2002).
- [113] M.C. Tanzi, S. Farè, G. Candiani, Chapter 2 - Mechanical Properties of Materials, in: M.C. Tanzi, S. Farè, G. Candiani (Eds.), Foundations of Biomaterials Engineering, Academic Press (2019).

- [114] Y.-L. Lee, M.E. Barkey, Chapter 6 - Strain-Based Uniaxial Fatigue Analysis, in: Y.-L. Lee, M.E. Barkey, H.-T. Kang (Eds.), *Metal Fatigue Analysis Handbook*, Butterworth-Heinemann, Boston (2012).
- [115] T. Thomson, 10 - Magnetic properties of metallic thin films, in: K. Barmak, K. Coffey (Eds.), *Metallic Films for Electronic, Optical and Magnetic Applications*, Woodhead Publishing (2014).
- [116] A.O. Adeyeye, G. Shimon, Chapter 1 - Growth and Characterization of Magnetic Thin Film and Nanostructures, in: R.E. Camley, Z. Celinski, R.L. Stamps (Eds.), *Handbook of Surface Science*, North-Holland (2015).
- [117] E. Spain, A. Venkatanarayanan, 13.02 - Review of Physical Principles of Sensing and Types of Sensing Materials, in: S. Hashmi, G.F. Batalha, C.J. Van Tyne, B. Yilbas (Eds.), *Comprehensive Materials Processing*, Elsevier, Oxford (2014).
- [118] N. Magnani, Ferromagnetism, in: F. Bassani, G.L. Liedl, P. Wyder (Eds.), *Encyclopedia of Condensed Matter Physics*, Elsevier, Oxford (2005).
- [119] C. Caizer, Nanoparticle Size Effect on Some Magnetic Properties, in: M. Aliofkhaezrai (Ed.), *Handbook of Nanoparticles*, Springer International Publishing, Cham (2016).
- [120] P.F. de Châtel, Paramagnetism, in: F. Bassani, G.L. Liedl, P. Wyder (Eds.), *Encyclopedia of Condensed Matter Physics*, Elsevier, Oxford (2005).
- [121] A.R.P. Hinson, R. Jones, L.E.S. Crose, B.C. Belyea, F.G. Barr, C.M. Linardic, Human rhabdomyosarcoma cell lines for rhabdomyosarcoma research: utility and pitfalls, *Frontiers in Oncology* 3 (2013).
- [122] V. Kuete, O. Karaosmanoğlu, H. Sivas, Chapter 10 - Anticancer Activities of African Medicinal Spices and Vegetables, in: V. Kuete (Ed.), *Medicinal Spices and Vegetables from Africa*, Academic Press (2017).
- [123] T. Burke, R. Bolger, W. Checovich, R. Lowery, CHAPTER 18 - Measurement of Peptide Binding Affinities Using Fluorescence Polarization, in: B.K. Kay, J. Winter, J. McCafferty (Eds.), *Phage Display of Peptides and Proteins*, Academic Press, Burlington (1996).
- [124] B.I. Tarnowski, F.G. Spinale, J.H. Nicholson, DAPI as a useful stain for nuclear quantitation, *Biotechnic & histochemistry : official publication of the Biological Stain Commission* 66(6) (1991).
- [125] J. In-Yup, J.-B. Baek, Nanocomposites Derived from Polymers and Inorganic Nanoparticles, *Materials* 3 (2010).
- [126] M.M. Maciel, S. Ribeiro, C. Ribeiro, A. Francesko, A. Maceiras, J.L. Vilas, S. Lanceros-Méndez, Relation between fiber orientation and mechanical properties of nano-engineered poly(vinylidene fluoride) electrospun composite fiber mats, *Composites Part B: Engineering* 139 (2018).
- [127] S.I. Huang, H. Chen, Study on the Improvement of Hydrophobicity of PVDF Films, *Journal of Thermoplastic Composite Materials* 24(1) (2010).
- [128] P.K. Szewczyk, S. Metwally, Z.J. Krysiak, Ł. Kaniuk, J.E. Karbowniczek, U. Stachewicz, Enhanced osteoblasts adhesion and collagen formation on biomimetic polyvinylidene fluoride (PVDF) films for bone regeneration, *Biomedical materials (Bristol, England)* 14(6) (2019).

- [129] S. Gee, B. Johnson, A.L. Smith, Optimizing electrospinning parameters for piezoelectric PVDF nanofiber membranes, *Journal of Membrane Science* 563 (2018).
- [130] R. Moradi, J. Karimi-Sabet, M. Shariaty-Niassar, A. Koochaki, Preparation and Characterization of Polyvinylidene Fluoride/Graphene Superhydrophobic Fibrous Films, *Polymers* 7 (2015).
- [131] C. Meringolo, T. Mastropietro, T. Poerio, E. Fontananova, G. Filpo, E. Curcio, G. Di Profio, Tailoring PVDF Membranes Surface Topography and Hydrophobicity by a Sustainable Two-Steps Phase Separation Process, *ACS Sustainable Chemistry & Engineering* 6 (2018).
- [132] F. Agyemang, F. Li, F. Momade, H. Kim, Effect of poly(ethylene oxide) and water on electrospun poly(vinylidene fluoride) nanofibers with enhanced mechanical properties as pre-filter for oil-in-water filtration, *Materials Chemistry and Physics* 182 (2016).
- [133] X. Cai, T. Lei, D. Sun, L. Lin, A critical analysis of the α , β and γ phases in poly(vinylidene fluoride) using FTIR, *RSC Advances* 7(25) (2017).
- [134] A. Rahimpour, S.S. Madaeni, S. Zereszki, Y. Mansourpanah, Preparation and characterization of modified nano-porous PVDF membrane with high antifouling property using UV photo-grafting, *Applied Surface Science* 255(16) (2009).
- [135] M. Sharma, G. Madras, S. Bose, Process induced electroactive β -polymorph in PVDF: Effect on dielectric and ferroelectric properties, *Physical chemistry chemical physics: PCCP* 16 (2014).
- [136] P. Martins, C.M. Costa, S. Lanceros-Mendez, Nucleation of electroactive β -phase poly(vinylidene fluoride) with CoFe₂O₄ and NiFe₂O₄ nanofillers: a new method for the preparation of multiferroic nanocomposites, *Applied Physics A* 103(1) (2011).
- [137] V. Sencadas, P. Martins, A. Pitães, M. Benelmekki, J.L. Gómez Ribelles, S. Lanceros-Mendez, Influence of Ferrite Nanoparticle Type and Content on the Crystallization Kinetics and Electroactive Phase Nucleation of Poly(vinylidene fluoride), *Langmuir* 27(11) (2011).
- [138] B. Zaarour, L. Zhu, C. Huang, X. Jin, Enhanced piezoelectric properties of randomly oriented and aligned electrospun PVDF fibers by regulating the surface morphology, *Journal of Applied Polymer Science* 136 (2018).
- [139] N. Shehata, E. Elnabawy, M. Fawzy, A. Hassanin, M. Salah, R. Ramakrishnan Nair, S. Bhat, Static-Aligned Piezoelectric Poly (Vinylidene Fluoride) Electrospun Nanofibers/MWCNT Composite Membrane: Facile Method, *Polymers* 10 (2018).
- [140] R. Gonçalves, P. Martins, X. Moya, M. Ghidini, V. Sencadas, G. Botelho, N. Mathur, S. Lanceros-Méndez, Magnetoelectric CoFe₂O₄ /polyvinylidene fluoride electrospun nanofibres, *Nanoscale* 7 (2015).
- [141] T. Feng, D. Xie, Y. Zang, X. Wu, T. Ren, W. Pan, Temperature control of P(VDF-TrFE) copolymer thin films, *Integrated Ferroelectrics* 141 (2013).
- [142] K. Lau, Y. Liu, H. Chen, R. Withers, Effect of Annealing Temperature on the Morphology and Piezoresponse Characterisation of Poly(vinylidene fluoride-trifluoroethylene) Films via Scanning Probe Microscopy, *Advances in Condensed Matter Physics* (2013).

- [143] C.C. Chu, 11 - Materials for absorbable and nonabsorbable surgical sutures, in: M.W. King, B.S. Gupta, R. Guidoin (Eds.), *Biotextiles as Medical Implants*, Woodhead Publishing (2013).
- [144] E. Erdtman, K.C. Satyanarayana, K. Bolton, Simulation of α - and β -PVDF melting mechanisms, *Polymer* 53(14) (2012).
- [145] A. Bhatt, d.k. Bhat, S. M S, Crystallinity, Conductivity, and Magnetic Properties of PVDF-Fe₃O₄ Composite Films, *Journal of Applied Polymer Science* 119 (2011).
- [146] L. Wu, M. Jing, Y. Liu, H. Ning, X. Liu, S. Liu, L. Lin, N. Hu, L. Liu, Power generation by PVDF-TrFE/graphene nanocomposite films, *Composites Part B: Engineering* 164 (2019).
- [147] C. Ribeiro, V. Sencadas, J.L. Gomez Ribelles, S. Lanceros-Méndez, Influence of Processing Conditions on Polymorphism and Nanofiber Morphology of Electroactive Poly(vinylidene fluoride) Electrospun Membranes, *Soft Materials* 8 (2010).
- [148] R. Brito-Pereira, D.M. Correia, C. Ribeiro, A. Francesko, I. Etxebarria, L. Pérez-Álvarez, J.L. Vilas, P. Martins, S. Lanceros-Mendez, Silk fibroin-magnetic hybrid composite electrospun fibers for tissue engineering applications, *Composites Part B: Engineering* 141 (2018).
- [149] R. Gonçalves, P. Martins, D.M. Correia, V. Sencadas, J.L. Vilas, L.M. León, G. Botelho, S. Lanceros-Méndez, Development of magnetoelectric CoFe₂O₄/poly(vinylidene fluoride) microspheres, *RSC Advances* 5(45) (2015).
- [150] G. Botelho, S. Lanceros-Mendez, A.M. Gonçalves, V. Sencadas, J.G. Rocha, Relationship between processing conditions, defects and thermal degradation of poly(vinylidene fluoride) in the β -phase, *Journal of Non-Crystalline Solids* 354(1) (2008).
- [151] A.A. Issa, M. Al-Maadeed, A.S. Luyt, M. Mrlik, M.K. Hassan, Investigation of the physico-mechanical properties of electrospun PVDF/cellulose (nano)fibers, *Journal of Applied Polymer Science* 133(26) (2016).
- [152] D. Mazuera, O. Perales, M. Suarez, S. Singh, Synthesis, characterization and thermal analysis of polyimide–cobalt ferrite nanocomposites, *Materials Science and Engineering: A* 527(23) (2010).
- [153] P. Martins, C.M. Costa, M. Benelmekki, G. Botelho, S. Lanceros-Méndez, Interface characterization and thermal degradation of ferrite/poly(vinylidene fluoride) multiferroic nanocomposites, *Journal of Materials Science* 48(6) (2013).
- [154] L. Amaro, D.M. Correia, T. Marques-Almeida, P.M. Martins, L. Pérez, J.L. Vilas, G. Botelho, S. Lanceros-Mendez, C. Ribeiro, Tailored Biodegradable and Electroactive Poly(Hydroxybutyrate-Co-Hydroxyvalerate) Based Morphologies for Tissue Engineering Applications, *Int J Mol Sci* 19(8) (2018).
- [155] P. Li, Q. Wang, S. Shi, Differential scheme for the effective elastic properties of nano-particle composites with interface effect, *Computational Materials Science* 50 (2011).
- [156] A. Sanida, T.G. Velmachos, S.G. Stavropoulos, G.C. Psarras, C. Tsonos, A. Kanapitsas, N. Soin, E. Siores, Thermomechanical response of Fe₃O₄/PVDF nanocomposites, *Procedia Structural Integrity* 10 (2018).

- [157] M. Sang, S. Wang, M. Liu, L. Bai, W. Jiang, S. Xuan, X. Gong, Fabrication of a piezoelectric polyvinylidene fluoride/carbonyl iron (PVDF/CI) magnetic composite film towards the magnetic field and deformation bi-sensor, *Composites Science and Technology* 165 (2018).
- [158] M. Dziadek, B. Zagrajczuk, M. Ziabka, K. Dziadek, K. Cholewa-Kowalska, The role of solvent type, size and chemical composition of bioactive glass particles in modulating material properties of poly(ϵ -caprolactone) based composites, *Composites Part A: Applied Science and Manufacturing* 90 (2016).
- [159] F.-C. Sun, A. Dongare, A. Asandei, S.P. Alpay, S. Nakhmanson, Temperature dependent structural, elastic, and polar properties of ferroelectric polyvinylidene fluoride (PVDF) and trifluoroethylene (TrFE) copolymers, *J. Mater. Chem. C* 3 (2015).
- [160] P. Nitti, N. Gallo, L. Natta, F. Scalera, B. Palazzo, A. Sannino, F. Gervaso, Influence of Nanofiber Orientation on Morphological and Mechanical Properties of Electrospun Chitosan Mats, *Journal of Healthcare Engineering* 2018 (2018).
- [161] K. Lee, B. Lee, C. Kim, H. Kim, K. Kim, C. Nah, Stress-strain behavior of the electrospun thermoplastic polyurethane elastomer fiber mats, *Macromolecular Research* 13 (2005).
- [162] S. Roman, N. Mangir, L. Hymanova, C.R. Chapple, J. Deprest, S. MacNeil, Use of a simple in vitro fatigue test to assess materials used in the surgical treatment of stress urinary incontinence and pelvic organ prolapse, *Neurourology and urodynamics* 38(1) (2019).
- [163] P. Martins, Y.V. Kolen'ko, J. Rivas, S. Lanceros-Mendez, Tailored Magnetic and Magnetoelectric Responses of Polymer-Based Composites, *ACS Applied Materials & Interfaces* 7(27) (2015).
- [164] S.-H. Xie, Y.-Y. Liu, J.-Y. Li, Synthesis, microstructures, and magnetoelectric couplings of electrospun multiferroic nanofibers, *Frontiers of Physics* 7(4) (2012).
- [165] W. Eerenstein, N.D. Mathur, J.F. Scott, Multiferroic and magnetoelectric materials, *Nature* 442(7104) (2006).