

**Universidade do Minho**  
Escola de Ciências

Rafaela Marques Meira

**Desenvolvimento de biomateriais ativos  
para engenharia de tecido muscular**

Rafaela Marques Meira **Desenvolvimento de biomateriais ativos para engenharia de tecido muscular**

UMinho | 2018

outubro de 2018



**Universidade do Minho**  
Escola de Ciências

Rafaela Marques Meira

**Desenvolvimento de biomateriais ativos  
para engenharia de tecido muscular**

Dissertação de Mestrado  
Mestrado em Biofísica e Bionanossistemas

Trabalho realizado sob orientação do  
**Doutor Senentxu Lanceros-Mendez**  
e da  
**Doutora Andreia Ferreira de Castro Gomes**

outubro de 2018

## DECLARAÇÃO

Nome: Rafaela Marques Meira

Endereço eletrónico: rafaeram\_meira@hotmail.com      Telefone: +351 916779321

Cartão de Cidadão: 14839058

Título da dissertação: Desenvolvimento de biomateriais ativos para engenharia de tecido muscular

Orientadores:

Doutor Senentxu Lanceros-Mendez

Doutora Andreia Ferreira de Castro Gomes

Ano de conclusão: 2018

Mestrado em Biofísica e Bionanossistemas

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

Universidade do Minho, \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_\_

Assinatura:

## Agradecimentos

Gostaria de expressar a minha profunda gratidão a todos aqueles que de forma direta ou indireta contribuíram para a realização deste trabalho.

Aos meus orientadores Professor Doutor Senentxu Lanceros-Mendez e Professora Doutora Andreia Ferreira de Castro Gomes. A eles agradeço todo o apoio e disponibilidade, dedicação, incentivo e orientação científica que me transmitiram ao longo de todo o trabalho.

Ao Professor Doutor José Luís Gómez Ribelles da Universitat Politècnica de València agradeço toda a disponibilidade e apoio ao longo da minha estadia em Valência. Não podia deixar de agradecer também aos investigadores do Centro De Biomateriales E Ingeniería Tisular (CBIT). Obrigada por me receberem com tanto carinho.

Quero agradecer também a todo o grupo *Eletroactive Smart Materials*, pelo bom ambiente e pela ajuda que sempre me prestaram. Em especial à Clarisse, à Daniela e à Sylvie. Obrigada não só pelo conhecimento científico, empenho, dedicação e preocupação, mas também pelos valores que me transmitiram. É um prazer aprender e trabalhar com profissionais como vocês.

A todos os meus amigos, em especial às que me acompanham sempre. A ti Xana, Deia, Marisol, Marta, e Sara. Obrigada por estarem sempre comigo, por me ajudarem e me apoiarem nos momentos mais difíceis. Obrigada pela amizade e carinho incondicional. Sou uma sortuda por vos ter na minha vida.

Ao João Tiago, agradeço todo o amor, carinho e compreensão. Obrigada por nunca desistires de mim.

Por fim, gostaria de agradecer à minha família, sobretudo aos meus pais e ao meu irmão por sempre me incentivarem e ajudarem em todas as etapas da minha vida. A eles devo tudo o que sou hoje.

A todos vocês o meu sincero obrigada.



## Resumo

Os materiais eletroativos, nomeadamente os polímeros eletroativos piezoelétricos, têm sido utilizados no desenvolvimento de *scaffolds* para regeneração muscular pois conseguem mimetizar o ambiente biológico do tecido através de estímulos eletromecânicos. O polímero piezoelétrico poli(fluoreto de vinilideno) (PVDF) é um material muito promissor para a engenharia de tecidos devido à sua eletroatividade e biocompatibilidade.

A utilização de líquidos iónicos (ILs) biocompatíveis como o cloreto (Cl) de 1-butil-3-metilimidazólio (Bmim), ([Bmim][Cl]), e o dihidrogenofosfato (DHP) de 2-hidroxi-etil-trimetilamónio (colina), ([Ch][DHP]), é já uma realidade em engenharia de tecidos. Os ILs apresentam uma grande estabilidade térmica, química e eletroquímica, uma baixa pressão de vapor e uma elevada condutividade iónica. A incorporação de ILs permite combinar um polímero electroativo com um sal iónico, e desta forma obter um material electroactivo iónico que conjugue o efeito piezoelétrico do polímero com as cargas iónicas do IL. Atualmente, este tipo de compósitos é utilizado em diversas aplicações tecnológicas, tal como em sensores, atuadores, baterias, entre outros.

No presente trabalho, foram desenvolvidos filmes compósitos PVDF/[Bmim][Cl] e PVDF/[Ch][DHP] com diferentes concentrações de IL (10, 20 e 40% (p/p)) para regeneração de tecido muscular. Os filmes compósitos foram avaliados a nível das suas propriedades morfológicas, físico-químicas e térmicas. A sua potencialidade como suportes para engenharia de tecidos foi avaliada através de ensaios de citotoxicidade e proliferação celular.

Através dos resultados obtidos foi possível verificar que a incorporação dos ILs [Bmim][Cl] e [Ch][DHP] não só melhora a condutividade elétrica, como induz a cristalização do filme de PVDF na fase  $\beta$ . Os estudos de degradação térmica mostram que a introdução de [Bmim][Cl] diminui a estabilidade térmica dos compósitos. Já a adição do IL [Ch][DHP] aumenta a estabilidade térmica dos compósitos, uma vez que se verifica um ligeiro aumento da temperatura inicial de degradação de 447,0 para 453,8 °C.

Finalmente, foi avaliada a citotoxicidade, de onde se concluiu que, os filmes compósitos, à exceção do 10% [Bmim][Cl], não são citotóxicos para as células. Além disso, promovem a adesão e proliferação celular. Assim sendo, foi demonstrado que a utilização de filmes compósitos PVDF/[Bmim][Cl] e PVDF/[Ch][DHP] são uma estratégia promissora na regeneração muscular.



## Abstract

Electroactive materials and, in particular, piezoelectric polymers, have been used in the development of scaffolds for muscle regeneration, due to their ability to mimic specific biological environments through electrical stimulation. Poly(vinylidene fluoride) (PVDF) is an interesting polymer for tissue engineering applications due to its electroactivity and biocompatibility.

The use of biocompatible ionic liquids (ILs) in tissue engineering, such as 1-butyl-3-methylimidazolium chloride ([Bmim][Cl]) and 2-hydroxyethyl-trimethylammonium dihydrogenphosphate ([Ch][DHP]), is already a reality. ILs exhibit high thermal, chemical and electrochemical stability, low vapor pressure and high ionic conductivity. The incorporation of ILs in a polymer matrix allows to combine the piezoelectric effect of the polymer with the ionic charge of the IL. This type of materials is used in different applications, such as sensors, actuators, batteries, among others.

In the present work, PVDF/[Bmim][Cl] and PVDF/[Ch][DHP] composite films were produced with different IL concentrations, 10, 20 and 40% (w/w), for muscle tissue regeneration. The morphological, physico-chemical and thermal properties of the composite films were analyzed. Their potential as scaffolds for tissue engineering was evaluated by cytotoxicity and cell proliferation assays.

It was verified that the incorporation of the IL [Bmim][Cl] and [Ch][DHP] not just improves the electrical conductivity but also induces the crystallization of PVDF in the  $\beta$  phase. Thermal degradation studies show that the introduction of [Bmim][Cl] decreases the thermal stability of the composites. Contrary, the addition of the IL [Ch][DHP] increases the thermal stability of the composites, leading to an increase of the degradation temperature from 447,0 to 453,8 °C.

Finally, cytotoxicity was evaluated, concluding that the composite films, with the exception of 10% (w/w) [Bmim][Cl], are not cytotoxic to the cells and promote cell adhesion and proliferation. Therefore, it was demonstrated that the use of PVDF/[Bmim][Cl] and PVDF/[Ch][DHP] composite films is a promising platform for muscle regeneration strategies.





# Índice

Agradecimentos	III
Resumo	V
Abstract	VII
Índice	IX
Lista de Figuras	XI
Lista de Tabelas	XIV
Lista de Símbolos e Acrónimos	XV
<b>Capítulo 1 - Introdução</b>	<b>1</b>
1.1 Enquadramento	3
1.2 Objetivos	4
1.3 Organização da dissertação	4
<b>Capítulo 2 - Estado da Arte</b>	<b>7</b>
2.1 Engenharia de tecidos	9
2.1.1 Regeneração músculo-esquelética	10
2.2 Propriedades dos <i>scaffolds</i>	12
2.3 Biomateriais	14
2.4 Polímeros eletroativos	15
2.4.1 Polímeros piezoelétricos	17
2.5 Poli (fluoreto de vinilideno)	19
2.5.1 Estrutura química	19
2.5.2 Estrutura molecular e fases cristalinas	19
2.5.2.1 Fase $\alpha$	20
2.5.2.2 Fase $\beta$	21
2.6 Líquidos iônicos	22
2.6.1 Compósitos polímero/líquido iônico	24
<b>Capítulo 3 – Materiais e Métodos</b>	<b>27</b>

3.1 Materiais _____	29
3.2 Procedimento experimental _____	29
3.2.1 Preparação dos filmes compósitos poli (fluoreto de vinilideno) / líquido iónico _____	29
3.3 Técnicas de caracterização _____	30
3.3.1 Microscopia eletrónica de varrimento _____	30
3.3.1.1 Condições de análise _____	32
3.3.2 Medição do ângulo de contacto _____	32
3.3.2.1 Condições de análise _____	33
3.3.3 Espectroscopia de infravermelho com transformadas de Fourier _____	34
3.3.1.1 Condições de análise _____	36
3.3.4 Calorimetria diferencial de varrimento _____	36
3.3.4.1 Condições de análise _____	38
3.3.5 Análise termogravimétrica _____	38
3.3.5.1 Condições de análise _____	39
3.3.6 Medidas de condutividade elétrica _____	40
3.3.6.1 Condições de análise _____	41
3.4 Esterilização dos filmes compósitos _____	41
3.5 Cultura celular _____	41
3.6 Ensaio de citotoxicidade _____	42
3.7 Ensaio de proliferação celular _____	43
3.7.1 Preparação das amostras para visualização por microscopia de fluorescência _____	43
<b>Capítulo 4 – Resultados e Discussão _____</b>	<b>45</b>
4.1 Caracterização morfológica _____	47
4.2 Avaliação da hidrofobicidade _____	49
4.3 Avaliação das propriedades físico-químicas e térmicas _____	50
4.3.1 Avaliação da fase cristalina _____	50
4.3.2 Avaliação da fusão, grau de cristalinidade e degradação térmica _____	53
4.3. Medidas de condutividade elétrica _____	56
4.4 Avaliação da citotoxicidade _____	58
4.5 Avaliação da proliferação celular _____	59
<b>Capítulo 5 – Conclusões _____</b>	<b>63</b>
5.1 Sugestões para trabalhos futuros _____	66
<b>Capítulo 6 – Bibliografia _____</b>	<b>67</b>

## Lista de Figuras

Figura 2.1 - Esquema representativo da tríade da engenharia de tecidos: estímulos, células e <i>scaffolds</i> . Adaptado de [6].....	9
Figura 2.2 - Imagem representativa da organização das fibras musculares. Adaptado de [11]...11	
Figura 2.3 - Polímero eletroativo eletrônico sujeito a um campo elétrico [32].....	16
Figura 2.4 - Mecanismo de dobra ( <i>bending</i> ) característico de um polímero eletroativo iônico [32]. .....	16
Figura 2.5 – Representação esquemática do efeito piezoelétrico a) direto e b) inverso [34].....	18
Figura 2.6 - Representação esquemática do monômero de fluoreto de vinilideno e a respetiva polimerização em PVDF.....	19
Figura 2.7 - Representação esquemática da estrutura esferulítica do PVDF [39].....	20
Figura 2.8 - Representação esquemática a) das cadeias de PVDF na fase $\alpha$ e b) da sua célula unitária [42].....	21
Figura 2.9 - Representação esquemática a) das cadeias de PVDF na fase $\beta$ e b) da sua célula unitária [42].....	22
Figura 2.10 – Estruturas químicas dos catiões e aniões mais utilizados na preparação de líquidos iônicos [45,52] .....	23
Figura 3.1 – Método de processamento de filmes poliméricos por <i>solvent casting</i> .....	30
Figura 3.2 – Esquema do funcionamento de um microscópio eletrônico de varrimento. Adaptado de [79].....	32
Figura 3.3 – Representação esquemática da medição de um ângulo de contacto. Adaptado de [34].....	33
Figura 3.4 – Representação do ângulo de contacto de uma gota numa superfície sólida: “ $\theta$ ” representa o ângulo de contacto, “ $\gamma_{lv}$ ” a interface líquido-vapor, “ $\gamma_{sv}$ ” a interface sólido-vapor e “ $\gamma_{sl}$ ” a interface sólido-líquido [81].....	33

<b>Figura 3.5</b> - Equipamento utilizado nas medições do ângulo de contacto: Dataphysics Contact Angle System OCA.....	34
<b>Figura 3.6</b> - Modos vibracionais possíveis numa molécula: a) Estiramento simétrico e assimétrico de uma ligação C-H; b) modos de deformação possíveis numa molécula de água. Os símbolos “+” e “-“ referem-se a movimentos perpendiculares ao plano de observação [26].....	35
<b>Figura 3.7</b> – Equipamento utilizado na espectroscopia de infravermelho: Jasco FT/IR-4100 FTIR spectra.....	36
<b>Figura 3.8</b> – Representação esquemática de um aparelho de DSC. O número 1 representa o sistema de aquecimento e o número 2 o sistema de medida de temperatura [88].....	37
<b>Figura 3.9</b> – Equipamento utilizado nos ensaios de DSC: Perkin-Elmer DSC 8000.....	38
<b>Figura 3.10</b> – Representação esquemática de um aparelho de TGA. Adaptado de [90].....	39
<b>Figura 3.11</b> – Equipamento utilizado na análise termogravimétrica das amostras: Perkin-Elmer TGA 4000.....	39
<b>Figura 3.12</b> – Montagem experimental utilizada nas medições de resistência elétrica.....	40
<b>Figura 4.1</b> – Imagem de SEM dos filmes a) PVDF e filmes compósitos b) PVDF/ 10 % (p/p) de [Bmim][Cl], c) PVDF/ 20 % (p/p) de [Bmim][Cl], d) PVDF/ 40 % (p/p) de [Bmim][Cl], e) PVDF/ 10 % (p/p) de [Ch][DHP], f) PVDF/ 20 % (p/p) de [Ch][DHP] e g) PVDF/ 40 % (p/p) de [Ch][DHP] a uma ampliação de 1500x.....	47
<b>Figura 4.2</b> – Valor médio do ângulo de contacto obtido em cada amostra produzida.....	49
<b>Figura 4.3</b> – Espectro de FTIR-ATR do filme de PVDF e filmes compósitos com 10, 20 e 40 % (p/p) de a) PVDF/[Bmim][Cl] e b) PVDF/[Ch][DHP].....	50
<b>Figura 4.4</b> – Fração de Fase ( $\beta$ ) em função da quantidade de IL presente na matriz polimérica (10,20 e 40% (p/p)) de [Bmim][Cl] e [Ch][DHP].....	51
<b>Figura 4.5</b> – Gráficos de DSC do filme de PVDF e filmes compósitos com 10, 20 e 40 % (p/p) de a) [Bmim][Cl] e b) [Ch][DHP].....	53

<b>Figura 4.6</b> – Curvas de TGA representativas dos filmes compósitos com 10, 20 e 40% (p/p) de a) [Bmim][Cl] e b) [Ch][DHP].....	55
<b>Figura 4.7</b> – Curvas I-V para o compósito polimérico a) [Bmim][Cl] e b) [Ch][DHP] a diferentes concentrações (10, 20 e 40%).....	56
<b>Figura 4.8</b> – Valores de condutividade elétrica dos filmes PVDF e filmes compósitos [Bmim][Cl] e [Ch][DHP] a diferentes concentrações (10, 20 e 40% (p/p)).....	57
<b>Figura 4.9</b> – Ensaio de viabilidade celular com as células C2C12 após 72 h em contacto com meio exposto aos filmes PVDF e filmes compósitos com diferentes concentrações de líquido iónico (10, 20 e 40% (p/p)) [Bmim][Cl] e [Ch][DHP].....	58
<b>Figura 4.10</b> – Proliferação celular de mioblastos C2C12 cultivados em filmes de PVDF e filmes compósitos PVDF/[Bmim][Cl] e PVDF/[Ch][DHP] com diferentes quantidades de líquido iónico (10, 20 e 40% (p/p)) após 24 e 72 h de cultura em condições estáticas.....	59
<b>Figura 4.11</b> – Ensaio de imunocitoquímica em mioblastos C2C12 cultivados em a) filmes de PVDF e filmes compósitos b) PVDF/20% (p/p) [Bmim][Cl], c) PVDF/20% (p/p) [Ch][DHP], d) PVDF/40% (p/p) [Bmim][Cl] e e) PVDF/40% (p/p) [Ch][DHP] após 24 h de cultura em condições estáticas. Filmes compósitos f) PVDF/20% (p/p) [Bmim][Cl] e g) PVDF/40% (p/p) [Ch][DHP] após 72 h. O núcleo dos mioblastos foi marcado com DAPI (azul) e o citoesqueleto de actina com faloidina-FITC (verde).....	61

## Lista de Tabelas

<b>Tabela 2.1</b> - Tipos de biomateriais, as suas vantagens e desvantagens [19,26].....	14
<b>Tabela 2.2</b> - Classificação dos polímeros eletroativos [19,32].....	17
<b>Tabela 2.3</b> - Líquidos iônicos utilizados no presente trabalho.....	24
<b>Tabela 2.4</b> – Matriz polimérica, líquido iônico, morfologia e aplicação.....	25
<b>Tabela 3.1</b> - Componentes básicos do SEM [26,42].....	31
<b>Tabela 3.2</b> - Bandas de absorção características das fases $\alpha$ e $\beta$ do PVDF [40].....	35
<b>Tabela 4.1</b> - Espessura média dos filmes compósitos PVDF/[Bmim][Cl] e PVDF/[Ch][DHP] produzidos.....	48
<b>Tabela 4.2</b> - Bandas de absorção características do PVDF, [Bmim][Cl] e [Ch][DHP presentes nos filmes de PVDF e filmes compósitos.....	52
<b>Tabela 4.3</b> - Temperatura de fusão ( $T_f$ ), variação da entalpia ( $\Delta H$ ) e grau de cristalinidade ( $\Delta X_c1$ ) do compósito PVDF+IL e grau de cristalinidade do PVDF ( $\Delta X_c2$ ) para cada amostra.....	54
<b>Tabela 4.4</b> - Temperatura inicial de degradação ( $T_{onset}$ ) de cada amostra.....	55

## Lista de Símbolos e Acrônimos

$\Delta X_c$	Grau de cristalinidade
$\Delta H$	Entalpia de fusão
$\Delta T$	Varição de temperatura
ATR	Reflexão total atenuada (do inglês <i>Attenuated Total Reflection</i> )
BSE	Eletrões retrodifundidos
[Bmim][Cl]	Cloreto (Cl) de 1-butil-3-metilimidazólio (Bmim)
CO <sub>2</sub>	Dióxido de carbono
[Ch][DHP]	dihidrogenofosfato (DHP) de 2-hidroxi-etil-trimetilamônio (colina)
DAPI	Dihidrocloreto de 4'-6diamidino-2-finilindole
DMF	Dimetilformamida
DMEM	Meio de Eagle modificado por Dulbecco (do inglês <i>Dulbecco's modified Eagles's medium</i> )
DSC	Calorimetria Diferencial de Varrimento (do inglês <i>Differential Scanning Calorimetry</i> )
FTIR	Espetroscopia de Infravermelho com Transformadas de Fourier (do inglês <i>Fourier Transform Infrared Spectroscopy</i> )
FBS	Soro fetal bovino (do inglês <i>Fetal bovine serum</i> )
IV	Infra-vermelho
IL	Líquido iônico (do inglês <i>Ionic Liquid</i> )
MEC	Matriz Extracelular
MTS	3- (4,5-dimetiltiazol-2-il) -5- (3-carboximetoxifenil) -2- (4-sulfofenil) - 2H-tetrazólio
NTf <sub>2</sub>	Bis ((trifluorometil)sulfonyl)imida
P/S	Penicilina/Estreptomicina (do inglês <i>Penicilin/Streptomycin</i> )
PBS	Tampão fosfato-salino (do inglês <i>Phosphate Buffer Saline</i> )
PVDF	Poli (fluoreto de vinilideno)
PVDF-TrFE	Poli (fluoreto de vinilideno-trifluoretileno)
PEG	Poli (etilenoglicol)



<b>PLLA</b>	Poli(L-ácido lático)
<b>PCL</b>	Poli (caprolactona)
<b>PLA</b>	Poli (ácido láctico)
<b>PEDOT</b>	Poli (3,4-etilenodioxitiofeno)
<b>PU</b>	Poliuretano
<b>PSS</b>	Poli (4 - ácido estirenosulfônico)
<b>SEM</b>	Microscopia Eletrônica de Varrimento (do inglês <i>Scanning Electron Microscopy</i> )
<b>SWCNT</b>	Nanotubos de carbono com paredes simples (do inglês <i>Single-Walled Carbon Nanotubes</i> )
<b>TGA</b>	Análise Termogravimétrica (do inglês <i>Thermogravimetric Analysis</i> )
<b>T<sub>f</sub></b>	Temperatura de fusão
<b>T onset</b>	Temperatura de início de degradação

# Capítulo 1 - Introdução

---



## 1.1 Enquadramento

As lesões traumáticas e as distrofias musculares afetam as células musculares esqueléticas por perda e fraqueza progressiva das suas funções, deixando os pacientes com mobilidade reduzida e menor qualidade de vida. Para superar estas limitações, o ser humano viu-se desde sempre forçado a procurar, desenvolver e aperfeiçoar novas formas de tratamento que, de forma independente ou combinadas com outras estratégias terapêuticas, sejam menos prejudiciais e mais eficazes. Inicialmente, surgiram as próteses e os implantes para substituir membros amputados. A ciência foi evoluindo, assim como as técnicas cirúrgicas, permitindo o tratamento e a reconstrução de tecido muscular, através da transplantação. Porém, as desvantagens inerentes, como a biodisponibilidade, a transmissão de doenças e a alta suscetibilidade a infeções, despoletaram a procura de alternativas mais viáveis.

A engenharia de tecidos, devido à sua multidisciplinaridade, surge como uma estratégia inovadora, uma vez que pode combinar células, estímulos externos e *scaffolds* para reparar ou substituir tecidos/órgãos. No entanto, consoante o tipo de tecido a regenerar, existem determinadas propriedades mecânicas, estruturais e bioquímicas que têm de ser mantidas para garantir uma boa interação material-célula. O sucesso depende em grande medida do suporte celular utilizado.

Os materiais eletroativos, nomeadamente os polímeros eletroativos, são a classe de materiais com maior potencial no desenvolvimento de *scaffolds* para regeneração muscular pois, conseguem mimetizar o ambiente biológico do tecido através de estímulos eletromecânicos. Além disso, podem ser sintetizados com morfologia semelhante à da célula muscular, por exemplo sob a forma de fibras orientadas. O polímero piezoelétrico poli (fluoreto de vinilideno) (PVDF) é um material muito promissor para a engenharia de tecidos devido à sua eletroatividade e biocompatibilidade.

Os líquidos iónicos (do inglês *ionic liquids*, ILs) apresentam uma grande estabilidade térmica, química e eletroquímica, uma baixa pressão de vapor e uma elevada condutividade iónica. A incorporação de ILs permite combinar um polímero electroactivo com um sal iónico, e desta forma obter um material electroactivo iónico que conjugue as propriedades piezoelétricas do polímero com as cargas iónicas do IL. Este tipo de materiais compósitos são atualmente utilizados em diversas aplicações tecnológicas, tais como em separadores de baterias, sensores e atuadores.

## 1.2 Objetivos

Esta dissertação teve como principal objetivo o desenvolvimento de materiais eletroativos iônicos para engenharia de tecido muscular. Durante a execução do trabalho objetivou-se cumprir as seguintes tarefas:

- Produção de filmes PVDF e filmes compósitos PVDF/[Bmim][Cl] e PVDF/[Ch][DHP] com diferentes concentrações de IL (10, 20 e 40% (p/p)) através do método de *solvent casting*;
- Caracterização dos filmes a nível estrutural, físico-químico e térmico;
- Avaliação da condutividade elétrica dos filmes compósitos;
- Avaliação da citotoxicidade dos filmes desenvolvidos;
- Avaliação da influência destes biomateriais na resposta celular (adesão e proliferação celular) em condições estáticas.

## 1.3 Organização da dissertação

A tese está organizada em cinco capítulos: Introdução, Estado da Arte, Materiais e Métodos, Resultados e Discussão e Conclusão.

No primeiro capítulo é feito um pequeno enquadramento teórico do trabalho executado. De seguida, é descrita a motivação para a realização do trabalho assim como os objetivos propostos e a estrutura da dissertação.

O segundo capítulo apresenta uma pesquisa bibliográfica das áreas nas quais o trabalho se insere. Este está dividido em vários subcapítulos que apresentam os conceitos relativos a engenharia de tecidos, biomateriais, polímeros piezoelétricos, com especial ênfase no polímero utilizado, o PVDF, e líquidos iônicos.

No terceiro capítulo são apresentados os materiais, reagentes e solventes utilizados na preparação de amostras e descritos os procedimentos experimentais adotados na preparação e caracterização das mesmas. Adicionalmente, é também apresentada uma breve descrição teórica de cada uma das técnicas de caracterização utilizadas. As metodologias relativas aos ensaios de citotoxicidade e proliferação celular encontram-se descritas na parte final do capítulo.

No quarto capítulo são apresentados e discutidos os resultados experimentais consequentes da caracterização dos materiais e dos ensaios celulares.

Por último, no quinto capítulo são apresentadas as conclusões mais relevantes e gerais desta dissertação. É feito um balanço do cumprimento dos objetivos delineados no capítulo inicial, e sugerido um conjunto de propostas de trabalho a implementar futuramente.



## Capítulo 2 - Estado da Arte

---





## 2.1 Engenharia de tecidos

Atualmente, a definição mais aceita pela comunidade científica é a de Langer & Vancati [1], em que define a engenharia de tecidos como uma “área que utiliza os princípios da engenharia e das ciências da vida com o intuito de desenvolver substitutos biológicos de forma a restaurar, manter ou melhorar a função do tecido pretendido”.

A engenharia de tecidos reúne diversos conhecimentos multidisciplinares (desde a biologia, medicina, física e engenharia) e um vasto conjunto de materiais e métodos passíveis de utilizar, visando a produção de tecidos biológicos viáveis e funcionais *in vitro* (a produção de tecido ocorre em estruturas apropriadas e depois este é implantado no organismo) ou *in vivo* (cria-se uma estrutura passível de ser estimulada e que, após ser implantada no local pretendido do organismo, é capaz de suportar e impulsionar o crescimento celular) [2,3].

É possível identificar um conjunto de três pontos fundamentais para formar o tecido: células, *scaffolds* e estímulos (Figura 2.1). Para que o tecido se forme é necessário um material que lhe sirva de suporte (*scaffold*) onde as células serão cultivadas e, posteriormente submetidas a estímulos bioquímicos (ex: fatores de crescimento) e/ou biofísicos (ex: forças de tensão), de forma a mimetizar o ambiente celular em que estão inseridas [4,5].

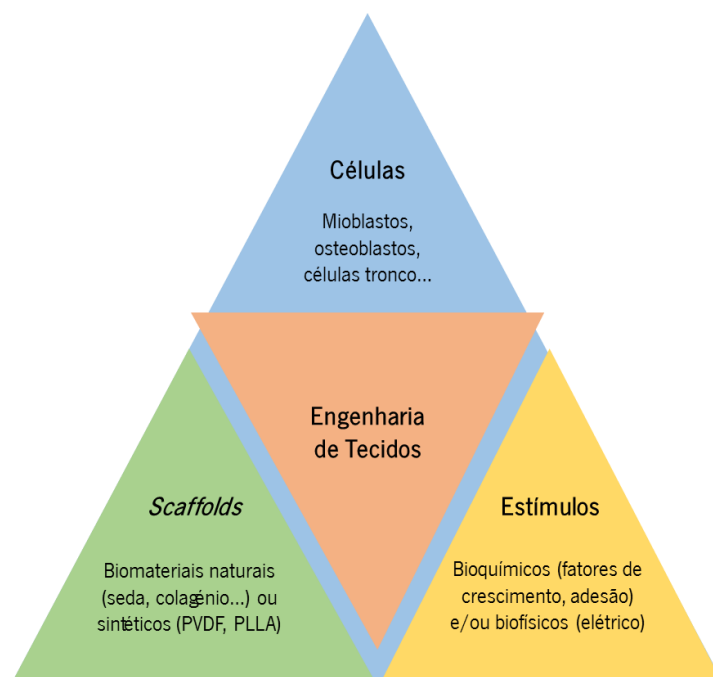


Figura 2.1 - Esquema representativo da tríade da engenharia de tecidos: estímulos, células e *scaffolds*. Adaptado de [6].

### 2.1.1 Regeneração músculo-esquelética

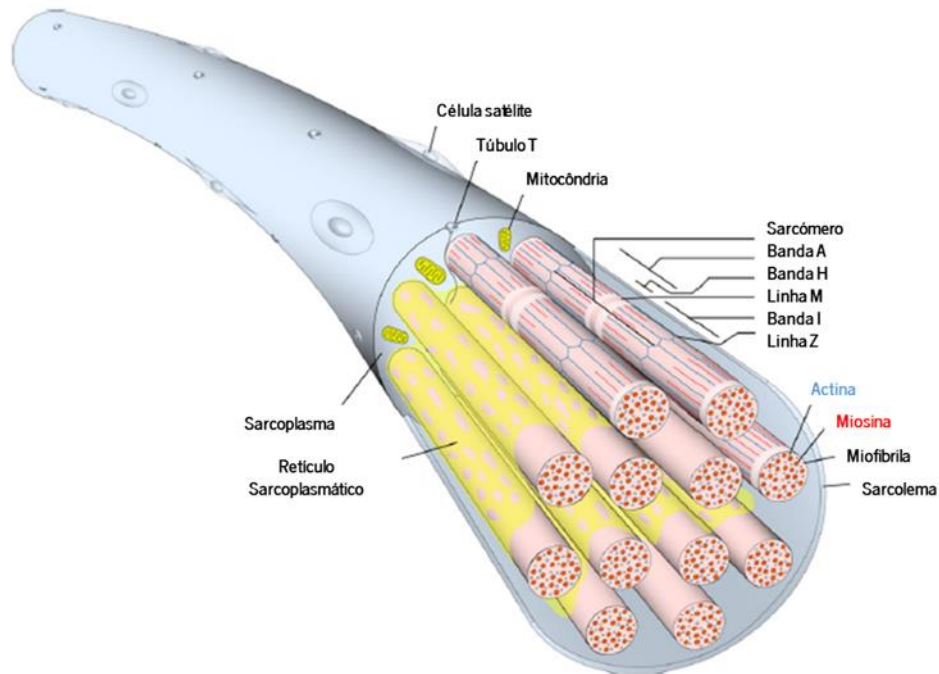
A regeneração muscular, tal como a regeneração óssea, tem um grande impacto na investigação da engenharia de tecidos. Existem três tipos de músculo: o músculo liso, o músculo cardíaco e o músculo-esquelético. O músculo liso localiza-se nas paredes de órgãos elásticos (ex: esófago, estômago, bexiga e intestinos), nos olhos, glândulas e vasos sanguíneos. Apresenta células mononucleadas e fusiformes, de contração lenta e involuntária com as extremidades bem afiadas [7,8].

Já o músculo cardíaco encontra-se única e exclusivamente no coração, onde é responsável pelas contrações cardíacas que fazem bombear o sangue para os vasos sanguíneos. Possui células mononucleadas separadas por uma membrana designada disco intercalar. Estes discos auxiliam a contração sincronizada do tecido muscular cardíaco, proporcionando assim, uma maior adesão entre as células adjacentes [7].

Os músculos-esqueléticos são os mais abundantes, representando cerca de 40 a 45% da massa corporal adulta [9,10]. Encontram-se fixos aos ossos através dos tendões e, para além de recobrirem todo o esqueleto humano, conseguem contrair voluntariamente, permitindo a movimentação corporal. Exibem células especializadas na contração muscular, as fibras musculares, que são células alongadas e multinucleadas com os núcleos localizados na região mais periférica da célula [3,11]. A perda ou dano muscular pode advir de diferentes causas, não só por doença ou envelhecimento, mas também por lesões [12].

O sistema muscular esquelético é uma estrutura altamente complexa e organizada que compreende: nervos, neurónios, vasos sanguíneos, tecido conjuntivo e feixes musculares [8].

Os feixes musculares são constituídos por fibras musculares. Cada fibra muscular, por sua vez, é composta por inúmeras miofibrilas (feixes de filamentos contráteis de actina e miosina) (Figura 2.2) que se encontram organizadas e dispostas de tal modo que originam um padrão bem definido de estrias transversais alternadas claras e escuras apresentando um aspeto estriado característico destas células musculares) [8].



**Figura 2.2** - Imagem representativa da organização das fibras musculares. Adaptado de [11].

O conjunto actina e miosina formam unidades, denominadas sarcômeros, que se repetem ao longo do comprimento das miofibrilas (Figura 2.2). As faixas mais externas do sarcômero são as mais claras e denominam-se bandas I (isotrópicas à luz polarizada). Estas contêm apenas filamentos finos de actina. Já a região central do sarcômero, designada banda A (anisotrópica à luz polarizada), é mais escura sendo constituída por filamentos de miosina parcialmente sobrepostos pela actina. No interior desta banda, existe uma região mediana mais clara, a banda H, que contém apenas filamentos grossos de miosina [3,13].

A miosina é considerada uma proteína motora, pois é capaz de converter energia química em energia mecânica, útil para a contração muscular. É constituída por seis cadeias polipeptídicas, duas cadeias pesadas e quatro cadeias leves. As duas cadeias pesadas enrolam-se em espiral, uma sob a outra, para originar uma cauda em dupla hélice. Na extremidade contrária à cauda, encontra-se a cabeça da miosina, uma estrutura polipeptídica globular, da qual também fazem parte as quatro cadeias leves que, ajudam a controlar a função da cabeça durante a contração muscular [14].

A actina é uma proteína globular (actina G) que polimeriza num filamento com dois cordões torcidos em hélice (actina F). Associados a esta, encontram-se a tropomiosina (que bloqueia os sítios de ligação da miosina) e a troponina. A troponina é constituída por três

moléculas que participam no processo de contração muscular: Troponina C (TnC), Troponina I (TnI) e Troponina T (TnT). A TnC liga-se aos íons de cálcio ( $Ca^{2+}$ ), a TnT possui uma grande afinidade com a tropomiosina e a TnI que é considerada uma subunidade inibitória, uma vez que cobre a região ativa da actina, região esta onde a actina e a miosina interagem [14,15].

A rodear cada fibra muscular está o sarcolema, constituído por uma membrana basal permeável (rica em glicoproteínas e colagénio) e pelo plasmalema. Este último, como apresenta uma composição química com propriedades adicionais de excitabilidade, permite a transmissão dos impulsos elétricos ao longo da célula muscular [14].

O sarcolema sofre invaginações, formando uma espécie de rede de túbulos anastomosados (designados Túbulos T) que envolvem cada conjunto de miofibrilas e permitem a contração uniforme de cada fibra muscular esquelética. Associado a estes túbulos, encontra-se o retículo sarcoplasmático, responsável pelo armazenamento de íons cálcio. Quando o retículo sarcoplasmático recebe o impulso nervoso vindo dos túbulos T, liberta o cálcio armazenado no citosol que rodeia as miofibrilas permitindo assim a contração muscular [14,15].

O músculo-esquelético possui uma capacidade de regeneração muito baixa. Os tratamentos atuais para grandes deficiências de volume muscular envolvem a transplantação de músculo autólogo, ou seja, a transplantação de músculo do próprio paciente para o local onde existe perda ou dano. Os transplantes tornaram-se numa alternativa viável mas com consequências a longo prazo, uma vez que os pacientes, após a cirurgia, são tratados com imunossuppressores para evitar a rejeição do enxerto transplantado [6,16].

De forma a colmatar todos estes entraves, a engenharia de tecidos pretende não só desenhar mas também construir matrizes, denominadas *scaffolds*, que promovam o normal crescimento das células musculares em défice [17,18].

## 2.2 Propriedades dos *scaffolds*

É no *design* e desenvolvimento de *scaffolds* biocompatíveis, capazes de mimetizar a matriz extracelular que a engenharia de tecidos mais se tem focado ultimamente [19,20].

Deste modo, os *scaffolds* devem obedecer a vários requisitos específicos. A biocompatibilidade de um dado material é um requisito de extrema importância. Estes não devem provocar nenhum efeito imunológico adverso ou toxicidade, e os seus produtos de

degradação devem ser metabolizados. Caso isto não se verifique, o organismo poderá rejeitar o tecido formado e outras complicações poderão surgir noutros locais do organismo [21,22].

A sua degradação em ambiente biológico deve estar ajustada ao tempo de tratamento que é necessário e os seus produtos de degradação não devem interferir no tratamento nem causar inflamações. Porém, se o objetivo for produzir o tecido fora do organismo humano e depois transplantá-lo, a biodegradabilidade deixa de ser um requisito importante a cumprir [4,21].

O *scaffold* deve apresentar propriedades mecânicas adequadas à zona corporal onde será implantado, fornecendo a estabilidade e rigidez necessária para o desenvolvimento local do tecido [6]. As características mecânicas devem ter em conta não só o tecido, o local, a idade do paciente e o processo de regeneração, mas também devem permitir a vascularização e a infiltração celular. Um *scaffold* "bem-sucedido" deve ser capaz de equilibrar a sua função mecânica com a entrega de nutrientes para as células e com a eliminação dos seus produtos de excreção, permitindo assim, a regeneração do tecido à medida que se vai degradando. Contudo, na maioria dos casos, este equilíbrio não é atingível [4,21].

As propriedades superficiais do *scaffold*, tais como a molhabilidade e a rugosidade, também são aspetos a ter em conta. É sabido que o crescimento, proliferação e diferenciação celular aumentam na presença de superfícies hidrofílicas. No entanto, estes valores de hidrofiliçidade não podem ser inferiores a 65°, caso contrário a adesão celular diminui [4,23]. Também a rugosidade do material, que está diretamente relacionada com o grau de cristalinidade, influencia a adesão celular. Porém, nem todas as linhas celulares respondem de igual forma, exemplos disso são os fibroblastos e os osteoblastos. Enquanto os primeiros proliferam melhor num *scaffold* com maior grau de cristalinidade (elevada rugosidade), os segundos demonstram exatamente o contrário, isto é, preferem crescer em superfícies menos rugosas [24].

Geralmente, a estrutura arquitetónica do *scaffold* procura mimetizar a matriz extracelular (MEC) de um determinado tecido. A interconetividade entre poros e o grau de porosidade facilita a penetração e a vascularização celular, assim como a difusão de nutrientes essenciais às células e o transporte de produtos residuais [21].

## 2.3 Biomateriais

Os biomateriais desempenham um papel cada vez mais proeminente no desenvolvimento e sucesso da engenharia de tecidos, nomeadamente na regeneração ou no restabelecimento da função de tecidos/órgãos do corpo humano [25]. Segundo a definição atual, um biomaterial é um material capaz de interagir de forma adequada e específica com os sistemas biológicos, de modo a avaliar, tratar, aumentar ou substituir qualquer tecido, órgão ou função corporal [26].

Os materiais podem ser divididos em quatro grupos distintos: os metais, os cerâmicos, os polímeros e os compósitos. Na Tabela 2.1 são apresentados os vários tipos de biomateriais, bem como as suas vantagens e desvantagens [19].

Nas últimas décadas, os polímeros têm vindo a substituir os materiais tradicionais em diversas áreas tecnológicas. O seu baixo custo, facilidade de processamento, flexibilidade e elevada resistência a nível eletrónico e mecânico fazem dos polímeros o foco de interesse na regeneração de tecidos [2].

**Tabela 2.1** - Tipos de biomateriais, as suas vantagens e desvantagens [19,26].

Material	Vantagens	Desvantagens
Metais	Ductilidade; Elevada resistência mecânica ao impacto.	Baixa biocompatibilidade; Corrosão em meio fisiológico; Propriedades mecânicas muito diferentes dos tecidos biológicos.
Cerâmicos	Elevada biocompatibilidade; Resistência à corrosão; Elevada resistência à compressão; Inerte; Baixas propriedades elétricas e térmicas	Dificuldades no processamento e fabricação, e na reprodução das suas propriedades; Baixa elasticidade; Elevada densidade.
Compósitos	Inerte; Resistência à corrosão; Elevada biocompatibilidade.	Pouca consistência; Dificuldade de reproduzir durante a fabricação.
Polímeros	Fácil fabricação; Baixa densidade e elasticidade.	Baixa resistência mecânica; Facilmente degradável.

Consoante a sua natureza/origem, os polímeros podem ser classificados como naturais ou sintéticos [27,28]. Os polímeros de origem natural, como o colagénio, a seda e o ácido hialurónico, possuem boas propriedades bioativas, o que melhora o seu desempenho biológico e conseqüentemente favorece a adesão e a proliferação celular. No entanto, não possuem propriedades elétricas e mecânicas favoráveis [29].

Os polímeros sintéticos surgem como uma alternativa aos polímeros naturais. Estes, para além de serem facilmente manipuláveis, apresentam boas propriedades mecânicas. Desta forma, diversos polímeros sintéticos, como o poli (ácido láctico) (PLA), o ácido L-poliláctico (PLLA) ou PVDF, têm sido amplamente utilizados na produção de biomateriais baseados em materiais inteligentes e funcionais [2,30].

Polímeros inteligentes são materiais capazes de alterar de uma forma controlada e reprodutível uma ou mais propriedades físico-químicas (como o tamanho, forma, solubilidade, permeabilidade, propriedades elétricas e mecânicas), em resposta a um ou mais estímulos externos [27]. Assim, dependendo do mecanismo de transdução, estes podem ser classificados como polímeros não eletricamente deformáveis (quando o estímulo não é elétrico mas sim devido à temperatura, luz ou pH); ou polímeros eletroativos, quando existe um mecanismo eletromecânico envolvido [27,31].

Os polímeros eletroativos são os que mais se evidenciam. Para além de serem facilmente manobráveis e adaptáveis, são capazes de realizar a conversão entre energia elétrica e energia mecânica - mecanismo de transdução eletromecânico – e, por esta mesma razão, são ideais para diversas aplicações como sensores e atuadores, próteses inteligentes, produção de músculos artificiais e diferenciação celular [32,33].

## 2.4 Polímeros eletroativos

Os polímeros eletroativos podem ser divididos em dois grupos de acordo com o mecanismo de ativação: polímeros eletroativos eletrónicos cuja deformação é proveniente de forças eletrostáticas, e polímeros eletroativos iónicos, cuja deformação é originada pela mobilidade ou difusão dos iões através do polímero quando este está sujeito a um campo elétrico [27,33].



Os polímeros eletroativos eletrônicos são maioritariamente aplicados em mecanismos de deformação longitudinais e transversais (Figura 2.3).

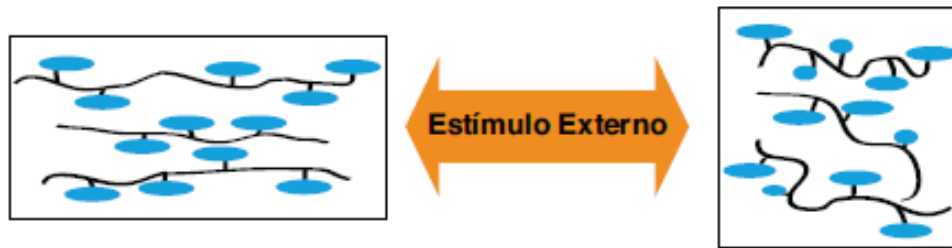


Figura 2.3 - Polímero eletroativo eletrônico sujeito a um campo elétrico [32].

Possuem uma alta eficiência, durabilidade, estabilidade e um mecanismo de resposta rápida (milissegundos) à temperatura ambiente. Já os polímeros eletroativos iônicos apresentam um mecanismo de resposta mais lenta e têm a vantagem de requerer baixas voltagens (1-2V) promovendo assim processos de dobra (*bending*) mais eficazes (Figura 2.4). Por outro lado, a sua resposta é mais lenta e a força produzida é menor que no caso dos polímeros eletroativos eletrônicos [27,32].

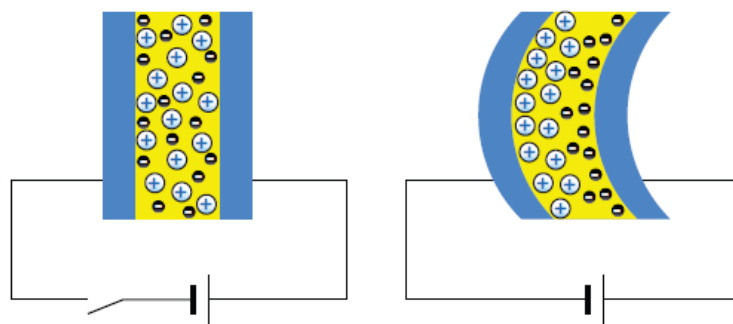


Figura 2.4 - Mecanismo de dobra (*bending*) característico de um polímero eletroativo iônico [32].

Na Tabela 2.2 encontram-se representados os diversos polímeros eletroativos que existem. Os polímeros piezoelétricos são os mais apropriados para aplicações em engenharia de tecidos, especialmente para regeneração muscular, neuronal e óssea, uma vez que conseguem mimetizar o ambiente biológico do tecido através de estímulos eletromecânicos [2].

Tabela 2.2 - Classificação dos polímeros eletroativos [19,32].

Polímeros eletroativos	
Eletrônicos	Iônicos
Polímeros piezoelétricos	Géis poliméricos iônicos
Polímeros ferroelétricos	Compósitos metálicos poliméricos iônicos
Elastômeros eletrostritivos	Polímeros condutores
Elastômeros eletro-viscoelásticos	Nanotubos de carbono
	Fluídos eletroreológicos

### 2.4.1 Polímeros piezoelétricos

Quando um material é sujeito a uma tensão mecânica ao longo de um determinado eixo, gera-se um sinal elétrico como resposta. Este efeito, que consiste na conversão de energia mecânica em elétrica, é designado efeito piezoelétrico direto. A forma mais comum para descrever o efeito piezoelétrico é pelo efeito direto, onde o coeficiente piezoelétrico  $d_i$  é descrito pela Equação 2.1.

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

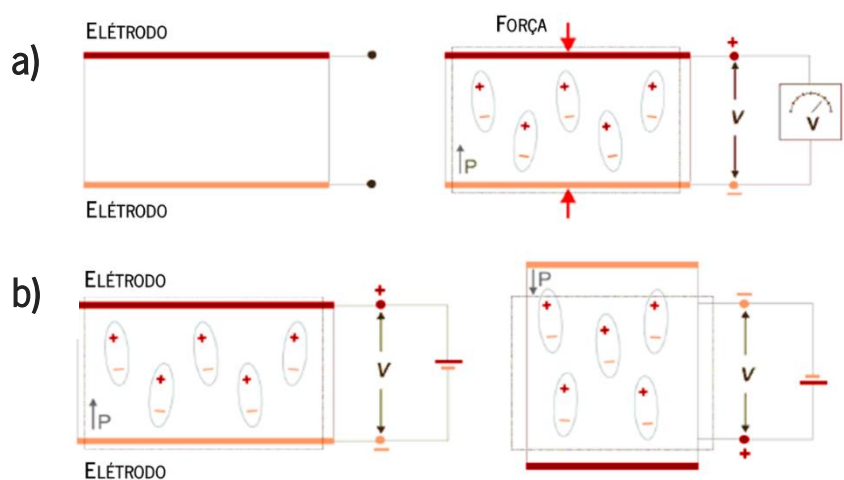
onde “ $D$ ” representa o deslocamento elétrico, “ $E$ ” a força do campo elétrico, “ $X$ ” a tensão mecânica e “ $x$ ” a deformação mecânica [2,32].

Pode ocorrer também o efeito inverso, isto é, a deformação do material quando sujeito a um campo elétrico (efeito piezoelétrico inverso). A Equação 2.2 descreve o efeito piezoelétrico inverso, de coeficiente  $e_i$  [2,32].

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

onde “ $D$ ” representa o deslocamento elétrico, “ $E$ ” a força do campo elétrico, “ $X$ ” a tensão mecânica e “ $x$ ” a deformação mecânica. [2,32] Deste modo, o efeito piezoelétrico pode ser observado como a relação entre as variáveis elétricas “ $D$ ” e “ $E$ ” e mecânicas “ $X$ ” e “ $x$ ”.

Na Figura 2.5 encontram-se representados os efeitos piezoelétricos direto e inverso. Sabendo que os sinais elétricos, em particular os eletromecânicos, são uns dos principais estímulos físicos presentes no corpo humano, o efeito piezoelétrico direto terá maior importância para aplicações biomédicas como sensores, e o efeito piezoelétrico inverso como atuador.



**Figura 2.5** – Representação esquemática do efeito piezoelétrico a) direto e b) inverso. [34]

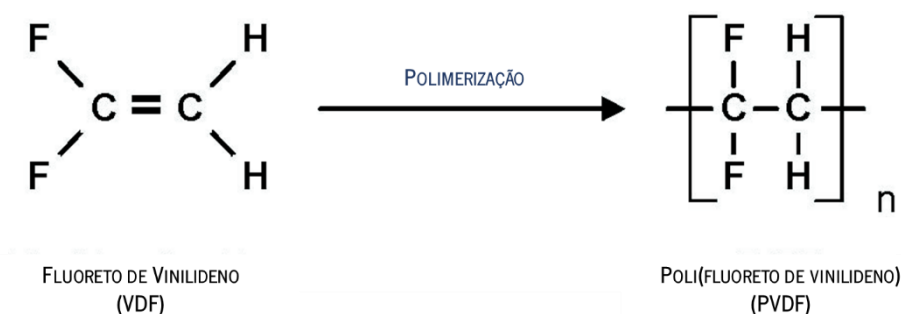
Os polímeros piezoelétricos, apesar de apresentarem uma resposta piezoelétrica mais baixa que alguns cerâmicos, são os que mais atraem a comunidade científica e tecnológica pois são flexíveis, leves e podem ser facilmente produzidos numa ampla gama de configurações (esferas, filmes, fibras, entre outros) a baixo custo [2,32].

Um polímero muito promissor para a regeneração de tecidos é o PVDF devido à sua eletroatividade e biocompatibilidade [35]. Estudos recentes com *scaffolds* de PVDF demonstraram que este promove a adesão e proliferação de osteoblastos para engenharia de tecido ósseo [36], o alongamento e ramificação de neurites para engenharia de tecido neuronal [37] e a proliferação e orientação de células mioblásticas para engenharia de tecido muscular [17].

## 2.5 Poli (fluoreto de vinilideno)

### 2.5.1 Estrutura química

O PVDF é sintetizado pela polimerização do monómero de fluoreto de vinilideno (VDF),  $\text{CH}_2=\text{CF}_2$ . Este monómero é um gás em condições normais de pressão e temperatura, sendo o seu ponto de ebulição de aproximadamente  $85\text{ }^\circ\text{C}$ . Possui uma baixa toxicidade e tem uma solubilidade menor do que  $0,02\text{ g}$  por  $100\text{ g}$  de água (à temperatura de  $25\text{ }^\circ\text{C}$  e pressão de  $1\text{ atm}$ ). A fórmula química do polímero é  $(-\text{CH}_2-\text{CF}_2-)_n$  (Figura 2.6), onde  $n$  representa o número de unidades repetitivas e possui um peso molecular médio de  $106\text{ g/mol}$  [38].



**Figura 2.6** - Representação esquemática do monómero de fluoreto de vinilideno e a respetiva polimerização em PVDF.

O PVDF apresenta um processo de relaxação e uma transição de fase. A relaxação ocorre por volta dos  $-34\text{ }^\circ\text{C}$  e é designada por transição vítrea. A transição de fase ocorre a uma temperatura mais elevada e é denominada por temperatura de fusão  $T_f$ , a qual se situa entre  $160$  e os  $190\text{ }^\circ\text{C}$ . Esta não apresenta um valor fixo uma vez que a temperatura de fusão depende fortemente das condições de processamento e da fase cristalina em que o material se encontra [38].

### 2.5.2 Estrutura molecular e fases cristalinas

O PVDF é um polímero semicristalino, biocompatível, com boas propriedades mecânicas e excelentes propriedades eletroativas, apresentando uma elevada resposta dielétrica, piezoelétrica, piroelétrica e ferroelétrica [17,32]. Geralmente, cristaliza numa estrutura esferulítica constituída por um conjunto de lamelas que crescem radialmente a partir de um

centro comum [36]. Na Figura 2.7 estão representadas duas lamelas que constituem a região cristalina, entre as quais se pode observar a região amorfa do material.

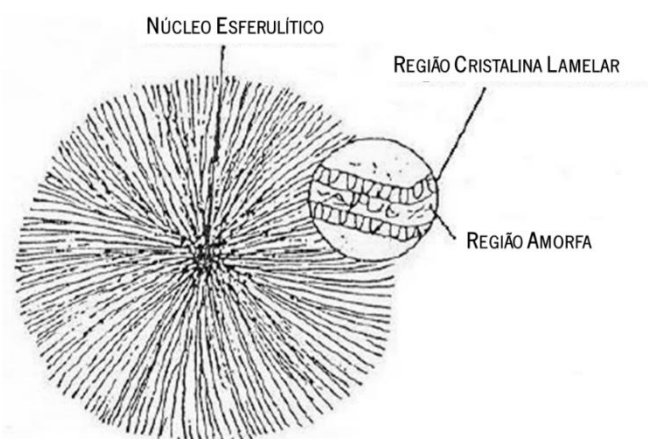


Figura 2.7 - Representação esquemática da estrutura esferulítica do PVDF [39].

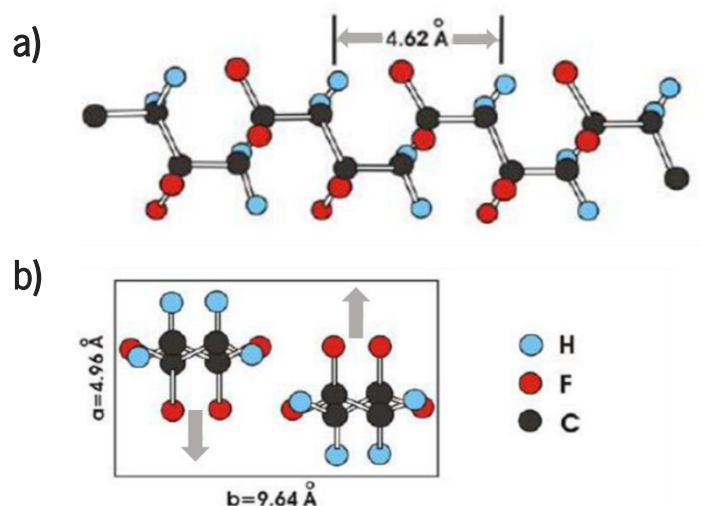
Quanto à polaridade, o PVDF é um polímero linear que apresenta dipolos elétricos permanentes, formados pela diferença de eletronegatividade entre os átomos de flúor e carbono. Apresenta um polimorfismo pouco comum entre os materiais poliméricos, podendo cristalizar em pelo menos quatro fases cristalinas possíveis ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  e  $\delta$ ) [18]. Isto deve-se às reduzidas dimensões do raio atômico do flúor, que favorece a ocorrência de diferentes tipos conformacionais e, conseqüentemente, diferentes estruturas cristalinas. As diversas conformações referem-se ao arranjo espacial dos átomos de carbono na cadeia polimérica, os quais podem ser alterados por rotações das ligações químicas. Deste modo, o PVDF apresenta as seguintes conformações: “*all-trans* (TTT) planar e em zig-zag” na fase  $\beta$  e TGTG’ (*trans-gauche-trans-gauche*) na fase  $\alpha$ . A obtenção de determinadas fases e a interconexão entre elas dependem fortemente dos métodos de processamento, bem como do tratamento térmico, mecânico e elétrico ao que o material é sujeito [18,40].

### 2.5.2.1 Fase $\alpha$

A fase apolar  $\alpha$  é a fase cristalina mais comum do PVDF. Nesta fase, as cadeias poliméricas organizam-se numa estrutura conformacional do tipo TGTG’ onde as moléculas assumem uma configuração helicoidal (Figura 2.8 a). Esta disposição permite um maior distanciamento entre os átomos de flúor dispostos ao longo da cadeia. No entanto, quando a

cadeia polimérica se encontra com esta conformação, o PVDF não apresenta eletroatividade [41].

A célula unitária desta fase é formada por duas macromoléculas e é apolar devido ao empacotamento das cadeias em direções alternadas. Possui uma estrutura cristalina ortorrômbica com dimensões  $a=4,96 \text{ \AA}$ ,  $b=9,64 \text{ \AA}$  e  $c=4,62 \text{ \AA}$  e apresenta uma densidade de  $1,92 \text{ g/cm}^3$  e um valor de entalpia de fusão ( $\Delta H$ ) de  $93,07 \text{ J/g}$ . Na Figura 2.8 b) é representada a célula unitária da fase  $\alpha$  [42].



**Figura 2.8** - Representação esquemática a) das cadeias de PVDF na fase  $\alpha$  e b) da sua célula unitária [42].

### 2.5.2.2 Fase $\beta$

A fase polar  $\beta$  é a mais ativa do ponto de vista elétrico e desta forma, a mais desejável sob o ponto de vista tecnológico para aplicações como sensor, atuador e transdutor. Embora possa ser obtida por diferentes técnicas, a mais reportada sucede do estiramento mecânico da fase  $\alpha$  a temperaturas inferiores a  $100 \text{ }^\circ\text{C}$  [18,32].

Nesta fase, todos os átomos de flúor estão diametralmente dispostos aos de hidrogénio na cadeia polimérica (configuração “*all-trans* (TTT) planar e em zig-zag), como ilustrado na Figura 2.9. Esta estrutura configuracional é a chave para as propriedades piezo- e piroelétricas apresentadas pelo material, pois o momento dipolar das unidades monoméricas é bastante elevado [43].

A célula unitária desta fase é polar, sendo constituída por duas macromoléculas organizadas numa estrutura ortorrômbica com dimensões  $a=8,58 \text{ \AA}$ ,  $b=4,91 \text{ \AA}$  e  $c=2,56 \text{ \AA}$  (Figura 2.9). Esta fase apresenta uma densidade de  $1,97 \text{ g/cm}^3$  e um valor de entalpia de fusão ( $\Delta H$ ) de  $103,4 \text{ J/g}$  [44].

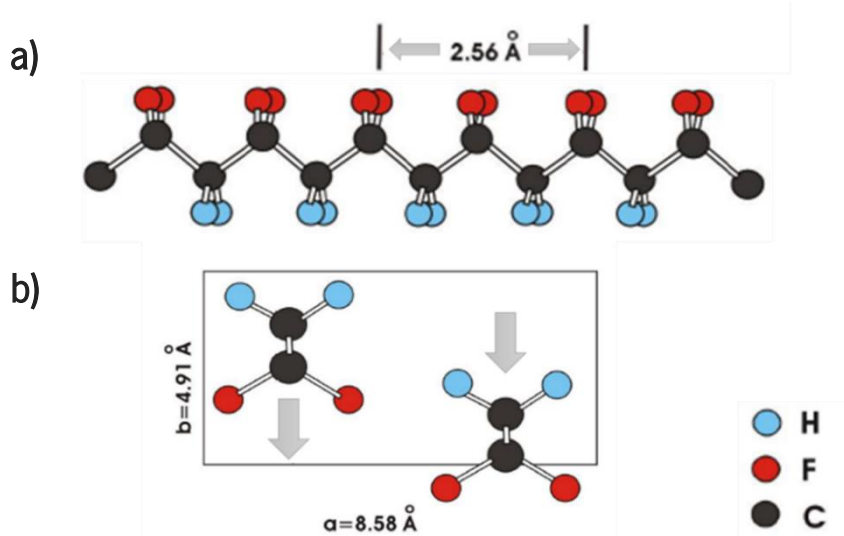


Figura 2.9 - Representação esquemática a) das cadeias de PVDF na fase  $\beta$  e b) da sua célula unitária [42].

## 2.6 Líquidos iónicos

Os ILs são um grupo diversificado de sais constituídos por catiões orgânicos assimétricos e uma variedade de aniões orgânicos e inorgânicos, cujo ponto de fusão ( $T_f$ ) se situa abaixo dos  $373 \text{ K}$  [45–47]. Geralmente possuem pressões de vapor muito baixas (ou quase inexistentes), alta estabilidade térmica, química e eletroquímica, elevada condutividade iónica e uma larga janela eletroquímica. Devido às suas características e propriedades, os ILs surgem como candidatos bastante promissores em diversas aplicações tecnológicas, tais como dispositivos de armazenamento de energia eletroquímica, solventes, baterias de ião lítio, células de combustível, sensores e atuadores [48–50].

As suas propriedades físicas, químicas e térmicas podem ser modeláveis e ajustáveis de acordo com a combinação adequada do catião e do anião. O ponto de fusão, a viscosidade e a miscibilidade com outros solventes são propriedades que podem ser alteradas com a modificação do catião do IL [51]. Na Figura 2.10 encontram-se representados os catiões e aniões que são comumente mais utilizados na preparação de ILs.

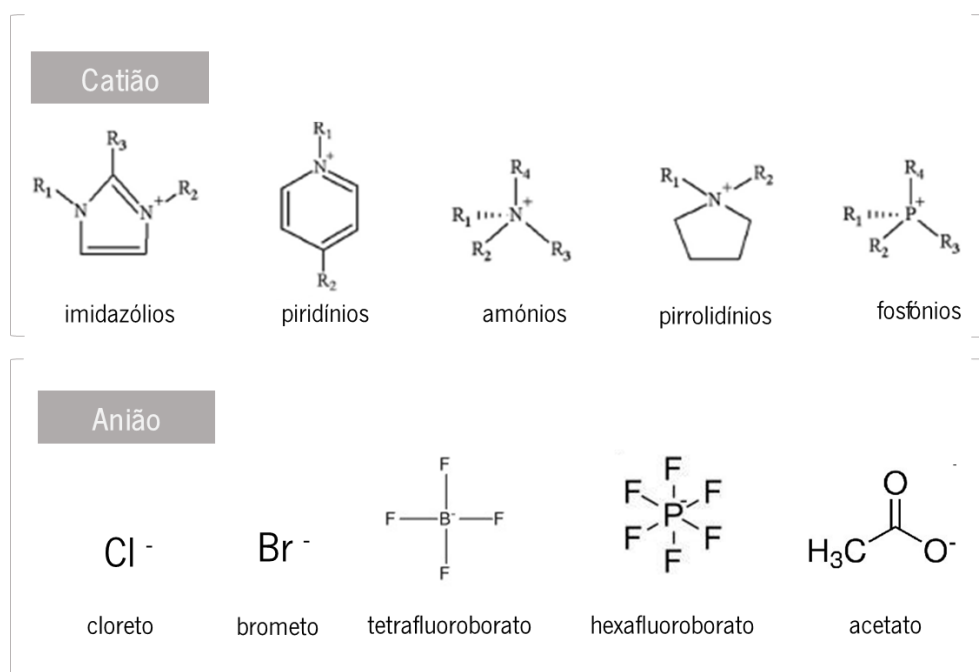


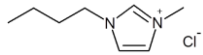
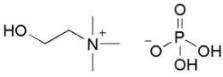
Figura 2.10 – Estruturas químicas dos cátions e aniões mais utilizados na preparação de líquidos iônicos [45,52].

A densidade é outra característica que os define. A maioria dos ILs conhecidos são mais densos que a água (valores entre 1,0 e 1,6 g/cm<sup>3</sup>), e sabe-se da literatura que, à medida que o comprimento da cadeia alquil aumenta, a densidade diminui [47,53]. Contudo, também apresentam algumas desvantagens. A sua elevada viscosidade faz com que eles percam muito rapidamente a sua condutividade eletrolítica com o aumento da temperatura [47]. Uma alternativa é o desenvolvimento de ILs a partir de componentes com propriedades toxicológicas e biodegradáveis bem caracterizadas, os designados “*Bio-Ionic Liquids*” (Bio-ILs) [54,55]. Os ILs baseados em colina [(cho)(AA)] são bastante biodegradáveis, não tóxicos para os seres humanos e para o ambiente e podem ser utilizados em inúmeras aplicações, especialmente a nível biológico [54].

Na Tabela 2.3 são apresentados os ILs que foram selecionados para o desenvolvimento deste trabalho. Estes foram selecionados devido à sua biocompatibilidade.



**Tabela 2.3** - Líquidos iônicos utilizados no presente trabalho.

Nome científico	Estrutura química	Massa molar (g/mol)	Temperatura de fusão (T <sub>f</sub> ) (°C)	Condutividade elétrica (S/m)
Cloreto (Cl) de 1-butil-3-metilimidazólio (Bmim) [Bmim][Cl]		174.68	65.1	0.046
Dihidrogenofosfato (DHP) de 2-hidroxietil-trimetilamônio (colina) [Ch][DHP]		201.16	190	≤ 0.04

Os ILs encontram-se agrupados em diferentes classes de acordo com as suas características e propriedades. Podem dividir-se em ILs apróticos, próticos e inorgânico [56].

Os ILs apróticos representam a grande maioria dos ILs. São constituídos por catiões orgânicos e por aniões do grupo das imidas, como o bis ((trifluorometil)sulfonil)imida (NTf<sub>2</sub>), o que lhes confere baixas viscosidades [57].

Os ILs próticos foram os primeiros ILs a ser sintetizados. Apresentam uma elevada condutividade iônica e formam-se quando ocorre a transferência de um próton de um ácido de Brønsted para uma base de Brønsted [51,56].

Relativamente aos ILs inorgânicos, estes tanto podem ser próticos ou apróticos. No entanto, apresentam catiões e aniões inorgânicos, ao contrário das classes anteriores, que apresentavam exclusivamente compostos orgânicos [57].

### 2.6.1 Compósitos polímero/líquido iônico

Devido a todas as suas características e propriedades, os ILs podem ser utilizados no desenvolvimento de materiais eletroativos iônicos. Na literatura, já existem diversos estudos realizados com compósitos poliméricos e ILs para diferentes aplicações. Na Tabela 2.4 encontram-se compilados os trabalhos já publicados.

Tabela 2.4 – Matriz polimérica, líquido iônico, morfologia e aplicação.

Matriz polimérica	Líquido Iônico	Morfologia	Aplicação	Referência
Nafion; PVDF-HFP; SWCNT	[C <sub>2</sub> mim][BF <sub>4</sub> ] [C <sub>2</sub> mim][TFSI]	Atuador <i>Bucky-gel</i>	Eletroquímica	[58]
Quitosano	[C <sub>2</sub> mim][OTf]	Membranas	Regeneração músculo-esquelética	[59]
PVDF – CTFE	[C <sub>2</sub> mim][TfO]	Filmes	Eletrólitos	[60]
PEDOT:PSS	[C <sub>2</sub> mim][TFSI]	Impressão jato de tinta	Filtração	[61]
PVDF-HFP; SWNT <sub>s</sub>	[C <sub>2</sub> mim][BF <sub>4</sub> ]	<i>Bulky gel</i>	Regeneração músculo-esquelética	[62]
PVDF	[C <sub>6</sub> (mpy) <sub>2</sub> ][NiCl <sub>4</sub> ] <sup>2-</sup>	Nanofibras	Sistema catalítico	[63]
PVDF-HFP	[HEMIm][Cl] [HEMIm][BF <sub>4</sub> ]	Gel filme	Dispositivos eletrônicos	[64]
PEUU	[C <sub>2</sub> mim][NTf <sub>2</sub> ]	Filme	Eletrólito	[65]
PVDF	[C <sub>4</sub> mim][PF <sub>6</sub> ] [C <sub>4</sub> mim][BF <sub>4</sub> ] [C <sub>4</sub> mim][FeCl <sub>4</sub> ] [C <sub>4</sub> mim][Cl]	Filmes	—	[66]
Colagénio	[C <sub>10</sub> mim][Cl] [C <sub>4</sub> mim][Cl] [C <sub>2</sub> mim][Cl]		Aplicações biomédicas	[67]
Nafion	[C <sub>2</sub> mim][Tf] [BMP][TFSI] [TES][TFSI]	Filmes	Sensores, atuadores, baterias	[68]
PVDF-HFP	[C <sub>2</sub> mim][DCA]	Filme	Baterias	[69]
PU	[C <sub>4</sub> mim][PF <sub>6</sub> ]	Fibras	Aplicações biomédicas e no tratamento de água residuais	[70]
PVDF	[C <sub>2</sub> mim][NTf <sub>2</sub> ]	Filmes	Atuadores	[71]
PVDF	[C <sub>4</sub> mim][Cl]; [C <sub>6</sub> mim][Cl]; [C <sub>18</sub> mim][Cl]	Filmes	Sensores, atuadores e baterias	[72]

Tal como se pode visualizar pela Tabela 2.4, os compósitos polímero/IL têm sido utilizados principalmente para aplicações em baterias [68,69,72], membranas de filtração [61,73], sensores e atuadores [68,72], dispositivos eletrônicos [64,74], sistemas catalíticos [63], entre outros. As aplicações em engenharia de tecidos são muito poucas [59,67]. Os compósitos de PVDF/IL têm sido utilizados essencialmente em, baterias, sensores e atuadores. [72]

*He et al* [66] desenvolveram filmes de  $\beta$ -PVDF com ILs da classe dos imidazólios na matriz polimérica, tendo verificado que os ILs influenciavam significativamente o mecanismo de nucleação e o crescimento das esferulites de PVDF. *Xing et al* [75] ao estudar compósitos nanoestruturados de PDVF/IL puderam comprovar que estes compósitos não só exibiam melhores propriedades elétricas, como também apresentavam um melhor módulo de *Young* e desempenho dielétrico quando comparados com o PVDF puro.

Na literatura, existem reportados diversos trabalhos que obtiveram sucesso no desenvolvimento de atuadores baseados em compósitos PDVF/IL para engenharia de tecidos. *Dias et al* [71] prepararam filmes compósitos PVDF/1-etil-3-metilimidazólio bis(trifluorometanosulfonil)imida [C<sub>2</sub>mim][NTf<sub>2</sub>] com 10, 25 e 40% (p/p) de IL, tendo verificado que a introdução de [C<sub>2</sub>mim][NTf<sub>2</sub>] interfere no processo de cristalização do polímero afetando as propriedades mecânicas do mesmo. A introdução do líquido iónico aumentou também a plasticidade das amostras, como consequência da diminuição do módulo de elasticidade. Uma tensão elétrica de 10 V, com uma frequência de 0.5 Hz causou uma flexão de  $6 \times 10^{-4}$  mm.

*Mejri et al* [76] prepararam filmes compósitos PVDF/[C<sub>6</sub>mim][Cl] e PVDF/[C<sub>6</sub>mim][NTf<sub>2</sub>] com 10, 25 e 40% (p/p) de IL para avaliar o efeito do anião na *performance* do atuador. Puderam verificar que, independentemente do tipo e quantidade de IL, a estrutura esferulítica do PVDF se encontra preservada em todas as amostras. Comprovaram também que, à medida que se adicionava mais IL, a plasticidade e condutividade elétrica dos filmes compósitos aumentava, e que essa última dependia do tipo de anião presente no IL. Como o tamanho do catião era o mesmo, mostraram que a mobilidade dos iões é fortemente influenciada pelo tamanho do anião (é maior quando os aniões são pequenos). Neste sentido, amostras com menor grau de cristalinidade (PVDF/[C<sub>6</sub>mim][Cl]) permitiam uma melhor mobilidade iónica.

O presente trabalho visa o desenvolvimento de filmes compósitos PVDF/IL com diferentes quantidades (10, 20 e 40% (p/p)) de [Bmim][Cl] e [Ch][DHP] para aplicações em engenharia de tecido muscular.

## Capítulo 3 – Materiais e Métodos

---



### 3.1 Materiais

Todos os compósitos poliméricos efetuados têm como matriz o polímero PVDF. O polímero PVDF (*Solef 6010*) em pó foi adquirido na *Solvay*. O solvente dimetilformamida (DMF, 99.5%) foi adquirido na *Merck* e os ILs [Ch][DHP] (grau de pureza > 98%) e [Bmim][Cl] (grau de pureza > 98%) foram adquiridos à *Iolitec* e *Solvionic*, respetivamente.

### 3.2 Procedimento experimental

Neste subtópico será descrito o protocolo experimental utilizados na obtenção de filmes compósitos PVDF/[Bmim][Cl] e PVDF/[Ch][DHP].

#### 3.2.1 Preparação dos filmes compósitos poli (fluoreto de vinilideno) / líquido iónico

Para a produção de filmes de PVDF e filmes compósitos PVDF/IL recorreu-se à técnica de evaporação do solvente - *solvent casting* [71].

Para os filmes de PVDF, preparou-se uma solução de PVDF em DMF com uma concentração de 15% (p/p). Após a completa dissolução do polímero em DMF sob agitação magnética, a solução foi distribuída homogeneamente sob um substrato de vidro, com o auxílio de um extensor. Uma vez espalhada no substrato de vidro, a solução foi colocada numa estufa (P-Slecta) a uma temperatura de 210 °C durante 10 minutos. Por fim, os vidros de deposição foram retirados da estufa e arrefecidos à temperatura ambiente. O filme de 35 µm foi depois destacado do substrato.

Para a obtenção dos filmes compósitos PVDF/IL adotou-se o mesmo procedimento experimental apresentado anteriormente. No entanto, previamente à adição do polímero, colocou-se cada um dos ILs a dispersar, independentemente, no solvente. Foram obtidos filmes de PVDF/[Bmim][Cl] e PVDF/[Ch][DHP] com diferentes concentrações de IL (10, 20 e 40% (p/p)).

A Figura 3.1 esquematiza o processamento de filmes por *solvent casting*.

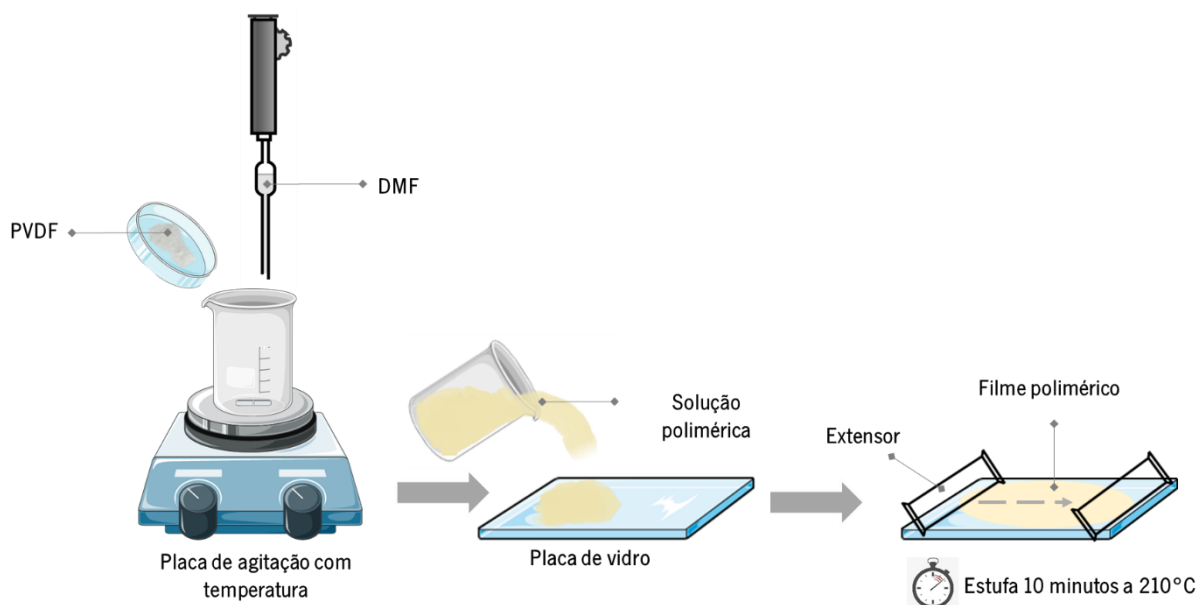


Figura 3.1– Método de processamento de filmes poliméricos por *solvent casting*.

### 3.3 Técnicas de caracterização

Neste subtópico serão descritas as diversas técnicas utilizadas na caracterização dos filmes compósitos: microscopia eletrônica de varrimento (SEM do inglês *Scanning Electron Microscope*), medição de ângulos de contacto, espectroscopia de infravermelho com transformadas de Fourier (FTIR do inglês *Fourier Transform Infrared Spectroscopy*), calorimetria diferencial de varrimento (DSC do inglês *Differential Scanning Calorimetry*), análise termogravimétrica (TGA do inglês *Thermogravimetric Analysis*) e medidas de condutividade. Adicionalmente, serão também indicados os princípios básicos do seu funcionamento bem como as condições de análise utilizadas para cada uma das técnicas.

#### 3.3.1 Microscopia eletrônica de varrimento

A microscopia eletrônica de varrimento é uma técnica de aquisição de imagem que permite a análise e a caracterização da morfologia das amostras a uma escala micro- e nanométrica [6,77]. No entanto, a preparação destas precisa de ser cuidada. As amostras metálicas não necessitam de uma preparação prévia, já as restantes, têm de ser revestidas com um material condutor (usualmente consiste num filme metálico finamente depositado na

superfície) de forma a evitar a acumulação de cargas superficiais que impeçam o feixe de atingir a amostra [78,79].

Os componentes básicos do SEM encontram-se descritos na Tabela 3.1.

**Tabela 3.1** - Componentes básicos do SEM [26,42].

Componente	Funcionalidade
Canhão eletrónico	Produção do feixe de eletrões
Sistema ótico eletromagnético (lentes convergentes)	Redução do diâmetro do feixe de eletrões, produzindo um feixe de diâmetro muito reduzido focado numa determinada região da amostra.
Bobines defletoras	Deflexão do feixe eletrónico de forma a efetuar o varrimento da região de interesse.
Platina	Suporta a amostra e possibilita o seu deslocamento por rotação e inclinação e translação, segundo os três eixos.
Sistema de deteção	Deteção dos eletrões refletidos pela amostra
Sistema de visualização da imagem	Visualização da imagem SEM formada após o varrimento contínuo da superfície da amostra pelo feixe de eletrões

Esta técnica utiliza um feixe fino de eletrões de elevada intensidade para examinar a amostra e, desta interação, resulta a emissão de uma série de radiações, tais como: eletrões secundários, eletrões retrofundidos, raios-X característicos, eletrões *Auger*, entre outros. O método mais comum de obtenção de imagens é a deteção de eletrões secundários. Quando estas radiações são detetadas, é possível obter informações sobre a topografia (interação do feixe eletrónico com a amostra obtém-se eletrões secundários), composição química (interação do feixe eletrónico com a amostra obtém-se eletrões retrodispersos – BSE) e elementos químicos que compõem a amostra (interação do feixe eletrónico com a amostra obtém-se raios X) (Figura 3.2) [78,80]. É importante salientar que os detetores não estão todos colocados à mesma distância da amostra. Os detetores de eletrões primários (eletrões retrodispersos) estão mais afastados, uma vez que estes eletrões possuem energias e velocidades elevadas. Já o detetor de eletrões secundários situa-se próximo da amostra. Este detetor possui uma carga positiva na superfície (Figura 3.2), capaz de capturar os eletrões secundários, eletrões estes que, são menos energéticos que os eletrões principais [79].



A imagem de SEM forma-se após o varrimento contínuo da superfície pelo feixe de eletrões. Esta imagem pode-se basear apenas na deteção de um só tipo de eletrões emitidos (análise mais rápida) ou pela deteção dos diferentes tipos de radiação gerada (análise mais demorada mas com melhor resolução) [79].

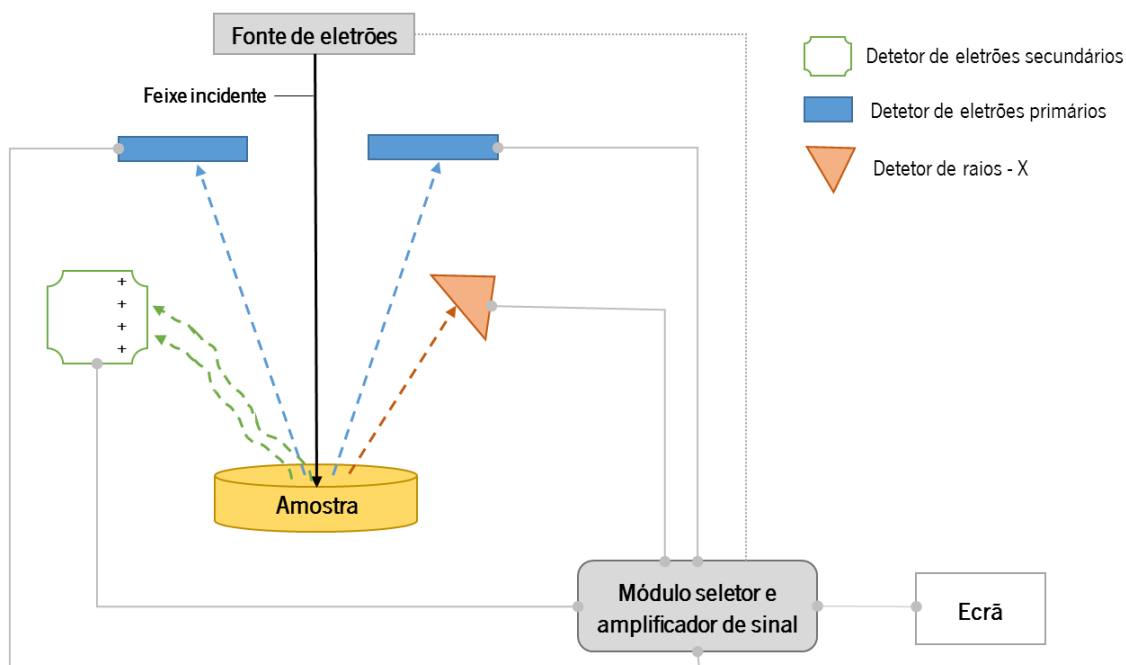


Figura 3.2 – Esquema do funcionamento de um microscópio eletrónico de varrimento. Adaptado de [79].

### 3.3.1.1 Condições de análise

A utilização desta técnica implica uma preparação prévia das amostras. Estas foram então recobertas com uma fina camada de ouro por *sputtering*. O equipamento utilizado no revestimento foi o *Polaron SC502*. As imagens de SEM foram obtidas com uma energia de 10 kV no aparelho FEG-SEM *Hitachi S4100*.

### 3.3.2 Medição do ângulo de contacto

A medição de ângulos de contato é uma técnica que permite avaliar o grau de hidrofobicidade e molhabilidade de superfícies através da deposição de uma gota de líquido, com volume definido, sobre a superfície do material [81].

Para uma gota líquida em repouso sobre uma superfície sólida, observa-se a existência de uma linha comum entre as fases sólida, líquida e vapor denominada por linha de contacto. O ângulo resultante entre a linha tangente à interface que separa o líquido e o vapor e a linha tangente à superfície do sólido é definido como ângulo de contacto ( $\theta$ ) (Figura 3.3) [81,82].

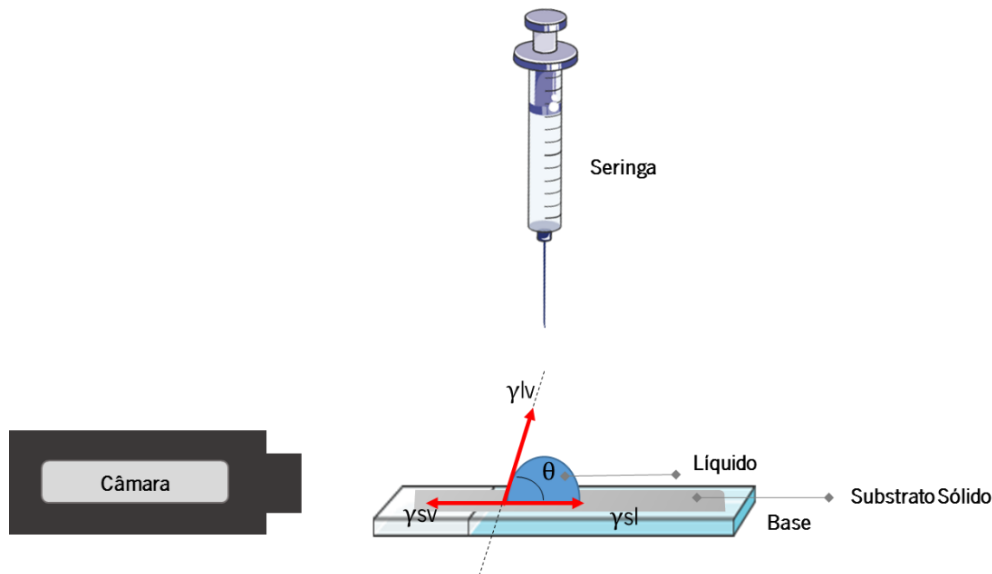


Figura 3.3 – Representação esquemática da medição de um ângulo de contacto. Adaptado de [34].

Uma superfície é considerada hidrofílica para valores de angulo de contacto ( $\theta$ ) inferiores a  $90^\circ$  e hidrofóbica para valores superiores a  $90^\circ$  (Figura 3.4) [34,83].

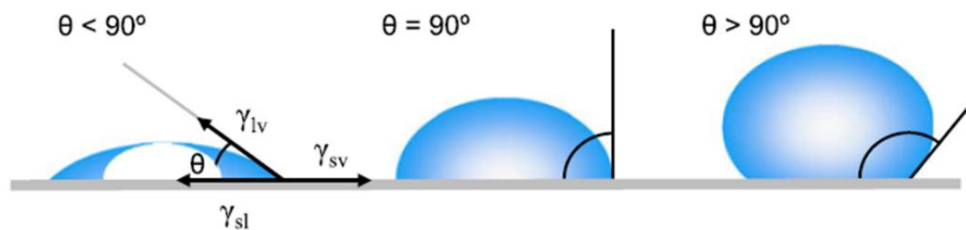


Figura 3.4 – Representação do ângulo de contacto de uma gota numa superfície sólida: “ $\theta$ ” representa o ângulo de contacto, “ $\gamma_{lv}$ ” a interface líquido-vapor, “ $\gamma_{sv}$ ” a interface sólido-vapor e “ $\gamma_{sl}$ ” a interface sólido-líquido [81].

### 3.3.2.1 Condições de análise

Utilizou-se uma gota de  $3 \mu\text{L}$  de água destilada à temperatura ambiente e o equipamento *Dataphysics Contact Angle System OCA* (Figura 3.5) para medir o ângulo de

contacto que a gota faz com a superfície do material. O *software* utilizado para a análise foi o SCA20. Foram realizadas 6 medições em locais diferentes para cada amostra, pelo que o ângulo de contacto é apresentado como a média e desvio padrão obtido em cada amostra.

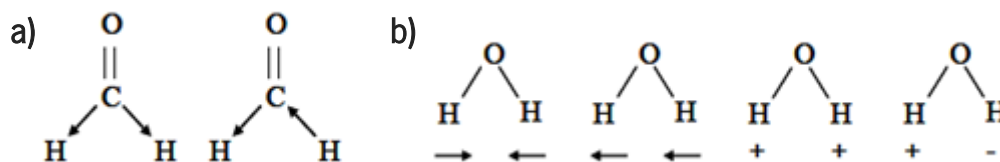


**Figura 3.5** - Equipamento utilizado nas medições do ângulo de contacto: Dataphysics Contact Angle System OCA.

### 3.3.3 Espetroscopia de infravermelho com transformadas de Fourier

A espectroscopia de infravermelho com transformadas de Fourier é uma técnica comumente utilizada na caracterização de materiais poliméricos.

Esta espectroscopia de absorção, baseada na vibração dos átomos de uma molécula, utiliza a região do infravermelho (IV) do espectro eletromagnético que se situa entre os 400 e 4000  $\text{cm}^{-1}$  [26]. Quando uma amostra é sujeita a este tipo de radiação, existe uma certa fração de radiação incidente que é absorvida a uma determinada energia, gerando assim um espectro de infravermelho (IV). A energia a que qualquer banda de absorção aparece no espectro de IV corresponde à frequência de vibração de uma dada ligação química ou grupo funcional na amostra [84]. No entanto, para que ocorra absorção de energia é necessária uma alteração do momento dipolar da ligação química ou grupo funcional em estudo decorrente do seu movimento vibracional ou rotacional. A vibração pode ter origem na alteração do comprimento de ligação, estiramento, variação do ângulo de ligação ou deformação (Figura 3.6) [84,85].



**Figura 3.6** - Modos vibracionais possíveis numa molécula: a) Estiramento simétrico e assimétrico de uma ligação C-H; b) modos de deformação possíveis numa molécula de água. Os símbolos “+” e “-” referem-se a movimentos perpendiculares ao plano de observação [26].

Recorreu-se então à técnica de FTIR para identificar as fases cristalinas presentes nos filmes compósitos PVDF/IL. Cada fase cristalina do PVDF apresenta uma conformação molecular e uma simétrica cristalina diferente, o que implica que a cada fase cristalina do polímero correspondam modos de vibração molecular característicos [86].

O espectro de FTIR-ATR do PVDF está bem caracterizado e existem bandas de absorção que identificam claramente as fases  $\alpha$  e  $\beta$  do PVDF [23].

**Tabela 3.2** - Bandas de absorção características das fases  $\alpha$  e  $\beta$  do PVDF [40].

Fase	Bandas de absorção características (cm <sup>-1</sup> )
$\alpha$	532, 615, 763, 796, 854, 870 e 970
$\beta$	442, 468, 510, 839, 1279

A fração de fase  $\beta$  presente na amostra pode ser calculada recorrendo à equação 3.1.

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

onde “F( $\beta$ )” representa o conteúdo da fase  $\beta$ , “A $_{\alpha}$ ” e “A $_{\beta}$ ” representam as absorvâncias a 763 e 839 cm<sup>-1</sup> sendo que estes números de onda correspondem à fase  $\alpha$  (F( $\alpha$ )) e F( $\beta$ ) do material respetivamente, “K $_{\alpha}$ ” e “K $_{\beta}$ ” são os coeficientes de absorção dos números de onda e os valores são 6,1x10<sup>4</sup> e 7,7x10<sup>4</sup> cm<sup>2</sup>/mol respetivamente [43].

### 3.3.1.1 Condições de análise

A análise foi realizada num espectrofotómetro *Jasco FT/IR-4100 FTIR spectra* (Figura 3.7) dotado de um sistema de reflexão total atenuada. Todos os espectros foram obtidos num intervalo compreendido entre os 600 e os 4000  $\text{cm}^{-1}$ , com uma resolução de 4  $\text{cm}^{-1}$ . Para cada amostra realizaram-se 64 varrimentos, sendo apresentada a média dos valores obtidos.

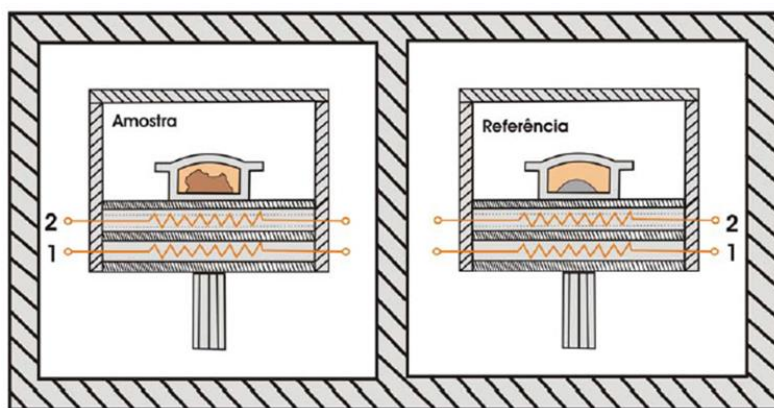


**Figura 3.7**– Equipamento utilizado na espectroscopia de infravermelho: Jasco FT/IR-4100 FTIR spectra.

### 3.3.4 Calorimetria diferencial de varrimento

A calorimetria diferencial de varrimento é uma técnica termoanalítica que regista o fluxo de energia calorífica em função do tempo ou temperatura [87].

O aparelho de DSC é constituído por duas câmaras, a da amostra e a de referência, ambas em contacto com um termopar e um sistema de aquecimento, como demonstrado na Figura 3.8. As duas câmaras são submetidas a um mesmo programa de temperatura com taxa de aquecimento ou arrefecimento controlado [88].



**Figura 3.8** – Representação esquemática de um aparelho de DSC. O número 1 representa o sistema de aquecimento e o número 2 o sistema de medida de temperatura [88].

Durante o ensaio experimental, o aparelho deteta a variação de temperatura ( $\Delta T$ ) entre a amostra a analisar e um composto referência sujeitos a um fluxo de calor semelhante. Esta diferença de temperatura deve-se basicamente à resistência térmica da amostra que sofre variações com as transições de fase, reações endotérmicas ou exotérmicas ou ainda com variações de massa da amostra [87,88].

Através desta técnica pode-se obter informações sobre a temperatura de fusão, cristalização e de transição vítrea de um polímero, bem como o seu grau de cristalinidade [19,25]. O grau de cristalinidade ( $\Delta X_c$ ) do material pode ser calculado a partir da equação 3.2.

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

onde “ $\Delta H$ ” é a entalpia de fusão da amostra em consideração, “ $\Delta H_\alpha$ ” e “ $\Delta H_\beta$ ” são a entalpia de fusão de uma amostra 100% cristalina na  $F(\alpha)$  e  $F(\beta)$  com os valores de 93,07 J/g e 103,4 J/g respetivamente, e “ $x$ ” e “ $y$ ” é a quantidade da  $F(\alpha)$  e  $F(\beta)$  presente na amostra respetivamente sendo os valores obtidos por medições de FTIR [56].

### 3.3.4.1 Condições de análise

Os ensaios de DSC foram efetuados num aparelho *Perkin-Elmer DSC 8000* (Figura 3.9), entre 0 e 200 °C, a uma velocidade de aquecimento de 10 °C/min em atmosfera de azoto. Todos os testes foram realizados utilizando cápsulas de alumínio de 30 µL.



**Figura 3.9** – Equipamento utilizado nos ensaios de DSC: Perkin-Elmer DSC 8000.

### 3.3.5 Análise termogravimétrica

A análise termogravimétrica é uma técnica de análise calorimétrica que estuda a variação de massa de uma amostra em função da temperatura. Esta variação pode estar relacionada com fenómenos de oxidação, desidratação ou até mesmo degradação do material [89].

Numa análise TGA podem ser efetuados dois tipos de ensaios: os ensaios dinâmicos e os ensaios isotérmicos. Os ensaios dinâmicos são utilizados quando a substância é submetida a um gradiente de temperatura segundo uma determinada velocidade de aquecimento. Já os ensaios isotérmicos são utilizados quando a substância é submetida a uma temperatura constante durante um determinado intervalo de tempo [90].

O equipamento utilizado pela técnica possui uma termobalança composta por uma microbalança de alta sensibilidade e um forno com um programador de temperatura e atmosfera controlada. Apresenta também um gás de purga, geralmente inerte, não só para evitar reações com amostra mas também melhorar a condução de calor [90]. É necessário também

um sistema de controlo, recolha e tratamento de dados. A Figura 3.10 esquematiza os principais componentes do instrumento de TGA.

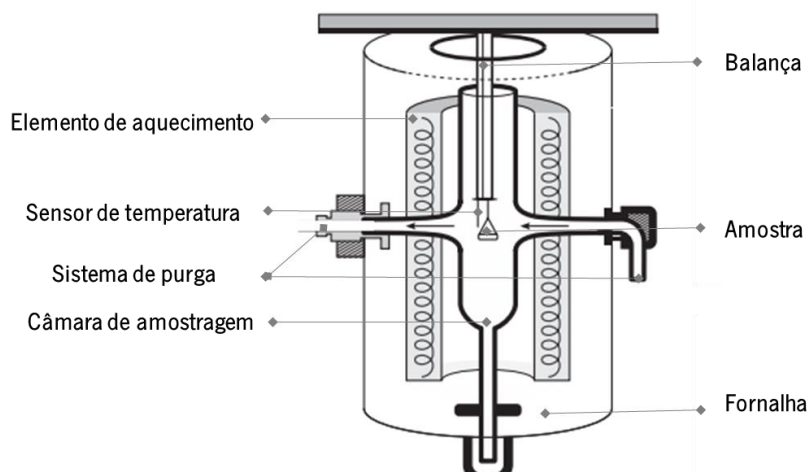


Figura 3.10 – Representação esquemática de um aparelho de TGA. Adaptado de [90].

Um termograma exprime a variação de massa das amostras em função do tempo ou temperatura. Os pontos de decréscimo e estabilização da massa indicam o intervalo de temperaturas de degradação e o declive da curva a rapidez com que o material se degrada [91].

### 3.3.5.1 Condições de análise

A análise termogravimétrica foi efetuada num aparelho *Perkin-Elmer TGA 4000* (Figura 3.11), entre os 30 e 900 °C, a uma velocidade de aquecimento de 10 °C/min em atmosfera de azoto. Todos os testes foram realizados utilizando cápsulas de alumínio de 30 µL.



Figura 3.11 – Equipamento utilizado na análise termogravimétrica das amostras: Perkin-Elmer TGA 4000.



### 3.3.6 Medidas de condutividade elétrica

Para avaliar a condutividade elétrica dos filmes compostos PVDF/IL, recorreu-se à utilização de um picoamperímetro *Keithley 6487* (Figura 3.12).

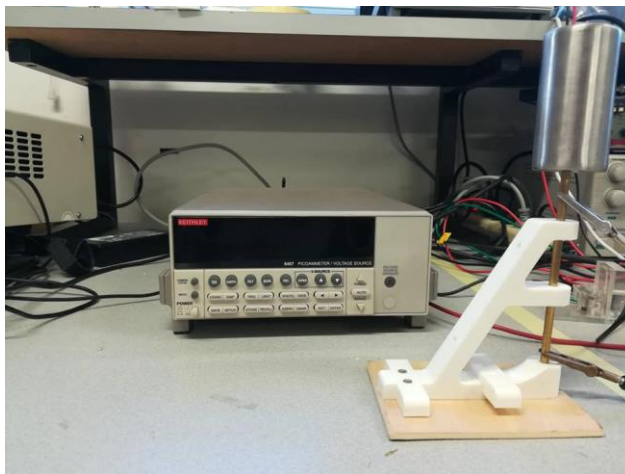


Figura 3.12 – Montagem experimental utilizada nas medições de resistência elétrica.

A partir do *software* do equipamento utilizado obteve-se a curva I-V (Intensidade de corrente – Voltagem) e através do declive da reta, obteve-se o valor da resistência (R).

Para cada amostra, sabendo o valor da resistência elétrica do circuito (R), a área dos eletrodos (A) e a distância entre eles (d), neste caso a espessura da amostra, é possível determinar a resistividade volúmica ( $\rho$ ) do composto (Equação 3.3) [92].

$$\rho = R \frac{A}{d} \quad (\text{Equação 3.3})$$

A resistividade elétrica ( $\rho$ ) é uma grandeza física que está relacionada com a oposição que um dado material oferece à passagem de corrente elétrica [89,92]. A condutividade elétrica ( $\sigma$ ) define-se como sendo inverso da resistividade ( $\rho$ ) (Equação 3.4) e vem expressa em S/m [93].

$$\sigma = \frac{1}{\rho} \quad (\text{Equação 3.4})$$

### 3.3.6.1 Condições de análise

Em todas as amostras preparadas foram depositados elétrodos por *sputtering*. Para tal, utilizou-se um *sputter coater* da marca *Fisions Instruments* modelo *Polaron SC502* com alvo de ouro. Os elétrodos depositados têm 2.5 mm de diâmetro e a espessura das amostras varia entre 21 e 49  $\mu\text{m}$ .

Como já foi referido anteriormente, para efetuar as medições de resistividade elétrica através de curvas I-V utilizou-se o equipamento *Keithley 6487* e aplicou-se uma voltagem entre os -10 e 10 V (Figura 3.12). Foram efetuadas 3 medições por amostra à temperatura ambiente.

## 3.4 Esterilização dos filmes compósitos

Para os ensaios *in vitro*, todas as amostras foram inicialmente cortadas em círculos, esterilizadas com radiação ultravioleta (UV) durante 2 h (1 h de cada lado) e lavadas com tampão fosfato-salino a 1% (PBS do inglês *Phosphate Buffer Saline*, Gibco) 5 vezes durante 5 minutos cada. O diâmetro do círculo utilizado para os ensaios de citotoxicidade e proliferação celular foi de 13 e 11 mm, respetivamente.

## 3.5 Cultura celular

As células mioblásticas de ratinho (linha celular C2C12) foram colocadas em expansão em frascos de cultura de 75  $\text{cm}^2$  utilizando meio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM do inglês *Dulbecco's modified Eagles's medium*, Gibco) contendo 4,5 g/L de glucose suplementado com 10% de soro fetal bovino (FBS do inglês *Fetal Bovine Serum*) e 1% de penicilina/estreptomicina (P/S do inglês *Penicilin/Streptomycin*). As células foram incubadas sob condições padrão a 37 °C com ar humidificado a 95% contendo uma atmosfera 5% de  $\text{CO}_2$ . O meio de cultura foi mudado a cada dois dias até que as células atingissem uma confluência de 60 – 70%. Posteriormente fez-se uma sub-cultura através da adição de 0.05 % de tripsina-EDTA [25].

### 3.6 Ensaio de citotoxicidade

A avaliação da citotoxicidade das amostras produzidas foi realizada de acordo com o descrito na norma ISO 10993-5 [35]. Para isso, utilizou-se o ensaio colorimétrico 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazólio (MTS). Este método permite avaliar a atividade metabólica mitocondrial que reflete o número de células viáveis, quantificáveis através da sua leitura num espectrofluorímetro [17].

A bio-redução do composto MTS a formazano pela ação da enzima desidrogenase mitocondrial será diretamente proporcional à atividade mitocondrial e ao número de células viáveis. Os cristais de formazano formados podem ser quantificados espectrofotometricamente por volta dos 490 nm de comprimento de onda, onde o seu pico de absorção é máximo [94].

Depois de esterilizadas as amostras, estas foram colocadas numa placa de cultura celular de 24 poços com o meio anteriormente descrito e nas mesmas condições padrão durante 24 h. Adicionalmente, foram preparados os controlos do ensaio. Para o controlo positivo utilizou-se uma solução de DMSO a 20 % (v/v) e para o controlo negativo meio de cultura celular [22].

Simultaneamente, foram cultivadas células C2C12 numa placa de 96 poços com uma densidade de  $2 \times 10^4$  células/mL e incubadas durante 24 h, de modo a permitir a adesão celular. Após essas 24 h, o meio de cultura da placa de 96 poços que continha as células foi descartado e substituído por 100  $\mu$ L do meio de extração (meio em contacto com as amostras). Por fim, as células foram incubadas durante 72 h a 37 °C em atmosfera com 95% de humidade e 5% de CO<sub>2</sub>.

Terminado o tempo de incubação, o meio foi novamente descartado e substituído por um meio contendo MTS (MTS dissolvido em DMEM na proporção de 1:5). Depois de 2 h de incubação, a absorvância dos poços foi medida a 490 nm utilizando um leitor de microplacas [25]. Os resultados foram obtidos a partir de 4 réplicas por amostra e controlo, tendo sido analisada a viabilidade celular e desvio padrão de acordo com a seguinte equação 3.4 [6].

$$\text{Viabilidade celular (\%)} = \frac{\text{Absorvância da amostra}}{\text{Absorvância do controlo negativo}} \times 100 \quad (\text{Equação 3.4})$$

### 3.7 Ensaio de proliferação celular

Para avaliar a influência dos materiais produzidos na proliferação celular das células mioblásticas C2C12, utilizou-se o ensaio colorimétrico MTS. Este ensaio avalia a viabilidade celular, que indiretamente indica a proliferação celular. A proliferação celular foi avaliada ao fim de 24 e 72 h.

Após os referidos tempos, as amostras foram transferidas para uma nova placa de 24 poços e lavadas 2 vezes com PBS a 1% durante 5 minutos. Posteriormente, foram incubadas num meio contendo MTS e DMEM, sem vermelho de fenol (Biochrom), numa proporção de 1:5, durante 2 h a 37°C, no escuro.

O sobrenadante foi utilizado para determinar a absorvância a 490 nm. Para cada condição foram utilizadas 4 réplicas ( $n = 4$ ) que contribuíram para uma análise quantitativa apresentada sob a forma de média e desvio padrão.

#### 3.7.1 Preparação das amostras para visualização por microscopia de fluorescência

De forma a avaliar a adesão e a morfologia das células nos diferentes filmes compósitos produzidos, as amostras foram preparadas para visualização por imunofluorescência.

Após terminado os ensaios de proliferação celular (24 e 72 h), as amostras foram lavadas com PBS a 1%. Posteriormente, as células foram fixadas com formaldeído a 4% (*Panreac*) e incubadas durante 10 minutos a 37°C com uma atmosfera de CO<sub>2</sub> de 5%.

Para a visualização por microscopia de fluorescência, depois de fixadas as células, estas foram novamente lavadas com PBS a 1% e incubadas com 1 µg/mL<sup>1</sup> de isotiocianato de fluoresceína (FITC, *Sigma Aldrich*) durante 45 minutos à temperatura ambiente. Após os 45 minutos de incubação, as células foram lavadas com PBS a 1% e incubadas numa solução de 0,1 µg/mL<sup>1</sup> de dihidrocloro de 4,6-diamidino-2-fenilindole (DAPI, *Sigma Aldrich*) durante 5 minutos à temperatura ambiente.

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



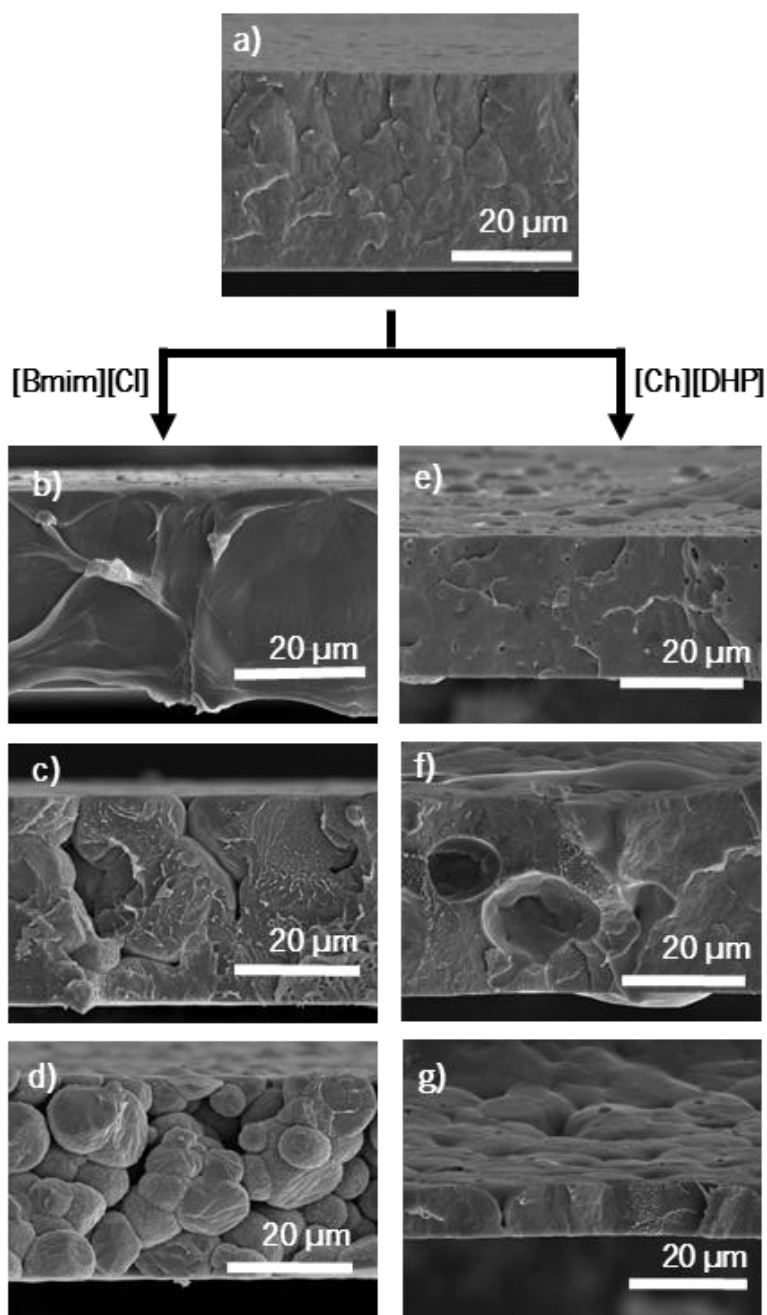
## Capítulo 4 – Resultados e Discussão

---



## 4.1 Caracterização morfológica

A morfologia dos filmes compósitos desenvolvidos foi analisada por SEM. Na Figura 4.1 encontram-se representadas as imagens de corte transversal dos filmes de PVDF e dos filmes compósitos de PVDF/[Bmim][Cl] e PVDF/[Ch][DHP] preparados com diferentes percentagens de IL (10, 20 e 40% (p/p)).



**Figura 4.1** – Imagem de SEM dos filmes a) PVDF e filmes compósitos b) PVDF/ 10% (p/p) de [Bmim][Cl], c) PVDF/20% (p/p) de [Bmim][Cl], d) PVDF/40% (p/p) de [Bmim][Cl], e) PVDF/10% (p/p) de [Ch][DHP], f) PVDF/20% (p/p) de [Ch][DHP] e g) PVDF/ 40% (p/p) de [Ch][DHP] a uma ampliação de 1500x.



O filme de PVDF (Figura 4.1a) apresenta-se homogéneo, sem poros e com uma espessura média de  $34,8 \pm 0,7 \mu\text{m}$ . Resultados similares são reportados na literatura [33,95]. É sabido que o polímero, quando processado segundo a técnica de *solvent casting* a  $210 \text{ }^\circ\text{C}$ , origina filmes sólidos, sem poros e com uma espessura média de aproximadamente  $35 \mu\text{m}$  [71].

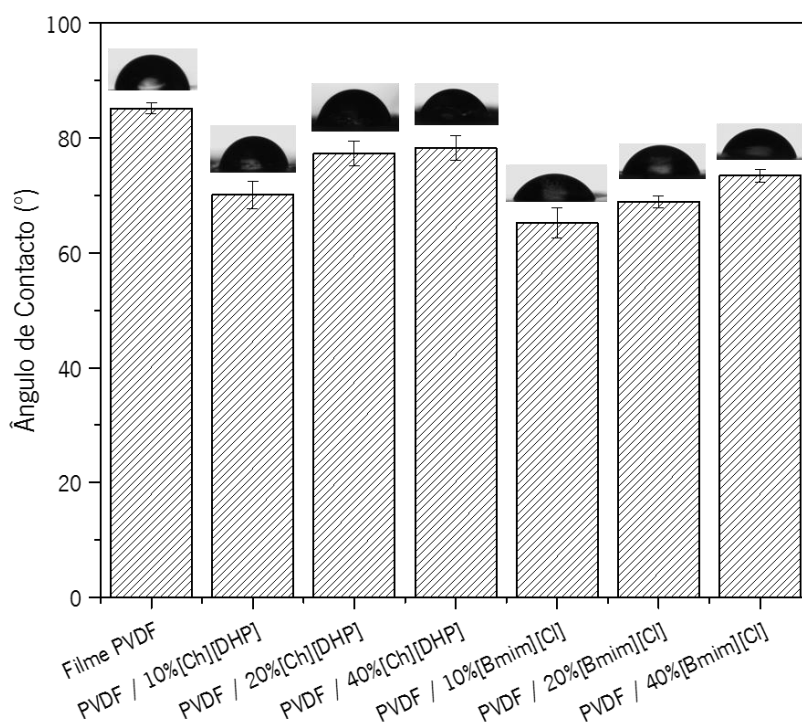
Os filmes compósitos PVDF/[Bmim][Cl] (Figura 4.1b, c e d) e PVDF/[Ch][DHP] (Figura 4.1e, f e g) apresentam-se rugosos. Na Tabela 4.1 encontram-se representados os valores de espessura média de cada filme compósito. A estrutura esferulítica do PVDF encontra-se preservada em ambos os casos, embora se verifique uma diminuição do seu tamanho [76]. Isto deve-se essencialmente a dois fatores: primeiro, os ILs atuam como agentes de nucleação, promovendo um maior número de núcleos de cristalização e, conseqüentemente, de esferulites com tamanhos reduzidos; segundo, as fortes interações eletrostáticas entre o IL e os momentos dipolares locais das cadeias poliméricas afetam fortemente a cinética de cristalização do polímero [95,96]. Quando a densidade dos núcleos de cristalização é alta, os núcleos das esferulites encontram-se muito próximos uns dos outros. Como não têm espaço para crescer livremente, dão origem a pequenas esferulites com contornos bem definidos. Estes contornos tornam-se mais evidentes com o aumento da percentagem de IL presente na matriz, tal como se pode observar na Figura 4.1d.

**Tabela 4.1** - Espessura média dos filmes compósitos PVDF/[Bmim][Cl] e PVDF/[Ch][DHP] produzidos.

	% IL (p/p)	Espessura média ( $\mu\text{m}$ )
PVDF/[Bmim][Cl]	10	$26,6 \pm 0,5$
	20	$38,0 \pm 2,0$
	40	$30,0 \pm 1,0$
PVDF/[Ch][DHP]	10	$34,8 \pm 0,8$
	20	$34,0 \pm 2,0$
	40	$35,0 \pm 3,0$

## 4.2 Avaliação da hidrofobicidade

Por forma a avaliar a molhabilidade dos filmes compósitos produzidos, avaliou-se a hidrofobicidade dos filmes compósitos produzidos através da medição dos ângulos de contacto. Os resultados obtidos dessa medição encontram-se representados na Figura 4.2.



**Figura 4.2** – Valor médio do ângulo de contacto obtido em cada amostra produzida.

Os filmes de PVDF apresentam um ângulo de contacto de  $85,2^\circ \pm 0,9^\circ$ . Este valor está de acordo com o que já existe referenciado na literatura [97].

Através dos resultados obtidos na Figura 4.2, verificou-se que a incorporação de ILs de natureza higroscópica [98] na matriz de PVDF promove a molhabilidade dos filmes, ocorrendo uma diminuição do valor de ângulo de contacto para  $70,0^\circ \pm 2,0^\circ$  nos filmes compósitos com 10% (p/p) de [Bmim][Cl] e para  $65,2^\circ \pm 2,6^\circ$  nos filmes compósitos com 10% (p/p) de [Ch][DHP]. Esta diminuição dos valores de ângulo de contacto é um indicativo de que as interações polímero-IL diminuem as interações catião-anião no IL, originando uma diminuição da tensão superficial e consequentemente uma diminuição do ângulo de contacto. Os valores de ângulos de contacto mais baixos foram obtidos para as matrizes de PVDF/[Ch][CHDP], indicando uma maior interação polímero-IL [81,99].

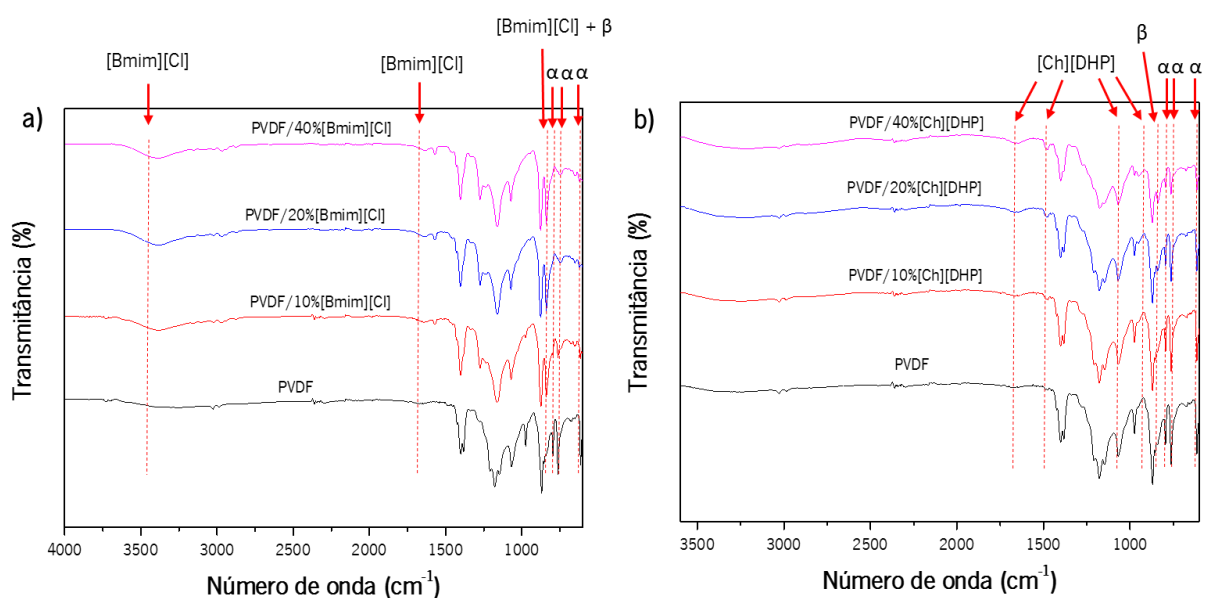
No entanto, com o aumento da concentração de [Bmim][Cl] e de [Ch][DHP] na matriz, o valor de ângulo de contacto tende a aumentar ligeiramente, observando-se um ângulo de contacto de  $78,0^\circ \pm 2,0^\circ$  nos filmes compósitos com 40% (p/p) de [Bmim][Cl] e os  $73,5^\circ \pm 1,1^\circ$  nos filmes compósitos com 40% (p/p) de [Ch][DHP], indicando que as interações polímero-IL tendem a diminuir com o aumento da concentração de IL na matriz polimérica [98,100].

### 4.3 Avaliação das propriedades físico-químicas e térmicas

Após a avaliação da morfologia e molhabilidade dos filmes compósitos produzidos, avaliaram-se as propriedades físico-químicas dos mesmos de modo a verificar se ocorreram ou não modificações na estrutura química do polímero e nas suas propriedades térmicas.

#### 4.3.1 Avaliação da fase cristalina

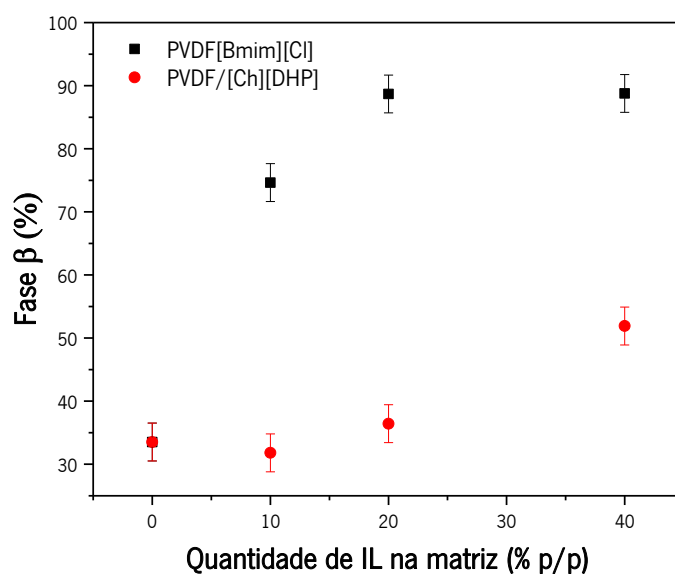
De forma a avaliar possíveis modificações na estrutura química do PVDF e determinar o grau de cristalinidade dos filmes produzidos, procedeu-se à sua caracterização por FTIR-ATR (Figura 4.3). Na Tabela 4.2 são apresentados os principais números de onda obtidos para os filmes de PVDF e filmes compósitos de PVDF/[Bmim][Cl] e PVDF/[Ch][DHP], bem como as respetivas bandas de absorção teóricas do PVDF puro.



**Figura 4.3** – Espectro de FTIR-ATR do filme de PVDF e filmes compósitos com 10, 20 e 40% (p/p) de a) PVDF/[Bmim][Cl] e b) PVDF/[Ch][DHP].

Pela análise dos resultados de FTIR verifica-se que, em ambos os casos, a estrutura polimérica não é afetada com a introdução dos diferentes ILs. Os picos característicos da fase  $\alpha$  são registados a 615, 763 e 796  $\text{cm}^{-1}$  e os da fase  $\beta$  a 840  $\text{cm}^{-1}$  [41,101]. No entanto, a intensidade de absorção de cada uma destas bandas varia com a percentagem de líquido iónico presente no filme compósito. A intensidade das bandas de absorção típicas da fase  $\alpha$  tendem a diminuir com o aumento da percentagem de IL. Contrariamente, as bandas características da fase  $\beta$  tendem a aumentar de intensidade. Não se observam a formação de novas bandas entre os ILs e a cadeia polimérica do PVDF indicando que as interações entre o IL e o polímero são eletrostáticas [76].

Para determinar a quantidade de fase  $\alpha$  e  $\beta$  presentes nos filmes compósitos recorreu-se à equação 3.1 descrita no Capítulo 3. Na Figura 4.4 são apresentadas as percentagens de fase  $\beta$  em função da quantidade de IL presente na matriz polimérica. Apesar do conteúdo de fase  $\beta$  aumentar em ambos os casos, os filmes compósitos com [Bmim][Cl] apresentam percentagens superiores aos filmes compósitos [Ch][DHP], chegando a atingir valores próximos dos 90% com 20 e 40% (p/p) de IL.



**Figura 4.4** – Fração de Fase ( $\beta$ ) em função da quantidade de IL presente na matriz polimérica (10, 20 e 40% (p/p)) de [Bmim][Cl] e [Ch][DHP].

Estudos anteriores mostraram que a presença de IL pode influenciar a cinética de cristalização do polímero, induzindo a cristalização do PVDF na fase  $\beta$  [95,102]. As fortes interações eletrostáticas entre o IL e os dipolos das cadeias de PVDF criam interações do tipo íon-dipolo que favorecem a geração de sequências *trans* características da fase  $\beta$  [43]. Este efeito foi também observado noutros trabalhos experimentais com a adição de partículas de titanato de bário [103], zeólitos [104] e ferrites de cobalto [43,96] na matriz polimérica do PVDF.

**Tabela 4.2** - Bandas de absorção características do PVDF, [Bmim][Cl] e [Ch][DHP] presentes nos filmes de PVDF e filmes compósitos.

Banda de Absorção (cm <sup>-1</sup> )	PVDF	[Bmim][Cl]	[Ch][DHP]	Ref
	(Fase $\alpha$ )			
615	CF <sub>2</sub> <i>bending</i> + vibração CCC	—	—	[41,86]
763	Fase $\alpha$	—	—	[70],[89]
796	(Fase $\alpha$ ) Vibração CH <sub>2</sub>	—	—	[106]
	(Fase $\beta$ )			
840	Vibração CH <sub>2</sub> + Estiramento assimétrico CF <sub>2</sub>	Vibração + Estiramento C-N	—	[101,107]
930	—	—	Estiramento C=O	[98]
1079	—	—	Estiramento C-N	[98]
1479	—	—	Vibração CH <sub>3</sub>	[98]
1600	—	Estiramento C=C e C=N	—	[107]
1650	—	Estiramento + Vibração OH	—	[100]
1657	—	—	v(C=O)	[108][109]
3385	—	Estiramento + Vibração OH	—	[100]

### 4.3.2 Avaliação da fusão, grau de cristalinidade e degradação térmica

Com o auxílio da técnica de DSC, efetuou-se uma caracterização térmica das amostras de PVDF e PVDF/IL para avaliar possíveis alterações nas suas propriedades físico-químicas, tal como a temperatura de fusão e o grau de cristalinidade. Na Figura 4.5 encontram-se representados os termogramas obtidos e na Tabela 4.3 sumarizados os valores de entalpia e temperatura de fusão e grau de cristalinidade das diversas amostras produzidas.

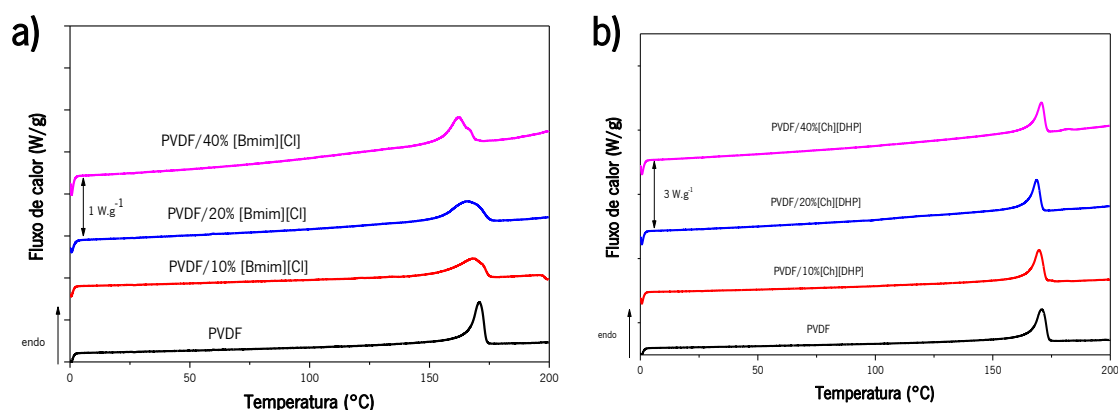


Figura 4.5 – Gráficos de DSC do filme de PVDF e filmes compostos com 10, 20 e 40 % (p/p) de a) [Bmim][Cl] e b) [Ch][DHP].

Através do termograma dos filmes de PVDF e filmes compostos (Figura 4.5) é possível observar um pico endotérmico a  $\approx 170$  °C correspondente à temperatura de fusão do polímero [33,110]. Na figura 4.5a é possível observar uma ligeira diminuição da temperatura de fusão do polímero e da área do pico de fusão com o aumento da percentagem de [Bmim][Cl] de 168,2 para 162,1 °C. Relativamente aos compostos [Ch][DHP], apesar de se observar uma diminuição da área do pico de fusão de 45,5 para 32,0 J/g, não se verificam alterações significativas na sua temperatura de fusão (esta oscila entre os 168,7 e os 170,7 °C). Independentemente do tipo de IL, verifica-se que a área do pico de fusão tende a diminuir com o aumento do conteúdo de IL, indicativo de uma diminuição do grau de cristalinidade dos materiais compostos (Figura 4.5 e Tabela 4.3). A diminuição da temperatura de fusão e do grau de cristalinidade estão relacionados, como já foi mencionado anteriormente, com as fortes interações eletrostáticas entre o IL e os dipolos da cadeia polimérica. Os ILs atuam como “defeitos” no processo cristalização do polímero dificultando o crescimento das esferulites [71,76].

O grau de cristalinidade determinado através da Equação 3.2 descrita no capítulo anterior não reflete verdadeiramente o grau de cristalinidade do polímero PVDF mas sim do compósito PVDF + IL ( $\Delta Xc1$ ). Determinou-se então o grau de cristalinidade do PVDF ( $\Delta Xc2$ ) dividindo o valor do grau de cristalinidade anteriormente obtido pela quantidade de polímero presente na amostra. Os cálculos efetuados encontram-se representados na Tabela 4.3. Verifica-se, em ambos casos, que o grau de cristalinidade do PVDF aumenta com o aumento do conteúdo de IL.

**Tabela 4.3** - Temperatura de fusão ( $T_f$ ), variação da entalpia ( $\Delta H$ ) e grau de cristalinidade ( $\Delta Xc1$ ) do compósito PVDF+IL e grau de cristalinidade do PVDF ( $\Delta Xc2$ ) para cada amostra.

Filme	% IL (p/p)	$T_f$ (°C)	$\Delta H$ (J/g)	$\Delta Xc1$ (%)	$\Delta Xc2$ (%)
PVDF	0	170,7	49,0	51,0 ± 2,0	51,0 ± 2,0
	10	168,2	45,0	45,0 ± 2,0	50,0 ± 2,0
PVDF/[Bmim][Cl]	20	165,8	42,8	41,0 ± 2,0	52,0 ± 2,0
	40	162,1	36,0	35,0 ± 2,0	58,0 ± 2,0
PVDF/[Ch][DHP]	10	169,6	45,5	47,0 ± 2,0	52,0 ± 2,0
	20	168,7	38,5	39,0 ± 2,0	49,0 ± 2,0
	40	170,7	32,0	32,0 ± 2,0	54,0 ± 2,0

Para além da caracterização térmica por DSC, os materiais foram submetidos a uma análise termogravimétrica. Na Figura 4.6 encontram-se representadas as curvas de perda de massa obtidas para os filmes de PVDF e filmes compostos [Bmim][Cl] (Figura 4.6a) e [Ch][DHP] (Figura 4.6b). Na Tabela 4.4 encontram-se sumarizadas as temperaturas iniciais de degradação (Tonset) referentes às várias amostras.

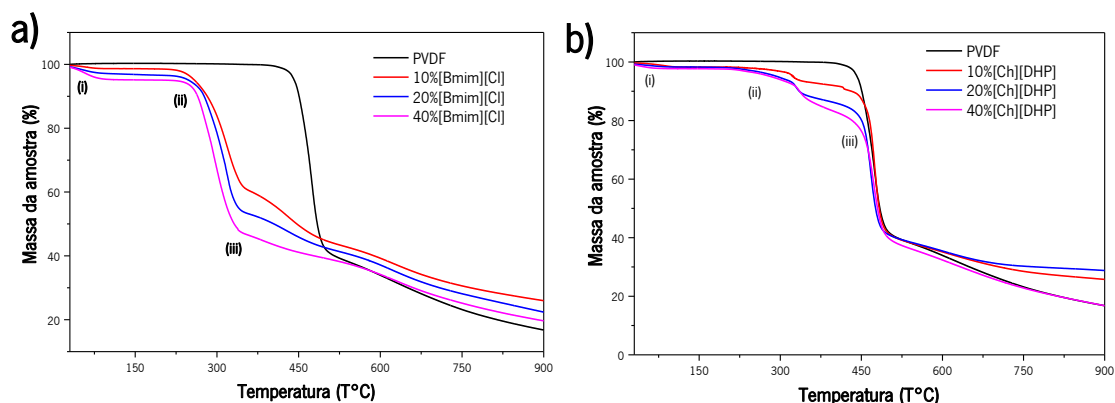


Figura 4.6 – Curvas de TGA representativas dos filmes compósitos com 10, 20 e 40% (p/p) de a) [Bmim][Cl] e b) [Ch][DHP].

O PVDF é um polímero termicamente muito estável [111], apresentando apenas um único patamar de degradação entre os 400 e 500 °C. Segundo *Botelho et al* [91], a presença de hidrogénio (H<sup>+</sup>) e flúor (F), resultante da quebra de ligações carbono-flúor (C-F) e carbono-carbono (C-C), leva à formação de HF como produto de degradação. Para além deste composto volátil, também se forma uma pequena quantidade de C<sub>4</sub>H<sub>3</sub>F<sub>3</sub>.

Analisando os termogramas obtidos, verifica-se que a temperatura de início de degradação dos compósitos PVDF/[Bmim][Cl] diminui com o aumento da percentagem de IL de 348,7 para 339,8 °C (Figura 4.6a). A introdução de [Bmim][Cl] diminui a estabilidade térmica dos compósitos. Já adição do IL [Ch][DHP] aumenta a estabilidade térmica dos compósitos, uma vez que se verifica um ligeiro aumento da temperatura de degradação térmica de 447,0 para 453,8 °C (Figura 4.6b) [112].

Tabela 4.4 - Temperatura inicial de degradação (Tonset) de cada amostra.

	% IL (p/p)	(i) Tonset (°C)	(ii) Tonset (°C)	(iii) Tonset (°C)
PVDF	0	—	437,0	—
PVDF/[Bmim][Cl]	10	43,9	232,0	348,7
	20	41,0	228,8	343,0
	40	37,6	227,0	339,8
PVDF/[Ch][DHP]	10	47,0	316,8	447,0
	20	38,8	323,5	450,2
	40	33,7	327,7	453,8



Contrariamente ao PVDF, ambos os filmes compósitos apresentam três patamares de degradação (Figura 4.6). No compósito PVDF/[Bmim][Cl], o primeiro (e menor) patamar de degradação (i) que ocorre entre os 42 e os 130 °C diz respeito à evaporação de água e degradação de impurezas presentes no IL [113]; o segundo patamar de degradação (ii) foi observado entre 228 e os 335 °C e diz respeito à degradação do próprio IL [114]; e o terceiro e último patamar (iii) acontece entre os 340 e os 500 °C e diz respeito à degradação do polímero. Formam-se HF e  $C_4H_3F_3$  como produtos de degradação.

Na compósito [Ch][DHP] observa-se, inicialmente, uma perda de massa (i) resultante da evaporação de água. Depois, por volta dos 320 e 330 °C verifica-se a existência de outro pequeno patamar de degradação (ii). Segundo *Usman et al* [112] esta perda de peso pode ser devida à desidratação do anião (DHP). A terceira etapa de degradação (iii) ocorreu entre os 450 e os 500 °C onde ocorre a degradação do polímero, onde se formam HF e  $C_4H_3F_3$  como produtos de degradação.

### 4.3. Medidas de condutividade elétrica

Mediram-se as curvas de intensidade de corrente – voltagem (I-V) por forma a determinar o valor da condutividade elétrica. Na Figura 4.7a e 4.7b encontram-se representadas as curvas I-V dos compósitos [Bmim][Cl] e [Ch][DHP] com diferentes concentrações.

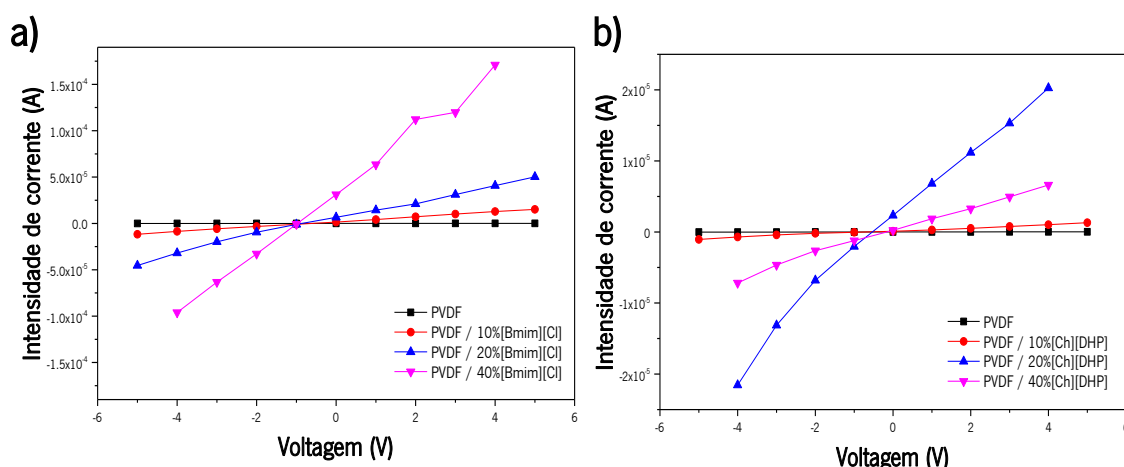
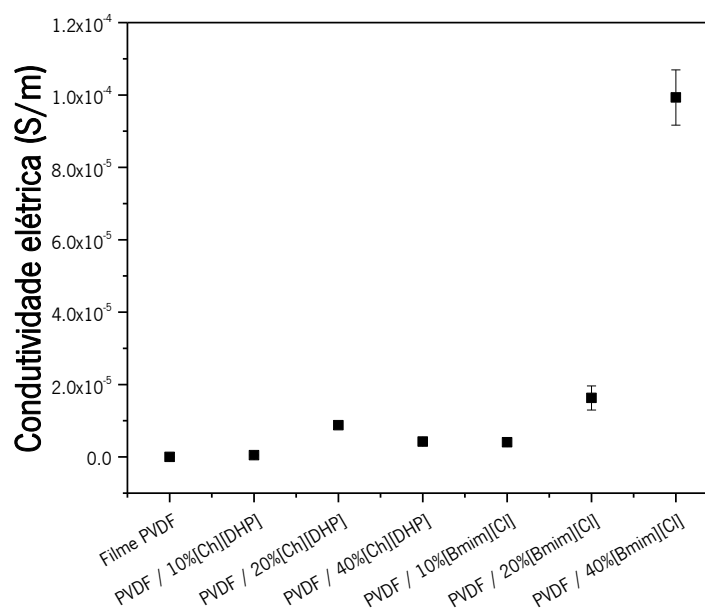


Figura 4.7 – Curvas I-V para o compósito polimérico a) [Bmim][Cl] e b) [Ch][DHP] a diferentes concentrações (10, 20 e 40% (p/p)).

Sabendo a resistividade volúmica de cada um dos materiais (Equação 3.3) determinou-se a sua condutividade elétrica através da Equação 3.4. Os resultados obtidos encontram-se esquematizados na Figura 4.8.



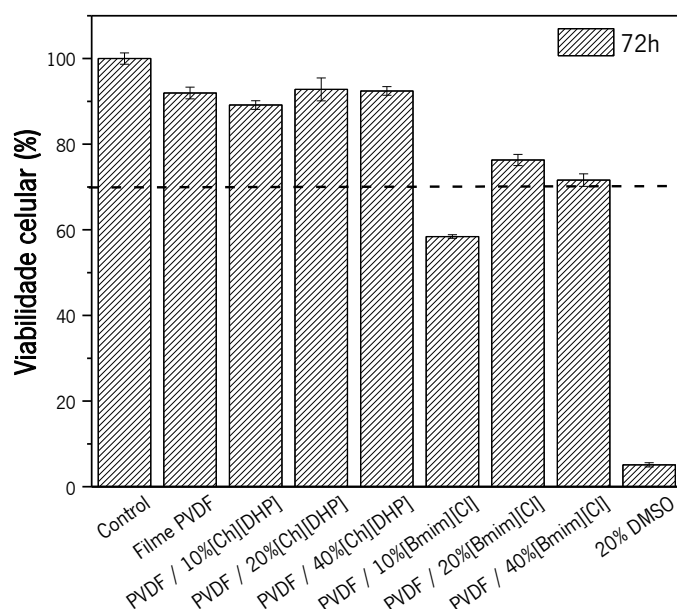
**Figura 4.8** – Valores de condutividade elétrica dos filmes PVDF e filmes compósitos [Bmim][Cl] e [Ch][DHP] a diferentes concentrações (10, 20 e 40% (p/p)).

Através da figura 4.8 é possível visualizar que, em ambos os casos, a adição de IL aumenta a condutividade elétrica dos materiais em comparação com a matriz polimérica pura [76,115]. Tal facto deve-se ao aumento do número de espécies iónicas presentes [116]. Nos compósitos [Bmim][Cl], a condutividade elétrica aumenta com o aumento da quantidade de IL presente de  $4,06 \times 10^{-6}$  para  $9,93 \times 10^{-5}$  S/m. Nos compósitos [Ch][DHP], a condutividade elétrica tende a aumentar ligeiramente chegando a atingir o seu valor máximo com 20% (p/p) de IL –  $8,76 \times 10^{-6}$  S/m.

O IL com maior condutividade – o [Bmim][Cl] – deu origem ao filme compósito com maior condutividade elétrica: o filme compósito PVDF/40% (p/p) [Bmim][Cl] apresenta uma condutividade elétrica de  $9,93 \times 10^{-5}$  S/m. No entanto, os filmes compósitos [Bmim][Cl] e [Ch][DHP] apresentam valores de condutividade elétrica inferiores ao IL puro, uma vez que, os iões encontram-se aprisionados na matriz polimérica do PVDF e não se difundem tão facilmente.

#### 4.4 Avaliação da citotoxicidade

A citotoxicidade dos filmes compósitos foi avaliada através de ensaios de viabilidade celular em células mioblásticas de ratinho (linha C2C12). As células foram sujeitas a um ensaio MTS ao fim de 72 h de contacto. Os resultados obtidos encontram-se representados na Figura 4.9. Para este ensaio foram utilizados um controlo positivo (20% DMSO), de morte celular, e um negativo, que representa o crescimento celular em condições padrão, ao qual se fez corresponder 100% de viabilidade celular



**Figura 4.9**– Ensaio de viabilidade celular com as células C2C12 após 72h em contacto com meio exposto aos filmes PVDF e filmes compósitos com diferentes concentrações de liquido iónico (10, 20 e 40% (p/p) [Bmim][Cl] e [Ch][DHP].

De acordo com a norma 10993-5, apenas são consideradas citotóxicas as amostras que apresentem uma viabilidade celular abaixo dos 70% [35].

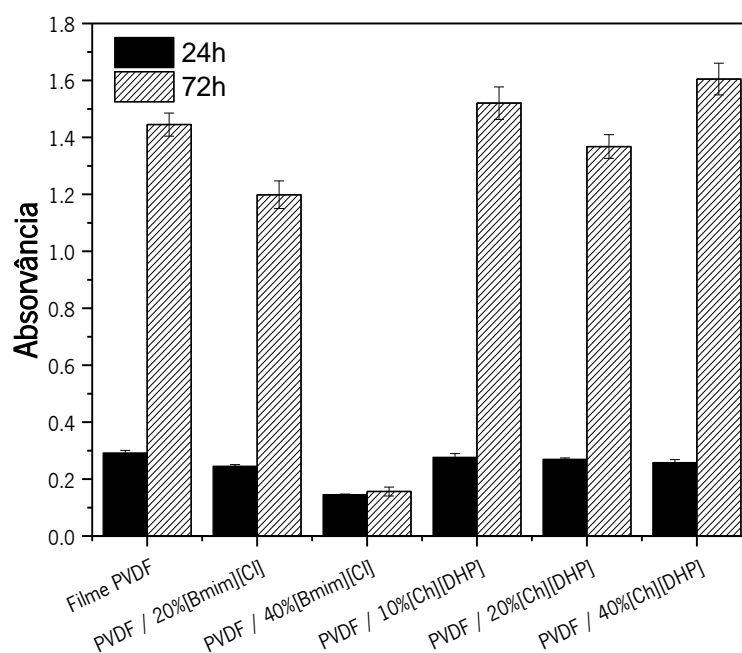
Pela análise do histograma (Figura 4.9) verifica-se, que todos os compósitos, à exceção do 10% (p/p) [Bmim][Cl], não são citotóxicos para as células C2C12. As células expostas ao meio que esteve anteriormente em contacto com os filmes compósitos PVDF/10% (p/p) [Bmim][Cl] exibem uma viabilidade celular de 58,4% ao fim de 72 h. Tal facto não seria expectável uma vez que ambos os ILs são biocompatíveis.

Dias *et al*/[33] verificou que o IL, quando presente em pequenas quantidades, encontra-se na superfície do filme polimérico. Tal facto pode ser um indicativo de uma possível reação que ocorre entre o anião Cl<sup>-</sup> e os grupos H<sup>+</sup> existentes no meio de cultura, dando origem a um composto ácido, o ácido clorídrico, caracterizado como um ácido fraco, de acordo com a caracterização de ácidos e bases.

Assim sendo, pode-se afirmar que estes biomateriais produzidos são bons candidatos para serem utilizados em engenharia de tecido muscular.

#### 4.5 Avaliação da proliferação celular

De forma a avaliar o seu efeito na proliferação celular, as amostras foram sujeitas a um ensaio de MTS ao fim de 24 e 72 h de cultura em condições estáticas (sem aplicação de estímulos mecânicos ou elétricos). Os resultados obtidos encontram-se representados na Figura 4.10.

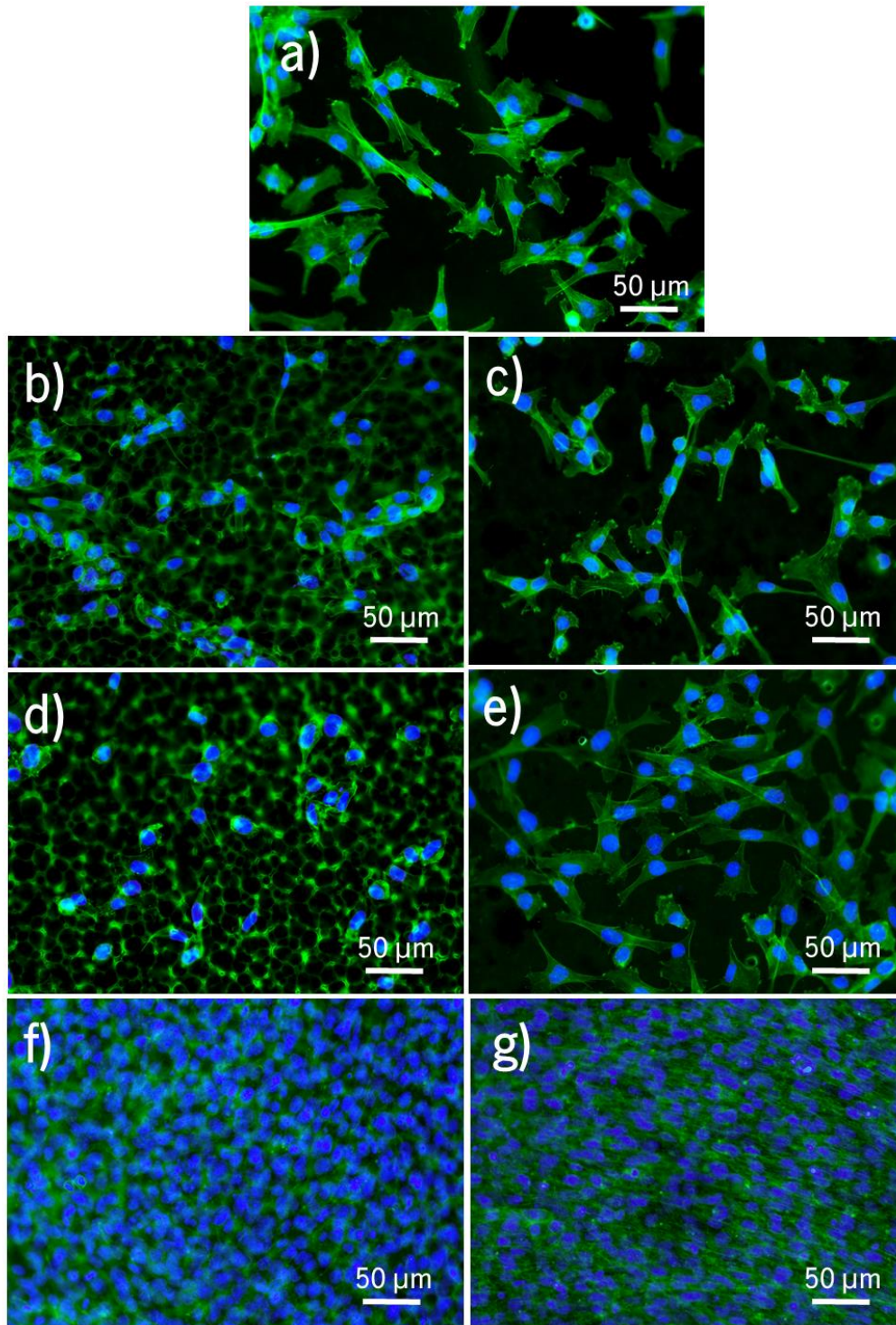


**Figura 4.10** – Proliferação celular de mioblastos C2C12 cultivados em filmes de PVDF e filmes compósitos PVDF/[Bmim][Cl] e PVDF/[Ch][DHP] com diferentes quantidades de líquido iónico (10, 20 e 40% (p/p)) após 24 e 72 h de cultura em condições estáticas.

Pela análise da Figura 4.10, é possível comprovar que a taxa de proliferação celular aumentou das 24 para as 72 h em todos os filmes compósitos. Este aumento não foi tão pronunciado nos filmes compósitos com 40% (p/p) [Bmim][Cl], uma vez que não se verificaram diferenças significativas entre as 24 e as 72 h. A taxa de proliferação celular nos compósitos [Bmim][Cl] diminui com o aumento de IL incorporado na matriz polimérica. Relativamente aos filmes compósitos PVDF/[Ch][DHP], estes apresentam taxas de proliferação celular superiores aos filmes compósitos baseados em [Bmim][Cl]. O filme compósito com 40% (p/p) de [Ch][DHP] é o que apresenta a maior taxa de proliferação celular quando comparado com os restantes filmes compósitos e com o filmes de PVDF puro.

A molhabilidade e o grau de cristalinidade desempenham um papel importante na adesão e proliferação celular. Atendendo ao facto que todos os materiais apresentam valores de ângulo de contacto similares, o aumento da proliferação celular pode dever-se ao grau de cristalinidade e a consequentes variações no módulo de elasticidade dos materiais [117]. De facto, tal como foi possível observar na Tabela 4.3, os filmes compósitos de PVDF/[Ch][DHP] são os que apresentam um aumento do grau de cristalinidade do PVDF com o aumento da percentagem de IL incorporado na matriz polimérica, promovendo uma maior proliferação celular. Resultados similares foram obtidos com filmes de poli (caprolactona)/poli (ácido glicólico) (PCL/PGA) [118].

Recorreu-se também a ensaios de imunocitoquímica para avaliar a adesão e a morfologia celular. O núcleo dos mioblastos foi marcado com DAPI (azul) e o citoesqueleto de actina com faloidina-FITC (verde). Na Figura 4.11 é possível observar a morfologia celular após 24 h e 72 h e confirmar, em conjunto com os resultados obtidos na Figura 4.10, que as células aderiram e proliferaram em todas as amostras. Os mioblastos apresentam-se alongados, com um citoesqueleto pequeno e já com alguma orientação definida.



**Figura 4.11** – Ensaio de imunocitoquímica em mioblastos C2C12 cultivados em a) filmes de PVDF e filmes compósitos b) PVDF/20% (p/p) [Bmim][Cl], c) PVDF/20% (p/p) [Ch][DHP], d) PVDF/40% (p/p) [Bmim][Cl] e e) PVDF/40% (p/p) [Ch][DHP] após 24 h de cultura em condições estáticas. Filmes compósitos f) PVDF/20% (p/p) [Bmim][Cl] e g) PVDF/40% (p/p) [Ch][DHP] após 72h. O núcleo dos mioblastos foi marcado com DAPI (azul) e o citoesqueleto de actina com faloidina-FITC (verde).



## Capítulo 5 – Conclusões

---





No presente trabalho, foram desenvolvidos filmes compósitos PVDF/[Bmim][Cl] e PVDF/[Ch][DHP] com diferentes concentrações de IL (10, 20 e 40% p/p) para regeneração de tecido muscular. Os filmes compósitos foram avaliados ao nível das suas propriedades morfológicas, físico-químicas e térmicas. A sua potencialidade como *scaffolds* para engenharia de tecidos foi avaliada através de ensaios de citotoxicidade e proliferação celular.

A introdução de [Bmim][Cl] e de [Ch][DHP] na matriz polimérica afeta o processo de cristalização do polímero. As imagens de SEM demonstraram que a estrutura esferulítica do PVDF encontra-se preservada em ambos os casos, embora se verifique uma diminuição do seu tamanho. Os ILs atuam como agentes de nucleação, promovendo um maior número de núcleos de cristalização e, conseqüentemente, de esferulites com tamanhos reduzidos.

Através dos resultados obtidos, verificou-se que a incorporação dos ILs [Bmim][Cl] e de [Ch][DHP] na matriz de PVDF promove a molhabilidade dos filmes, ocorrendo uma diminuição do valor de ângulo de contacto para  $70,0^\circ \pm 2,0^\circ$  nos filmes compósitos com 10% de [Bmim][Cl] e para  $65,2^\circ \pm 2,6^\circ$  nos filmes compósitos com 10% de [Ch][DHP].

Pela análise dos espectros de absorção obtidos por FTIR, demonstrou-se que os ILs não alteram a estrutura química do PVDF. No entanto, promovem um aumento do conteúdo da fase eletroativa  $\beta$ . Tal facto, deve-se às fortes interações eletrostáticas entre o IL e os dipolos das cadeias de PVDF que favorecem a geração de sequências *trans* características da fase  $\beta$ . Os filmes com ILs apresentam melhores propriedades piezoelétricas que os filmes de PVDF puro.

Pelas caracterizações térmicas efetuadas, verificou-se uma ligeira diminuição da temperatura de fusão do polímero de 168,2 para 162,1°C com o aumento da percentagem de [Bmim][Cl]. Relativamente aos compósitos [Ch][DHP], não se verificam alterações significativas na temperatura de fusão do polímero. O grau de cristalinidade dos filmes compósitos diminui com o aumento da concentração dos ILs, [Bmim][Cl] e [Ch][DHP]. A diminuição da temperatura de fusão e do grau de cristalinidade estão relacionados, com as fortes interações eletrostáticas entre o IL e os dipolos da cadeia polimérica.

A introdução de [Bmim][Cl] diminui a estabilidade térmica dos compósitos. Contrariamente, a adição do líquido iónico [Ch][DHP] aumenta a estabilidade térmica dos compósitos, uma vez que se verifica um ligeiro aumento da temperatura de degradação térmica de 447,0 para 453,8 °C.

Através das medidas de condutividade, concluiu-se que a adição de IL aumenta a condutividade elétrica dos materiais em comparação com matriz polimérica pura. O filme compósito PVDF/40% [Bmim][Cl] é o que apresenta o valor de condutividade elétrica mais elevado -  $9,93 \times 10^{-5} \text{ S/m}$ .

Os ensaios de citotoxicidade demonstraram que todos os compósitos, à exceção do 10% [Bmim][Cl], não são citotóxicos para as células C2C12. Uma possível reação química entre os grupos (Cl) do IL e os grupos (H<sup>+</sup>) existentes no meio de cultura poderá estar na origem de formação de um composto ácido, logo citotóxico para as células.

Os ensaios de proliferação e imunocitoquímica mostraram que as células C2C12 aderiram e proliferaram em todas as amostras. As amostras mais cristalinas, filmes compósitos PVDF/[Ch][DHP], são as que apresentam taxas de proliferação celular mais elevadas. Os mioblastos apresentam-se alongados, com um citoesqueleto pequeno e já com alguma orientação definida.

Todos os resultados demonstraram a potencialidade dos filmes compósitos PVDF/[Bmim][Cl] e PVDF/[Ch][DHP] como suporte celular para aplicações em regeneração muscular.

## 5.1 Sugestões para trabalhos futuros

Todos os objetivos delineados nesta dissertação de mestrado foram cumpridos, sendo, simultaneamente, proposta uma nova e promissora estratégia com aplicabilidade em engenharia de tecido muscular. Desde modo, sugerem-se os seguintes trabalhos futuros:

- realizar ensaios mecânicos e piezoresistivos (variação da resistência elétrica com a deformação aplicada) às amostras produzidas;
- proceder a ensaios de proliferação celular e diferenciação celular em condições dinâmicas (ex: aplicação de estímulos mecânicos e/ou elétricos durante os cultivos); utilizar os filmes compósitos desenvolvidos para estudos em diferentes tipos celulares, como por exemplo em células ósseas e neuronais;
- testar a potencialidade dos filmes compósitos como atuadores.

## Capítulo 6 – Bibliografía

---



- [1] R. Langer, J. P. Vacanti, "Tissue Engineering" Science, New Series, Vol. 260 (1993), pp. 920-926.
- [2] C. Ribeiro, V. Sencadas, D. M. Correia, S. Lanceros-Mendez, "Piezoelectric polymers as biomaterials for tissue engineering Applications", Colloids Surf B Biointerfaces, vol. 136 (2015) pp. 46 – 55.
- [3] T. H. Qazi, D. J. Mooney, M. Pumberger, S. Geißler, G. N. Duda, "Biomaterials based strategies for skeletal muscle tissue engineering: Existing technologies and future trends", Biomaterials, vol. 53 (2015), pp. 502–521.
- [4] F. J. O'Brien, "Biomaterials & scaffolds for tissue engineering", Materials Today, vol 14 (2011) pp. 88–95.
- [5] J. M. Karp, P. D. Dalton, M. S. Shoichet, "Scaffolds for Tissue Engineering», (2003).
- [6] M. Maciel, "Desenvolvimento e otimização de estruturas condutoras de base polimérica para engenharia de tecidos", Tese de Mestrado em Biofísica e Bionanossistemas, Escola de Ciências, Universidade do Minho, (2016).
- [7] B. M. Carlson, "Human Embryology and Developmental Biology", (2014).
- [8] R. Santos, "Síntese de materiais poliméricos para regeneração de tecido muscular", Dissertação de Mestrado em Engenharia Biomédica, Faculdade de Ciências e Tecnologias, Universidade de Coimbra, (2010).
- [9] B. J. Kwee, D. J. Mooney, "Biomaterials for skeletal muscle tissue engineering", Current Opinion in Biotechnology , vol. 47 (2017) pp. 16–22.
- [10] W. Yang, P. Hu, "Skeletal muscle regeneration is modulated by inflammation», Journal of Orthopaedic Translation, (2018).
- [11] M. D. P. Silva, R. F. Carvalho, "Mecanismos celulares e moleculares que controlam o desenvolvimento e o crescimento muscular", Revista Brasileira de Zootecnia, vol. 36, (2007).
- [12] A. R. Gillies, R. L. Lieber, "Structure and function of the skeletal muscle extracellular matrix", Muscle & Nerve, (2011).

[13] B. Kasukonis, "Scaffold and Tissue Based Therapies to Improve Skeletal Muscle Regeneration After Volumetric Muscle Loss", Degree of Doctor of Philosophy in Engineering", University of Arkansas, (2016).

[14] L. P. Simões, "Alteração das fibras musculares esqueléticas com o exercício aeróbio", Dissertação de Mestrado em Patologia Experimental", Faculdade de Medicina, Universidade de Coimbra, (2009).

[15] R. B. Sher, G. A. Cox, C. Ackert-Bicknell, "Chapter 2.5: Development and Disease of Mouse Muscular and Skeletal Systems ", The Laboratory Mouse (2012).

[16] S. Naahidi, M. Jafari, M. Logan, Y. Wan, Y. Yuan, H. Bae, B. Dixon, P.Chen, "Biocompatibility of hydrogel-based scaffolds for tissue engineering applications", *Biotechnology Advances*, vol. 35, (2017).

[17] P. M. Martins, S. Ribeiro, C.Ribeiro, V. Sencadas, A. C. Gomes, F. M. Gama, S. Lanceros-Mendez, "Effect of poling state and morphology of piezoelectric poly(vinylidene fluoride) membranes for skeletal muscle tissue engineering", *RSC Advances* , vol. 3 (2013).

[18] C. Ribeiro, D. M. Correia, S. Ribeiro, V. Sencadas, G. Botelho, S. Lanceros-Mendez, "Piezoelectric poly(vinylidene fluoride) microstructure and poling state in active tissue engineering", *Engineering in Life Sciences*, vol 15 (2015) pp. 351–356.

[19] C. Ribeiro, "Processing and characterization of piezoelectric polymers for tissue engineering applications", Tese de Doutoramento, Escola de Ciências, Universidade do Minho, 2012.

[20] M. R. Singh, S. Patel, D. Singh, "Chapter 9: Natural polymer-based hydrogels as scaffolds for tissue engineering", *Nanobiomaterials in Soft Tissue Engineering*, (2016).

[21] G. Chen, T. Ushida, T. Tateishi, "Scaffold design for tissue engineering", *Macromolecular. Bioscience*, (2002), pp. 67–77.

[22] J. Nunes-Pereira, S. Ribeiro, C. Ribeiro, C. J. Gombek, F. M. Gama, A. C. Gomes, D. A. Patterson, S. Lanceros-Mendez, "Poly (vinylidene fluoride) and copolymers as porous membranes for tissue engineering applications", *Polymer Testing*, vol. 44 (2015) pp. 234–241.

[23] K. Anselme, L. Ploux, A. Ponche, "Cell/Material Interfaces : Influence of Surface Chemistry and Surface Topography on Cell Adhesion", *Journal of Adhesion Science and Technology* 24, (2010).

[24] J. Parssinen, H. Hammarén, R. Rahikainen, V. Sencadas, C. Ribeiro, S. Vanhatupa, S. Miettinen, S. Lanceros-Méndez, V. P. Hytonen, " Enhancement of adhesion and promotion of osteogenic differentiation of human adipose stem cells by poled electroactive poly(vinylidene fluoride ", *J Biomed Mater Res Part A*, (2014).

[25] D. Correia, "Three dimensional scaffolds based on electroactive polymers for tissue engineering applications", *Tese de Doutoramento em Engenharia de Materiais, Escola de Engenharia, Universidade do Minho*, (2015).

[26] D. Correia, "Desenvolvimento de membranas de quitosano para libertação controlada de fármacos", *Tese de Mestrado em Técnicas de Caracterização e Análise Química, Escola de Ciências, Universidade do Minho*, (2011).

[27] V. F. Cardoso, C. Ribeiro, S. Lanceros-Mendez, "Metamorphic biomaterials", *Bioinspired Materials for Medical Applications*, (2017).

[28] R. Vaz, "Preparação de scaffolds por combinação das técnicas de fotopolimerização e electrospinning para engenharia de tecidos", *Dissertação de Mestrado Integrado em Engenharia Química, Faculdade de Ciências e Tecnologias, Universidade de Coimbra*, (2016).

[29] B. E. Pollot, C. R. Rathbone, J. C. Wenke, T. Guda, "Natural polymeric hydrogel evaluation for skeletal muscle tissue engineering", (2017).

[30] C. Liu, Z. Xia, J. T. Czernuszka, "Design and development of three-dimensional scaffolds for tissue engineering", *Trans IChemE, Part A, Chemical Engineering Research and Design*, (2007).

[31] J. F. Mano, "Polímeros inteligentes em aplicações biomédicas", *Química* 126 (2012), pp. 27 – 31.

[32] A.C. Lopes, P. Martins, S. Lanceros-Mendez, "Polímeros piezoelétricos: características, aplicações, perspetivas", *Gaz. Física*, vol. 37.



- [33] J. C. Dias, M. S. Martins, S. Ribeiro, M. M. Silva, J. M. S. S. Esperança, C. Ribeiro, G. Botelho, C. M. Costa, S. Lanceros-Mendez, "Electromechanical actuators based on poly(vinylidene fluoride) with [N1 1 1 2(OH)][NTf2] and [C2mim] [C2SO4]", *J. Mater. Sci.*, vol. 51 (2016).
- [34] V.F. Cardoso, "Sistema de fluxo acústico de base polimérica para aplicações microfluídicas", Programa Doutoral em Engenharia Biomédica, Escola de Engenharia, Universidade do Minho (2012).
- [35] C.Ribeiro, J. Parssinen, V. Sencadas, V. Correia, S. Miettinen, V. P. Hytonen, S. Lanceros-Méndez "Dynamic piezoelectric stimulation enhances osteogenic differentiation of human adipose stem cells ", *J Biomed Mater Res Part A*, (2014).
- [36] C. Ribeiro, S. Moreira, V. Correia, V. Sencadas, J.G. Rocha, F. M. Gama, J. L. Gomez Ribelles, S. Lanceros-Mendez, "Enhanced proliferation of pre-osteoblastic cells by dynamic piezoelectric stimulation", *RSC Adv* (2012).
- [37] Y. Lee, G. Collins, T. L. Arinzeh, "Neurite extension of primary neurons on electrospun piezoelectric scaffolds", *Acta Biomaterialia*, (2011).
- [38] R. Gregorio Jr, R. C. Capitão, "Morphology and phase transition of high melt temperature crystallized poly (vinylidene fluoride)", *Journal of Materials Science* 35 (2000), pp. 299–306.
- [39] M. G. Broadhurst, G. T. Davis, J. E. McKinney, "Piezoelectricity and pyroelectricity in polyvinylidene fluoride—A model M", *EJB Electronic Journal of Biotechnology*, (2000).
- [40] P. Martins, A. C. Lopes, S. Lanceros-Mendez, "Electroactive phases of poly (vinylidene fluoride): Determination , processing and applications", *Progress in Polymer Science*, vol. 39 (2014), pp. 683–706.
- [41] R. Gregorio Jr, "Determination of the  $\alpha$ ,  $\beta$ , and  $\gamma$  crystalline phases of poly(vinylidene fluoride) films prepared at different conditions", *Journal of Applied Polymer Science*, vol. 100 (2006), pp. 3272–3279.
- [42] R. M. S. Magalhães. " Desenvolvimento de poli (fluoreto de vinilideno) poroso na fase beta para aplicações biomédicas. Tese de Mestrado em Física: Formação Contínua de Professores. Escola de Ciências da Universidade do Minho, 2009.

- [43] P. Martins, C. M. Costa, M. Benelmekki, G. Botelho, S. Lanceros-Mendez, "On the origin of the electroactive poly(vinylidene fluoride)  $\beta$ -phase nucleation by ferrite nanoparticles via surface electrostatic interactions", *CrystEngComm*, vol. 14 (2012), pp. 2807–2811.
- [44] L. Ruan, X. Yao, Y. Chang, L. Zhou, G. Qin, X. Zhang, "Properties and Applications of the  $\beta$  Phase Poly(vinylidene fluoride)", *Polymers* (2018).
- [45] J. Wang, J. Luo, S. Feng, H. Li, Y. Wan, X. Zhang, "Recent development of ionic liquid membranes", *Green Energy & Environment* (2016), pp. 43–61.
- [46] Y. Fukaya, Y. Iizuka, K. Sekikawa, H. Ohno, "Bio ionic liquids: room temperature ionic liquids composed wholly of biomaterials", *Green Chemistry* (2007), pp. 1155–1157.
- [47] L. C. Branco, "Líquidos iónicos: aplicações e perspectivas futuras", *Química* 139 (2015).
- [48] C. Verma, E. E. Ebenso, C. Verma, E. E. Ebenso, M.A. Quraishi, "Chapter 6 - Ionic Liquids as Green Corrosion Inhibitors for Industrial Metals and Alloys", (2018).
- [49] I. Noshadi, B. W. Walker, R. Portillo-lara, E. S. Sani, N. Gomes, M. R. Aziziyan, N. Annabi, "Engineering Biodegradable and Biocompatible Bio-ionic Liquid Conjugated Hydrogels with Tunable Conductivity and Mechanical Properties", *Scientific Reports* (2017).
- [50] C. Krause, J. R. Sangoro, C. Jacob, F. Kremer, "Charge Transport and Dipolar Relaxations in Imidazolium-Based Ionic Liquids", *J. Phys. Chem. B* (2010), pp. 382–386.
- [51] B. Clare, A. Sirwardana, D. R. MacFarlane, "Synthesis, Purification and Characterization of Ionic Liquids", *Topics in Current Chemistry* (2009), pp. 1-40.
- [52] C. Jangu, T. E. Long, "Phosphonium cation-containing polymers: From ionic liquids to polyelectrolytes", *Polymer*, (2014).
- [53] M. J. C. Neto, "Aplicações eletroquímicas de eletrólitos baseados em líquidos iónicos", *Dissertação de Mestrado em Técnicas de Caracterização e Análise Química*, Escola de Ciências, Universidade do Minho,(2013).
- [54] B. L. Gadilohar, G. S. Shankarling, "Choline based ionic liquids and their applications in organic transformation", *Journal of Molecular Liquids*, vol. 227 (2017), pp. 234–261.

[55] L. Gontrani, E. Scarpellini, R. Caminiti, M. Campetella, "Bio ionic liquids and water mixtures: a structural study", RSC Advances (2017).

[56] J. Dias, "Development of ionic electroactive polymers for artificial muscle applications", Tese de Doutoramento em Ciências Especialidade em Química, Escola de Ciências, Universidade do Minho, (2017).

[57] R. Hayes, G. G. Warr, R. Atkin, "Structure and Nanostructure in Ionic Liquids", Chemical Reviews, (2015).

[58] N. Terasawa, "High-performance ionic and non-ionic fluoropolymer/ionic liquid gel hybrid actuators based on single-walled carbon nanotubes", RSC Advances (2017).

[59] J. H. Jeon, R. K. Cheedarala, C. D. Kee, I. K. Oh, "Dry-type artificial muscles based on pendent sulfonated chitosan and functionalized graphene oxide for greatly enhanced ionic interactions and mechanical stiffness", Advance Functional Materials, (2013).

[60] Y. Liu, M. Ghaffari, R. Zhao, J. H. Lin, M. Lin, Q. M. Zhang, "Enhanced electromechanical response of ionic polymer actuators by improving mechanical coupling between ions and polymer matrix", Macromolecules, vol. 45 (2012), pp. 5128–5133.

[61] A. Simaite, F. Mesnilgrete, B. Tondu, P. Souères, C. Bergaud, "Towards inkjet printable conducting polymer artificial muscles", Sensors Actuators B: Chemical, vol. 229 (2016), pp. 425–433.

[62] K. Mukai, K. Asaka, K. Kiyohara, T. Sugino, I. Takeuchi, T. Fukushima, T. Aida, "High performance fully plastic actuator based on ionic-liquid-based bucky gel", Electrochimica Acta 53, (2008).

[63] A. Chinnappan, H. Kim, "Transition metal based ionic liquid (bulk and nanofiber composites) used as catalyst for reduction of aromatic nitro compounds under mild conditions", RSC Advances, (2013).

[64] S. Yeon, K. Kim, S. Choi, J. Cha, H. Lee, "Characterization of PVdF ( HFP ) Gel Electrolytes Based on 1- ( 2-Hydroxyethyl ) -3-methyl Imidazolium Ionic Liquids", Journal of Physics Chemistry B, (2005).

[65] S. Imaizumi, Y. Kato, H. Kokubo, M. Watanabe, "Driving mechanisms of ionic polymer actuators having electric double layer capacitor structures", *Journal of Physics Chemistry B*, (2012).

[66] L. He, J. Sun, X. Wang, C. Wang, R. Song, Y. Hao, "Facile and effective promotion of  $\beta$  crystalline phase in poly(vinylidene fluoride) via the incorporation of imidazolium ionic liquids", *Polym. Int.*, (2013).

[67] A. Mehta, J. R. Rao, N. N. Fathima, "Effect of ionic liquids on the different hierarchical order of type I collagen", *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, vol. 117 (2014), pp. 376–382.

[68] W. Hong, C. Meis, J. R. Heflin, R. Montazami, "Evidence of counterion migration in ionic polymer actuators via investigation of electromechanical performance", *Sensors and Actuators B: Chemical*, vol. 205 (2014), pp. 371–376.

[69] Q. Li, H. Ardebili, "Flexible thin-film battery based on solid-like ionic liquid-polymer electrolyte", *Journal of Power Sources*, vol. 303 (2016), pp. 17–21.

[70] C. Xing, J. Guan, Z. Chen, Y. Zhu, B. Zhang, Y. Li, J. Li, "Novel multifunctional nanofibers based on thermoplastic polyurethane and ionic liquid: Towards antibacterial, anti-electrostatic and hydrophilic nonwovens by electrospinning", *Nanotechnology*, (2015).

[71] J. C. Dias, A. C. Lopes, B. Magalhães, G. Botelho, M. M. Silva, J.M.S.S. Esperança, S. Lanceros-Mendez, "High performance electromechanical actuators based on ionic liquid/poly(vinylidene fluoride)", *Polymer Testing*, vol. 48 (2015), pp. 199–205.

[72] E. Thomas, C. Parvathy, N. Balachandran, S. Bhuvaneswari, K. P. Vijayalakshmi, B. K. George, "PVDF-ionic liquid modified clay nanocomposites: Phase changes and shish-kebab structure", *Polymer*, (2017).

[73] C. Bagdahn, A. Taubert, "Ionogel Fiber Mats: Functional Materials via Electrospinning of PMMA and the Ionic Liquid Bis(1-butyl-3-methyl-imidazolium) Tetrachloridocuprate(II), [Bmim]<sub>2</sub>[CuCl<sub>4</sub>]", *Zeitschrift für Naturforschung - Section A Journal of Physical Sciences*, (2013).

[74] R. Leones, F. Senatnin, L. C. Rodrigues, I.M. Marrucho, J.M.S.S. Esperança, A. Pawlicka, M. M. Silva, "Investigation of polymer electrolytes based on agar and ionic liquids", *Express Polymer Letters*, vol. 6, (2012).

- [75] C. Xing, M. Zhao, L. Zhao, J. You, X. Cao, Y. Li, "Ionic liquid modified poly(vinylidene fluoride): Crystalline structures, miscibility, and physical properties", *Polymer Chemistry*, vol. 4 (2013), pp. 5726–5734.
- [76] R. Mejri, J. C. Dias, S. B. Hentati, M. S. Martins, C. M. Costa, S. Lanceros-Mendez, "Effect of anion type in the performance of ionic liquid/poly(vinylidene fluoride) electromechanical actuators", *Journal of Non-Crystalline Solids*, (2016).
- [77] A. Ribeiro, "Desenvolvimento de métodos para a determinação da atividade antivirica em diferentes suportes", Tese de Mestrado em Engenharia Biológica, Escola de Engenharia, Universidade do Minho, (2013).
- [78] A. Rodrigues, "Desenvolvimento de magnetolipossomas baseados em nanopartículas de níquel com coroa de sílica para aplicações na entrega de fármacos antitumorais", Tese de Mestrado em Biofísica e Bionanossistemas, Escola de Ciências, Universidade do Minho, (2012).
- [79] H. Figueiredo, "Reutilização Catalítica de Biossorbentes Suportados em Zeólitos", Tese de Mestrado em Biotecnologia - Engenharia de Bioprocessos, Escola de Engenharia, Universidade do Minho, (2007).
- [80] P. Martins, "Produção e caracterização de nanopartículas magnéticas para aplicação biotecnológica", Tese de Mestrado em Micro e Nanotecnologias, Escola de Engenharia, Universidade do Minho, (2011).
- [81] Y. Yuan, T. R. Lee, "Contact Angle and Wetting Properties", (2013).
- [82] J. M. Schuster, C. E. Schvezov, M. R. Rosenberger, "Influence of Experimental Variables on the Measure of Contact Angle in Metals Using the Sessile Drop Method", *Procedia Materials Science*, vol n.8 (2015), pp. 742–751.
- [83] K.L.Mittal, "Contact Angle, Wettability and Adhesion", (1993).
- [84] A. Salimi, A. A. Yousefi, "FTIR studies of  $\beta$ -phase crystal formation in stretched PVDF films", *Polymer Testing*, vol. 22 (2003), pp. 699–704.
- [85] W. M. Doyle, "Principles and Applications of Fourier Transform Infra- red ( FTIR ) Process Analysis".

[86] J. F. Mano, A. M. Costa, V. H. Schmidt, J. F. Mano, A. M. Costa, V. H. Schmidt, "FTIR and DSC studies of mechanically deformed  $\beta$ -PVDF films", *Journal of Macromolecular Science*, (2001).

[87] A. Gregorova, "Application of Differential Scanning Calorimetry to the Characterization of Biopolymers", (2013).

[88] V. Sencadas, "Influência das condições de processamento na morfologia e fases cristalinas do PVDF e nas transições de fase do copolímero P(VDF-TrFE)", *Dissertação de Mestrado - Processamento e Caracterização de Materiais, Escola de Engenharia, Universidade do Minho*, (2005).

[89] R. Gonçalves, "Desenvolvimento de nanocompósitos poliméricos de PVDF / Zeólitos para aplicações tecnológicas", *Tese de Mestrado em Técnicas de Caracterização de Análise Química, Escola de Ciências, Universidade do Minho*, (2011).

[90] K. J. MacKenzie, O. M. Dunens, A.T. Harris, "Insights into carbon nanotube growth using an automated gravimetric apparatus" *Carbon*, vol.59 (2013) , pp. 344-365.

[91] 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  $\beta$ -phase", *Journal of Non-Crystalline Solids*, (2008).

[92] João P. N. Pereira, "Efeito piezoresistivo em polímeros condutores em substrato flexível", *Tese de Mestrado em Física, Escola de Ciências da Universidade do Minho*, (2009).

[93] P. F. R da Costa, " Estudo das propriedades mecânicas, elétricas e térmicas do compósito poli (fluoreto de vinilideno)/ nanotubos de carbono", *Tese de Mestrado em Física dos Materiais Avançados, Escola de Ciências, Universidade do Minho*, (2009).

[94] 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*, vol. 140 (2016), pp. 430–436.

[95] R. Mejri, J. C. Dias, A. C. Lopes, S. Hentati, M. M. Silva, G. Botelho, A. Mão de Ferro, J. M. S. S. Esperança, A. Macieiras, J. M. Laza, J.L. Vilas, L.M. León, S. Lanceros-Mendez, "Effect of ionic liquid anion and cation on the physico-chemical properties of poly(vinylidene fluoride)/ionic liquid blends", *European Polymer Journal*, vol. 71 (2015), pp. 304–313.

- [96] 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)", (2011).
- [97] S. Huang, H. Chen, "Study on the Improvement of Hydrophobicity of PVDF Films", (2011).
- [98] A. Cortez, "Development and characterization of chitosan and N - carboxybutylchitosan based materials doped with biocompatible ionic liquids for application as stimuli-responsive biopolymers", Tese de Mestrado em Engenharia Biomédica, Faculdade de Ciências e Tecnologias, Universidade de Coimbra.
- [99] C. Xing, J. Guan, Y. Li, J. Li, "Effect of a Room-Temperature Ionic Liquid on the Structure and Properties of Electrospun Poly(vinylidene fluoride) Nanofibers", ACS Applied Materials and Interfaces, vol. 6 (2014), pp. 4447–4457.
- [100] N. Kotov, A. Sturcova, A. Zhigunov, V. Raus, J. Dybal, "Structural Transitions of 1 - Butyl-3-methylimidazolium Chloride/ Water Mixtures Studied by Raman and FTIR Spectroscopy and WAXS", (2016).
- [101] X. Cai, T. Lei, D. Sun, L. Lin, "A critical analysis of the  $\alpha$ ,  $\beta$  and  $\gamma$  phases in poly(vinylidene fluoride) using FTIR", RSC Advances, vol. 7 (2017), n. 25, pp. 15382–15389.
- [102] Y. Zhu, C. Li, B. Na, R. Lv, B. Chen, J. Zhu, "Polar phase formation and competition in the melt crystallization of poly (vinylidene fluoride) containing an ionic liquid", (2014).
- [103] S. F. Mendes, C. M. Costa, C. Caparros, V. Sencadas, S. Lanceros-Méndez, "Effect of filler size and concentration on the structure and properties of poly(vinylidene fluoride)/BaTiO<sub>3</sub> nanocomposites", Journal of Materials Science, vol. 47 (2012), pp. 1378–1388.
- [104] A. C. Lopes, R. Gonçalves, C. M. Costa, A. M. Fonseca, G Botelho, I. C. Neves, S. Lanceros-Méndez, "Effect of Zeolite Content in the Electrical, Mechanical and Thermal Degradation Response of Poly(vinylidene fluoride)/NaY Zeolite Composites", Nanoscience and Nanotechnology, (2012).

[105] A. Biswas, K. Henkel, D. Schmeißer, D. Mandal, "Comparison of the thermal stability of the  $\alpha$ ,  $\beta$  and  $\gamma$  phases in poly ( vinylidene fluoride ) based on in situ thermal Fourier transform infrared spectroscopy", (2017).

[106] I. N. Bhatti, M. Banerjee, I. N. Bhatti, "Effect of Annealing and Time of Crystallization on Structural and Optical Properties of PVDF Thin Film Using Acetone as Solvent", *Journal of Applied Physics*, vol n.4 (2013), pp. 42–47.

[107] S. A. Dharaskar, M. N. Varma, D. Z. Shende, C. K. Yoo, K. L. Wasewar, "Synthesis, Characterization and Application of 1-Butyl-3 Methylimidazolium Chloride as Green Material for Extractive Desulfurization of Liquid Fuel", (2013).

[108] K. Fujita, R. Macfarlane, M. Forsyth, "Protein solubilising and stabilising ionic liquids", (2005).

[109] P. Barbosa, J. Campos, A. Turygin, V. Shur, A. Kholkin, A. Barros-Timmons, F. M. Figueiredo, "Piezoelectric poly(lactide) stereocomplexes with a cholinium organic ionic plastic crystal", *Journal of Materials Chemistry C*, (2017).

[110] A. C. Lopes, J. Gutiérrez, J. M. Barandiarán, "Direct fabrication of a 3D-shape film of polyvinylidene fluoride (PVDF) in the piezoelectric  $\beta$ -phase for sensor and actuator applications", *European Polymer Journal*, (2018).

[111] L. Francisco, C. Langiano, J. Manoel, M. Cordeiro, I. Solteira, "Thermal and Mechanical Properties of PVDF / PANI Blends",(2010).

[112] U. A. Rana, P. M. Bayley, R. Vijayaraghavan, P. Howlett, D. R. Macfarlane, M. Forsyth, "Proton transport in choline dihydrogen phosphate/H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> mixtures", *Physical Chemistry Chemical Physics*, (2010).

[113] V. Kamavaram, R. G. Reddy, "Thermal stabilities of di-alkylimidazolium chloride ionic liquids", *International Journal of Thermal Sciences*, vol. 47 (2008), pp. 773–777.

[114] S. Ismail, N. Mansor, Z. Man, "A Study on Thermal Behaviour of Thermoplastic Starch Plasticized by [Emim] Ac and by [Emim]Cl", *Procedia Engineering*, vol. 184 (2017), pp. 567–572.



[115] V. Sencadas, S. Lancers-Mendez, R. Sabater i Serra, A. Balado, J. L. Gomez Ribelles, "Relaxation dynamics of poly (vinylidene fluoride) studied by dynamical mechanical measurements and dielectric spectroscopy", *The European Physical Journal*, (2012).

[116] R. Leones, C. M. Costa, A. V. Machado, J. M. S. S. Esperança, M. M. Silva, S. Lancers-Méndez, "Development of solid polymer electrolytes based on poly(vinylidene fluoride-trifluoroethylene) and the [N1 1 1 2(OH)][NTf2] ionic liquid for energy storage applications", *Solid State Ionics*, vol. 253 (2013), pp. 143–150.

[117] K. Gilmore, M. Kit, Y.Han, A. Gelmi, M. Higgins, S. Moulton, G. Clark, R. Kapsa, G. Wallace, "Skeletal muscle cell proliferation and differentiation on polypyrrole substrates doped with extracellular matrix components", *Biomaterials* ,(2009).

[118] H. Cui, P. J. Sinko, "The role of crystallinity on differential attachment/proliferation of osteoblasts and fibroblasts on poly (caprolactone-co-glycolide) polymeric surfaces", (2012).