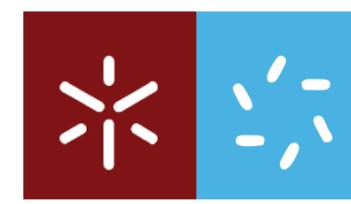




Desenvolvimento de *scaffolds* poliméricos padronizados para aplicação em engenharia de tecidos

Teresa Isabel Marques de Almeida

UMinho | 2018



Universidade do Minho
Escola de Ciências

Teresa Isabel Marques de Almeida

Desenvolvimento de *scaffolds* poliméricos padronizados para aplicação em engenharia de tecidos

Janeiro de 2018



Universidade do Minho
Escola de Ciências

Teresa Isabel Marques de Almeida

Desenvolvimento de *scaffolds* poliméricos padronizados
para aplicação em engenharia de tecidos

Dissertação de Mestrado

Mestrado em Biofísica e Bionanossistemas

Trabalho efetuado sob a orientação do

Professor Doutor Filipe Vaz

e da

Doutora Vanessa Cardoso

Janeiro 2018

DECLARAÇÃO

Nome: Teresa Isabel Marques de Almeida

Endereço eletrónico: teresaalmeida20@hotmail.com **Telefone:** +351935963832

Cartão de Cidadão: 14593668

Título da dissertação: Desenvolvimento de *scaffolds* poliméricos padronizados para aplicação em engenharia de tecidos.

Orientadores:

Professor Doutor Filipe Vaz

Doutora Vanessa Fernandes Cardoso

Ano de conclusão: 2018

Mestrado: Biofísica e Bionossistemas

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

À minha mãe,

Agradecimentos

A realização deste trabalho só foi possível com o apoio e disponibilidade de diversas pessoas, pelo que não poderia deixar de expressar o meu profundo agradecimento.

Aos meus orientadores Professor Doutor Filipe Vaz, por toda a disponibilidade fornecida no decorrer do presente trabalho, e Doutora Vanessa Cardoso, por todo o apoio, orientação científica, incentivo, dedicação e conhecimento que me forneceu, essenciais para a realização desta dissertação de mestrado. Também ao Doutor Senentxu Lanceros Méndez, pela oportunidade concedida em integrar este fantástico grupo, por toda a disponibilidade, transmissão de conhecimento e pelo incentivo contínuo que fornece a cada um de nós.

Ao Departamento de Física da Escola de Ciências desta Universidade, pela disponibilização das instalações. Ao Laboratório de Micro/Nanotecnologias e Aplicações Biomédicas do Departamento de Eletrónica Industrial da Universidade do Minho, pela disponibilização dos equipamentos de microfabricação e ao laboratório de Revestimentos Funcionais III da mesma Universidade, pela disponibilização do equipamento de tratamento por plasma.

A todo o grupo *Eletroactive Smart Materials*, pelo bom ambiente, pela ajuda que sempre me prestaram e pelo espírito de equipa evidente. Particularmente, à Clarisse e à Sylvie agradeço pelo tempo e apoio disponibilizados no decorrer do presente trabalho.

Aos meus amigos e à minha família, que direta ou indiretamente contribuíram para que conseguisse manter a determinação e a força que muitas vezes me faltou para conseguir chegar até aqui. Em especial à Bea e à Estela, por estarem sempre comigo, por me ajudarem, apoiarem e darem ânimo quando os momentos não foram os melhores. Essencialmente pela amizade e carinho incondicionais.

The last but not the least, gostaria de agradecer e reconhecer a importância que o Fábio teve no decorrer deste trabalho, sem ele não teria conseguido chegar até aqui. Por tudo o que já fez por mim, por todo o apoio e amor que me deu nos momentos mais difíceis de todos, mas também por todo o incentivo, determinação e todas as alegrias que frequentemente me dá, um muito obrigada.

Resumo

A engenharia de tecidos dispõe de princípios multidisciplinares que se unem para restabelecer a arquitetura dos tecidos e/ou dos órgãos alterados, patologicamente ou por esforço. Esta ciência recorre a estratégias que mimetizam o ambiente celular natural, influenciando o comportamento das células que irão reconstituir o tecido danificado. Essas estratégias englobam o processamento de biomateriais utilizados como suportes celulares, designados como *scaffolds*. Sabe-se que as células reagem aos microambientes nos quais estão inseridas, o que faz com que a utilização de *scaffolds* microestruturados sejam um elemento essencial para o estudo da regeneração de tecidos.

A presente tese demonstra o processamento de *scaffolds* poliméricos de poli(fluoreto de vinilideno-co-trifluoretileno) (P(VDF-TrFE)) de superfície microestruturada, com morfologia porosa e não porosa, recorrendo a técnicas de fotolitografia e moldagem por réplica. Foram processados *scaffolds* com topografias de superfície do tipo “linhas”, “linhas intermitentes”, “hexagonais”, “zigzagues lineares” e “zigzagues curvos” com dimensões de 25 µm, 75 µm e 150 µm. Após processamento, os materiais foram caracterizados por análises morfológicas e físico-químicas. Com estas caracterizações confirmou-se que a obtenção das topografias de superfície foi efetuada com sucesso e que as diferentes morfologias dos *scaffolds* não alteraram as propriedades intrínsecas do material.

Pelos ensaios de adesão efetuados foi possível idealizar quais os *scaffolds* mais apropriados para a regeneração de cada um dos tipos celulares em estudo. *Scaffolds* do tipo “linhas”, “linhas intermitentes”, “zigzagues lineares” e “zigzagues curvos” demonstraram promover o direcionamento, alongamento e posicionamento paralelo das células de mioblastos, que são essenciais para a posterior fusão em miotubos durante ensaios de diferenciação. Deste modo, apresentaram o seu grande potencial na regeneração de tecido muscular-esquelético. Por sua vez, mesmo tendo os pré-osteoblastos o mesmo comportamento com a variação da topografia, analisando o microambiente ósseo, é possível propor a hipótese de que os *scaffolds* mais apropriados serão os que possuem estruturas mais anisotrópicas. Como tal, os *scaffolds* “hexagonais” e “zigzagues curvos”, de morfologia porosa, serão os que possuem maior potencial para favorecer o crescimento de tecido ósseo.

Comprovou-se, efetivamente, que as diferentes topografias e morfologias influenciam a modulação celular de diferentes linhas celulares, e que os *scaffolds* fabricados serão uma mais-valia na engenharia de diversos tecidos.

Abstract

Tissue engineering is based on multidisciplinary principles, which as combined for restitution of pathologic or defective tissues and organs. Tissue engineering uses different strategies to mimic the cellular natural environment, influencing cells behavior. These strategies are mainly based on the processing of biomaterials used as cellular supports, named scaffolds. It is known that the cells react to the microenvironments in which they are placed, and therefore, the use of microstructured scaffolds is essential for the study of tissue regeneration.

The present work shows the processing of polymeric, porous and non-porous, microstructured P(VDF-TrFE) through photolithography and replica molding. Scaffolds were processed with different surface topographies named as "lines", "intermittent lines", "hexagonal", "linear zigzags" and "curved zigzags" with 25 μm , 75 μm and 150 μm . The scaffolds were characterized in terms of morphology and physicochemical analysis. It was confirmed that the different morphologies were successfully obtained and that the different morphologies of the scaffolds did not alter the intrinsic properties of the material.

Adhesion assays allowed to assess which scaffolds are suitable for specific regeneration type. "Lines", "intermittent lines", "linear zigzags" and "curved zigzags" scaffolds promote orientation, elongation and parallel positioning of myoblast cells, essential for subsequent fusion in myotubes during differentiation assays, thus presenting their large potential in the regeneration of skeletal muscle tissue. Although pre-osteoblasts show similar behavior on different topographies, it is possible to propose the hypothesis that scaffolds with more anisotropic porous morphologies, such as "hexagonal" and "curved zigzags", will be the ones with the largest potential to promote the growth of bone tissue.

Thus, it has been proven that different topographies and morphologies do influence cellular modulation of different cell lines and that the manufactured scaffolds will be an added value in different tissues engineering strategies.

ÍNDICE

AGRADECIMENTOS.....	V
RESUMO.....	VII
ABSTRACT	IX
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	XIII
LISTA DE FIGURAS	XV
LISTA DE TABELAS	XIX
1. INTRODUÇÃO	1
1.1. CONTEXTUALIZAÇÃO	3
1.2. MOTIVAÇÃO E OBJETIVOS.....	4
1.3. ESTRUTURA DA DISSERTAÇÃO	6
2. ENQUADRAMENTO	7
2.1. ENGENHARIA DE TECIDOS	9
2.2. <i>SCAFFOLDS</i> : DEFINIÇÃO E CONCEITOS GERAIS	15
2.3. BIOMATERIAIS: DEFINIÇÃO E CONCEITOS GERAIS	17
2.4. MICROESTRUTURAS DE SUPERFÍCIE.....	24
2.5. TÉCNICAS DE MICROFABRICAÇÃO DE <i>SCAFFOLDS</i> PARA ENGENHARIA DE TECIDOS.....	25
2.6. ESTADO DA ARTE	28
3. MATERIAIS E MÉTODOS	33
3.1. PROCEDIMENTO GERAL DA PRODUÇÃO DOS <i>SCAFFOLDS</i>	35
3.2. FABRICO DOS MOLDES EM SU-8	36
3.3. FABRICO DOS MOLDES EM POLIDIMETILSILOXANO	41
3.4. FABRICO DOS <i>SCAFFOLDS</i> PADRONIZADOS DE POLI(FLUORETO DE VINILIDENO- <i>CO</i> -TRIFLUORETILENO)	44
3.5. POLARIZAÇÃO ELÉTRICA DOS <i>SCAFFOLDS</i> POR DESCARGA DE CORONA	46
3.6. ENSAIOS DE ADESÃO CELULAR	47
3.7. TÉCNICAS DE CARACTERIZAÇÃO.....	49
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	57
4.1. ANÁLISE ESTRUTURAL E MORFOLÓGICA	59
4.2. ANÁLISE DA HIDROFOBICIDADE DE SUPERFÍCIE	66
4.3. ANÁLISE DAS PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS	67
4.4. ANÁLISE DA ADESÃO CELULAR ÓSSEA E MUSCULAR AOS <i>SCAFFOLDS</i> DESENVOLVIDOS	72
5. CONCLUSÃO	87
5.1. PERSPETIVAS FUTURAS	91

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... 93

Lista de abreviaturas e siglas

	Designação
2D	Bidimensional
3D	Tridimensional
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ATR	Reflexão total atenuada (do inglês <i>attenuated total reflection</i>)
BSE	Elétrões retrodifundidos
CAD	Desenho computadorizado (do inglês <i>computer aided design</i>)
DAPI	Dihidrocloreto de 4'-6diamidino-2-finilindole
DMEM	Meio modificado MEM (do inglês <i>Dulbecco's modified Eagles's medium</i>)
DMF	Dimetilformamida
DSC	Calorimetria diferencial de varrimento (do inglês <i>differential scanning calorimetry</i>)
EBSD	Elétrões retrodifundidos difratados (do inglês <i>diffracted backscattered electrons</i>)
ETD	Detetor Everhart-Thornley (do inglês <i>Everhart-Thornley detector</i>)
FTIR	Espetroscopia de infravermelhos com transformada de Fourier (do inglês <i>Fourier transform infrared spectroscopy</i>)
GBL	Gama-butirolactona
HA	Hidroxiapatite
hMSC	Células estaminais mesenquimais humanas (do inglês <i>human mesenchymal stem cells</i>)
IPA	Álcool Isopropílico
IV	Infravermelhos
MEC	Matriz extracelular
P/E	Penicilina/estreptomicina
P(VDF-TrFE)	Poli(fluoreto de vinilideno- <i>co</i> -trifluoretileno)
P(VDF-HFP)	Poli(fluoreto de vinilideno- <i>co</i> -hexafluoropropileno)
PBS	Tampão fosfato salino
PDMS	Polidimetilsiloxano
PHB	Polihidroxibutirato
PLGA	Poli(ácido láctico- <i>co</i> -glicólico)
PS	Poliestireno
PVDF	Poli(fluoreto de vinilideno)

Designação

rpm	Rotações por minuto
SE	Elétrões secundários (do inglês <i>secondary electrons</i>)
SEM	Microscopia eletrônica de varrimento (do inglês <i>scanning electron microscopy</i>)
SFB	Soro Fetal Bovino
SU-8	Éter glicídico de bisfenol A
TGA	Termogravimetria
TRITC	Tetrametilrodamina
UV	Ultravioleta
XRD	Difração de raios-X (do inglês X-ray diffraction)

Lista de figuras

Figura 1.1: Diagrama representativo dos passos efetuados ao longo do presente trabalho.	5
Figura 2.1: Tríade da Engenharia de Tecidos.....	9
Figura 2.2: Representação ilustrativa dos diferentes tipos de células ósseas. Adaptado de [20].	11
Figura 2.3: Imagem representativa da organização das fibras musculares. Adaptado de [19]...	14
Figura 2.4: Imagem representativa da relação desejada entre as células e os <i>scaffolds</i> . Adaptado de [36].	15
Figura 2.5: Representação esquemática do efeito piezoelétrico: a) direto e b) inverso.	20
Figura 2.6: Estrutura química do PVDF.	21
Figura 2.7: Representação gráfica das cadeias de α - e β -PVDF. Adaptado de [11].	22
Figura 2.8: Representação gráfica do copolímero P(VDF-TrFE). Adaptado de [48].	22
Figura 3.1: Representação gráfica das diferentes etapas para o fabrico dos <i>scaffolds</i> de P(VDF-TrFE).	35
Figura 3.2: Representação esquemática do processamento de SU-8.	38
Figura 3.3: Representação esquemática do processamento de PDMS.	42
Figura 3.4: Câmara de descarga de corona utilizada para polarização das amostras.....	47
Figura 3.5: Diagrama representativo das possíveis interações de uma gota com uma superfície sólida, demonstrada pelo seu ângulo de contacto. Adaptado de [107].	51
Figura 3.6: Equipamento de medição de ângulo de contacto utilizado.	52
Figura 3.7: Equipamento de DSC utilizado.	54
Figura 3.8: Equipamento de TGA utilizado.	55
Figura 3.9: Equipamento d_{33} -meter utilizado para a medição do coeficiente piezoelétrico d_{33}	55
Figura 4.1: Imagens obtidas por estereomicroscopia referentes à topografia tipo “linhas”, nos diferentes estágios de processamento. Escala apresentada: 200 μm .	59
Figura 4.2: Imagens obtidas por estereomicroscopia referentes à topografia tipo “linhas intermitentes”, nos diferentes estágios de processamento. Escala apresentada: 200 μm .	60
Figura 4.3: Imagens obtidas por estereomicroscopia referentes à topografia tipo “hexagonais”, nos diferentes estágios de processamento. Escala apresentada: 200 μm .	60
Figura 4.4: Imagens obtidas por estereomicroscopia referentes à topografia tipo “zigzagues	

lineares”, nos diferentes estágios de processamento. Escala apresentada: 200 μm	61
Figura 4.5: Imagens obtidas por estereomicroscopia referentes à topografia tipo “zigzagues curvos”, nos diferentes estágios de processamento. Escala apresentada: 200 μm	61
Figura 4.6: Imagens SEM de P(VDF-TrFE) “controlo”.....	63
Figura 4.7: Imagens SEM de P(VDF-TrFE) com topografia tipo “hexagonais”.....	63
Figura 4.8: Imagens SEM de P(VDF-TrFE) com topografia tipo “linhas”.....	64
Figura 4.9: Ângulos de contacto dos <i>scaffolds</i> de P(VDF-TrFE) não porosos.	66
Figura 4.10: Ângulos de contacto dos <i>scaffolds</i> de P(VDF-TrFE) porosos.....	67
Figura 4.11: Espetros de FTIR-ATR representativos dos <i>scaffolds</i> de P(VDF-TrFE) porosos e não porosos.	68
Figura 4.12: Curvas de DSC representativas dos <i>scaffolds</i> de P(VDF-TrFE) porosos e não porosos, com a representação endotérmica no sentido ascendente.	69
Figura 4.13: Curvas de TGA representativas dos <i>scaffolds</i> de P(VDF-TrFE) poroso e não poroso.	70
Figura 4.14: Imagens obtidas por imunofluorescência de mioblastos C2C12 e de pré-osteoblastos MC3T3-E1, sobre <i>scaffolds</i> de P(VDF-TrFE) não padronizados (“controlo”).....	72
Figura 4.15: Imagens obtidas por imunofluorescência de mioblastos C2C12 sobre <i>scaffolds</i> de P(VDF-TrFE) com dimensões de 150 μm	74
Figura 4.16: Imagens obtidas por imunofluorescência de mioblastos C2C12 sobre <i>scaffolds</i> de P(VDF-TrFE) de morfologia não porosa e com topografia do tipo “linhas”, com focagem à sua superfície e profundidade.....	75
Figura 4.17: Imagens obtidas por imunofluorescência de células pré-osteoblásticas MC3T3-E1 sobre <i>scaffolds</i> com dimensões de 150 μm	76
Figura 4.18: Imagens obtidas por imunofluorescência de células mioblásticas C2C12 sobre <i>scaffolds</i> com topografia de superfície tipo “hexagonais”.....	77
Figura 4.19: Imagens obtidas por imunofluorescência de células mioblásticas C2C12 sobre <i>scaffolds</i> com topografia de superfície tipo “linhas”.....	79
Figura 4.20: Imagens obtidas por imunofluorescência de células pré-osteoblásticas MC3TE-E1 sobre <i>scaffolds</i> com topografia de superfície tipo “hexagonais”.	81
Figura 4.21: Imagens obtidas por imunofluorescência de células pré-osteoblásticas MC3T3-E1 sobre <i>scaffolds</i> com topografia de superfície tipo “linhas”.	82
Figura 4.22: Imagens obtidas por SEM de mioblastos C2C12 em <i>scaffolds</i> de P(VDF-TrFE) tipo “hexagonais” e “linhas”, com morfologia não porosa e porosa.	83

Figura 4.23: Imagens obtidas por SEM de pré-osteoblastos MC3T3-E1 em *scaffolds* de P(VDF-TrFE) tipo “hexagonais” e “linhas”, com morfologia não porosa e porosa. 85

Lista de tabelas

Tabela 2.1: Exemplos de polímeros sintéticos e naturais utilizados para o desenvolvimento de <i>scaffolds</i>	18
Tabela 2.2: Apresentação de resultados selecionados, dedicados à regeneração músculo-esquelética e óssea, relevantes para o presente estudo.....	28
Tabela 3.1: Desenhos das diferentes matrizes geométricas em AutoCAD.....	36
Tabela 3.2: Parâmetros utilizados no 2º ciclo de <i>spin-coating</i> , tendo em conta as diferentes espessuras de SU-8 desejadas.....	39
Tabela 3.3: Parâmetros utilizados no pré-aquecimento, tendo em conta as diferentes espessuras de SU-8.....	39
Tabela 3.4: Tempos de exposição à radiação UV, tendo em conta as diferentes espessuras de SU-8.....	40
Tabela 3.5: Parâmetros utilizados no pós-aquecimento, tendo em conta as diferentes espessuras de SU-8.....	41
Tabela 3.6: Tempos necessários de revelação, tendo em conta as diferentes espessuras de SU-8.....	41
Tabela 4.1: Valores teóricos e experimentais da espessura dos moldes em SU-8 e das dimensões das topografias de superfície dos <i>scaffolds</i> produzidos.....	62
Tabela 4.2: Valores médios e respetivos desvios-padrão dos tamanhos dos poros presentes à superfície dos <i>scaffolds</i> de P(VDF-TrFE) porosos.....	65
Tabela 4.3: Coeficientes $ d_{33} $ correspondentes às amostras “controlo”, porosas e não porosas, após respetiva polarização.....	71

1. INTRODUÇÃO

1.1. Contextualização

A perda/disfunção de um órgão ou tecido ainda é um problema para o qual os serviços médicos têm demoradas e poucas respostas. É possível enumerar estratégias que permitem ao paciente ter uma melhor qualidade de vida, como é o caso das próteses, terapias farmacológicas e transplantes. Contudo, como desvantagens inerentes estão a falta de doadores compatíveis, a transmissão de doenças e a alta suscetibilidade para infeções e rejeição [1]. Deste modo, a engenharia de tecidos surge como alternativa ou complementação a estas estratégias.

De facto, a engenharia de tecidos visa a regeneração de tecidos perdidos através da integração de sistemas ao nível celular. Estes sistemas são constituídos por biomateriais sólidos designados como *scaffolds* e têm como principal função fornecer às células um suporte que permita mimetizar a matriz extracelular (MEC) e, conseqüentemente, ajudar no seu crescimento e diferenciação. Existem diversos biomateriais passíveis de serem utilizados como *scaffolds* e como característica imprescindível está a sua biocompatibilidade.

Os biomateriais de origem natural, tais como, o colagénio, o quitosano e a hidroxiapatite (HA) são muito utilizados na engenharia de tecidos [2-5]. Embora apresentem vantagens, como a baixa possibilidade de rejeição por possuírem estruturas semelhantes às moléculas existentes nos órgãos biológicos, serem extraídos de fontes renováveis e passíveis de deterem locais de adesão celular, os mesmos podem provocar problemas como infeções e rejeições causadas pela sua origem e pela possibilidade de conterem impurezas patológicas. Para além disto, as suas propriedades mecânicas são pouco versáteis [6].

Como alternativa a este tipo de biomateriais, a comunidade científica tem dado ênfase à utilização de biomateriais sintéticos, especialmente aos polímeros sintéticos, por possuírem propriedades adaptáveis e facilmente reprodutíveis a baixo custo [7]. Mais recentemente surgiram os materiais inteligentes e funcionais, que rapidamente ganharam o seu lugar na investigação da engenharia de tecidos. Nomeadamente os polímeros eletroativos, são muito utilizados no desenvolvimento de *scaffolds*. Este tipo de *scaffolds* não desempenha apenas um papel estrutural ou passivo, mas tem igualmente um papel funcional nos sistemas aos quais são integrados. Influenciando ativamente o crescimento e diferenciação celular, através da recriação de estímulos presentes no ambiente natural *in vivo*, estes *scaffolds* permitem a mimetização mais fidedigna do ambiente celular natural. Para além disso, os materiais poliméricos detêm vantagens como o fácil controlo de processamento, a possibilidade de biodegradabilidade, as

boas propriedades mecânicas e o baixo custo [8].

Dentro da classe dos polímeros eletroativos encontram-se os polímeros piezoelétricos, como é o caso do poli(fluoreto de vinilideno) (PVDF) e seus copolímeros, do poli(L-ácido láctico) (PLLA), do poli(ácido láctico-co-glicólico) (PLGA) e do polihidroxibutirato (PHB), por exemplo. Os polímeros piezoelétricos são capazes de converter energia elétrica em energia mecânica, e vice-versa, apresentando-se como *scaffolds* bastante promissores [9]. O PVDF pode encontrar-se sobre a forma de 5 fases cristalinas, nomeadamente β , α , δ , γ e ϵ sendo que a fase β é aquela que apresenta a melhor resposta eletroativa [10]. Deste modo, aquando o desenvolvimento de *scaffolds* de PVDF, é essencial ter em conta a necessidade de dispor a sua estrutura na fase eletroativa β . De forma facilitar este processo, é muito utilizado o seu copolímero poli(fluoreto de vinilideno-co-trifluoretileno) (P(VDF-TrFE)), já que a sua conformação apresenta-se sempre em fase tipo β seja qual for o método de processamento [11].

Para além do material do qual é constituído, existem diversos fatores que podem influenciar de forma significativa o desempenho de um *scaffold*, nomeadamente as suas características de superfície. A rugosidade, molhabilidade, energia e topografia de superfície são de especial relevância aquando a adsorção de proteínas nas primeiras fases de interação do *scaffold* com as células [12]. A superfície de um *scaffold* funciona como um modelador da resposta biológica das células em contacto com o mesmo, influenciando diretamente a morfologia, adesão, proliferação e diferenciação celulares [13].

Dito isto, este trabalho de investigação pretende aliar as boas propriedades de *scaffolds* de P(VDF-TrFE) com a capacidade de modulação celular inerente a diferentes topografias de superfície do mesmo. O facto do P(VDF-TrFE) não ser biodegradável faz com que este tipo de *scaffolds* tenha como alvo a cultura *in vitro* para crescimento de tecidos, que posteriormente poderão ser implantados *in vivo*.

1.2. Motivação e objetivos

No âmbito do descrito na secção anterior, a motivação do presente trabalho prende-se com a necessidade de desenvolver *scaffolds* funcionais com novas topografias de superfície controladas e definidas, para a regeneração de tecido ósseo e muscular. O estudo sistemático da influência de *scaffolds* com diferentes topografias, dimensões e morfologias, nas células ósseas e

musculares, permite a obtenção de resultados comparáveis. Os resultados obtidos nas mesmas condições, para as diferentes variáveis, permitem que sejam legitimamente comparáveis.

O material escolhido para o fabrico dos *scaffolds* foi o P(VDF-TrFE), por possuir a vantagem de apresentar sempre a fase piezoelétrica β , independentemente dos parâmetros de processamento, contrariamente ao polímero PVDF e dos seus outros copolímeros. Os *scaffolds* serão fabricados de forma a apresentarem diferentes topografias de superfície, nomeadamente matrizes com “linhas”, “linhas intermitentes”, “hexagonais”, “zigue-zagues curvos” e “zigue-zagues lineares”. Além disso, a dimensão destas estruturas será variada em termos de largura e altura, assim como de espaçamento entre as mesmas.

Para o processamento dos *scaffolds* vai se recorrer à técnica de moldagem por réplica, utilizando moldes de polidimetilsiloxano (PDMS) padronizados. Estes últimos serão previamente obtidos recorrendo igualmente a moldagem por réplica, utilizando moldes de éter glicídico de bisfenol A (SU-8) fabricados por fotolitografia. Os *scaffolds* padronizados serão obtidos com diferentes morfologias, i.e. porosa e não porosa, através do controlo da temperatura de cristalização do copolímero durante o seu processamento. As diferentes geometrias e morfologias obtidas permitiram a análise e comparação do comportamento celular quando em contacto com os diferentes ambientes topográficos (Figura 1.1).



Figura 1.1: Diagrama representativo dos passos efetuados ao longo do presente trabalho.

Deste modo, os objetivos do trabalho são os seguintes:

1. Desenho e fabrico de moldes em SU-8 e PDMS, com diferentes tipos de topografias e dimensões, incluindo matrizes do tipo “linhas”, “linhas intermitentes”, “hexagonais”, “zigue-zagues curvos” e “zigue-zagues lineares”;

2. Obtenção de *scaffolds* em P(VDF-TrFE), recorrendo aos moldes previamente fabricados, e estudo da influência da topografia, dimensão da mesma, assim como da temperatura de cristalização na morfologia, molhabilidade e propriedades físico-químicas dos respetivos *scaffolds*;

3. Avaliação da influência dos diferentes *scaffolds* de P(VDF-TrFE) no comportamento de células ósseas e musculares, nomeadamente ao nível da sua adesão.

1.3. Estrutura da dissertação

Enquadrando os objetivos definidos, a tese está organizada em 5 capítulos sumarizados de seguida.

Capítulo 1- Introdução

O presente capítulo apresenta a contextualização do presente estudo, assim como a motivação para a sua realização e os objetivos pretendidos. Por último, é apresentada a estrutura da dissertação.

Capítulo 2- Enquadramento teórico

O segundo capítulo dispõe de conceitos gerais sobre os *scaffolds*, respetivas propriedades e a sua utilização para a engenharia de tecidos, mais especificamente óssea e muscular. Apresenta de forma sucinta a escolha das diferentes características e enquadra as seleções feitas para o presente trabalho. Por fim, é apresentada uma revisão bibliográfica pertinente ao estudo efetuado.

Capítulo 3- Materiais e métodos

Neste capítulo são descritos os materiais e técnicas utilizadas ao longo de todo o percurso laboratorial, tanto para o processamento dos *scaffolds*, como para a sua caracterização e utilização em ensaios celulares.

Capítulo 4- Resultados e discussão

No quarto capítulo são apresentados os resultados obtidos, assim como uma análise e discussão dos mesmos.

Capítulo 5- Conclusões e perspetivas futuras

No último capítulo são expostas as conclusões e são tecidas algumas considerações finais. Por fim, são apresentadas sugestões de trabalhos futuros enquadrados no âmbito desta tese.

2. ENQUADRAMENTO

2.1. Engenharia de tecidos

O conceito de engenharia de tecidos surgiu em 1993 pelos investigadores *Langer e Vacanti*, caracterizando-a como “uma área interdisciplinar que combina o conhecimento e a tecnologia ao nível celular, de materiais e fatores bioquímicos, capazes de criar órgãos e tecidos artificiais, ou de regenerar os danificados” (Figura 2.1) [14].

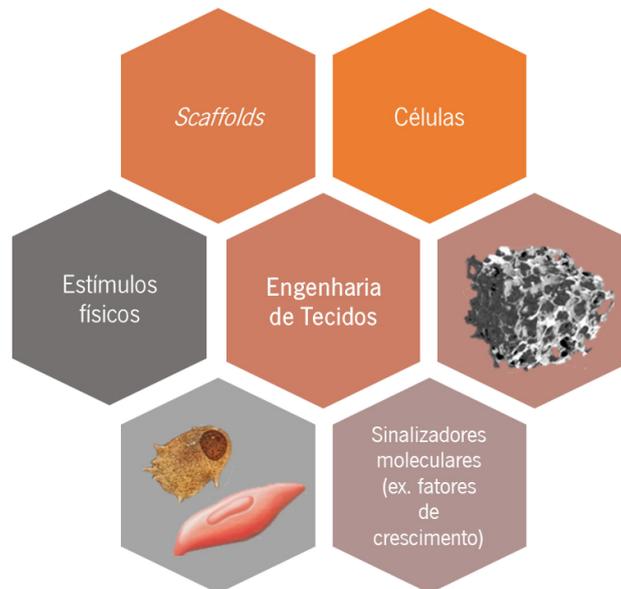


Figura 2.1: Triade da Engenharia de Tecidos.

A engenharia de tecidos dispõe de princípios multidisciplinares tanto ao nível das ciências da vida como das engenharias, com o principal objetivo de conseguir restabelecer a arquitetura dos tecidos e/ou dos órgãos alterados, patologicamente ou por esforço [14]. Esta área científica destaca: 1) a criação de matrizes de biomateriais funcionais (designados como *scaffolds*) que mimetizem a matriz extracelular característica do tecido, 2) a utilização de células precursoras que depositem a nova matriz celular, 3) a utilização de sinais morfogénicos que ajudem diretamente as células a desenvolver o tipo fenotípico correto e 4) a vascularização suficiente que permita o fornecimento de nutrientes suficientes ao crescimento do tecido. É também alvo de estudos para o tratamento e despistagem de doenças dentro da criação de modelos tecidulares para tratamento de cancro, para teste de fármacos, na modulação de doenças e na criação de “*organs-on-a-chip*” [15]. Ao passo do crescimento tecnológico, a sofisticação e a interdisciplinaridade nas abordagens utilizadas para gerar e analisar tecidos estão em ascensão.

Tal área da engenharia recorre a abordagens como: 1) a implantação de células isoladas no organismo do paciente de modo a que o crescimento ocorra diretamente *in vivo*; 2) o crescimento e diferenciação de células em *scaffolds in vitro* que mimetizem o ambiente celular natural, implantadas diretamente no paciente, ou então juntamente com o suporte utilizado, 3) a entrega de substâncias indutoras de crescimento, como por exemplo a utilização de fatores de crescimento [16].

Este projeto visa ajudar na investigação da engenharia de tecidos ósseo e muscular *in vitro*, com recurso a biomateriais designados como *scaffolds*.

2.1.1. Regeneração óssea

A estrutura óssea desempenha uma série de funções essenciais em qualquer vertebrado, pois é responsável pelo suporte do corpo, proteção de órgãos vitais, assistência no movimento e na locomoção, serve de reservatório de fatores de crescimento, minerais e citoquinas e fornece o ambiente para a hematopoiese dentro da medula [17]. Quando ocorre um trauma na estrutura óssea, quer por acidente quer por doença, o bom funcionamento dos órgãos internos pode ficar em risco. Apesar do osso estar em processo contínuo de renovação e remodelação, quando sofre um dano ou uma perda maior do que aquela que consegue suportar, é preciso criar alternativas de tratamento de modo a proceder à substituição ou reparação do tecido.

A técnica recorrentemente utilizada na medicina para tal efeito é designada por enxerto ósseo, consistindo num procedimento cirúrgico que recorre à transplantação de tecido ósseo ou de material biocompatível. Esse tecido transplantado pode ser do próprio paciente (autoenxerto) ou de um dador (aloenxerto). No entanto, ambas as técnicas possuem limitações, como a possibilidade de rejeição, inflamação, transmissão de infeções, a limitação do tecido a transplantar e as características imprevisíveis da sua reabsorção [18].

A engenharia de tecido ósseo surge como tentativa para ultrapassar estas limitações através da criação de materiais de suporte celular funcionais que permitam a diferenciação de células precursoras do osso, de modo a repor o tecido funcional no paciente. Para que a regeneração óssea seja eficaz é necessário um conhecimento prévio do osso.

O osso é um sistema compósito orgânico-inorgânico de estrutura complexa. Histologicamente existem dois tipos de osso, o primário, que surge no desenvolvimento embrionário e na

reparação de fraturas, e o tecido ósseo secundário ou lamelar, que surge em maior abundância no homem adulto. Ambos os tecidos são constituídos por células ósseas incorporadas numa matriz de fibras de colagénio tipo I à qual aderem substâncias inorgânicas. Estas substâncias inorgânicas advêm da combinação de fosfato de cálcio [$\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$] com carbonato de cálcio (CaCO_3), formando a HA [$\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3(\text{OH})$]. Esta por sua vez, incorpora outros sais inorgânicos como o hidróxido de magnésio ($\text{Mg}(\text{OH})_2$), fluoreto (F^-) e sulfato (SO_4^{2-}) à medida que cristaliza ou calcifica nos espaços das fibras de colagénio, conferindo dureza e resistência ao osso e ajudando na sua função de proteção e suporte. Por sua vez, as fibras de colagénio conferem flexibilidade, tornando-o menos suscetível a quebras [19].

Na matriz óssea estão presentes células osteoclásticas, que são responsáveis pelos processos de reabsorção de osso, células osteoblásticas, que são responsáveis por repor essa perda de tecido através da produção de uma nova matriz (matriz osteóide que carece de mineralização) e os osteócitos que consistem num sistema mecanosensorial responsável pela calcificação da matriz osteóide e pela sua regulação, detetando ações de forças biomecânicas e transmitindo sinais elétricos (Figura 2.2) [17, 19].

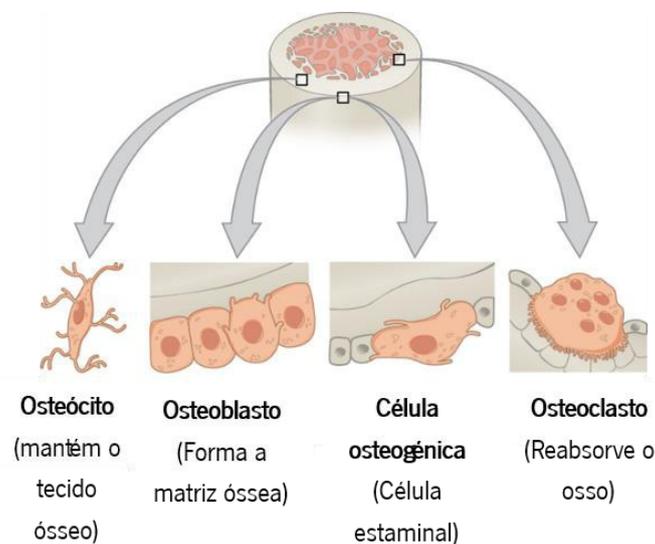


Figura 2.2: Representação ilustrativa dos diferentes tipos de células ósseas. Adaptado de [20].

O osso lamelar é constituído por sistemas de Havers, que se caracterizam por estruturas cilíndricas cujas paredes concêntricas são designadas como lamelas. As lamelas são formadas por matriz osteóide e matriz óssea mineralizada, contendo fibras de colagénio dispostas em

espiral ao longo da sua estrutura. No interior e à superfície das lamelas encontram-se os osteócitos e no centro do sistema existe uma cavidade denominada por canal de Havers, que contém vasos sanguíneos e nervos, revestido por células que habitam a superfície dos ossos, ou seja, osteoblastos e osteoclastos.

As moléculas de colagénio tipo I constituem fibrilas que, por sua vez, se agrupam e originam matrizes de fibras de colagénio interpostas por lacunas, onde se deposita a HA. As fibrilas são alinhadas paralela e unidireccionalmente em hélice e orientadas conforme a sua posição. No momento em que as moléculas de colagénio são cristalizadas pela HA, ocorre a sua orientação com o eixo das fibras e, conseqüentemente, as fibrilas são orientadas na direção do eixo do osso (eixo z). Esta orientação unidireccional resulta na ocorrência de um efeito de piezoelectricidade [21]. A piezoelectricidade define-se como a capacidade de gerar energia elétrica quando é aplicado um stress mecânico a um dado tecido/material cristalino, em que a sua estrutura cristalina é perturbada e a orientação aleatória dos domínios de momento dipolar muda, distribuindo a carga e despoletando um potencial elétrico. Neste caso específico das fibras de colagénio, a piezoelectricidade resulta do deslocamento de cargas proveniente da distorção de ligações cruzadas das moléculas de colagénio, originado por uma tensão mecânica de corte aquando a reorientação das fibras de colagénio no momento da cristalização [22].

Após a descoberta de propriedades piezoelétricas no osso e no colagénio [21, 23], observou-se a produção de correntes elétricas e criação de potenciais elétricos no osso, quando sujeito a um stress mecânico [24]. De acordo com a Lei de Wolf, num corpo em movimento, observa-se a produção de potenciais elétricos que se apresentam como estímulos promotores do crescimento e remodelação do osso [25]. Deste modo, as solicitações eletromecânicas, às quais o osso está sujeito, são as responsáveis pela regulação das células ósseas, que por sua vez são responsáveis pela manutenção da massa óssea. Aquando a redução destes estímulos eletromecânicos, por incapacidade do paciente ou por fratura óssea, os materiais sintéticos piezoelétricos são passíveis de serem utilizados na intensificação deste tipo de estímulo. Pela aplicação de um estímulo mecânico no material, similar ao caminhar no corpo humano, ele vai responder com a geração de potenciais elétricos capazes de regular a funcionalidade das células ósseas. Posto isto, os materiais poliméricos piezoelétricos são capazes de mimetizar o ambiente natural do osso, originando *scaffolds* mimetizadores da matriz óssea [8, 26, 27].

Neste trabalho de investigação será estudado o comportamento de células precursoras de

osteoblastos, em crescimento sobre diferentes topografias de superfície de *scaffolds* piezoelétricos de P(VDF-TrFE), de modo a concluir qual ou quais apresentam maior potencial na modulação do tecido ósseo.

2.1.2. Regeneração músculo-esquelética

Para além da regeneração de tecido ósseo, também a regeneração de tecido muscular tem um grande impacto na investigação da engenharia de tecidos. O tecido muscular divide-se em três tipos básicos, nomeadamente, o tecido muscular cardíaco, o músculo liso e o músculo-esquelético. O músculo-esquelético é o responsável por tracionar os ossos nos movimentos voluntários, sendo indispensável para a locomoção. A perda ou dano muscular pode advir de diferentes causas, quer por doenças, quer por envelhecimento ou mesmo por lesões [19].

O músculo-esquelético possui uma capacidade muito baixa de se autoregenerar, o que faz com que, quando sofre algum tipo de dano mais grave, a medicina recorra a intervenções cirúrgicas [5]. Estas intervenções envolvem a transplantação de músculo autólogo, ou seja, transplantação de músculo do próprio paciente para o local onde existe perda ou dano, sendo o tratamento limitado ao músculo que o dador pode “disponibilizar”. Nestas abordagens, a engenharia de tecidos pretende desenhar e construir matrizes que promovam o normal crescimento das células musculares em défice, sem que seja necessária a transposição de tecido muscular.

O músculo-esquelético é um sistema altamente organizado compreendido por miofibrilas, vasos sanguíneos, nervos e tecido conjuntivo extracelular. A unidade básica do músculo-esquelético é a miofibrila, resultante da diferenciação de células precursoras de células musculares, os mioblastos. Estes últimos fundem-se e formam miotubos multinucleados alongados que maturam em fibras musculares constituídas por muitas miofibrilas paralelas. Cada miofibrila é cercada por tecido conjuntivo, são empacotadas e originam o músculo-esquelético [28]. O tecido conjuntivo circundante é quem suporta e mantém a forma do músculo, permitindo às miofibrilas contraírem em coadjuvação durante o movimento. A maturação apresentada pelos miotubos é acompanhada por um aumento da força contrátil das miofibrilas que atuam através do movimento relativo de duas microestruturas interligadas (miofilamentos), designadas por filamentos de actina e filamentos de miosina (Figura 2.3) [29].

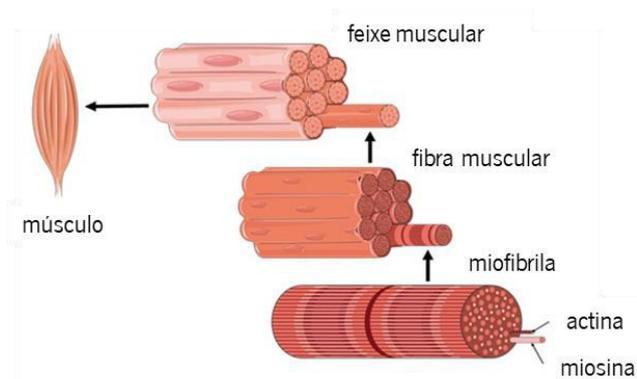


Figura 2.3: Imagem representativa da organização das fibras musculares. Adaptado de [19].

O músculo-esquelético compreende uma rede densa de vasos sanguíneos que asseguram o fornecimento de oxigénio e nutrientes, de forma a manter a atividade metabólica das miofibrilas. Este está ligado ao sistema nervoso através de junções neuromusculares que entregam impulsos elétricos e induzem contractilidade por acoplamento excitação-contração [30].

O principal objetivo do tecido muscular é gerar força contrátil uniaxial e, como tal, o principal objetivo da engenharia de tecidos é criar uma construção de tecido muscular capaz de gerar forças contráteis suficientemente grandes para que seja capaz de restaurar a função normal do músculo quando implantado no paciente. A solicitação eletromecânica, a que o músculo está sujeito durante os processos de contração-excitação, confere à engenharia de tecidos a vantagem do uso de materiais eletroativos capazes de fornecerem propriedades semelhantes ao tecido nativo, através da recriação de estímulos elétricos capazes de gerar a energia necessária para a reposição das forças contráteis e a restauração da função normal do músculo [9, 31, 32]. Para além dos estímulos elétricos, a engenharia de tecidos também é capaz de fornecer matrizes de biomateriais padronizados com as características do tecido muscular, capazes de estimular a diferenciação dos mioblastos e o alinhamento paralelo dos miotubos obtendo um aumento no grau de maturação muscular e das forças contráteis de forma a restaurar a função muscular [31].

Pela necessidade de criar *scaffolds* que sejam capazes de fornecer todos estes requisitos, neste trabalho de investigação será estudado o comportamento de células precursoras de mioblastos, em crescimento sobre diferentes topografias de superfície de *scaffolds* poliméricos piezoelétricos, de modo a concluir qual ou quais apresentam maior potencial para o efeito.

2.2. *Scaffolds*: definição e conceitos gerais

Os *scaffolds* são caracterizados como matrizes de biomateriais sólidos que podem existir nas mais diversas formas, como filmes, membranas, fibras, hidrogéis e matrizes tridimensionais (3D). Têm como função o fornecimento de suporte para a fixação celular inicial, com subsequente formação de tecido, possuindo características-chave para a interação celular [33]. Estes surgiram com a necessidade de mimetizar a MEC existente no ambiente tecidual *in vivo*, com o intuito de fornecer às células condições naturais à sua adesão, proliferação e diferenciação celular. Para além disso, podem servir como transporte de citocinas e fatores de crescimento para o local danificado (Figura 2.4) [34, 35].

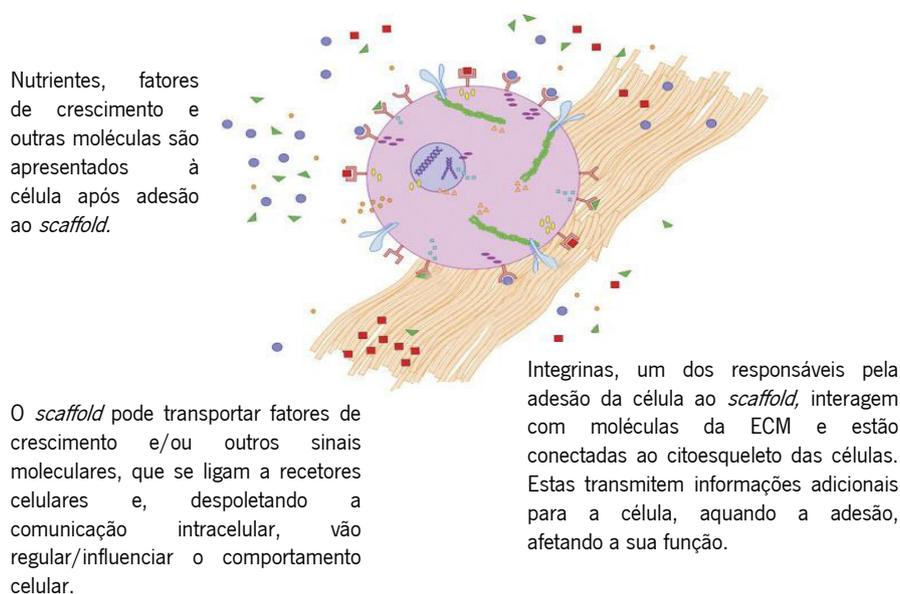


Figura 2.4: Imagem representativa da relação desejada entre as células e os *scaffolds*. Adaptado de [36].

Os *scaffolds* são inspirados em análogos da MEC, desenhados e construídos para cumprir uma ou mais das seguintes funções: 1) promover interações biomaterial-célula, adesão celular e deposição da MEC, 2) permitir o transporte suficiente de gases, nutrientes e fatores reguladores, possibilitando a sobrevivência celular, proliferação e diferenciação, 3) deter a capacidade de biodegradação numa taxa controlada, que se aproxime à taxa de regeneração do tecido dentro das condições desejadas de cultura, 4) provocar um grau mínimo de inflamação e/ou toxicidade *in vivo* [33].

Imediatamente após as células entrarem em contacto com o *scaffold* ocorre uma série de reações físico-químicas, cujos fenómenos se designam por adesão focal. Neste processo, as células aderem ao material em locais de adesão, onde conectam o seu citoesqueleto à superfície do *scaffold* (Figura 2.4). Quando este fenómeno acontece são libertados compostos ativos de sinalização que vão provocar a deposição da MEC [37]. É determinante que ocorra adesão à superfície e, eventualmente, ao interior do *scaffold*, de modo a que as células consigam proliferar sem perdas de função e sem que ocorra uma resposta por parte do sistema imunitário, evitando problemas de toxicidade e de rejeição do *scaffold* [38]. Para que tal aconteça, é essencial que o *scaffold* seja biocompatível, que a energia de superfície e a topografia sejam adequadas, assim como as propriedades químicas e mecânicas. Com estas características reunidas, ocorrerá uma interação positiva e natural com as células [39].

As características da superfície, particularmente a sua rugosidade, molhabilidade, energia e topografia, são de especial relevância aquando a adsorção de proteínas nas primeiras fases de interação do *scaffold* com as células [12]. A molhabilidade da superfície do material influencia essa adsorção, sabendo-se que na presença de superfícies hidrofílicas o crescimento celular, a proliferação e a diferenciação são aumentadas, e conseqüentemente a biocompatibilidade do material [37]. No entanto, também se sabe que para valores muito baixos de hidrofílicidade a adesão celular diminui, sendo assim importante a caracterização dos biomateriais ao nível da sua hidrofobicidade [40].

Também a arquitetura do próprio material influencia o comportamento celular. Características como a porosidade e a interconectividade entre os poros facilitam a penetração celular, a vascularização, a difusão de nutrientes e o transporte de produtos residuais [39]. *In vivo*, o tamanho dos poros deverá ser suficientemente grande para permitir a migração celular, mas também suficientemente pequeno para permitir uma boa área de superfície [38]. Já *in vitro*, Karageorgiou e Kaplan demonstraram que a baixa porosidade estimula a osteogénese em resultado da supressão da proliferação e da agregação celular que é causada [41]. Conforme o tipo de células em estudo e o tipo de tecido a regenerar, a presença /o tamanho dos poros deverá ser otimizado.

Nos casos em que o *scaffold* é implantado diretamente no corpo, a interconectividade entre os poros permite a difusão de resíduos para fora dos mesmos e facilita o transporte dos produtos de degradação para fora do corpo sem que interfiram com órgãos circundantes. A difusão dos

resíduos e a falta de vascularização são neste momento um problema que se tenta ultrapassar [42, 43]. O ideal seria que após algum tempo as células do próprio corpo substituíssem o *scaffold*, não sendo um implante permanente, e para isso este deverá ser biodegradável de modo a que as células produzam a sua própria MEC e que a taxa de degradação acompanhe a taxa de regeneração do próprio tecido, ocorrendo a substituição simultaneamente [38, 39].

As propriedades mecânicas dos materiais são de igual modo importantes pela necessidade indispensável de serem consistentes com o sítio anatómico. Especialmente na regeneração de tecido ósseo, as propriedades mecânicas são um desafio, já que devem permitir ao *scaffold* exercer a sua função desde o momento da implantação até ao término do ciclo de remodelação do osso. Outro fator que dificulta a conceção de *scaffolds* com integridade mecânica suficientemente boa, é a variação da taxa de recuperação com a idade, ou seja, nos jovens as fraturas normalmente recuperam em 6 semanas, o que não acontece com o aumento da idade. Em aplicações ortopédicas estes fatores têm que ser tidos em conta para um desenho de um *scaffold* adequado [38]. É fundamental que o biomaterial detenha propriedades mecânicas compatíveis, capazes de fornecer um ambiente de stresse apropriado aos tecidos a regenerar [44].

Também na escolha do biomaterial a utilizar, a aplicação e o contexto celular devem ser tidos em conta. Para além da função estrutural passiva que os *scaffolds* podem fornecer às células, a escolha de materiais inteligentes e funcionais para o seu processamento fornece-lhes um comportamento ativo nos sistemas celulares aos quais são integrados. Os materiais eletroativos, em particular os polímeros eletroativos, estão a transformar-se na classe de materiais com maior potencial no desenvolvimento de *scaffolds*, capazes de fornecer estímulos necessários à regeneração adequada de tecidos. Como já referido anteriormente, são capazes de mimetizar a piezoelectricidade presente no osso e os sinais eletromecânicos presentes nos mecanismos de contração-excitação presentes no músculo. Como tal, o material escolhido para o desenvolvimento deste trabalho foi o copolímero piezoelétrico P(VDF-TrFE).

2.3. Biomateriais: definição e conceitos gerais

Um biomaterial define-se como “toda a substância que é manipulada pela engenharia para tomar uma forma que, sozinha ou parte integrante de um sistema complexo, é usada para direcionar, por controlo de interações com componentes de sistemas vivos, o curso de um

procedimento terapêutico ou diagnóstico, em medicina humana ou veterinária” [45].

No que diz respeito a aplicações biomédicas, o biomaterial escolhido é um dos passos mais sensíveis. Como já referido, para que possa ser utilizado como *scaffold* é indispensável que seja biocompatível, detenha boas propriedades mecânicas e que possua propriedades químicas e estruturais que favoreçam a adesão celular, proliferação e diferenciação. Por sua vez, a biocompatibilidade é definida como “ a habilidade de um biomaterial para desempenhar as funções desejadas, com respeito a uma terapia médica, sem incitar qualquer efeito local ou sistémico indesejado no paciente, mas sim gerar a resposta celular ou tecidual mais apropriada naquela situação específica, e otimizar o desempenho daquela terapia” [46].

Os materiais podem ser divididos em metálicos, poliméricos, cerâmicos e compósitos. Os metais, polímeros e cerâmicos têm sido muito utilizados nas últimas décadas para implantações cirúrgicas, contribuindo para grandes avanços na medicina. No entanto, os metais e os cerâmicos possuem desvantagens como o facto de não serem biodegradáveis e de serem limitados em termos de adaptabilidade e processamento. O fácil controlo de processamento, a possibilidade de biodegradabilidade, as boas propriedades mecânicas e o baixo custo fazem dos polímeros o foco de interesse na regeneração de tecidos [8].

Os polímeros podem ser naturais (biológicos) ou sintéticos (Tabela 2.1) e estão disponíveis nas mais diversas composições e propriedades, podendo ser prontamente processados em formas e estruturas complexas [47].

Tabela 2.1: Exemplos de polímeros sintéticos e naturais utilizados para o desenvolvimento de *scaffolds*.

Polímeros Naturais	Polímeros Sintéticos
Quitosano [5]	PVDF [31]
Colagénio [3]	P(VDF-TrFE) [48]
Seda [49]	PLLA [50]
Celulose [51]	PLGA [52]

Os polímeros naturais biodegradáveis foram os primeiros biomateriais utilizados clinicamente [53]. Por possuírem estruturas semelhantes às moléculas existentes nos órgãos biológicos, a

possibilidade de rejeição torna-se bastante diminuta. Estes materiais baseiam-se em proteínas, polissacáridos ou polinucleótidos e desempenham funções *in vivo*, o que os tornam biocompatíveis e passíveis de deterem locais de adesão celular, daí serem bastante procurados ao nível da investigação em engenharia de tecidos. São materiais derivados de fontes renováveis e ecológicos [54]. Apesar de serem bastante promissores para o suporte da adesão celular, são suscetíveis à variabilidade inerente à sua fonte e à necessidade de que seja garantida a pureza da proteína ou polissacárido antes de se proceder ao implante *in vivo* [6]. A acrescentar a estas desvantagens, está o facto de os biopolímeros possuírem propriedades mecânicas pouco versáteis e serem uma fonte limitada e dispendiosa [54].

Por sua vez, os polímeros sintéticos possuem propriedades previsíveis, podendo ser adaptadas às diferentes aplicações num grande espectro de variações ao nível químico e físico. Estes podem ser produzidos em larga escala, dentro de condições controladas, são facilmente reproduzíveis, possuem um tempo de vida longo e apresentam uma produção de baixo custo comparativamente aos *scaffolds* biológicos [7].

Para além do tipo de materiais, estes também são classificados e divididos em bioinertes e bioativos. Os materiais bioinertes referem-se a qualquer material que interage minimamente com o tecido ou células circundantes, não despoletando qualquer resposta por parte dos mesmos. Já os materiais bioativos classificam-se como materiais capazes de interagir ativamente com os sistemas biológicos nos quais estão integrados, promovendo por exemplo a regeneração do tecido ou desencadeando respostas celulares.

Nas últimas décadas, a investigação na produção de *scaffolds* recaiu essencialmente sobre os materiais bioinertes, no entanto, com o avanço no desenvolvimento de novos materiais, são os bioativos que estão em vantagem pela sua capacidade de estimulação ativa [47]. O processamento de *scaffolds* com materiais bioativos, mais propriamente com polímeros eletroativos, permite a manipulação direta no crescimento e diferenciação celular através da recriação de estímulos presentes no ambiente natural *in vivo*.

2.3.1. Polímeros inteligentes e multifuncionais

A utilização de fatores e estímulos externos está relacionada com a necessidade de fornecer às células a recriação dos estímulos que receberiam no seu ambiente natural *in vivo*, de forma a

que mantenham as interações naturais entre si e as suas normais propriedades. Estes permitem uma melhor reprodutibilidade do ambiente celular normal, fornecendo-lhes todos os requisitos para que proliferem e se diferenciem no tipo celular característico ao ambiente recriado. Podem ser químicos, através de fatores de crescimento [55], ou físicos, por estimulação mecânica [56].

Os polímeros eletroativos surgem no processamento de *scaffolds* funcionais com a capacidade de fornecer estímulos, mecânicos ou elétricos, diretos às células. Dentro destes, os polímeros piezoelétricos destacam-se na regeneração de tecidos, já que, sob uma solicitação mecânica, detêm a capacidade de gerar cargas elétricas e vice-versa, ou seja, sob solicitações elétricas são capazes de gerar deformações mecânicas [9]. Quando é aplicado um stress mecânico a um material piezoelétrico a sua estrutura é perturbada e a orientação aleatória dos domínios de momento dipolar muda, distribuindo a carga pelas duas faces do cristal e despoletando um potencial elétrico (Figura 2.5 a). Essa aptidão é designada como efeito piezoelétrico direto, descoberto pelos irmãos *Curie* em 1880 [57]. Por outro lado, quando um material piezoelétrico é sujeito a um campo elétrico forte, os domínios de momento dipolar são orientados na direção do campo elétrico aplicado, originando um stress mecânico e despoletando uma deformação (Figura 2.5 b). Este efeito designa-se como efeito piezoelétrico inverso, deduzido matematicamente por *Lippman* em 1881 [58] e mais confirmado mais tarde pelos irmãos *Curie*.

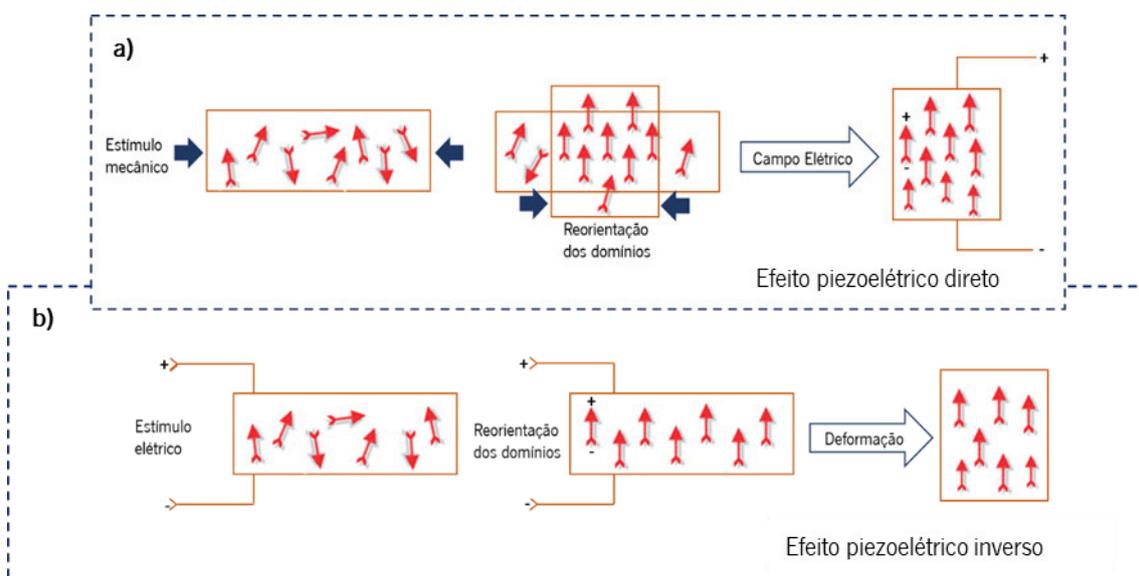


Figura 2.5: Representação esquemática do efeito piezoelétrico: a) direto e b) inverso.

Nem só os materiais são capazes de apresentar efeito piezoelétrico, este pode ser também

observado em diferentes partes do corpo humano, como no osso, tendão, ligamentos, cartilagem, pele, dentes, colagénio, ácidos desoxirribonucleicos (ADN) e nas membranas celulares [8]. Uma vez inerente ao corpo humano, os sinais elétricos podem ser considerados como uma propriedade universal dos tecidos vivos, o que fornece à engenharia de tecidos vantagens na utilização de polímeros piezoelétricos.

A possibilidade de alteração do estado de polarização superficial, por uma ação mecânica/deformação celular, faz com que os polímeros piezoelétricos sejam benéficos no processamento de *scaffolds* ativos. A carga superficial do material é um critério importante para a orientação, adesão, proliferação e diferenciação celular [10, 59] e prova disso são os estudos recorrentes com *scaffolds* de PVDF. O PVDF exibe influência no comportamento de condrócitos para a engenharia de tecidos de cartilagem [60], promove a adesão e proliferação de osteoblastos para a engenharia de tecido ósseo [26], promove o alongamento e ramificação de neurites para a engenharia de tecido neuronal [61] e promove a proliferação e orientação de células mioblásticas para a engenharia de tecido muscular [31].

Apesar de apresentarem uma resposta piezoelétrica mais baixa que alguns cerâmicos, os polímeros piezoelétricos detêm uma maior gama de aplicações. Uma vez que são flexíveis, leves e podem ser transformados em qualquer configuração, são facilmente produzidos em larga escala numa ampla gama de configurações (filmes, esferas, fibras, microestruturas, entre outros) e a um baixo custo.

Poli(fluoreto de vinilideno)

O PVDF e os seus copolímeros são reconhecidos como materiais ímpares em aplicações biomédicas devido à sua alta resposta eletroativa dentro dos materiais poliméricos. É um material semi-cristalino, quimicamente inerte, eletricamente ativo e biocompatível (Figura 2.6) [11].

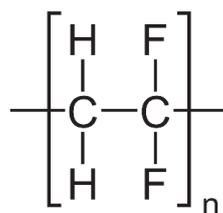


Figura 2.6: Estrutura química do PVDF.

O PVDF pode encontrar-se sobre a forma de 5 fases cristalinas, relacionadas com as diferentes conformações que a cadeia pode apresentar. As conformações designam-se de TTTT' (*all trans planar zigzag*) para a fase β , TGTG' (*trans-gauche-trans-gauche*) para as fases α e δ e T3GT3G' para as fases γ e ϵ . Enquanto a fase α é a termodinamicamente mais estável, a fase β é a mais desejada do ponto de vista tecnológico por apresentar melhores propriedades eletroativas (Figura 2.7) [11].

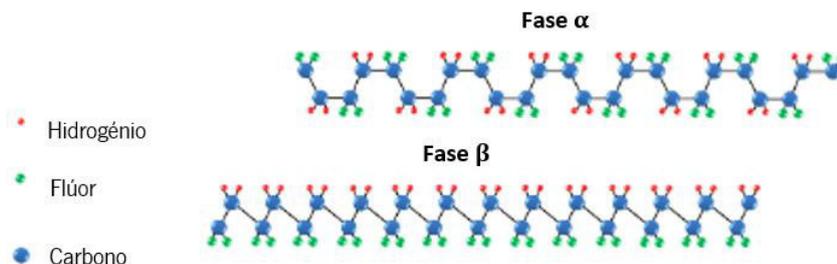


Figura 2.7: Representação gráfica das cadeias de α - e β -PVDF. Adaptado de [11].

A fase α é uma fase não polar caracterizada pelo empacotamento das cadeias em direções alternadas e, conseqüentemente, quando a cadeia polimérica se encontra com esta conformação o PVDF não apresenta eletroatividade [56]. Em contrapartida, a fase polar β caracteriza-se pelo empacotamento das cadeias orientadas na mesma direção, que lhe confere características eletroativas. São várias as estratégias que têm sido desenvolvidas para induzir a fase β , tais como o estiramento mecânico e a inclusão de materiais nanométricos na matriz polimérica [11]. Além disso, o desenvolvimento do copolímero P(VDF-TrFE), pela adição de um terceiro flúor no monómero de trifluoretileno, induz espontaneamente a conformação *all trans* (fase tipo β do PVDF) da cadeia polimérica, independentemente do método de processamento (Figura 2.8) [11].

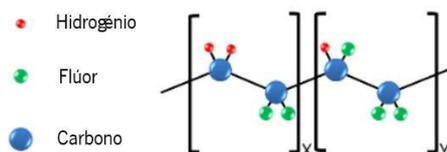


Figura 2.8: Representação gráfica do copolímero P(VDF-TrFE). Adaptado de [48].

Poli(fluoreto de vinilideno-*co*-trifluoretileno)

O copolímero P(VDF-TrFE) é um material eletroativo, semi-cristalino e biocompatível, que tem despertado grande interesse ao nível de aplicações tecnológicas devido às suas interessantes propriedades. Além da sua atividade piezoelétrica e piroelétrica, este copolímero exibe uma transição de Curie ferro-paramagnética abaixo da temperatura de fusão quando contém uma % em mol de VDF entre 50 e 85, permitindo o estudo da fase de transição ferro-paramagnética. Ao contrário do PVDF, apresenta-se em fase ferroelétrica à temperatura ambiente, independentemente das condições às quais acontece a sua cristalização, ou seja, independentemente do modo de processamento. Nesta fase ferroelétrica a cadeia apresenta a conformação mais desejada para aplicações tecnológicas, a *all trans* semelhante à fase polar β do PVDF (Figura 2.8) [11]. Para além disso, o P(VDF-TrFE) apresenta uma maior polarização remanescente e maior estabilidade a altas temperaturas [62].

Em conjunto com as suas boas propriedades, materiais baseados em PVDF, tais como o P(VDF-TrFE), permite 1) o processamento de *scaffolds* com diferentes topografias de superfície, por técnicas de microfabricação; 2) a obtenção de superfícies polarizadas, quando sujeito a um stresse mecânico; 3) a obtenção de *scaffolds* com diferentes hidrofobicidades, por tratamento de plasma. Todos estes fatores influenciam a resposta celular, fazendo do P(VDF-TrFE) um polímero adaptável no estudo da regeneração de tecidos [39].

Tal como o PVDF, o seu copolímero P(VDF-TrFE) não é biodegradável. A incapacidade de degradabilidade é uma característica limitante no processamento de *scaffolds* utilizados em implantes médicos ou aplicações relacionadas, mas não em estudos de cultura, expansão e diferenciação celular antecedentes à aplicação das células/tecidos *in vivo* [48]. A utilização de um polímero não biodegradável para a construção dos *scaffolds* funcionais não irá ser um entrave, pois a perspetiva é a utilização direta dos tecidos crescidos e diferenciados nos *scaffolds in vitro*, em aplicações biomédicas.

O efeito piezoelétrico de um material está presente quando o mesmo se encontra polarizado, sendo este diretamente proporcional ao grau de polarização que o material consegue atingir. Neste projeto, na avaliação do comportamento celular os *scaffolds* de base polimérica de P(VDF-TrFE) não se encontrarão polarizados, ou seja, não se irá verificar o seu efeito piezoelétrico. Só assim se consegue retirar elações acerca da influência das diferentes microestruturas na adesão celular. Como perspetiva futura está a complementação com o efeito piezoelétrico do material e

o seu estudo em cultura celular.

2.4. Microestruturas de superfície

Em 1911, *Harrison* observou a influência da topografia no comportamento celular verificando que as células se orientavam ao longo das fibras de uma teia de aranha, fenómeno que foi designado por estereotropismo [35]. Desde então que a topografia de superfície e o seu efeito na modelação celular têm vindo a ser estudados.

A maioria das células humanas são dependentes de ancoragem, o que faz com que a microestrutura e as propriedades de superfície dos *scaffolds* sejam também questões fundamentais para o seu bom funcionamento. Como já referido anteriormente, a adesão celular à superfície do biomaterial envolve uma sequência de reações físicas e químicas entre ambos que influenciam a deposição da MEC, a proliferação e diferenciação celular [37]. Diferentes tipos celulares possuem mecanismos de adesão distintos para o mesmo biomaterial e, também, tipos celulares iguais, podem responder de modo dispar a diferentes morfologias do mesmo material [9]. Por conseguinte, microestruturas diferentes fornecem ao mesmo tipo celular sinais físicos, geométricos, mecânicos e estruturais específicos distintos independentemente da composição química do material que constitui o *scaffold* [63].

Para uma melhor compreensão do efeito topográfico, têm sido estudadas diferentes geometrias de superfície como por exemplo, padrões característicos de linhas [64, 65], pilares [63, 66-69], poços [70], depressões [71] e microestruturas com forma piramidal [72]. Estes estudos são essenciais para uma melhor compreensão do comportamento celular em resposta à interação com os *scaffolds*. Contudo, continuam a existir lacunas na comparação de resultados, uma vez que os materiais são processados e caracterizados de forma distinta e expostos a diferentes tipos de células, carecendo de poder de comparação entre estudos [73].

O desenho de superfícies funcionais para a engenharia de tecidos pode ser otimizado através do conhecimento mais aprofundado do comportamento de diferentes tipos celulares à variação da microestrutura de superfície do *scaffold* de um mesmo biomaterial. Posto isto, este trabalho de investigação visa o desenvolvimento de *scaffolds* de P(VDF-TrFE) com diferentes tipos de topografia de superfície, que irão permitir concluir acerca da influência de cada matriz no comportamento de células pré-osteoblásticas e mioblásticas.

2.5. Técnicas de microfabricação de *scaffolds* para engenharia de tecidos

Para a obtenção de *scaffolds* poliméricos funcionais e padronizados com microestruturas 3D de alta qualidade recorre-se a processos de microfabricação [74]. O aumento da precisão de sistemas microfabricados, inerente ao progresso tecnológico, permite a manipulação de sistemas biológicos tanto à escala centimétrica (tecidos e órgãos) como à escala micrométrica (células) e até mesmo à escala nanométrica (biomoléculas individuais). A MEC é composta por inúmeras proteínas estruturais com características desde milimétricas a nanométricas, sendo as primeiras designadas para o suporte macroscópico e as últimas responsáveis por dar estímulos que vão influenciar funções essenciais como a proliferação, migração e propagação celular [73]. Diversos sistemas alterados topograficamente com características micrométricas e nanométricas já foram concebidos para o estudo do comportamento celular [75-77].

A fotolitografia consiste num processo de micropadronização muito utilizado na biomedicina. Esta técnica recorre à padronização de um material fotossensível, geralmente o SU-8, quando exposto a um tipo específico de radiação. Para a padronização do material utiliza-se uma máscara fotolitográfica (fotolito) padronizada, colocada entre o material e a radiação, de maneira a que sejam controladas as áreas expostas à radiação [78]. Dependendo do tipo de material fotossensível, as áreas que não forem protegidas pela máscara reagem de forma distinta às protegidas. No caso de materiais fotorresistentes positivos, as áreas que não forem protegidas pelo fotolito tornam-se solúveis a solventes orgânicos e podem ser removidas, enquanto em materiais negativos as áreas expostas reticulam e tornam-se insolúveis [79]. O SU-8 é um material fotossensível negativo, transparente no espectro de luz visível (350-400 nm) que polimeriza à luz UV. A utilização deste material possibilita a obtenção de topografias 3D com uma espessura/altura controláveis [80].

Neste trabalho a técnica de fotolitografia será empregue para a padronização de moldes em SU-8, no entanto, estes moldes não serão utilizados diretamente para a padronização dos *scaffolds*, isto porque o SU-8 reage com a dimetilformamida (DMF), que é o solvente utilizado para a dissolução do copolímero P(VDF-TrFE). Para além disto, o SU-8 é frágil e quebradiço o que iria dificultar o descarte do copolímero sem que o molde fosse danificado.

Deste modo, o SU-8 padronizado, resultante da fotolitografia, é utilizado na litografia suave como um “molde mestre” para a réplica do respetivo padrão em materiais elastoméricos, como é o caso do PDMS. A litografia suave engloba diversos métodos não fotolitográficos, como é o caso da moldagem por réplica [78]. O sucesso desta técnica reside no molde elastomérico obtido, que transfere o padrão para o substrato polimérico quando este está a polimerizar sobre ele [81, 82]. O PDMS não reage com o DMF e, sendo um molde flexível, vai permitir que os *scaffolds* sejam mais facilmente removidos. Para além disto os moldes de PDMS não são facilmente danificáveis podendo deste modo ser reutilizados inúmeras vezes.

2.5.1. Conceitos gerais de fotolitografia para obtenção de moldes em SU-8

A fotolitografia permite a microfabricação de estruturas na ordem dos micrómetros, com praticamente todas as formas e tamanhos desejados, para além de que permite não só a obtenção de microestruturas planares, mas também de multicamada e microestruturas 3D [83].

A resina SU-8 é um exemplo de um material polimérico fotossensível utilizado para a construção de microestruturas, com baixo custo e fácil processamento [84]. Esta resina, baseada em epóxi negativa, é utilizada como material estrutural e como molde. Sendo fotossensível, permite a sua padronização através da técnica de fotolitografia por radiação ultravioleta (UV) e a sua transparência à luz visível permite que seja muito utilizado em sistemas microfluídicos [84, 85]. Para além disto, o SU-8 é quimicamente inerte, e termicamente estável [84] que, cumulativamente à sua biocompatibilidade, possui um elevado potencial para desenvolvimento de dispositivos médicos [86].

Quando exposto à luz UV, o SU-8 polimeriza e cria uma elevada densidade de ligações cruzadas no material, fazendo desta capacidade um passo fulcral na microfabricação, uma vez que permite a transferência dos padrões desejados [87]. No entanto, para que seja possível a obtenção do padrão desejado, é necessário que se proceda anteriormente ao desenho e impressão das máscaras fotolitográficas. Estes fotolitos são desenhados recorrendo a desenho computadorizado (CAD do inglês, *computer aided design*) e posteriormente impressos comercialmente. No fotolito estarão inscritos os padrões bidimensionais pretendidos e, como já foi referido, a luz UV incidente apenas ultrapassa a máscara nas zonas em que a mesma é transparente. Consequentemente, a luz que ultrapassa o fotolito irá incidir no SU-8 que está

imediatamente abaixo, polimerizando nos locais expostos. Essa polimerização deve-se à formação de um fotoácido que vai fazer com que as ligações cruzadas aumentem nessa área, tornando-a resistente à ação de solventes orgânicos utilizados para remoção do SU-8 não polimerizado [80].

Este método permite que sejam obtidos moldes padronizados com estruturas na escala micrométrica, o que é vantajoso para a produção de *scaffolds*. No entanto, como já foi referido, possui a desvantagem de serem rígidos, frágeis e de reagirem com o DMF. A obtenção de moldes em SU-8 padronizados é aproveitada na litografia suave para a obtenção de réplicas do padrão em moldes reutilizáveis, flexíveis e elásticos, como é o caso do PDMS.

2.5.2. Conceitos gerais de moldagem por réplica para obtenção de moldes em polidimetilsiloxano

A moldagem por réplica consiste na utilização de um “molde mestre” fotorresistente padronizado, caso do SU-8, para a obtenção de moldes reutilizáveis, padronizados e replicados, caso do PDMS.

O elastómero PDMS, pertencente ao grupo dos siloxanos, possui propriedades muito aliciantes para o desenvolvimento de microestruturas com vários tipos de aplicações na área biomédica, especialmente na área da microfluídica [88, 89]. Este permite o fabrico de estruturas à microescala com alta fidelidade e reprodutibilidade, por métodos de litografia suave. Dentro das suas propriedades estão o seu baixo custo, fácil manuseamento, biocompatibilidade, elasticidade, permeabilidade e transparência ótica nos intervalos de 290-1100 nm. Passível de ser usado numa série de esquemas de deteção, possui facilidade de ligação a outros materiais ou estruturas de PDMS, boa estabilidade térmica e baixa tensão superficial. Para além disto é térmica e eletricamente isolante, quimicamente inerte e resistente a vários químicos, como é o caso do DMF [90]. O polímero é ecológico porque, apesar de resistir a elevadas temperaturas e à exposição UV, possuiu a capacidade de ser degradado no ambiente [91]. A elasticidade e baixa energia de superfície do PDMS faz com que, assim que o *scaffold* esteja polimerizado, seja facilmente removível do molde [78].

A superfície destes elastómeros é hidrofóbica devido aos grupos metil CH₃ presentes à superfície, o que pode dificultar a sua molhabilidade e, conseqüentemente, a deposição de soluções dentro

dos padrões à sua superfície. A hidrofobicidade pode ser ultrapassada através da técnica de tratamento com plasma de oxigénio, que vai provocar a oxidação da superfície, tornando-a hidrofílica [92].

Aliado à fotolitografia, que oferece a capacidade de manipulação do tamanho e da forma do padrão desejado, permite que as estruturas obtidas possam ser repetidas em múltiplas cópias de boa fiabilidade e reprodutibilidade [78].

A partir destes moldes em PDMS vão ser fabricados os *scaffolds* baseados em P(VDF-TrFE) por deposição da solução copolimérica no molde. A solução irá polimerizar e adquirir o inverso da topografia inscrita e, com tempo e temperatura de cristalização específicos, será possível também a obtenção de *scaffolds* porosos e não porosos.

2.6. Estado da arte

Na engenharia de tecidos existem diversos estudos de materiais bioinertes e bioativos sob diferentes morfologias e com diferentes topografias de superfície, sendo maioritariamente dedicados à regeneração óssea, neuronal e muscular [8]. Referente à contextualização deste trabalho, serão apresentados de seguida alguns dos trabalhos dedicados à regeneração óssea e muscular, apresentados na Tabela 2.2, baseados em materiais piezoelétricos e/ou em *scaffolds* microestruturados.

Tabela 2.2: Apresentação de resultados selecionados, dedicados à regeneração músculo-esquelética e óssea, relevantes para o presente estudo.

	Morfologia/ Topografia	Material	Tipo Celular	Descrição	Referência
Regeneração músculo- esquelética	Fibras Filmes	β -PVDF	Mioblastos	Maior proliferação em superfícies carregadas negativamente; Crescimento direcionado e alongado das células ao longo de fibras orientadas.	[31]

Tabela 2.2 (continuação)

	Morfologia/ Topografia	Material	Tipo Celular	Descrição	Referência
Regeneração Musculo-esquelética	Filmes porosos	PVDF P(VDF-HFP) P(VDF-TrFE)	Mioblastos	Distribuição aleatória dos mioblastos em todos os filmes porosos, independentemente do material; Alongamento das células no material com maior porosidade e tamanho dos poros, nomeadamente o P(VDF-TrFE).	[48]
	Matrizes 3D de microfissuras à superfície	PDMS	Mioblastos	Fraco alinhamento das células nos <i>scaffolds</i> com microfissuras “rasas”, o que sugere que a altura não é suficiente para provocar um guia topográfico; As células aderiram à profundidade dos <i>scaffolds</i> com microfissuras de altura mais elevada, designados por “fundas” e exibiram alinhamento paralelo à direção das mesmas.	[65]
	Matrizes 3D de poros tubulares	Quitosano	Mioblastos	As células aderiram, proliferaram e diferenciaram-se em miotubos espessos.	[5]
Regeneração Óssea	Filmes	β -PVDF	Pré-osteoblastos	Maior adesão e proliferação em filmes de β -PVDF positivamente carregados.	[26]
	Filmes porosos	PVDF P(VDF-HFP) P(VDF-TrFE)	Pré-osteoblastos	Alteração da forma arredondada, característica dos osteoblastos, nos filmes porosos de P(VDF-TrFE).	[48]
	Matrizes 3D de pilares à superfície	PS (poliestireno)	Células mesenquimais humanas	Matrizes de pilares com maior diâmetro e distância entre eles estimulam a diferenciação osteogénica.	[93]

Tem sido demonstrada a influência direta da morfologia e do estado de polarização do PVDF na morfologia de mioblastos C2C12. *Ribeiro et al.* [31] observaram a influência de diferentes cargas superficiais (nula, negativa e positiva) e morfologias (filmes e fibras) do biomaterial β -PVDF na

adesão e forma de mioblastos. Demonstrou-se que em filmes de β -PVDF de superfície negativamente polarizada, a proliferação das células C2C12 foi maior comparativamente aos filmes de superfície positivamente polarizada e sem qualquer polarização. Foi também demonstrado que em filmes de β -PVDF as células apresentavam uma forma irregular e uma distribuição aleatória. Quando expostas em cultura com fibras de β -PVDF alinhadas, estas promoviam o crescimento direcionado e alongado das células C2C12 ao longo das fibras poliméricas, contrariamente a fibras aleatoriamente dispostas. Deste modo, extrapola-se que a conjugação de fibras alinhadas de β -PVDF polarizadas negativamente é uma mais-valia para a estimulação de tecido músculo-esquelético. Contrariamente, verificou-se uma maior adesão e proliferação de pré-osteoblastos (MC3T3-E1) em filmes de β -PVDF positivamente carregados [26]. Estes resultados suportam a influência da morfologia dos *scaffolds* na morfologia celular e da carga de superfície na adesão e proliferação.

Nunes-Pereira et al. estudaram a influência do PVDF e dos seus copolímeros, poli(fluoreto de vinilideno-co-hexafluoropropileno) (P(VDF-HFP)) e P(VDF-TrFE), como filmes porosos na viabilidade e morfologia de células precursoras de tecido ósseo e muscular [48]. Mais uma vez foi observado a distribuição aleatória das C2C12 em todos os filmes porosos, independentemente do material. No entanto, a morfologia das células precursoras musculares parece variar quando em contacto com os filmes de P(VDF-TrFE) com poros de tamanho e grau de porosidade elevados, apresentando-se alongadas, característica do tecido muscular. Por sua vez, a morfologia dos osteoblastos também foi alterada pelo substrato de P(VDF-TrFE), alterando a sua forma arredondada para uma forma mais alongada, não característica do tecido ósseo. Desta forma, a alta porosidade e o grande tamanho dos poros aparentam induzir o alongamento celular, podendo estas características serem utilizadas para a engenharia de tecidos músculo-esqueléticos.

Por sua vez, a criação de *scaffolds* padronizados em 3D fornece uma melhor mimetização do ambiente celular. A construção de *scaffolds* 3D com diferentes topografias de superfície, através de técnicas de litografia suave, têm vindo a ser estudados na regeneração óssea e muscular. A título de exemplo, foi efetuado um estudo recorrendo a moldes de poliestireno (PS), obtidos pela técnica de moldagem por microinjeção, padronizados com pilares. Foram processadas réplicas dos moldes PS padronizadas com pilares de diâmetros 2, 3 e 4 μm distanciados entre eles com 8, 9 e 10 μm . Este estudo foi feito com o objetivo de observar a influência das dimensões da topografia de superfície na diferenciação osteogénica de células estaminais mesenquimais

humanas (hMSC do inglês *human mesenchymal stem cells*), sem fatores de crescimento osteogénicos. A micropadronização de facto afetou o comportamento celular, demonstrando uma maior taxa de diferenciação osteogénica para diâmetros e distâncias inter-pilares maiores (4 x 10 µm, diâmetro por distância), verificando-se os mais eficazes na indução da diferenciação osteogénica [93].

Existem muitos outros estudos já feitos recorrendo a diferentes métodos de processamento e arquiteturas. Outro exemplo, neste caso utilizado para a regeneração de tecido muscular, foi a produção de *scaffolds* poliméricos de PDMS, por moldagem por réplica. Os mesmos foram padronizados com microfissuras estreitas linearmente alinhadas e com diferentes alturas com o objetivo de verificar a adaptação e direção de células mioblásticas [65]. Para este trabalho foram produzidos moldes em PDMS com microfissuras “rasas” e “fundas”, nomeadamente com 2 x 2 µm (largura por altura), e com 2 x 7 µm (largura por altura), respetivamente. Verificou-se um fraco alinhamento das células nos *scaffolds* com microfissuras “rasas”, o que sugeriu que a altura não foi suficiente para provocar um guia topográfico, ao contrário do que aconteceu com os *scaffolds* “fundos”. Nestes últimos as células desceram para as fissuras e exibiram um alinhamento paralelo à direção das mesmas. Estes dados vão contra os obtidos por *Lam et al.*, em 2006 e *Charest et al.*, em 2007 os quais verificaram que as C2C12 preferiam aderir às superfícies das estruturas, e não à sua profundidade [94, 95]. No entanto, os autores acreditam que tal não aconteceu devido ao facto de as células não terem área suficiente à superfície para conseguirem aderir. A visualização por fluorescência demonstrou a influência da topografia na diferenciação celular, na qual se verificou que o alinhamento das células nas microfissuras “fundas” encorajou a diferenciação dos mioblastos em miotubos multinucleados. A monocamada formada pelos miotubos permitiu a fixação, crescimento e diferenciação de camadas subsequentes de mioblastos dispostos linearmente, resultando em estruturas 3D de camadas múltiplas de miotubos, características do tecido músculo-esquelético [65].

O tamanho das topografias de superfície presentes nos *scaffolds* e a sua relação com as células deve-se também em grande parte ao espaço que elas conseguem ocupar e que têm para aderir e manter conexão entre si. Prova disso está no trabalho desenvolvido por *Araújo et al.*, o qual apresenta o crescimento de células de ovário de rato em *scaffolds* de SU-8, com topografias de superfície hexagonal, com diâmetro e espessura variáveis [96]. Os autores testaram topografias com diâmetros reduzidos, comparativamente ao tamanho das células (12 e 30 µm), e diâmetros maiores (80, 280 e 560 µm). Verificaram que as células tendiam a aderir ao interior dos

hexágonos e, que para diâmetros reduzidos, a adesão celular era dificultada pela expansão da célula a mais do que uma cavidade hexagonal. Já nas topografias de 280 e 560 μm , as células apresentavam-se distantes umas das outras, como se estivessem aderidas a um material liso. A maior densidade de crescimento celular deu-se na topografia com diâmetros de 80 μm , que se mostrou ser o tamanho ideal dentro dos estudados, permitindo às células estarem a uma distância adequada para se conectarem entre si.

Analisando a literatura e procurando a inovação, o presente projeto visa a construção de *scaffolds* tridimensionais poliméricos de P(VDF-TrFE), com diferentes morfologias (porosa e não porosa) e fabricados com diferentes topografias de superfície e diferentes dimensões. A inovação está na produção de *scaffolds* 3D microestruturados, de material polimérico piezoelétrico P(VDF-TrFE), ainda não relatados na literatura. Estes *scaffolds* serão capazes de fornecer uma melhor mimetização do ambiente celular normal e, pelas diferentes morfologias e topografias, poderá influenciar de forma distinta o comportamento dos dois tipos celulares em estudo. Para além disso, na literatura, o estudo comportamental de diferentes linhas celulares em condições e métodos de trabalho diferentes carece de poder de comparação entre si, pelo que este trabalho irá permitir a comparação da influência de todas as morfologias e topografias obtidas nos dois tipos celulares.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Procedimento geral da produção dos *scaffolds*

A produção de *scaffolds* poliméricos com topografias de superfície 3D pode ser obtida de forma simples, barata e reprodutível, recorrendo a técnicas de microfabricação. A atividade experimental foi dividida em 4 etapas (Figura 3.1).

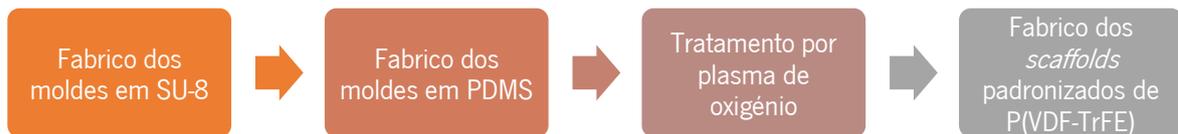


Figura 3.1: Representação gráfica das diferentes etapas para o fabrico dos *scaffolds* de P(VDF-TrFE).

A primeira etapa consistiu no fabrico dos moldes em SU-8. Esta etapa iniciou-se pelo desenho das estruturas desejadas para a padronização dos *scaffolds* e da sua impressão em fotolitos. De seguida utilizaram-se os mesmos para a obtenção dos diferentes moldes microestruturados em SU-8, recorrendo à técnica de fotolitografia. Posteriormente, procedeu-se à obtenção dos moldes em PDMS, como negativos dos moldes em SU-8, através de técnicas de prototipagem rápida por moldagem por réplica. Devido a elevada hidrofobicidade do PDMS, e de forma a promover a boa deposição da solução polimérica ao longo da estrutura, os moldes de PDMS foram sujeitos a tratamento por plasma de oxigénio, de modo a alterar a sua superfície tornando-a hidrofílica. Por fim, após a preparação da solução polimérica de P(VDF-TrFE), a mesma foi depositada nos moldes de PDMS. A cristalização do P(VDF-TrFE) foi realizada a duas temperaturas distintas para obtenção de diferentes morfologias, nomeadamente porosa e não porosa.

A utilização de moldes em PDMS tem a vantagem de poderem ser utilizados repetidamente sem que se danifiquem, reduzindo o custo e os processos necessários de fabrico [97].

As etapas de preparação dos moldes em SU-8 e PDMS foram levadas a cabo no Laboratório de Micro/Nanotecnologias e Aplicações Biomédicas do Departamento de Eletrónica Industrial da Universidade do Minho.

3.2. Fabrico dos moldes em SU-8

3.2.1. Desenho das máscaras fotolitográficas

O AutoCAD (versão experimental) é um programa da *Autodesk, Inc.* do tipo CAD, essencialmente utilizado para desenho técnico e criação de modelos bi- e/ou tridimensionais, nas áreas de arquitetura, *design*, engenharias, entre outros. O trabalho experimental iniciou-se pelo desenho, em duas dimensões (2D), das estruturas desejadas para a padronização dos moldes em SU-8. Foram desenhadas diferentes matrizes geométricas, que corresponderão às topografias de superfície dos diferentes *scaffolds*, com larguras de 20 μm e espaçamentos entre si de 25 μm , 75 μm e 150 μm , representadas na Tabela 3.1.

Tabela 3.1: Desenhos das diferentes matrizes geométricas em AutoCAD.

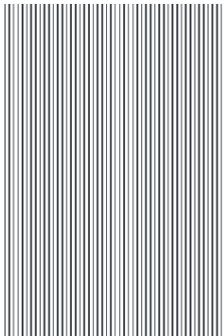
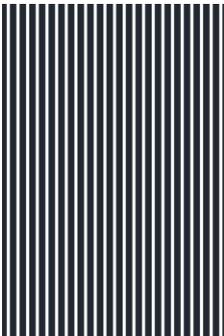
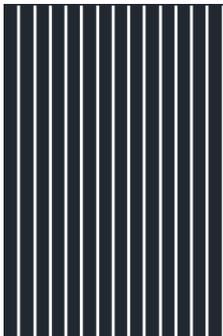
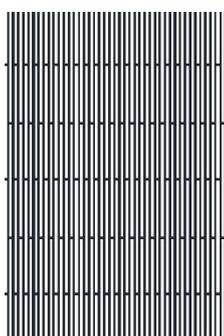
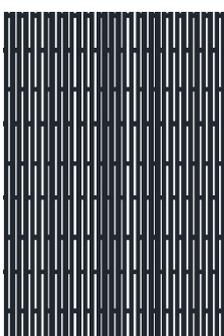
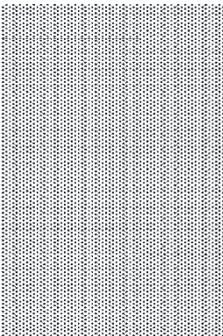
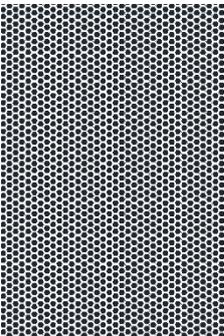
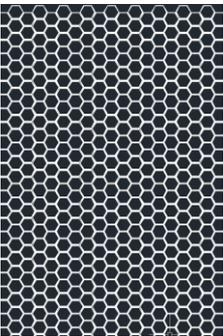
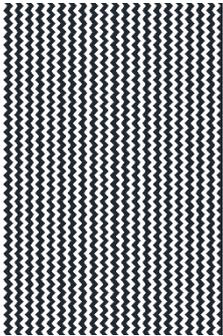
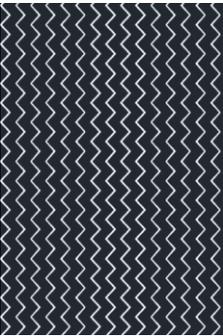
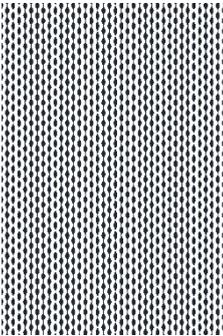
Estrutura	25 μm	75 μm	150 μm
Linhas			
Linhas intermitentes			

Tabela 3.1(continuação)

Estrutura	25 μm	75 μm	150 μm
Hexagonal			
Ziguezagues lineares			
Ziguezagues curvos			

Os desenhos foram posteriormente impressos em fotolitos (recorrendo a empresa *Microlitho*) e utilizados para o fabrico dos moldes em SU-8.

3.2.2. Obtenção dos moldes em SU-8

O fabrico dos moldes em SU-8 envolve vários passos litográficos (Figura 3.2). A técnica de fotolitografia é uma técnica que requer especial cuidado em determinados pontos do processamento, uma vez que influenciam diretamente as características do molde SU-8 obtido,

essencialmente ao nível da sua espessura. Os parâmetros de processamento devem estar ajustados e otimizados de acordo com as microestruturas desejadas, assim como as condições ambientais. Conseqüentemente, as condições utilizadas basearam-se em otimizações realizadas em trabalhos anteriores, tendo em conta uma temperatura ambiente compreendida entre 19 e 23°C [80]. Além disso, todo o processo foi realizado num ambiente ausente de luz natural.



Figura 3.2: Representação esquemática do processamento de SU-8.

1) Preparação do SU-8

A etapa inicial passou por escolher qual o SU-8 comercial (*MicroChem*) a utilizar, conforme a espessura desejada para as topografias. Definiu-se que a espessura seria o dobro da dimensão da respetiva microestrutura. Desta forma, optou-se pelo SU-8 25 para a obtenção de uma espessura de 50 μm , correspondente a microestruturas com dimensões de 25 μm . Para as microestruturas com dimensões de 75 e 150 μm , optou-se pelo SU-8 100 de forma a ser possível obter espessuras de 150 e 300 μm , respetivamente [80].

Neste passo de preparação fez-se a limpeza de lâminas de vidro, utilizadas como substrato (26x76mm *microscope slides, LabBox*), com álcool isopropílico (IPA) e secagem com pistola de azoto, de modo a remover quaisquer resíduos e favorecer a adesão do SU-8 ao substrato.

2) Deposição do SU-8

Os filmes de SU-8 foram depositados recorrendo a técnica de *spin-coating* (*Spin-coater Polos 200*). A espessura do filme é influenciada pela viscosidade da resina e pelos parâmetros escolhidos no processo de deposição, nomeadamente ao nível da velocidade, aceleração e tempo. Para a deposição da resina são necessários dois ciclos, nomeadamente, o ciclo de dispersão, no qual a aplicação de uma força centrífuga incita a dispersão do SU-8 do centro do substrato para as extremidades do mesmo e o ciclo de rotação, que define a espessura do SU-8. Deste modo, em primeiro lugar pesou-se 1 g de SU-8 na lâmina de vidro e em seguida definiu-se o ciclo de dispersão, igual para todas as amostras, com velocidade rotacional de 500 rpm e aceleração de 300 rpm/m durante 7 s. Os parâmetros utilizados no segundo ciclo foram

definidos de acordo com as espessuras desejadas para cada amostra, sendo apresentados na Tabela 3.2.

Tabela 3.2: Parâmetros utilizados no 2º ciclo de *spin-coating*, tendo em conta as diferentes espessuras de SU-8 desejadas.

	50 μm	150 μm	300 μm
Velocidade (rpm)	1000	3000	1750
Aceleração (rpm/s)	300	300	300
Tempo (s)	30	30	30

3) Pré-aquecimento

A etapa de pré-aquecimento foi realizada colocando as lâminas de vidro com o SU-8 depositado numa placa de aquecimento (*Prazitherm*). O respetivo processo de pré-aquecimento envolveu dois ciclos de temperaturas distintas com taxas de aquecimento controladas (2.5 °C/min), de modo a reduzir a tensão induzida no filme de SU-8 (Tabela 3.3). Os tempos apresentados não incluem o tempo necessário para a placa de aquecimento atingir a temperatura pretendida.

Tabela 3.3: Parâmetros utilizados no pré-aquecimento, tendo em conta as diferentes espessuras de SU-8.

		50 μm	150 μm	300 μm
1ºCiclo	Temperatura (°C)	65	65	65
	Tempo (min)	10	25	40
2ºCiclo	Temperatura (°C)	95	95	95
	Tempo (min)	30	60	100

Esta etapa tem como objetivo a remoção do solvente gama-butirolactona (GBL) presente no SU-8 comercial, de modo a que este endureça e seja promovida a sua adesão ao substrato de vidro. A adesão é importante para que no final do processo os moldes SU-8 obtidos possam ser

reutilizados. O primeiro ciclo apresenta uma temperatura mais baixa de maneira a permitir que ocorra uma evaporação lenta do solvente, resultando num melhorado revestimento e adesão. Por sua vez, o segundo ciclo permite a evaporação total do solvente e a densificação do SU-8. No final do procedimento, as lâminas de vidro foram colocadas a temperatura ambiente.

4) Exposição à luz UV

A exposição à luz UV é um passo fulcral no processamento do SU-8, uma vez que permite a transferência dos padrões impressos no fotolito para os filmes de SU-8. A exposição à radiação UV é responsável pela geração de um fotoácido, que vai promover a polimerização do SU-8 durante a próxima etapa do pós-aquecimento. Dito isto, as amostras foram colocadas num equipamento de exposição UV, constituído por 10 lâmpadas UV de 20 W (*Photomeca- type IPP 45*, Maxville) com uma faixa de emissão entre os 347 e 377 nm, que está dentro da faixa de emissão adequada para a exposição do SU-8. Os fotolitos foram colocados por cima das amostras de SU-8 depositadas nas lâminas de vidro e com um sistema de vácuo (integrado no equipamento) foi possível maximizar o contacto do fotolito com a amostra, de forma a evitar a presença de espaços vazios e a irradiação de luz para locais não desejados. O tempo de exposição foi definido de acordo com estudos previamente realizados [80] e depende da espessura do filme de SU-8 (Tabela 3.4).

Tabela 3.4: Tempos de exposição à radiação UV, tendo em conta as diferentes espessuras de SU-8.

	50 μm	150 μm	300 μm
Tempo (min)	3	7	12

5) Pós-Aquecimento

No processo de pós-aquecimento, a reticulação do SU-8 aumenta na área que foi exposta ao UV devido ao fotoácido gerado, tornando-o resistente à ação de solventes utilizados para remoção das áreas não polimerizadas, ou seja, das áreas não expostas à radiação UV, durante o processo de revelação.

Uma vez que a reação responsável pela reticulação é muito lenta à temperatura ambiente, as diferentes amostras foram sujeitas a 2 ciclos de temperatura, apresentados na Tabela 3.5. De forma semelhante ao processo de pré-aquecimento, os tempos apresentados não incluem o

tempo necessário para a placa de aquecimento atingir a temperatura pretendida. No fim do procedimento, as amostras foram colocadas a temperatura ambiente durante 10 min antes de iniciar o processo de revelação.

Tabela 3.5: Parâmetros utilizados no pós-aquecimento, tendo em conta as diferentes espessuras de SU-8.

		50 μm	150 μm	300 μm
1ºCiclo	Temperatura (°C)	65	65	65
	Tempo (min)	3	5	12
2ºCiclo	Temperatura (°C)	95	95	95
	Tempo (min)	6	10	20

6) Revelação

A etapa de revelação do SU-8 permite a remoção da resina não curada, revelando o padrão desejado proveniente dos fotolitos. A revelação foi realizada por imersão das amostras no revelador comercial da *MicroChem* colocado numa tina de vidro e sujeito a uma agitação magnética (*MSH 300, BOECO*) de forma a aumentar a eficiência de remoção do SU-8 e facilitar a revelação de zonas mais difíceis. Os tempos de agitação variam com a espessura desejada, sendo apresentados na Tabela 3.6. Findo o processo, as amostras foram limpas com IPA e secas com pistola de azoto.

Tabela 3.6: Tempos necessários de revelação, tendo em conta as diferentes espessuras de SU-8.

	50 μm	150 μm	300 μm
Tempo (min)	5	10	25

3.3. Fabrico dos moldes em polidimetilsiloxano

Para a microfabricação de moldes em PDMS recorreu-se aos moldes em SU-8, padronizados

pelo processo descrito no subcapítulo anterior. O processo de fabrico dos moldes em PDMS encontra-se esquematizado na Figura 3.3.



Figura 3.3: Representação esquemática do processamento de PDMS.

1- Preparação do PDMS

O PDMS é comercializado em dois componentes, nomeadamente, a base ou monómero e o agente de cura. Para a sua preparação foi necessário ter em conta a proporção agente de cura : base a utilizar, que é essencial para a elasticidade do PDMS, já que é a responsável pela quantidade de ligações cruzadas na posterior reticulação do mesmo. A proporção utilizada neste trabalho foi de 1:10 (agente de cura/base), que é a proporção recomendada pelo fabricante [98]. Após a mistura adequada dos dois componentes com a ajuda de uma espátula, a mesma foi desgaseificada com recurso a um sistema de vácuo (fabricado no laboratório) até a obtenção de uma mistura homogénea e sem quaisquer bolhas de ar, levando aproximadamente 30 min.

2- Preparação das lâminas que contêm as estruturas em SU-8

Para a deposição da solução de PDMS foi indispensável a criação de limites/paredes nas lâminas de vidro que continham o SU-8. Esses limites foram criados recorrendo a fita adesiva de alumínio rígida, coladas na base e extremidade das lâminas.

3- Deposição do PDMS

Aproximadamente 5 g de solução de PDMS foi vertida lentamente em cada molde de SU-8. Esta deposição foi efetuada numa das extremidades do respetivo molde, de modo a que a solução se distribuisse por toda a estrutura sem criar bolhas de ar. Após ficar homogeneamente distribuída, deixou-se repousar durante 10 min para que a superfície ficasse plana.

Simultaneamente, 5 g de solução de PDMS foi também depositada em lâminas de vidro livres de estruturas em SU-8, delineadas também com fita adesiva de alumínio. Desta forma, foram criados filmes de PDMS não padronizados, utilizados para delimitar as paredes dos moldes de PDMS padronizados e para dar forma a moldes de PDMS lisos, por sua vez utilizados para a obtenção de *scaffolds* em P(VDF-TrFE) sem topografias de superfície.

4- Cura do PDMS

Após o preenchimento dos moldes de SU-8 com a solução de PDMS, foram colocados numa placa de aquecimento a 100 °C até à cura total do PDMS, que demorou aproximadamente 35 min.

5- Destacamento do PDMS curado do molde de SU-8

Após o término da polimerização do PDMS, as amostras foram retiradas da placa de aquecimento e deixadas durante uns minutos à temperatura ambiente para arrefecerem. Com a ajuda de um bisturi, as amostras em PDMS foram cortadas numa delimitação de aproximadamente 8 mm além das margens da zona padronizada e, utilizando uma pinça, foram destacadas cuidadosamente do molde de SU-8.

6- Criação de paredes para formação dos moldes de PDMS

Para a posterior deposição da solução polimérica de P(VDF-TrFE), foi indispensável a criação de limites/paredes nas amostras em PDMS. Os limites foram criados recorrendo aos filmes de PDMS sem padrões produzidos anteriormente.

Os filmes sem padrões foram destacados das lâminas de vidro com uma pinça e recortados com um bisturi em retângulos, com tamanho semelhante às amostras em PDMS padronizadas. De seguida, recortou-se um outro retângulo no interior dos filmes de PDMS sem padrões, de forma a obter uma estrutura com paredes laterais, de aproximadamente 4 mm de largura. Após remoção do retângulo interior, os filmes recortados foram colados aos PDMS padronizados, usando solução de PDMS não curado. De seguida, os moldes obtidos foram dispostos numa placa de aquecimento a 100 °C para que ocorresse a cura do PDMS, ligando a estrutura às paredes.

Simultaneamente aos moldes padronizados, moldes de PDMS não padronizados foram fabricados, de forma a serem obtidos *scaffolds* de controlo (sem padrão) para os ensaios de adesão celular.

3.3.1. Tratamento dos moldes de polidimetilsiloxano por plasma de oxigénio

O carácter hidrofóbico ou hidrofílico da superfície do PDMS é uma característica determinante em muitas aplicações. Na sua forma natural, o PDMS é um polímero hidrofóbico com um ângulo de

contacto de aproximadamente 110° [90]. Para que a deposição da solução polimérica de P(VDF-TrFE) e a sua entrada nas estruturas micrométricas fosse bem-sucedida, foi necessário tornar a superfície do molde hidrofílica de modo a aumentar a sua molhabilidade e assim permitir a obtenção de uma réplica perfeita da estrutura do molde.

O tratamento por plasma de oxigénio é muito utilizado para alterar a superfície de polímeros hidrofóbicos, tornando-a hidrofílica [92, 98, 99]. A descarga uniforme do plasma de oxigénio dá origem a oxigénio atómico que reage com grupos de carbono presentes na superfície do material, nomeadamente com grupos metil ($-\text{CH}_3$). Estes grupos, responsáveis pela hidrofobicidade do material, vão ser substituídos por grupos hidroxilo ($-\text{OH}$) aquando a redução da superfície exposta ao plasma. O aumento da concentração de grupos hidroxilo vai tornar a superfície hidrofílica, com ângulos de contacto inferiores a 90° [38].

De forma a otimizar o processo e a conhecerem-se quais as melhores condições de tratamento de plasma de oxigénio, foi feito um estudo prévio do comportamento de PDMS não padronizado. Para tal foi utilizada a câmara *Electronic Diener Plasma-Surface-Technology* da *Zepto*, presente no Laboratório de Revestimentos Funcionais III da Universidade do Minho em Azurém. De seguida, as amostras foram caracterizadas por ângulo de contacto de forma a verificar a eficácia do tratamento. Verificou-se que o tratamento por plasma de oxigénio a uma potência de 100 W e uma pressão de oxigénio de 0,8 mbar, durante 20 min, seria o mais adequado para a obtenção de superfícies hidrofílicas de PDMS.

3.4. Fabrico dos *scaffolds* padronizados de poli(fluoreto de vinilideno-co-trifluoretileno)

Após tratamento por plasma de oxigénio, as amostras de PDMS foram imediatamente levadas para o laboratório de preparação, de modo a lhes serem depositadas a solução polimérica previamente preparada.

1- Preparação da solução polimérica de P(VDF-TrFE)

P(VDF-TrFE) em pó (70/30 % mol, *Solvay*) foi dissolvido em DMF (*Merk*) com uma fração volumétrica de copolímero de 8 %, recorrendo a um agitador magnético (*Ika C-Mag HS7*). Nos primeiros 15 min a solução foi exposta a um ligeiro aquecimento a 30°C , de forma a evitar a formação de agregados e facilitar a dissolução do copolímero. A agitação foi mantida até que

uma solução transparente e homogénea fosse obtida, o que levou aproximadamente 1 h. Durante todo o procedimento o recipiente contendo a solução foi selado com *parafilm*, de forma a evitar a evaporação do solvente.

2- Deposição da solução polimérica de P(VDF-TrFE) nos moldes de PDMS

A solução de P(VDF-TrFE) foi vertida lentamente nos moldes de PDMS até perfazer a altura das paredes dos mesmos. Esta deposição foi realizada numa das extremidades do molde em PDMS de modo a que a solução se distribuisse por toda a estrutura sem criar bolhas de ar. Após ficar homogeneamente distribuída, deixou-se repousar durante 5 min para que a superfície ficasse plana.

3- Cristalização da solução polimérica de P(VDF-TrFE)

Como referido anteriormente, a cristalização do P(VDF-TrFE) foi realizada a duas temperaturas, para obtenção de *scaffolds* com morfologias distintas, i.e. porosas e não porosas. De facto, a variação da porosidade dos *scaffolds* pode ser obtida pelo controlo da taxa de evaporação do solvente, que depende diretamente da temperatura de cristalização [100]. Uma temperatura mais elevada aumenta a taxa de evaporação do solvente, evitando a formação de poros. Este resultado deve-se ao facto das cadeias poliméricas possuírem mobilidade suficiente para ocupar o espaço livre deixado pelo solvente durante a evaporação, levando à formação de uma estrutura mais compacta [100, 101]. Dito isto, e considerando estudos referenciados, uma temperatura de aproximadamente 25 °C foi utilizada de forma a obter *scaffolds* de P(VDF-TrFE) porosos e uma temperatura de 100 °C de forma a obter *scaffolds* de P(VDF-TrFE) não porosos [101]. Para tal, os moldes de PDMS, preenchidos com solução de P(VDF-TrFE), foram colocados num forno (2000208 da *Selecta*) à temperatura desejada, demorando aproximadamente 3 dias a cristalizar para as amostras porosas e 3 h para as não-porosas. Uma cor branca e uma cor transparente caracterizam as amostras porosas e não porosas, respetivamente. No fim do processo, os *scaffolds* de P(VDF-TrFE) foram facilmente removidos dos moldes de PDMS (devido a baixa energia de superfície e maleabilidade do PDMS), sendo estes últimos lavados com acetona e água destilada e devidamente armazenados para posterior reutilização.

Desta forma, foram obtidos *scaffolds* de P(VDF-TrFE) porosos e não porosos, não padronizados e padronizados e com as diferentes topografias de superfície, prontos a serem caracterizados e testados em ensaios celulares.

3.5. Polarização elétrica dos *scaffolds* por descarga de corona

Embora os *scaffolds* de P(VDF-TrFE) possuam domínios ferroelétricos polares, estes encontram-se aleatoriamente orientados. Deste modo, para que se verifique atividade piezoelétrica por parte do material, é necessário proceder-se à sua polarização. Na literatura não existe qualquer estudo acerca da capacidade de polarização deste tipo de *scaffolds* e, embora a sua atividade piezoelétrica não seja uma variável em estudo no presente trabalho, apenas como prova de conceito, foi efetuada a tentativa de polarização elétrica dos *scaffolds* “controlo”, por descarga de corona.

A polarização dá-se dentro de uma câmara de corona, a qual possui uma ponta de corona, suspensa sobre a amostra ligada por fita condutora a uma base metálica, por sua vez ligada à terra. Durante o processo a ponta é submetida a uma tensão elétrica elevada, ocorrendo a acumulação de cargas elétricas na sua reduzida área. A acumulação excessiva de cargas faz com que ocorra uma descarga elétrica (descarga de corona) a partir da ponta de corona, gerando um plasma responsável por ionizar o ar no interior da câmara. Os iões positivos gerados vão ser atraídos para a base metálica, depositando-se sobre a superfície da amostra [102]. Esta deposição faz com que ocorra a orientação das cargas negativas, presentes na amostra polimérica, na direção das cargas positivas depositadas à sua superfície. Deste modo, pela orientação dos domínios ferroelétricos dá-se a polarização da amostra [103].

As amostras cristalizadas a 25 °C e 100 °C, porosas e não porosas, respetivamente, foram então sujeitas a polarização elétrica sob descarga de corona no interior de uma câmara de corona, fabricada pelo grupo de investigação *Eletroactive Smart Materials*, no laboratório “Propriedades Magnéticas e Eletromecânicas” da Universidade do Minho (Figura 3.4). Individualmente, as amostras foram colocadas na base metálica do interior da câmara a uma distância de 2 cm da ponta, à qual foi aplicada uma tensão constante de 12,5 Kv a uma corrente reajustável até um máximo de 20 μ A em temperatura controlada de 100 °C. As amostras foram sujeitas a um campo de corona durante 60 minutos e, ao arrefecerem, permaneceram sobre campo elétrico até atingirem a temperatura ambiente, para que os domínios ferroelétricos fossem bloqueados no estado polarizado. Estes foram os valores de polarização selecionados após prévia otimização da tensão e corrente aplicadas, assim como da temperatura de polarização.

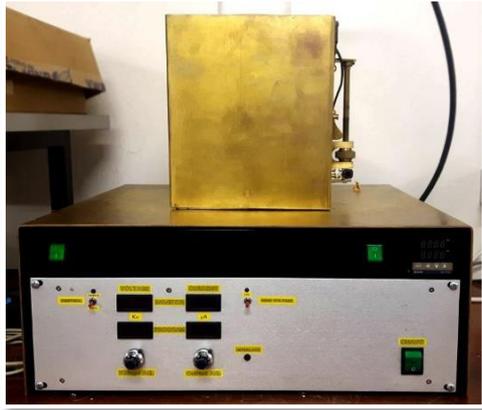


Figura 3.4: Câmara de descarga de corona utilizada para polarização das amostras.

Para posterior avaliação da atividade piezoelétrica do material foi utilizado um sistema designado como d_{33} -meter APC YE2730A, descrito na secção 3.7.7.

3.6. Ensaios de adesão celular

Os ensaios de adesão celular foram realizados com células de pré-osteoblastos de linha celular MC3T3-E1, e com células de mioblastos de linha celular C2C12. Os ensaios de citotoxicidade não foram realizados nas amostras produzidas, visto já existirem estudos que comprovam a não toxicidade do P(VDF-TrFE) [48]. Inicialmente, foram realizados ensaios de adesão aos *scaffolds* com dimensão de 150 μm (de todas as morfologias e topografias), de forma a avaliar a influência das várias topografias na adesão celular. De seguida, foram efetuados ensaios celulares nos *scaffolds* porosos e não porosos, de 25 e 75 μm , referentes às topografias mais representativas, ou seja, a mais isotrópica e mais anisotrópica (“linhas” e “hexagonais”, respetivamente).

1- Esterilização das amostras

Os *scaffolds* foram cortados em círculos de 6 mm de diâmetro e expostos à radiação UV durante 1 h de cada lado. De seguida, as amostras foram colocadas em placas de cultura de 48 poços, uma para os ensaios com as MC3T3-E1 e outra com as C2C12, e sujeitas a 5 lavagens de 5 min com tampão fosfato salino a 1 % (PBS 1 %).

De modo a que não ocorressem deslocamentos do material durante os ensaios de adesão, os *scaffolds* foram colados no fundo dos poços com fita de carbono.

2- Cultura celular

As células MC3T3-E1 (*Riken Bank*) foram colocadas em crescimento em frascos de cultura de 75 cm² utilizando meio DMEM (do inglês *Dulbecco's modified Eagles's medium*, Gibco) contendo 1 g.L⁻¹ de glucose, 10 % de soro fetal bovino (SFB, *Biochrom*) e 1 % de penicilina/estreptomicina (P/E, *Biochrom*) em condições padrão de cultura celular (incubadora a 37 °C, com 95 % ar humidificado com 5% dióxido de carbono, CO₂).

Por sua vez, as células C2C12 foram colocadas em DMEM com 4,5 g.L⁻¹ de glucose suplementado também com 10 % SFB e 1 % P/E em frascos de cultura de 75 cm² dentro das condições padrão de cultura acima referidas. Os meios de cultura foram mudados a cada 2 dias e as células foram passadas para subculturas quando atingiram 60-70 % de confluência.

3- Ensaio de adesão celular

Para o ensaio de adesão celular foram colocadas 2500 células por amostra. Para tal, foi adicionada uma gota de 25 µL de suspensão celular por cima de cada *scaffold*, utilizando uma concentração celular de 10x10⁴ células.mL⁻¹. De seguida, as placas foram incubadas durante 30 min de forma a que as células aderissem e, após esse tempo, perfez-se o volume do poço com meio celular, incubando novamente durante 24 h.

3.6.1. Preparação das amostras para visualização por microscopia de fluorescência

De forma a observar o comportamento das células nos diferentes tipos de *scaffolds* processados, as amostras foram preparadas para visualização por imunofluorescência.

1- Fixação celular

Após a conclusão dos ensaios de adesão (24 h), as células foram fixadas. Para tal, as amostras foram lavadas com PBS a 1 %, fixadas com formaldeído a 4 % (*Panreac*) e incubadas durante 10 min a 37 °C com uma atmosfera de CO₂ de 5 %.

2- Imunofluorescência

Para a observação do comportamento celular nas diferentes estruturas, foram realizados ensaios

de imunofluorescência que permitiram a visualização das células ao microscópio ótico de fluorescência. Estes ensaios permitem a determinação da morfologia celular e da sua localização.

Após o passo de fixação, as células foram lavadas 3 vezes com PBS a 1 %. De seguida, as amostras foram incubadas numa solução de 1 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ de tetrametilrodamina (TRITC, *Sigma Aldrich*) durante 45 min à temperatura ambiente, lavadas novamente com PBS a 1 % e incubadas numa solução de 0,1 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ de dihidroclorato de 4',6-diamidino-2-fenilindole (DAPI, *Sigma Aldrich*) durante 5 min à temperatura ambiente. As células foram novamente lavadas uma vez com PBS a 1 % e de seguida com água destilada. Por fim, as amostras foram colocadas em lâminas e visualizadas ao microscópio de fluorescência (*Olympus BX5 1 Microscope*).

3.6.2. Preparação das amostras para visualização por microscopia eletrónica de varrimento

Para complementar a observação do comportamento das células nos *scaffolds*, recorreu-se à microscopia eletrónica de varrimento (SEM do inglês *scanning electron microscopy*), cuja técnica será descrita posteriormente no subcapítulo 3.7.2. Apenas as amostras que se mostraram mais relevantes, após análise por microscopia de fluorescência, foram visualizadas por esta técnica.

As respetivas amostras foram desidratadas sucessivamente com etanol a 10 %, 30 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 % e 99 %, em períodos de 20 min. Este passo de desidratação foi utilizado para que a estrutura das células fosse mantida, substituindo lentamente o seu conteúdo em água, para que, quando sujeitas ao vácuo do SEM, não ocorresse a sua lize ou alteração da sua forma.

3.7. Técnicas de caracterização

3.7.1. Estereomicroscopia

Esta técnica consiste num sistema de microscopia do tipo ótica que funciona a baixa magnificação. Este sistema utiliza a luz naturalmente refletida pela superfície do objeto para a sua visualização (e não luz transmitida como é usual por outros sistemas óticos), pelo que é ideal para visualização de amostras opacas e compactas. Para além disso, o estereomicroscópio usa duas objetivas e oculares independentes que fornecem ângulos de visão ligeiramente

diferentes a cada olho, permitindo a produção de uma imagem tridimensional da amostra a ser analisada, ideal para visualização de amostras com topografias complexas [104].

Foi utilizado um estereomicroscópio (*Leica M80*) para a visualização das amostras durante todas as fases de processamento, observando-se os moldes em SU-8, seguido dos moldes em PDMS e, finalmente, os *scaffolds* em P(VDF-TrFE). As imagens foram visualizadas e fotografadas recorrendo ao programa de visualização *LAS EZ (Leica)*, de forma a ser verificada a qualidade dos padrões obtidos nas diferentes fases de fabrico.

3.7.2. Microscopia eletrónica de varrimento

As matrizes à superfície dos *scaffolds* de P(VDF-TrFE) com topografias mais representativas, i.e. com maior e menor anisotropia (“linhas” e “hexagonais”, respetivamente), foram caracterizadas recorrendo ao SEM (*Quanta 650 FEG da FEI*).

O SEM é uma ferramenta capaz de fornecer imagens 3D com alta resolução de diferentes materiais sólidos, biológicos ou não, desde a micro- à nanoescala, ao nível de topografia, microestrutura, cristalografia, composição química entre outras [105]. A amostra a ser analisada é submetida a um feixe de eletrões focalizado que, ao interagir com a sua superfície, vai gerar diferentes sinais que vão ser detetados e convertidos em informação. Estes sinais, resultantes da dissipação de energia que os eletrões sofrem ao atingir a amostra, incluem eletrões secundários (SE do inglês *secondary electrons*), eletrões retrodifundidos (BSE do inglês *backscattered electrons*), eletrões retrodifundidos difratados (EBSD do inglês *diffracted backscattered electrons*), fótons de raios-X, luz visível e calor. As deteções dos SE e dos BSE são as mais utilizadas para a obtenção de imagem, sendo que os primeiros são os melhores a demonstrar a morfologia e topografia da amostra e os segundos são os que permitem a melhor visualização de contrastes em amostras multifásicas, permitindo uma rápida discriminação das diferentes fases. Por sua vez, os EBSD são utilizados para determinar a estrutura cristalina da amostra e a sua orientação [106].

Relativamente ao presente trabalho, o microscópio operou em condições de deteção de ETD (do inglês, *Everhart-Thornley Detector*), que consiste num detetor SE, com uma voltagem de aceleração de 3 KV. As amostras foram previamente revestidas com uma camada nanométrica de ouro, recorrendo ao equipamento *Polaron SC502*, de modo a garantir uma boa produção de

elétrões secundários.

3.7.3. Ângulo de contacto

Quando uma gota está em repouso sob uma superfície plana homogénea, observa-se a presença de uma linha comum entre as fases de vapor, líquida e sólida. Essa linha é designada por linha de contacto, originando a definição de ângulo de contacto (θ). Este último define-se como o ângulo entre a linha tangente à interface que separa o líquido e o vapor e a linha tangente à superfície do sólido sobre a qual o líquido se encontra ou se move (Figura 3.5) [103, 107, 108]. O ângulo de contacto surge então como a medida da hidrofobicidade dos materiais.

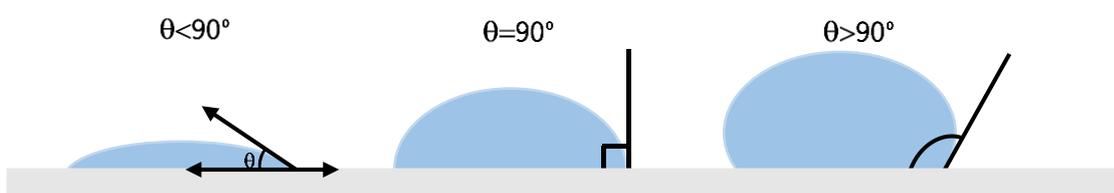


Figura 3.5: Diagrama representativo das possíveis interações de uma gota com uma superfície sólida, demonstrada pelo seu ângulo de contacto. Adaptado de [107].

Define-se como um material hidrofóbico o que possua um ângulo de contacto superior a 90° e hidrofílico um ângulo inferior a 90° . A maior energia de superfície, característica das superfícies hidrofílicas, resulta na maior interação da superfície sólida com o líquido detendo assim boa molhabilidade e apresentando um ângulo de contacto reduzido comparativamente às superfícies hidrofóbicas, que possuem menor energia de superfície e, conseqüentemente, ângulos de contacto maiores [108].

A medição de ângulos de contacto foi efetuada para a caracterização dos materiais ao nível da sua molhabilidade, de forma a observar a influência das diferentes topografias de superfície na molhabilidade do P(VDF-TrFE). Os ângulos de contacto foram medidos por goniometria no equipamento de ângulo de contacto (*OCA, Dataphysics*) presente no Centro de Engenharia Biológica da Universidade do Minho em Braga (Figura 3.6). Para a formação da gota foi utilizada uma agulha Hamilton de $500\ \mu\text{L}$ colocada no respetivo suporte do equipamento. A libertação da gota, com um volume de $3\ \mu\text{L}$ de água ultrapura, foi feita através do software SCA20 versão 2, utilizando o método de gota sésil a uma velocidade de $2\ \mu\text{L}\cdot\text{s}^{-1}$.

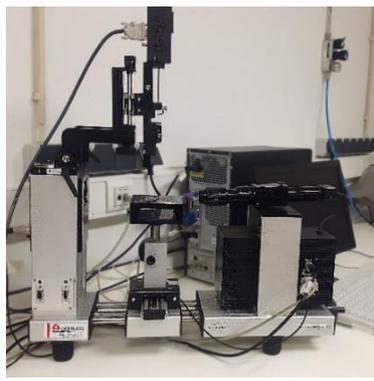


Figura 3.6: Equipamento de medição de ângulo de contacto utilizado.

3.7.4. Espectroscopia de infravermelhos com transformadas de *Fourier*

A espectroscopia de infravermelhos com transformadas de *Fourier* (FTIR do inglês *fourier transform infrared spectroscopy*) é uma técnica comumente utilizada na caracterização de materiais poliméricos e baseia-se na interação da matéria com ondas eletromagnéticas, na gama dos infravermelhos ($400 - 4000 \text{ cm}^{-1}$), ao nível das vibrações moleculares [109].

A absorção da radiação por parte de uma molécula conduz a variações dos movimentos vibracionais e/ou rotacionais das suas ligações químicas. O espectro de absorção, resultante da passagem de um feixe de radiação infravermelha (IV), vai apresentar os picos de absorção correspondentes às frequências de vibração entre as ligações dos átomos que constituem o material. Para que a vibração ocorra e apareça no espectro, a molécula ou grupo funcional em estudo deve sofrer uma variação no seu momento dipolar durante a vibração. Estas variações acontecem em números de onda específicos dependendo da ligação química, ou seja, diferentes grupos funcionais absorvem a radiação IV a frequências características, obtendo-se espectros específicos especialmente na zona entre os 400 e 1000 cm^{-1} (que se representa como a “impressão digital” molecular do material em estudo) [110].

A técnica FTIR é utilizada na identificação e caracterização de materiais, na determinação da qualidade de uma amostra e na quantidade de determinados componentes numa mistura. É das técnicas mais utilizadas para identificação das fases cristalinas presentes nos filmes de PVDF e dos seus copolímeros, o que se deve ao facto das diferentes fases cristalinas apresentarem modos vibracionais moleculares específicos que podem favorecer ou restringir determinados modos de vibração dos grupos de átomos constituintes das cadeias poliméricas. Como já

exposto anteriormente, o P(VDF-TrFE) apresenta-se na configuração tipo *all trans* (TTT') planar, identificada pelas bandas de absorção característica da fase β do PVDF, aos 510 e 840 cm^{-1} [111, 112]. De forma a confirmar a inexistência da fase α é também importante referir que a sua banda característica de absorção se encontra presente aos 763 cm^{-1} [112].

No presente trabalho, os espectros foram obtidos com o auxílio de um espectrofotómetro *Spectrum Two™* da Perkin-Elmer, possuidor de um sistema de reflexão total atenuada (ATR do inglês *attenuated total reflection*). Os espectros de FTIR-ATR do P(VDF-TrFE), expostos a diferentes temperaturas de cristalização, foram obtidos num intervalo de 400 a 4000 cm^{-1} com uma resolução de 4 cm^{-1} e 64 varrimentos por amostra. Deste modo será possível comprovar se a temperatura de cristalização afeta ou não a fase em que se encontra o copolímero.

3.7.5. Calorimetria Diferencial de Varrimento

A calorimetria diferencial de varrimento (DSC, do inglês *differential scanning calorimetry*) consiste numa técnica calorimétrica que tem aplicabilidade na medição das propriedades térmicas de um material, nomeadamente na medição do ponto de fusão dos materiais em estudo. Este método utiliza o registo do fluxo de energia calorífica, associado a transições de fase do material, em função do fluxo de calor para uma referência (neste caso um cadinho vazio). O sistema de DSC irá medir o calor irradiado (exotérmico) ou absorvido (endotérmico) pela amostra, comparativamente com uma referência enquanto ambas são submetidas ao mesmo processo de aquecimento ou arrefecimento [113].

Este tipo de caracterização é importante para perceber se o processamento dos *scaffolds* alterou as propriedades físicas e químicas do polímero que o constitui. Neste caso específico, o objetivo consistiu em detetar as diferenças, relativamente às características calorimétricas, do material poroso em relação ao não poroso, detetando alterações que poderão ter ocorrido ao nível da cristalização ou do ponto de fusão.

Para o processo foram utilizados aproximadamente 6 mg de cada tipo de P(VDF-TrFE), nomeadamente poroso e não poroso, analisados individualmente pelo sistema de DSC de modelo 6000 da *Perkin-Elmer* (Figura 3.7), que operou com um fluxo de calor de 10 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ expondo as amostras desde os 25 $^{\circ}\text{C}$ aos 650 $^{\circ}\text{C}$ de temperatura.



Figura 3.7: Equipamento de DSC utilizado.

A percentagem de cristalinidade $X_c(\%)$ dos materiais foi calculada pela seguinte equação:

$$X_c(\%) = \frac{\Delta H_f}{\Delta H_{100}} \times 100$$

na qual, ΔH_f corresponde à entalpia de fusão experimental e ΔH_{100} à entalpia de fusão para qual o copolímero em questão é 100 % cristalino [114].

3.7.6. Termogravimetria

A Termogravimetria (TGA do inglês *Thermogravimetry Analysis*) é uma técnica destrutiva, também calorimétrica, que monitoriza a variação da massa de uma amostra em função da temperatura. O material a ser analisado é colocado no sistema de TGA, imediatamente acima de uma balança de alta precisão, e à medida que a temperatura aumenta vai sendo feito o registo da sua massa, gerando um gráfico com a perda de massa percentual em função da temperatura à qual o material é exposto.

A variação da massa registada pelo programa deve-se à rutura de ligações químicas e consequente libertação de produtos voláteis, observando-se a perda de massa. Também pode acontecer o aumento da massa, caracterizada pela formação de ligações químicas originando a fixação de produtos. Assim sendo, esta técnica permite concluir acerca da estabilidade térmica dos materiais e seus constituintes [115].

Para o processo foram utilizados aproximadamente 10 mg de cada tipo de P(VDF-TrFE), nomeadamente poroso e não poroso, analisados individualmente pelo sistema de TGA de modelo 4000 da Perkin-Elmer (Figura 3.7), que operou com um fluxo de calor de $10 \text{ }^\circ\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$

expondo as amostras desde os 30 aos 200 °C de temperatura.



Figura 3.8: Equipamento de TGA utilizado.

3.7.7. Propriedades piezoelétricas

Após polarização por descarga de corona, o comportamento piezoelétrico dos materiais foi definido através da determinação do coeficiente piezoelétrico d_{33} . Este coeficiente corresponde à polarização na direção “3” (ao longo da espessura) por unidade de stresse aplicado no eixo “3”, cuja unidade é Coulomb por Newton (C.N⁻¹). Para a medição do coeficiente foi utilizado um d_{33} -meter APC YE2730A (Figura 3.9). Este consiste num sistema eletromecânico que mede a variação de tensão em circuito aberto aos terminais da amostra no sentido da pressão mecânica aplicada [116]. A tensão aplicada irá gerar energia elétrica caso o material apresente atividade piezoelétrica.



Figura 3.9: Equipamento d_{33} -meter utilizado para a medição do coeficiente piezoelétrico d_{33} .

As amostras foram colocadas, individualmente, entre as duas pontas de prova condutoras, onde foram submetidas a uma pressão mecânica, de aproximadamente 0,25N, aplicada na direção

normal ao material (direção “3”) previamente polarizado na mesma direção. Tal força é aplicada ciclicamente num sinal de onda quadrada a uma frequência de 110Hz. O coeficiente d_{33} é fornecido diretamente pelo dispositivo através do processamento dos sinais elétricos provenientes da amostra quando comparados a uma referência interna [117].

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Análise estrutural e morfológica

A estereomicroscopia foi a técnica utilizada para a visualização das amostras durante os diferentes estágios de processamento, incluído os moldes em SU-8, os moldes em PDMS, assim como os *scaffolds* em P(VDF-TrFE). Esta visualização mostrou-se fundamental para observar as diferentes topografias de superfície obtidas e assim avançar nos métodos com a certeza de que os procedimentos estavam a correr como planeado. No entanto, pela sua composição porosa, não foi possível observar a padronização das amostras de P(VDF-TrFE) cristalizadas a 25 °C. Deste modo, após o fabrico dos *scaffolds*, foram selecionadas as amostras mais representativas para observação por SEM, técnica que permite a aquisição de imagens com maior ampliação, maior noção de profundidade e maior resolução.

Imagens de estereomicroscopia das amostras constituídas por matrizes de “linhas”, “linhas intermitentes”, “hexagonais”, “zigzagues lineares” e “zigzagues curvos” com dimensões de 25, 75 e 150 μm , estão representadas na Figura 4.1, Figura 4.2, Figura 4.3, Figura 4.4 e Figura 4.5, respetivamente.

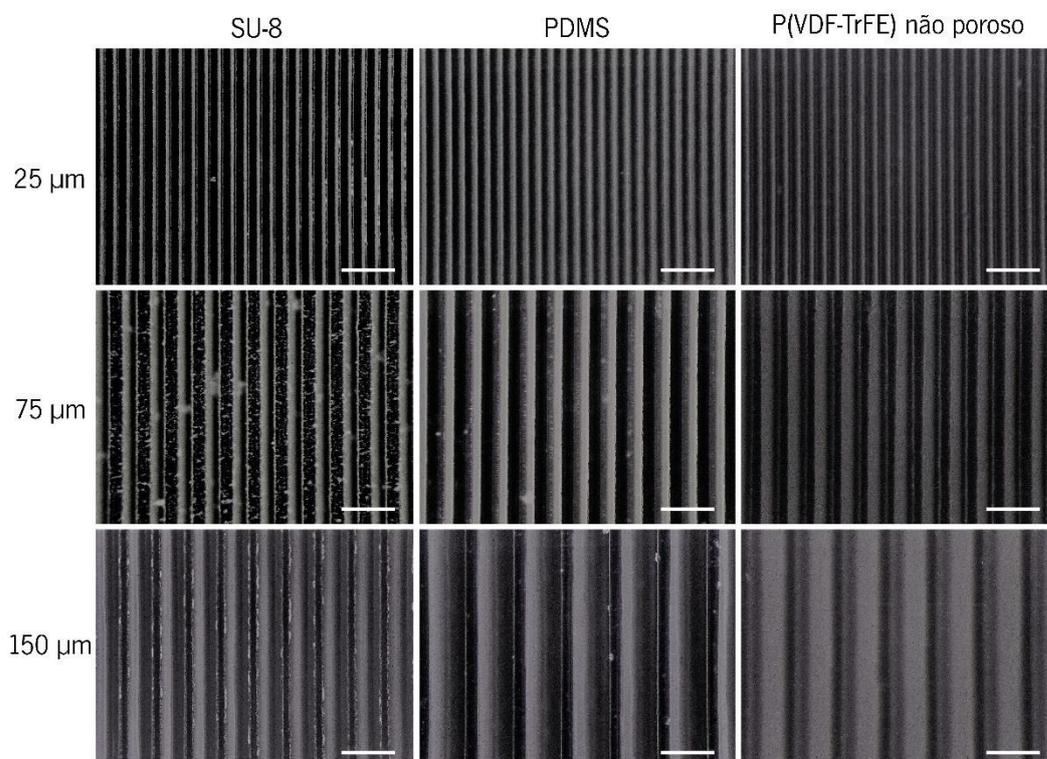


Figura 4.1: Imagens obtidas por estereomicroscopia referentes à topografia tipo “linhas”, nos diferentes estágios de processamento. Escala apresentada: 200 μm .

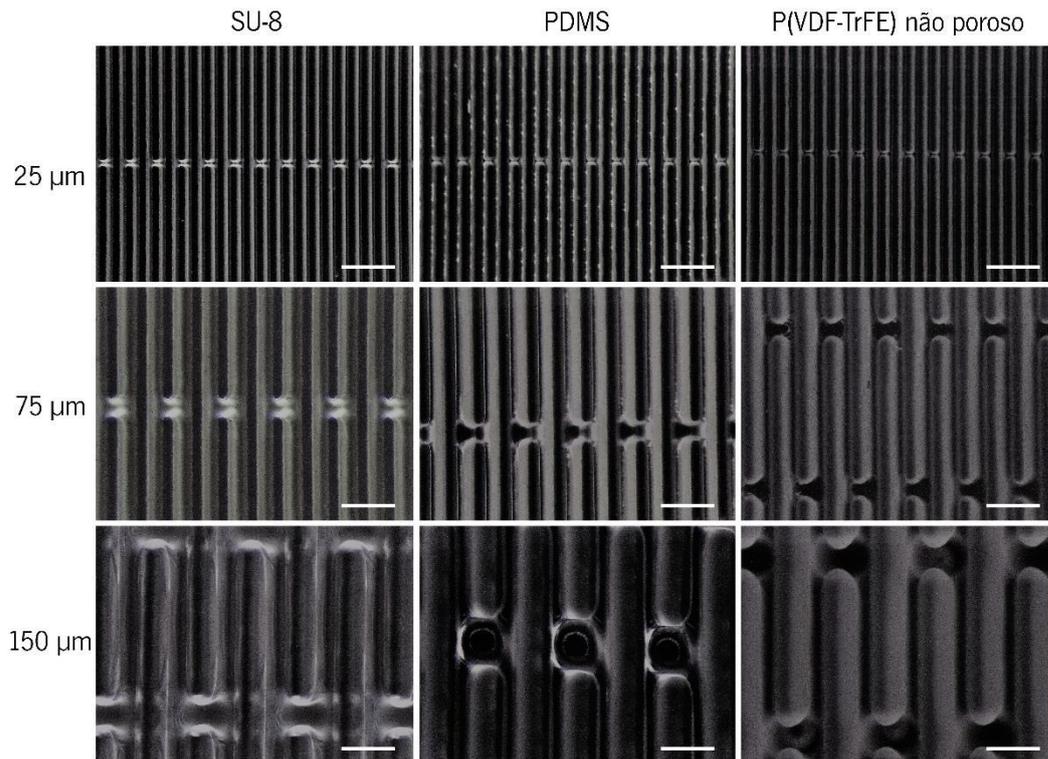


Figura 4.2: Imagens obtidas por estereomicroscopia referentes à topografia tipo “linhas intermitentes”, nos diferentes estágios de processamento. Escala apresentada: 200 μm .

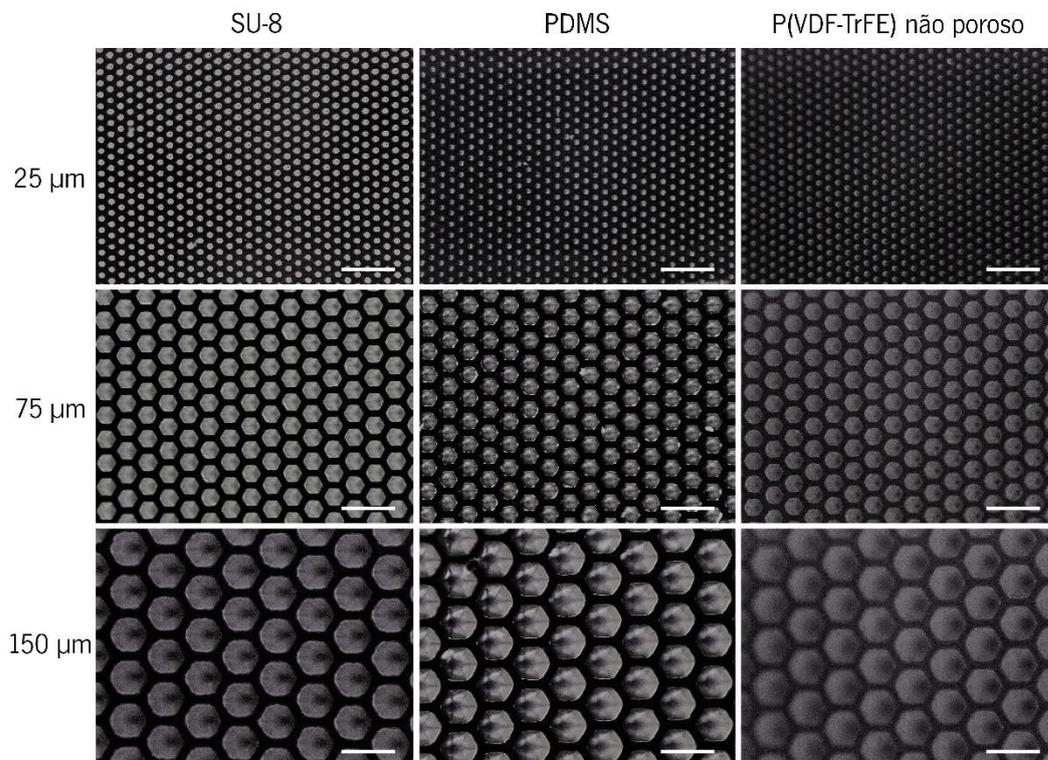


Figura 4.3: Imagens obtidas por estereomicroscopia referentes à topografia tipo “hexagonais”, nos diferentes estágios de processamento. Escala apresentada: 200 μm .

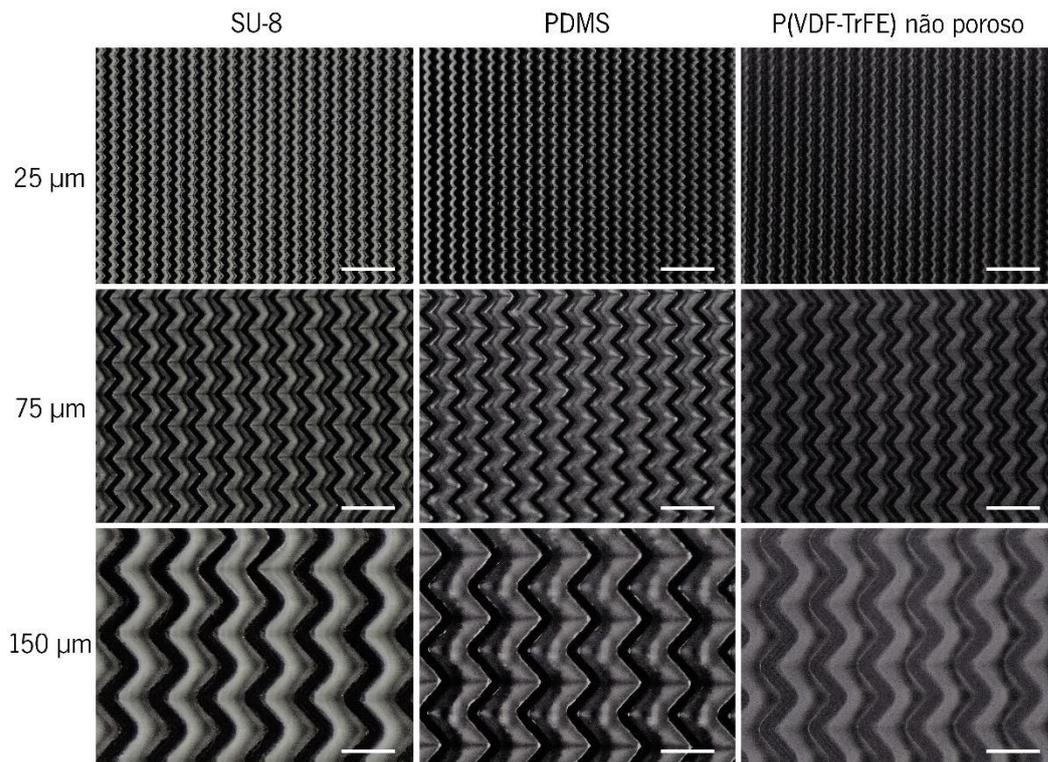


Figura 4.4: Imagens obtidas por estereomicroscopia referentes à topografia tipo “zigzagues lineares”, nos diferentes estágios de processamento. Escala apresentada: 200 μm .

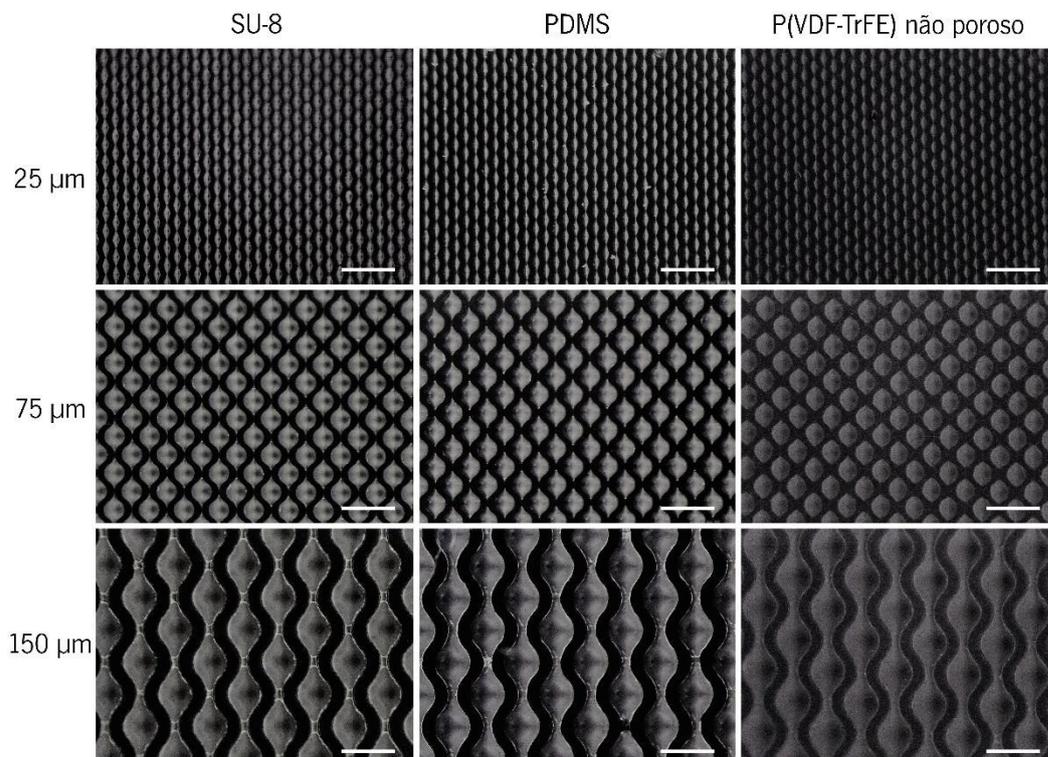


Figura 4.5: Imagens obtidas por estereomicroscopia referentes à topografia tipo “zigzagues curvos”, nos diferentes estágios de processamento. Escala apresentada: 200 μm .

Verificou-se que todas as estruturas obtidas exibem dimensões próximas das pretendidas, tanto ao nível da espessura dos moldes em SU-8 como nas dimensões das topografias de superfície nos *scaffolds* em P(VDF-TrFE), com os valores apresentados na Tabela 4.1. Estas foram as topografias escolhidas para o desenvolvimento deste trabalho, no entanto esta técnica fornece a possibilidade da obtenção de qualquer topografia à escala micrométrica.

Tabela 4.1: Valores teóricos e experimentais da espessura dos moldes em SU-8 e das dimensões das topografias de superfície dos *scaffolds* produzidos.

	Valor teórico (μm)	Média dos valores experimentais (μm)
Espessura do SU-8	50	54 \pm 5
	150	135 \pm 7
	300	325 \pm 10
Topografias de superfície	25	24 \pm 1
	75	74 \pm 2
	150	135 \pm 3

No entanto, algumas amostras aparentam apresentar paredes ligeiramente inclinadas, como é possível observar com maior evidência nas topografias tipo “hexagonais” (Figura 4.3) e “zigzagues curvos” (Figura 4.5), o que pode resultar em estruturas ligeiramente “cónicas” na sua profundidade. Sendo os moldes em SU-8 responsáveis pela obtenção dos moldes em PDMS, e estes por sua vez dos *scaffolds* em P(VDF-TrFE), quaisquer irregularidades presentes nos moldes em SU-8 irão repercutir-se nas amostras subsequentes. Para ultrapassar este facto, todo o procedimento envolvido no processamento dos moldes em SU-8 teria de ser otimizado para cada tipo de topografia, o que se verificou desnecessário no âmbito deste trabalho, uma vez que os *scaffolds* em P(VDF-TrFE) apresentam topografias com resolução adequada para os objetivos pretendidos.

Após processamento de todas as amostras, a técnica de SEM foi utilizada para caracterizar estruturalmente e morfologicamente algumas das topografias presentes à superfície dos *scaffolds* de P(VDF-TrFE), porosos e não porosos. A seleção de determinadas amostras deveu-se ao facto de não se justificar a necessidade de visualização de todas as microestruturas construídas antes de ser verificado o seu efeito no comportamento celular. Por conseguinte,

foram escolhidas as amostras ditas “controlo” (sem topografia de superfície) apresentadas na Figura 4.6, e de topografias tipo “hexagonais” e “linhas” apresentadas na Figura 4.7 e Figura 4.8, respetivamente.

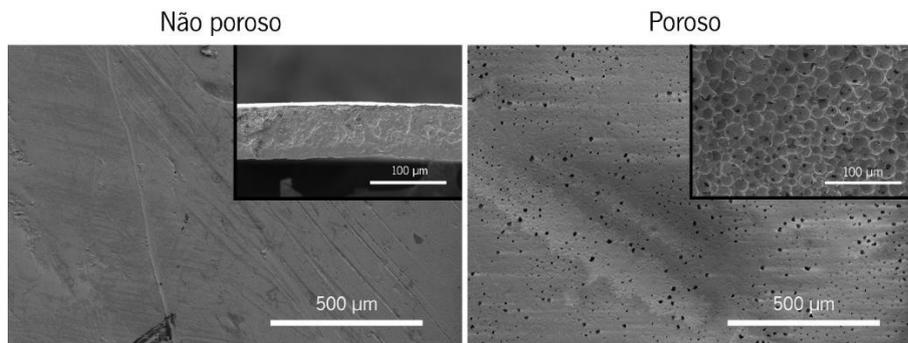


Figura 4.6: Imagens SEM de P(VDF-TrFE) “controlo”.

Pela análise das imagens SEM das amostras “controlo”, é possível concluir que o procedimento experimental foi bem-sucedido, verificando-se a ausência de poros nas amostras cristalizadas a 100 °C (não porosas) e a presença dos mesmos nas amostras cristalizadas a 25 °C (porosas) tanto a nível superficial como transversal. De facto, pela análise da secção transversal é possível observar uma estrutura compacta no caso das amostras não porosas, enquanto que as amostras porosas apresentam poros interconectados.

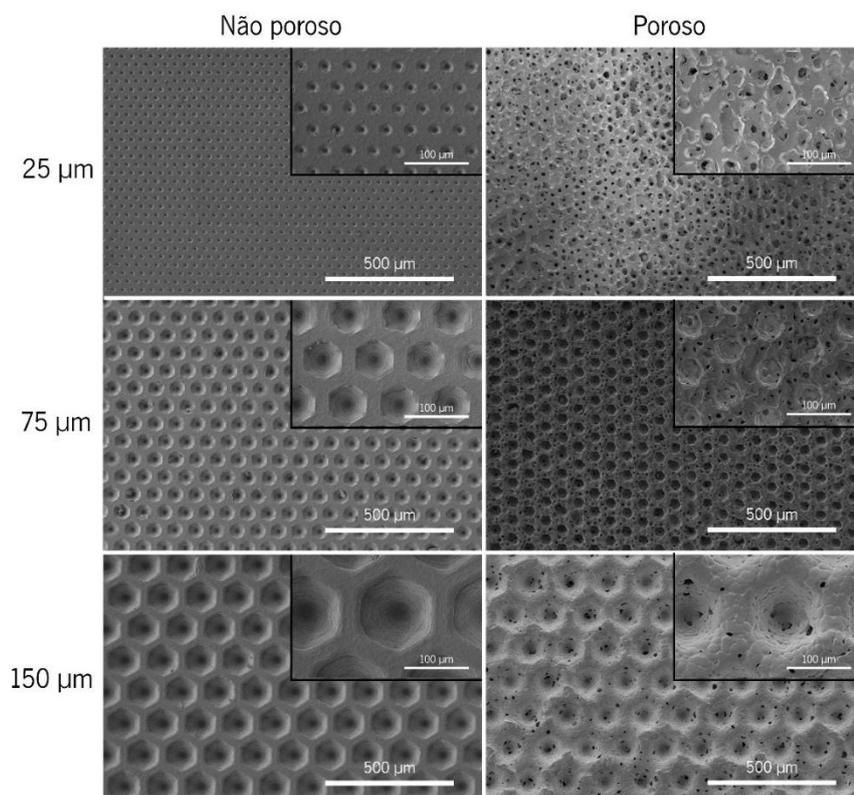


Figura 4.7: Imagens SEM de P(VDF-TrFE) com topografia tipo “hexagonais”.

No que diz respeito às amostras densas de P(VDF-TrFE) tipo “hexagonais”, todas elas apresentam estruturas bem definidas, à exceção da dimensão de 25 μm na qual se verificou o arredondamento das estruturas hexagonais (Figura 4.7). Similarmente, as amostras porosas com as dimensões 75 e 150 μm foram obtidas com sucesso. No entanto, a dimensão de 25 μm apresenta total inexistência de estruturas hexagonais na sua superfície. Este último resultado é justificado pela dimensão dos poros à superfície, que apresentam um tamanho superior à dimensão dos hexágonos, como será apresentado posteriormente na Tabela 4.2.

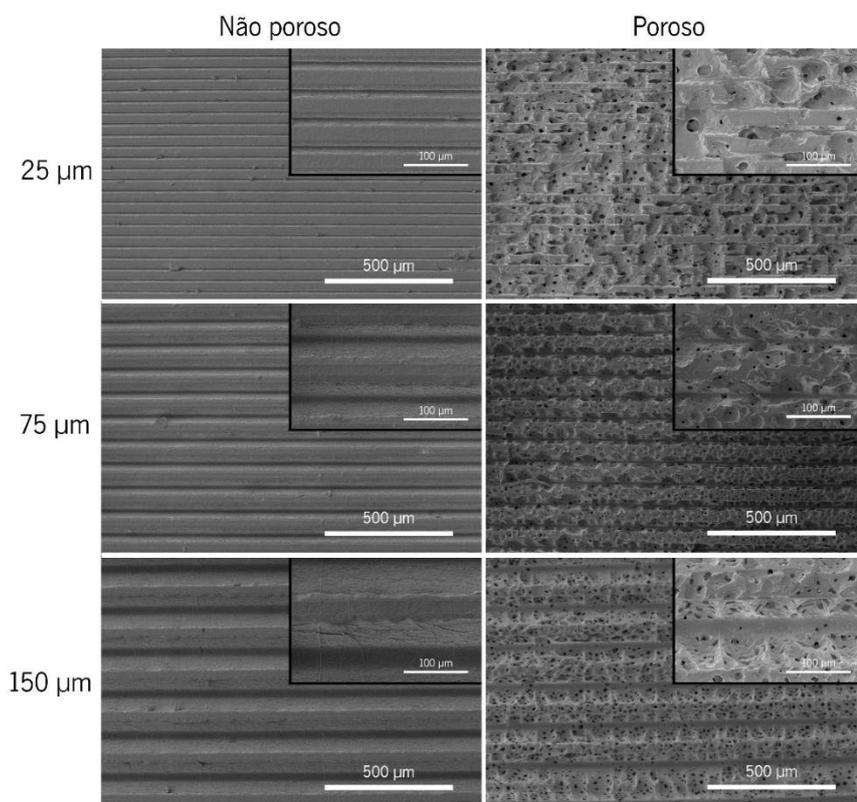


Figura 4.8: Imagens SEM de P(VDF-TrFE) com topografia tipo “linhas”.

As mesmas conclusões tecidas para as amostras do tipo “hexagonais” podem ser adotadas às amostras do tipo “linhas”, tanto no caso das amostras não porosas como porosas. De facto, estruturas definidas foram obtidas, à exceção das amostras porosas com dimensão de 25 μm (Figura 4.8). Neste último caso, as estruturas em linha foram minimamente recriadas, apresentando algumas interrupções devido à presença de poros com maiores dimensões.

Recorrendo ao programa ImageJ e utilizando as imagens SEM apresentadas anteriormente, foram medidos os valores médios e respetivos desvios-padrão dos tamanhos dos poros presentes nas amostras de P(VDF-TrFE) porosas. Esses valores estão apresentados na Tabela

4.2 e são referentes à medição de tamanhos de 30 poros por *scaffold*.

Tabela 4.2: Valores médios e respetivos desvios-padrão dos tamanhos dos poros presentes à superfície dos *scaffolds* de P(VDF-TrFE) porosos.

Tipo de topografia	Dimensão da topografia (μm)	Tamanho médio dos poros (μm)
Controlo (superfície)	-	$4,8 \pm 2,4$
Controlo (transversal)	-	$15,9 \pm 6,3$
"Hexagonais"	25	$31,1 \pm 19,3$
	75	$6,9 \pm 2,5$
	150	$12,6 \pm 3,8$
"Linhas"	25	$18,8 \pm 12,5$
	75	$9,6 \pm 8,4$
	150	$9,5 \pm 5,2$

Relativamente aos *scaffolds* de "controlo", é possível verificar que os poros à superfície apresentam tamanhos de aproximadamente $4,8 \pm 2,4 \mu\text{m}$, enquanto transversalmente apresentam tamanhos de aproximadamente $15,9 \pm 6,3 \mu\text{m}$. Embora não exposto, a gama de tamanhos dos poros na secção transversal manteve-se para os *scaffolds* de P(VDF-TrFE) porosos de topografias do tipo "hexagonais" e "linhas", havendo apenas variação do tamanho de poros à superfície. Deste modo, acredita-se que todas as amostras de P(VDF-TrFE) apresentam a mesma gama de tamanhos de poros na secção transversal.

Relativamente aos tamanhos dos poros à superfície, os dados obtidos não apresentam nenhuma tendência, verificando-se apenas que, tanto as médias como os respetivos desvios padrão do tamanho dos poros, nas estruturas com $25 \mu\text{m}$, apresentam valores aproximados à respetiva dimensão. Isto remete para a conclusão de que, na fase de e evaporação do solvente, a réplica da topografia foi de facto interrompida pela formação dos poros, não se conseguindo manter. Deste modo, é possível concluir apenas que, tanto a topografia como a sua dimensão apresentam efeitos distintos na gama de poros obtidos à superfície, não sendo possível tecer mais conclusões uma vez que esses efeitos teriam de ser analisadas e caracterizadas caso a caso.

4.2. Análise da hidrofobicidade de superfície

Para estudar a influência das microestruturas na hidrofobicidade de superfície dos *scaffolds* de P(VDF-TrFE) produzidos, foram efetuadas as respetivas medições dos ângulos de contacto, recorrendo ao aparato experimental descrito na secção 3.7.3. Os resultados obtidos estão apresentados na Figura 4.9 e Figura 4.10 e dizem respeito à média dos valores obtidos para 3 réplicas de cada amostra de P(VDF-TrFE) não porosa e porosa, respetivamente.

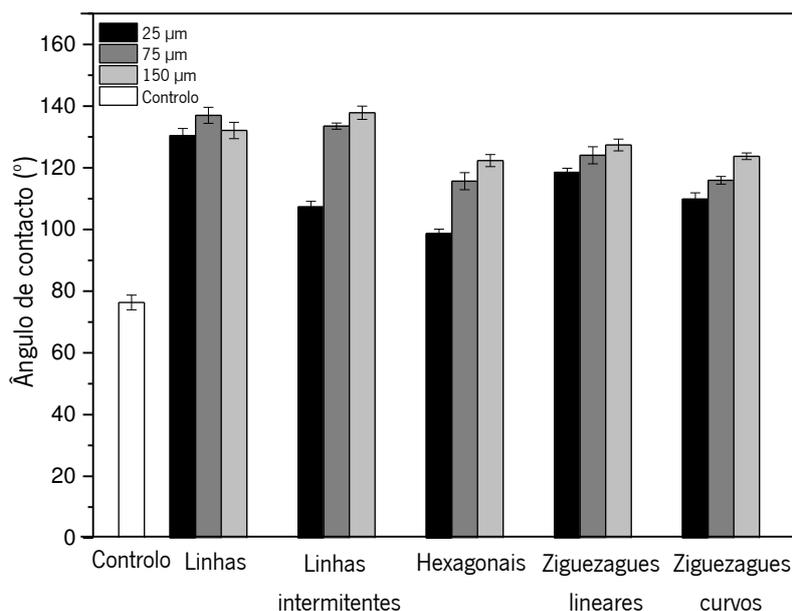


Figura 4.9: Ângulos de contacto dos *scaffolds* de P(VDF-TrFE) não porosos.

Analisando os resultados apresentados na Figura 4.9 para os *scaffolds* não porosos, verifica-se o aumento do ângulo de contacto para todas as amostras padronizadas, comparativamente ao controlo não padronizado. A superfície da amostra tipo “controlo” apresenta-se hidrofílica, com um valor de ângulo de contacto de $76 \pm 2^\circ$. Deste modo é possível observar a perda da hidrofílicidade para as amostras topograficamente modificadas, que exibem ângulos de contacto numa gama compreendida entre $99 \pm 1^\circ$ e $137 \pm 2^\circ$. Conclui-se assim que a presença de topografias de superfície aumenta a hidrofobicidade dos *scaffolds* de P(VDF-TrFE). É possível verificar igualmente que a hidrofobicidade das amostras aumenta ligeiramente com o aumento do tamanho das microestruturas, a exceção das amostras de topografia do tipo “linhas”, que apresentam gamas de valores de ângulos de contacto muito semelhantes.

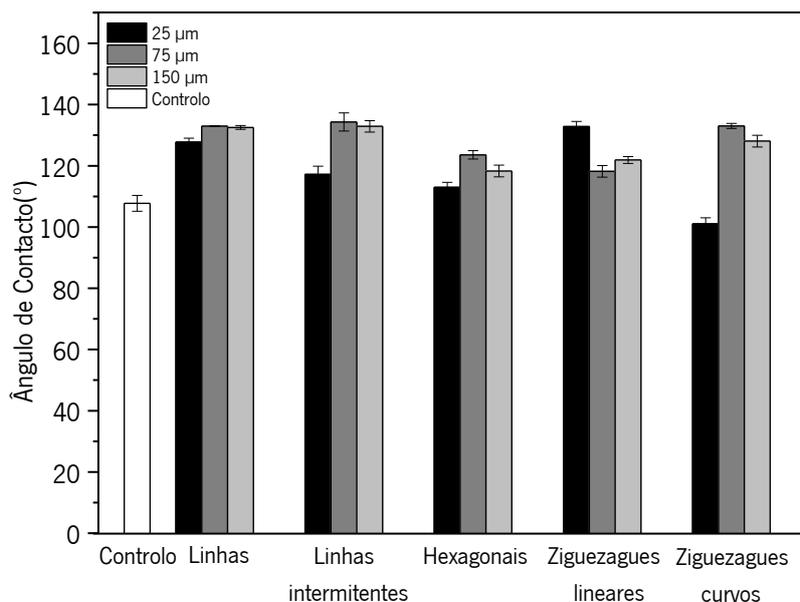


Figura 4.10: Ângulos de contacto dos *scaffolds* de P(VDF-TrFE) porosos.

Por sua vez, o *scaffold* tipo “controlo” de morfologia porosa apresenta uma superfície hidrofóbica, com um ângulo de contacto de $108 \pm 3^\circ$ (Figura 4.10). Comparativamente à amostra “controlo” não porosa, que se apresentou hidrofílica, acredita-se que os poros poderão ter algum efeito nos valores de ângulos de contacto obtidos. No entanto, observando os ângulos de contacto dos *scaffolds* padronizados de morfologia porosa, é possível verificar que esse efeito não é considerado significativo, uma vez que não existe uma diferença valorizável entre os ângulos de contacto dos *scaffolds* padronizados porosos e não porosos. Isto porque, os *scaffolds* porosos apresentam ângulos de contacto compreendidos entre $101 \pm 2^\circ$ e $134 \pm 3^\circ$, apresentando-se na mesma gama de valores dos ângulos de contacto dos *scaffolds* não porosos. Por outro lado, contrariamente às amostras não porosas, não se verifica uma correlação clara entre os tamanhos das microestruturas e os valores de ângulos de contacto obtidos.

Dito isto, é possível concluir que as topografias de superfície têm um papel mais significativo do que os poros nos valores de ângulos de contacto, e conseqüentemente, na hidrofobicidade de superfície dos *scaffolds*.

4.3. Análise das propriedades físico-químicas

Além dos estudos apresentados anteriormente, os *scaffolds* de P(VDF-TrFE) tanto porosos como não porosos foram caracterizados recorrendo às técnicas de FTIR, DSC e TGA. Além disso, o coeficiente piezoelétrico $|d_{33}|$ foi também medido depois da polarização das respetivas

amostras. Pelo facto de a temperatura de cristalização ser a variável preponderante na variação dos parâmetros medidos, os estudos foram realizados apenas nas amostras tipo “controlo”, como representativas das restantes amostras padronizadas.

4.3.1. Avaliação da fase cristalina

As amostras não padronizadas, porosas e não porosas, foram então submetidas à análise por FTIR-ATR, de forma a verificar a influência da temperatura de cristalização ao nível de mudanças de fase e ligações químicas do copolímero P(VDF-TrFE). Os resultados estão apresentados na Figura 4.11.

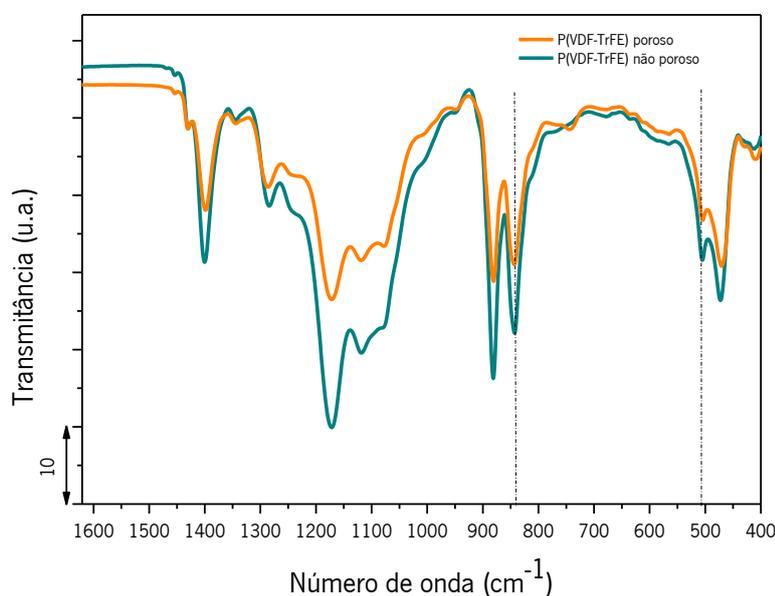


Figura 4.11: Espectros de FTIR-ATR representativos dos *scaffolds* de P(VDF-TrFE) porosos e não porosos.

Pela análise dos resultados obtidos observam-se os modos vibracionais característicos da fase tipo β , aos 510 e 843 cm⁻¹ [103, 112]. Não existem evidências da presença de modos vibracionais característicos da fase α nos *scaffolds* desenvolvidos, nomeadamente aos 763 cm⁻¹ [112]. Consequentemente e como seria de esperar, conclui-se que a temperatura de cristalização não influencia a estrutura do P(VDF-TrFE) que se apresenta na conformação *all trans* (TTT').

4.3.2. Avaliação calorimétrica

A análise da influência da temperatura de cristalização na temperatura de fusão e na cristalinidade das amostras, foi efetuada recorrendo à técnica de DSC. Os resultados estão apresentados na Figura 4.12.

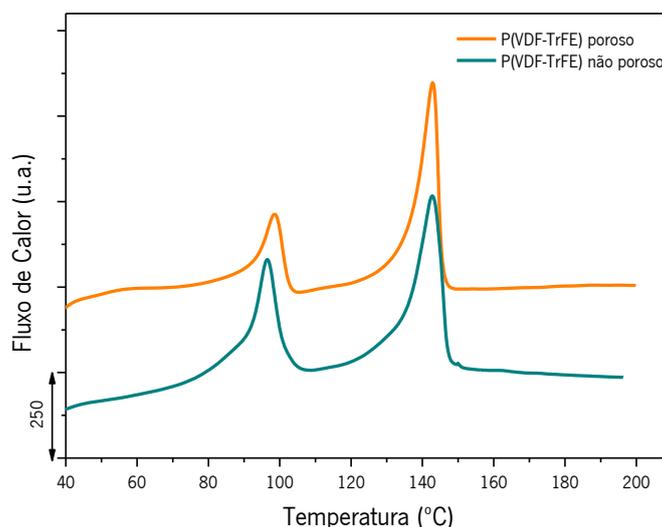


Figura 4.12: Curvas de DSC representativas dos *scaffolds* de P(VDF-TrFE) porosos e não porosos, com a representação endotérmica no sentido ascendente.

Pela observação do gráfico prevê-se que nenhuma alteração significativa exista entre as amostras cristalizadas a diferentes temperaturas. Os picos apresentados nas temperaturas mais elevadas estão associados à fusão do material, designado por temperatura de fusão (T_f), sendo esta uma transição endotérmica confirmada pelo pico positivo representado na curva de DSC. O copolímero P(VDF-TrFE) exhibe uma transição de Curie (T_c) ferro-paramagnética abaixo da temperatura de fusão quando contém uma % em mol de VDF entre 50 e 85. Tendo sido utilizada uma percentagem de 70 % mol é possível identificar a temperatura de Curie nestas amostras em picos de valores de temperatura mais baixos, como esperado [62]. Deste modo, observa-se uma T_c de aproximadamente 95 °C, antecedendo a T_f de 139 °C, com uma entalpia de fusão de 24 J.g⁻¹ para a amostra porosa. No caso do P(VDF-TrFE) não poroso, verifica-se um ligeiro aumento em ambas as temperaturas, apresentando uma T_c de 97 °C e uma T_f de 143 °C, com uma entalpia de fusão de 29 J.g⁻¹. Os valores de entalpia de fusão foram fornecidos pelo software de aquisição das curvas de DSC, correspondendo às áreas das curvas referentes aos picos de fusão. Todos estes picos endotérmicos encontram-se dentro dos intervalos referidos na literatura, podendo desta forma concluir-se que o método de processamento dos *scaffolds* não alterou as

propriedades nativas do polímero [118].

Considerando o valor padrão de entalpia de fusão do P(VDF-TrFE) quando é 100% cristalino, de aproximadamente 66 J.g^{-1} [114], e a equação referida no subcapítulo 3.7.5, foram calculadas as respectivas percentagens de cristalinidade. Deste modo, os *scaffolds* de P(VDF-TrFE) porosos apresentam uma cristalinidade de 36 %, enquanto os não porosos apresentam um valor de 44 %. As elações retiradas estão de acordo com a literatura, que demonstra que a temperatura de cristalização não afeta de forma significativa a transição de fase ferroelétrica-paraelétrica nem a temperatura de fusão do polímero, observando-se uma fraca influência da taxa de evaporação do solvente na dinâmica da cristalização [100].

Para além da caracterização térmica por DSC, os *scaffolds* porosos e não porosos foram igualmente submetidos à técnica TGA. Os resultados estão apresentados na Figura 4.13.

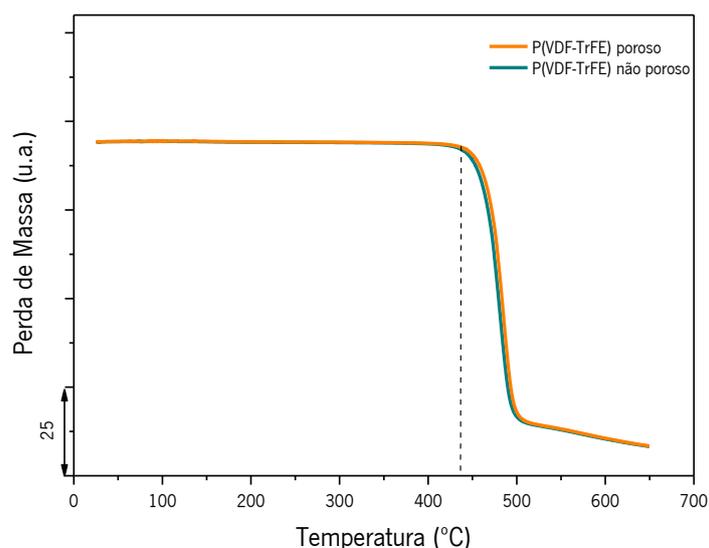


Figura 4.13: Curvas de TGA representativas dos *scaffolds* de P(VDF-TrFE) poroso e não poroso.

Pela análise do gráfico é possível observar que a taxa de degradação de ambos os *scaffolds* não foi influenciada pela temperatura de cristalização e que não existem impurezas. Ambos os materiais iniciaram a degradação aproximadamente aos 440 °C, reforçando os resultados obtidos pelo DSC, que concluíam a falta de influência do processamento efetuado nas propriedades térmicas de ambos os *scaffolds*.

4.3.3. Avaliação da atividade piezoelétrica

De forma a comprovar o comportamento piezoelétrico dos materiais processados, os mesmos foram polarizados por descarga de corona e o coeficiente piezoelétrico $|d_{33}|$ medido. Os valores obtidos estão apresentados na Tabela 4.3.

Tabela 4.3: Coeficientes $|d_{33}|$ correspondentes às amostras “controlo”, porosas e não porosas, após respetiva polarização.

	$ d_{33} $ (pC.N ⁻¹)
P(VDF-TrFE) poroso	5±1
P(VDF-TrFE) não poroso	5±1

Os resultados obtidos demonstram que ambas as morfologias, porosas e não porosas, são polarizáveis, sendo que o coeficiente piezoelétrico de 5 pC.N⁻¹ manteve-se estável durante pelo menos um mês (tempo durante o qual o coeficiente piezoelétrico foi medido). Embora o valor obtido seja muito inferior aos referidos na literatura, podendo alcançar os 34 pC.N⁻¹ [119], as amostras processadas neste trabalho apresentam uma espessura consideravelmente superior (244±7 e 792±247µm, não poroso e poroso respetivamente, para 34 µm) e são por este motivo mais difíceis de polarizar e de se obter valores de constantes piezoelétricas elevados. Tendo este estudo sido realizado apenas como prova de conceito, um processo de otimização poderá ser levado a cabo num trabalho futuro, de forma a maximizar o coeficiente piezoelétrico dos materiais processados. Além disso, este estudo permitiu comprovar que é de facto possível polarizar amostras de P(VDF-TrFE) porosas, facto nunca comprovado na literatura até ao momento.

Dito isto, é demonstrado que o efeito piezoelétrico destes materiais será ideal para utilização em cultura de células de tecidos com propriedades piezoelétricas, como é o caso do osso, já que este tecido apresenta um coeficiente piezoelétrico de aproximadamente 7- 8 pC.N⁻¹ [120], bastante semelhante ao presente nos *scaffolds* obtidos durante o presente trabalho. É de especial interesse o posterior estudo dos mesmos no comportamento celular ósseo, pela boa capacidade que terá em mimetizar o ambiente natural do tecido.

4.4. Análise da adesão celular óssea e muscular aos *scaffolds* desenvolvidos

Os ensaios de adesão celular foram efetuados recorrendo ao aparato descrito na secção 3.5, utilizando as linhas celulares MC3T3-E1 e C2C12, com o objetivo de observar a influência das diferentes topografias de superfície no comportamento celular de pré-osteoblastos e mioblastos, respetivamente. Para a visualização dos resultados obtidos recorreu-se a técnicas de imunofluorescência e de SEM, processos descritos nas secções 3.6.1 e 3.6.2, respetivamente.

4.4.1. Influência da topografia de superfície

Como primeiro estudo e elemento base, ensaios celulares foram realizados nos *scaffolds* de P(VDF-TrFE) não padronizadas (“controlo”), tanto porosos como não porosos. Imagens de imunofluorescência estão apresentadas na Figura 4.14.

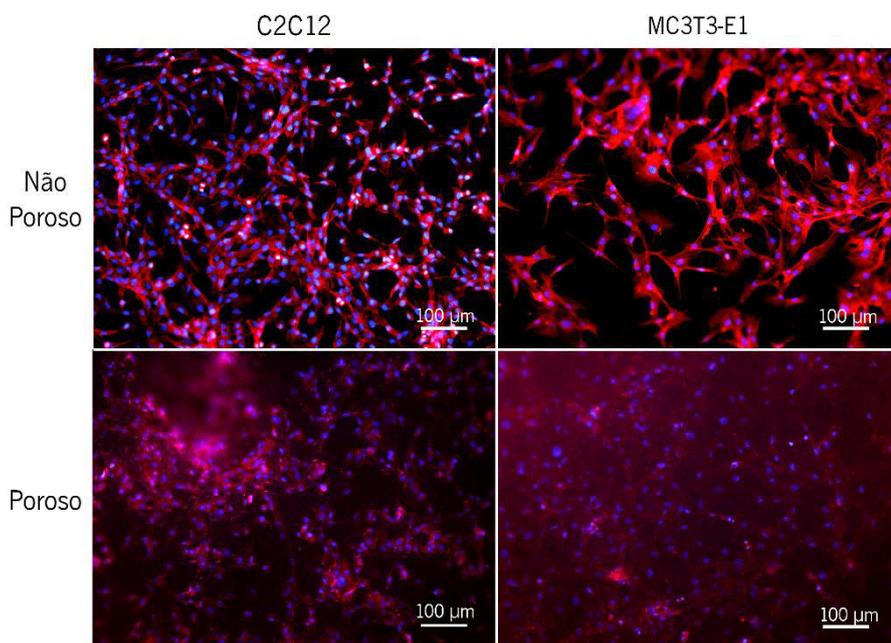


Figura 4.14: Imagens obtidas por imunofluorescência de mioblastos C2C12 e de pré-osteoblastos MC3T3-E1, sobre *scaffolds* de P(VDF-TrFE) não padronizados (“controlo”).

Pela análise do comportamento celular em contacto com os *scaffolds* controlo, verifica-se uma boa adesão dos dois tipos celulares, demonstrando a ausência de citotoxicidade por parte do material, como demonstrado na literatura [48]. As células encontram-se aderidas de forma não

ordenada, sendo que os mioblastos C2C12 se apresentam alongados e não orientados e os pré-osteoblastos MC3T3-E1 arredondados e aderidos de forma dispersa, constatando assim que o material não alterou as morfologias características das respectivas células. Comparando os materiais porosos e não porosos salta à vista a absorção de fluorescência por parte do material poroso, o que cria nas imagens um maior *background* e maior dificuldade na sua observação.

De seguida, foram realizados ensaios celulares em todos os *scaffolds* P(VDF-TrFE) com dimensão de 150 μm de ambas as morfologias, porosas e não porosas, com o objetivo de observar a influência da topografia de superfície no comportamento celular. Foi escolhida a maior dimensão de *scaffold* por ser mais fácil a avaliação do comportamento celular em dimensões delimitantes maiores. A Figura 4.15 apresenta os resultados obtidos nos ensaios de adesão de mioblastos e a Figura 4.17 dos ensaios de adesão de pré-osteoblastos.

Através de uma análise geral das imagens de fluorescência obtidas, verifica-se a adesão dos mioblastos C2C12 tanto à superfície das topografias como à sua profundidade, posicionamento evidenciado na Figura 4.16 que apresenta imagens representativas com focagem à superfície e à profundidade de uma das topografias (“linhas”). Avaliando os *scaffolds* não porosos, é possível observar a tendência para a orientação das células mioblásticas C2C12 ao longo da superfície das topografias, o que sugere o direcionamento da adesão celular por parte dos *scaffolds*. Essa tendência parece mais acentuada nas matrizes do tipo “linhas”, “linhas intermitentes”, “ziguezagues lineares” e “ziguezagues curvos”, que evidenciam o alongamento dos mioblastos à superfície, fenótipo característico das células muscular-esqueléticas. Este fenómeno é sustentado pela Figura 4.16, referente à adesão no *scaffold* tipo “linhas” não poroso, na qual é possível denotar que os mioblastos se apresentam alongados à superfície da topografia e não alongados, com pequeno citoesqueleto, à profundidade da mesma. De facto, a literatura afirma que topografias lineares paralelas estimulam o alongamento dos mioblastos na direção da geometria [31, 32, 64, 121] e, deste modo, os resultados do presente trabalho estão de acordo com a mesma. O facto de as células apresentarem morfologia característica à superfície e não à profundidade poderá estar relacionado com diferentes áreas e cargas superficiais do material nesses locais [12].

Por sua vez, as mesmas células em contacto com *scaffolds* porosos, apresentam um citoesqueleto mais pequeno, carecendo do mesmo alongamento observado nos *scaffolds* não porosos. É possível que esteja a ocorrer a entrada das células mioblásticas para dentro dos

poros neste tipo de superfície, sendo mais difícil observar o alongamento e direcionamento celular. Esta hipótese vai ser detetada por recurso a imagens de SEM na posterior secção 4.4.3 deste trabalho.

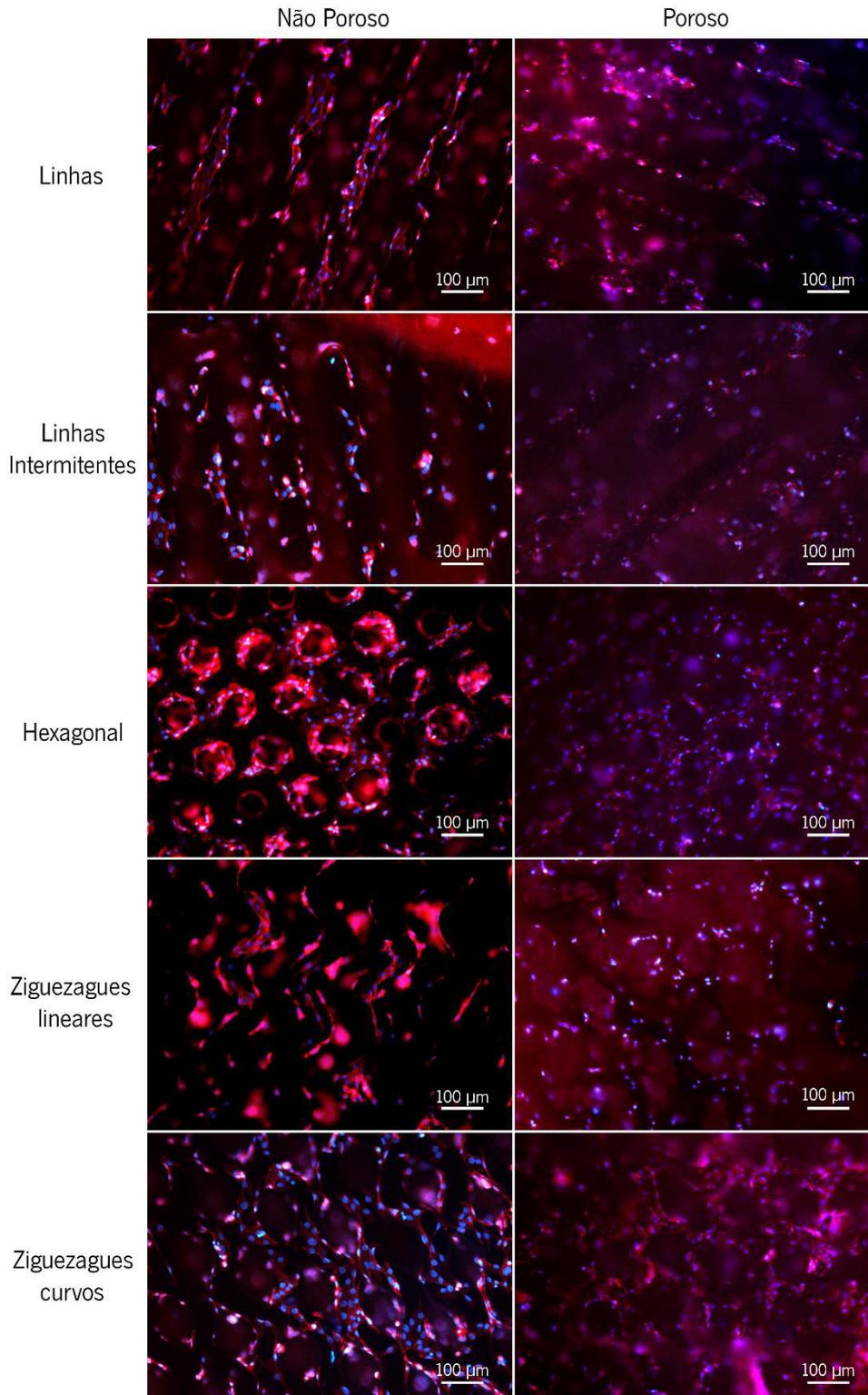


Figura 4.15: Imagens obtidas por imunofluorescência de mioblastos C2C12 sobre *scaffolds* de P(VDF-TrFE) com dimensões de 150 µm.

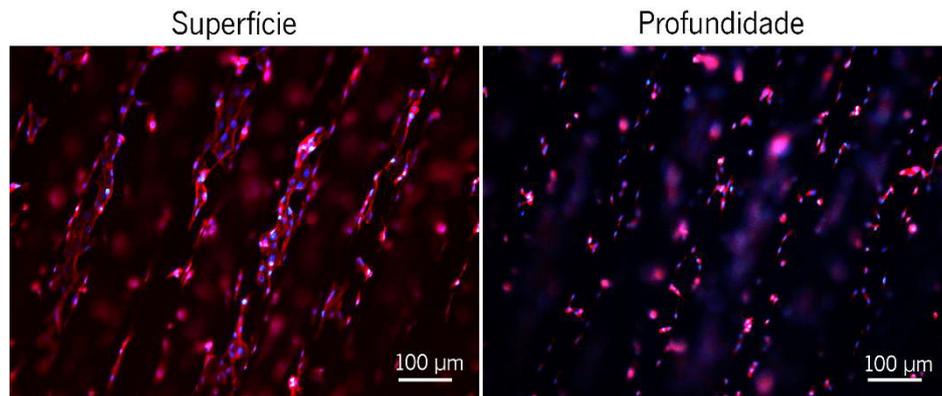


Figura 4.16: Imagens obtidas por imunofluorescência de mioblastos C2C12 sobre *scaffolds* de P(VDF-TrFE) de morfologia não porosa e com topografia do tipo “linhas”, com focagem à sua superfície e profundidade.

Quanto às células de pré-osteoblastos MC3T3-E1, observa-se que a adesão celular se dá essencialmente à superfície das microestruturas (Figura 4.17). Pelas imagens obtidas não é possível identificar qualquer tipo de preferência por parte dos osteoblastos, quer ao nível de morfologia quer ao nível de topografia de superfície. As células apresentam-se bem aderidas em toda a superfície das diferentes topografias, recobrimo-as e acompanhando a geometria presente. À semelhança do comportamento dos mioblastos, e até mais evidentemente, a topografia dos *scaffolds* foi capaz de direcionar o crescimento celular dos pré-osteoblastos. Para além disso, as células pré-osteoblásticas não demonstraram alteração de comportamento aquando aderidas às diferentes morfologias. Ou seja, comparando as mesmas topografias de superfície para os *scaffolds* poroso e não poroso, as células apresentam-se aderidas à superfície com fenótipo e direcionamento semelhantes. Este facto remete para que a superfície das topografias seja, de facto, o ambiente que mais lhes agrada, o que mais uma vez poderá estar relacionado com as propriedades da superfície, tanto ao nível químico como físico, do material nesse local.

A literatura não relata, até ao momento, qualquer preferência em termos de tipo de topografia ou posicionamento por parte das células pré-osteoblásticas MC3T3-E1. Tendo em conta as diferentes morfologias presentes no osso, desde as fibras não orientadas de colagénio até ao osso trabecular (poroso) e ao osso cortical (denso), as células osteoblásticas inserem-se em diversos microambientes [17], o que lhes parece fornecer a capacidade de se adaptarem facilmente a diferentes ambientes circundantes. Esta hipótese pode sustentar os resultados obtidos, já que não se verificaram alterações de comportamento dos pré-osteoblastos com a

variação das topografias e da morfologia dos *scaffolds*.

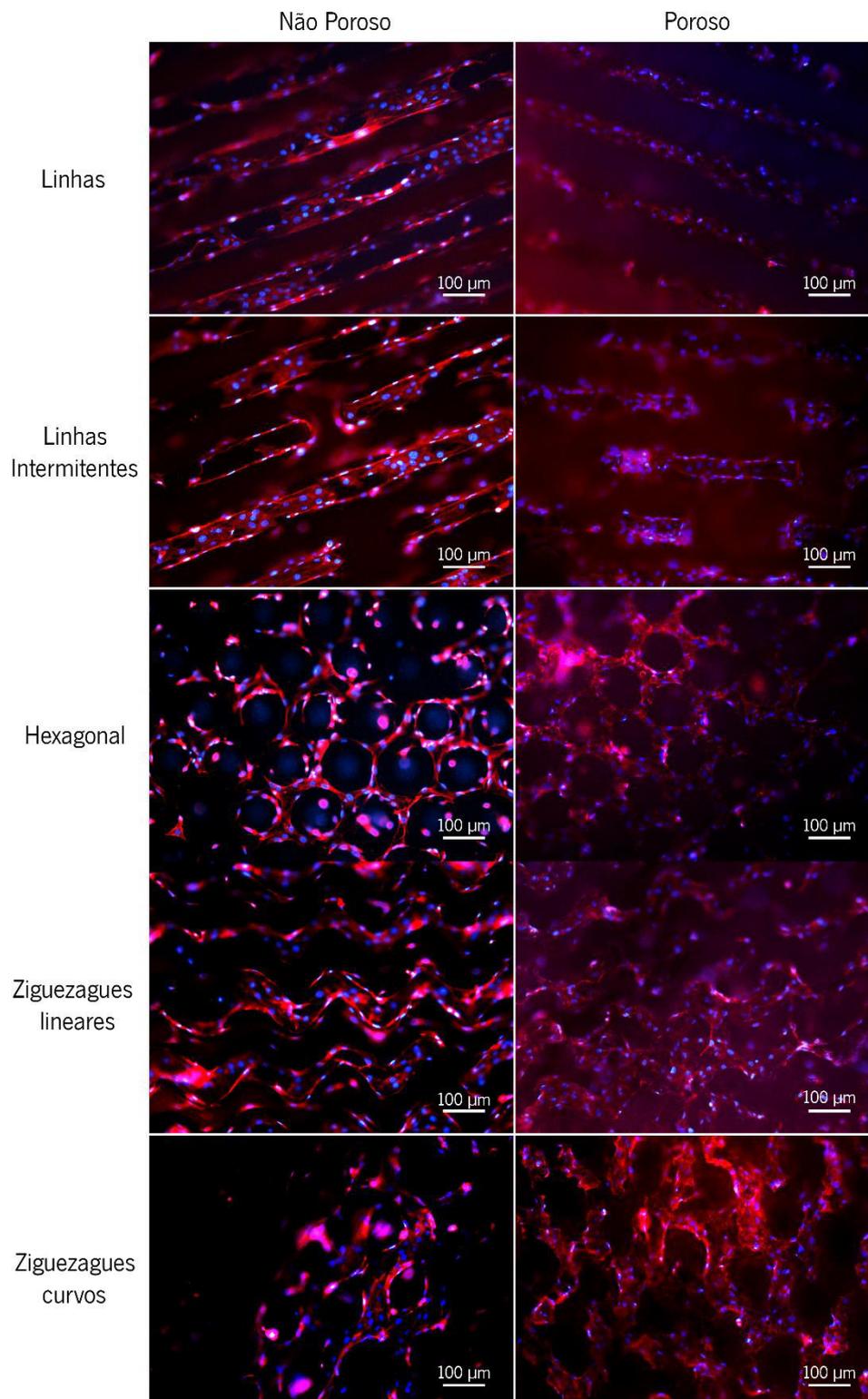


Figura 4.17: Imagens obtidas por imunofluorescência de células pré-osteoblásticas MC3T3-E1 sobre *scaffolds* com dimensões de 150 µm.

4.4.2. Influência das dimensões da geometria de superfície

Com o objetivo de analisar qual a influência da dimensão das topografias de superfície no comportamento celular, foram feitos ensaios de adesão celular aos *scaffolds* mais representativos, ou seja, à topografia mais e menos isotrópica (“linhas” e “hexagonais”, respetivamente). Nesta secção estão presentes a comparação e discussão dos resultados obtidos, tanto para as topografias referidas de 150 μm (apresentadas novamente), como para as de 75 e 25 μm .

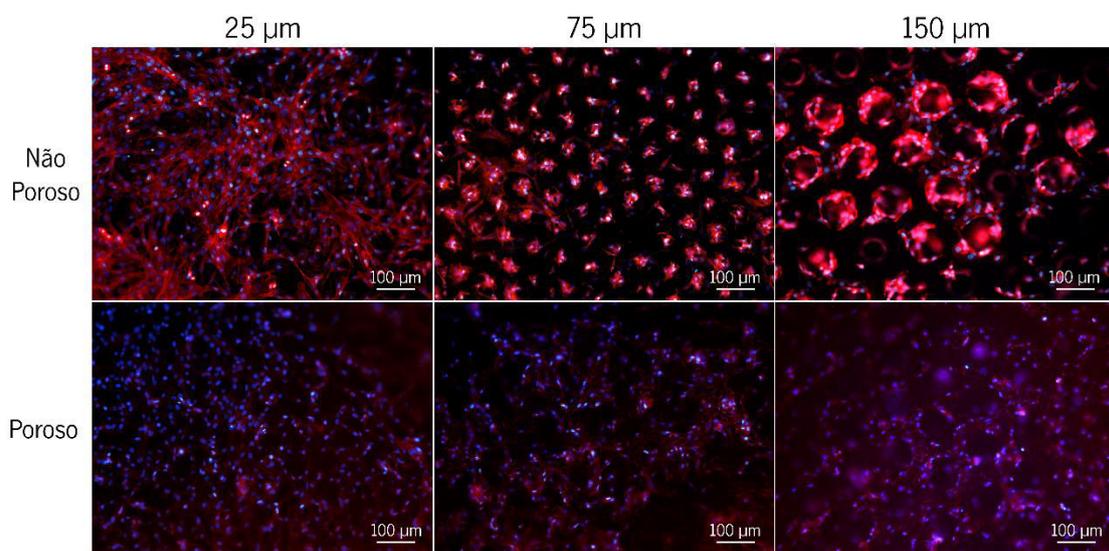


Figura 4.18: Imagens obtidas por imunofluorescência de células mioblásticas C2C12 sobre *scaffolds* com topografia de superfície tipo “hexagonais”.

Observando as imagens referentes aos *scaffolds* padronizados com topografia do tipo “hexagonais”, apresentados na Figura 4.18, é possível observar que a dimensão de 25 μm não exerce influência no comportamento dos mioblastos. Tal dispersão e falta de orientação por parte das células, também acontece para os *scaffolds* de morfologia não porosa com a respetiva dimensão. Retrocedendo à secção 4.1, na qual foi possível observar por SEM que a topografia de 25 μm não foi obtida com sucesso, essencialmente para material poroso, como tal este seria um resultado esperado. Embora a morfologia não porosa apresentasse uma topografia de superfície hexagonal arredondada, esta não foi capaz de exercer qualquer influência sobre as células. Uma hipótese para que isto aconteça é o facto de as células de mioblastos apresentarem diâmetros de 10 μm , aproximadamente, pelo que a dimensão da topografia obtida

não permitiu a adesão direcionada das células, por possuir dimensões muito próximas aos seus tamanhos, tanto ao nível de espaçamento entre linhas como ao nível da altura das mesmas.

Por sua vez, as imagens dos *scaffolds* com dimensões de 75 μm e de 150 μm de morfologia não porosa, evidenciam a adesão das células de mioblastos maioritariamente ao interior das delimitações hexagonais, não revelando influência da dimensão no posicionamento celular. Por outro lado, esse posicionamento celular parece ser influenciado pelo tipo de morfologia, uma vez que as células de mioblastos aparentam maior tendência a aderir à superfície da topografia aquando a presença de poros. Essa tendência parece aumentar com o aumento da dimensão da topografia de superfície, apresentando-se mais acentuada para os 150 μm . No entanto, junto com a variação do espaçamento entre as geometrias hexagonais (25, 75 ou 150 μm), também a sua altura está a variar (50, 150 e 300 μm , respetivamente). Essa altura pode determinar o posicionamento dos mioblastos, mas também a perceção das imagens de fluorescência. Ou seja, possuindo uma altura maior as células aderidas à profundidade e à superfície estão mais afastadas, pelo que poderá dar a sensação da sua adesão à superfície ser mais acentuada com o aumento do espaçamento, por não se conseguir ter perceção da sua profundidade.

Observando a morfologia dos mioblastos C2C12, verifica-se que o seu fenótipo alongado fica comprometido quando em contacto com este tipo de topografia de superfície. O facto de não ser uma matriz linear não lhe permite promover o alongamento celular que é muito importante para fases posteriores da regeneração de tecido muscular-esquelético [122]. Deste modo, é possível identificar esta topografia mais anisotrópica como menos adequada para ser aplicada em regeneração muscular.

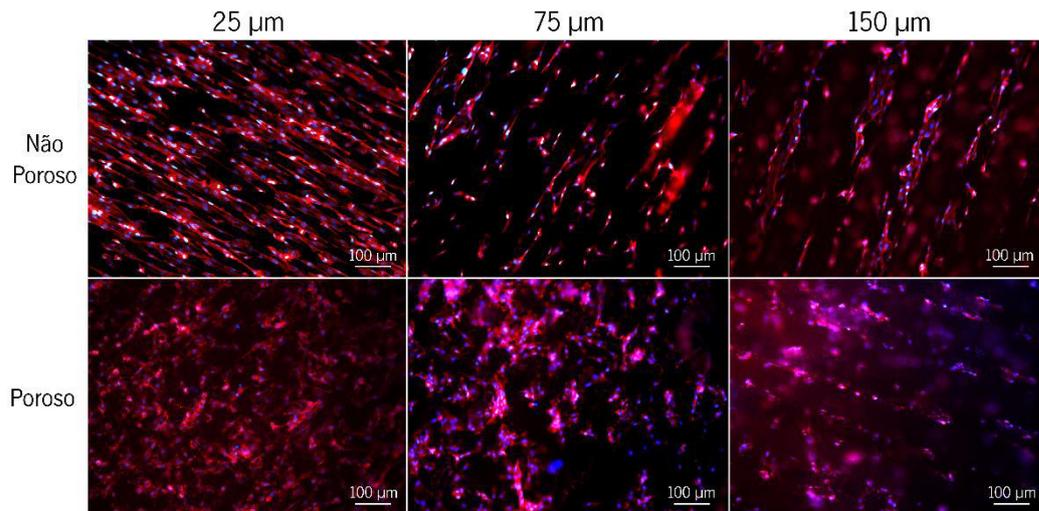


Figura 4.19: Imagens obtidas por imunofluorescência de células mioblásticas C2C12 sobre *scaffolds* com topografia de superfície tipo “linhas”.

Pela observação dos *scaffolds* de geometria do tipo “linhas” denota-se uma clara influência dos *scaffolds* de morfologia não porosa no comportamento das células de mioblastos C2C12 (Figura 4.19). Nas estruturas de 25 µm da respetiva morfologia, verifica-se um alto grau de alongamento e orientação das células de mioblastos C2C12 com a geometria da matriz, observando-se bem aderidas e em elevada quantidade por todo o material. Também na dimensão de 75 µm, em morfologia não porosa, o mesmo tipo celular apresenta-se alongado e direcionado com a topografia de superfície, similarmente ao que acontece para a dimensão de 150 µm.

Comparando as três dimensões é possível observar que a densidade celular parece diminuir com o aumento do espaçamento entre linhas. Este facto pode indicar a melhor adesão dos mioblastos na presença de um menor espaçamento (25 µm), ou então, devido ao facto de as maiores dimensões de topografias possuírem maiores alturas é possível que não se tenha perceção da quantidade de células que existem na sua profundidade. Deste modo, seriam necessários estudos de quantificação para determinar, de facto, se as células mioblásticas aderem melhor à dimensão de 25 µm, ou se é uma questão de perspetiva. Outra hipótese, desencadeada também com o aumento da altura, é o facto de se tornar mais difícil para as células intercomunicarem, e, por esse motivo, apresentarem maior adesão ao substrato que lhes permitem estar mais próximas.

Quando em contacto com os *scaffolds* de morfologia porosa, as células de mioblastos não direcionaram o seu posicionamento de forma tão evidente quanto nos materiais não porosos.

Isto remete, mais uma vez, para a influência da presença de poros nas respetivas topografias. Individualmente, analisando a dimensão de 25 μm , na qual a topografia linear não conseguiu exercer influência sobre as células mioblásticas, estas apresentam-se aderidas de forma dispersa, contrariamente ao que aconteceu em material não poroso. Este facto não se deverá apenas à presença dos poros, mas também às linhas terem sido interrompidas aquando a formação dos mesmos, como demonstrado na análise dos *scaffolds* fabricados, através de SEM (Figura 4.8). Comparando as três dimensões deste tipo de *scaffold* poroso, parece mais uma vez observar-se o aumento da influência na direção celular com o aumento do espaçamento entre linhas. Ou seja, para a dimensão de 25 μm a influência da topografia foi quase nula, aumentando para a de 75 μm e sendo bastante evidente na de 150 μm . Mais uma vez, à margem do que era hipótese para os *scaffolds* porosos analisados anteriormente, a tendência da influência com o aumento da dimensão pode ser uma questão de perspectiva por não ser tão fácil a visualização das células aderidas à profundidade para as maiores alturas, evidenciando-se apenas as que estão à superfície e criando a sensação de melhor orientação e posicionamento. Para além disso, por si só a visualização torna-se mais difícil neste tipo de material, devido à sua absorção da fluorescência, que cria maior *background* nas imagens. No entanto, e como em contacto com os *scaffolds* “hexagonais” porosos, os mioblastos pareciam ser influenciados de forma idêntica, é possível que não se deva à difícil visualização dos diferentes planos, mas que de facto apresentem essa variação de comportamento, orientando-se mais facilmente em *scaffolds* com espaçamentos entre topografias de 150 μm .

Parecem mais adequados, para estudos de proliferação e diferenciação, os *scaffolds* com dimensões de 25 μm e 150 μm . Isto porque, seria interessante observar o comportamento da fusão dos mioblastos em miotubos com essa variação de espaçamentos.

Como conclusão geral, é possível identificar que os *scaffolds* padronizados com linhas, para quase todas as dimensões e morfologias distintas, influenciam e direcionam o alongamento dos mioblastos. Como já referido anteriormente, na secção 4.4.1, o alongamento dos mioblastos é promovido por topografias lineares paralelas [31, 32, 64, 121]. Deste modo, os resultados apresentados estão mais uma vez de acordo com a literatura, justificando a eficiência que teria este tipo de topografia “linhas”, ao contrário da topografia “hexagonais”, na regeneração de tecido muscular do tipo esquelético.

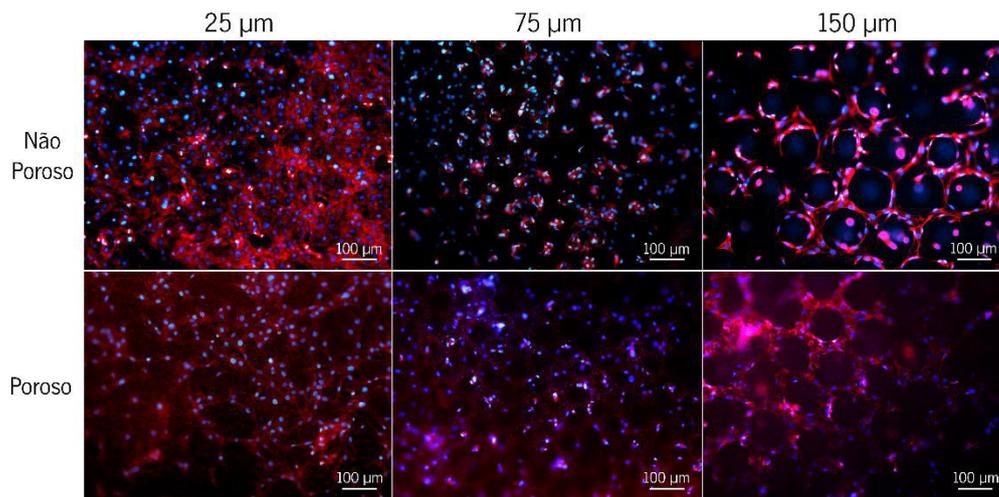


Figura 4.20: Imagens obtidas por imunofluorescência de células pré-osteoblásticas MC3TE-E1 sobre *scaffolds* com topografia de superfície tipo “hexagonais”.

Relativamente à adesão sobre os *scaffolds* de topografia “hexagonais”, não foi demonstrada influência da dimensão de 25 μm no comportamento celular dos pré-osteoblastos, tanto na morfologia não porosa como na porosa, apresentando-se distribuídos aleatoriamente sobre o material (Figura 4.20). Mais uma vez, estes resultados estão dentro do esperado, não só pela baixa eficiência da técnica em obter este tipo de topografia com tão reduzido tamanho, mas também devido ao facto de os osteoblastos apresentarem diâmetros de aproximadamente 30 μm, que é uma dimensão superior ao tamanho da topografia, acabando por acontecer a adesão celular sobre todo o espaço superficial sem orientação.

Relativamente ao *scaffold* de morfologia não porosa com 75 μm, é possível observar a adesão das respetivas células ao interior das microestruturas, o que contraria a premissa de que este tipo celular adere essencialmente à superfície da topografia tal qual acontece para as microestruturas com 150 μm. Para explicar esta variação de comportamento seriam necessários mais estudos, como por exemplo a avaliação da área do material, tanto à superfície como ao interior da topografia, de forma a tentar justificar o posicionamento celular, não só para esta situação em específico, mas também para as restantes dimensões e topografias que se demonstrassem determinantes. Para além disso, seria pertinente o estudo posterior de diferenciação celular em dimensões de 75 μm e 150 μm, já que, de facto, afetam drasticamente o posicionamento celular.

Já no *scaffold* de morfologia porosa com a mesma dimensão, os pré-osteoblastos estão

maioritariamente aderidos à superfície da topografia, tal qual acontece para a dimensão de 150 μm .

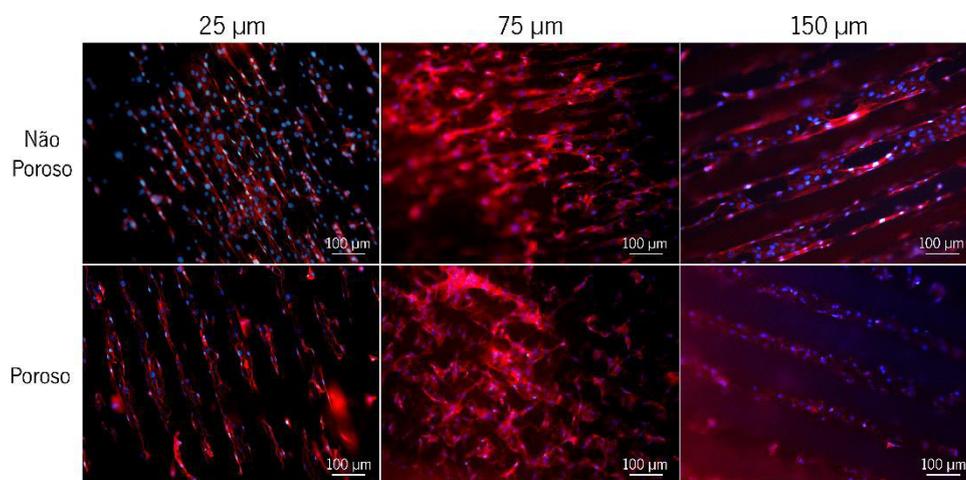


Figura 4.21: Imagens obtidas por imunofluorescência de células pré-osteoblásticas MC3T3-E1 sobre *scaffolds* com topografia de superfície tipo “linhas”.

Sobre todos os *scaffolds* de “linhas” não porosos, as células pré-osteoblásticas apresentam-se bem aderidas à superfície da topografia, acompanhando-a (Figura 4.21). Nos respectivos *scaffolds* com 25 μm e 75 μm , as células demonstram conexões entre linhas consecutivas, o que não acontece para as topografias com espaçamento de 150 μm . Deste modo é possível constatar que a comunicação entre células dispostas em linhas vizinhas é prejudicada com o aumento do espaçamento entre linhas.

Observando a adesão dos pré-osteoblastos aos *scaffolds* porosos, é possível constatar que a morfologia do material não afeta significativamente o comportamento deste tipo celular, já que estes apresentam um comportamento semelhante ao descrito em material não poroso, mantendo a tendência para aderir à superfície da topografia com qualquer dimensão. Também em material poroso as células apresentam mais conexões entre si quanto menor o espaçamento entre linhas.

As conexões intercelulares são importantes para o seu normal desenvolvimento, pelo que será importante estabelecer qual a dimensão que permita um bom direcionamento celular, mas ainda assim, que permita que as células estabeleçam comunicações entre si. Dito isto, e dentro dos *scaffolds* desenvolvidos, o espaçamento entre linhas mais adequado seria o de 75 μm , já que se apresenta como a topografia que permite a maior comunicação entre células e ainda assim o

direcionamento celular. No entanto, tendo em conta a morfologia do microambiente ósseo, no qual não se verifica a necessidade de alongamento e direcionamento celular paralelo, esta topografia de superfície não seria a mais adequada para prosseguir ensaios de proliferação e diferenciação óssea, já que não recria a geometria natural ao seu microambiente. Deste modo, a topografia mais adequada para a regeneração óssea seria, possivelmente, as “hexagonais” ou “zigzagues curvos”, por serem mais anisotrópicas, em morfologia porosa por favorecerem o crescimento do tecido ósseo, a difusão de nutrientes e a osseointegração [41].

4.4.3. Visualização por microscopia eletrônica de varrimento

Após visualização e análise das amostras por microscopia de fluorescência, foram selecionadas as mais representativas para visualização por SEM. As amostras escolhidas foram as do tipo “linhas” e do tipo “hexagonais” com geometrias de superfície de 150 μm e foram preparadas recorrendo ao processo descrito na secção 3.6.2. Mais uma vez, optou-se pela visualização da estrutura mais isotrópica e mais anisotrópica, respetivamente.

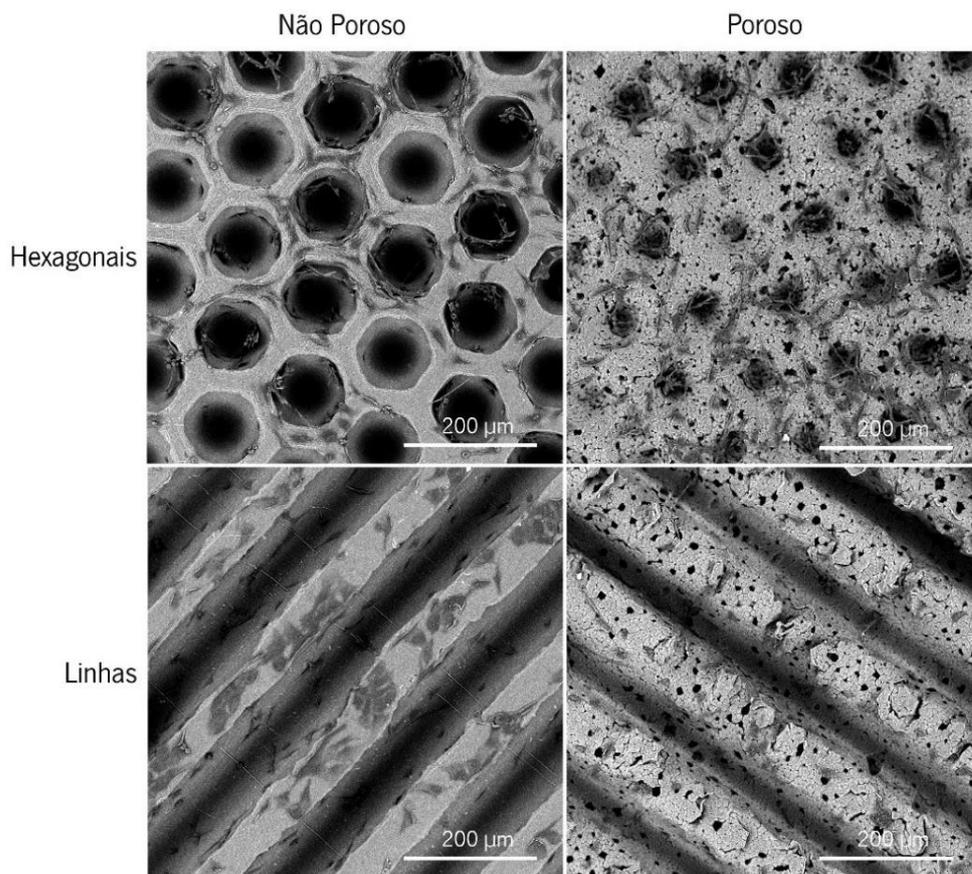


Figura 4.22: Imagens obtidas por SEM de mioblastos C2C12 em *scaffolds* de P(VDF-TrFE) tipo “hexagonais” e “linhas”, com morfologia não porosa e porosa.

Coerentemente com as imagens de imunofluorescência (Figura 4.15), em ambos os materiais porosos e não porosos, é possível visualizar que os mioblastos C2C12 se encontram aderidos tanto à superfície da microestrutura como à sua profundidade (Figura 4.22).

Quanto aos *scaffolds* não porosos do tipo “hexagonais”, verifica-se que as células mioblásticas tendem a entrar dentro da delimitação hexagonal, denotando-se a acumulação das células à volta dos poços quando já não existe espaço no seu interior, provavelmente pela tendência que as células têm para se manter juntas, de modo a conseguirem intercomunicar. Por sua vez, nos *scaffolds* não porosos do tipo “linhas”, os mioblastos C2C12 apresentam-se bem aderidos e alongados à superfície das microestruturas e com um citoesqueleto mais pequeno à sua profundidade, corroborando os resultados obtidos por imunofluorescência (Figura 4.16). A imagem de SEM evidencia que à profundidade a área é mais reduzida do que à superfície, podendo indicar o porquê de as células mioblásticas não alongarem nesse espaço.

Pela observação dos *scaffolds* porosos de geometria tipo “hexagonais”, verifica-se que as células tendem igualmente a entrar dentro da delimitação hexagonal, e a ocupar o contorno dos espaços já ocupados. Relativamente aos *scaffolds* porosos de geometria tipo “linhas”, é possível verificar a entrada das células para dentro dos poros, evidenciada pela conexão do citoesqueleto entre duas linhas consecutivas. Estes resultados confirmam a hipótese de que as células entrariam nos poros e por isso apresentavam um citoesqueleto mais pequeno e não tão alongado. Através das imagens de imunofluorescência não era possível identificar este fenómeno.

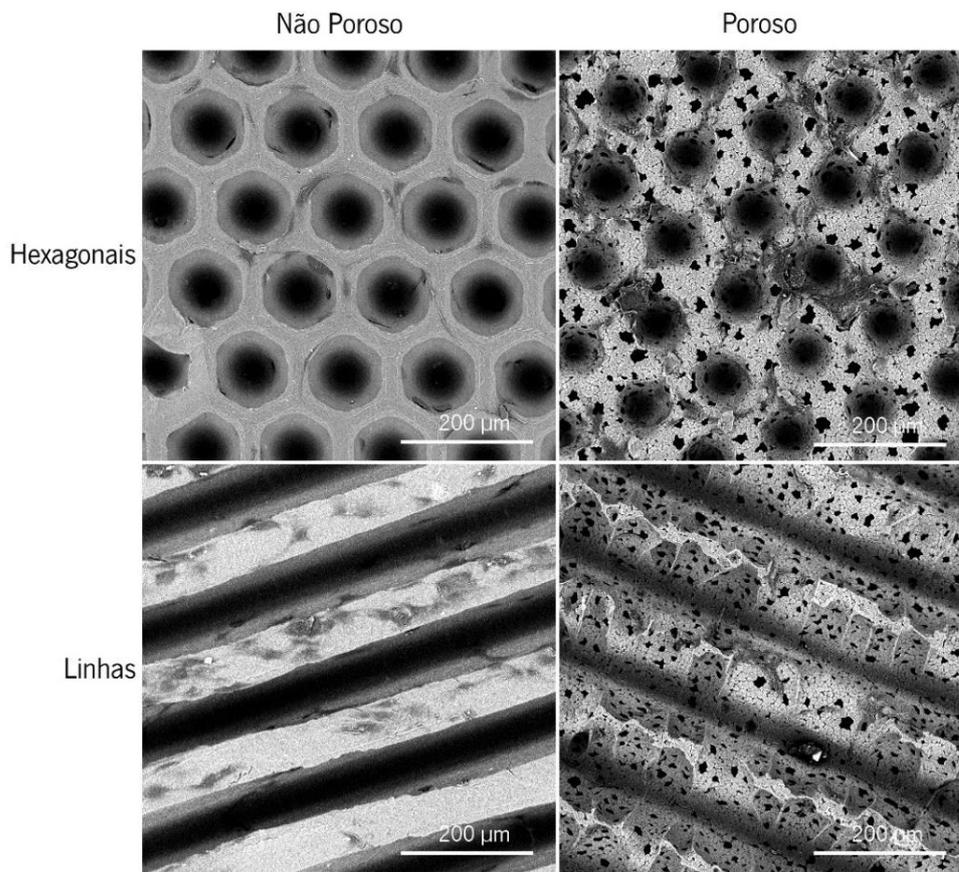


Figura 4.23: Imagens obtidas por SEM de pré-osteoblastos MC3T3-E1 em *scaffolds* de P(VDF-TrFE) tipo “hexagonais” e “linhas”, com morfologia não porosa e porosa.

Por sua vez, no que diz respeito aos materiais não porosos, tanto na topografia tipo “hexagonais” como no tipo “linhas”, as células pré-osteoblásticas apresentam-se aderidas à superfície da microestrutura, mas também aderidas nas paredes laterais perto da superfície da mesma, caso que não foi possível observar nas imagens de fluorescência (Figura 4.17). Não quer dizer que alguma das análises esteja errada, mas sim que, estando as células aderidas tão próximas da superfície a fluorescência não permitiu observar com distinção o seu posicionamento. Analisando as imagens do comportamento celular nos materiais porosos, as MC3T3-E1 parecem evitar a adesão ao interior das microestruturas tipo “hexagonais” e à profundidade das “linhas”, confirmando a análise das imagens de fluorescência.

Ao contrário do que foi possível visualizar por microscopia de fluorescência, as imagens de SEM demonstram que as células pré-osteoblásticas não se encontram aderidas em grande quantidade, principalmente nos materiais não porosos, comparativamente às células de mioblastos. No entanto, para além de constituírem réplicas distintas, durante os processos de

fixação e desidratação pode ter ocorrido perda de material celular, não sendo correto afirmar que as células aderem em menor quantidade.

As imagens obtidas por SEM permitiram a observação do comportamento celular com maior detalhe, tendo sido possível confirmar hipóteses dadas durante a análise de imunofluorescência e confirmar os resultados obtidos.

5. CONCLUSÃO

Esta tese apresenta o processamento de *scaffolds* de base polimérica de P(VDF-TrFE), micropadronizados por técnicas de fotolitografia e moldagem por réplica, para utilização em regeneração de tecidos ósseo e muscular. Foram fabricados diferentes tipos de *scaffolds*, com padrões do tipo “linhas”, “linhas intermitentes”, “hexagonais”, “zigzagues curvos” e “zigzagues lineares”, de diferentes dimensões, nomeadamente 25 μm , 75 μm e 150 μm . Recorrendo a duas temperaturas de cristalização distintas, 25 $^{\circ}\text{C}$ e 100 $^{\circ}\text{C}$, obtiveram-se *scaffolds* porosos e não porosos, respetivamente.

Pela análise das caracterizações estrutural e morfológica foi possível verificar que todas as estruturas obtidas exibiram dimensões próximas das pretendidas, tanto ao nível da espessura dos moldes em SU-8, que apresentaram valores de 54 ± 5 , 135 ± 7 e 325 ± 10 μm (para os teóricos de 50, 150 e 300 μm , respetivamente), como das dimensões das topografias de superfície nos *scaffolds* em P(VDF-TrFE), que apresentaram valores de 24 ± 1 , 74 ± 2 e 135 ± 3 μm (para os valores teóricos de 25, 75 e 150 μm , respetivamente). No entanto, pela análise de SEM dos *scaffolds* porosos com topografias do tipo “hexagonais” e “linhas”, foi possível observar que a técnica de fabrico não foi eficiente na obtenção das mesmas com dimensão de 25 μm , que remete para a conclusão de que, na fase de evaporação do solvente, a réplica da topografia foi interrompida pela formação dos poros, não se conseguindo manter. O mesmo se verificou nos *scaffolds* não porosos com topografias de superfície do tipo “hexagonais” de 25 μm , nos quais se apresentaram sob forma arredondada. A baixa resolução obtida poderá ser ultrapassada através do recurso a otimizações no fabrico das estruturas de dimensões mais reduzidas. Para as restantes padronizações e dimensões observadas, as técnicas de processamento permitiram a sua aquisição de forma adequada.

Os materiais processados, de diferentes topografias e morfologias, apresentaram-se hidrofóbicos, com ângulos de contacto que variam entre os $99\pm 1^{\circ}$ e os $137\pm 2^{\circ}$. Pelas caracterizações calorimétricas efetuadas, conclui-se que a temperatura de cristalização não teve influência significativa nas respetivas propriedades do material polimérico, apresentando temperaturas de fusão de 139 $^{\circ}\text{C}$ e 143 $^{\circ}\text{C}$ e percentagens de cristalinidade de 36 % e 44%, para os *scaffolds* porosos e não porosos, respetivamente. Através da técnica TGA foi também possível concluir que ambas os tipos de morfologia iniciam a sua degradação aproximadamente aos 440 $^{\circ}\text{C}$. Para além disso, pela análise dos espetros de absorção obtidos por FTIR, foi possível confirmar que ambas as morfologias de *scaffolds* de P(VDF-TrFE) apresentaram-se em

conformação do tipo β [11]. No decorrer do presente trabalho foi também efetuada uma prova de conceito em termos da avaliação da atividade piezoelétrica por polarização dos materiais processados. Com esta prova de conceito constatou-se que os materiais de diferentes morfologias são passíveis de serem polarizados, apresentando um $|d_{33}|$ de 5 ± 1 pC.N⁻¹, factos não constatados na literatura até ao momento.

Avaliando os ensaios de adesão celular, é possível concluir que os materiais fabricados não possuem efeitos nocivos às células, tal qual indica a literatura [48]. Após visualização por microscopia de fluorescência, de imediato se notou a diferença do posicionamento das duas linhas celulares. Isto é, as células de mioblastos apresentaram-se aderidas tanto à superfície das topografias como à sua profundidade, enquanto que as células pré-osteoblásticas se apresentaram essencialmente aderidas à superfície das mesmas. Estes resultados foram também confirmados pelas imagens de SEM. Foi também possível constatar que a hidrofobicidade dos materiais não dificultou a adesão celular.

Particularmente, os mioblastos demonstraram uma morfologia orientada e alongada com as diferentes topografias, especialmente evidenciada nas matrizes não porosas tipo “linhas”, “linhas intermitentes”, “zigzagues lineares” e “zigzagues curvos”. A regeneração de tecido muscular-esquelético, que é altamente organizado, requiere que os mioblastos se juntem, orientem e alonguem paralelamente, para que posteriormente se dê a fusão em miotubos (células diferenciadas do mesmo tecido) [122]. Deste modo, os *scaffolds* lineares fabricados, que promovem o direcionamento, alongamento e posicionamento paralelo, indicam efetivamente o seu grande potencial neste tipo de regeneração [31, 121, 122]. Em termos de dimensões, para posteriores estudos de proliferação e diferenciação, seria interessante a utilização dos *scaffolds* com dimensões de 25 μ m e 150 μ m de modo a observar o comportamento da fusão dos mioblastos em miotubos com essa variação de espaçamentos.

Tendo em conta a complexidade do osso, naturalmente as células osteoblásticas inserem-se em microambientes com morfologias distintas [17], o que lhes parece fornecer a capacidade de se adaptarem facilmente a diferentes ambientes circundantes. Isto porque as células pré-osteoblásticas apresentaram-se bem aderidas a toda a superfície das diferentes topografias, recobrimo-as e acompanhando a geometria presente e, para além disso, não demonstraram preferência por qualquer morfologia, apresentando comportamentos semelhantes. No entanto, tendo em conta a morfologia do microambiente ósseo, no qual não se verifica a necessidade de

alongamento e direcionamento celular paralelo, topografias lineares, como as do tipo “linhas”, não se apresenta como a mais adequada para prosseguir ensaios de proliferação e diferenciação óssea, já que não recriam a geometria natural ao seu microambiente. Deste modo, a topografia mais adequada para a regeneração óssea seria, possivelmente, as “hexagonais” ou “zigzagues curvos”, por serem mais anisotrópicas, e em morfologia porosa por favorecerem o crescimento do tecido ósseo, a difusão de nutrientes e a osseointegração já relatado na literatura [41].

Após retiradas as conclusões, é possível afirmar que os *scaffolds* fabricados são promissores no estudo da engenharia de diversos tecidos, uma vez que comprovaram que a sua topografia e morfologia influenciam diretamente o comportamento de diferentes tipos celulares, sendo passíveis de integrar microambientes tão distintos.

5.1. Perspetivas futuras

A presente dissertação de mestrado constitui um trabalho de investigação inicial, pelo que ainda muito se pode perspetivar com a utilização deste tipo de *scaffolds* poliméricos.

Deste modo, sugere-se como trabalhos futuros:

1. proceder a ensaios de proliferação e diferenciação celular, consequentes aos ensaios de adesão efetuados no decorrer deste trabalho;
2. após observação do efeito da topografia na diferenciação, complementar os estudos com o efeito piezoelétrico do material, recorrendo a ensaios dinâmicos em biorreatores;
3. utilizar os *scaffolds* de P(VDF-TrFE) desenvolvidos para estudos em diferentes tipos celulares, para além do ósseo e muscular, como por exemplo em células neuronais;
4. utilizar os *scaffolds* de P(VDF-TrFE) desenvolvidos para outro tipo de aplicações, como membranas de filtração, baterias, etc.
5. reutilizar os moldes em PDMS para o fabrico de *scaffolds* com outro tipo de materiais, como por exemplo PLLA, PLGA, etc.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Lima M, Correlo V, Reis R., *Micro/nano replication and 3D assembling techniques for scaffold fabrication*. Materials Science & Engineering C, Materials for Biological Applications: C 2014, 42:615-621.
2. O'Brien F, Harley B, Yannas I, Gibson L., *The effect of pore size on cell adhesion in collagen-GAG scaffolds*. Biomaterials 2005, 26(4):433-441.
3. Villa M, Wang L, Huang J, Rowe D, Wei M., *Bone tissue engineering with a collagen-hydroxyapatite scaffold and culture expanded bone marrow stromal cells*. Journal of Biomedical Materials Research Part B 2015, 103(2):243-253.
4. Cholas R, Padmanabhan S, Gervaso F, Udayan G, Monaco G, Sannino A, Licciulli A., *Scaffolds for bone regeneration made of hydroxyapatite microspheres in a collagen matrix*. Materials Science and Engineering: C, Materials for Biological Applications 2016, 63:499-505.
5. Jana S, Cooper A, Zhang M., *Chitosan scaffolds with unidirectional microtubular pores for large skeletal myotube generation*. Advanced Healthcare Materials 2013, 2(4):557-561.
6. Willerth S, Sakiyama-Elbert S., *Combining stem cells and biomaterial scaffolds for constructing tissues and cell delivery*. Stem Book 2008.
7. Sadiasa A, Nguyen T, Lee B-T., *In vitro and in vivo evaluation of porous PCL-PLLA 3D polymer scaffolds fabricated via salt leaching method for bone tissue engineering applications*. Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition 2014, 25(2):150-167.
8. Ribeiro C, Sencadas V, Correia D, Lanceros-Méndez S., *Piezoelectric polymers as biomaterials for tissue engineering applications*. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces 2015, 136:46-55.
9. Ribeiro C, Correia D, Ribeiro S, Sencadas V, Botelho G, Lanceros-Méndez S., *Piezoelectric poly (vinylidene fluoride) microstructure and poling state in active tissue engineering*. Engineering in Life Sciences 2015, 15(4):351-356.
10. Weber N, Lee Y-S, Shanmugasundaram S, Jaffe M, Arinzeh T., *Characterization and in vitro cytocompatibility of piezoelectric electrospun scaffolds*. Acta biomaterialia 2010, 6(9):3550-3556.
11. Martins P, Lopes A, Lanceros-Mendez S., *Electroactive phases of poly (vinylidene fluoride): determination, processing and applications*. Progress in Polymer Science 2014, 39(4):683-706.
12. Samavedi S, Whittington A, Goldstein A., *Calcium phosphate ceramics in bone tissue engineering: a review of properties and their influence on cell behavior*. Acta biomaterialia 2013, 9(9):8037-8045.
13. Araujo W, Teixeira F, da Silva G, Salvadori D, Salvadori M, Brown I., *Cell growth on 3D microstructured surfaces*. Materials Science and Engineering: C 2016, 63:686-689.
14. Langer R, Vacanti J., *Tissue engineering*. Science 1993, 260(5110):920-926.
15. Wobma H, Vunjak-Novakovic G., *Tissue Engineering and Regenerative Medicine 2015: A Year in Review. Tissue Engineering Part B, Reviews* 2016, 22(2):101-113.
16. Dhandayuthapani B, Yoshida Y, Maekawa T, Kumar D., *Polymeric scaffolds in tissue engineering application: a review*. International Journal of Polymer Science 2011, 2011.
17. Clarke B., *Normal bone anatomy and physiology*. Clinical journal of the American Society of Nephrology 2008, 3(Supplement 3):S131-S139.
18. Mallick S, Tripathi S, Srivastava P., *Advancement in scaffolds for bone tissue engineering: A review*. IOSR Journal of Pharmacy and Biological Sciences 2015, 10:37-54.
19. Seeley RR., *Anatomia & fisiologia*. 3. ed. Lusodidacta: Porto, Portugal 2011, 10: 323-372.
20. Seeley RR: *Anatomia & fisiologia*. 3. ed. Lusodidacta: Porto, Portugal 2011, 6: 173-204 .
21. Fukada E, Yasuda I., *Piezoelectric effects in collagen*. Japanese Journal of Applied Physics 1964, 3(2):117.
22. Shamos M, Lavine L., *Piezoelectricity as a fundamental property of biological tissues*. Nature 1967, 213(5073):267-269.
23. Fukada E, Yasuda I., *On the piezoelectric effect of bone*. Journal of the Physical Society of Japan 1957, 12(10):1158-1162.
24. Bassett C, Becker R., *Generation of electric potentials by bone in response to mechanical stress*. Science 1962, 137(3535):1063-1064.
25. Frost H., *Wolff's Law and bone's structural adaptations to mechanical usage: an overview for clinicians*. The Angle Orthodontist 1994, 64(3):175-188.
26. Ribeiro C, Moreira S, Correia V, Sencadas V, Rocha J, Gama F, Ribelles J, Lanceros-Méndez S., *Enhanced proliferation of pre-osteoblastic cells by dynamic piezoelectric stimulation*. Royal Society of Chemistry Advances 2012, 2(30):11504-11509.
27. Costa R, Ribeiro C, Lopes A, Martins P, Sencadas V, Soares R, Lanceros-Méndez S., *Osteoblast, fibroblast and in vivo biological response to poly (vinylidene fluoride) based composite materials*. Journal of Materials Science: Materials in Medicine 2013, 24(2):395-403.
28. Qazi T, Mooney D, Pumberger M, Geissler S, Duda G., *Biomaterials based strategies for skeletal muscle tissue engineering: existing technologies and future trends*. Biomaterials 2015, 53:502-521.

29. Wang L, Wu Y, Guo B, Ma P., *Nanofiber yarn/hydrogel core-shell scaffolds mimicking native skeletal muscle tissue for guiding 3D myoblast alignment, elongation, and differentiation*. ACS nano 2015, 9(9):9167-9179.
30. Sandow A., *Excitation-contraction coupling in muscular response*. The Yale Journal of Biology and Medicine 1952, 25(3):176.
31. Ribeiro C, Sencadas V, Areias A, Gama F, Lanceros-Méndez S., *Cell adhesion and proliferation of skeletal muscle cells on piezoelectric poly (vinylidene fluoride) membranes*. 8th International Conference on Polymer and Fiber Biotechnology, Braga, 2014.
32. Martins P, Ribeiro S, Ribeiro C, Sencadas V, Gomes A, Gama F, Lanceros-Méndez S., *Effect of poling state and morphology of piezoelectric poly (vinylidene fluoride) membranes for skeletal muscle tissue engineering*. Royal Society of Chemistry Advances 2013, 3(39):17938-17944.
33. Langer R, Tirrell D., *Designing materials for biology and medicine*. Nature 2004, 428(6982):487-492.
34. Hutmacher D., *Scaffold design and fabrication technologies for engineering tissues-state of the art and future perspectives*. Journal of Biomaterials Science Polymer Edition 2001, 12(1):107-124.
35. Jafari M, Paknejad Z, Rad M, Motamedian S, Eghbal M, Nadjimi N, Khojasteh A., *Polymeric scaffolds in tissue engineering: a literature review*. Journal of Biomedical Materials Research Part B, Applied biomaterials 2017, 105(2):431-459.
36. Evans N, Gentleman E, Polak J., *Scaffolds for stem cells*. Materials Today 2006, 9(12):26-33.
37. Chang H-I, Wang Y., *Cell responses to surface and architecture of tissue engineering scaffolds*. Regenerative Medicine and Tissue Engineering - Cells and Biomaterials Prof. Daniel Eberli. ed., InTech 2011.
38. O'brien F., *Biomaterials & scaffolds for tissue engineering*. Materials today 2011, 14(3):88-95.
39. Guo B, Ma P., *Synthetic biodegradable functional polymers for tissue engineering: a brief review*. Science China Chemistry 2014, 57(4):490-500.
40. Baier R., *Surface behaviour of biomaterials: the theta surface for biocompatibility*. Journal of Materials Science: Materials in Medicine 2006, 17(11):1057.
41. Karageorgiou V, Kaplan D., *Porosity of 3D biomaterial scaffolds and osteogenesis*. Biomaterials 2005, 26(27):5474-5491.
42. Ko H, Milthorpe B, McFarland C., *Engineering thick tissues-the vascularisation problem*. European Cells & Materials 2007, 14:1-19.
43. Phelps E, Garcia A., *Update on therapeutic vascularization strategies*. Regenerative Medicine 2009, 4(1):65-80.
44. Ribeiro C., *Processing and characterization of piezoelectric polymers for tissue engineering applications*. Braga 2012.
45. Williams D., *On the mechanisms of biocompatibility*. Biomaterials 2008, 29(20):2941-2953.
46. Williams D., *On the nature of biomaterials*. Biomaterials 2009, 30(30):5897-5909.
47. Ramakrishna S, Mayer J, Wintermantel E, Leong K., *Biomedical applications of polymer-composite materials: a review*. Composites Science and Technology 2001, 61(9):1189-1224.
48. Nunes-Pereira J, Ribeiro S, Ribeiro C, Gombek C, Gama F, Gomes A, Patterson D, Lanceros-Méndez S., *Poly (vinylidene fluoride) and copolymers as porous membranes for tissue engineering applications*. Polymer Testing 2015, 44:234-241.
49. Mandal B, Grinberg A, Gil E, Panilaitis B, Kaplan D., *High-strength silk protein scaffolds for bone repair*. Proceedings of the National Academy of Sciences 2012, 109(20):7699-7704.
50. Correia D, Sencadas V, Ribeiro C, Martins P, Martins P, Gama F, Botelho G, Lanceros-Méndez S., *Processing and size range separation of pristine and magnetic poly (l-lactic acid) based microspheres for biomedical applications*. Journal of Colloid and Interface Science 2016, 476:79-86.
51. Courtenay J, Johns M, Galembek F, Deneke C, Lanzoni E, Costa C, Scott J, Sharma R., *Surface modified cellulose scaffolds for tissue engineering*. Cellulose 2017, 24(1):253-267.
52. Vozzi G, Flaim C, Ahluwalia A, Bhatia S., *Fabrication of PLGA scaffolds using soft lithography and microsyringe deposition*. Biomaterials 2003, 24(14):2533-2540.
53. Nair L, Laurencin C., *Biodegradable polymers as biomaterials*. Progress in Polymer Science 2007, 32(8):762-798.
54. Okamoto M, John B., *Synthetic biopolymer nanocomposites for tissue engineering scaffolds*. Progress in Polymer Science 2013, 38(10):1487-1503.
55. Whitaker M, Quirk R, Howdle S, Shakesheff K., *Growth factor release from tissue engineering scaffolds*. Journal of Pharmacy and Pharmacology 2001, 53(11):1427-1437.
56. Guo H, Li Z, Dong S, Chen W, Deng L, Wang Y, Ying D., *Piezoelectric PU/PVDF electrospun scaffolds for wound healing applications*. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces 2012, 96:29-36.
57. Curie J, Curie P., *Development by pressure of polar electricity in hemihedral crystals with inclined faces*. Bulletin De La Societe Chimique De France 1880, 3:90.

58. Lippmann G., *Principe de la conservation de l'électricité, ou second principe de la théorie des phénomènes électriques*. Journal de Physique Théorique et Appliquée 1881, 10(1):381-394.
59. Ribeiro C, Sencadas V, Ribelles J, Lanceros-Méndez S., *Influence of processing conditions on polymorphism and nanofiber morphology of electroactive poly (vinylidene fluoride) electrospun membranes*. Soft Materials 2010, 8(3):274-287.
60. Dadsetan M, Pumberger M, Casper M, Shogren K, Giuliani M, Ruesink T, Hefferan T, Currier B, Yaszemski M., *The effects of fixed electrical charge on chondrocyte behavior*. Acta biomaterialia 2011, 7(5):2080-2090.
61. Lee Y-S, Collins G, Arinze T., *Neurite extension of primary neurons on electrospun piezoelectric scaffolds*. Acta biomaterialia 2011, 7(11):3877-3886.
62. Ducrot P, Dufour I, Ayela C., *Optimization of PVDF-TrFE processing conditions for the fabrication of organic MEMS resonators*. Scientific Reports 2016, 6:19426.
63. Zanchetta E, Guidi E, Della Giustina G, Sorgato M, Krampera M, Bassi G, Di Liddo R, Lucchetta G, Conconi M, Brusatin G., *Injection molded polymeric micropatterns for bone regeneration study*. ACS Applied Materials & Interfaces 2015, 7(13):7273-7281.
64. Huang N, Lee R, Li S., *Engineering of aligned skeletal muscle by micropatterning*. American Journal of Translational Research 2010, 2(1):43-55.
65. Zhao Y, Zeng H, Nam J, Agarwal S., *Fabrication of skeletal muscle constructs by topographic activation of cell alignment*. Biotechnology and Bioengineering 2009, 102(2):624-631.
66. Turner A, Dowell N, Turner S, Kam L, Isaacson M, Turner J, Craighead H, Shain W., *Attachment of astroglial cells to microfabricated pillar arrays of different geometries*. Journal of biomedical materials research 2000, 51(3):430-441.
67. Frey M, Tsai I, Russell T, Hanks S, Wang Y-I., *Cellular responses to substrate topography: role of myosin II and focal adhesion kinase*. Biophysical Journal 2006, 90(10):3774-3782.
68. Ghibaud M, Trichet L, Le Digabel J, Richert A, Hersen P, Ladoux B., *Substrate topography induces a crossover from 2D to 3D behavior in fibroblast migration*. Biophysical Journal 2009, 97(1):357-368.
69. Kolind K, Dolatshahi-Pirouz A, Lovmand J, Pedersen F, Foss M, Besenbacher F., *A combinatorial screening of human fibroblast responses on micro-structured surfaces*. Biomaterials 2010, 31(35):9182-9191.
70. Wang L, Murthy S, Fowle W, Barabino G, Carrier R., *Influence of micro-well biomimetic topography on intestinal epithelial Caco-2 cell phenotype*. Biomaterials 2009, 30(36):6825-6834.
71. Hamilton D, Chehroudi B, Brunette D., *Comparative response of epithelial cells and osteoblasts to microfabricated tapered pit topographies in vitro and in vivo*. Biomaterials 2007, 28(14):2281-2293.
72. Le Saux G, Magenau A, Böcking T, Gaus K, Gooding J., *The relative importance of topography and RGD ligand density for endothelial cell adhesion*. PLOS One 2011, 6(7):e21869.
73. Anselme K, Ploux L, Ponche A., *Cell/material interfaces: influence of surface chemistry and surface topography on cell adhesion*. Journal of Adhesion Science and Technology 2010, 24(5):831-852.
74. Laurencin C, Nair L., *Nanotechnology and tissue engineering: the scaffold*. CRC Press: Boca Raton Florida, USA 2008.
75. Flemming R, Murphy C, Abrams G, Goodman S, Nealey P., *Effects of synthetic micro-and nano-structured surfaces on cell behavior*. Biomaterials 1999, 20(6):573-588.
76. Martinez E, Engel E, Planell J, Samitier J., *Effects of artificial micro-and nano-structured surfaces on cell behaviour*. Annals of Anatomy-Anatomischer Anzeiger 2009, 191(1):126-135.
77. Carvalho A, Pelaez-Vargas A, Hansford D, Fernandes M, Monteiro F., *Effects of line and pillar array microengineered SiO₂ thin films on the osteogenic differentiation of human bone marrow-derived mesenchymal stem cells*. Langmuir 2016, 32(4):1091-1100.
78. Laurencin C, Nair L., *Nanotechnology and regenerative engineering: the scaffold*. CRC Press: Boca Raton Florida, USA 2014.
79. Moreau W., *Semiconductor lithography: principles, practices, and materials*. Springer US: New York, USA 2012. 4:157-210.
80. Pinto V, Sousa P, Cardoso V, Minas G., *Optimized SU-8 processing for low-cost microstructures fabrication without cleanroom facilities*. Micromachines 2014, 5(3):738-755.
81. Xia Y, Whitesides G., *Soft lithography*. Annual Review of Materials Science 1998, 28(1):153-184.
82. Whitesides G, Ostuni E, Takayama S, Jiang X, Ingber D., *Soft lithography in biology and biochemistry*. Annual Review of Biomedical Engineering 2001, 3(1):335-373.
83. del Campo A, Greiner C., *SU-8: a photoresist for high-aspect-ratio and 3D submicron lithography*. Journal of Micromechanics and Microengineering, 17(6):R81-R95.
84. Martinez-Duarte R, Madou M., *SU-8 photolithography and its impact on microfluidics*. vol. 2 CRC Press: Boca Raton, FL, USA; 2011: 231-268.
85. Fiorini G, Chiu D., *Disposable microfluidic devices: fabrication, function, and application*. BioTechniques

- 2005, 38(3):429-446.
86. Nemani K, Moodie K, Brennick J, Su A, Gimi B., *In vitro and in vivo evaluation of SU-8 biocompatibility*. Materials Science & Engineering C, Materials for Biological Applications 2013, 33(7):4453-4459.
 87. Parida O, Bhat N., *Characterization of optical properties of SU-8 and fabrication of optical components*. International Conference on Optics and Photonics (CSIO): 2009.
 88. Anderson J, Chiu D, Wu H, Schueller O, Whitesides G., *Fabrication of microfluidic systems in poly (dimethylsiloxane)*. Electrophoresis 2000, 21(1):27-40.
 89. Fujii T., *PDMS-based microfluidic devices for biomedical applications*. Microelectronic Engineering 2002, 61-2:907-914.
 90. Mata A, Fleischman A, Roy S., *Characterization of polydimethylsiloxane (PDMS) properties for biomedical micro/nanosystems*. Biomedical Microdevices 2005, 7(4):281-293.
 91. Lehmann R, Miller J, Kozerski G., *Degradation of silicone polymer in a field soil under natural conditions*. Chemosphere 2000, 41(5):743-749.
 92. Tan S, Nguyen N, Chua Y, Kang T., *Oxygen plasma treatment for reducing hydrophobicity of a sealed polydimethylsiloxane microchannel*. Biomicrofluidics 2010, 4(3):32204.
 93. Zanchetta E, Guidi E, Della Giustina G, Sorgato M, Krampera M, Bassi G, Di Liddo R, Lucchetta G, Conconi M, Brusatin G., *Injection molded polymeric micropatterns for bone regeneration study*. ACS Applied Materials & Interfaces 2015, 7(13):7273-7281.
 94. Charest J, Garcia A, King W., *Myoblast alignment and differentiation on cell culture substrates with microscale topography and model chemistries*. Biomaterials 2007, 28(13):2202-2210.
 95. Lam M, Sim S, Zhu X, Takayama S., *The effect of continuous wavy micropatterns on silicone substrates on the alignment of skeletal muscle myoblasts and myotubes*. Biomaterials 2006, 27(24):4340-4347.
 96. Araujo W, Teixeira F, da Silva G, Salvadori D, Salvadori M, Brown I., *Cell growth on 3D microstructured surfaces*. Materials Science and Engineering: C 2016, 63:686-689.
 97. Cardoso V, Machado A, Pinto V, Sousa P, Botelho G, Minas G, Lanceros-Méndez S., *From superhydrophobic-to superhydrophilic-patterned poly (vinylidene fluoride-co-chlorotrifluoroethylene) architectures as a novel platform for biotechnological applications*. Journal of Polymer Science Part B: Polymer Physics 2016, 54(18):1802-1810.
 98. Sousa P., *Estudo e otimização de estruturas em PDMS para dispositivos microfluidicos*. Braga 2011.
 99. Bodas D, Khan-Malek C., *Hydrophilization and hydrophobic recovery of PDMS by oxygen plasma and chemical treatment - An SEM investigation*. Sensors & Actuators, B: Chemical 2007, 123(1):368-373.
 100. Cardoso V, Costa C, Sencadas V, Botelho G, Gómez-Ribelles J, Lanceros-Mendez S., *Tailoring porous structure of ferroelectric poly (vinylidene fluoride-trifluoroethylene) by controlling solvent/polymer ratio and solvent evaporation rate*. European Polymer Journal 2011, 47(12):2442-2450.
 101. Ferreira A, Silva J, Sencadas V, Ribelles J, Lanceros-Méndez S., *Poly [(vinylidene fluoride)-co-trifluoroethylene] Membranes Obtained by Isothermal Crystallization from Solution*. Macromolecular Materials and Engineering 2010, 295(6):523-528.
 102. Cleaves H., *Encyclopedia of Astrobiology: Corona Discharge*. Springer Berlin Heidelberg: 2011: 363-363.
 103. Cardoso V., *Sistema de fluxo acústico de base polimérica para aplicações microfluidicas*. Braga 2012.
 104. Nothnagle P, Chambers W, Davidson M., *Introduction to stereomicroscopy*. Nikon MicroscopyU 2009.
 105. Zhou W, Wang Z., *Scanning Microscopy for Nanotechnology: Techniques and Applications*. Springer Science & Business Media: New York, USA 2007.
 106. Goldstein J, Newbury D, Echlin P, Joy D, Lyman C, Lifshin E, Sawyer L, Michael J., *Scanning Electron Microscopy and X-ray Microanalysis. The SEM and Its Modes of Operation*. 3. ed. Springer US: Boston, Massachusetts 2003: 21-60.
 107. Yuan Y, Lee T., *Surface science techniques: Contact angle and wetting properties*. Springer Berlin, Heidelberg 2013: 51:3-34.
 108. Mittal K., *Contact angle, wettability and adhesion*. 4. ed. CRC Press: Boston, Massachusetts 2006.
 109. Gauglitz G, Vo-Dinh T., *Handbook of spectroscopy*. John Wiley & Sons: Weinheim, Germany 2006.
 110. Stuart B., *Encyclopedia of Chemical Technology: Infrared spectroscopy*. John Wiley & Sons: Weinheim, Germany 2005.
 111. Salimi A, Yousefi A., *Analysis method: FTIR studies of β -phase crystal formation in stretched PVDF films*. Polymer Testing 2003, 22(6):699-704.
 112. Lanceros-Mendez S, Mano J, Costa A, Schmidt V., *FTIR and DSC studies of mechanically deformed β -PVDF films*. Journal of Macromolecular Science, Part B 2001, 40(3-4):517-527.
 113. Casimiro M, Leal J, Gil MH, Castro C., *Análise calorimétrica aplicada a polímeros biológicos. Parte I: Fundamentos teóricos*. Boletim da Sociedade Portuguesa de Química 2005, 98(1):29-35.
 114. Teyssedre G, Lacabanne C., *Study of the thermal and dielectric behavior of P (VDF-TrFE) copolymers in*

- relation with their electroactive properties.* Ferroelectrics 1995, 171(1):125-144.
115. Gonçalves R., *Desenvolvimento de nanocompósitos poliméricos de PVDF-Zeólitos para aplicações tecnológicas.* Braga 2011.
 116. Vyshatko N, Brioso P, de la Cruz J, Vilarinho P, Kholkin A., *Fiber-optic based method for the measurements of electric-field induced displacements in ferroelectric materials.* Review of Scientific Instruments 2005, 76(8):085101.
 117. Southin J, Wilson S, Schmitt D, Whatmore R., *e31, f determination for PZT films using a conventional d33' meter.* Journal of Physics D: Applied Physics 2001, 34(10):1456.
 118. Lau K, Liu Y, Chen H, Withers R., *Effect of annealing temperature on the morphology and piezoresponse characterisation of Poly (vinylidene fluoride-trifluoroethylene) films via scanning probe microscopy.* Advances in Condensed Matter Physics 2013.
 119. Cardoso V, Costa C, Minas G, Lanceros-Mendez S., *Improving the optical and electroactive response of poly(vinylidene fluoride-trifluoroethylene) spin-coated films for sensor and actuator applications.* Smart Materials and Structures 2012, 21(8).
 120. Halperin C, Mutchnik S, Agronin A, Molotskii M, Urenski P, Salai M, Rosenman G., *Piezoelectric effect in human bones studied in nanometer scale.* Nano Letters 2004, 4(7):1253-1256.
 121. Charest J, Garcia A, King W., *Myoblast alignment and differentiation on cell culture substrates with microscale topography and model chemistries.* Biomaterials 2007, 28(13):2202-2210.
 122. Evans D, Britland S, Wigmore P., *Differential response of fetal and neonatal myoblasts to topographical guidance cues in vitro.* Development Genes and Evolution 1999, 209(7):438-442.