



Mariana Pires Ferrão

Licenciatura em Engenharia Biomédica

**Produção e Caracterização de
Espumas 3D obtidas por Electrofiação para
aplicação em Engenharia de Tecidos**

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em
Engenharia Biomédica

Orientador: João Paulo Borges, Professor Auxiliar, DCM-FCT/UNL

Co-orientador: Isabel Ferreira, Professora Associada, DCM-FCT/UNL

Júri:

Presidente: Prof. Doutora Carla Maria Quintão Pereira, Professora Auxiliar, FCT/UNL

Arguente: Prof. Doutora Célia Maria Reis Henriques, Professora Auxiliar, FCT/UNL

Vogal: Prof. Doutor João Paulo Borges, Professor Auxiliar, FCT/UNL



FACULDADE DE
CIÊNCIAS E TECNOLOGIA
UNIVERSIDADE NOVA DE LISBOA

Março, 2015

Mariana Pires Ferrão

Licenciatura em Engenharia Biomédica

**Produção e Caracterização de
Espumas 3D obtidas por Electrofiação para
aplicação em Engenharia de Tecidos**

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em
Engenharia Biomédica

Orientador: João Paulo Borges, Professor Auxiliar, DCM-FCT/UNL

Co-orientador: Isabel Ferreira, Professora Associada, DCM-FCT/UNL

Júri:

Presidente: Prof. Doutora Carla Maria Quintão Pereira, Professora Auxiliar, FCT/UNL

Arguente: Prof. Doutora Célia Maria Reis Henriques, Professora Auxiliar, FCT/UNL

Vogal: Prof. Doutor João Paulo Borges, Professor Auxiliar, FCT/UNL

Março, 2015

Produção e Caracterização de Espumas 3D obtidas por Electrofiação para aplicação em Engenharia de Tecidos¹

Copyright © Mariana Pires Ferrão, Faculdade de Ciências e Tecnologia, Universidade Nova de Lisboa.

A Faculdade de Ciências e Tecnologia e a Universidade Nova de Lisboa têm o direito, perpétuo e sem limites geográficos, de arquivar e publicar esta dissertação através de exemplares impressos reproduzidos em papel ou de forma digital, ou por qualquer outro meio conhecido ou que venha a ser inventado, e de a divulgar através de repositórios científicos e de admitir a sua cópia e distribuição com objectivos educacionais ou de investigação, não comerciais, desde que seja dado crédito ao autor e editor

¹ Este documento foi escrito de acordo com o antigo acordo ortográfico

AGRADECIMENTOS

Após a concretização deste trabalho, não poderia deixar de expressar os meus agradecimentos a todos aqueles que contribuíram para o seu sucesso.

Gostaria antes de mais reconhecer todo o apoio e incentivo demonstrado pelo Professor João Paulo Borges. A sua partilha de conhecimentos e a disponibilidade foram fundamentais para a realização deste trabalho.

Também quero agradecer à minha co-orientadora, Professora Isabel Ferreira, pelo profissionalismo e colaboração. O seu contributo foi essencial para a finalização desta dissertação.

Ao Professor Jorge Carvalho e Silva, pela cooperação e pelo interesse demonstrado pelo meu trabalho.

Aos elementos do DCM e do CENIMAT, pela disponibilidade que proporcionaram ao longo deste semestre, contribuindo assim para o desenvolvimento da tese.

Quero deixar um agradecimento muito especial à Alexandra Rodrigues, ao Carlos João, à Ana Baptista e ao Paulo Duarte por todos os dias incentivarem-me a continuar, mostrando sempre disponibilidade e simpatia.

À Paula Soares, à Coro e à Suzete pelo estímulo e pelo espírito de entreatajuda que ofereceram.

Às minhas queridas amigas de laboratório, Inês Ropio, Ana Isabel Sousa e Diana Machado quero deixar um profundo obrigada. Por terem sido uma companhia inigualável e por terem tornado os meus dias mais agradáveis.

Aos meus Pais, por me terem dado a oportunidade de me formar e pela confiança que depositaram em mim. Pela motivação, compreensão e transmissão de sabedoria!

Às minhas irmãs, Cristina e Leonor, pelo apoio incondicional e por todos os conselhos que me transmitiram. E também à restante família, que de forma indirecta, acompanharam o meu percurso.

Ao Prof. Doutor José Alberto Campos Neves, por todo o tempo dispendido e por todas as

sugestões assertivas. À Prof.^a Doutora Isabel Ramos e ao Prof. Doutor Luís Gales pela amabilidade de me receberem e oferecerem a oportunidade de trabalhar no Hospital de São João e no IBMC/UP, respectivamente.

Aos meus colegas de Faculdade, pela união e pela paciência que tiveram comigo. Em especial, à Constança, à Rita e ao Francisco, que sempre me acompanharam ao longo destes cinco anos.

A todos os meus sinceros agradecimentos.

RESUMO

A produção de estruturas tridimensionais poliméricas tem sido foco de estudo por parte da Engenharia de Células e Tecidos, pelo que mimetizam melhor as condições *in vivo* dos tecidos. A conjugação das propriedades eléctricas com arquitectura 3D permite uma regeneração tecidual mais eficaz. Desta forma este estudo incidiu na construção de *scaffolds*, que conjugasse as propriedades mecânicas, eléctricas e biológicas num só suporte.

O processo utilizado para produção de *scaffolds* baseou-se na electrofiação de soluções poliméricas de PCL (8% m/m) com incorporação de óxido de grafeno em diferentes concentrações: 0.01%, 0.1% e 0.25% (m/V). Foram avaliados os parâmetros de electrofiação que permitiram a organização tridimensional.

A composição química e a morfologia das membranas foram avaliadas por FTIR-ATR e por microscopia electrónica de varrimento (MEV), respectivamente. Através de ensaios de tracção e de permeabilidade estudou-se a influência de óxido de grafeno na matriz polimérica.

Foram feitas experiências de redução de óxido de grafeno nas fibras electrofiadas, tanto nas membranas como das espumas, através do uso de vapores de hidrazina. Este mecanismo mostrou-se ineficaz, uma vez que afectou a sua morfologia.

As espumas foram avaliadas quanto à sua bioactividade e propriedades mecânicas (ensaios de compressão).

Também foram realizados testes de viabilidade celular nas membranas e de adesão celular nas espumas, de forma a avaliar o seu potencial para aplicação biomédica.

Os resultados destes ensaios revelaram que óxido de grafeno não apresenta efeitos citotóxicos para o organismo e a sua presença promove a adesão celular ao *scaffold*.

Palavras-chave: Electrofiação, Espumas Condutoras, Policaprolactona, Óxido de Grafeno, Engenharia de Tecidos

ABSTRACT

The production of three-dimensional polymeric structures has been a subject of Cell and Tissue Engineering research, because they mimic the tissue conditions. The coupling of electrical properties with 3D architecture allows a more effective tissue regeneration. The aim of this work is the construction of *scaffolds* matching mechanical, electrical and biological properties in a single support.

The process employed for the production of *scaffolds* was based on electrospinning of PCL polymeric solutions (8% w/w) with incorporation of graphene oxide under different concentrations: 0.01%, 0.1%, 0.25% (w/V). The parameters of electrospinning that allowed the three-dimensional organization were evaluated.

The chemical composition and membranes morphology were respectively evaluated by FTIR-ATR and by Scanning Electron Microscopy (SEM). Using the tensile and permeability tests, the graphene oxide influence in the polymeric matrix was evaluated.

Experiments on graphene oxide reduction were conducted for both, membranes and foams, by using steam of hydrazine. This procedure revealed to be insufficient since it affected the structures morphology.

The bioactive potential of graphene oxide foams were tested, as well as their mechanical behavior under compression tests.

Citotoxicity studies of PCL and graphene oxide membranes were carried out in order to characterize its biocompatibility in the organism. Afterwards, the foams were submitted to adhesion tests.

The cell culture revealed the non-toxicity of GO and its presence promote the cell adhesion to the *scaffold*.

Keywords: Electrospinning, Conductive Foams, Polycaprolactone, Graphene Oxide, Tissue Engineering

ÍNDICE

Agradecimentos	v
Resumo	vii
Abstract	ix
Índice	xi
Índice de Figuras	xv
Índice de Tabelas	xix
Lista de Abreviaturas e Siglas	xxi
Lista de Símbolos	xxiii
Objectivos e Estrutura da Tese	1
1. Introdução	3
1.1. Scaffolds e sua importância na Engenharia de Tecidos	3
1.1.1. Biomateriais	3
1.2. Grafite	5
1.2.1. Grafeno.....	6
1.2.2. Óxido de Grafeno	6
1.2.3. Síntese de Óxido de Grafeno.....	7
1.2.4. Óxido de Grafeno Reduzido.....	7
1.2.5. Aplicações na Engenharia de Tecidos	8
1.3. Electrofição	9
1.3.1. Parâmetros da Solução Polimérica	10
1.3.2. Parâmetros do Processo.....	11
1.3.3. Parâmetros Ambientais	13
1.4. Produção de Estruturas Tridimensionais	14

2.	Procedimento Experimental.....	17
2.1.	Síntese de Óxido de Grafeno	17
2.2.	Materiais para Soluções Poliméricas	18
2.3.	Produção de Nanofibras PCL e OG	18
2.3.1.	Preparação das Soluções e optimização do processo de electrofiação	18
2.3.2.	Montagem para produção de Espumas 3D.....	19
2.4.	Redução de Óxido de Grafeno	20
2.4.1.	Redução de Óxido de Grafeno por Vapores de hidrazina à temperatura ambiente.....	20
2.5.	Caracterização Química do PCL e dos pós de Grafite e Óxido de Grafeno	20
2.5.1.	Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR)	20
2.6.	Avaliação da Condutividade das Soluções	21
2.7.	Avaliação da Viscosidade das Soluções	21
2.8.	Caracterização das Membranas.....	22
2.8.1.	Microscopia Electrónica de Varrimento (MEV).....	22
2.9.	Ensaio Mecânicos	22
2.9.1.	Ensaio de Tracção das Membranas	22
2.9.2.	Ensaio de Compressão das Espumas.....	23
2.10.	Ensaio de Condutividade.....	24
2.11.	Determinação de ângulos de contacto – avaliação da hidrofili- cidade das membranas	25
2.12.	Bioactividade	26
2.13.	Testes de Citotoxicidade e de Adesão Celular.....	27
2.13.1.	Ensaio de Citotoxicidade	27
2.13.2.	Ensaio de Adesão Celular nas Espumas	28
3.	Análise e Discussão de Resultados.....	29
3.1.	Síntese de Óxido de Grafeno	29
3.1.1.	Composição química das membranas	30
3.2.	Ensaio de Condutividade da Solução	33

3.3. Ensaio de Viscosidade.....	34
3.3. Análise Morfológica das Membranas	35
3.3.1. Variação da Concentração de Óxido de Grafeno	35
3.4. Caracterização Mecânica das Membranas	39
3.5. Caracterização Eléctrica das Membranas.....	41
3.6. Caracterização da Hidrofilicidade das Membranas	43
3.7. Ensaio de Citotoxicidade das Membranas	45
3.8. Caracterização das Espumas.....	47
3.9. Bioactividade das Espumas	49
3.10. Caracterização Mecânica das Espumas	50
3.11. Caracterização Eléctrica das Espumas.....	53
3.12. Ensaio de Adesão das Espumas	54
4. Conclusões e Perspectivas Futuras	57
5. Referências Bibliográficas.....	59
Anexos	65
A. Produção de Filmes	65
B. Resultados Obtidos nos Ensaio de Tracção	65
C. Resultados Obtidos nos Ensaio de Condutividade	67
D. Resultados Obtidos nos Ensaio de Hidrofilicidade.....	67
E. Redução de Óxido de Grafeno por Vapores de Hidrazina com controlo de temperatura.....	68
F. Preparação de 1L de solução SBF10	68
G. Quadro dos Resultados Obtidos para os Ensaio de Condutividade das Espumas.....	69
H. Preparação da Cultura Celular	69

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.1 - Estrutura da unidade repetitiva do Poli(ϵ -caprolactona) [10].....	4
Figura 1.2 - Estrutura Atómica da Grafite (adaptado de [12]).....	5
Figura 1.3 – Estrutura do: (a) Grafeno; (b) Óxido de Grafeno; (c) Óxido de Grafeno Reduzido (Adaptado de [25]).....	7
Figura 1.4 - Sistema de Electrofiação (adaptado de [35])	10
Figura 1.5 – Diferentes Colectores existentes: (a) Placa Estática Plana; (b) Eléctrodos Paralelos; (c) Disco Rotativo; (d) Cilindro Rotativo; (e) Grelha [43]	12
Figura 1.6 – (a) Esquema de auto-organização de fibras (Adaptado de [47]); (b) Esquema de uma fibra heterogénea (Adaptado de [48])	15
Figura 2.1 – (a) Colector (Área total de 11x11 cm ²); (b) Aparelho de electrofiação.....	19
Figura 2.2 - Viscosímetro rotacional Cone-Prato ([51])	21
Figura 2.3 - Curva Exemplo de tensão em função da deformação, num ensaio de tracção.....	22
Figura 2.4 - Esquema do efeito na amostra durante um ensaio de compressão ([52])	23
Figura 2.5 – Curva de Compressão Típica obtida para Espumas.....	24
Figura 2.6 - Curva Característica I-V	24
Figura 2.7 - Esquema do Equipamento utilizado para medição de ângulos de contacto ([55]) .	25
Figura 2.8 - Placa de 96 poços para ensaios de viabilidade celular.....	27
Figura 2.9 - Placa de 24 poços, com suporte de teflon, para ensaios de adesão.....	28
Figura 3.1 - (a) Pó de Grafite, (b) Pó de Óxido de Grafeno, (c) Imagem de SEM do Óxido de Grafeno, ampliação 1x (d) Imagem de SEM do Óxido de Grafeno, ampliação 50x.....	29
Figura 3.2 - Espectro de Absorção FTIR do PCL	30
Figura 3.3 - Espectro de Absorção FTIR do Pó de Grafite	31
Figura 3.4 - Espectro de Absorção FTIR do Pó de Óxido de Grafeno	31
Figura 3.6 – Espectro de Absorção FTIR das Membranas: (a) P8-OG0.01, (b) P8-OG0.1, (c) P8-OG0.25	33

Figura 3.5 - Condutividade das Soluções de PCL e OG.....	34
Figura 3.7 – Variação da Viscosidade com a concentração de Óxido de Grafeno	34
Figura 3.8 - Imagens de SEM de Membranas com diferentes concentrações de Óxido de Grafeno: (a ₁) e (a ₂) P8-OG0.01; (b ₁) e (b ₂) P8-OG0.1; (c ₁) e (c ₂) P8-OG0.25.....	36
Figura 3.9 - Imagens de SEM da Membrana P8.....	37
Figura 3.10 - Histograma dos diâmetros das fibras de: (a) P8-OG0.01, (b) P8-OG0.1, (c)P8-OG0.25	38
Figura 3.11 – Curvas de Tracção das diferentes membranas	39
Figura 3.12 - Gráficos de Comparação do Módulo de Young e da Tensão de Ruptura	40
Figura 3.13 - Imagem de SEM da Membrana P8-OG0.1 após 24h de incubação	42
Figura 3.14 - Ângulos de Contacto em função da concentração do Óxido de Grafeno	44
Figura 3.15 - Imagem de SEM da Fibra da Membrana P8-0.25OG	45
Figura 3.16 - Viabilidade Celular das Membranas de PCL e Óxido de Grafeno	45
Figura 3.17 - Culturas Celulares de: (a) Controlo Positivo; (b) Controlo Negativo; (c) P8-OG0.25, com uma ampliação 100x.....	46
Figura 3.18 - Zona Densa de Fibras da Membrana P8-OG0.25.....	47
Figura 3.19 - Geometria das depressões do colector, com material dieléctrico e condutor	48
Figura 3.20 - Imagens Reais de Espumas: (a) ampliada (b) vista de cima (c) PCL, (d) P8-OG0.01, (e) P8-OG0.1, (f) P8-OG0.25.....	49
Figura 3.21 - Imagens de SEM das Espumas de (a) PCL e (b) P8-OG0.25 submersas em SBF 10X, após (1) 4 horas, (2) 8 horas e (3) 12horas	50
Figura 3.22 - Curva de Compressão da Espuma P8, com ampliação da zona elástica e patamar de colapso (A)	51
Figura 3.23 - Curva de Compressão da Espuma P8-OG0.01, com ampliação da zona elástica e patamar de colapso (B)	52
Figura 3.24 - Curva de Compressão da Espuma P8-OG0. 1, com ampliação da zona elástica e patamar de colapso (C)	52
Figura 3.25 - Curva de Compressão da Espuma P8-OG0.25, com ampliação da zona elástica e patamar de colapso (D)	52
Figura 3.26 - Espuma antes e depois da Redução por Vapores de Hidrazina	53
Figura A.1 – (a) Equipamento utilizado para a Produção de Filmes; (b) Régua	65

Figura G.2 - Esquema de Contagem do Hemocítmetro..... 70

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1.1 - Propriedades da Poli(ϵ -caprolactona) [11].....	5
Tabela 1.2 - Propriedades do Grafeno [15]	6
Tabela 1.3 - Grupos Funcionais presentes no Óxido de Grafeno (adaptado de [17]).....	6
Tabela 1.4 – Factores promotores à estruturação tridimensional das fibras.....	14
Tabela 2.1 - Concentrações das Soluções Poliméricas com OG.....	19
Tabela 3.1 - Condutividade das Soluções de PCL e OG.....	33
Tabela 3.2 - Parâmetros de Electrofiação para produção de membranas.....	35
Tabela 3.3 - Diâmetro Médio das Fibras com diferentes concentrações de Óxido de Grafeno e respectivo desvio padrão	37
Tabela 3.4 - Propriedades Mecânicas das Membranas com diferentes concentrações de Óxido de Grafeno	39
Tabela 3.5 - Condutividade das Membranas de PCL e de PCL/Grafite.....	41
Tabela 3.6 - Condutividade das Membranas com OG, após 24h de incubação	42
Tabela 3.7 - Ângulos de Contacto de Membranas e Filmes com Óxido de Grafeno	43
Tabela 3.8 – Classificação do índice de Citotoxicidade.....	46
Tabela 3.9 - Parâmetros de Electrofiação para produção de Espumas	48
Tabela 3.10 - Propriedades Mecânicas das Espumas com diferentes concentrações de Óxido de Grafeno	51
Tabela 3.11 - Ensaio de Condutividade das Espumas, após 24 horas de incubação com vapores de hidrazina	54
Tabela 3.12 – Média das medições das absorvâncias a 570nm e 600nm.....	54
Tabela B.1 - Resultados de Ensaio de Tracção à membrana P8.....	65
Tabela B.2 - Resultados de Ensaio de Tracção à membrana P8-OG0.01.....	66
Tabela B.3 - Resultados de Ensaio de Tracção à membrana P8-OG0.1	66
Tabela B.4 - Resultados de Ensaio de Tracção à membrana P8-OG0.25.....	66
Tabela C.5 - Resultados de Ensaio de Condutividade à membrana com OG	67

Tabela D.6 - Resultados dos Ângulos de Contacto	67
Tabela E.7 – Resultados de Condutividade da Membrana P8-OG0.1 (com temperatura controlada).....	68
Tabela G.8 - Resultados da Condutividade das Espumas	69

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

2D	Bidimensional
3D	Tridimensional
ATR	<i>Attenuated Total Reflectance</i>
DCM	Diclorometano
DMF	Dimetilformamida
ETC	Engenharia de Tecidos e Células
FDA	<i>Food and Drug Delivery</i>
FTIR	<i>Fourier Transform Infrared</i>
HR	Humidade Relativa
m/m	Rácio de massa/massa
m/V	Rácio de massa/Volume
OG	Óxido de Grafeno
PCL	Policaprolactona
PTFE	Politetrafluoretileno (Teflon)
MEV	Microscopia de Electrónica de Varrimento
SBF10	Simulated Body Fluid (10x concentrado)
Saos-2	<i>Sarcoma Osteogenic</i>
VIPS	<i>Vapor-Induced Phase Separation</i>

LISTA DE SÍMBOLOS

P	Polarização
ε_0	Permitividade Eléctrica no Vácuo
χ_e	Susceptibilidade Eléctrica
E	Campo Eléctrico
ε_r	Constante Dieléctrica
M	Massa molar
ρ	Densidade
\varnothing	Diâmetro
η	Viscosidade
τ	Tensão de Corte
γ	Fluxo de Corte
E	Módulo de Young
σ	Tensão
σ_R	Tensão de Ruptura
$\sigma_{máx}$	Tensão Máxima
F	Força
A	Área
Δl	Variação de comprimento
l_0	Comprimento Inicial
ε	Deformação
R	Resistência
V	Tensão Aplicada
I	Corrente Eléctrica

σ_e	Condutividade Eléctrica
σ^*	Tensão de Colapso
$\varepsilon_{máx}$	Deformação Máxima de Compressão

OBJECTIVOS E ESTRUTURA DA TESE

No âmbito de Biomateriais e Engenharia de Tecidos, a realização deste trabalho tem como principal objectivo a produção de estruturas tridimensionais condutoras para aplicação biomédica. Esta incide na combinação de óxido de grafeno e policaprolactona (PCL), cujas propriedades são bastante atractivas para área da regeneração de tecidos.

Como os tecidos vivos têm a capacidade de auto-regeneração a nível celular, a procura de estruturas que facilitem este processo tem sido vasta. Dessa forma, a complementaridade entre os campos da engenharia, biologia e ciência dos materiais possibilitou a realização de *scaffolds* biodegradáveis e biocompatíveis que permitem manter, restaurar ou melhorar a funcionalidade dos tecidos humanos [1].

A investigação relativa à alternativa de regeneração de tecidos está cada vez mais centrada na produção de materiais capazes de mimetizar a organização tecidular. Nesta perspectiva, o presente trabalho visa a produção de espumas tridimensionais, a partir de organização de nanofibras poliméricas. Os *scaffolds* compósitos de PCL e óxido de grafeno são preparados por uma técnica simples e de baixo custo, designada electrofiação. Contudo, sendo este tipicamente um processo de produção de estruturas 2D, pretende-se analisar os diferentes parâmetros que conduzem à formação de estruturas 3D.

Esta dissertação está dividida em quatro capítulos:

➤ **Primeiro Capítulo: Introdução**

Este capítulo refere-se à contextualização dos principais conceitos inerentes ao trabalho laboratorial. É feita uma abordagem teórica sobre os vários materiais usados, a sua combinação e processamento, bem como, as suas aplicações em ETC.

➤ **Segundo Capítulo: Procedimento Experimental**

Neste capítulo expõe-se todos os materiais usados e procedimentos aplicados em cada etapa da experiência.

Inicia-se pela descrição da solução utilizada na produção de nanofibras, seguida da parametrização e optimização do processo de electrofiação para estruturas tridimensionais.

Posteriormente são descritos os métodos utilizados para a caracterização morfológica, eléctrica, mecânica e físico-química das membranas.

➤ **Terceiro Capítulo: Análise e Discussão de Resultados**

No terceiro capítulo, são apresentados os resultados obtidos e a sua análise. Numa primeira fase, são discutidos detalhadamente os resultados referentes às membranas. Adicionalmente comprovou-se a biocompatibilidade.

➤ **Quarto Capítulo: Conclusões e Futuras Perspectivas**

Por último, são retiradas conclusões e apresentadas perspectivas futuras de desenvolvimento deste trabalho.

1. INTRODUÇÃO

1.1. *Scaffolds* e sua importância na Engenharia de Tecidos

A Engenharia de Tecidos é uma área multidisciplinar que alia os conhecimentos da engenharia de materiais à biologia celular, com o objectivo principal de desenvolver substitutos tecidulares ou até mesmo de regenerar ou recriar órgãos. Os *scaffolds* são estruturas tridimensionais e de elevada porosidade, que interagem com os tecidos vivos do corpo humano, e assim, incentivam a adesão celular, e sustentam o crescimento, proliferação e diferenciação celular [1]–[3]. O quadro do estudo destes materiais incidiu em dois pontos fundamentais: o primeiro refere-se aos diferentes materiais utilizados e avaliação de citotoxicidade. O segundo define a sua arquitectura e propriedades biológicas, físicas e químicas.

Existem requisitos básicos que os *scaffolds* devem apresentar, para que sejam aplicáveis na regeneração de tecido. São estes:

➤ **Biocompatibilidade:**

A biocompatibilidade é um conceito que alia o material do *scaffold* com a sua aplicação. Deste modo, deve apresentar uma biofuncionalidade adequada, sem provocar quaisquer efeitos colaterais ao organismo. As características de biocompatibilidade são influenciadas pelas propriedades químicas, biológicas e físicas do suporte, e por conseguinte, devem ser avaliadas ao nível da interface com o tecido. [1][4][5].

➤ **Biodegradabilidade:**

A biodegradação é um processo pelo qual há decomposição do material por parte elementos biológicos, que deve ser controlado com base na formação do novo tecido, do tempo de regeneração e de todo processo envolvido. Os produtos resultantes da degradação, também não devem causar respostas adversas ao organismo [1][4][5].

1.1.1. Biomateriais

Na Segunda Conferência da Sociedade Europeia de Biomateriais (*ESB*), o conceito de biomaterial ficou definido como “material destinado a interagir com sistemas biológicos, para avaliar, tratar, aumentar ou substituir qualquer tecido, órgão ou função do corpo”. Esta

caracterização tem sido reformulada consoante o desenvolvimento de novas funcionalidades. Pode-se dividir a sua evolução em três gerações: a primeira geração engloba os biomateriais inertes, que não desencadeiam qualquer reacção no organismo. Em meados do século XX, desenvolveram-se materiais que promoviam a regeneração tecidual, designados materiais bioactivos, tais como cerâmicos. Estes materiais, pertencentes à 2ª geração, foram construídos com o objectivo final de coligar as propriedades físicas à interacção com o tecido circundante. Mais tarde, em 2002, *Hench e Polak* descreveram os designados “biomateriais da terceira geração”, que associam as propriedades anteriores com a capacidade de induzir respostas celulares [6]. Estes estão de acordo com as características procuradas para o recente trabalho.

A extensa gama de materiais usados para produção de *scaffolds* está dividida em três categorias: metais, cerâmicos e polímeros. Tanto os metais como a maior parte dos cerâmicos apresentam a desvantagem de não ser biodegradáveis, pelo que o seu uso não será sustentável. No entanto, apresentam vantagens relativamente às suas propriedades mecânicas: módulo de Young (no caso dos metais) e resistência de compressão (no caso dos cerâmicos) [7].

Pelo facto dos suportes serem dedicados ao tecido vivo, restringiu-se a escolha aos polímeros e subsequentemente a compósitos elaborados a partir destes. Os compósitos são definidos como uma junção de dois componentes distintos, que conjugam as suas propriedades intrínsecas. Este material é aplicado frequentemente à regeneração de tecidos, com diferentes combinações de matérias, que incluem aqueles mencionados acima [7][8].

➤ Poli (ϵ -caprolactona)

Entre vários materiais, e acompanhando o constante desenvolvimento na criação de novos tecidos, o PCL apresenta-se como um polímero adequado, aplicável na produção de *scaffolds* (Figura 1.1). É um polímero de baixo custo, aprovado pela *Food and Drug Administration*, que apresenta inúmeras características cativantes para os investigadores [9].

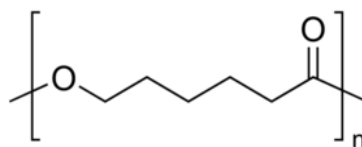


Figura 1.1 - Estrutura da unidade repetitiva do Poli(ϵ -caprolactona) [10]

A fórmula linear deste material é $(C_8H_{10}O_2)_n$, e a sua estrutura química está representada na Figura 1.1. É um poliéster alifático linear, com estrutura semicristalina, que se destaca pela sua flexibilidade e resistência, solubilidade elevada em solventes orgânicos e

biodegradabilidade. Os seus graus de cristalinidade e temperatura de fusão variam com o peso molecular. Ou seja, quanto maior o seu peso molecular, maior o seu grau de cristalinidade e, consequentemente, maior a temperatura de fusão. Adicionalmente, é considerado um material não tóxico com propriedades mecânicas e químicas atractivas e de fácil manuseamento.

Tabela 1.1 - Propriedades da Poli(ϵ -caprolactona) [11]

Ponto de Fusão	55 - 60 °C
Temperatura de Degradação	350 °C
Módulo de Elasticidade	220 - 440 MPa
Resistência à Compressão	120 MPa
Resistência à Tração	20 - 42 MPa
Viscosidade Intrínseca	0.9 cm ³ ·g ⁻¹

1.2. Grafite

A grafite (Figura 1.2) é um alótropo de carbono com um arranjo molecular hexagonal. É composta por várias camadas de grafeno, separadas por 0.34 nm e ligadas através de forças de Van der Waals. É considerado um material com características singulares, tanto a nível de condutividade térmica e eléctrica, como em termos de rigidez e resistência [12].

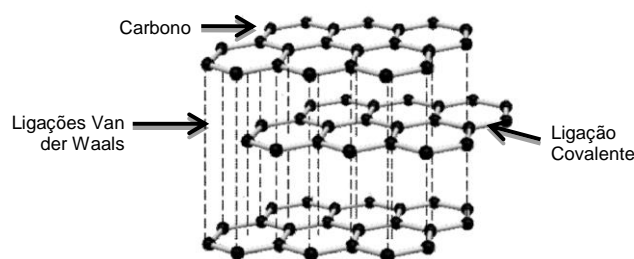


Figura 1.2 - Estrutura Atômica da Grafite (adaptado de [12])

Este é classificado como um material anisotrópico devido ao diferente rearranjo dos átomos de carbono. Os átomos possuem uma hibridização sp^2 com ligações π deslocalizadas, que promovem o seu carácter electricamente e termicamente condutor [13].

1.2.1. Grafeno

Dotado de propriedades únicas, o grafeno despertou o interesse na comunidade científica nos últimos anos. A sua estrutura 2D de átomos de carbono distribuídos de forma hexagonal e compostos por ligações do tipo sp^2 , apresenta propriedades mecânicas, eléctricas e térmicas, não encontradas noutros materiais [14]. De salientar que as características deste nanomaterial e a sua diversidade estrutural permite que seja aplicado em inúmeras e variadas áreas tais como sensores, nanocompósitos, armazenamento de energia e libertação controlada de fármacos [15].

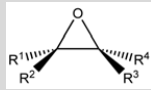


Tabela 1.2 - Propriedades do Grafeno [15]

Área Superficial	2630 m^2g^{-1}
Mobilidade de Cargas	200000 $cm^2V^{-1}s^{-1}$
Módulo de Elasticidade	~ 1 TPA
Condutividade Térmica	~ 5000 $Wm^{-1}K^{-1}$
Transmitância	~ 97.7%

1.2.2. Óxido de Grafeno

O óxido de grafeno (OG), representado na Figura 1.3 (b), é uma rede hexagonal de carbonos, que apresenta hibridização sp^2 e sp^3 , e estruturalmente, contém grupos funcionais epóxido e hidroxilo no seu plano basal, enquanto na sua periferia, maioritariamente existem grupos carbonilo e carboxilo (Tabela 1.3).

Tabela 1.3 - Grupos Funcionais presentes no Óxido de Grafeno (adaptado de [17])

Grupo Funcional	Estrutura Atómica
Epóxido	
Hidroxilo	$R-O-H$
Carbonilo	
Carboxilo	

A sua estrutura não é facilmente definida devido à variação do rácio entre os grupos funcionais presentes, a qual depende do material oxidado e do método de síntese [16]. Como os grupos funcionais apresentam afinidade às moléculas de água, o óxido de grafeno é um material hidrofílico e solúvel em água [17].

1.2.3. Síntese de Óxido de Grafeno

A primeira referência a óxido de grafeno (OG) foi reportada por Brodie, que numa reacção de clorato de potássio (KClO_3) com uma mistura de grafite e ácido nítrico (HNO_3), comprovou o aumento da massa de grafite, maioritariamente composto por hidrogénio, oxigénio e carbono [18]. Mais tarde, baseando-se no protocolo de Brodie, Staudenmaier fez pequenas modificações, que levaram a um aumento de oxidação da grafite. Esse aumento deve-se à adição de compostos mais ácidos como ácido sulfúrico concentrado e ácido nítrico [19].

Com base nestas descobertas, Hummers e Offeman optimizaram a técnica de obtenção de óxido de grafeno, através do uso de diferentes agentes oxidantes e acidificantes, como o permanganato de potássio (KMnO_4) e ácido sulfúrico concentrado (H_2SO_4) [20]. Contudo, os resultados foram semelhantes aos níveis de oxidação obtidos pelo método de Staudenmaier.

Apesar da dificuldade em definir a estrutura exacta de OG, sabe-se que a inserção dos grupos funcionais (Tabela 1.3) na grafite resulta no alargamento da distância interplanar das camadas, ou seja, passa de uma distância de 0.34 nm para 0.625 nm. Por conseguinte, este aumento de distância promove uma redução das forças de Van der Waals e uma maior facilidade em obter camadas isoladas (i.e. óxido de grafeno) [21][22].

1.2.4. Óxido de Grafeno Reduzido

A redução do óxido de grafeno resulta na recuperação das propriedades eléctricas e mecânicas do grafeno. No entanto, em termos estruturais, as diferenças em relação ao grafeno são significativas.

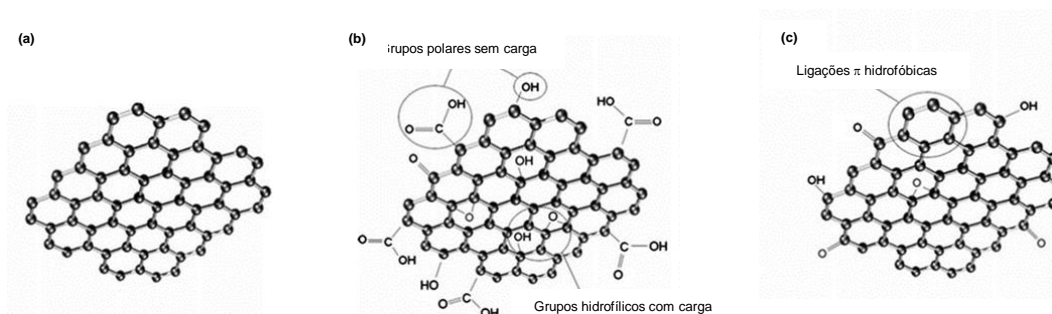


Figura 1.3 – Estrutura do: (a) Grafeno; (b) Óxido de Grafeno; (c) Óxido de Grafeno Reduzido
(Adaptado de [25])

A redução do óxido de grafeno consiste na desidratação e desoxigenação do óxido de grafeno, isto é, na eliminação dos grupos epóxidos da sua estrutura.

O método da redução pode ser dividido em duas abordagens: química e térmica. A primeira recorre ao uso de agentes redutores, como a hidrazina, borohidreto de sódio, entre outros. A segunda abordagem requer um tratamento térmico através do aumento rápido da temperatura, que resulta na desagregação dos grupos funcionais com oxigénio. No entanto, ambas as metodologias podem provocar defeitos estruturais, uma vez que a decomposição pode levar também à remoção de átomos de carbono da superfície gráfica. Tal resulta na presença de descontinuidades na sua estrutura [23][24][25].

1.2.5. Aplicações na Engenharia de Tecidos

Materiais compostos por grafeno e derivados têm sido explorados para cicatrização de feridas, na engenharia celular, na medicina regenerativa e na engenharia de tecidos [15]. Devido às suas propriedades de excelência, este é potencialmente aplicado como material de reforço em *scaffolds*, fibras electrofiadas, hidrogéis, entre outros [14]. Vários estudos focaram-se na sua influência em meio celular e nas vantagens proporcionadas.

Do ponto de vista de regeneração celular, o objectivo principal é criar um microambiente onde a actividade celular ocorra eficazmente, e os materiais utilizados para a promover, apresentem um nível de toxicidade reduzido. Demonstrou-se que a interacção do grafeno e do óxido de grafeno com os biominais mais abundantes do tecido ósseo promove a sua proliferação. Para além de exibir biocompatibilidade, a sua incorporação permitiu uma melhoria da bioactividade [26]. Igualmente se verificou que o grafeno e óxido de grafeno promovem a diferenciação em diferentes linhagens celulares: neuronais, osteogénicas e adipogénicas [27].

Depan *et al.* produziram um *scaffold* de quitosano com ligações covalentes ao óxido de grafeno, cuja estrutura apresentou um comportamento de adesão e proliferação celular muito eficaz. Estas estruturas tornaram-se vantajosas para regeneração de tecidos ósseos, uma vez que a sua morfologia porosa facilitou a interacção celular. Conclui-se que a adição de OG aumenta a natureza hidrofílica do suporte, e por isso promove a união das células a este [28].

Recentemente, B. Chaudhuri *et al.* estudaram a biocompatibilidade de *scaffolds* compostos por PCL e OG em células estaminais humanas. Observaram que, na presença de *scaffolds* de PCL/OG, a adesão e proliferação celular ocorre mais eficazmente. No início a um ritmo lento, devido a hidrofobicidade de PCL, mas uma vez que as células começam a aderir e a ficar expostas a GO, o crescimento celular é acelerado [29].

➤ Estimulação Eléctrica

A bioelectricidade engloba fenómenos eléctricos associados ao corpo humano, em geral pela manutenção das funções biológicas tais como a sinalização do sistema nervoso, a contracção muscular e cicatrização de feridas. A partir deste conceito, foram testados processos de estimulação eléctrica em meio celular (*in vivo* ou *in vitro*), que resulta no aumento da sua dinâmica.

A produção de *scaffolds* condutores surgiu com base na possibilidade de controlar o comportamento celular. A sua regulação é feita através da aplicação de um campo ou corrente eléctrica no suporte condutor, que afecta a actividade e repostas celulares [30].

Vários autores reportaram as condições apropriadas de estimulação eléctrica em diversos tipos de células, bem como os diferentes suportes utilizados. No contexto de regeneração óssea foram fabricadas estruturas electroconductoras, que ao serem estimuladas, permitiram uma adesão e proliferação celular mais eficiente. Segundo Supronowicz, o aumento da taxa de proliferação dos osteoblastos deve-se à presença de *scaffolds* condutores (PLA e CNT'S) [31]. Meng et al. também comprovaram que o uso de polímeros condutores, como PPy, incentiva a actividade celular [32]. Em tecidos neuronais, Xie et al. desenvolveram matrizes de PCL e PPy, que potencializam a regeneração dos nervos. A estimulação eléctrica ao nível do axónio demonstrou que a utilização de polímeros condutores, como PPy, é um factor promotor do crescimento do tecido neuronal. [33][34].

Em geral, o intervalo de tensão aplicada dos estímulos eléctricos encontra-se entre os 50 mV e os 100 mV, com uma duração de 1-4 horas. Também se demonstrou que a utilização de uma corrente contínua é mais eficaz que a corrente alterna [30][32].

1.3. Electrofiação

A electrofiação é um método frequentemente utilizado devido à sua versatilidade e baixo custo, que permite a produção de nanofibras a partir de soluções poliméricas ou de fundidos. Estas estruturas têm aplicações em diversas áreas como produção de biosensores, dispositivos ópticos e electrónicos e suportes catalíticos [35]. No âmbito de ETC, esta técnica permite a fabricação de *templates* provisórios, que servem de suporte para a integração de um novo tecido e que se assemelham à sua morfologia [3].

O equipamento de electrofiação, reproduzido na Figura 1.4, é composto por três componentes principais: fonte de tensão, bomba infusora e colector. Neste processo um campo eléctrico é aplicado à solução polimérica. O conteúdo na seringa é empurrado a um caudal constante, controlado pela bomba infusora. As cargas presentes na solução tendem a repelir-se com o aumento da tensão, sendo esta força oposta à tensão superficial. Forma-se uma gota na ponta da agulha em forma de cone, designada por cone de Taylor. Esta gota é estirada em

formando um jacto que viaja na direcção do colector, quando as forças electrostáticas superam a tensão superficial [36][37].

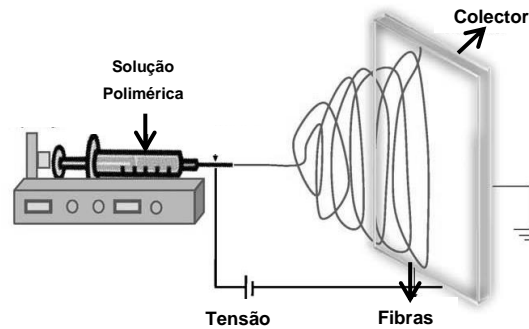


Figura 1.4 - Sistema de Electrofiação (adaptado de [35])

A evaporação do solvente, durante o tempo de voo provoca a solidificação das fibras. Combinado com o estiramento destas, devido às forças repulsivas da solução, é possível depositar as fibras, de forma aleatória, sobre o colector.

O processo de electrofiação é influenciado por diversos parâmetros controláveis, que conseqüentemente, modificam a morfologia final das fibras. Os parâmetros estão divididos em três áreas: solução, processo e ambientais. Os parâmetros da solução incluem o peso molecular do polímero, viscosidade e a condutividade da solução, a tensão superficial e o solvente utilizado. No que diz respeito aos parâmetros do processo salientam-se a tensão aplicada, o colector, o caudal aplicado e a distância entre a agulha e o colector. E, por último, os parâmetros ambientais, temperatura e a humidade, são igualmente importantes para obtenção das fibras [35]. Em seguida, são discutidos cada um dos parâmetros detalhadamente:

1.3.1. Parâmetros da Solução Polimérica

➤ **Peso Molecular e Viscosidade**

O peso molecular e a viscosidade são dois parâmetros que se relacionam entre si, ou seja, quanto maior o peso molecular do polímero, mais viscosa é a solução.

Por um lado, existe uma dificuldade de ejeção da solução, quando esta apresenta um elevado grau de viscosidade. Porém, quando os valores são demasiado baixos, a probabilidade de aparecerem defeitos nas fibras ou de obter *spray* aumenta. Desta forma, para que o processo seja viável, é necessário um controlo simultâneo sob estes parâmetros [35][38][39].

➤ **Condutividade da Solução**

Uma solução condutora implica a presença de cargas. Uma maior condutividade da solução reflecte-se numa repulsão mais forte entre as cargas, o que implica um maior estiramento de fibras.

Havendo a formação de fibras mais finas e sem contas como resultado de uma condutividade mais elevada, o inverso também ocorre. Pelo que a consequência de uma baixa condutividade é a produção de fibras com contas [38].

➤ **Tensão Superficial**

A tensão superficial contribui para a formação das fibras, para a sua morfologia e também influencia os outros parâmetros associados à electrofiação. Este parâmetro depende fortemente do solvente usado na mistura com o polímero, bem como, na concentração usada.

O início do processo de electrofiação dá-se quando a tensão superficial é superada. Por vezes, pode ocorrer a formação de contas, uma vez que a tensão superficial permite a aglomeração de solvente. Quando esta apresenta um valor elevado, provoca instabilidade do jacto, e assim, gera o fenómeno de *electrospraying*.

É possível reduzir os defeitos das fibras, ao aumentar a concentração da solução polimérica e consequentemente a sua viscosidade. Este aumento tem como resultado uma maior interacção entre as moléculas presentes na solução, e por conseguinte, um aumento do entrelaçamento entre as cadeias. Ao aplicar-se diferença de potencial à solução, as moléculas do solvente perdem a capacidade de se aglomerar e formar defeito, porque se difundem nas cadeias existentes. Observa-se que uso de um surfactante também permite uma redução da tensão superficial [35][40][41].

1.3.2. Parâmetros do Processo

➤ **Tensão Aplicada**

Este é um factor fundamental para a produção de fibras. Tal como foi referido anteriormente, o processo de electrofiação inicia-se quando a força electrostática supera a tensão superficial. Esta força é resultante da tensão aplicada à solução, pelo facto das cargas presentes serem electricamente induzidas.

Ao aplicar-se uma tensão de valor elevado, as cargas eléctricas da solução dão origem a uma força repulsiva maior, que por sua vez, resultam num estiramento mais alongado e fibras com um diâmetro menor. No entanto, ao aumentar o campo eléctrico, o tempo de voo da fibra diminui, e assim, as fibras produzidas podem apresentar maior diâmetro, se não for possível estirar as mesmas, o que depende do solvente usado. Deste modo, com o aumento da tensão

aplicada, o diâmetro das fibras produzidas pode ter uma configuração mais fina, ou mais larga [35][42].

➤ Efeito do Colector

A partir das diferentes geometrias do colector, pode-se controlar a morfologia das fibras produzidas.

Geralmente, o colector é feito de um material condutor, uma vez que ao depositar as fibras, as cargas residuais presentes dissipam-se facilmente para a placa condutora. Deste modo, é possível reduzir as forças de repulsão das fibras, havendo uma deposição mais eficiente.

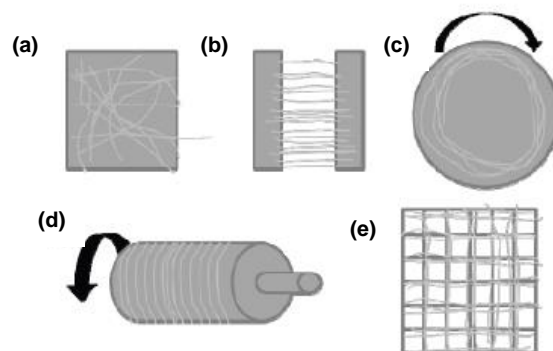


Figura 1.5 – Diferentes Colectores existentes: (a) Placa Estática Plana; (b) Eléctrodos Paralelos; (c) Disco Rotativo; (d) Cilindro Rotativo; (e) Grelha [43]

Existem diversos coletores, sendo os mais usados exemplificados na Figura 1.5, que resultam em matrizes com diferentes configurações. As placas rotativas permitem obter o alinhamento de fibras, ao contrário das placas estáticas, onde a deposição é feita de forma aleatória. Todos estes coletores estão ligados à terra, de forma a manter uma diferença de potencial estável entre si e a agulha [43].

➤ Caudal

A taxa a que a solução é ejetada varia consoante o caudal definido na bomba infusora. É necessário definir antecipadamente uma gama de valores para o caudal, de modo a que o processo de electrofiação ocorra. Se o caudal for demasiado baixo, a quantidade de solução que chega é mínima, e nesse caso, a sua ejeção pode sofrer interrupções. Mas, se o caudal for elevado, torna-se impossível ejectar regularmente a solução que se encontra na seringa, e por isso, aquela tende a acumular-se na ponta da agulha. Adicionalmente, verifica-se a obtenção de fibras com um diâmetro maior ou com contas maiores.

A partir do momento em que se decide um dado caudal, é necessário também ter em conta a taxa de evaporação do solvente. Se o caudal for grande para um tempo de voo curto, a

probabilidade de haver fusão de fibras é maior, uma vez que não houve tempo suficiente para o solvente se evaporar na sua totalidade [38][44].

➤ **Distância entre a Agulha e o Colector**

A distância entre a agulha e o colector influencia tanto a taxa a que o solvente se evapora, como o tempo de voo. A partir da variação deste parâmetro, é possível obter fibras com diferentes morfologias.

Quando a distância é menor, o tempo de voo é reduzido, e assim, o solvente não evapora tão eficientemente. O campo eléctrico presente é maior, para uma tensão constante, o que implica uma maior aceleração do jacto. Em consequência, pode ocorrer fusão das fibras colectadas e uma deposição com má qualidade. Por outro lado, quando a distância é elevada, o tempo de voo aumenta, e por isso, o solvente tem mais tempo para evaporar. Para a mesma tensão aplicada, a uma menor distância, o campo eléctrico é reduzido. Deste modo, é necessário que este seja suficiente para que possa ocorrer deposição das fibras no colector [35][45].

1.3.3. Parâmetros Ambientais

➤ **Temperatura**

Este parâmetro está associado a dois factores inerentes à solução: viscosidade e a taxa de evaporação do solvente. Quando o ambiente circundante apresenta uma temperatura elevada, a taxa de evaporação do solvente é superior e, consequentemente, as forças viscoelásticas da solução aumentam. Uma vez que a força eléctrica não supera estas forças, é mais difícil de estirar a solução. Como resultado, obtêm-se fibras com maior diâmetro e uma fraca probabilidade de ocorrer fusão destas.

No caso contrário, a baixas temperaturas, a taxa de evaporação é reduzida, e por isso, as forças viscoelásticas são menores. Assim, a força electroestática promove o estiramento eficiente do jacto [35].

➤ **Humidade**

Durante o processo de electrofiação, as cargas eléctricas presentes no jacto são dissipadas para as moléculas de vapor de água da atmosfera. Dado que a constante dieléctrica do vapor de água ($\epsilon_r=80$) é elevada, a transferência de cargas eléctricas entre as moléculas é facilitada. Desta forma, quando a humidade relativa apresenta valores elevados (ou seja, maior quantidade de moléculas de água) formam-se fibras porosas, consequência de separação de fases induzida pelo vapor (*Vapor-Induced Phase Separation*). Todavia, também pode causar o efeito contrário, que resulta na fusão de fibras ou a impossibilidade de as obter [46].

Contrariamente, uma humidade reduzida implica uma menor quantidade de moléculas de água, conduzindo a um jacto mais carregado. Pelo facto de ter uma maior densidade eléctrica, a possibilidade de ocorrer ruptura das fibras é superior devido a um maior estiramento destas após a evaporação do solvente [46].

1.4. Produção de Estruturas Tridimensionais

Um processo de auto-organização resume-se a uma associação de estruturas primárias simples, dando origem a estruturas secundárias complexas. Nestas condições, as estruturas auto-organizadas podem exibir características únicas, que não são observadas nos componentes individuais.

A possibilidade de auto-organização de nanofibras pelo método de electrofiação tem sido reportada em vários estudos. A sua estratificação à escala nanométrica confere características importantes na ETC, capazes de superar certas limitações impostas por estruturas 2D [47][48]. O mecanismo de auto-organização por electrofiação é condicionado por diversos factores, bem como, por parâmetros inerentes ao método utilizado (tempo de deposição, solução polimérica, factores ambientais, etc). [47].

Na Tabela 1.4 estão exemplificados os principais factores descritos na literatura.

Tabela 1.4 – Factores promotores à estruturação tridimensional das fibras

Factores de Organização Tridimensional	Referência
Balanço das forças electroestáticas atractivas e repulsivas das fibras	[47]
Distribuição Bimodal do diâmetro das fibras	[48]
Acção Competitiva entre Tensão Superficial e Repulsão Electroestática	[49]
Humidade Relativa das Fibras Poliméricas	[49]
Propriedades eléctricas e material constituinte do colector	[50]
Presença de contos que impedem a deposição directa de fibras	[49]

Em geral, a deposição das fibras sobre o colector é feita de forma aleatória. Quando estas atingem o colector, as cargas eléctricas são neutralizadas e as fibras ficam polarizadas em relação ao campo eléctrico. E, uma vez que apresentam um maior grau de polarização, as cargas negativas são distribuídas pela superfície das fibras colectadas, mas também na superfície das outras que estão a ser estiradas. Ao aumentar o tempo de deposição, inicia-se uma heterogeneidade das fibras que resulta em diferentes arquitecturas do *scaffolds*. Esta alteração topográfica ocorre devido à presença de contos ou pela variação dos diâmetros das fibras, criando assim zonas mais susceptíveis à sua atracção (Figura 1.6).

Tal como mencionado na Tabela 1.4, estas mudanças morfológicas, como a presença de zonas electricamente mais carregadas, favorecem o desenvolvimento das estruturas tridimensionais.

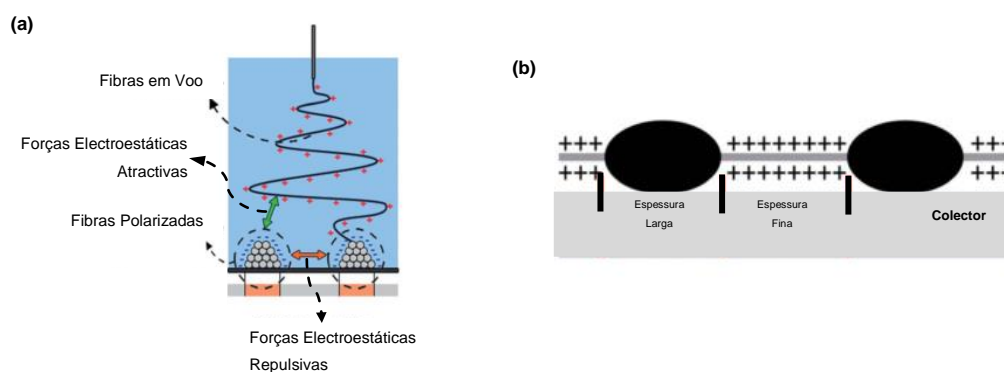


Figura 1.6 – (a) Esquema de auto-organização de fibras (Adaptado de [47]); (b) Esquema de uma fibra heterogénea (Adaptado de [48])

Para além dos factores inerentes ao processo de electrofiação, há ainda outros métodos que associadas a este permitem a construção de *scaffolds* 3D. Estes métodos incluem a pós-modificação da matriz electrofiada e mecanismos de *self-assembly*.

A primeira técnica compromete a morfologia da estrutura previamente electrofiada. A fotolitografia ou modulação através de laser são exemplos desta abordagem. O segundo mecanismo ocorre com base na auto-organização das fibras através do controlo do campo eléctrico. A influência directa deste parâmetro permite construir a configuração topográfica desejável [47][50][51].

A versatilidade das variadas técnicas de produção de estruturas tridimensionais permite controlar o dimensionamento e arquitectura dos *scaffolds*, tornando-se vantajoso o manuseamento do material para as mais variadas aplicações.

2. PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

Neste capítulo será descrito a metodologia de síntese de óxido de grafeno, assim como, a preparação das soluções de PCL/OG a diferentes concentrações.

Também é ilustrado o sistema de produção dos *scaffolds* através do uso de uma máscara de Teflon com depressões.

Para uma melhor compreensão das técnicas utilizadas e respectiva caracterização das membranas e espumas, estas são minuciosamente explicadas, bem como as condições de aplicação.

Os estudos de mineralização consistiram na incubação das espumas em SBF10, para avaliar de que forma o OG influencia a formação da camada apatítica.

Com o objectivo de testar estas estruturas em meio celular, recorre-se a ensaios de citotoxicidade das membranas e adesão das espumas.

2.1. Síntese de Óxido de Grafeno

Para a síntese de óxido de grafeno, foi utilizado o método de Hummers modificado, tendo como base experimental o artigo *“Improved Synthesis of Graphene Oxide”* [17]. O procedimento é descrito detalhadamente:

Reagentes:

- 3 g de grafite, previamente exfoliado;
- 69 mL de Ácido Sulfúrico Concentrado ($\geq 95\%$), H_2SO_4 , CAS: 7664-93-9, *Fisher Scientific*
- 1.5 g de Nitrato de Sódio, NaNO_3 , CAS: 7631-99-4, *Sigma-Aldrich*
- 9 g de Permanganato de Potássio, KMnO_4 , CAS: 7722-64-7, *Sigma-Aldrich*
- Água Millipore
- 3 mL de Peróxido de Hidrogénio (30%), H_2O_2 , $\rho=1.11-1.12 \text{ g/cm}^3$, *Merck*
- 200 mL de HCl (30%)
- 200 mL de Etanol ($\geq 99.8\%$), CAS: 64-17-5, *Sigma-Aldrich*

Procedimento:

- (1) Num banho de gelo, dissolveu-se a grafite e nitrato de sódio em ácido sulfúrico concentrado;
- (2) Adicionou-se permanganato de potássio em pequenas porções, para manter a temperatura reduzida;
- (3) A solução foi agitada durante 30 min, com uma temperatura controlada de 35°C;
- (4) Com o auxílio de uma pipeta de *Pasteur*, juntou-se 138 mL de água. Esta etapa resultou no aumento da temperatura até 98°C;
- (5) A solução foi mantida à temperatura de 98°C durante 15 min, sendo depois colocada num banho de água, durante 10 min;
- (6) Posteriormente adicionou-se, sob agitação constante, 420 mL de água e H₂O₂ (30%);
- (7) Após o arrefecimento da solução, esta foi filtrada e o material sólido resultante foi lavado duas vezes com HCl (30%) e EtOH;
- (8) A solução foi centrifugada (Heraeus, Multifuge X1R, Thermo Scientific) em intervalos de 15 min a 12000 rpm e o sobrenadante desprezado;
- (9) As amostras foram liofilizadas (Vaco 2, Zirbu) por período de 24 horas, para que toda a água fosse retirada e se obtivesse óxido de grafeno em pó.

2.2. Materiais para Soluções Poliméricas

Para a produção de soluções poliméricas usou-se Policaprolactona (*Sigma-Aldrich*, M = 70 000-90 000 g/mol) e óxido de grafeno (Subcapítulo 2.1). Estes compostos foram dissolvidos numa mistura em diclorometano (DCM, $\rho = 1,326$ g/mL) e dimetilformamida (DMF, *Merk*: M = 73.1 g/mol, $\rho = 0.95$ g/mL).

2.3. Produção de Nanofibras PCL e OG**2.3.1. Preparação das Soluções e otimização do processo de electrofiação**

Foram preparadas soluções de PCL com diferentes concentrações de óxido de grafeno, numa mistura de DCM:DMF (85:15 v/v), as quais se encontram na Tabela 2.1.

Para cada uma das concentrações mencionadas produziram-se membranas num colector estático de alumínio (Al). Com base nos resultados foram escolhidos parâmetros óptimos para a produção de estruturas fibrosas tridimensionais, apresentados no capítulo 3.

Tabela 2.1 - Concentrações das Soluções Poliméricas com OG

% (m/m) PCL	% (m/V) Óxido de Grafeno	Designação
	0.01 %	P8-OG0.01
8 %	0.1 %	P8-OG0.1
	0.25 %	P8-OG0.25

A preparação das soluções poliméricas com a incorporação de diferentes compostos foi feita em duas fases. Primeiro, sonicou-se a óxido de grafeno (Hielscher UP400S) em DMF por um período de uma a duas horas (Amplitude=80%, Cycle=1). Através de agitação magnética, o PCL foi dissolvido em DCM, ao qual foi posteriormente adicionado a solução dispersa de DMF/OG. Uma vez que o solvente utilizado é volátil, as soluções foram feitas em frascos de âmbar e cobertos com parafilmes.

2.3.2. Montagem para produção de Espumas 3D

Para produção das estruturas tridimensionais com PCL/OG foi usado um colector auxiliar de Teflon (Politetrafluoretileno, PTFE), colocado diante do colector de alumínio, com pequenos orifícios de 10 mm de diâmetro e 2 mm de altura (Figura 2.1).

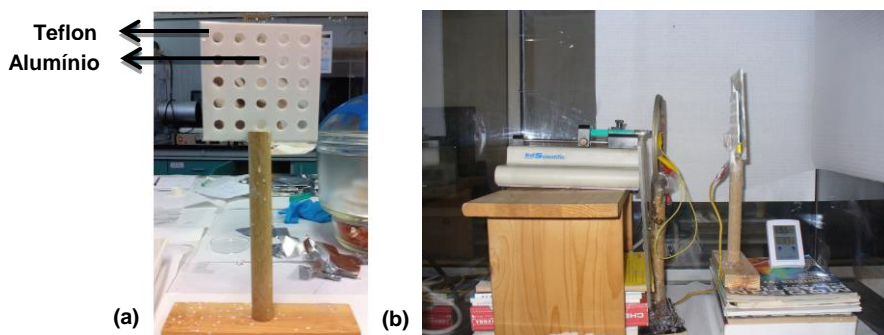


Figura 2.1 – (a) Colector (Área total de 11x11 cm²); (b) Aparelho de electrofiação

O equipamento de electrofiação inclui uma bomba infusora da kd Scientific e uma fonte de alta tensão da Glassman High Voltage (0-30 kV).

2.4. Redução de Óxido de Grafeno

2.4.1. Redução de Óxido de Grafeno por Vapores de hidrazina à temperatura ambiente

As membranas de PCL e óxido de grafeno foram colocadas numa câmara de vapores com 4mL a 5mL de hidrazina, para que ocorresse a sua redução. A câmara foi selada com parafilme e deixada durante um intervalo de tempo de 24 horas (tempo ajustado experimentalmente para se conseguir redução das membranas).

Este método de redução foi extrapolado para as espumas, cujos resultados serão posteriormente discutidos.

2.5. Caracterização Química do PCL e dos pós de Grafite e Óxido de Grafeno

2.5.1. Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR)

O FTIR (*Fourier Transform Infrared Spectroscopy*) é uma técnica qualitativa que permite identificar a composição química de um material. Este método consiste na obtenção de um espectro, que resulta da absorção (ou transmissão) de radiação, num determinado número de onda, por parte da amostra.

O material é constituído por diferentes grupos funcionais, que estão interligados quimicamente. Cada uma das ligações apresenta frequências características, que correspondem a níveis vibracionais específicos. Quando a amostra é irradiada com a mesma energia ($E=h\nu$, onde h é constante de *Planck* e ν é a frequência) dos estados vibracionais das ligações, ocorre absorção da radiação, permitindo a sua quantificação num espectro, sendo assim possível identificar as diferentes bandas de vibração correspondentes aos grupos funcionais presentes.

A composição química do PCL e dos pós de grafite e óxido de grafeno, bem como das membranas produzidas, foram obtidos num espectrofómeto da marca FTIR Nicolet 6700 – Thermo Electron Corporation, com o sistema ATR (*Attenuated Total Reflectance*).

2.6. Avaliação da Condutividade das Soluções

A condutividade das diferentes soluções de PCL e OG foram medidas através do condutímetro Schott Instruments (Lab 906).

Primeiramente mediu-se a condutividade do solvente utilizado, DCM:DMF, para verificar como a adição de PCL e OG influencia o transporte de cargas. Esta apresentou um valor de $2.8 \mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$.

Entre cada medição, o eléctrodo do condutímetro foi devidamente lavado com acetona.

2.7. Avaliação da Viscosidade das Soluções

O comportamento reológico de um material relaciona o estado de tensão e de deformação dos corpos sólidos ou fluídos submetidos a deformações elásticas.

A viscosidade corresponde à resistência do material em relação ao seu deslocamento. Esta grandeza pode ser traduzida na seguinte equação:

$$\eta = \frac{\tau}{\dot{\gamma}}$$

onde τ é a tensão de corte, $\dot{\gamma}$ é a taxa de corte.

Este estudo teve como objectivo verificar a influência de OG na viscosidade das soluções poliméricas de PCL. Para tal, utilizou-se um reómetro rotacional que permite a medição da viscosidade a partir da velocidade angular do disco rotativo sob o líquido.

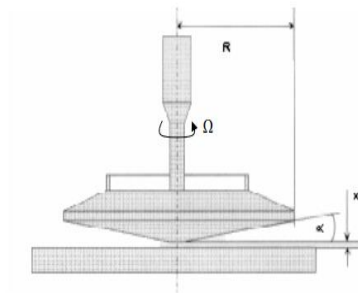


Figura 2.2 - Viscosímetro rotacional Cone-Prato ([52])

O ensaio foi realizado no reómetro rotacional, com geometria cone-prato, da Bohlin Gemini HR^{NANO}. Para proceder às medições da viscosidade das soluções com diferentes concentrações de OG, utilizou-se uma geometria cone-prato, patenteada na Figura 2.2, de diâmetro 40 mm e com um ângulo de inclinação de 2° [52]. Estas medições foram feitas em regime estacionário, a uma temperatura controlada de 25°C .

2.8. Caracterização das Membranas

2.8.1. Microscopia Electrónica de Varrimento (MEV)

Com o objectivo de se poder caracterizar morfologicamente as membranas produzidas, recorreu-se a MEV, que permite a obtenção de imagens de alta resolução da superfície da amostra. Nesta técnica um feixe de electrões incide sobre a amostra, interagindo com a mesma. Os sinais resultantes dessa interacção são detectados, dando origem a informação relativa à topografia e/ou composição da amostra.

As amostras das membranas foram colocadas numa fita de carbono e, através do aparelho de *sputtering*, cobertas com uma camada de ouro, de modo a que a sua condutividade aumente. Para a recolha de imagens, serviu-se do equipamento SEM-FIB da Zeiss, com uma tensão aplicada de 5 kV.

A medição dos diâmetros foi determinada através do *software* ImageJ. Para que análise de dados fosse fiável, utilizou-se a medição de 50 diâmetros de diferentes fibras.

2.9. Ensaio Mecânicos

2.9.1. Ensaio de Tracção das Membranas

As propriedades mecânicas das membranas produzidas foram testadas através de ensaios mecânicos de tracção. Este teste foi feito numa máquina de tracção Rheometric Scientific, Minimat Firmware 3.1, com uma célula de carga de 20 N e velocidade de 2 mm/min.

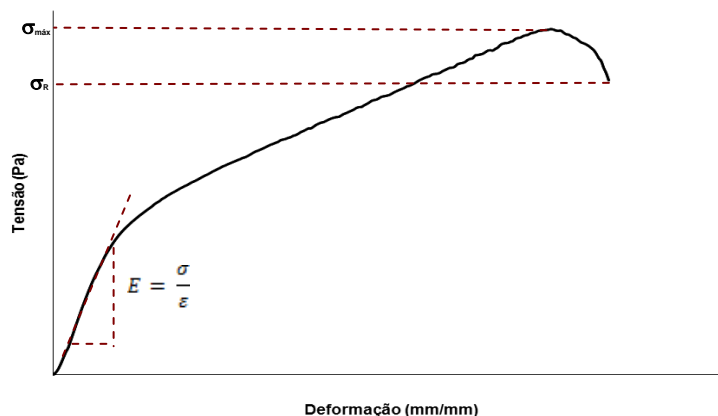


Figura 2.3 - Curva Exemplo de tensão em função da deformação, num ensaio de tracção

Estes ensaios permitem verificar a influência da incorporação da OG nas membranas de PCL. Durante o teste de tracção uniaxial é aplicada uma força na amostra, provocando o seu estiramento. Efectuando-se o registo da extensão da membrana e da carga aplicada, obtém-se um gráfico de força em função do alongamento, que é depois convertido numa curva tensão-extensão (curva de tracção).

Na Figura 2.3 está representada uma curva de tracção das membranas, sendo observáveis duas zonas: zona elástica e a zona plástica. A partir desta curva retira-se o Módulo de Young (E), que representa a resistência do material face à deformação elástica (ε). Graficamente equivale à linha tangencial dos pontos pertencentes à região elástica. A unidade SI desta grandeza é Pascal (Pa).

A tensão é calculada através da divisão entre a força aplicada (F) e a secção da amostra (A). A deformação é determinada pela divisão entre o alongamento da amostra (Δl) e o comprimento inicial (l_0).

A partir destas variáveis, o módulo de elasticidade é calculado da seguinte forma:

$$E = \frac{\sigma}{\varepsilon} = \frac{\frac{F}{A}}{\frac{\Delta l}{l_0}} \text{ (Pa)}$$

Foram retiradas 10 amostras de cada membrana, com uma área de 2 cm x 1 cm, com uma espessura medida, três vezes, com um micrómetro.

2.9.2. Ensaio de Compressão das Espumas

As espumas foram testadas à compressão usando o equipamento referido anteriormente. Nas amostras foram aplicadas forças compressivas unidireccionais, que resultam na diminuição do volume da espuma, como visível na Figura 2.4 [53].

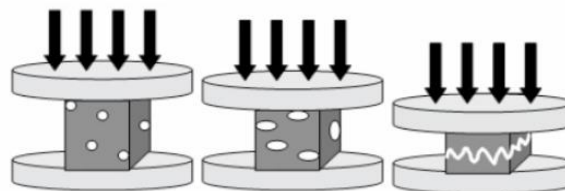


Figura 2.4 - Esquema do efeito na amostra durante um ensaio de compressão ([53])

A partir destes ensaios é possível retirar conclusões acerca das propriedades mecânicas das espumas e da influência dos compostos presentes. O gráfico resultante dos testes de compressão é semelhante ao representado na Figura 2.5, no qual se distinguem três zonas principais: zona elástica, patamar de colapso e zona de densificação [54].

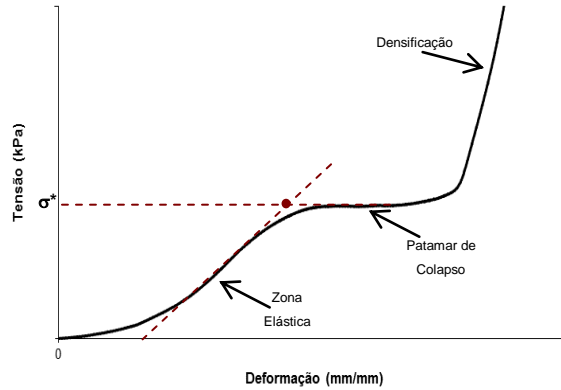


Figura 2.5 – Curva de Compressão Típica obtida para Espumas

A fase elástica corresponde a flexão das paredes das espumas, seguida da fase de colapso. No patamar de colapso observa-se a cedência das paredes da célula, ou mesmo a fractura destas. E por fim, a zona de densificação, que se caracteriza pelo aumento da tensão e esmagamento das paredes das células. Todos os ensaios foram realizados a uma velocidade de 2 mm/min.

2.10. Ensaio de Condutividade

Estes ensaios permitem estudar a condutividade eléctrica do material. Cada uma das amostras é fixada com cola de prata nas extremidades, onde são colocadas as pontas de prova. É aplicada uma tensão contínua e feito o registo da corrente eléctrica que atravessa a membrana, obtendo-se assim a sua condutividade.

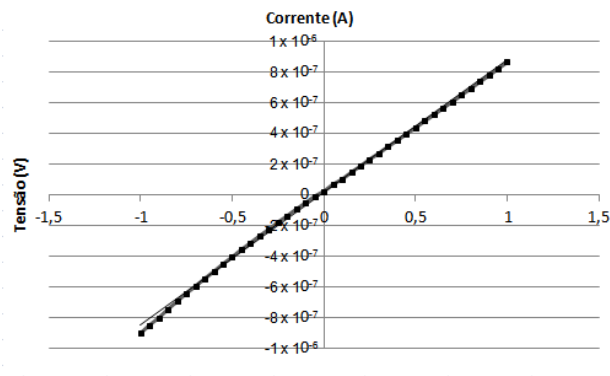


Figura 2.6 - Curva Característica I-V

As curvas I-V foram obtidas com o equipamento 4145B Semiconductor Parameter Analyser e o *software* spaManager v1.1. A partir do gráfico, reproduzido na Figura 2.6, é possível determinar o declive da recta de regressão linear, que corresponde ao inverso da resistência do material [55].

$$\frac{1}{R} = \frac{I}{V}$$

A resistência é determinada pelo cociente entre a tensão, V e corrente, I , que percorre a amostra. Uma vez determinado este valor, a condutividade eléctrica da amostra é calculada através da seguinte equação:

$$\sigma_e = \frac{1}{R} \cdot \frac{l}{A} = \frac{I}{V} \cdot \frac{l}{A} \text{ (S/cm)}$$

Onde l é a comprimento da amostra e A área transversal.

Para cada membrana foram retiradas 6 amostras e efectuadas três medições de condutividade eléctrica. Os parâmetros definidos no *software* foram: $V = [-1;1]$ V, com um *step* de 50 mV e uma *compliance* de 100 mV.

2.11. Determinação de ângulos de contacto – avaliação da hidrofiliçidade das membranas

As medidas do ângulo de contacto foram feitas, através da deposição de uma gota séssil na superfície das amostras, com o equipamento OCA20 da DataPhysics Instruments GmbH, esquematizado na Figura 2.7 [56].

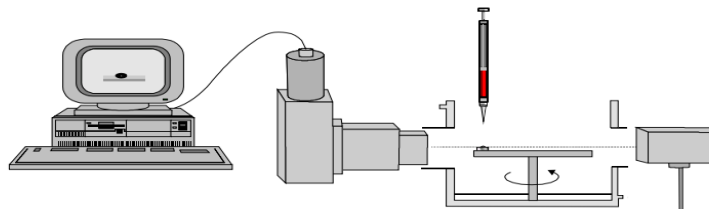


Figura 2.7 - Esquema do Equipamento utilizado para medição de ângulos de contacto ([56])

Em regiões diferentes de cada uma das amostras aplicou-se uma sequência de cinco gotas de água millipore ($V=5\mu\text{L}$), com uma seringa micrométrica. Este procedimento, designado *Pick-up*, é realizado dentro de uma câmara com temperatura controlada ($21^\circ\text{C} \pm 0.5^\circ$) e previamente saturada com água, usando um gerador de humidade HGC 20EC. As imagens obtidas neste ensaio foram determinadas no tempo $t=0$ s, ou seja, no momento inicial da deposição da gota, e foram captadas com uma vídeocâmara, sendo a sua análise realizada pelo *software* SCA20 v.4.3.12 e v.3.3.16.

Os resultados obtidos correspondem a uma média dos ângulos de contacto e respectivo desvio padrão.

Para a realização deste ensaio usou-se uma amostra da membrana e uma amostra do filme produzido, como descrito no Anexo A.

2.12. Bioactividade

A biomineralização é um processo pelo qual um organismo vivo produz minerais. Este processo é facilitado em presença de materiais ditos bioactivos, que quando implantados no organismo, são cobertos por uma camada apatítica, responsável pela formação de ligações biológicas e químicas que permitem a sua adesão ao tecido vivo [57]. Estes fenómenos são, obviamente, importantes em aplicações biomédicas que visem a regeneração óssea, onde estes minerais têm um papel preponderante.

Alguns estudos comprovaram que a presença de óxido de grafeno promove a bioactividade do material. É sugerido pelos autores, que este aumento se deve à presença de grupos funcionais aniónicos, que atraem os catiões Ca^{2+} , e conseqüentemente levam à formação de biominerais sob as matrizes [58][59].

De modo a avaliar a influência do óxido de grafeno na actividade de biomineralização das espumas, recorreu-se a imersão destas num meio salino 10 x concentrado (SBF 10 – *Simulated Body Fluid*) [60]. O uso de uma solução mais concentrada permitiu a obtenção de resultados num período inferior de tempo.

O SBF é uma solução concentrada de iões, semelhante ao plasma humano, com condições de pH constante e temperatura fisiológica idêntica. A solução de SBF 10 foi reproduzida como menciona o Anexo F.

As espumas de PCL e 0.25% (m/V) OG foram submersas em SBF, num total de 12 horas. Retiram-se as amostras após 4 horas, 8 horas e 12 horas. Posteriormente, todas foram analisadas através do MEV.

2.13. Testes de Citotoxicidade e de Adesão Celular

2.13.1. Ensaio de Citotoxicidade

Uma vez que este estudo visa a implementação das estruturas em tecidos vivos, é necessário determinar a sua biocompatibilidade. De forma a verificar a viabilidade celular, as membranas foram submetidas a testes de citotoxicidade por contacto indirecto (método por extrato).

Estes ensaios consistem em colocar as células em contacto com o meio onde previamente estiveram incubadas as matrizes. Para verificar o número de células viáveis, foi utilizado um método colorimétrico baseado no reagente resazurina, que é reduzido pelas células vivas. A forma reduzida, chamada resorufina, possui o máximo da absorvância a um comprimento de onda menor (570 nm) do que a resazurina (600 nm) pelo que é possível avaliar a actividade celular, através da mudança de cor do meio. As medições de fluorescência permitem quantificar o número de células sobreviventes e determinar a citotoxicidade das membranas.

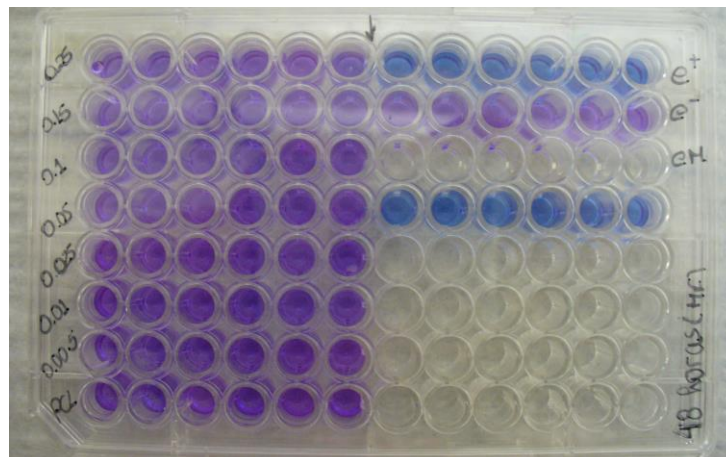


Figura 2.8 - Placa de 96 poços para ensaios de viabilidade celular

Para produção do extracto, as diferentes amostras foram recortadas com uma área de 10 cm² e com massa idêntica de 25 mg. Posteriormente condicionou-se cada membrana com 3 mL de meio completo e 30 µL de fungicida (anfotericina), à temperatura de 37°C, durante três dias.

Para a cultura celular utilizaram-se as células Vero. Foram preparadas conforme exposto no Anexo H. As células foram semeadas em três placas de 96 poços para diferentes tempos de incubação: 24 horas, 48 horas e 72 horas. Em cada placa foram feitos controlos positivos, negativos e de meio celular, que servem como referência para a o cálculo da viabilidade.

As concentrações intermédias de óxido de grafeno obtidas por a diluição do meio de extracto, feitos para se ter um intervalo mais alargado para determinação de citotoxicidade. Na Figura 2.8 está ilustrado a placa de cultura celular, e a disposição dos diferentes meios de extracto. Em cada poço foram semeadas células com uma concentração, de aproximadamente, $60\,000\text{ células/cm}^2$, e ao qual se adicionou $100\ \mu\text{L}$ de meio composto.

2.13.2. Ensaio de Adesão Celular nas Espumas

Os testes de adesão celular foram realizados nas espumas produzidas. Para estes ensaios utilizaram-se osteoblastos de origem humana da linha Saos-2.

Para a preparação de cultura celular, as amostras foram esterilizadas com uma mistura de isopropanol a 70% e água ultrapura, e posteriormente, lavadas com PBS (sem Ca^{2+} , nem Mg^{3+}). Numa placa de 24 poços, foram fixadas com um suporte de teflon, e em cada um dos poços colocou-se $250\ \mu\text{L}$ de meio de cultura com 1% de volume de fungizona.

A cultura celular foi previamente preparada, como referido no Anexo H, e adicionadas a cada poço com uma concentração de $320\,000\text{ células/cm}^2$ (Figura 2.9). Decorridas as 24 horas, avaliou-se a taxa de adesão das células às espumas.

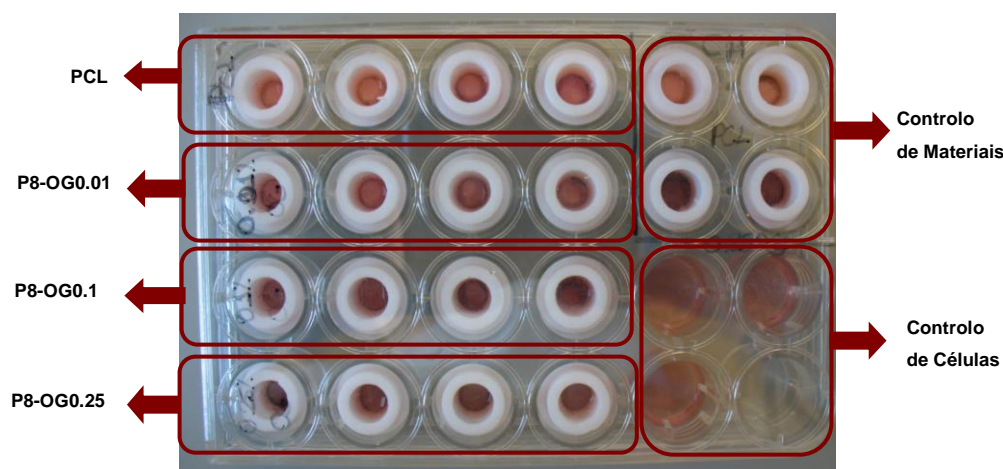


Figura 2.9 - Placa de 24 poços, com suporte de teflon, para ensaios de adesão

3. ANÁLISE E DISCUSSÃO DE RESULTADOS

Neste capítulo será analisada e discutida a influência da incorporação de óxido de grafeno numa matriz polimérica de PCL. São apresentados os resultados obtidos da caracterização química da grafite e do óxido de grafeno, de maneira a verificar os grupos funcionais presentes e confirmar a sua existência. Também se verificou como OG influencia a condutividade e o comportamento reológico das soluções.

Descreve-se a morfologia das membranas produzidas em função dos parâmetros de electrofiação estipulados.

Segue-se uma análise dos resultados dos testes mecânicos, eléctricos e de hidrofiliçidade das membranas. São também estudados os efeitos da adição de OG, em termos mecânicos, eléctricos e bioactivos nas espumas.

Procedeu-se, finalmente, à avaliação do nível citotóxico de OG, assim como a taxa de adesão celular nas espumas.

3.1. Síntese de Óxido de Grafeno

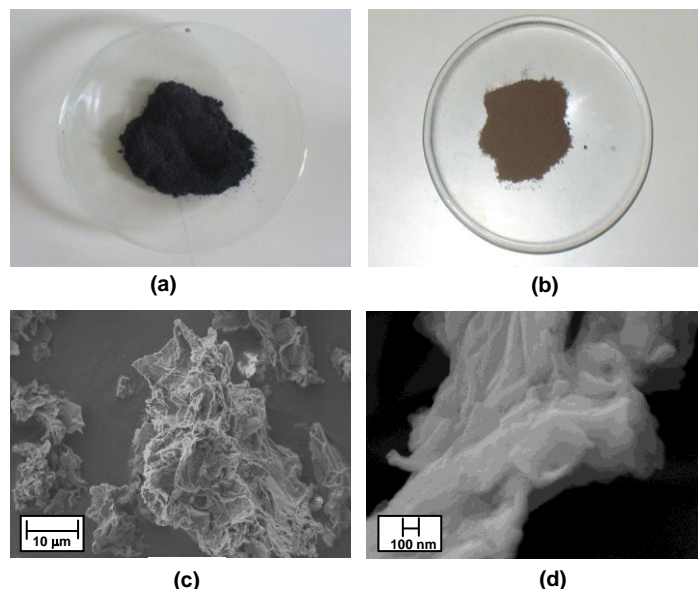


Figura 3.1 - (a) Pó de Grafite, (b) Pó de Óxido de Grafeno, (c) Imagem de SEM do Óxido de Grafeno, ampliação 1x (d) Imagem de SEM do Óxido de Grafeno, ampliação 50x

A síntese de óxido de grafeno foi preparada de acordo com o método de Hummers e está descrito no subcapítulo 2.1. A Figura 3.1 (b) mostra o resultado, a nível macroscópico da síntese.

Em linhas gerais, a mudança de cor permite prever a adequada oxidação do material, ou seja, do preto da grafite (Figura 3.1 (a)), obteve-se um pó de cor castanha, oxidado.

As Figura 3.1 (c) e a Figura 3.1 (d) ilustram a análise de microscopia SEM do óxido de grafeno, onde é possível ver as diferentes camadas de OG sintetizadas e a textura enrugada da superfície.

3.1.1. Composição química das membranas

O processo de oxidação é comprovado através da análise de FTIR, por meio da identificação dos diferentes grupos funcionais presentes no óxido de grafeno. A partir dos gráficos seguintes constata-se a presença de grupos funcionais característicos do óxido de grafeno, tal como mencionado no capítulo anterior (Tabela 1.3).

Na amostra de PCL, identifica-se a presença de diferentes ligações, a partir da análise espectral. Numa gama de valores elevados de números de onda, verifica-se a existência das ligações de CH_2 a 2943 cm^{-1} e 2867 cm^{-1} , bem como do *alongamento* do grupo carbonilo ($\text{C}=\text{O}$) a 1720 cm^{-1} . Para valores abaixo dos 1500 cm^{-1} estão presentes, o *alongamento* dos grupos C-C e C-O (correspondentes à fase cristalina do PCL) a 1293.95 cm^{-1} , o *alongamento* dos grupos COC a 1165 cm^{-1} e *alongamento* do C-O e C-C a 1107 cm^{-1} .

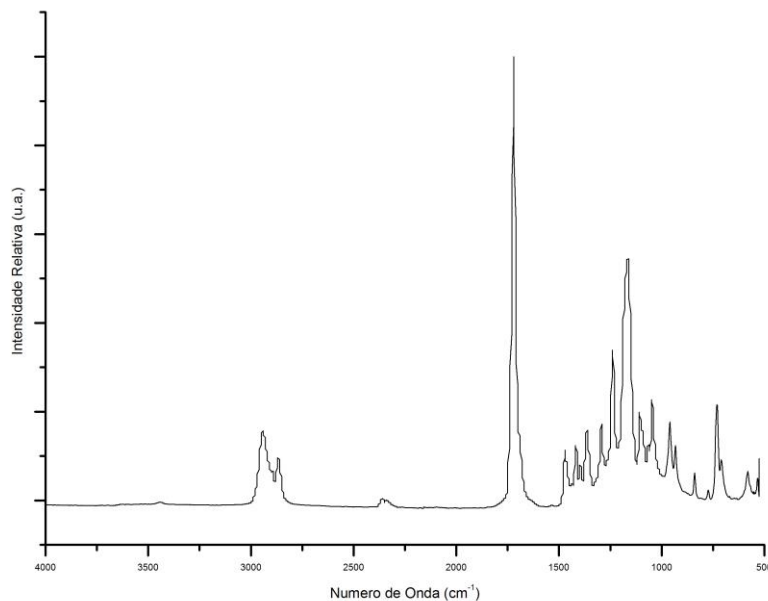


Figura 3.2 - Espectro de Absorção FTIR do PCL

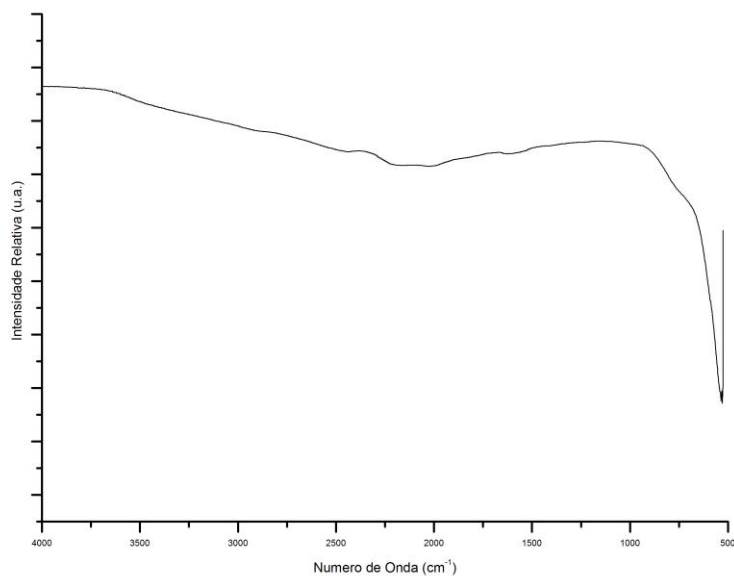


Figura 3.3 - Espectro de Absorção FTIR do Pó de Grafite

Relativamente ao pó de grafite, cujo espectro está ilustrado na Figura 3.3, verifica-se que não há presença de quaisquer bandas que lhe sejam específicas [61].

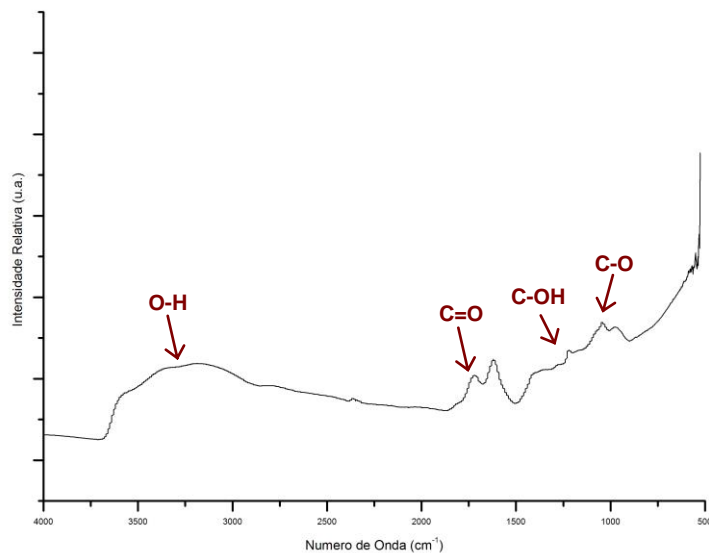
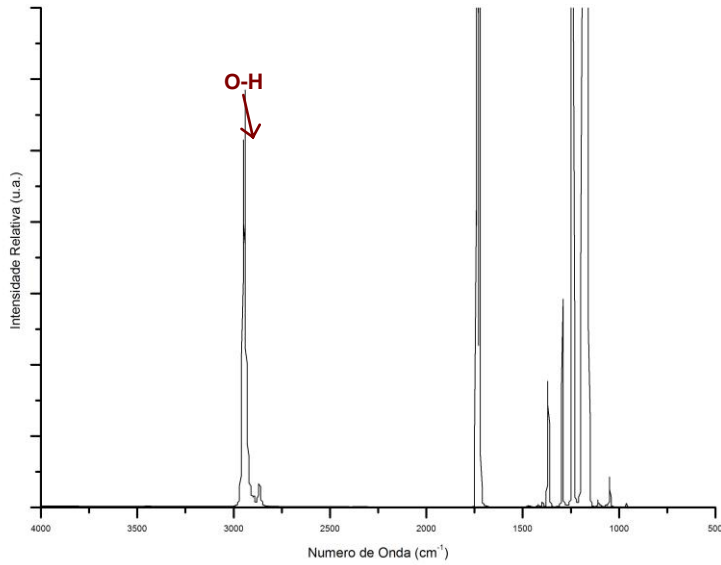


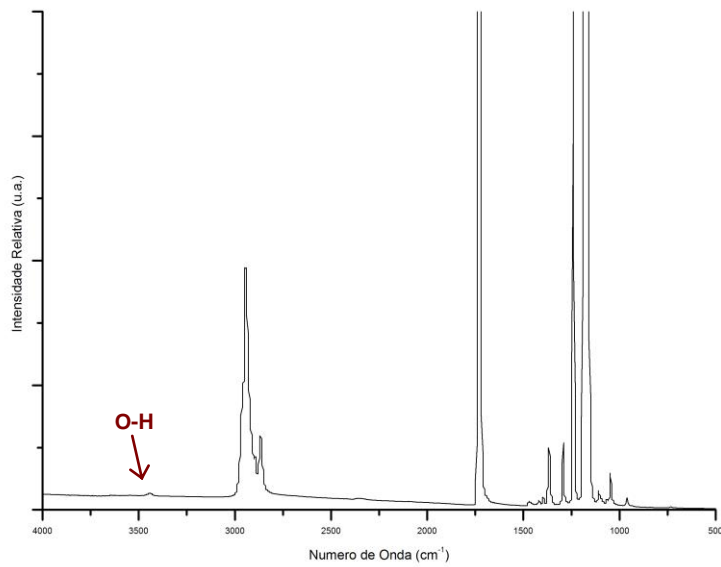
Figura 3.4 - Espectro de Absorção FTIR do Pó de Óxido de Grafeno

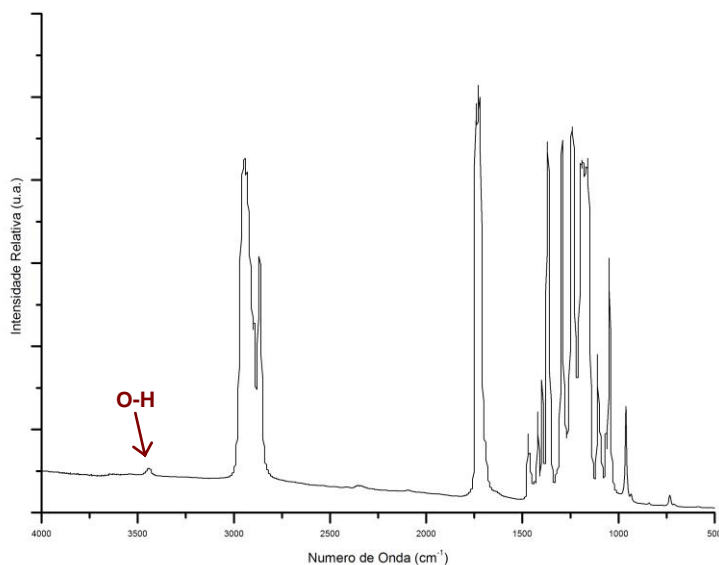
No óxido de grafeno, é possível comprovar as bandas características deste material: *alongamento* dos grupos OH a 3326 cm^{-1} , a 1719 cm^{-1} das ligações C=O e a 1221 cm^{-1} e 1044 cm^{-1} do *alongamento* dos grupos C-OH e C-O, respectivamente, como ilustrado na Figura 3.4 [61].

A partir do espectro da Figura 3.5 (a), (b) e (c) é possível constatar a presença dos grupos funcionais característicos do óxido de grafeno, tal como mencionado anteriormente. Os picos relativos ao *alongamento* dos grupos O-H, C=O e C-OH encontram-se presentes em cada amostra, e tendo em conta a sua presença, é possível afirmar que as membranas possuem na sua composição óxido de grafeno.



(a)





(c)

Figura 3.5 – Espectro de Absorção FTIR das Membranas: (a) P8-OG0.01, (b) P8-OG0.1, (c) P8-OG0.25

3.2. Ensaio de Condutividade da Solução

Na tabela abaixo, Tabela 3.1, encontram-se as condutividades das soluções com diferentes concentrações de OG.

Tabela 3.1 - Condutividade das Soluções de PCL e OG

	Condutividade ($\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$)
Solvente (DCM:DMF)	2.8
P8	0.8
P8-OG0.01	1.8
P8-OG0.1	4.0
P8-OG0.25	4.6

É observável que ao adicionar o polímero ao solvente, a condutividade da solução diminui. Esta diminuição é justificada pela presença das várias cadeias poliméricas, que oferecem resistência ao transporte de cargas eléctricas.

Com o acréscimo de OG, verifica-se um aumento da condutividade das soluções, e desta

forma, o transporte de cargas eléctricas é facilitado. Este facto pode ser traduzido pela presença de ligações sp^2 presentes no óxido de grafeno.

O processo de oxidação pode influenciar o grau de condutividade do óxido de grafeno, ou seja, ainda podem existir regiões com ligações sp^2 , que permitem a condução através do efeito túnel (*Klein Tunneling Mechanism*) [62].

No gráfico da Figura 3.6 é possível visualizar o aumento da condutividade das soluções, com o acréscimo de OG.

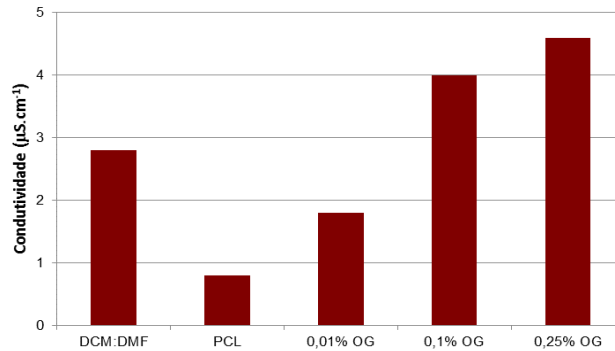


Figura 3.6 - Condutividade das Soluções de PCL e OG

3.3. Ensaio de Viscosidade

Com o objectivo de verificar a efeito da presença de OG na viscosidade da solução procedeu a ensaios reológicos.

No gráfico da Figura 3.7 está representado a variação da viscosidade com o teor de OG presente nas soluções.

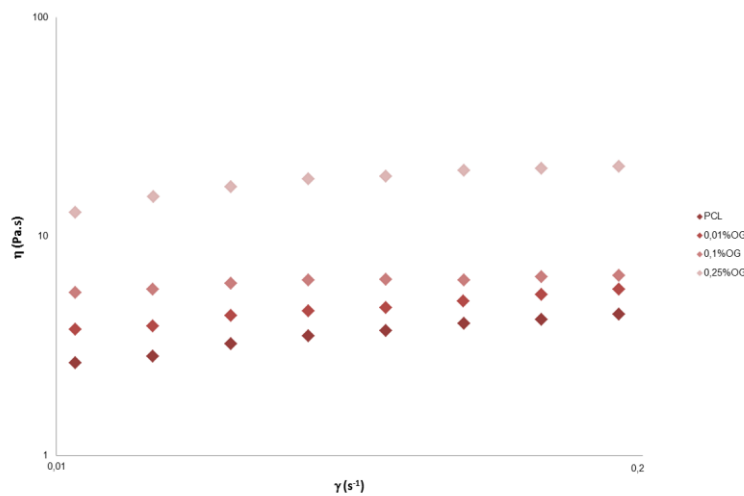


Figura 3.7 – Variação da Viscosidade com a concentração de Óxido de Grafeno

Da observação do gráfico conclui-se numa taxa de corte entre 0.01 s^{-1} e 0.2 s^{-1} , equivalente à viscosidade à taxa de corte nula, a solução de PCL e de 0.01% e 0.1% (m/V) de OG apresentam uma viscosidade inferior a 10 Pa.s . Relativamente à solução com maior teor de OG, exibe um valor de viscosidade acima desse patamar.

Deste modo, conclui-se que OG afecta a viscosidade das soluções, sendo que o aumento da sua concentração implica um aumento da viscosidade [63].

3.3. Análise Morfológica das Membranas

Para análise morfológica, é necessário ter em consideração que a alteração das características inerentes ao processo de electrofiação influencia a estrutura das membranas.

Baseado em estudos realizados foi possível definir alguns critérios, como a concentração do polímero, a distância ao colector, a humidade e temperatura [41]. O ponto de partida para a estratificação de estruturas tridimensionais foi a utilização de uma solução pouco concentrada. Em termos ambientais, manteve-se a humidade relativa superior a 50%, uma vez que a permuta de cargas eléctricas é maior, e assim o jacto apresenta um menor transporte de cargas.

Tabela 3.2 - Parâmetros de Electrofiação para produção de membranas

Tensão (kV)	Caudal (mlh^{-1})	Distância (cm)	Temperatura ($^{\circ}\text{C}$)	Humidade (%)	Tempo de Deposição (h)
17	0.5	12	≈ 20	50 – 60	2

De notar que um caudal superior ao mencionado na tabela, verificou-se acumulação de gota na ponta de agulha e conseqüentemente, deposição de jactos na membrana, pelo que se manteve o caudal de 0.5 mLh^{-1} .

No próximo subcapítulo são apresentados as imagens de SEM correspondentes às amostras de PCL/OG, bem como, uma estimativa dos diâmetros e morfologia das fibras.

3.3.1. Variação da Concentração de Óxido de Grafeno

A Figura 3.8 ilustra as imagens SEM das membranas obtidas com diferentes concentrações de óxido de grafeno, com tempo de deposição de 2 horas, em iguais condições de electrofiação: tensão de 17 kV, um caudal de 0.5 mLh^{-1} , uma distância de 12 cm e uma humidade relativa entre os 50%-60%

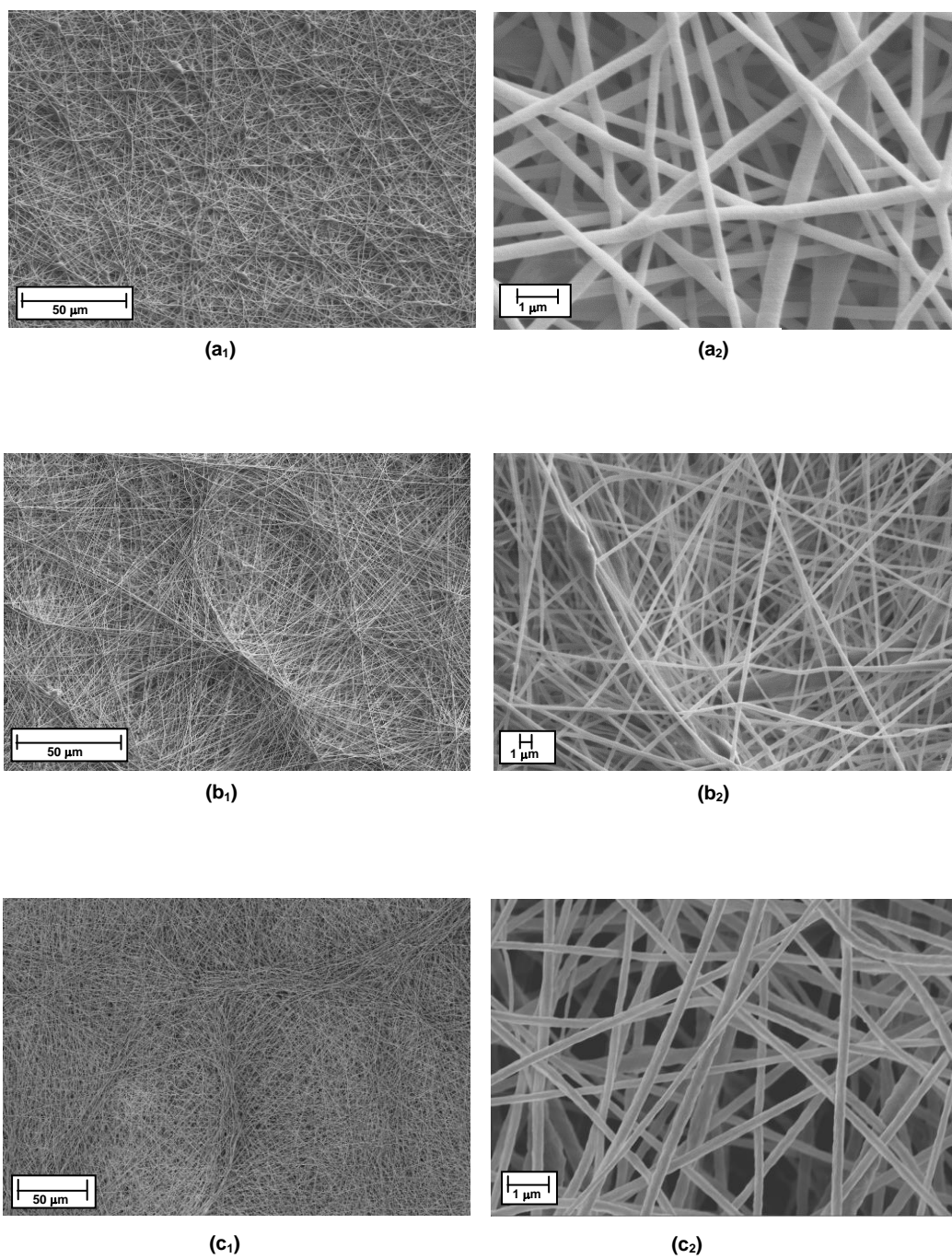


Figura 3.8 - Imagens de SEM de Membranas com diferentes concentrações de Óxido de Grafeno: (a₁) e (a₂) P8-OG0.01; (b₁) e (b₂) P8-OG0.1; (c₁) e (c₂) P8-OG0.25

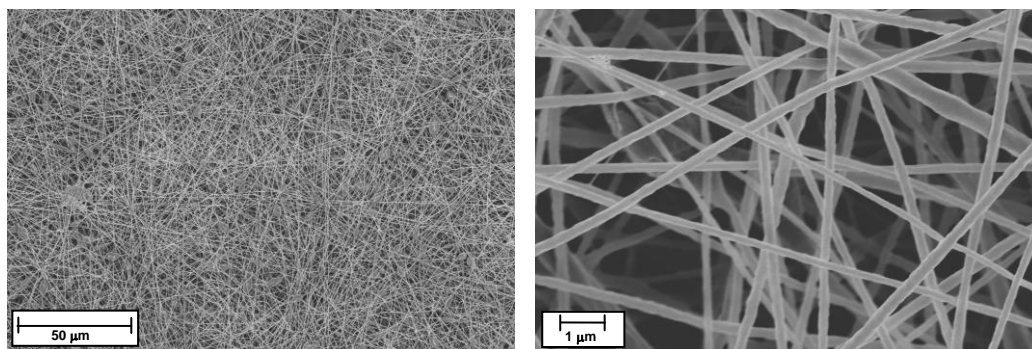


Figura 3.9 - Imagens de SEM da Membrana P8

A Figura 3.9 corresponde a uma amostra da membrana de PCL. Esta serve de referência, para verificar de que modo a morfologia das fibras se altera com a adição de OG. A membrana foi produzida segundo os parâmetros supramencionados.

Tabela 3.3 - Diâmetro Médio das Fibras com diferentes concentrações de Óxido de Grafeno e respectivo desvio padrão

	Diâmetro Médio (nm)
P8	273 ± 72
P8-OG0.01	351 ± 102
P8-OG0.1	400 ± 112
P8-OG0.25	310 ± 72

Na Tabela 3.3 estão apresentados os diâmetros médios das fibras de cada amostra. Em geral, verifica-se uma tendência de aumento das dimensões dos diâmetros das fibras electrofiadas com o aumento da concentração de óxido de grafeno.

Os diâmetros das fibras com OG são superiores aos das fibras de PCL, com uma média superior a 300 nm e uma maior dispersão. Assim, é evidente que a incorporação de OG influencia a dimensionalidade das fibras electrofiadas. Este facto pode dever-se a um rácio maior de composição, à viscosidade e também de área superficial.

Contudo, nota-se que acima da concentração de 0.1% (m/V) de OG, houve uma redução dos tamanhos das fibras. Este facto pode ser justificado por haver um coeficiente entre o polímero e OG muito baixo. Ou seja, para a mesma quantidade de polímero, existe uma concentração de OG mais elevada, o que pode implicar uma dispersão de pouco eficaz do composto na solução [58].

No que diz respeito à morfologia das fibras, é interessante reparar que com as concentrações de 0.1% e 0.25% (m/V) de OG, surgiram as estruturas em favos. Estas estruturas resultam da polarização das fibras devido ao campo eléctrico aplicado. Tal como mencionado no subcapítulo 1.1.1 e 1.2.2, o PCL e o OG são materiais dieléctricos (isto é, não conduzem cargas eléctricas), no entanto, quando sujeitos a um campo eléctrico externo, as fibras ficam polarizadas. Este fenómeno pode ser descrito pela seguinte equação:

$$P = \varepsilon_0 \cdot \chi_e \cdot E$$

onde, ε_0 é a permitividade eléctrica no vácuo, χ_e é a susceptibilidade eléctrica e E é o campo eléctrico.

Segundo Aihwal et al., as estruturas em favo também podem surgir devido distribuição bimodal dos diâmetros das fibras. Esta distribuição é traduzida pela presença de fibras com diferentes diâmetros, onde as fibras com maiores diâmetros apresentam mais quantidade de polímero, e por isso, maior grau de polarização e formação de agregados.

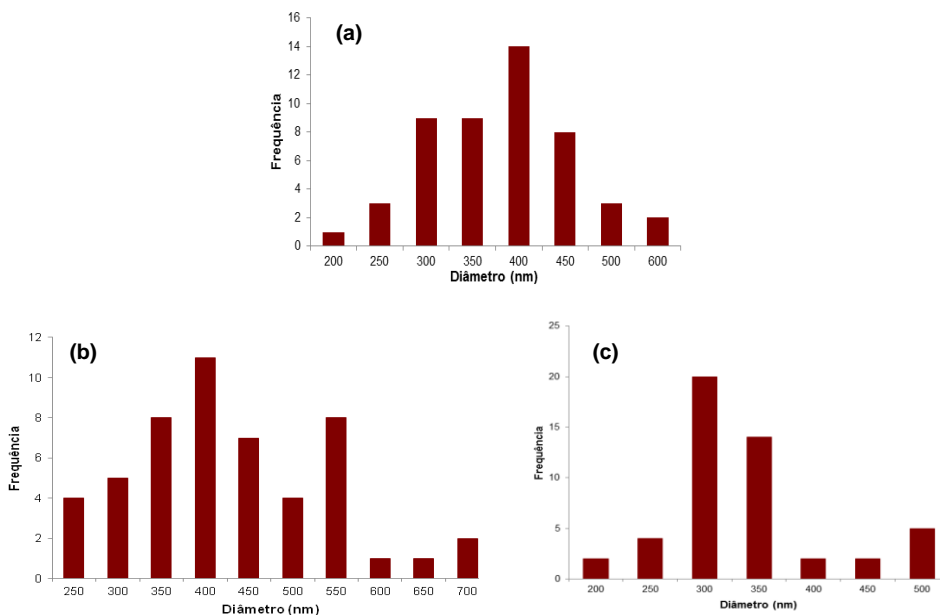


Figura 3.10 - Histograma dos diâmetros das fibras de: (a) P8-OG0.01, (b) P8-OG0.1, (c) P8-OG0.25

Perante os histogramas apresentados na Figura 3.10 obtidos pela medição dos diâmetros das fibras de cada matriz, é possível observar que para as soluções com maior concentração de OG, existe uma distribuição aproximadamente bimodal dos diâmetros. Esta distribuição pode justificar a presença das estruturas em favos observadas nas imagens MEV.

3.4. Caracterização Mecânica das Membranas

No que respeita às propriedades mecânicas, os gráficos obtidos, são curvas de ensaios de tracção, onde se pode extrair o Módulo de Young (E), o qual caracteriza a resistência mecânica do material e a tensão de ruptura.

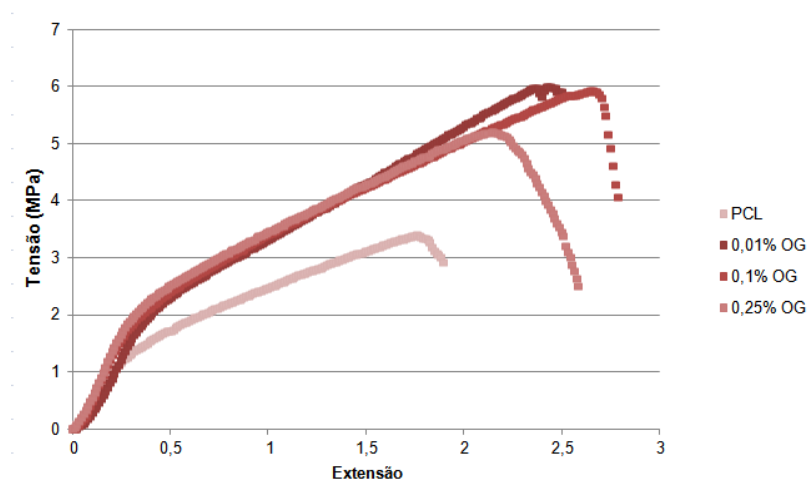


Figura 3.11 – Curvas de Tracção das diferentes membranas

Na Figura 3.11 estão representados as curvas de tensão-deformação das membranas de PCL e das membranas com 0.01%, 0.1%, 0.25% (m/V) de OG. A partir do declive da recta da regressão linear correspondente à zona elástica ($\epsilon \approx 0.3$) determina-se o módulo de Young. A tensão de ruptura corresponde à tensão onde ocorre a fractura do material [64].

Tabela 3.4 - Propriedades Mecânicas das Membranas com diferentes concentrações de Óxido de Grafeno

	Módulo de Young (MPa)	Tensão de Ruptura (MPa)
P8	2.9 ± 0.9	3.2 ± 0.4
P8-OG0.01	6.9 ± 0.8	5.6 ± 1.6
P8-OG0.1	7.8 ± 0.8	6.1 ± 0.6
P8-OG0.25	6.5 ± 1.0	5.2 ± 0.8

Observando os resultados, verifica-se que o módulo de Young varia entre 2.9 MPa para o PCL e 7.8 MPa para a membrana com 0.1% (m/V) OG. O mesmo ocorre com a tensão de

ruptura, que tem valores superiores com o acréscimo da concentração de OG, com um valor médio de 6.1 MPa.

Esta alteração das propriedades mecânicas pode ser justificada pela presença de OG, que em função da sua aplicação pode ser uma vantagem. Segundo Wan et al., este aumento considerável pode estar relacionado com o diâmetro das fibras e também com a sua morfologia [65]. Tal como foi visto no subcapítulo anterior, confirmou-se a presença de fibras com diâmetros maiores, o que pode justificar os resultados obtidos.

Adicionalmente, as propriedades mecânicas do OG também afectam as grandezas mecânicas calculadas: módulo de Young (E) e a tensão de ruptura (σ_R). Segundo a literatura estima-se que a oxidação pode degradar mecanicamente as propriedades intrínsecas de OG, uma vez que o rácio de grupos epóxidos e hidroxilos aumenta. Comparativamente com o PCL, estas grandezas são superiores ($E \approx 34\text{-}37$ GPa e $\sigma_R \approx 4\text{-}5$ GPa) [66]. Deste modo, comprova-se que as propriedades de OG influenciam as características mecânicas das matrizes poliméricas.

No entanto, para uma concentração de OG mais elevada obteve-se um decréscimo no módulo de Young, bem como na tensão de ruptura. Esta redução poderá estar associada à dispersão de OG na solução e formação de aglomerados [65].

Em termos estatísticos, é perceptível que a adição de OG afecta os parâmetros mecânicos das membranas, porém não existe uma diferença significativa dos mesmos com o aumento do teor de OG (Figura 3.12). Este facto é traduzido pelos valores de desvio padrão associado a cada amostra.

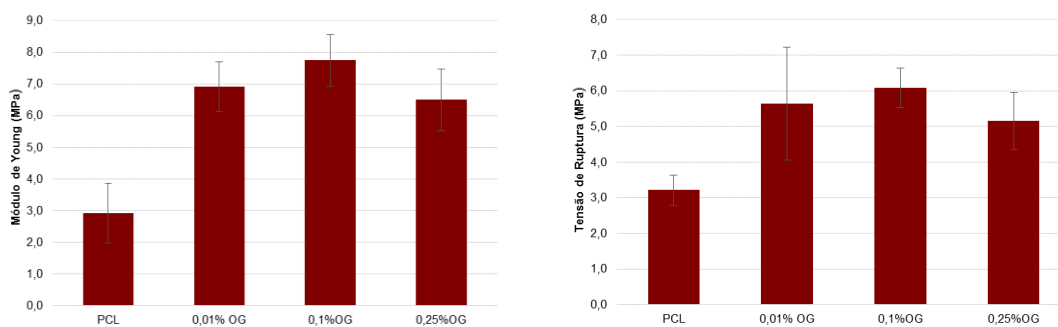


Figura 3.12 - Gráficos de Comparação do Módulo de Young e da Tensão de Ruptura

Em suma, conclui-se que a incorporação de OG nas matrizes poliméricas tem um efeito de reforço nas membranas.

3.5. Caracterização Eléctrica das Membranas

A análise da condutividade das membranas com grafite demonstrou que estas não apresentavam carácter condutor. Assim, antes de se colocar as membranas com OG numa câmara de vapores com hidrazina, foram feitas outras membranas com grafite incorporada, para verificar se era possível obter condutividade. Na tabela seguinte, Tabela 3.5, apresentam-se os dados recolhidos.

Tabela 3.5 - Condutividade das Membranas de PCL e de PCL/Grafite

	σ_e (S·cm ⁻¹)
P8	$\approx 3.4 \times 10^{-8}$
P8-G0.01	$\approx 1.2 \times 10^{-8}$
P8-G0.1	$\approx 5.8 \times 10^{-10}$
P8-G0.25	$\approx 4.6 \times 10^{-10}$

Como seria de esperar, a membrana de PCL têm carácter isolante, pelo que a sua condutividade é baixa.

Os valores de condutividade para as membranas com grafite também apresentam uma ordem de grandeza reduzida, o que indica que a grafite não alterou as propriedades eléctricas da membrana. Supõe-se que o polímero encapsulou o material, impedindo o fluxo de cargas eléctricas. Também se verifica que com o acréscimo de concentração, não existem mudanças significativas da condutividade superficial, que mais uma vez sublinha a não condutividade das membranas.

Perante estes resultados, optou-se por alternativas para conseguir propriedades eléctricas das membranas.

O óxido de grafeno é um derivado da grafite e considerado como um material isolante, mas com a sua redução, as propriedades eléctricas podem ser recuperadas. A partir deste conceito, experimentou-se a possível redução do óxido de grafeno presente nas membranas, através dos vapores libertos pela hidrazina (N₂H₄). Como mencionado anteriormente, a hidrazina é um agente redutor, que elimina os átomos de oxigénio da estrutura de OG. Esta eliminação resulta na recuperação da condutividade do composto, sendo o produto final, o óxido de grafeno reduzido.

Na Tabela 3.6 apresentam-se os resultados de condutividade obtidos para amostras com 0.01% e 0.1% (m/V) de OG, submetidas à redução por hidrazina.

Tabela 3.6 - Condutividade das Membranas com OG, após 24h de incubação

		σ_e (S·cm ⁻¹)
P8-OG0.01	Controlo (0 horas)	$\approx 6.6 \times 10^{-8}$
	Incubação (24 horas)	$\approx 3.2 \times 10^{-8}$
P8-OG0.1	Controlo (0 horas)	$\approx 9.2 \times 10^{-8}$
	Incubação (24 horas)	$\approx 4.3 \times 10^{-4}$

Da análise da tabela verifica-se que as amostras de controlo apresentam valores semelhantes. Contudo, é observável uma diferença de cerca de quatro ordens de grandeza entre as condutividades das membranas com concentração de 0.01% (m/V) de OG e com concentração de 0.1% (m/V) de OG, no tempo de incubação de 24 horas. O aumento dos valores de condutividade deve-se à redução do óxido de grafeno presente nas membranas.

Na Figura 3.13 está ilustrado uma amostra da membrana que foi submetida à incubação com vapores de hidrazina, onde se observa que o efeito dos vapores originou algumas quebras nas fibras de PCL, como assinalado pelas circunferências.

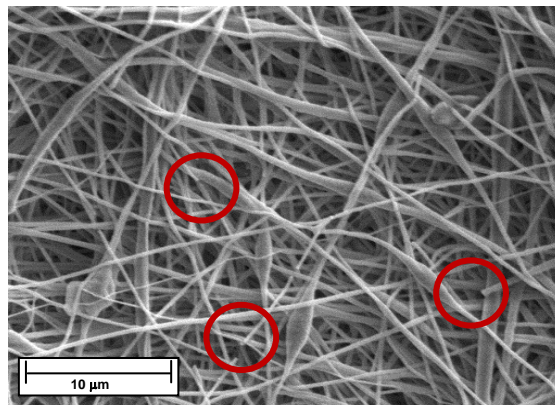


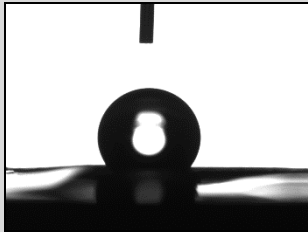
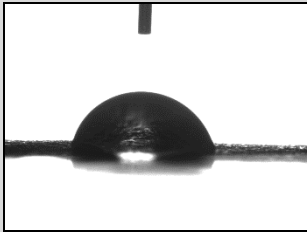
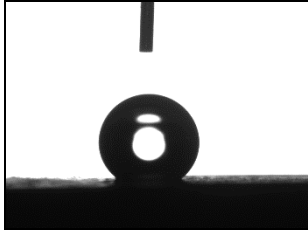
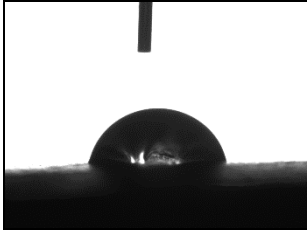
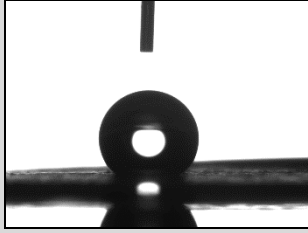
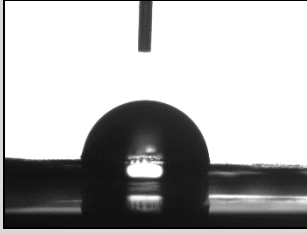
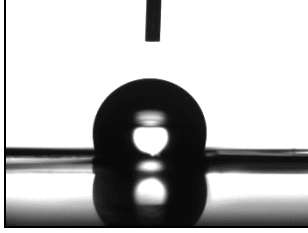
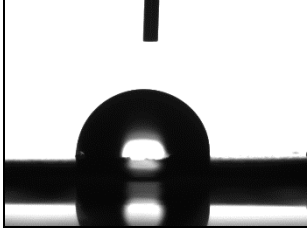
Figura 3.13 - Imagem de SEM da Membrana P8-OG0.1 após 24h de incubação

Em resumo, pode-se concluir que houve uma redução do óxido de grafeno presente nas fibras. Todavia, este processo teria de ser otimizado para que não houvesse quebra da estrutura das fibras.

3.6. Caracterização da Hidrofilicidade das Membranas

Para o estudo e compreensão de como o óxido de grafeno influencia a superfície das membranas, realizaram-se ensaios de molhabilidade. Foram feitas cinco medidas de ângulos de contacto de em superfícies de PCL contendo três concentrações diferentes de óxido de grafeno.

Tabela 3.7 - Ângulos de Contacto de Membranas e Filmes com Óxido de Grafeno

	Membrana	Filme
PCL	 Ângulo de Contacto: $147^{\circ} \pm 3^{\circ}$	 Ângulo de Contacto: $78^{\circ} \pm 2^{\circ}$
P8-OG0.01	 Ângulo de Contacto: $147^{\circ} \pm 2^{\circ}$	 Ângulo de Contacto: $77^{\circ} \pm 4^{\circ}$
P8-OG0.1	 Ângulo de Contacto: $153^{\circ} \pm 4^{\circ}$	 Ângulo de Contacto: $91^{\circ} \pm 4^{\circ}$
P8-OG0.25	 Ângulo de Contacto: $155^{\circ} \pm 4^{\circ}$	 Ângulo de Contacto: $114^{\circ} \pm 2^{\circ}$

Na Tabela 3.7 estão detalhados os ângulos de contacto médios com o respectivo desvio padrão. Também se apresentam as fotografias, demonstrando macroscopicamente, as gotas depositadas nas membranas e nos filmes.

Através da comparação dos resultados obtidos, verifica-se um ligeiro aumento da hidrofobicidade das membranas e dos filmes com óxido de grafeno incorporado. Este efeito pode ser explicado através do Modelo de Wenzel.

Este modelo prevê que num material de carácter hidrofóbico, o ângulo de contacto aumente com a rugosidade da superfície, isto é, o material torna-se mais hidrofóbico. O mesmo ocorre com materiais hidrofílicos, cujo ângulo de contacto diminui com o aumento da rugosidade da superfície [67].

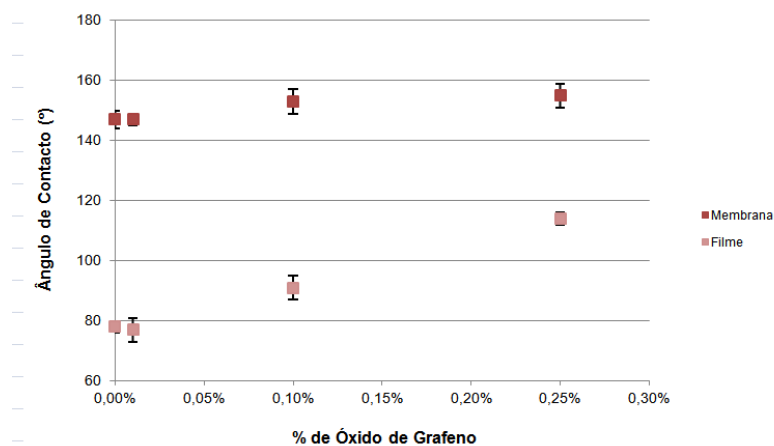


Figura 3.14 - Ângulos de Contacto em função da concentração do Óxido de Grafeno

O PCL é considerado um polímero hidrofóbico, uma vez que o seu ângulo de contacto é superior a 90° . Os resultados obtidos para a membrana vão de acordo com esses valores, apresentado um ângulo de contacto igual a 147° ; no entanto não se verifica a mesma característica nos filmes. Este resultado demonstra que o filme apresenta uma diferente porosidade, pelo que, possivelmente, ocorre diminuição do valor de ângulo de contacto.

Através do gráfico representado na Figura 3.14 constata-se que o ângulo de contacto segue uma tendência linear com o aumento de OG. Comparativamente às amostras de PCL verifica-se um aumento do ângulo de contacto de, aproximadamente, 5%. De acordo com as premissas divulgadas por Wenzel, o comportamento hidrofóbico das membranas é reflectido pela diferente morfologia superficial das fibras.

Relativamente aos filmes, também se pode inferir que há encapsulamento de OG, pelo que os valores de ângulo de contacto também são elevados.

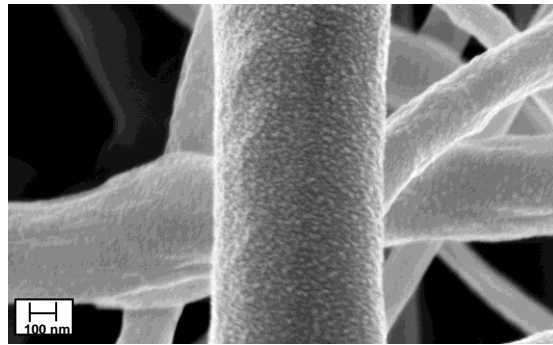


Figura 3.15 - Imagem de SEM da Fibra da Membrana P8-0.25OG

Como se observa na Figura 3.15, as fibras exibem uma superfície rugosa, que promove à membrana um valor de hidrofobicidade elevado.

3.7. Ensaio de Citotoxicidade das Membranas

A avaliação *in vitro* da biocompatibilidade de biomateriais é um teste necessário preliminar à sua aplicação biomédica

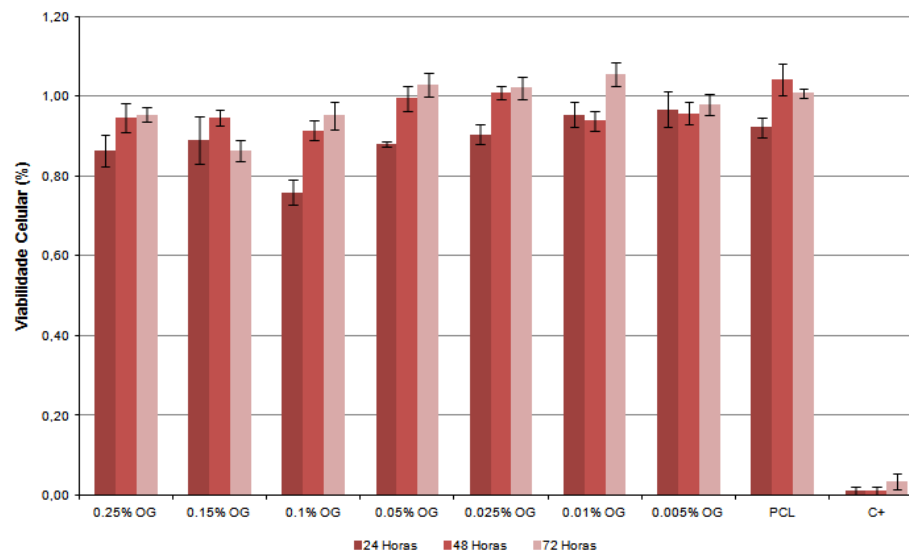


Figura 3.16 - Viabilidade Celular das Membranas de PCL e Óxido de Grafeno

A Figura 3.16 indica os resultados obtidos para a viabilidade celular, dependentes da incubação com extractos com diferentes concentrações de óxido de grafeno e num intervalo de tempo variado. Também são apresentados os valores do controlo positivo, como referência dos níveis citotóxicos.

Tabela 3.8 – Classificação do índice de Citotoxicidade

Viabilidade Celular (%)	
Citotoxicidade	Faixa
Não-citotóxico	> 90
Levemente citotóxico	80 a 90
Moderadamente citotóxico	50 a 79
Severamente citotóxico	< 50

Tendo como base de comparação a Tabela 3.8 verifica-se que, em toda a gama de concentrações de OG não existe reduções significativas na viabilidade celular, para qualquer tempo de incubação. Pode-se afirmar, que as membranas com OG não induzem apoptose das células, sendo este material biocompatível.

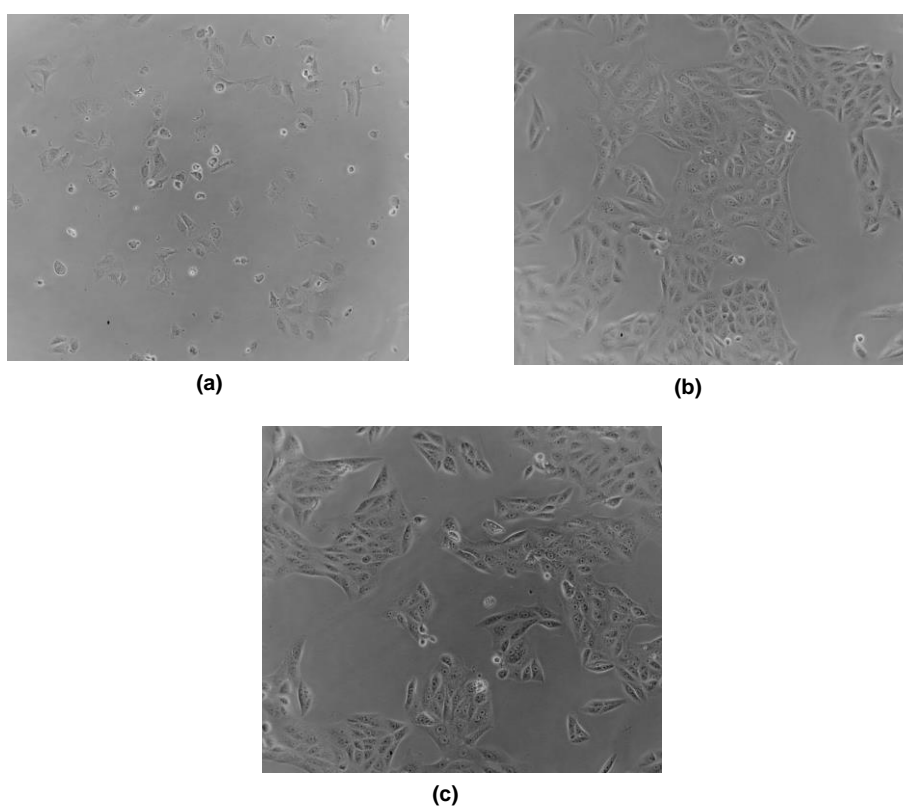


Figura 3.17 - Culturas Celulares de: (a) Controlo Positivo; (b) Controlo Negativo; (c) P8-OG0.25, com uma ampliação 100x

Na Figura 3.17, estão fotografadas culturas de células no controlo positivo, no controlo negativo e no meio de extracto com 0.25% OG, observando-se as diferentes morfologias das células. As do controlo positivo, células em apoptose celular, apresentam uma morfologia mais arredondada e uma confluência reduzida. No controlo negativo e no meio de extracto condicionado, a morfologia celular mantém-se inalterada.

3.8. Caracterização das Espumas

Segundo estudos anteriormente realizados, a arquitectura tridimensional de estruturas electrofiadas ocorre através do uso de diferentes colectores ou a partir da conjugação dos diversos parâmetros de electrofiação. Conforme o ensaio de Lavielle et *al.*, a produção de *scaffolds* teve como base o uso de uma solução polimérica bastante concentrada (17% m/m) para uma proporção de 50:50 de DCM e DMF, e o uso de colectores com uma geometria particular [68][48].

Airhwal et *al.*, com uma concentração de PCL elevada (13% m/m) para uma proporção de 1:1 de DCM e DMF [48], também produziram estruturas tridimensionais. Todavia, este estudo baseou-se na auto-organização de fibras, obtidas pela associação dos parâmetros de electrofiação.

Neste trabalho usou-se uma solução com concentração inferior às anteriormente usadas, da ordem de 8% m/m PCL e uma percentagem de DMF superior. É possível averiguar-se a delineação do favo, tal como ilustra a Figura 3.18. A ocorrência deste fenómeno pode estar associado à fusão parcial de fibras ou à polarização de fibras. Tal como foi mencionado anteriormente, a polarização das fibras ocorre devido ao balanço entre as cargas electrostáticas repulsivas e atractivas.

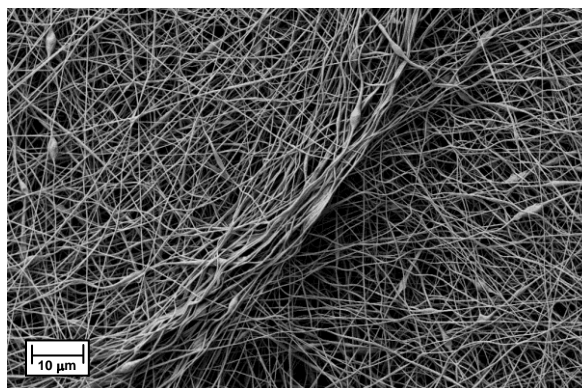


Figura 3.18 - Zona Densa de Fibras da Membrana P8-OG0.25

Para a produção das espumas, usou-se de uma placa isolante de Teflon com um fundo

condutor, permitindo que o preenchimento das zonas de depressão por parte das fibras se realize eficazmente.

Comparativamente com a constante dielétrica do solvente utilizado (DMF, $\epsilon_r=36,7$), a máscara de Teflon apresenta uma constante bastante inferior ($\epsilon_r=2.1$). Esta diferença de valores permite que a deposição sobre a máscara seja menor, e as fibras se dirijam para as zonas condutoras. Este método foi anteriormente descrito por Lavielle *et al.*, onde se refere que que as fibras têm tendência a dirigir-se mais para zonas condutoras [68]. À semelhança do seu estudo, as dimensões das depressões da placa estão relacionadas (diâmetro/ altura), ou seja quanto menor for o quociente entre as duas grandezas, menos eficiente é a deposição das fibras [68].

Na Figura 3.19 está esquematizado um exemplo da zona de depressão da placa. A placa é sobreposta a um colector de alumínio, que permite que as fibras se depositem somente nas áreas de depressão.

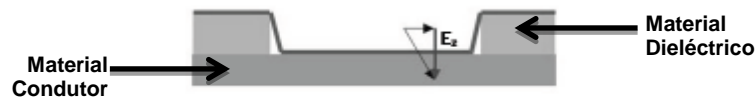


Figura 3.19 - Geometria das depressões do colector, com material dielétrico e condutor (adaptado de [68])

Sendo a placa é composta por material dielétrico, foi necessário aumentar a tensão aplicada. Assim, mantendo uma distância entre o colector e a agulha de 12 cm, obteve-se um campo eléctrico aproximadamente 1.8 kV/cm. Em relação ao caudal, este foi da ordem dos 0.5 mLh⁻¹, com condições de humidade e de temperatura controlada.

Tabela 3.9 - Parâmetros de Electrofiação para produção de Espumas

Tensão (kV)	Caudal (mLh ⁻¹)	Distância (cm)	Temperatura (°C)	Humidade (%)	Tempo de Deposição (h)
20	0.5	12	≈ 20	50 – 60	5

Na tabela acima estão detalhados os parâmetros utilizados para a construção de *scaffolds* tridimensionais.

O preenchimento da máscara resultou nas estruturas ilustradas na Figura 3.20, em que se pode observar a tridimensionalidade do *scaffold*.

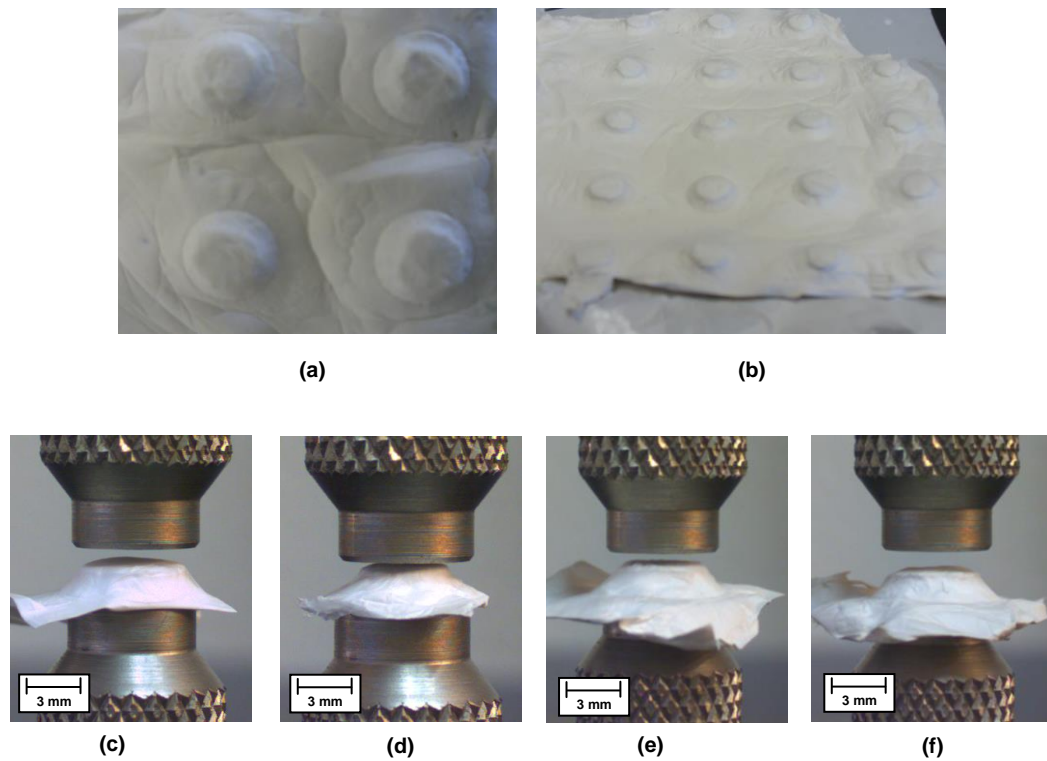
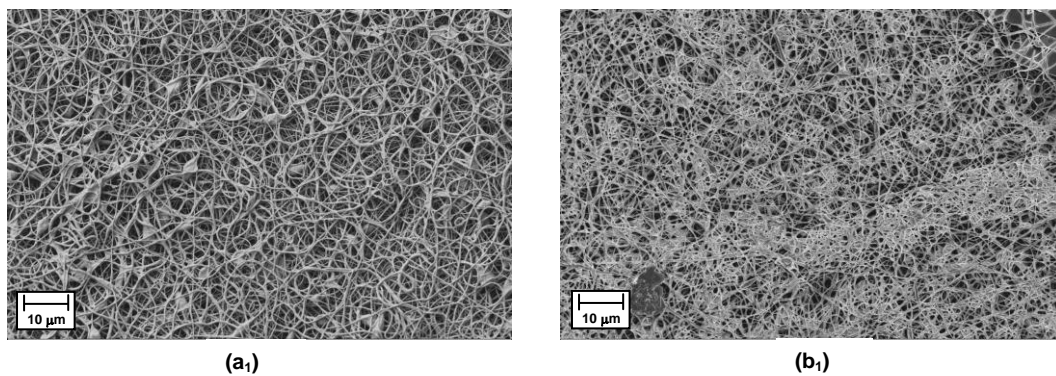


Figura 3.20 - Imagens Reais de Espumas: (a) ampliada (b) vista de cima (c) PCL, (d) P8-OG0.01, (e) P8-OG0.1, (f) P8-OG0.25

3.9. Bioactividade das Espumas

As espumas de PCL e de PCL/OG foram submersas em SBF 10x, para verificar a sua bioactividade. Os resultados do estudo temporal de imersão das espumas em SBF estão ilustrados na figura abaixo.



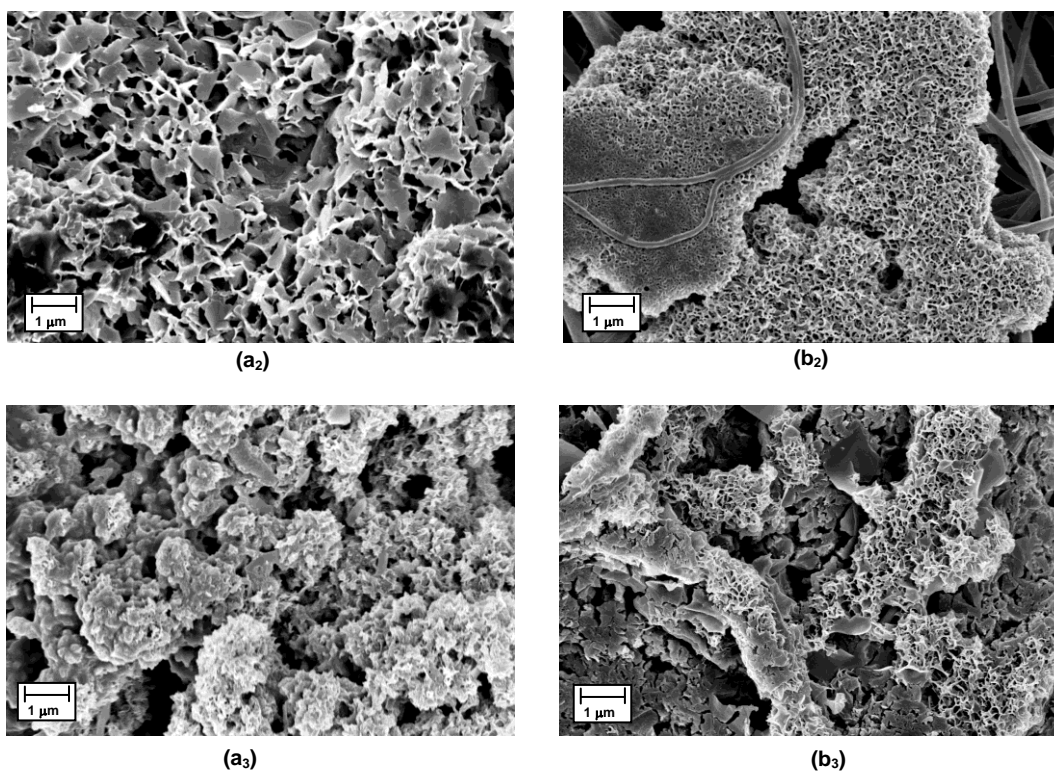


Figura 3.21 - Imagens de SEM das Espumas de (a) PCL e (b) P8-OG0.25 submersas em SBF 10X, após (1) 4 horas, (2) 8 horas e (3) 12horas

Os resultados dos ensaios de bioatividade, permitem concluir que o tempo necessário para a mineralização dar início nas espumas de PCL, é da ordem das 8 horas, e com o transcorrer do tempo, existe um incremento da presença dos cristais.

No caso das espumas com OG, verifica-se que a sua presença influencia a formação de cristais apatíticos, uma vez que no intervalo de tempo de 4 horas, se observa desde logo a presença de cristais.

Perante estes resultados, uma razão plausível para o aparecimento de uma camada apatítica pode estar relacionado com presença de grupos aniônicos de OG, como foi reportado em certos estudos [59][65].

Sabe-se que OG facilita a estruturação de camadas apatíticas, ou seja, a nucleação é favorecida, uma vez que atrai catiões de Ca^{2+} , propiciando a sua deposição e consequentemente favorecendo a formação de biominaerais com PO_4^{3-} .

Os resultados obtidos parecem confirmar que a presença de OG aumenta a bioatividade das espumas.

3.10. Caracterização Mecânica das Espumas

As espumas criadas, por meio do processo de electrofiação, foram submetidas a ensaios de compressão, o que permitiu compreender de que forma o óxido de grafeno afecta as propriedades mecânicas dos suportes tridimensionais.

Para cada concentração de óxido de grafeno foram realizados cinco ensaios, e a partir dos dados obtidos construiu-se os gráficos de tensão em função da deformação, de onde se retirou o módulo de Young (E), a tensão de colapso (σ^*) e a deformação máxima ($\epsilon_{máx}$) da amostra, como patente na tabela seguinte.

Tabela 3.10 - Propriedades Mecânicas das Espumas com diferentes concentrações de Óxido de Grafeno

	Módulo de Young (kPa)	Tensão de Colapso (kPa)	Deformação Máxima	Gráfico
P8	2.3 ± 0.7	0.5 ± 0.2	0.97 ± 0.01	Figura 3.22
P8-OG0.01	2.5 ± 0.5	0.5 ± 0.1	0.96 ± 0.01	Figura 3.23
P8-OG0.1	3.3 ± 0.7	0.7 ± 0.2	0.93 ± 0.01	Figura 3.24
P8-OG0.25	4.8 ± 0.9	1.5 ± 0.2	0.83 ± 0.05	Figura 3.25

Os gráficos abaixo representados ilustram as curvas de compressão de espumas para diferentes concentrações de OG, onde é possível distinguir a zona elástica, o patamar de colapso e de densificação.

As amostras nunca atingem a deformação máxima ($\epsilon=1$), pelo que existe uma espessura residual da espuma, limite de compressibilidade. A zona elástica estendeu-se até deformações da ordem dos 20%.

O módulo de Young é calculado através do declive da recta referente à zona elástica e o patamar de colapso é determinado a partir do ponto em que a tangente a região linear intersecta com a região de colapso.

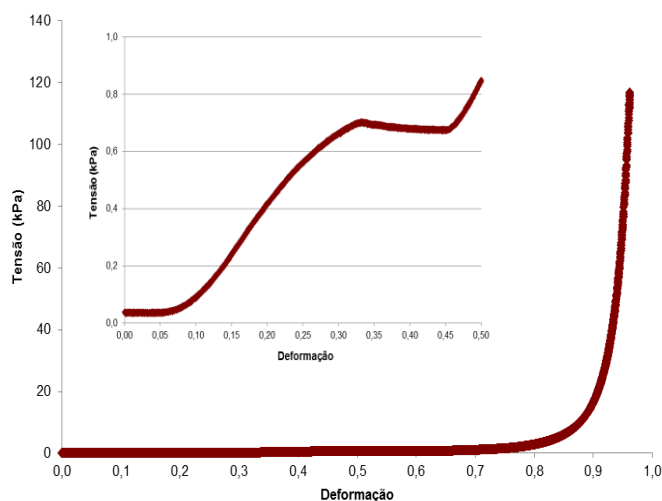


Figura 3.22 - Curva de Compressão da Espuma P8, com ampliação da zona elástica e patamar de colapso (A)

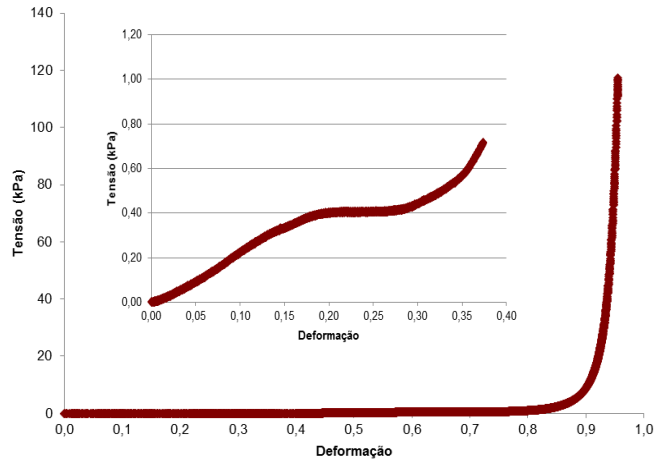


Figura 3.23 - Curva de Compressão da Espuma P8-OG0.01, com ampliação da zona elástica e patamar de colapso (B)

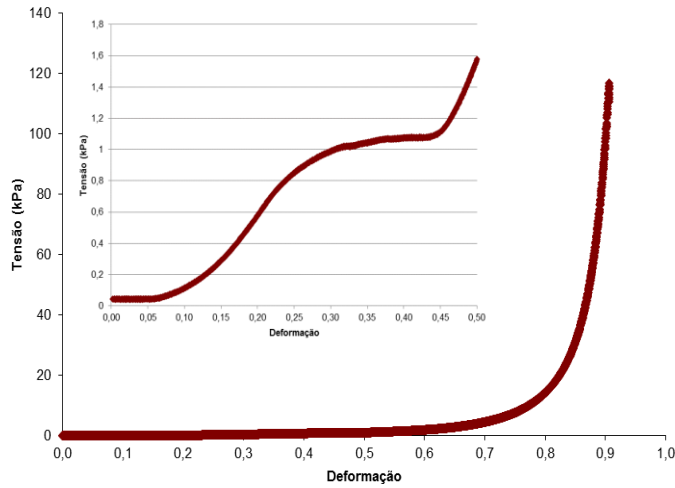


Figura 3.24 - Curva de Compressão da Espuma P8-OG0.1, com ampliação da zona elástica e patamar de colapso (C)

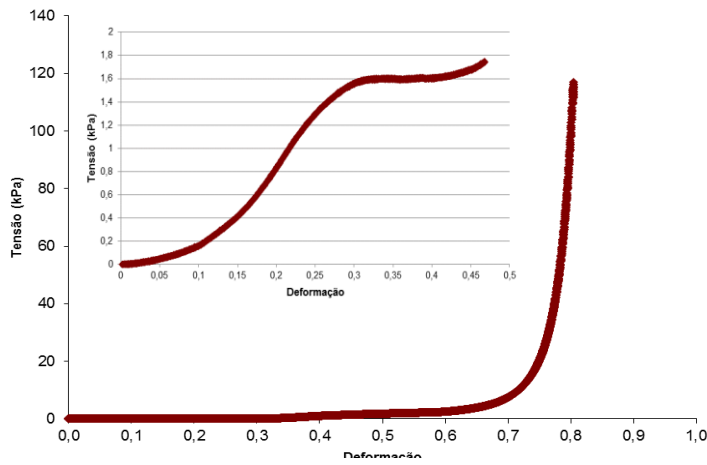


Figura 3.25 - Curva de Compressão da Espuma P8-OG0.25, com ampliação da zona elástica e patamar de colapso (D)

Para cada concentração de óxido de grafeno foram realizados cinco ensaios, e a partir dos dados obtidos construiu-se os gráficos de tensão em função da deformação, de onde se retirou o módulo de Young (E), a tensão de colapso (σ^*) e a deformação máxima ($\varepsilon_{máx}$) da amostra, como patente na tabela seguinte.

Tabela 3.10 verifica-se uma tendência de aumento das grandezas calculadas, módulo elástico e tensão de colapso, com o aumento da concentração de OG. Estatisticamente, as propriedades mecânicas das espumas com 0.01% (m/V) OG não diferem das espumas de PCL.

A deformação máxima de compressão mais reduzida equivale à espuma de 0.25% OG (m/V), que pode justificado pela presença de zonas mais densas que impossibilita a deformação total da estrutura.

Pode-se concluir que as amostras que têm mais OG apresentam melhores propriedades mecânicas.

3.11. Caracterização Eléctrica das Espumas

A tentativa de redução de óxido de grafeno através dos vapores de hidrazina foi também efectuada para as espumas. A cola de prata foi colocada nos bordos destas, para que as medições fossem feitas transversalmente. Para esta experiência, utilizaram-se espumas com maior concentração de OG (0.25% m/V) e também se utilizou um maior volume de hidrazina, aproximadamente 6 mL, uma vez que a dimensão da amostra é maior. O resultado da medição da condutividade está apresentado em baixo. Neste ensaio utilizaram-se duas amostras.



Figura 3.26 - Espuma antes e depois da Redução por Vapores de Hidrazina

Na figura acima, Figura 3.26, encontram-se fotografadas as espumas antes e depois da incubação com vapores de hidrazina. É observável a mudança de cor, que equivale à redução de OG nas espumas.

Tabela 3.11 - Ensaio de Condutividade das Espumas, após 24 horas de incubação com vapores de hidrazina

Tempo de Incubação		σ_e (S·cm ⁻¹)
P8-OG0.25	24 horas	$\approx 3.4 \times 10^{-10}$

Através da análise do resultado obtido, verifica-se que a condutividade é baixa e duas ordens de grandeza inferiores à das membranas, o que deve estar relacionado com as diferenças de espessura entre os dois tipos de amostra. Conclui-se, que este processo de redução não é eficaz no caso das espumas.

3.12. Ensaio de Adesão das Espumas

A adesão celular é um processo importante para que a regeneração de tecido inicie, e por isso, é necessário realizar testes para avaliar a interação entre o suporte e as células.

Após 24 horas, mediu-se as absorvâncias de cada poço nos comprimentos de onda de 570 nm e 600 nm. A partir da diferença dos valores resultantes, estimou-se a taxa de adesão das células ao suporte.

Tabela 3.12 – Média das medições das absorvâncias a 570nm e 600nm

	Absorvância a 570 nm	Absorvância a 600 nm	Diferença de Absorvâncias
P8	0.944 ± 0.017	1.030 ± 0.018	-0.086 ± 0.005
P8-OG0.01	0.836 ± 0.055	0.896 ± 0.069	-0.060 ± 0.021
P8-OG0.1	0.806 ± 0.121	0.865 ± 0.137	-0.060 ± 0.019
P8-OG0.25	0.741 ± 0.061	0.783 ± 0.066	-0.042 ± 0.017
Controlo de Células	1.018 ± 0.014	1.168 ± 0.0465	-0.150 ± 0.030

Na Tabela 3.12 estão detalhadas as medições de absorvâncias e as respectivas médias. Neste ensaio o tratamento de dados e a respectiva análise é qualitativa, pelo que não houve medição do controlo de meio.

Mediante a análise da Tabela 3.12, pode-se observar que a espuma com uma concentração de 0.25% (m/V) obteve um melhor resultado de taxa de adesão, sendo a

diferença entre as absorvâncias reduzida. Tendo em conta este resultado, conclui-se que a presença de OG contribui para uma melhor aderência ao suporte, uma vez que as células estão em contacto com o composto. A partir da hipótese mencionada, pode-se justificar que a presença dos grupos funcionais do OG promove e suporta a actividade celular [29] [69].

Assim, conclui-se que OG favorece a dinâmica celular, e as espumas são adequadas para regeneração de tecidos. Todavia, para confirmar a viabilidade destas, seria essencial realizar ensaios de proliferação com um intervalo de tempo alargado.

4. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS FUTURAS

No presente caso, os objectivos estipulados só foram parcialmente cumpridos, dado não ter sido possível a formação de *scaffolds* tridimensionais condutores. Todavia, foram realizados outros testes, complementares, que evidenciaram melhorias das propriedades mecânicas, bioactivas e biológicas das estruturas.

Neste trabalho foram produzidas membranas e espumas de PCL com diferentes concentrações de OG: 0.01%, 0.1%, 0.25% (m/V). Estudaram-se, também, os parâmetros que permitiam a organização tridimensional de fibras, e de forma a facilitar o processo de estratificação, servimo-nos de um colector de teflon com depressões, o qual possibilita a deposição das fibras nas zonas condutoras.

Os resultados obtidos da caracterização mecânica das membranas mostraram, ainda, que a incorporação de OG na solução polimérica produz uma melhoria nas suas propriedades físicas.

A partir da redução de OG com vapores de hidrazina, foi possível que as fibras apresentassem condutividade eléctrica. Comparativamente ao material de controlo, obteve-se um aumento de quatro ordens de grandeza.

A influência de OG resultou num comportamento hidrofóbico das fibras. Conforme se verificou, o aumento da concentração originou um aumento dos valores de ângulo de contacto, causado pela rugosidade das fibras.

Em geral, concluiu-se que uma maior concentração deste composto influencia a dimensão das fibras, a qual pode alterar o mecanismo de organização espacial, uma vez que com diferentes diâmetros facilita uma arquitectura tridimensional diferente.

O potencial bioactivo das espumas foi comprovado pela presença de uma camada apatítica agregada às fibras. No caso, das espumas, com 0.25% (m/V) OG, confirmou-se que o processo de mineralização inicia-se atempadamente ao das espumas de PCL. Isto mostra que OG pode ter influência no processo de formação de cristais apatíticos.

Os ensaios de compressão apresentaram um comportamento característico de uma estrutura tridimensional, com três zonas distintas: zona elástica, patamar de colapso e densificação. O aumento do valor das constantes associadas a estes ensaios provou que a presença de OG é um factor diferenciador.

Os ensaios de viabilidade celular demonstram que OG, nas quantidades usadas para este trabalho, não induzem qualquer efeito citotóxico para a cultura celular, apresentando condições

de biocompatibilidade necessárias para aplicação em tecidos celulares. Adicionalmente, estimou-se que OG contribuiu para uma aderência das células ao *scaffold* mais eficiente, sendo um ponto positivo para a sua utilização.

Os desafios da investigação científica, muitas vezes, passam por percalços indesejáveis. Efectivamente comprovou-se que não foi possível obter propriedades eléctricas por parte dos *scaffolds*. Mas com base nestes resultados, torna-se necessário arranjar alternativas que permitam recuperar a condutividade eléctrica das estruturas com OG, sem danificar a sua organização.

Também seria interessante fazer um estudo mais pormenorizado acerca das características hidrofóbicas das membranas com OG, e a possível aplicação biomédica para estas estruturas. Por exemplo, estas características permitem que não haja aderência bacteriana ao *scaffold*, e assim, inibição inflamatória por parte do organismo.

No âmbito dos testes celulares, a avaliação *in vitro*, teria de ser feita num período de tempo mais alargado, para que se verificasse concretamente a sua biocompatibilidade. Associado às propriedades condutoras do *scaffold*, poder-se-ia realizar testes *in vitro* com estímulos eléctricos, para investigar se a condutividade influencia a dinâmica celular, e a assim, o processo pudesse ser acelerado.

Confúcio dizia que “... *quanto mais luz, mais escuridão*”. Esse é o desafio da ciência, da descoberta, e dos insucessos que a sustentam, dos ensaios perdidos e do tempo, que se julga gasto em trabalho infrutífero e inútil, mas que quando colocado em perspectiva apenas se entende como um bloqueio é um incentivo noutra direcção.

Confúcio tinha razão pois quanto mais descobrimos, mais temos para descobrir, mais desafios temos para seguir e novas fronteiras para desbravar, nós, ou quem nos suceder.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] F. J. O'Brien, "Biomaterials & scaffolds for tissue engineering," *Mater. Today*, vol. 14, no. 3, pp. 88–95, 2011.
- [2] V. Karageorgiou and D. Kaplan, "Porosity of 3D biomaterial scaffolds and osteogenesis," *Biomaterials*, vol. 26, no. 27, pp. 5474–5491, 2005.
- [3] A. Martins, J. V Araújo, R. L. Reis, and N. M. Neves, "Electrospun nanostructured scaffolds for tissue engineering applications," *Nanomedicine*, vol. 2, no. 6, pp. 929–42, 2007.
- [4] R. C. Thomson, M. J. Yaszemski, J. M. Powers, and A. G. Mikos, "Fabrication of biodegradable polymer scaffolds to engineer trabecular bone," *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.*, vol. 7, no. 1, pp. 23–38, 1996.
- [5] Y. Ikada, "Surface modification of polymers for medical applications," *Biomaterials*, vol. 15, no. 10, pp. 725–736, 1994.
- [6] L. L. Hench and J. M. Polak, "Third-Generation Biomedical Materials," *Science (80-.)*, vol. 295, pp. 1014–1017, 2002.
- [7] S. Bose, M. Roy, and A. Bandyopadhyay, "Recent advances in bone tissue engineering scaffolds," *Trends Biotechnol.*, vol. 30, no. 10, pp. 546–554, 2012.
- [8] A. Gloria, R. De Santis, and L. Ambrosio, "Polymer-based composite scaffolds for tissue engineering," *J. Appl. Biomater. Biomech.*, vol. 8, no. 2, pp. 57–67, 2010.
- [9] B. Chuenjitkuntaworn, W. Inrung, D. Damrongsri, K. Mekaapiruk, P. Supaphol, and P. Pavasant, "Polycaprolactone/hydroxyapatite composite scaffolds: preparation, characterization, and in vitro and in vivo biological responses of human primary bone cells," *J. Biomed. Mater. Res. A*, vol. 94, no. 1, pp. 241–51, 2010.
- [10] "Polycaprolactone." [Online]. Available: <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/aldrich/440752?lang=pt®ion=PT>. [Accessed: 12-Nov-2014].
- [11] B. L. Seal, T. C. Otero, and A. Panitch, "Polymeric biomaterials for tissue and organ regeneration," vol. 34, pp. 147–230, 2001.
- [12] M. G. Tyagi, A. P. Albert, V. Tyagi, and R. Hema, "Graphene Nanomaterial and applications in Biomedical Sciences," *World J. Pharm. Pharm. Sci.*, vol. 3, no. 1, pp. 339–345, 2013.
- [13] R. Sengupta, M. Bhattacharya, S. Bandyopadhyay, and A. K. Bhowmick, "A review on the mechanical and electrical properties of graphite and modified graphite reinforced polymer composites," *Prog. Polym. Sci.*, vol. 36, no. 5, pp. 638–670, 2011.

-
- [14] V. Singh, D. Joung, L. Zhai, S. Das, S. I. Khondaker, and S. Seal, "Graphene based materials: Past, present and future," *Prog. Mater. Sci.*, vol. 56, no. 8, pp. 1178–1271, 2011.
- [15] S. K. Lee, H. Kim, and B. S. Shim, "Graphene: an emerging material for biological tissue engineering," *Carbon Lett.*, vol. 14, no. 2, pp. 63–75, 2013.
- [16] D. A. Stewart and K. A. Mkhoyan, "Graphene Oxide: Synthesis, Characterization, Electronic Structure, and Applications," in *Graphene Nanoelectronics*, H. Raza, Ed. Springer Berlin Heidelberg, 2012, pp. 435–464.
- [17] D. C. Marcano, D. V Kosynkin, J. M. Berlin, A. Sinitskii, Z. Sun, A. Slesarev, L. B. Alemany, W. Lu, and J. M. Tour, "Improved synthesis of graphene oxide," *ACS Nano*, vol. 4, no. 8, pp. 4806–4814, 2010.
- [18] B. . Brodie, "On the Atomic Weight of Graphite," *Philosophical Transactions R. Soc. London*, vol. 149, no. 1859, pp. 249–259, 1894.
- [19] L. Staudenmaier, "Verfahren zur Darstellung der Graphitsaure," *Berichte der Dtsch. Chem. Geellschaft*, vol. 31, no. 2, pp. 1481–1487, 1898.
- [20] W. Hummers and R. Offeman, "Preparation of Graphitic Oxide," *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 208, no. 1937, p. 1339, 1958.
- [21] G. Gonçalves, "Nanocompósitos de PMMA/HA/Grafeno para Aplicações Biomédicas," Universidade de Aveiro, 2012.
- [22] L. Shahriary and A. A. Athawale, "Graphene Oxide Synthesized by using Modified Hummers Approach," *Int. J. Renew. Energy Environ. Eng.*, vol. 02, no. 01, pp. 58–63, 2014.
- [23] S. Pei and H.-M. Cheng, "The reduction of graphene oxide," *Carbon N. Y.*, vol. 50, no. 9, pp. 3210–3228, 2012.
- [24] C. K. Chua and M. Pumera, "Chemical reduction of graphene oxide: a synthetic chemistry viewpoint.," *Chem. Soc. Rev.*, vol. 43, no. 1, pp. 291–312, 2014.
- [25] A. M. Jastrzebska, P. Kurtycz, and A. R. Olszyna, "Recent advances in graphene family materials toxicity investigations," *J. Nanoparticle Res.*, vol. 14, pp. 1–21, 2012.
- [26] S. Kim, H. Ku, Y. Lim, J. . Kim, and C. . Park, "Graphene - biomineral hybrid materials," *Adv. Mater.*, vol. 23, no. 17, pp. 2009–2014, 2011.
- [27] E. Bressan, L. Ferroni, C. Gardin, L. Sbricoli, L. Gobbato, F. Ludovichetti, I. Tocco, A. Carraro, A. Piattelli, and B. Zavan, "Graphene based scaffolds effects on stem cells commitment.," *J. Transl. Med.*, vol. 12, no. 1, p. 296, 2014.
- [28] D. Depan, B. Girase, J. S. Shah, and R. D. K. Misra, "Structure-process-property relationship of the polar graphene oxide-mediated cellular response and stimulated growth of osteoblasts on hybrid chitosan network structure nanocomposite scaffolds.," *Acta Biomater.*, vol. 7, no. 9, pp. 3432–45, 2011.
- [29] B. Chaudhuri, D. Bhadra, B. Mondal, and K. Pramanik, "Biocompatibility of electrospun graphene oxide–poly(ϵ -caprolactone) fibrous scaffolds with human cord blood
-

- mesenchymal stem cells derived skeletal myoblast,” *Mater. Lett.*, vol. 126, pp. 109–112, 2014.
- [30] G. Shi, M. Rouabhia, Z. Wang, L. H. Dao, and Z. Zhang, “A novel electrically conductive and biodegradable composite made of polypyrrole nanoparticles and polylactide,” *Biomaterials*, vol. 25, no. 13, pp. 2477–2488, 2003.
- [31] P. R. Supronowicz, P. M. Ajayan, K. R. Ullman, B. P. Arulanandam, M. D.W., and R. Bizios, “Novel current-conducting composite substrates for exposing osteoblasts to alternating current stimulation,” *J. Biomed. Mater. Res.*, vol. 59, pp. 499–506, 2002.
- [32] S. Meng, M. Rouabhia, and Z. Zhang, “Electrical stimulation modulates osteoblast proliferation and bone protein production through heparin-bioactivated conductive scaffolds,” *Bioelectromagnetics*, vol. 34, no. 3, pp. 189–99, Apr. 2013.
- [33] P. Taylor, J. Y. Lee, and J. A. E. Y. Lee, “Electrically Conducting Polymer- Based Nanofibrous Scaffolds for Tissue Engineering Applications Electrically Conducting Polymer-Based Nanofibrous,” vol. 53, pp. 443–459, 2013.
- [34] J. Xie, M. MacEwan, L. Xiaoran, and D. W. Moran, “Conductive Core-Sheath Nanofibers and Their Potential Application in Neural Tissue Engineering,” *Adv. Funct. Mater.*, vol. 19, no. 14, pp. 2312–2318, 2009.
- [35] N. Bhardwaj and S. C. Kundu, “Electrospinning: A fascinating fiber fabrication technique,” *Biotechnol. Adv.*, vol. 28, no. 3, pp. 325–347, 2010.
- [36] J. Vonch, A. Yarin, and C. M. Megaridis, “Electrospinning : A study in the formation of nanofibers,” *J. Undergrad. Res.*, vol. 1, no. 1, pp. 1–6, 2007.
- [37] T. Valente, “Produção de nanofibras de poli (ϵ -caprolactona) por electrospinning para futura aplicação na regeneração óssea e outras aplicações biomédicas,” Universidade da Beira Interior, 2011.
- [38] Z. Li and C. Wang, “Effects of Working Parameters on Electrospinning,” in *One-Dimensional Nanostructures*, Berlin, Heidelberg: SpringerBriefs, 2013, pp. 15–29.
- [39] Q. P. Pham, U. Sharma, and A. G. Mikos, “Electrospinning of polymeric nanofibers for tissue engineering applications: a review,” *Tissue Eng.*, vol. 12, no. 5, pp. 1197–1211, 2006.
- [40] A. Haghi and M. Akbari, “Trends in electrospinning of natural nanofibers,” *Phys. Status Solidi*, vol. 204, pp. 1830–1834, 2007.
- [41] A. M. Rebelo, “Produção de Espumas 3D Porosas por Auto-Organização de Nanofibras de Policaprolactona,” Universidade Nova de Lisboa, 2013.
- [42] V. Tavares, “Matrizes de Policaprolactona e Quitosano para aplicação em Engenharia de Tecidos Matrizes de Policaprolactona e Quitosano para aplicação em Engenharia de Tecidos,” Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade Nova de Lisboa, 2011.
- [43] N. Zander, “Hierarchically Structured Electrospun Fibers,” *Polymers (Basel)*, vol. 5, pp. 19–44, 2013.
- [44] S. Zargham, S. Bazgir, A. Tavakoli, A. S. Rashidi, and R. Damerchely, “The Effect of

- Flow Rate on Morphology and Deposition Area of Electrospun Nylon 6 Nanofiber,” 2012.
- [45] T. Mazoochi, M. Hamadian, M. Ahmadi, and V. Jabbari, “Investigation on the morphological characteristics of nanofibrous membrane as electrospun in the different processing parameters,” *Int. J. Ind. Chem.*, vol. 3, no. 2, pp. 1–8, 2012.
- [46] R. M. Nezarati, M. B. Eifert, and E. Cosgriff-hernandez, “Effects of Humidity and Solution Viscosity on Electrospun Fiber Morphology,” *Tissue Eng.*, vol. 19, no. 10, pp. 810–819, 2013.
- [47] T. C. Reis, J. Í. Correia, and A. Aguiar-Ricardo, “Electrodynamic tailoring of self-assembled three-dimensional electrospun constructs †,” *Nanoscale*, vol. 5, pp. 7528–7536, 2013.
- [48] D. Ahirwal, A. Hébraud, R. Kádár, M. Wilhelm, and G. Schlatter, “From self-assembly of electrospun nanofibers to 3D cm thick hierarchical foams,” *Soft Matter*, vol. 9, no. 11, pp. 3164–3172, 2013.
- [49] J. M. Deitzel, J. D. Kleinmeyer, J. K. Hirvonen, and N. C. . Tan, “Controlled deposition of electrospun poly(ethelene oxide),” *Polymer (Guildf)*, vol. 42, pp. 8163–8170, 2001.
- [50] C. R. Wittmer, A. Hébraud, S. Nedjari, and G. Schlatter, “Well-organized 3D nanofibrous composite constructs using cooperative effects between electrospinning and electrospaying,” *Polymer (Guildf)*, vol. 55, pp. 5781–5787, 2014.
- [51] Y. Wu, Z. Dong, S. Wilson, and R. L. Clark, “Template-assisted assembly of electrospun fibers,” *Polymer (Guildf)*, vol. 51, pp. 3244–3248, 2010.
- [52] A. M. Cavadas, “Hidrodinâmica de jactos de impacto confinados escoamento de fluidos newtonianos e nao newtonianos,” Faculdade de Engenharia da Universidade do Porto, 2008.
- [53] A. Oliveira, J. Oliveira, R. Oréfica, H. Mansur, and M. Pereira, “Avaliação das propriedades mecânicas de espumas híbridas de vidro bioactivo/álcool polivinílico para aplicação em engenharia de tecidos,” *Matéria*, vol. 12, pp. 140–149, 2007.
- [54] D. V. W. . de Vries, “Characterization of polymeric foams,” Eindhoven University of Technology, 2009.
- [55] T. Nakamura, K. Homma, and K. Tachibana, “Thin film deposition of metal oxides in resistance switching devices: electrode material dependence of resistance switching in manganite films,” *Nanoscale Res. Lett.*, vol. 8, no. 76, pp. 1–7, 2013.
- [56] J. Azeredo, “Adesão de Microrganismos e Composição da Matriz de Biodegradados. Desenvolvimento de Técnicas e Estudo da Influência de Expolímeros,” 1998.
- [57] T. Kokubo and H. Takadama, “Simulated Body Fluid (SBF) as a Standard Tool to Test the Bioactivity of Implants,” in *Handbook of Biomineralization: Biological Aspects and Structure Formation*, vol. 3, Wiley-VCH, 2007, pp. 97–109.
- [58] C. Wan and B. Chen, “Poly(ϵ -caprolactone)/graphene oxide biocomposites: mechanical properties and bioactivity.,” *Biomed. Mater.*, vol. 6, no. 5, p. 055010, Oct. 2011.
- [59] C. Wan, M. Frydrych, and B. Chen, “Strong and bioactive gelatin–graphene oxide

- nanocomposites,” *Soft Matter*, vol. 7, pp. 6159–6166, 2011.
- [60] A. C. Tas and S. B. Bhaduri, “Rapid coating of Ti6Al4V at room temperature with a calcium phosphate solution similar to 10 × simulated,” *J. Mater. Res.*, vol. 19, no. 91, pp. 2742–2749, 2004.
- [61] E. Y. Choi, T. H. Han, J. Hong, J. E. Kim, S. H. Lee, H. W. Kim, and S. O. Kim, “Noncovalent Functionalization of Graphene with End-Functional Polymers,” *J. Mater. Chem.*, vol. 20, pp. 1907–1912, 2010.
- [62] B. Chaudhuri, D. Bhadra, L. Moroni, and K. Pramanik, “Myoblast differentiation of human mesenchymal stem cells on graphene oxide and electrospun graphene oxide–polymer composite fibrous meshes: importance of graphene oxide conductivity and dielectric constant on their biocompatibility,” *Biofabrication*, vol. 7, no. 1, pp. 1–13, 2015.
- [63] W. Tesfai, P. Singh, Y. Shatilla, M. Z. Iqbal, and A. a. Abdala, “Rheology and microstructure of dilute graphene oxide suspension,” *J. Nanoparticle Res.*, vol. 15, no. 10, pp. 1–7, 2013.
- [64] W. F. Smith, *Princípios de ciência e engenharia de materiais*, 3rd ed. 1998.
- [65] C. Wan and B. Chen, “Poly(ϵ -caprolactone)/graphene oxide biocomposites: mechanical properties and bioactivity,” *Biomed. Mater.*, vol. 6, no. 5, pp. 1–8, Oct. 2011.
- [66] C. Wang, Q. Peng, J. Wu, X. He, L. Tong, Q. Luo, J. Li, S. Moody, H. Liu, R. Wang, S. Du, and Y. Li, “Mechanical characteristics of individual multi-layer graphene-oxide sheets under direct tensile loading,” *Carbon N. Y.*, vol. 80, pp. 279–289, 2014.
- [67] R. Wenzel, “Surface Roughness and Contact Angle,” *J. Phys. Colloid Chem.*, vol. 53, no. 9, pp. 1466–1467, 1949.
- [68] N. Lavielle, A. Hebraud, C. Mendoza-Palomares, A. Ferrand, N. Benkirane-Jessel, and G. Schlatter, “Structuring and Modeling of Electrospun Nanofibers: Effect of Electrical and Topographical Local Properties of Micro-Patterned Collectors,” *Macromol. Mater. Eng.*, vol. 297, pp. 958–98, 2012.
- [69] S. Dinescu, M. Ionita, A. Madalina, and B. Galateanu, “In vitro cytocompatibility evaluation of chitosan / graphene oxide 3D scaffold composites designed for bone tissue engineering,” *Biomed. Mater. Eng.*, vol. 24, pp. 2249–2256, 2014.

ANEXOS

A. Produção de Filmes

Os filmes utilizados nos ensaios de hidrofiliçidade foram produzidos no equipamento Automatic Film Applicator. (Figura A.1 (a)). A deposição do filme foi feita sobre um vidro e utilizou-se uma régua de 0.1 mm de espessura (Figura A.1 (b)). A solução é vertida na ranhura da régua e espalhada a uma velocidade constante ($v=2\text{mm/s}$).



Figura A.1 – (a) Equipamento utilizado para a Produção de Filmes; (b) Régua

B. Resultados Obtidos nos Ensaios de Tracção

Nas seguintes tabelas estão apresentados os resultados obtidos nos ensaios de tracção para cada amostra.

Tabela B.1 - Resultados do Ensaio de Tracção à membrana P8

Amostra	E (MPa)	σ_R (MPa)	Amostra	E (MPa)	σ_R (MPa)
1	3.8	4.0	6	1.4	2.7
2	4.8	3.4	7	2.7	2.7
3	3.6	3.4	8	2.6	2.8
4	2.6	3.3	9	3.5	3.8
5	2.1	3.0	10	2.1	3.0

Tabela B.2 - Resultados do Ensaio de Tracção à membrana P8-OG0.01

Amostra	E (MPa)	σ_R (MPa)	Amostra	E (MPa)	σ_R (MPa)
1	5.7	4.1	6	7.8	7.2
2	7.5	3.4	7	7.3	5.7
3	7.9	5.9	8	6.8	6.9
4	6.4	4.1	9	6.6	7.0
5	5.7	4.1	10	7.6	8.1

Tabela B.3 - Resultados do Ensaio de Tracção à membrana P8-OG0.1

Amostra	E (MPa)	σ_R (MPa)	Amostra	E (MPa)	σ_R (MPa)
1	8.8	5.5	6	8.4	7.5
2	7.4	6.2	7	8.8	6.1
3	7.4	6.1	8	7.2	5.2
4	6.1	6.0	9	8.5	6.3
5	8.0	5.9	10	7.1	6.1

Tabela B.4 - Resultados do Ensaio de Tracção à membrana P8-OG0.25

Amostra	E (MPa)	σ_R (MPa)	Amostra	E (MPa)	σ_R (MPa)
1	6.2	4.4	6	6.0	5.0
2	6.8	6.6	7	8.2	6.2
3	5.8	5.2	8	4.6	4.5
4	6.3	3.8	9	7.4	5.3
5	6.0	5.3	10	7.6	5.3

C. Resultados Obtidos nos Ensaios de Condutividade

Nas tabelas abaixo estão apresentadas as condutividades calculadas para cada membrana com diferente teor de OG, antes e após a incubação nos vapores de hidrazina.

Tabela C.5 - Resultados de Ensaios de Condutividade à membrana com OG

Amostra	P8-OG0.01		P8-OG0.1	
	Controlo	Incubação (24horas)	Controlo	Incubação (24horas)
	σ_e (S·cm ⁻¹)	σ_e (S·cm ⁻¹)	σ_e (S·cm ⁻¹)	σ_e (S·cm ⁻¹)
1	3.9×10^{-8}	4.8×10^{-8}	8.5×10^{-8}	3.2×10^{-4}
2	6.6×10^{-8}	1.2×10^{-8}	8.0×10^{-8}	1.1×10^{-3}
3	3.9×10^{-8}	1.2×10^{-8}	6.8×10^{-8}	2.1×10^{-4}
4	7.3×10^{-8}	3.1×10^{-8}	1.3×10^{-8}	2.7×10^{-4}
5	8.7×10^{-8}	6.6×10^{-8}	1.0×10^{-8}	3.4×10^{-4}
6	4.0×10^{-8}	7.4×10^{-8}	4.8×10^{-8}	3.3×10^{-4}

D. Resultados Obtidos nos Ensaios de Hidrofilicidade

Na tabela em baixo estão expostos os ângulos de contacto obtidos nos ensaios de hidrofilicidade.

Tabela D.6 - Resultados dos Ângulos de Contacto

P8		P8-0.01OG		P8-0.1OG		P8-0.25OG	
Membrana	Filme	Membrana	Filme	Membrana	Filme	Membrana	Filme
133.3 °	78.2 °	147.9 °	80.9 °	153.0 °	86.7 °	153.9 °	111.4 °
143.5 °	79.7 °	149.2 °	80.6 °	157.7 °	96.0 °	150.4 °	115.9 °
148.7 °	76.3 °	148.7 °	73.1 °	151.7 °	91.0 °	158.7 °	111.5 °
149.6 °	79.5 °	144.2 °	81.7 °	156.3 °	89.6 °	156.0 °	116.5 °
144.4 °	76.0 °	144.8 °	72.9 °	147.1 °	101.2 °	142.4 °	114.9 °

E. Redução de Óxido de Grafeno por Vapores de Hidrazina com controlo de temperatura

Tal como no método descrito no capítulo 3, as membranas foram colocadas numa câmara de vapor com 4 mL de hidrazina, em banho de silicone a uma temperatura controlada de 40°C. O aumento de temperatura permitiu que se procedesse à redução de OG num intervalo de tempo inferior, neste caso, de uma hora.

Tabela E.7 – Resultados de Condutividade da Membrana P8-OG0.1 (com temperatura controlada)

Tempo de Incubação (h)		σ_e (S·cm ⁻¹)
P8-OG0.1	1	$\approx 2.6 \times 10^{-9}$

Na tabela acima apresentam-se os dados obtidos. Não foi feito um estudo temporal, uma vez que uma incubação de 2 horas provocou a quebra da membrana.

F. Preparação de 1L de solução SBF10

Reagentes:

- 58.44 g de NaCl, CAS: 7647-14-5, *JT Buker*
- 0.373 g de KCl, *Sigma-Aldrich*
- 3.675 g de CaCl₂·2H₂O, CAS: 10035-04-8, *Sigma-Aldrich*
- 1.017 g de MgCl₂·6H₂O, CAS: 7791-18-6, *Sigma-Aldrich*
- 1.1200 g de NaH₂PO₄, *Panreac*
- NaHCO₃, *Merck*
- Solução de 1M de HCl;

Procedimento:

- (1) Dissolve-se cada um dos reagentes, conforme a ordem apresentada atrás, em 950 mL de água destilada, num frasco de 1 L de capacidade. Antes de se adicionar um reagente, o anterior tem de estar dissolvido na sua totalidade;
- (2) Após a adição do último composto, adicionou-se água destilada até perfazer 1 L de solução;
- (3) À solução, de pH=6,45, foi adicionado HCl até se obter um pH aproximadamente 4,5. A solução foi conservada à temperatura ambiente;
- (4) Antes de usar a solução, adicionou-se uma quantidade de NaHCO₃, em constante agitação, até se obter uma solução com pH aproximadamente de 6.5;

G. Quadro dos Resultados Obtidos para os Ensaio de Condutividade das Espumas

Na tabela estão discriminados os parâmetros utilizados para a determinação da condutividade.

Tabela G.8 - Resultados da Condutividade das Espumas

Amostra	Comprimento (mm)	Largura (mm)	Espessura (mm)	Resistividade (S)	σ_e (S·cm ⁻¹)
1	10	10	2	9.1×10^{-11}	4.6×10^{-11}
	10	10	2	5.7×10^{-13}	2.9×10^{-13}
	10	10	2	4.9×10^{-11}	2.4×10^{-11}
	10	10	2	7.4×10^{-11}	3.7×10^{-11}
2	10	10	2	1.1×10^{-11}	5.3×10^{-11}
	10	10	2	9.6×10^{-11}	4.8×10^{-11}
	10	10	2	6.9×10^{-11}	3.4×10^{-11}
	10	10	2	5.6×10^{-11}	2.8×10^{-11}

H. Preparação da Cultura Celular

Subcultura de células

A replicação das células ocorre até a superfície disponível para adesão fica coberta de células (confluência) ou haja falta de nutrientes. Quando esta situação acontece, é necessário transferir as células para um novo frasco, para que o crescimento prossiga. O procedimento está descrito de seguida:

- (1) De forma a determinar o grau de confluência da cultura e se esta está ausente de qualquer contaminação microbiana ou fúngica, estas são observadas no microscópio invertido;
- (2) Com uma pipeta retira-se o meio de cultura, com o cuidado de não tocar na camada de células;
- (3) Lavou-se a monocamada celular com 5 mL de PBS, sem cálcio nem magnésio, até estarem completamente aderidas à superfície;
- (4) Adicionou-se tripsina e agitou-se o frasco para que cobrisse toda a camada de células. O excesso de tripsina foi removido;
- (5) O frasco foi colocado na incubadora, a 37°C, durante 5 min;

(6) Verificou-se, através do microscópio invertido, se as células se soltaram e estavam em suspensão;

(7) Adicionou-se 2 mL de meio de cultura completo, e por pipetagem, ressuspendeu-se bem as células;

(8) O frasco com a cultura celular foi guardado na incubadora, para que o processo de replicação ocorresse.

Contagem de células

É necessário quantificar o número de células de uma cultura, para que os procedimentos de crescimento celular sejam controlados e haja uma otimização de resultados.

Para a contagem celular utilizou-se azul tripano, uma solução corante de exclusão, que apenas marca as células inviáveis. Quando as células estão mortas, há rompimento da membrana que permite a entrada do corante para o seu interior, e estas ficam coradas de azul.

Para a quantificação celular, seguiu-se o procedimento descrito:

(1) Num microtubo, colocou-se 50 μL de suspensão de células com igual quantidade de azul tripano (factor de diluição 2);

(2) Após a limpeza do hemocitómetro, colocou-se em cada uma das câmaras, cerca de 10 μL da suspensão celular;

(3) No microscópio invertido, realizou-se a contagem de células viáveis em cada câmara. Para se obter rigor na percentagem de células viáveis, deve-se contar pelo menos 100 células;

(4) Depois de quantificar o número de células viáveis, calculou-se a concentração destas.

Na figura seguinte está representado o esquema de contagem do hemocitómetro:

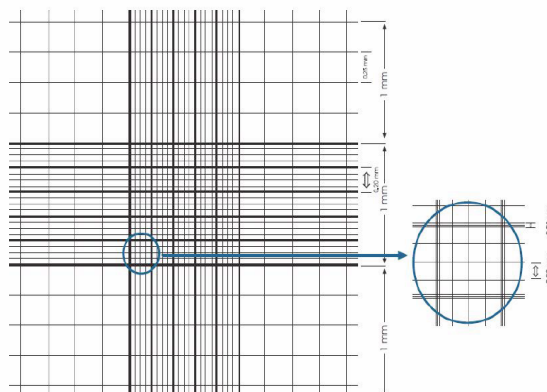


Figura G.2 - Esquema de Contagem do Hemocitómetro

Concentração de células viáveis (células/mL):

$$\frac{\text{Número de células vivas contadas}}{\text{Número de quadrados contados com 1 mm de lado}} \times \text{diluição} \times 10000$$

Concentração de células não viáveis (células/mL):

$$\frac{\text{Número de células mortas contadas}}{\text{Número de quadrados contados com 1 mm de lado}} \times \text{diluição} \times 10000$$

Porcentagem de células viáveis (células/mL):

$$\frac{\text{Número de células vivas contadas}}{\text{Número de células mortas contadas}} \times 100$$

Nota:

O factor de 10 000 resulta da conversão do volume da câmara de contagem (0,1 mm³) em mL.

Marcação de Células com Resazurina

Como foi anteriormente mencionado, a resazurina é um corante azul que é usado como um indicador de viabilidade celular. As células viáveis não metabolizam a resazurina, e desta maneira, esta não é reduzida a resorufina (composto cor-de-rosa). A medição da absorvância traduz-se na variação de cor do meio, que por sua vez, é proporcional ao número de células metabolicamente activas ou inactivas. O pico de absorvância da resazurina é 601 nm, enquanto o da resorufina corresponde a um máximo de absorvância a 571 nm.

Para a marcação de células com resazurina realizou-se o seguinte procedimento:

- (1) A cada poço foi adicionado uma solução de meio completo com 10% de volume de resazurina (equivalente a 10 µL);
- (2) A placa de células com meio composto foi colocado a incubar na estufa de CO₂ durante um período de 3 horas;
- (3) Após a incubação ter finalizado, procedeu-se a leitura da absorvância do meio para 570 nm e 600 nm, através do leitor de microplacas (Biotek ELX 800 UV).