



André Filipe da Silva Delgado

Licenciado em Ciências de Engenharia Biomédica

**Estudo e Optimização da Técnica de Fiação Húmida
para Produção de Microfibras de Quitosano**

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em
Engenharia Biomédica

Orientadores: Jorge Carvalho Silva, PhD, FCT-UNL
João Paulo Borges, PhD, FCT-UNL

Júri:

Presidente: Prof. Doutor Mário António Basto Forjaz Secca
Arguente: Prof. Doutor Luís Filipe Verga Vieira Pinto
Vogais: Prof. Doutor Jorge Alexandre Monteiro de Carvalho e Silva
Prof. Doutor João Paulo Miranda Ribeiro Borges



**FACULDADE DE
CIÊNCIAS E TECNOLOGIA
UNIVERSIDADE NOVA DE LISBOA**

Setembro 2011

Copyright

Copyright© - Todos os direitos reservados. André Filipe da Silva Delgado; Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade Nova de Lisboa.

Estudo e Optimização da Técnica de Fiação Húmida para Produção de Microfibras de Quitosano

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.

“Um bom cientista é uma pessoa com ideias originais. Um bom engenheiro é uma pessoa que faz um projecto que trabalha com tão poucas ideias originais quanto possível”

Freeman Dyson

AGRADECIMENTOS

Aos meus orientadores, Professor Doutor João Paulo Borges e Professor Doutor Jorge Carvalho e Silva, pela disponibilidade demonstrada, pelo apoio prestado, pelo incentivo constante ao desenvolvimento de novas ideias e pela fonte de conhecimento que se revelaram.

À Engenheira Ana Espiga, que me transmitiu os conhecimentos fundamentais para o desenvolvimento deste trabalho, para além de todo o auxílio que me ofereceu quer em termos de técnicas laboratoriais quer na constante troca de ideias.

Aos meus pais, pelos valores e boa educação dados que fizeram de mim o que sou hoje, por todos os sacrifícios feitos ao longo deste percurso, pelo apoio constante, pela compreensão e ânimo dados em etapas mais complicadas da vida e que foram essenciais para chegar a esta fase. Valeu a pena!

A toda a minha família, pelo suporte que foram durante esta longa caminhada e pelo carinho e ajuda incessantes que me deram.

À minha namorada Joana Tavares, por todo o amor, carinho, força e incentivo que me deu, por acreditar em mim quando muitos duvidavam, pela paciência e compreensão nos momentos mais complicados, por ser o meu suporte fundamental nesta jornada e por ser a pessoa fabulosa que é e que tanto significa para mim

Ao Grupo de Polímeros do Departamento de Ciências dos Materiais, local onde comecei este trabalho, por todo o apoio e disponibilidade prestados em grande parte pelos Engenheiros Hugo Lisboa e João Canejo, pela Biotecnóloga Ana Baptista e pela D^a Augusta.

Ao Grupo de Engenharia de Tecidos do Departamento de Física, pelo excelente ambiente proporcionado, pela entreatuda dada e pela troca de ideias feita. Uma palavra de grande apreço à Engenheira Susana Gomes, por todo o auxílio que me proporcionou e pela amizade criada e ao Engenheiro Carlos João, pela cooperação feita e pelo apoio prestado.

Ao Departamento de Biologia Animal da FCUL, nomeadamente à Professora Doutora Gabriela Rodrigues e ao Doutor Gabriel Martins, pela maneira como me acolheram no seu departamento, por toda a ajuda prestada na parte das culturas celulares, pela disponibilidade demonstrada e pelos conhecimentos transmitidos.

Ao meu grupo de amigos Gavionenses, Bruno Mendes, Fábio Gomes, Filipe Tibúrcio, Nuno Cardigos, Paulo Matos e Susana Cardigos pela amizade e companheirismo de sempre.

Ao grupo de amigos da FCT, Carlos Mota, Dinis Vieira, João Miranda e Ricardo Marques. Ao longo deste tempo de faculdade, inúmeras foram as aventuras partilhadas em conjunto e ainda mais as histórias que guardamos. A amizade travada foi fundamental para suportar muitas das fases menos boas da vida académica.

Finalmente, a todos aqueles que de alguma forma me ajudaram ao longo do percurso na FCT ou contribuíram para a realização deste trabalho. Um muito obrigado.

SUMÁRIO

O quitosano é um dos materiais mais importante para a engenharia de tecidos. Este polímero resulta da desacetilação da quitina, o segundo polímero natural mais abundante. Entre as suas propriedades mais importantes contam-se a biocompatibilidade, a biodegradabilidade e o facto de poder ser moldado em fibras, filmes, géis e esponjas.

Neste trabalho recorreu-se à técnica de fiação húmida para produzir microfibras de quitosano. Inicialmente, variaram-se parâmetros como a concentração do polímero, a velocidade de enrolamento da fibra e o tipo de secagem. O melhor resultado obteve-se a partir de uma concentração de quitosano de 3% e secar as fibras numa folha de acetato.

Seguidamente, procedeu-se à optimização do processo de produção das fibras, com vista ao melhoramento das suas propriedades mecânicas. Testaram-se vários aditivos – poli(óxido de etileno), polietilenoglicol e glicerol – e fizeram-se variar a temperatura do banho de coagulação e o solvente do quitosano – trocou-se o ácido acético pelo ácido láctico. Após testes de tracção, espectroscopia de infra-vermelhos e microscopia electrónica de varrimento foi possível caracterizar todas as fibras produzidas. Concluiu-se que as fibras de quitosano dissolvidas em ácido láctico a 2% e coaguladas num banho de NaOH 1M com uma temperatura entre 42°C e 45°C são as que melhores propriedades apresentam.

A estas fibras foram feitos testes de variação de pH e absorção de água. Percebeu-se que após re-hidratação e nova secagem as fibras apresentam-se neutras ($pH \approx 7$) mas perdem drasticamente a capacidade de absorção.

Foi produzida uma matriz com três camadas destas fibras sobrepostas, rodadas de 90° relativamente à camada inferior. Realizaram-se culturas celulares, que apesar de não terem revelado a proliferação das células, não excluem esta matriz como substrato para a adesão e cultura de células.

Finalmente, foi projectado e construído um modelo contínuo de fiação húmida que permite realizar a coagulação e a secagem das fibras em sequência.

Palavras-chave: Quitosano; Engenharia de Tecidos; Microfibras; Fiação Húmida; Optimização; Modelo Contínuo

ABSTRACT

Chitosan is one of the most important materials for tissue engineering. This polymer results from the deacetylation of chitin, the second most abundant natural polymer. Its most important properties include the biocompatibility, biodegradability and the fact that it can be shaped into fibers, films, gels and sponges.

In this work, the wet spinning technique was used to produce chitosan microfibers. Initially, parameters such as polymer concentration, fiber winding speed and drying method were varied. The best results were obtained with the use of chitosan at 3% and dry the fibers over an acetate sheet.

The next step was the optimization of the production process with the aim of improving their mechanical properties. Various additives were tested – poly(ethylene oxide), polyethylene glycol and glycerol – the coagulation bath temperature was varied and the solvent of chitosan was changed – replacing acetic acid by lactic acid. After tensile testing, infrared spectroscopy and scanning electron microscopy, it was possible to characterize all the fibers produced. The conclusion was that the fibers of chitosan dissolved in 2% lactic acid and coagulated in a bath of NaOH 1M at a temperature between 42°C and 45°C are those that have better properties.

Tests of variation of pH and water absorption were made to these fibers. It was noticed that after re-hydration and re-drying the fibers have neutral pH but they lost dramatically the capacity of absorption.

A scaffold was produced with three overlapping layers of these fibers, rotated 90° relative to each other. Cell cultures were made, which despite not having revealed the proliferation of cells, do not excluded this scaffold as a support for the adhesion and culture of cells.

Finally, a continuous model of wet spinning, that allows the coagulation and drying of the fibers to be done in sequence, was designed and built.

Key words: Chitosan; Tissue Engineering; Microfibers; Wet Spinning; Optimization; Continuous Model

LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

CCK8 – Kit de contagem celular – *cell counting kit*

CS – Quitosano – *chitosan*

CS L – Quitosano de alta massa molecular – *large molecular weight chitosan*

CS M – Quitosano de média massa molecular – *médium molecular weight chitosan*

CS S – Quitosano de baixo peso molecular – *small molecular weight chitosan*

DMEM – Meio de cultura celular – *Dulbecco's Modified Eagle's Medium*

ECACC – *European Collection of Animal Cell Cultures*

ELISA – Placa para leitura de absorvâncias – *Enzyme Linked Immunosorbent Assay*

FBS – Soro fetal bovino – *fetal bovine serum*

FT-IR – Espectroscopia de Infra-vermelhos por Transformada de Fourier – *Fourier Transform Infrared Spectroscopy*

HCl – Ácido clorídrico

HFFF2 – Fibroblastos de origem humana – *human caucasian foetal foreskin fibroblasts*

IV – Infra-vermelhos

KBr – Brometo de Potássio

NaOH – Hidróxido de Sódio

NH₂ – Grupo Amina

P6 – Passagem celular correspondente ao número de tripsinações

PBS – Solução salina de tampão fosfato – *phosphate buffered saline*

PEG – Polietilenoglicol

PEG 300 – Polietilenoglicol de massa molecular 300 g/mol

PEO – Poli(óxido de etileno)

PEO 5M – Poli(óxido de etileno) de massa molecular 5000000 g/mol

PEO 8M – Poli(óxido de etileno) de massa molecular 8000000 g/mol

PFA – Paraformaldeído

SEM – Microscopia Electrónica de Varrimento – *Scanning Electron Microscope*

T75 – Frasco de cultura celular com 75cm² de área

TO-PRO3 – Corante de ADN

USP – *United States Pharmacopeia*

WST-8 – Sal constituinte do kit de contagem – *water-soluble tetrazolium salt*

(OCH₂CH₂)_n – Poli(óxido de etileno)

C₃H₈O₃ – Glicerol

C₆H₁₁NO₄ – Quitosano

CH₃COOH – Ácido acético

CH₃OH – Metanol

m/m – Fração massa/massa

v/v – Fração volume/volume

ÍNDICE

AGRADECIMENTOS	IV
SUMÁRIO	V
ABSTRACT	VI
LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS	VII
ÍNDICE	VIII
ÍNDICE DE ILUSTRAÇÕES	XI
ÍNDICE DE TABELAS	XII
OBJECTIVOS	XIII
1.1. Engenharia Biomédica	1
1.2. Biomateriais	2
1.2.1. Definição.....	2
1.2.2. Classificação.....	3
1.3. Biopolímeros	4
1.3.1. Classificação.....	5
1.3.2. Degradação	7
1.4. Quitina & quitosano	8
1.4.1. Estrutura	9
1.4.2. Propriedades físicas e químicas	9
1.4.3. Propriedades biológicas	11
1.4.4. Aplicações	11
1.5. Fiação húmida	12
1.6. Materiais aditivos	14
1.6.1. Poli(óxido de etileno) e Polietilenoglicol.....	14
1.6.2. Glicerol	15
2. PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL	16
2.1. Produção de fibras de quitosano por fiação húmida	16
2.1.1. Preparação das soluções de quitosano.....	16
2.1.2. Preparação do banho de coagulação	16
2.1.3. Preparação dos banhos de secagem	16
2.1.4. Montagem experimental	17
2.1.5. Secagem das fibras ao ar.....	17
2.1.6. Medição do diâmetro das fibras.....	19
2.1.7. Testes de tracção	19

2.2. Optimização da técnica de fição húmida e caracterização das fibras de quitosano produzidas	19
2.2.1. Secagem das fibras ao ar.....	19
2.2.2. Preparação das soluções de quitosano e PEO	20
2.2.3. Preparação do banho de coagulação	20
2.2.4. Montagem e procedimento experimental.....	20
2.2.5. FT-IR	21
2.2.6. SEM.....	21
2.2.7. Preparação das soluções de quitosano e glicerol, quitosano e PEG, quitosano em ácido láctico e banhos aquecidos	22
2.3. Estudo da re-hidratação, perda de massa e pH das fibras produzidas	24
2.3.1. pH.....	24
2.3.2. Perda de massa.....	24
2.3.3. Testes de tracção	25
2.4. Produção de uma matriz com fibras de quitosano	25
2.5. Culturas celulares	25
2.5.1. Recta de calibração	26
2.5.2. Preparação das matrizes	27
2.5.3. Testes de proliferação	27
2.5.4. Morfologia	27
2.6. Modelo contínuo de fição húmida.....	28
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	31
3.1. Estudos preliminares	31
3.1.1. Quitosano M e L a diferentes concentrações.....	31
3.1.2. Quitosano M e L a 3%	32
3.1.3. Quitosano M a várias velocidades de enrolamento	32
3.1.4. Secagens.....	34
3.2. Optimização das propriedades das fibras produzidas	36
3.2.1. Fibras de quitosano e PEO.....	36
3.2.2. Variação de parâmetros de produção e aditivos.....	42
3.2.3. Fibras de CS a 3% + PEG 300 a 0.3%.....	45
3.2.4. Testes de pH e perda de massa.....	47
3.2.5. Testes de tracção a fibras re-hidratadas	51
3.3. Culturas celulares	52
3.3.1. Recta de calibração	52
3.3.3. Morfologia	55
3.4. Modelo contínuo de fição húmida.....	56
4. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS FUTURAS	58
5. BIBLIOGRAFIA.....	61

ANEXOS	A1
ANEXO A - PROTOCOLOS	A2
A1 – Preparação das soluções de quitosano	A2
A2 – Preparação do banho de coagulação.....	A2
A3 – Protocolo de fiação húmida	A2
A4 – Preparação de soluções de quitosano e PEO.....	A3
A5 – Preparação das pastilhas de KBr para FT-IR.....	A3
A6 – Preparação das soluções de quitosano e glicerol, quitosano e PEG, quitosano em ácido láctico e banhos aquecidos	A4
A7 – Produção de uma matriz com fibras de quitosano	A4
A8 – Recta de calibração.....	A5
A9 – Preparação das matrizes para os testes <i>in vitro</i>	A6
A10 – Testes de proliferação	A6
A11 – Fixação e coloração para observação em microscópio confocal	A7
A12 – Fixação e coloração para observação em SEM	A7
ANEXO B – DIÂMETROS DAS FIBRAS	A8
ANEXO C – MÓDULOS DE YOUNG E TENSÕES DE QUEBRA DAS FIBRAS.....	A11
Módulos de Young.....	A12
Tensões de quebra ou ruptura.....	A19

ÍNDICE DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Ciências abrangidas pela Biomédica (http://www.g9toengineering.com/engineering/biomedical.htm).....	1
Figura 2 – O mundo da engenharia Biomédica (Bronzino 2006)	2
Figura 3 – Tipos de cadeia polimérica: (a) linear, (b) ramificada, (c) reticulada (Shi 2006)	6
Figura 4 – Esquema da preparação da quitina e do quitosano a partir do exoesqueleto de crustáceos e fungos e suas aplicações (Azevedo et al. 2007).....	8
Figura 5 – Estruturas da quitina, do quitosano e da celulose (Allan et al. 1977)	9
Figura 6 – Espectros de absorção obtidos por FT-IR da quitina e do quitosano (Assis et al. 2008).....	10
Figura 7 – Esquema generalizado do processo de fiação húmida	13
Figura 8 – Estrutura do poli(óxido de etileno) (http://en.wikipedia.org/wiki/File:Polyethylene_glycol.png)..	14
Figura 9 – Estrutura do glicerol (http://en.wikipedia.org/wiki/File:Glycerin_Skelett.svg).....	15
Figura 10 – Fotografia da montagem experimental para fiação húmida	17
Figura 11 – Fotografia da montagem experimental para fiação húmida com a adição de um termómetro para controlo de temperatura.....	23
Figura 12 – Imagem das HFFF2 obtida através de microscópio confocal (gentilmente cedida pela Engenheira Ana Espiga).....	26
Figura 13 – Esquemas feito no programa Solidworks para o modelo contínuo de fiação húmida construído – a) vista tridimensional; b) alçado principal; c) alçado lateral	29
Figura 14 – Fotografia do modelo contínuo de fiação húmida projectado e montado	30
Gráfico 1 – Diâmetro de fibras de CS M a 3% a várias velocidades.....	33
Gráfico 2 – Módulo de Young de fibras de CS M a 3% a diferentes velocidades	33
Gráfico 3 – Diâmetros de fibras sujeitas a diferentes tipos de secagem.....	35
Gráfico 4 – Módulos de Young de fibras sujeitas a diferentes tipos de secagem	35
Gráfico 5 – Diâmetro de fibras de CS e CS+PEO.....	37
Gráfico 6 – Módulo de Young de fibras de CS e CS+PEO	37
Gráfico 7 – Tensão de ruptura de fibras de CS e de CS+PEO	38
Gráfico 8 – Espectros de absorção para CS, PEO e CS+PEO 5M (obtidos no CENIMAT e no DQ)	39
Gráfico 9 – Espectros de absorção de CS, PEO e CS+PEO 8M (obtidos no CENIMAT).....	39
Figura 15 – Imagens SEM de pormenor da superfície das fibras de CS (a), CS+PEO 5M (b) e CS+PEO 8M (c).....	41
Figura 16 – Imagens SEM das fibras de CS+PEO 5M (a) e CS+PEO 8M (b).....	41
Gráfico 10 – Diâmetro de fibras de CS em ácido acético, CS+Glicerol, CS em ácido láctico e respectivos banhos aquecidos.....	43
Gráfico 11 – Módulo de Young de fibras de CS em ácido acético, CS+Glicerol, CS em ácido láctico e respectivos banhos aquecidos.....	44
Gráfico 12 – Tensão de ruptura de fibras de CS em ácido acético, CS+Glicerol, CS em ácido láctico e respectivos banhos aquecidos.....	44
Gráfico 13 – Diâmetro de fibras de CS puro e com dois tipos de aditivo	46
Gráfico 14 – Módulo de Young de fibras de CS puro e com dois tipos de aditivo.....	46
Gráfico 15 – Tensão de ruptura de fibras de CS puro e com dois tipos de aditivo	47
Gráfico 16 – Variação de pH em fibras de CS em ácido acético após ciclos de secagem e re-hidratação	48
Gráfico 17 – Variação de pH em fibras de CS+PEG após ciclos de secagem e re-hidratação	48
Gráfico 18 – Variação de pH em fibras de CS em ácido láctico após ciclos de secagem e re-hidratação	49
Gráfico 19 – Variação de pH em fibras de CS em ácido láctico com banho aquecido após ciclos de secagem e re-hidratação	49
Gráfico 20 – Recta de calibração para as HFFF2 para absorvâncias inferiores a 0,4	52
Gráfico 21 – Recta de calibração para as HFFF2 para absorvâncias superiores a 0,4	53
Gráfico 24 – Representação gráfica da proliferação das HFFF2 com e sem matriz.....	54
Figura 17 – Imagens de SEM de vários pontos da matriz produzida.....	55

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1 – Alguns tipos de polímeros naturais e sua origem (Shi 2006).....	5
Tabela 2 – Alguns tipos de polímeros sintéticos e seu mecanismo de polimerização (Shi 2006)	5
Tabela 3 – Potenciais aplicações a nível biomédico do quitosano e suas características (Rinaudo 2006) 11	
Tabela 4 – Soluções preparadas para os testes de otimização da técnica de fiação húmida (a.a. – ácido acético; a.l. – ácido láctico; b.a. – banho aquecido).....	23
Tabela 5 – Lista de material utilizado no modelo contínuo de fiação húmida	28
Tabela 6 – Resultado das soluções de CS M e L com diferentes concentrações	31
Tabela 7 – Diâmetro para fibras de CS M e L a 3%.....	32
Tabela 8 – Módulo de Young de fibras de CS M e L a 3%	32
Tabela 9 – Diâmetro de fibras de CS M a 3% a diferentes velocidades	33
Tabela 10 – Módulo de Young de fibras de CS M a 3% a diferentes velocidades.....	33
Tabela 11 – Diâmetro de fibras sujeitas a diferentes tipos de secagem	34
Tabela 12 – Módulo de Young de fibras sujeitas a diferentes tipos de secagem	35
Tabela 13 – Diâmetro de fibras de CS e de CS+PEO	36
Tabela 14 – Módulo de Young de fibras de CS e CS+PEO.....	37
Tabela 15 – Tensão de ruptura de fibras de CS e de CS+PEO.....	37
Tabela 16 – Diâmetro de fibras de CS em ácido acético, CS+Glicerol, CS em ácido láctico e respectivos banhos aquecidos.....	42
Tabela 17 – Módulo de Young de fibras de CS em ácido acético, CS+Glicerol, CS em ácido láctico e respectivos banhos aquecidos.....	43
Tabela 18 – Tensão de ruptura de fibras de CS em ácido acético, CS+Glicerol, CS em ácido láctico e respectivos banhos aquecidos.....	43
Tabela 19 – Diâmetro de fibras de CS puro e com dois tipos de aditivo.....	45
Tabela 20 – Módulo de Young de fibras de CS puro e com dois tipos de aditivo	46
Tabela 21 – Tensão de ruptura de fibras de CS puro e com dois tipos de aditivo.....	46
Tabela 22 – Valores de pH dos vários tipos de fibras após três ciclos de secagem e re-hidratação.....	48
Tabela 23 – Valores de massa dos vários tipos de fibras após três ciclos de secagem e re-hidratação.....	50
Tabela 24 – Diâmetro de fibras de CS em ácido láctico e banho aquecido, com e sem re-hidratação	51
Tabela 25 – Módulo de Young de fibras de CS em ácido láctico e banho aquecido, com e sem re-hidratação	51
Tabela 26 – Tensão de ruptura de fibras de CS em ácido láctico e banho aquecido, com e sem re-hidratação	51
Tabela 27 – Valores de absorvância a 450nm para as várias amostras em 24, 48 e 72 horas.....	53
Tabela 28 – Subtracção do valor de absorvância do controlo branco às absorvâncias médias obtidas e extrapolação dos valores pela recta de calibração	53
Tabela 29 – Valores de diâmetro, módulo de Young e tensão de quebra para fibras de CS 3% produzidas no modelo contínuo de fiação húmida	56

OBJECTIVOS

Há bastante tempo que o quitosano tem vindo a ser estudado como um material com propriedades bastante interessantes no âmbito da Engenharia de Tecidos. As suas características estruturais aliadas a uma grande compatibilidade com o organismo revelam-no como um polímero muito útil na área das aplicações médicas.

Uma das particularidades do quitosano que o torna tão apetecível é o facto de poder ser moldado em forma de fibras e de matrizes tridimensionais através de técnicas como a fiação húmida e a electrofiação. Neste trabalho procurou aprofundar-se os conhecimentos sobre a primeira técnica referida: a fiação húmida.

Assim, delinearam-se como objectivos para esta dissertação os seguintes pontos:

1. Produção de fibras de quitosano pela técnica de fiação húmida.
2. Variação de parâmetros relativos à técnica utilizada (concentração de polímero, velocidade de enrolamento e modo de secagem).
3. Optimização das fibras produzidas através de aditivos, variações de solvente e variações de temperatura.
4. Caracterização mecânica, química e estrutural das fibras obtidas através de ensaios de tracção, espectroscopia de infra-vermelhos e microscopia óptica de varrimento.
5. Estudo da variação de pH e absorção de água nas fibras.
6. Produção de uma matriz tridimensional a partir das fibras optimizadas.
7. Análise da matriz produzida como substituto para a cultura celular através de testes de proliferação e morfologia de células.
8. Projecção e montagem de um sistema de fiação húmida contínuo (que incorpore banho de coagulação e banho de secagem sem interrupção).

Este trabalho foi realizado nos laboratórios do Grupo de Engenharia de Tecidos do Departamento de Física e do Grupo de Polímeros e Materiais Mesomorfos do Departamento de Ciências dos Materiais, ambos da Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade Nova de Lisboa e nos laboratórios do Departamento de Biologia Animal da Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa.

1. INTRODUÇÃO TEÓRICA

1.1. Engenharia Biomédica

A Engenharia Biomédica faz a ponte entre os princípios teóricos e as técnicas utilizadas pela bioengenharia para as aplicar no campo da Medicina: combina o planeamento, *design* e capacidade de resolução de problemas típicos de engenharia com uma componente biológica e médica de forma a melhorar os cuidados de saúde prestados aos pacientes, quer seja a nível de métodos e técnicas de diagnóstico quer a nível dos tratamentos (Patil and Mane 2009, Reyes-Guerra and Fischer 1985).

Podemos descrever a engenharia Biomédica como um campo interdisciplinar que engloba uma vasta gama de princípios e técnicas de outras ciências, tais como a Física, a Química e a Biologia. Na figura 1 está bem demonstrada a multiplicidade de temas que a Biomédica aborda na busca de novas aplicações e meios para otimizar as condições de saúde (Polikar 2004).

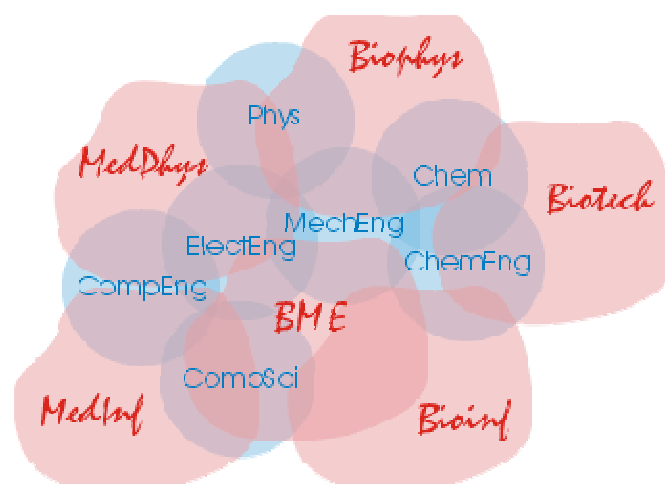


Figura 1 – Ciências abrangidas pela Biomédica
(<http://www.g9toengineering.com/engineering/biomedical.htm>)

Sendo uma disciplina relativamente recente, a maior parte dos trabalhos realizados pela engenharia Biomédica consiste na pesquisa e desenvolvimento de novos dispositivos nas mais diversas áreas de interesse: bioinformática (farmácias virtuais, por exemplo), imagem médica (ressonâncias magnéticas, p.e.), processamento de imagem (*software* para filtrar imagens ou aumentar contraste, p.e.), biomecânica (próteses, p.e.) e biomateriais são algumas das principais matérias, sendo que esta última será objecto de maior destaque neste trabalho. Na figura 2 pode ser observada a vasta gama de áreas de pesquisa biomédica (Patil and Mane 2009, Bronzino 2006).

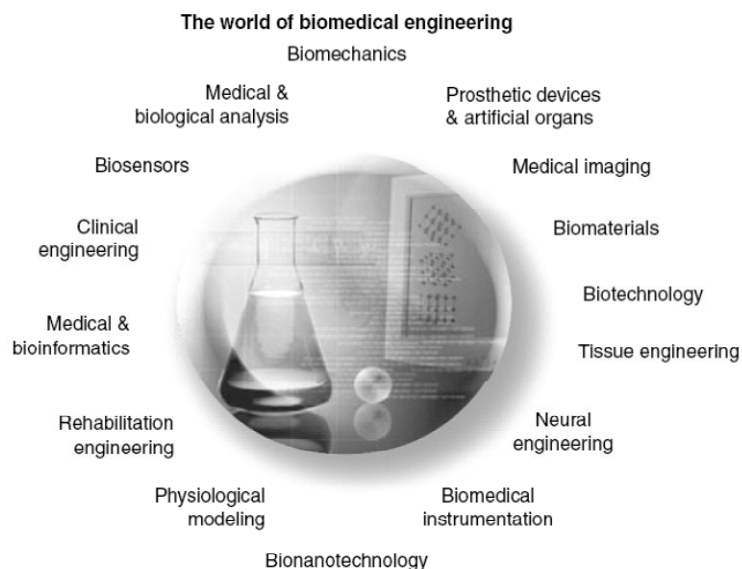


Figura 2 – O mundo da engenharia Biomédica (Bronzino 2006)

1.2. Biomateriais

Durante as últimas duas décadas foram feitos avanços significativos em relação ao desenvolvimento de materiais biocompatíveis – materiais seguros de implantar no organismo pois são tolerados por este – e biodegradáveis – materiais que após um determinado tempo são processados pelo próprio organismo sem criar produtos nocivos (Bronzino and Wong 2006, Park and Lakes 1992). No que diz respeito ao campo da Engenharia Biomédica, o objectivo é desenvolver e caracterizar materiais para utilizar no corpo humano para medir, restaurar ou melhorar a forma e/ou a função e assim aumentar a qualidade de vida. É nesta pesquisa que entram os biomateriais (Bronzino and Park 2003).

1.2.1. Definição

A definição de biomaterial tem sofrido alterações à medida que os estudos conhecem novos e satisfatórios resultados. Nos anos 80 um biomaterial era descrito como uma substância ou combinação de substâncias, sintéticas ou de origem natural, que poderiam ser utilizadas por um determinado período de tempo como um todo ou como parte de um sistema e que tratavam, melhoravam ou substituíam qualquer tecido, órgão ou função do corpo humano (Boretos and Eden 1984). Tratava-se porém de um ponto de vista passivo. Nos anos 90 esta definição foi reformulada e passou a denominar-se como biomaterial um material utilizado como dispositivo médico e desenhado para interagir com os sistemas biológicos (Dee, Puleo and Bizios 2003). Apesar da adopção desta visão activa, qualquer das definições dadas se

rege pelo princípio de os materiais terem de ser não tóxicos e compatíveis com o organismo (Callister Jr. 2005, Wise 2003).

1.2.2. Classificação

Existem dois grandes parâmetros de classificação de biomateriais: comportamento biológico – forma como interagem com o organismo – e composição química.

Em relação ao comportamento biológico, estas classificações foram evoluindo ao longo do tempo, daí se dizer que cada uma delas é uma geração de biomateriais. Temos assim quatro gerações distintas:

- I. Bioinertes: materiais que não desencadeiam nenhuma reacção no hospedeiro, ou seja, não são rejeitados nem reconhecidos (Williams 1999). São exemplo deste tipo o alumínio e o titânio.
- II. Biotolerados: materiais que causam a formação de tecido conjuntivo fibroso entre eles e o receptor (Moscatiello 2011). Pertencem a este grupo alguns polímeros sintéticos, como o nylon de fios de sutura.
- III. Bioactivos: materiais com a capacidade de interagir activamente com o tecido vivo, através de pontes químicas, formando assim uma interface dinâmica biomaterial/tecido capaz de suportar cargas funcionais (Ducheyne and Kohn 1992). São exemplos deste tipo o quitosano e a hidroxiapatite.
- IV. Biodegradáveis: materiais que têm a capacidade de ser degradados ou dissolvidos gradualmente, através de processos naturais (mecanismos hidrolíticos ou acção de enzimas), sendo depois substituídos por tecido natural do sítio onde são implantados. A sua degradação resultará em substâncias não tóxicas e passíveis de serem metabolizadas pelo organismo (Williams 1999, Shi 2006). Para além de polímeros como o PGA e o PLA, o quitosano também se engloba neste grupo.

Em relação à composição química, foi acordado considerar quatro grandes grupos de materiais:

- I. Metálicos: materiais compostos por um ou mais elementos metálicos (ferro, alumínio, cobre, titânio, ouro e níquel). São bons condutores eléctricos e térmicos mas apresentam alguns problemas de corrosão e toxicidade. Em relação a propriedades mecânicas, são materiais bastante resistentes e duros, apesar de possuírem uma boa ductilidade. São assim principalmente utilizados para aplicações estruturais sujeitas a cargas, como por exemplo próteses de joelho ou anca e fixadores de fracturas ósseas (Callister Jr. 2005, Dee, Puleo and Bizios 2003).

- II. Cerâmicos: materiais compostos por elementos metálicos e não metálicos (frequentemente óxidos, nitretos e carbonetos). São geralmente duros e resistentes a altas temperaturas (devido a serem bons isolantes de calor e electricidade). Contudo, a sua ductilidade é bastante baixa, sendo bastante susceptíveis a fracturas. São utilizados principalmente como auxiliares de implantes, como é o caso da cabeça do fémur na prótese da anca e do revestimento dos implantes dentários (Callister Jr. 2005, Dee, Puleo and Bizios 2003, Moscatiello 2011).
- III. Polímeros: materiais que têm como base o carbono, o hidrogénio e outros elementos não metálicos. Têm estruturas moleculares bastante grandes devido a serem o resultado da junção de várias unidades estruturais básicas (monómeros) repetidas em cadeia. Tipicamente os polímeros têm baixas densidades, baixas condutividades eléctricas, são não magnéticos e são bastante menos duros que os metais e os cerâmicos. Em compensação, são bastante dúcteis e flexíveis. Quimicamente, são inertes e não reactivos num grande número de ambientes. Contudo, têm tendência a amolecer ou decompor a temperaturas pouco elevadas, o que limita o seu uso. São utilizados maioritariamente como substitutos de tecidos moles e vasos sanguíneos, bem como suturas (Callister Jr. 2005, Dee, Puleo and Bizios 2003, Jayakumar et al. 2010).
- IV. Compósitos: constituídos por dois ou mais tipos de material já referidos. Têm como objectivo reunir num único material num único compósito as melhores propriedades dos materiais envolvidos, sendo que um funciona como base ou matriz e os outros como reforço. Logicamente, possuirão vantagens em relação aos materiais que lhes deram origem. São principalmente utilizados como substitutos de válvulas cardíacas e implantes dentários (Callister Jr. 2005, Moscatiello 2011).

Em suma, os biomateriais constituem uma vasta gama de compostos, de diferentes origens e com diferentes propriedades.

Neste trabalho serão abordados os biopolímeros, com grande destaque para o quitosano e a sua utilidade como biomaterial passível de aplicação médica.

1.3. Biopolímeros

Os biopolímeros podem ser descritos como polímeros biocompatíveis e utilizados em aplicações médicas. Devido às suas propriedades mecânicas e físicas próprias (que variam consoante os elementos utilizados) e ao seu razoável custo, estes materiais são preferidos aos metais e aos cerâmicos para diversas aplicações. As mais relevantes dizem respeito a sistemas de libertação controlada de drogas, matrizes para aplicação em engenharia de tecidos, aplicações cardiovasculares (válvulas cardíacas artificiais, por exemplo), implantes

mamários, lentes de contacto, revestimentos para cápsulas e comprimidos, suturas e adesivos. Como se pode constatar, abrangem um grande leque de diferentes problemas (Dee, Puleo and Bizios 2003, Davis 2003, Bronzino 2008).

1.3.1. Classificação

Para classificar os biopolímeros, existem quatro parâmetros essenciais a ser abordados: origem, tipo de cadeia, comportamento térmico e estabilidade.

- I. Origem: os biopolímeros podem ser naturais – existem originalmente na natureza – ou sintéticos – sintetizados a partir de um monómero por uma reacção de polimerização.

Do primeiro caso e a título de exemplo fazem parte o colagénio, a seda, a celulose, a quitina e o quitosano. Do segundo caso poderemos indicar o polietileno e o polipropileno como exemplos. Nas tabelas 1 e 2 estão patentes alguns polímeros naturais e sintéticos, respectivamente, bem como a sua origem ou mecanismo de polimerização (Shi 2006).

Tabela 1 – Alguns tipos de polímeros naturais e sua origem (Shi 2006)

Polímero	Origem
Colagénio	Animal
Seda	Animal
Agar	Algas vermelhas
Celulose	Plantas
Quitina/Quitosano	Animal/Fungos

Tabela 2 – Alguns tipos de polímeros sintéticos e seu mecanismo de polimerização (Shi 2006)

Polímero	Mecanismo de polimerização
Polietileno	Radical, reacção em cadeia de iões
Polipropileno	Reacção em cadeia de iões
Nylon 6	Polimerização por passos
Poliéster-uretano	Polimerização por passos

- II. Tipo de cadeia: os biopolímeros podem ser lineares, ramificados ou reticulados. Na figura 3 são apresentados esquemas dos três tipos: linear (a), ramificado (b) e reticulado (c).

Quando o polímero é linear, não existem ligações químicas entre as cadeias do mesmo. Isto faz com que estes polímeros possam ser dissolvidos em solventes adequados e possam ser fundidos quando aquecidos. Estas particularidades tornam os polímeros lineares mais fáceis de processar.

Os polímeros ramificados possuem propriedades semelhantes aos lineares. Contudo, as cadeias laterais existentes nas cadeias podem afectar significativamente o seu comportamento. Por exemplo, o polietileno linear tem maior densidade e cristalinidade que o polietileno ramificado.

Se as cadeias poliméricas forem ligadas quimicamente para formar uma estrutura tridimensional o polímero diz-se reticulado. Estes polímeros não podem ser dissolvidos em solventes nem fundidos quando aquecidos, daí também serem chamados polímeros termofixos (Shi 2006).

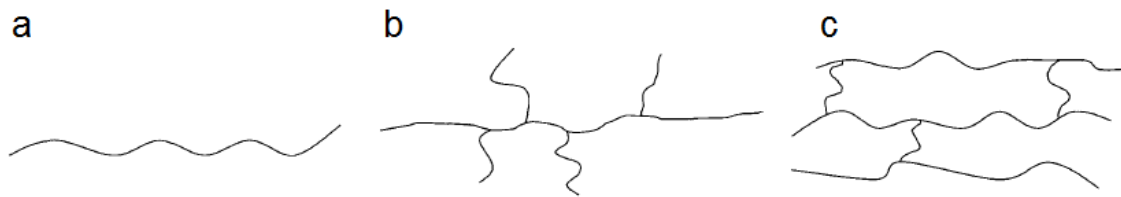


Figura 3 – Tipos de cadeia polimérica: (a) linear, (b) ramificada, (c) reticulada (Shi 2006)

III. Comportamento térmico: em relação a este parâmetro os polímeros podem ser termoplásticos – a uma dada temperatura apresentam alta viscosidade podendo ser moldados – ou termofixos – a sua rigidez não se altera com a temperatura. Na primeira categoria englobamos os polímeros lineares e ramificados enquanto os reticulados se englobam na categoria dos termofixos (Shi 2006, Lefteri 2008).

IV. Estabilidade: os polímeros podem ser bioestáveis ou biodegradáveis.

Um polímero bioestável não se degrada com o tempo. Nas aplicações médicas a sua utilização é geralmente permanente e o seu bom funcionamento depende de uma manutenção cuidada. São assim bastante passíveis de causar problemas ao paciente, tais como inflamações, incapacidade de acompanhar o crescimento e em casos mais graves podem levar à repetição da cirurgia para nova aplicação (Barbucci 2002, Dee, Puleo and Bizios 2003).

Um polímero biodegradável é um polímero cuja degradação é mediada pelo menos em parte pelo sistema biológico e ocorre por hidrólise, degradação enzimática ou bacteriológica. Os detritos resultantes são produtos com a capacidade de ser absorvidos ou eliminados do organismo sem lhe serem nocivos. Podemos assim apontar várias vantagens deste tipo de polímeros: melhor reparação fisiológica, apresentam a possibilidade de crescimento de tecido, tornam-se num processo menos invasivo para o paciente e dispensam nova cirurgia para remoção ou substituição do dispositivo (Barbucci 2002, Shi 2006).

Torna-se assim claro que é bastante vantajoso utilizar polímeros biodegradáveis pois são uma solução prática mas também eficaz em muitas aplicações médicas.

Para este efeito muito contribui o conhecimento do mecanismo de degradação dos polímeros.

1.3.2. Degradação

Segundo Kronenthal (1975), a degradação de polímeros baseia-se em quatro passos:

- I. Absorção de água: água ou fluidos biológicos difundem-se para o material.
- II. Redução das propriedades mecânicas: devido à entrada de líquido (que terá efeito plastificante no material e reduz assim a sua temperatura de transição vítrea), as propriedades mecânicas do material decrescem, nomeadamente o módulo de Young.
- III. Redução da massa molar: devido à quebra das cadeias do polímero, que ocorre por hidrólise, a massa molar vai diminuir. Isto vai provocar uma diminuição contínua do módulo de Young, dando assim seguimento ao passo anterior.
- IV. Perda final de peso: com propriedades bastante mais plásticas que as originais, o material finalmente perde peso e altera a sua forma.

Gilding (1981) estudou e descreveu o mecanismo de degradação dos polímeros no organismo – a biodegradação. Esta também se efectua em quatro passos: solubilização, ionização seguida de solubilização, hidrólise catalisada enzimaticamente ou por pH e hidrólise simples.

Os dois primeiros passos consistem na dissolução das cadeias poliméricas, quer seja directamente quer seja após a ionização em meio aquoso. Apesar destas mudanças, a estrutura básica da molécula mantém-se.

É nos dois passos finais que acontece a fragmentação de toda a estrutura polimérica, quer seja através de hidrólise devido a enzimas existentes no meio, quer seja por variações de pH (ambos os casos para o terceiro passo) ou finalmente por simples reacção com as moléculas de água (último passo).

Adicionalmente, foi provado que vários polímeros apresentam uma degradação mais rápida em contacto com determinadas bactérias ou através de um processo de oxidação. Contudo, estes mecanismos estão dependentes de outros factores (proliferação bacteriana e toxicidade dos produtos da oxidação, por exemplo) o que leva a que sejam alvos de mais estudos (Barbucci 2002).

Para este trabalho, foi considerado e estudado um tipo de biopolímero biodegradável, com características conhecidas e com grande potencial para aplicações biomédicas: o quitosano.

1.4. Quitina & quitosano

A quitina é o mais abundante amino-polissacarídeo natural e o segundo polímero natural mais abundante no mundo. Estima-se que anualmente seja produzida quase tanta quitina como celulose (o principal polímero natural existente). Devido à sua versatilidade e grande potencial a nível dos biomateriais, tornou-se numa substância cujo estudo desperta grande interesse (Ravi Kumar 1999, Rinaudo 2006, Kumar Dutta, Dutta and Tripathi 2004).

A quitina provém principalmente de dois crustáceos marinhos (camarões e caranguejos) e do fungo *mycelia*. Aquando da sua extracção sofre um processo de desmineralização, desproteinização e descoloração, que consiste na aplicação de soluções diluídas de HCl e NaOH. Contudo, na maior parte das vezes, a quitina é desacetilada, ou seja, elimina-se o grupo acetil dando assim origem ao quitosano (Ravi Kumar 1999, Azevedo et al. 2007, Paulino et al. 2006). Na figura 4 é apresentado um esquema para este processo.

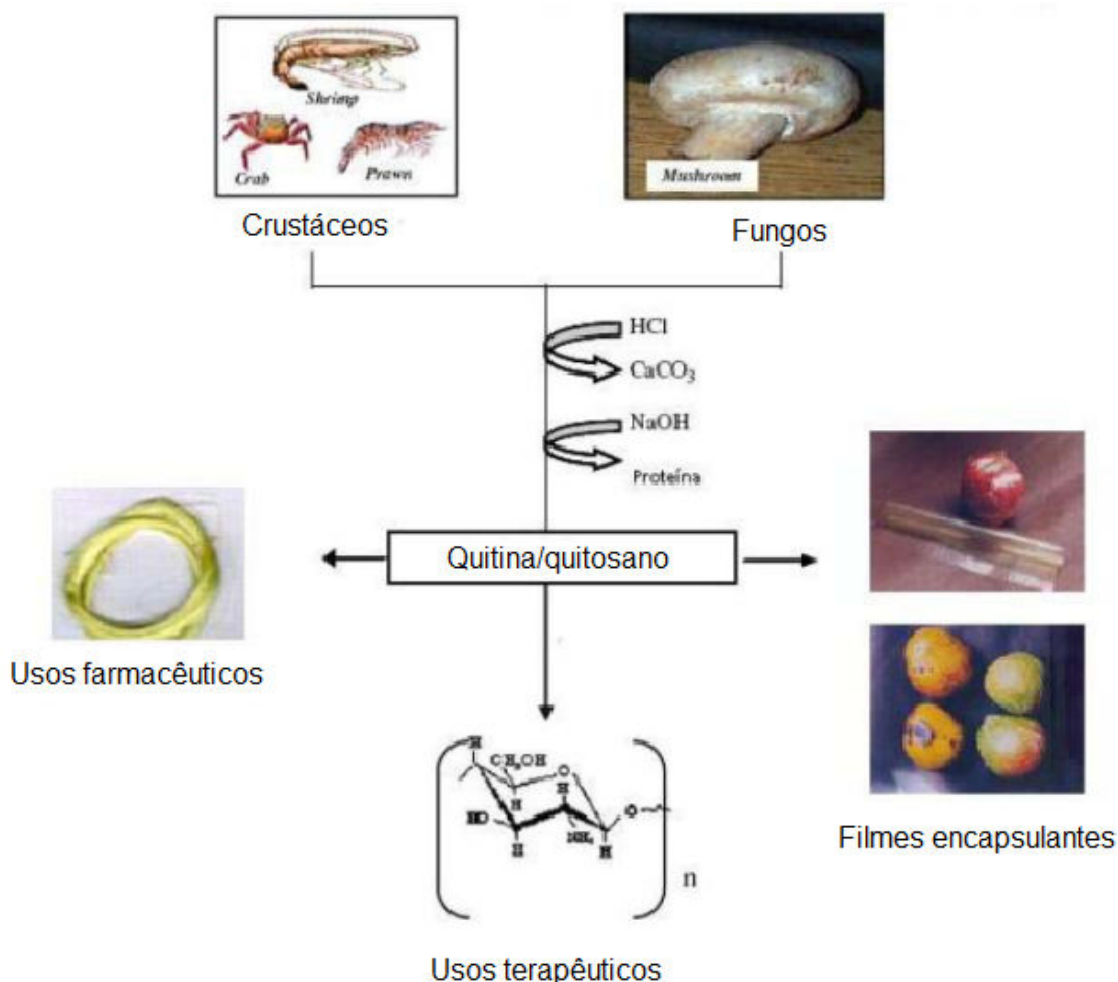


Figura 4 – Esquema da preparação da quitina e do quitosano a partir do exoesqueleto de crustáceos e fungos e suas aplicações (Azevedo et al. 2007)

1.4.1. Estrutura

Tanto a quitina como o quitosano são co-polímeros cujas unidades estruturais são *N*-glucosamina e *N*-acetil-glucosamina unidos entre si por ligações beta(1-4), o que não se afasta muito da estrutura da celulose (a figura 5 mostra isso mesmo). A maneira como se identificam diz respeito ao grau de desacetilação das moléculas: convencionou-se que se existir mais de 50% de unidades *N*-acetil-glucosamina a molécula é designada de quitina; se por outro lado o polímero sofreu desacetilação (o que permite, em solução aquosa ácida, a protonação do grupo funcional NH_2) e consequentemente existe mais de 50% de unidades *N*-glucosamina, então a molécula passa a designar-se quitosano (Rinaudo 2006, Aranaz et al. 2009).

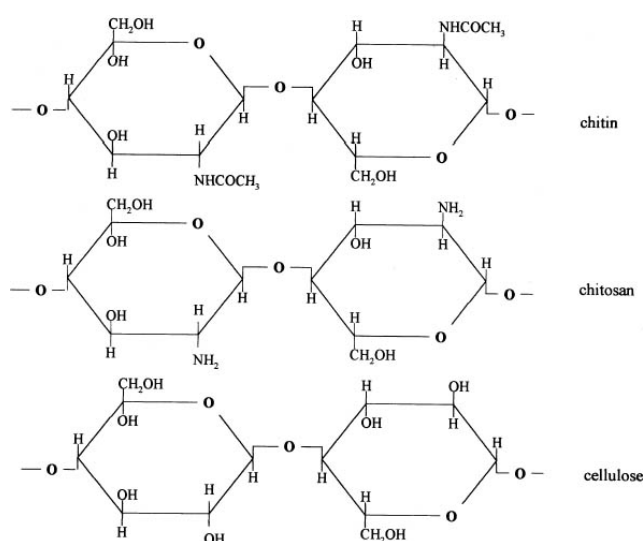


Figura 5 – Estruturas da quitina, do quitosano e da celulose (Allan et al. 1977)

1.4.2. Propriedades físicas e químicas

Devido ao grande número de ligações de hidrogénio existentes na quitina, esta torna-se bastante insolúvel e muito densa, o que leva a que seja bastante complicado o seu processamento. Pelo contrário, o quitosano é solúvel em soluções ácidas, o que o torna na maior parte das vezes preferido à quitina.

No estado sólido, o quitosano apresenta uma estrutura semi-cristalina e propriedades que podem ser adaptadas às exigências requeridas. Os principais parâmetros de variação são o peso molecular, o grau de desacetilação e a solubilidade, sendo que este último é bastante difícil de controlar pois depende de muitos factores (desacetilação, pH, distribuição dos grupos acetil na cadeia, concentração iónica e natureza do ácido utilizado) (Ravi Kumar 1999, Rinaudo 2006, Knaul and Creber 1997).

Quimicamente, o quitosano (e também a quitina) pode ser modificado de forma a obter propriedades específicas da aplicação em questão. Esta particularidade muito se deve à existência de grupos amina livres e reactivos (que permitem acetilações, quaternizações e reacção com outros grupos funcionais) e grupos hidroxilo (que permitem variações na solubilidade, bem como esterificações e eterificações). O resultado é um polímero modificado com propriedades bastante importantes para aplicação sem problemas no organismo (Kumar Dutta, Dutta and Tripathi 2004, Rinaudo 2006).

As diferenças estruturais entre a quitina e o quitosano podem ser detectadas através de espectros obtidos por FT-IR. Na figura 6 são apresentados ambos os espectros.

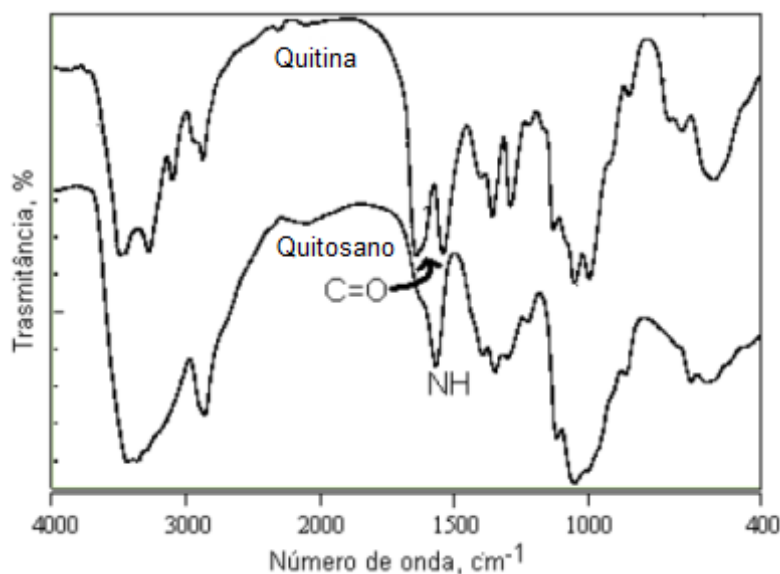


Figura 6 – Espectros de absorção obtidos por FT-IR da quitina e do quitosano (Assis et al. 2008)

Como podemos constatar, existem algumas diferenças nos espectros, que denunciam as diferenças estruturais entre a quitina e o quitosano. A mais notória prende-se com a deformação angular de ligações C=O (1650cm^{-1} no caso de amidas). No espectro da quitina o sinal do grupo carbonilo é bastante evidente (assinalado com a seta na figura), enquanto para o espectro de quitosano existe uma acentuada diminuição de intensidade do mesmo sinal evidenciando a ocorrência de desacetilação da quitina, isto é, a hidrólise básica do grupo amida.

Também na região compreendida entre os 3500cm^{-1} e os 3100cm^{-1} são visíveis diferenças entre os dois espectros. No espectro de quitina é possível observar dois picos bem definidos em 3200cm^{-1} e 3450cm^{-1} , atribuídos ao NH do grupo amida e às ligações de hidrogénio que o envolvem, respectivamente. Para o espectro de quitosano não é possível visualizar estes picos de forma tão definida pois devido à desacetilação a quantidade de grupos acetil é menor, diminuindo assim a quantidade de pontes de hidrogénio possíveis de serem realizadas (Assis et al. 2008).

1.4.3. Propriedades biológicas

Em termos de propriedades a nível biológico do quitosano, a mais importante é sem dúvida a sua biocompatibilidade. Isto deve-se ao facto de ser um polímero natural, biodegradável no ambiente do corpo humano e não tóxico. É esta particularidade que o leva a ser um dos grandes objectos de estudo a nível dos biomateriais e da biomédica, figurando já em trabalhos e aplicações de diversas áreas. A corroborar isto mesmo surgem características biológicas tais como a aceleração da formação de osteoblastos e do próprio osso, o efeito regenerativo no tecido conjuntivo da gengiva e o facto de ser imunoadjuvante (estimulador da resposta imunitária), entre outras propriedades (Kumar Dutta, Dutta and Tripathi 2004).

1.4.4. Aplicações

Como já foi referido, o quitosano tornou-se num material de grande interesse para a engenharia Biomédica. Muitos trabalhos e aplicações já foram desenvolvidos e muitos estão a ser estudados. Na tabela 3 estão ilustradas algumas das potenciais aplicações deste polímero a nível biomédico bem como as principais características que as tornam viáveis.

Tabela 3 – Potenciais aplicações a nível biomédico do quitosano e suas características (Rinaudo 2006)

Potenciais aplicações	Características principais
Suturas cirúrgicas	Biocompatibilidade e biodegradabilidade
Implantes dentários	Biocompatibilidade
Pele artificial	Acelerador da regeneração
Reconstrução de osso	Formação de filmes
Lentes de contacto corneais	Agente hidratante
Sistemas de libertação controlada de drogas	Não tóxico, tolerância biológica
Material encapsulante	Hidrolisado por lisozima, eficiente contra bactérias, vírus e fungos
Substituto de vasos sanguíneos	Biocompatibilidade

Grande parte das aplicações descritas é possível graças às diferentes formas como o quitosano pode ser processado. Este biomaterial tem a particularidade de poder formar hidrogéis, espumas, filmes e fibras, principalmente, tendo o modo de processamento do quitosano um papel decisivo (Khor and Lim 2003).

Para este trabalho estudaram-se propriedades de fibras de quitosano produzidas por *wet spinning*, ou seja, fiação húmida.

1.5. Fiação húmida

O processo de *wet spinning* ou fiação húmida foi desenvolvido por vários investigadores (Paul 1968; Moncreiff 1970; Ziabicki 1985) e permite obter fibras com diâmetros na escala dos micrómetros (daí serem chamadas de microfibras) a partir do quitosano previamente dissolvido.

A fiação húmida do quitosano tem por teoria base a capacidade deste material (quando dissolvido e em solução) precipitar na presença de determinados agentes coagulantes. Confinando a solução de quitosano a uma seringa e posterior passagem por uma agulha, é possível obter fibras coaguladas e bem orientadas que posteriormente se podem recolher num colector apropriado (Ravi Kumar 1999, Knaul et al. 1998).

Assim, podemos dividir o processo de fiação húmida em vários passos: preparação da solução, preparação do sistema, banho de coagulação, banho de secagem e/ou lavagem (sendo que existem várias opções neste campo, com o segundo a ser considerado opcional) e recolha das fibras.

- I. Preparação da solução: geralmente, o polímero encontra-se no seu estado sólido (flocos, pós ou grânulos). Para ser fiado precisa de ser dissolvido. Este processo é feito adicionando-o a uma solução aquosa de ácido, sendo comum utilizar o ácido acético numa concentração entre 1% e 10%. O resultado é uma solução com uma viscosidade bastante notória que depende da concentração de quitosano: quanto mais percentagem de polímero existir, mais viscosa é a solução.
Para se obterem as fibras, a solução é colocada numa seringa montada numa bomba infusora. Vários estudos (Hirano 2001) revelaram que a estrutura e várias características das fibras obtidas dependem do ácido utilizado para dissolver o quitosano, bem como do diâmetro da agulha utilizada e da velocidade de extrusão.
Ao ser bombeada, a solução sai da seringa, passa pela agulha e é libertada na tina que contém o banho de coagulação.
- II. Banho de coagulação: este passo diz respeito a uma solução que tem a capacidade de coagular o quitosano dissolvido previamente.
Devido às propriedades deste polímero, o banho a utilizar terá de ter um pH elevado, ou seja, possuir uma grande quantidade de iões OH^- que irão desprotonar os grupos amina do quitosano, tornando-o insolúvel e formando assim uma fibra coagulada. É geralmente utilizado um banho de NaOH a 1M.
- III. Banho de lavagem/secagem: depois de coagulada, a fibra está quase pronta para ser recolhida. Contudo, devido ao pH elevado do banho de coagulação, a fibra poderá apresentar-se esbranquiçada, o que significa ter excesso de agente coagulante. O banho de lavagem serve para remover este excedente, que poderá modificar radicalmente as propriedades da fibra.

Para além deste problema, ao ser coagulada a fibra apresenta também uma superfície bastante viscosa, muito devida ao NaOH ainda existente. Assim, torna-se fundamental utilizar um banho de secagem, chamado assim porque desidrata a fibra, ou seja, remove o excesso de água nela contida fazendo com que não se corra o risco de ficar colada.

Para o banho de lavagem, o mais convencional é utilizar água destilada. Para o banho de secagem, geralmente aplica-se metanol, etanol, acetona ou isopropanol, de modo a desidratar a fibra.

Apesar de tudo, este passo do processo não é muito linear: devido ao grande número de soluções que se podem utilizar, são várias as combinações que podem ser aplicadas. Por exemplo, podem-se misturar banhos de secagem com lavagem, podem-se variar tempos de residência, pode-se variar a altura em que os banhos são aplicados (se antes da recolha se depois) e pode-se inclusive suprimir o banho de lavagem, principalmente. Cada estudo já efectuado sobre a fiação húmida utiliza a sua própria versão.

IV. Recolha das fibras: para se obter uma fibra fácil de manusear, geralmente utiliza-se um colector para a recolher. Este consiste num rolo de um material com pouco atrito e quimicamente inerte (teflon, por exemplo), que está ligado a um motor e vai girando de forma a enrolar em si a fibra.

Vários estudos (Hirano 2001, El-Tahlawy and Hudson 2005) revelaram que as propriedades mecânicas da fibra obtida dependem bastante da tensão a que estão sujeitas aquando do enrolamento no colector. Assim, variando o caudal de saída da solução e a velocidade do rolo variam-se também as características da fibra.

Estes passos do processo de fiação húmida podem ser vistos na figura 7, onde é apresentado um esquema generalizado da técnica.

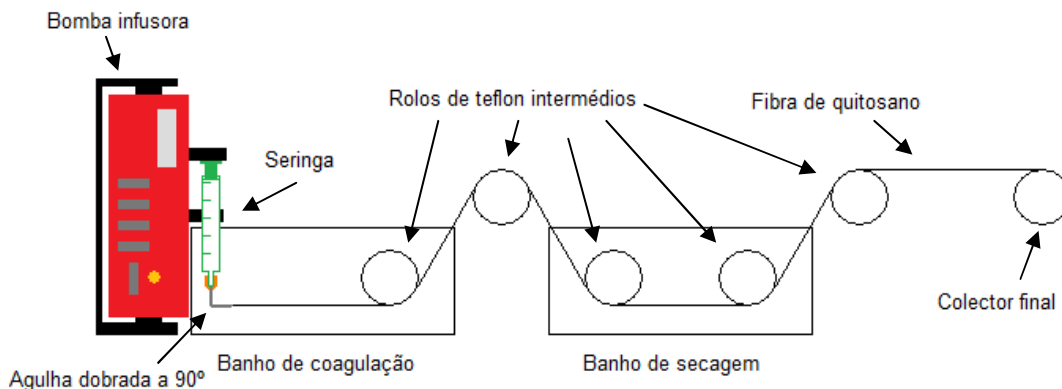


Figura 7 – Esquema generalizado do processo de fiação húmida

Devido à grande adaptabilidade desta técnica, que admite várias mudanças em termos de materiais e de processos, é possível produzir fibras de quitosano para análise física e mecânica, mas também englobar outros materiais com características específicas que irão alterar as propriedades das fibras obtidas. São os chamados aditivos.

1.6. Materiais aditivos

1.6.1. Poli(óxido de etileno) e Polietilenoglicol

O PEO é um homopolímero não iônico composto por unidades de óxido de etileno e representado pela estrutura da figura 8, onde n representa o número de vezes que o grupo oxietileno é repetido.

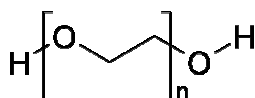


Figura 8 – Estrutura do poli(óxido de etileno)
(http://en.wikipedia.org/wiki/File:Polyethylene_glycol.png)

Geralmente, é apresentado sob a forma de um pó branco e tem características bastante particulares e interessantes (USP 2008).

O PEO é um material que possui um módulo de Young moderado, elevado alongamento e a capacidade de se orientar quando sujeito a tensão. Quimicamente, é de destacar a sua elevada cristalinidade e o facto de ser solúvel em vários solventes, sendo que este factor varia com o seu peso molecular: quanto maior for, mais difícil será dissolver o PEO. Em termos biológicos o poli(óxido de etileno) é biocompatível com o organismo e apresenta uma toxicidade quase nula, o que o torna um biomaterial apetecível.

Entre as suas aplicações a nível industrial contam-se o pó para combate a incêndios e adesivos.

A sua junção ao quitosano é feita de forma a aproveitar as características indicadas de forma a obter fibras com melhores propriedades mecânicas e físicas. Os principais focos de mudança prendem-se com a resistência à tensão e o aumento da cristalinidade da fibra de quitosano (Mohd Nasir et al. 2005, Saboormaleki et al. 2004, Zivanovic et al. 2007).

Tal como o PEO, o PEG também é o resultado da polimerização do óxido de etileno. Apresenta a mesma estrutura do PEO, apresentada na figura 13 e tem propriedades bastante parecidas com este.

A diferença entre os dois prende-se com o peso molecular do polímero: se for abaixo das 20000g/mol, a nomenclatura a utilizar é PEG; se o peso molecular for superior a 20000g/mol,

então é chamado PEO (contudo, é de ressaltar que estes valores variam de autor para autor, sendo também várias vezes utilizado 35000g/mol como valor de separação).

O PEG apresenta características bastante importantes como biomaterial, já que é biocompatível e apresenta uma natureza biodegradável e hidrofílica, o que se torna bastante útil em vários casos (membranas de substituição de pele, por exemplo). É um polímero bastante apreciado a nível farmacêutico, onde é aplicado como excipiente (de líquidos e comprimidos, por exemplo) ou como agente activo (em líquidos oftálmicos, laxantes e soluções de preservação de órgãos).

Tal como o PEO, a finalidade da adição do PEG ao quitosano prende-se com a tentativa de melhoramento das propriedades mecânicas das fibras, sendo que neste caso o parâmetro principal que o polietilenoglicol altera é a ductilidade das fibras (Henning 2002, Kolhe and Kannan 2002).

1.6.2. Glicerol

O glicerol (ou glicerina) é um simples composto orgânico pertencente ao grupo dos álcoois e representado pela fórmula estrutural apresentada na figura 9 que contempla três grupos hidroxilo hidrofílicos, responsáveis pela sua solubilidade em água e pela sua natureza higroscópica (tendência para absorver água).

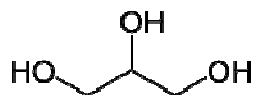


Figura 9 – Estrutura do glicerol (http://en.wikipedia.org/wiki/File:Glycerin_Skelett.svg)

O glicerol é apresentado em forma de um líquido incolor, inodoro e bastante viscoso e a sua utilização prende-se bastante com a indústria farmacêutica, a indústria de cosméticos (sabonetes, por exemplo), a indústria automóvel (como anticongelante) e a indústria de explosivos (é componente da nitroglicerina).

Em termos biológicos, revela-se um bom biomaterial, já que é biocompatível e não tóxico. A sua utilização conjunta com o quitosano deve-se à tentativa de exploração do material como fluidificante: devido à sua elevada viscosidade, o glicerol confere uma maior ductilidade às fibras onde é aplicado (David and Henry 1996).

2. PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

2.1. Produção de fibras de quitosano por fiação húmida

2.1.1. Preparação das soluções de quitosano

Foram preparadas seis soluções de CS com três concentrações diferentes (2%, 3% e 4% (m/m)) e com dois pesos moleculares diferentes (large (L) e medium (M)). Todas foram dissolvidas numa solução de ácido acético a 2% (v/v).

▪ **Material**

- Quitosano (CS): Sigma-Aldrich, *large molecular weight* (L) e *medium molecular weight* (M);
- Ácido acético glacial (CH₃COOH): Panreac, p.a.=99,7%;
- Água destilada: a partir do destilador do laboratório.

O procedimento experimental seguido encontra-se descrito no anexo A1.

2.1.2. Preparação do banho de coagulação

Foi utilizado um banho de coagulação de 70% hidróxido de sódio (NaOH) a 1M e 30% metanol (CH₃OH) e o procedimento referido no anexo A2.

▪ **Material**

- Hidróxido de sódio (NaOH): EKA, lote 190609;
- Metanol (CH₃OH): Valente & Ribeiro Lda.;
- Água destilada: Auchan, pH=5-7.

2.1.3. Preparação dos banhos de secagem

Foi protocolado fazer três banhos de secagem seguidos, com diferentes tempos de residência: 1h na própria solução coagulante **(1)**, 3h numa solução de 50% metanol e 50% água destilada **(2)** e 24h numa solução de 100% metanol **(3)**.

2.1.4. Montagem experimental

Foi utilizada a montagem da figura 10, que consiste no seguinte material:

- Bomba infusora: New Era Pump Systems Inc.;
- Seringa: volume de 3ml com diâmetro interno de 9,43mm;
- Agulha: de calibre 23, com diâmetro interno de 0,330mm e diâmetro externo 0,6414mm, dobrada a 90° de forma a não ter estreitamentos;
- Tina de alumínio para banho de coagulação: dimensões 40cm x 15cm x 3cm;
- Fonte de alimentação: Agilent U8001A, Agilent Technologies;
- Motor e eixo de rotação;
- Colector: rolo cilíndrico de teflon de 6cm de diâmetro e 6cm de comprimento;
- Taças para banhos de secagem: feitas em vidro e de formato cilíndrico.



Figura 10 – Fotografia da montagem experimental para fiação húmida

O procedimento de fiação húmida encontra-se detalhado no anexo A3.

2.1.5. Secagem das fibras ao ar

Após os banhos de secagem, as fibras foram colocadas a secar ao ar, para evaporar o metanol e a água que possuem no seu interior. Assim, foi utilizado um esquema que consiste numa placa de esferovite com pregos: corta-se um pedaço de fibra, dá-se um nó numa das

extremidades para que fique presa a um prego e seguidamente estica-se na placa para ficarem a secar sob tensão, prendendo a outra extremidade com outro prego. Foi repetido este procedimento para várias porções de fibra e para todos os tipos produzidos.

Nesta parte do trabalho foram produzidos vários tipos de fibras para serem caracterizados em termos de propriedades mecânicas. Estes estudos consistiram na medição dos diâmetros das fibras e posterior submissão a ensaios de tracção. Resolveu-se apenas variar um parâmetro de cada vez, para se ter um termo de comparação bastante fiável. Assim, variou-se o peso molecular do quitosano entre L e M, sendo que para este último se variou a velocidade de enrolamento da fibra. Esta variação foi efectuada atendendo à equação que relaciona a tensão aplicada no motor e a velocidade de rotação do rolo:

$$V = 4,25 \times T^{-0,73},$$

onde V representa a tensão (em volt) e T representa o período de rotação (em segundos).

Sabendo que o diâmetro interno da agulha utilizada é de 0,330mm e adoptando um caudal, ϕ , de 20ml/h, pode-se calcular a velocidade de saída da solução pela equação

$$\phi = \pi \times r^2 \times v_{\phi} \Leftrightarrow v_{\phi} = \frac{\phi}{\pi \times r^2} \Leftrightarrow v_{\phi} = \frac{20\text{cm}^3/3600\text{s}}{\pi \times (0,0330/2)^2} \Leftrightarrow v_{\phi} = 6,5\text{cm/s}.$$

Decidiu adoptar-se uma velocidade de enrolamento um pouco superior à velocidade de saída, de forma a imprimir uma tensão aceitável sobre a fibra. Assim, escolheu-se um factor de 1,35X, ou seja,

$$v_{\text{rolo}} = 1,35 \times v_{\phi} \Leftrightarrow v_{\text{rolo}} = 1,35 \times 6,5 = 8,775\text{cm/s}.$$

Pela definição de período de rotação tem-se

$$T = \frac{2\pi r_{\text{rolo}}}{v_{\text{rolo}}} \Leftrightarrow T = \frac{2\pi \times 3}{8,775} \Leftrightarrow T = 2,15\text{s}$$

que corresponde ao período de rotação que se quer imprimir no colector. Finalmente, recorrendo à primeira equação apresentada, tem-se que

$$V = 4,25 \times T^{-0,73} \Leftrightarrow V = 4,25 \times 2,15^{-0,73} \Leftrightarrow V = 2,43\text{V}$$

Esta tensão será a necessária para colocar o colector a rodar 1,35 vezes mais rápido que a velocidade de saída do quitosano. Para facilitar a análise, esta será denominada velocidade base, v_b .

As restantes tensões aplicadas são 2,88V, que corresponde a 1,7 vezes a velocidade de saída e 3,24V, que corresponde a duas vezes a velocidade de saída e tende para a tensão

máxima que a fibra aguenta sem partir. Nestas duas velocidades foi utilizada a nomenclatura $V_{1,7}$ e $V_{máx}$, respectivamente.

2.1.6. Medição do diâmetro das fibras

Após estarem totalmente secas, as fibras foram cortadas em pedaços de aproximadamente 3cm de comprimento. Para se obter um valor com significado estatístico, foram preparadas 25 amostras. Os seus diâmetros foram medidos com um micrómetro digital (*Mitutoyo*, 0-25mm, 0.001mm), com o cuidado de não esmagar a fibra e os valores foram registados. Seguidamente, colaram-se as amostras com uma tira de fita-cola numa das extremidades numa folha de cartolina preta para as guardar e submeter posteriormente aos testes de tracção.

2.1.7. Testes de tracção

Para a realização destes testes foi utilizada a máquina de tracção existente no Departamento de Ciências dos Materiais da FCT-UNL, que funciona com uma célula de carga de 20N e é operada a partir de um computador com o software *Minimat*.

Foi colocada e presa uma amostra de cada vez entre as garras da máquina e a partir do computador procedeu-se aos testes de tracção.

2.2. Optimização da técnica de fiação húmida e caracterização das fibras de quitosano produzidas

De forma a otimizar, em termos de propriedades mecânicas, as fibras produzidas, testaram-se várias combinações de aditivos à solução de quitosano e variações de temperatura no banho de coagulação. O processo seguido é idêntico ao descrito anteriormente, variando apenas nos seguintes aspectos: após as conclusões dos primeiros estudos, optou-se pela utilização de quitosano de peso molecular médio (M), numa concentração de 3% (m/m) e usou-se um banho de coagulação 100% hidróxido de sódio a 1M.

2.2.1. Secagem das fibras ao ar

Para encontrar a melhor forma de secar as fibras testaram-se três combinações: a montagem já referida da esferovite com os pregos (1); deixar as fibras a secar numa folha de

acetato esticadas e com as pontas coladas com fita-cola **(2)**; dispor as fibras em acetato livremente, sem tensão **(3)**.

2.2.2. Preparação das soluções de quitosano e PEO

Foi adicionado ao quitosano um polímero para estudar o seu efeito na estrutura e resistência das fibras produzidas. Escolheu-se o poli(óxido de etileno) de massa molecular elevada – PEO. Assim, foram preparadas soluções de 3% (m/m) quitosano e 0.3% (m/m) PEO, de massa molecular 5M e 8M, dissolvidas em ácido acético a 2% (v/v) e seguido o protocolo em anexo (anexo A4).

▪ Material

- Quitosano (CS): Sigma-Aldrich, *medium molecular weight* (M);
- Poli(óxido de etileno) 5M (PEO 5M): Sigma-Aldrich, ref. 189472-250G;
- Poli(óxido de etileno) 8M (PEO 8M): Sigma-Aldrich, ref. 372838-250G;
- Ácido acético glacial (CH₃COOH): Panreac, p.a.=99,7%;
- Água destilada: Auchan, pH=5-7.

2.2.3. Preparação do banho de coagulação

Foi utilizado o procedimento já referido, suprimindo o último passo que diz respeito à mistura com metanol. Aqui o banho consiste apenas na solução de NaOH a 1M.

2.2.4. Montagem e procedimento experimental

Novamente, o protocolo seguido é idêntico ao referido anteriormente. Em termos de secagem ao ar, optou-se por colocar as fibras a secar na folha de acetato.

Para além dos testes de tracção feitos, realizou-se também um teste de fibras com um nó no meio e produziram-se amostras para realizar espectroscopia de infra-vermelhos por transformada de Fourier (FT-IR) e microscopia óptica de varrimento (SEM).

2.2.5. FT-IR

A espectroscopia de infra-vermelhos baseia-se no facto de as ligações químicas das substâncias terem frequências de vibração específicas, às quais correspondem diferentes níveis de energia da molécula. Se esta receber radiação electromagnética com a mesma energia de uma das vibrações, a luz será absorvida. Ao criar espectros de absorção para o quitosano e para o PEO em pó, obtém-se um termo de comparação com os espectros das misturas produzidas, podendo assim comparar os picos característicos de cada amostra e perceber de que modo a adição de um novo composto (PEO) ao quitosano o irá influenciar em termos de absorção de luz.

Na técnica utilizada, por transformada de Fourier, utiliza-se um feixe IV (com todos os comprimentos de onda da faixa utilizada), direccionado através de um interferómetro. Ao sinal medido chama-se interferograma e será este que irá sofrer uma transformada de Fourier para assim resultar um espectro de absorção de IV.

Esta técnica tem como vantagens (em comparação com os espectrofotómetros convencionais) ser mais barata e bastante mais rápida.

Para obter os espectros de absorção utilizaram-se dois espectrofotómetros diferentes: um do departamento de Química (DQ) e outro do CENIMAT/I3N, ambos na FCT-UNL. Enquanto o primeiro utiliza um sistema de pastilhas de brometo de potássio (KBr), o segundo faz a leitura num molho de fibras. Foram obtidos espectros de absorção para o quitosano, para os dois tipos de PEO e para as fibras resultantes da mistura. O procedimento para produzir as pastilhas de KBr é apresentado no anexo A5.

2.2.6. SEM

Foi utilizada a técnica da microscopia electrónica de varrimento para analisar as superfícies das fibras obtidas de quitosano, quitosano com PEO 5M e quitosano com PEO 8M.

Esta técnica consiste na emissão de electrões por um cátodo aquecido de tungsténio, que são acelerados e projectados contra o alvo. Ao colidir com a amostra, este feixe de electrões provoca a emissão de electrões secundários, passíveis de ser registados por um detector adequado. Seguidamente, através de processos computacionais, a corrente detectada é convertida numa intensidade e os resultados apresentados sob a forma de imagem.

O procedimento seguido implica cortar pedaços de fibra de aproximadamente 1cm, colocá-los na placa de SEM (disco metálico) sobre fita condutora de carbono dupla face para posteriormente sofrerem um revestimento fino de ouro, que contribui para diminuir a acumulação de cargas e para aumentar o contraste da imagem.

Espera-se assim perceber como é a superfície de uma fibra de quitosano bem como as alterações resultantes da mistura com o PEO.

Foi utilizado o aparelho Zeiss DSM-962 (pertencente ao CENIMAT/I3N).

2.2.7. Preparação das soluções de quitosano e glicerol, quitosano e PEG, quitosano em ácido láctico e banhos aquecidos

Devido a limitações do stock existente, a partir deste ponto passou a ser utilizado o quitosano da *Cognis*, de baixo peso molecular (S). Para além desta mudança, decidi abreviar-se os banhos de secagem. Assim, atendendo aos resultados obtidos por estudos feitos aos banhos (João 2010), optou-se por um único banho de secagem que consistia em 100% metanol.

Foi preparada uma solução de quitosano a 3% (m/m) dissolvido em ácido acético a 2% (v/v) para servir de base de comparação e foram testadas várias variantes para se obter conclusões concretas do efeito de determinados factores nas propriedades das fibras.

O primeiro parâmetro de estudo consiste na adição de um plastificante – glicerol – e de outro polímero – polietilenoglicol à solução de quitosano. Foram preparadas uma solução de quitosano a 3% com glicerol a 0,3% (m/m) dissolvida em ácido acético a 2% (v/v) e uma solução de quitosano a 3% (m/m) com PEG de massa molecular 300 a 0,3% (m/m) dissolvida em ácido acético a 2% (v/v).

Seguidamente, variou-se o solvente utilizado. Assim, fez-se uma solução de quitosano a 3% (m/m) dissolvida em ácido láctico a 2% (v/v).

O último parâmetro a variar foi a temperatura do banho de coagulação. Este estudo foi feito para as soluções acima referidas (exceptuando a de PEG) e consistiu em colocar uma placa de aquecimento sob a tina de alumínio com o banho de coagulação, para que este atingisse uma temperatura entre 42°C e 45°C (medida com um termómetro digital (*Testo 720*)).

▪ Material

- Quitosano (CS): *Cognis*, *small molecular weight* (S), lote 0070045718;
- Polietilenoglicol 300 (PEG 300): Merck-Schuchardt, art. 807484;
- Glicerol (C₃H₈O₃): Steripan, lote 039A;
- Ácido láctico (C₃H₆O₃): Prolabo, p.a.=90%;
- Ácido acético glacial (CH₃COOH): Panreac, p.a.=99,7%;
- Água destilada: Auchan, pH=5-7.

O procedimento geral para a preparação das soluções referidas encontra-se descrito no anexo A6.

Estas soluções seguiram o protocolo normal de fiação, apenas alterado com a introdução do factor temperatura em metade dos testes. A montagem referente a essa mudança está apresentada na figura 11, onde é visível o termómetro montado para o controlo de temperatura.



Figura 11 – Fotografia da montagem experimental para fição húmida com a adição de um termómetro para controlo de temperatura

No total, produziram-se sete tipos diferentes de fibras, indicados na tabela 4. Todas estiveram sujeitas ao banho de secagem de 100% metanol durante a noite e seguidamente colocadas em folhas de acetato bem identificadas a secar ao ar sob tensão. Mais uma vez, mediram-se os diâmetros de várias amostras de cada tipo de fibra e realizaram-se testes de tracção.

Tabela 4 – Soluções preparadas para os testes de optimização da técnica de fição húmida (a.a. – ácido acético; a.l. – ácido láctico; b.a. – banho aquecido)

Designação	Quitosano (percentagem)	Solvente e percentagem	Aditivo e percentagem	Aquecimento do banho
CS S a.a.	3%	Ácido acético 2%		
CS S + Glicerol	3%	Ácido acético 2%	Glicerol 0,3%	
CS S a.l.	3%	Ácido láctico 2%		
CS S a.a. (b.a.)	3%	Ácido acético 2%		42°C-45°C
CS S + Glicerol (b.a.)	3%	Ácido acético 2%	Glicerol 0,3%	42°C-45°C
CS S a.l. (b.a.)	3%	Ácido láctico 2%		42°C-45°C
CS S + PEG 300	3%	Ácido acético 2%	PEG 0,3%	

2.3. Estudo da re-hidratação, perda de massa e pH das fibras produzidas

Para o posterior fabrico de matrizes compostas pelas fibras de quitosano produzidas, foi necessário compreender qual o seu comportamento em termos de pH e de secagem/re-hidratação.

Escolheram-se quatro tipos de fibras ilustrativas das combinações já trabalhadas: quitosano a 3% (m/m) dissolvido em ácido acético a 2% (v/v) **(I)**; quitosano a 3% (m/m) e PEG 300 a 3% (m/m) dissolvidos em ácido acético a 2% (v/v) (decidiu aumentar-se a concentração de aditivo para assim maximizar os seus efeitos) **(II)**; quitosano a 3% (m/m) em ácido láctico a 2% (v/v) **(III)**; e finalmente uma repetição da terceira solução, mas com o banho de coagulação aquecido entre 42°C e 45°C **(IV)**.

Não foram feitas mudanças no protocolo de fiação seguido anteriormente.

Após a fiação, as fibras foram deixadas durante a noite num banho de 100% metanol. Seguidamente, foram colocadas numa placa de acrílico (para não colar) e introduzidas na estufa a 30°C para secar completamente, o que aconteceu ao fim de dois dias. Foram então mergulhadas num banho de água destilada durante um dia para voltar a hidratar.

Este ciclo de secagem/re-hidratação foi repetido mais duas vezes.

2.3.1. pH

De forma a estudar a variação do pH das fibras produzidas utilizou-se o medidor digital de pH existente no laboratório (*Hanna Hi 4521*) e recolheram-se três valores: o primeiro para as fibras após a re-hidratação inicial e os restantes para a segunda e terceira re-hidratações correspondentes aos três ciclos de secagem/re-hidratação executados.

2.3.2. Perda de massa

Os testes feitos para perceber a perda de massa relativa à secagem das fibras corresponderam a pesagens em pontos fulcrais dos ciclos efectuados: registaram-se os valores das massas após as fibras saírem da estufa completamente secas e após um dia mergulhadas em água (com o cuidado de eliminar o excesso recorrendo a papel absorvente). Estas medições repetiram-se para o segundo e terceiro ciclos de secagem/re-hidratação.

2.3.3. Testes de tracção

Para além das fibras produzidas para os testes acima referidos, também se fiou uma porção de fibra para ser submetida a testes de tracção após re-hidratação.

Foi escolhida a solução **IV**, visto ter as melhores características mecânicas. As fibras foram colocadas primeiramente no banho de 100% metanol e secas ao ar numa folha de acetato. De seguida, os pedaços foram cortados e mergulhados durante 5 minutos numa tina com água destilada. Foram novamente colocados a secar ao ar, mas desta vez nos pinos de uma placa de circuito impresso (visto que ao passar por água as fibras colam ao acetato). Finalmente, foram preparadas amostras da maneira já referida (cortes de 3cm, medição de diâmetros) e feitos os testes de tracção.

2.4. Produção de uma matriz com fibras de quitosano

O passo seguinte consistiu em criar uma estrutura tridimensional com as fibras que demonstraram ter melhores propriedades mecânicas: CS a 3% em ácido láctico a 2%, com um banho de coagulação aquecido entre 42°C e 45°C.

Foi seguido o protocolo indicado no anexo A7 para a produção de matrizes tridimensionais que consistiam em três camadas distintas de fibras sobrepostas e alinhadas com um desfasamento de 90° entre cada uma.

2.5. Culturas celulares

Feitas as matrizes, procedeu-se ao estudo da viabilidade das mesmas como material para cultura celular. Para isso, foi necessário realizar testes de proliferação de células e morfologia.

Nestes estudos utilizaram-se células HFFF2 (*human caucasian foetal foreskin fibroblasts*), ou seja, fibroblastos de origem humana. Estas células têm um aspecto afilado (na figura 12 pode-se confirmar isso mesmo) e um tempo de vida finito. Em meio de cultura (DMEM + *glutamax* + 10% FBS + penicilina estreptomomicina 1:100) espalham-se pela superfície onde estão, sendo “retiradas” ao adicionar tripsina, uma enzima que hidrolisa as proteínas intercelulares responsáveis pela aderência das células à superfície. As células tomam então uma forma arredondada e descolam da superfície. A este processo dá-se o nome de passagem. As células que chegaram ao laboratório já tinham sofrido cinco passagens, por isso diz-se que estavam em P5. Como foram enviadas congeladas, foi necessário proceder a um tratamento inicial de descongelamento e contagem (recomendado pelo ECACC). Posteriormente foram armazenadas em frascos T75 e novamente congeladas (já em P6), para

ser mais fácil o seu manuseamento (Freshney 2005, Freshney 2006, Fisher, Mikos and Bronzino 2006).

Estes procedimentos foram realizados nos laboratórios da FCUL, em colaboração com a Dra. Gabriela Rodrigues e com o Dr. Gabriel Martins, ambos docentes do DBA da FCUL. As soluções utilizadas encontram-se em stock, preparadas pelos responsáveis dos laboratórios.

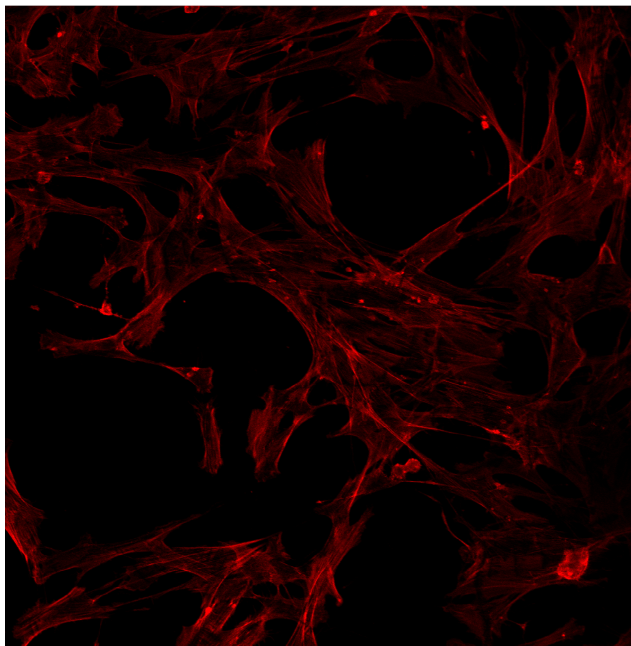


Figura 12 – Imagem das HFFF2 obtida através de microscópio confocal (gentilmente cedida pela Engenheira Ana Espiga)

2.5.1. Recta de calibração

Para uma maior facilidade em termos de contagem de células, foi utilizado um kit de crescimento – CCK8.

Esta solução consiste num sal – WST-8 – que produz um corante aquando da sua redução na presença de transportadores de electrões provenientes do metabolismo celular. Assim, ao ser adicionado às culturas, este kit vai alterar a sua cor consoante a quantidade de células presente na amostra. Como cada cor absorve um comprimento de onda específico, as amostras podem ser lidas num espectrofotómetro equipado com um suporte específico e através do programa de computador *XRead Plus*.

Ao ligar os valores de absorvância com números conhecidos de quantidade de células, foi possível criar duas rectas de calibração para as HFFF2: a primeira para absorvâncias com valor inferior a 0,4 e a segunda a partir deste valor. Isto deve-se ao facto de existirem dois padrões distintos de crescimento, um para um pequeno número de células e outro para uma grande quantidade de células.

As células utilizadas foram descongeladas previamente para estarem prontas a utilizar no espaço de tempo pretendido de acordo com o protocolo em anexo (anexo A8), realizado em meio estéril e em câmara de fluxo horizontal.

2.5.2. Preparação das matrizes

Com a recta de calibração das HFFF2 feita, foi possível partir para os testes *in vitro* nas matrizes produzidas.

A preparação das matrizes consistiu no processo descrito no anexo A9.

2.5.3. Testes de proliferação

Estes testes foram feitos numa placa de 96 poços. Semearam-se no total 21 poços: três réplicas de meio com material e células para 24, 48 e 72 horas; três réplicas de meio com células mas sem material para 24, 48 e 72 horas e um controlo branco (meio com material e sem células) para 24, 48 e 72 horas.

Após várias passagens para mudança de meio, as células utilizadas estavam em P10 e armazenadas num T25. Foram semeadas 10000 células em cada poço e seguido o procedimento apresentado no anexo A10.

2.5.4. Morfologia

Os testes morfológicos consistem em fixar e corar as culturas para serem observadas no microscópio confocal e SEM.

Para confocal o fixador utilizado é o paraformaldeído (PFA). Quanto a corantes, recorreu-se a dois tipos: o primeiro corante utilizado foi o TO-PRO3, que se liga ao ADN e o ARN das células, emitindo a 600nm (o que corresponde a um vermelho alaranjado). Como só interessa corar o ADN, tem de se utilizar em conjunto com uma enzima que degrade o ARN – a RNase. O segundo corante utilizado foi a faloidina, um fluorocromo proveniente dos cogumelos *Amanita phalloides* que realça o citoesqueleto da célula, tornando-o verde ao microscópio.

Para SEM, o fixador escolhido é o glutaraldeído e não se aplicam corantes.

Para uma maior visibilidade resolveu utilizar-se placas de 24 poços. Como os testes de morfologia e de proliferação decorreram ao mesmo tempo, as células utilizadas são as mesmas em P10. Também para a morfologia se semearam 10000 células por poço.

O protocolo para semear as células é o mesmo que foi realizado para os testes de proliferação, tendo o cuidado de adequar o valor do volume de suspensão a utilizar de acordo com a nova área do poço (anexo).

Para fixar e corar o protocolo seguido está descrito nos anexos A11 (fixação para confocal) e A12 (fixação para SEM).

2.6. Modelo contínuo de fiação húmida

De forma a facilitar todo o processo de fiação húmida, foi projectado um modelo contínuo que permite a passagem sem interrupções da fibra pelo banho de coagulação e pelo banho de secagem.

Foi utilizada uma base de perfis de alumínio da empresa *Rose-Krieger* e outros componentes importantes para o esquema. A lista completa dos materiais utilizados é descrita na tabela 5 e um esquema tridimensional do projecto elaborado, bem como os principais alçados (feitos através do programa *Solidworks*) são apresentados na figura 13.

A figura 14 representa o modelo já montado.

Tabela 5 – Lista de material utilizado no modelo contínuo de fiação húmida

Material	Quantidade
Perfil de alumínio s-30x30	8 metros
Conexões para ligação de perfis	16
Pés	4
Tampas	14
Conexões circulares	12
Bomba infusora	1
Motores	4
Rolos de teflon	6
Veios de motor	6
Rodas dentadas	2
Correias de transmissão	2
Placas de acrílico	3
Resistência 10 Ω	1
Resistência 5 Ω	3
Resistência 1 Ω	1

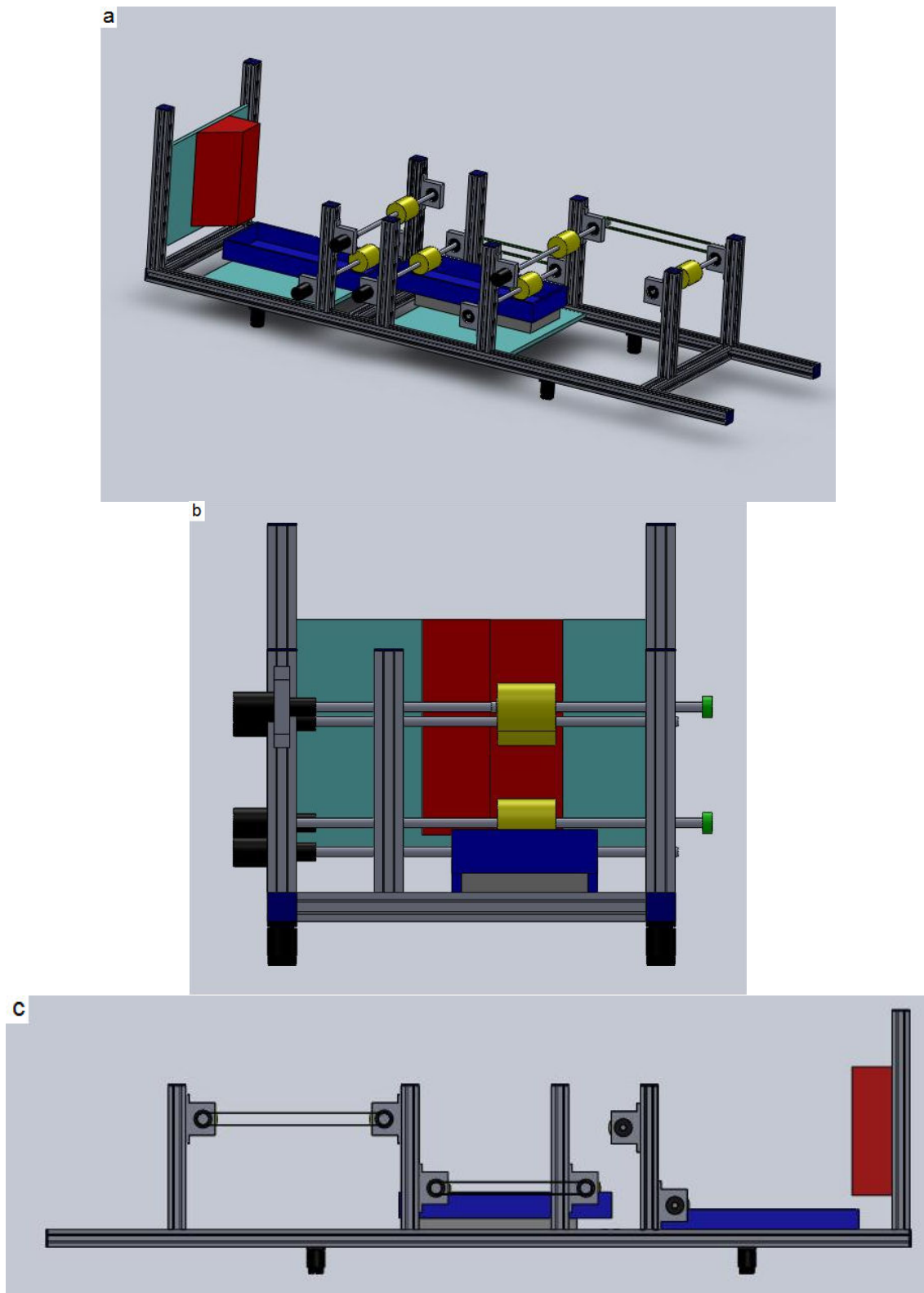


Figura 13 – Esquemas feitos no programa Solidworks para o modelo contínuo de fiação húmida construído – a) vista tridimensional; b) alçado principal; c) alçado lateral

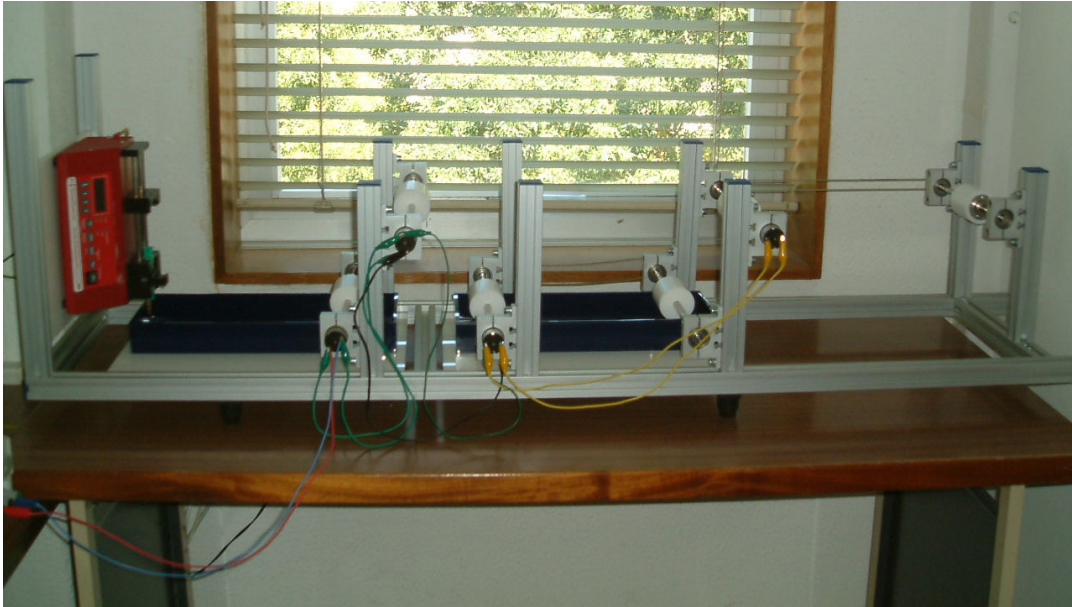


Figura 14 – Fotografia do modelo contínuo de fiação húmida projectado e montado

Devido às diferentes cargas exercidas sobre os motores, não se conseguiu inicialmente colocá-los à mesma velocidade. Para tal acontecer foi necessário aplicar resistências aos motores que rodavam mais rápido para assim fazer baixar a sua velocidade, numa aplicação simples da lei de Ohm. Com este intuito, ligaram-se duas resistências de 5Ω (de modo a perfazer 10Ω mas conseguir dissipar mais potência) ao primeiro e segundo rolos de teflon e uma resistência de 5Ω e outra de 1Ω (a perfazer 6Ω) ao terceiro rolo de teflon.

Desta forma, conseguiu-se colocar os motores a rodar todos à mesma velocidade e produzir fibras correctamente (apesar de esta associação de resistências ser apenas temporária, já que elas não resolvem o problema permanentemente).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Estudos preliminares

3.1.1. Quitosano M e L a diferentes concentrações

Foram preparadas soluções de CS M – *medium molecular weight* e L – *large molecular weight* nas concentrações de 2%, 3% e 4%. Os resultados das soluções obtidas são apresentados na tabela 5.

Tabela 6 – Resultado das soluções de CS M e L com diferentes concentrações

Tipo de quitosano	Concentração	Resultado
M	2%	Pouco viscosa mas viável para fiação
	3%	Viável
	4%	Muito viscosa e com muitas bolhas. Inviável
L	2%	Pouco viscosa mas viável para fiação
	3%	Viável
	4%	Muito viscosa e com muitas bolhas. Inviável

Como podemos observar, as soluções de CS a 4% tornam-se bastante viscosas. Esta particularidade leva ao aparecimento de bolhas depois da agitação. Tentaram-se eliminar as bolhas utilizando uma bomba de vácuo ligada a um tubo com uma agulha na extremidade. Contudo, verificou-se que após este tratamento a massa da solução diminuía consideravelmente. Assim, resolveu-se abandonar esta concentração.

Para as soluções de CS a 2% foi possível produzir fibras, mas devido à pequena concentração de polímero e conseqüente diminuta viscosidade, as fibras obtidas revelaram-se bastante frágeis e quebradiças, tornando-se muito difícil conseguir pedaços aceitáveis para testes mecânicos. Esta concentração também foi abandonada.

As soluções de CS a 3% para além de serem viáveis para fiar produzem fibras muito aceitáveis para trabalhar.

Destes estudos pode-se concluir que existe uma concentração ótima de quitosano para fiação húmida, que permite obter fibras estruturalmente sólidas e resistentes o suficiente para os testes posteriores. Esta concentração ronda os 3% de CS e não pode variar muito (menos de uma unidade) trabalhando com pequenas massas de solução.

Os restantes estudos foram feitos para esta concentração.

3.1.2. Quitosano M e L a 3%

Foram calculados os diâmetros e os módulos de Young a partir de grupos de 25 amostras tanto para a solução de CS M a 3% como para CS L a 3%. Os valores obtidos para os dois tipos de fibra são apresentados seguidamente nas tabelas 6 e 7. Os valores foram arredondados às unidades para uma melhor compreensão. No anexo C (módulos de Young e tensão de ruptura das fibras) explica-se o cálculo do módulo de Young.

Tabela 7 – Diâmetro para fibras de CS M e L a 3%

Tipo de quitosano	Diâmetro / μm	Desvio padrão / μm	Desvio padrão em %
M	71	3	4
L	74	6	9

Tabela 8 – Módulo de Young de fibras de CS M e L a 3%

Tipo de quitosano	Módulo de Young / MPa	Desvio Padrão / MPa	Desvio Padrão em %
M	9033	1532	17
L	3240	872	27

A partir dos resultados obtidos podemos tirar várias conclusões: em primeiro lugar, analisando os diâmetro das fibras conclui-se que não existe grande diferença entre as que foram produzidas com CS M e CS L.

Em relação aos módulos de Young é possível observar uma enorme diferença de valores consoante o peso molecular do CS utilizado: para o peso molecular médio o módulo de Young quase triplica em relação ao peso molecular elevado. Isto pode dever-se ao facto de o CS L ter moléculas muito maiores e como tal para a mesma concentração em peso de polímero a cadeia não é tão protonada, o que levará a uma solubilidade mais baixa. Desta forma, as soluções devem possuir microgéis que vão fazer com que a fibra não seja totalmente homogénea (à micro-escala). Esta particularidade tem reflexos dramáticos nas propriedades mecânicas das fibras, como se constata pelos valores obtidos.

Assim, depois deste estudo, decidiu-se que é bastante vantajoso utilizar o quitosano de massa molecular média, pois as características mecânicas das fibras obtidas são as melhores.

3.1.3. Quitosano M a várias velocidades de enrolamento

Este estudo foi focado na velocidade de enrolamento do colector, o que foi conseguido alterando a tensão de alimentação do motor. Foram produzidas fibras de CS a 3% com uma velocidade 1,35 vezes superior à de saída do líquido (v_b – velocidade base), 1,7 vezes superior à saída do líquido ($v_{1,7}$) e com uma velocidade duas vezes superior à velocidade de saída e que se aproxima do limite de ruptura ($v_{\text{máx}}$)

Os resultados de diâmetros e módulos de Young são apresentados nas tabelas 8 e 9 e nos gráficos 1 e 2.

Tabela 9 – Diâmetro de fibras de CS M a 3% a diferentes velocidades

Velocidade	Diâmetro / μm	Desvio padrão / μm	Desvio padrão em %
v_b	71	3	4
$V_{1,7}$	65	5	8
$v_{\text{máx}}$	57	6	10

Tabela 10 – Módulo de Young de fibras de CS M a 3% a diferentes velocidades

Velocidade	Módulo de Young / MPa	Desvio padrão / MPa	Desvio padrão em %
v_b	9033	1532	17
$V_{1,7}$	7905	1931	24
$v_{\text{máx}}$	9438	3356	36

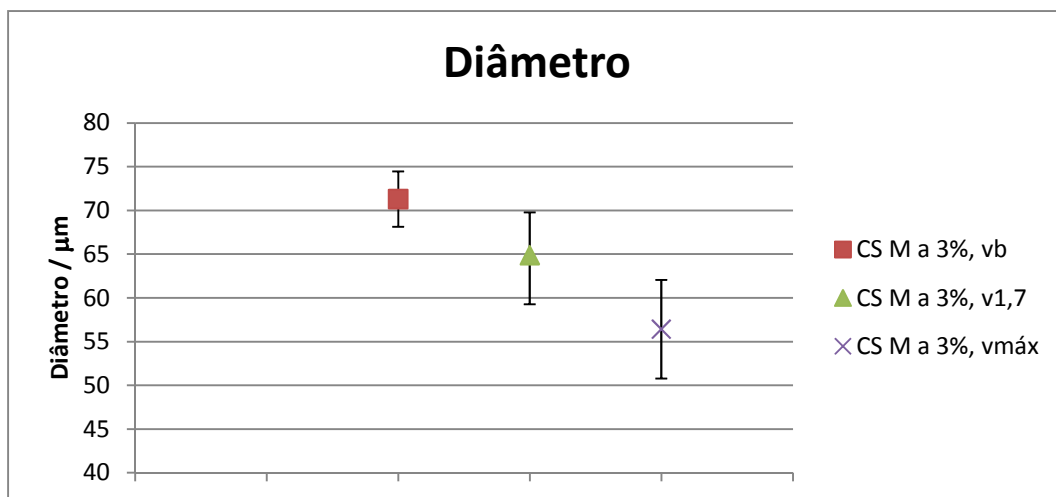


Gráfico 1 – Diâmetro de fibras de CS M a 3% a várias velocidades

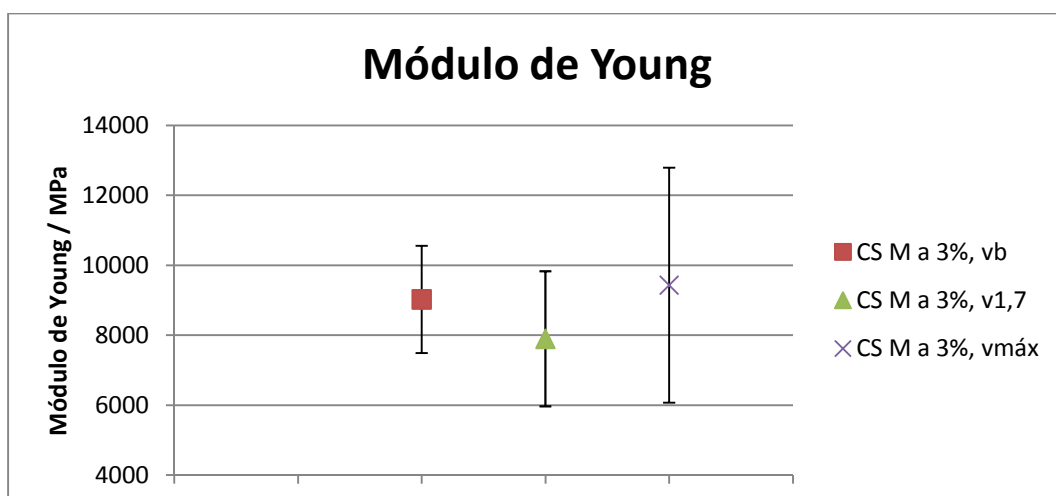


Gráfico 2 – Módulo de Young de fibras de CS M a 3% a diferentes velocidades

Deste estudo concluímos que a velocidade de enrolamento vai influenciar as propriedades físicas e mecânicas das fibras.

Em termos de diâmetro, é notório o decréscimo de valores à medida que se aumenta a tensão de alimentação e conseqüentemente a velocidade do colector. Como a fibra é enrolada com maior velocidade, fica sujeita a uma maior tensão (visto que o caudal se mantém inalterado). O resultado físico traduz-se numa diminuição do diâmetro.

Para os valores médios calculados de módulo de Young, existe um decréscimo para $v_{1,7}$ mas um aumento para $v_{máx}$, o que representa resultados contraditórios. Tendo em conta que estes valores têm um desvio padrão bastante elevado, o conjunto de dados foi submetido a testes de *t-Student* para avaliar a probabilidade de os valores serem idênticos.

Em relação a v_b e a $v_{1,7}$ obteve-se $p=5,3\%$, na comparação entre $v_{1,7}$ e $v_{máx}$ o resultado foi $p=5,6\%$ e para v_b e $v_{máx}$ a probabilidade obtida é de $p=58,8\%$. Analisando as diferenças entre os módulos de Young à luz destes resultados, nota-se claramente que não são estatisticamente significativas, visto que a probabilidade dos valores comparados serem iguais é sempre superior a 5%. Assim, a partir dos valores recolhidos, não se pode concluir nada acerca do aumento ou diminuição do módulo de Young, visto existir uma probabilidade considerável dos valores serem idênticos.

Apesar disto, é crível que a velocidade de enrolamento e conseqüente tensão aplicada tenha uma ligeira influência nas propriedades mecânicas das fibras produzidas, pois uma maior tensão pode conferir melhores propriedades mecânicas à fibra. Neste caso, atendendo aos desvios padrão associados e aos testes de *t-Student*, não se pode garantir para estes dados que a velocidade de enrolamento tenha tido grande efeito na fibra.

Reciprocamente, o caudal também poderá influenciar, pois este parâmetro controla a velocidade de saída de solução: mais fibra a ser produzida em menos tempo leva a uma menor tensão aplicada pelo colector.

A partir deste estudo resolveu adoptar-se a velocidade base v_b (que corresponde a uma tensão de 2.43V) como a mais apropriada.

3.1.4. Secagens

Foram produzidas fibras de CS a 3% e deixadas a secar de três maneiras diferentes: montagem de esferovite com pregos e folha de acetato com e sem tensão. Seguidamente, foram feitos testes de tracção a amostras dessas fibras com o intuito de concluir sobre o melhor método de secagem. Os resultados são apresentados nas tabelas 10 e 11 e nos gráficos 3 e 4.

Tabela 11 – Diâmetro de fibras sujeitas a diferentes tipos de secagem

Tipo de secagem	Diâmetro / μm	Desvio padrão / μm	Desvio padrão em %
Acetato	80	2	2
Esferovite	80	4	4
Sem tensão	84	3	3

Tabela 12 – Módulo de Young de fibras sujeitas a diferentes tipos de secagem

Tipo de secagem	Módulo de Young / MPa	Desvio padrão / MPa	Desvio padrão em %
Acetato	5888	832	14
Esferovite	6286	751	12
Sem tensão	5203	1099	21

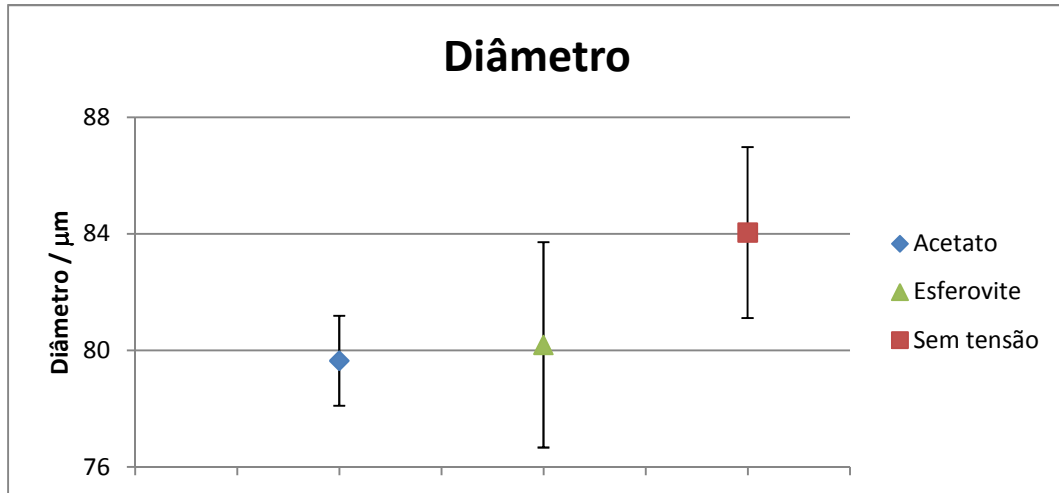


Gráfico 3 – Diâmetros de fibras sujeitas a diferentes tipos de secagem

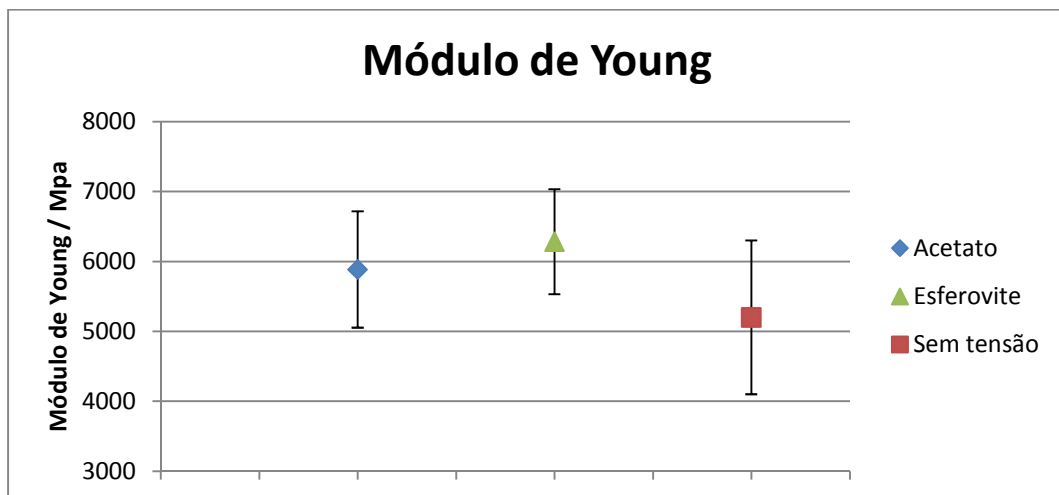


Gráfico 4 – Módulos de Young de fibras sujeitas a diferentes tipos de secagem

Em termos da forma de secagem das fibras este estudo permite tirar algumas conclusões.

Para começar, vê-se que as fibras que foram secas sem tensão aplicada têm um diâmetro médio maior mas um módulo de Young médio menor. Isto deve-se ao facto de, ao não ser aplicada tensão, as fibras estão livres de, ao secar, contrair em qualquer dimensão, não ganhando uma estrutura bem orientada e sofrendo assim um decréscimo das suas características mecânicas. Daqui se pode concluir que a secagem sob tensão é um factor extremamente importante a ter em conta para produzir boas fibras.

Comparando as fibras secas em acetato e na esferovite, conclui-se que são bastante idênticas. Em termos de diâmetro a diferença é decimal apenas (apesar de o desvio padrão do segundo ser bastante maior, o que se poderá dever à má fixação dos pregos ou a alguma falha no nó dado pela fibra no prego) e em relação ao módulo de Young o sistema da esferovite apresenta um valor médio um pouco superior. Analisando os valores através do teste de *t-Student*, obtém-se uma probabilidade $p=10,3\%$, o que revela os dados como não significativos e indica que é possível os valores de módulo de Young serem idênticos. Apesar disso, nesta comparação tem de se ter em conta a facilidade de execução e neste campo as diferenças são assinaláveis: o sistema da folha de acetato é melhor que o sistema da esferovite. Isto deve-se ao facto de o segundo implicar nós minúsculos na fibra para a fixar e a possibilidade de deslocamento do prego devido à tensão aplicada, o que torna o sistema da esferovite bastante trabalhoso em comparação com a folha de acetato.

Após os testes preliminares, é possível concluir acerca da solução a utilizar para o restante trabalho: justifica-se produzir fibras de quitosano com massa molecular média, numa concentração de 3%, com uma tensão aplicada ao motor do colector de 2.43V e secas sob tensão numa folha de acetato.

3.2. Optimização das propriedades das fibras produzidas

3.2.1. Fibras de quitosano e PEO

Foi adicionado PEO com duas massas moleculares diferentes à solução de CS. Seguidamente produziram-se fibras de CS a 3% com PEO 5M a 0.3% e CS a 3% com PEO 8M a 0.3%. Foram feitos vários testes comparativos tendo como base os resultados anteriormente explicados para as fibras simples de CS a 3%.

- **Análise física e mecânica**

Nas tabelas 13 a 15 e nos gráficos 5 a 7 são apresentados os resultados das medições de diâmetros e testes de tracção (módulo de Young e tensão de quebra) efectuados às fibras produzidas, bem como a comparação com as fibras de CS anteriormente analisadas.

Tabela 13 – Diâmetro de fibras de CS e de CS+PEO

Tipo de fibra	Diâmetro / μm	Desvio padrão / μm	Desvio padrão em %
CS	71	3	4
CS + PEO 5M	50	2	4
CS + PEO 8M	46	2	4

Tabela 14 – Módulo de Young de fibras de CS e CS+PEO

Tipo de fibra	Módulo de Young / MPa	Desvio padrão / MPa	Desvio padrão em %
CS	9033	1532	17
CS + PEO 5M	10585	1875	18
CS + PEO 8M	11035	1753	16

Tabela 15 – Tensão de ruptura de fibras de CS e de CS+PEO

Tipo de fibra	Tensão de ruptura / (N/mm ²)	Desvio padrão / (N/mm ²)	Desvio padrão em %
CS	169	18	11
CS + PEO 5M	198	22	11
CS + PEO 8M	214	24	11

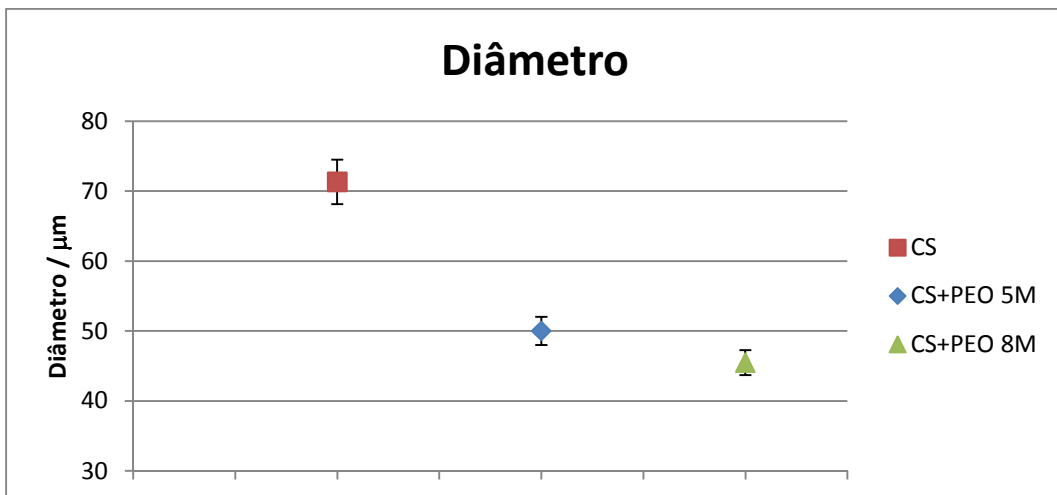


Gráfico 5 – Diâmetro de fibras de CS e CS+PEO

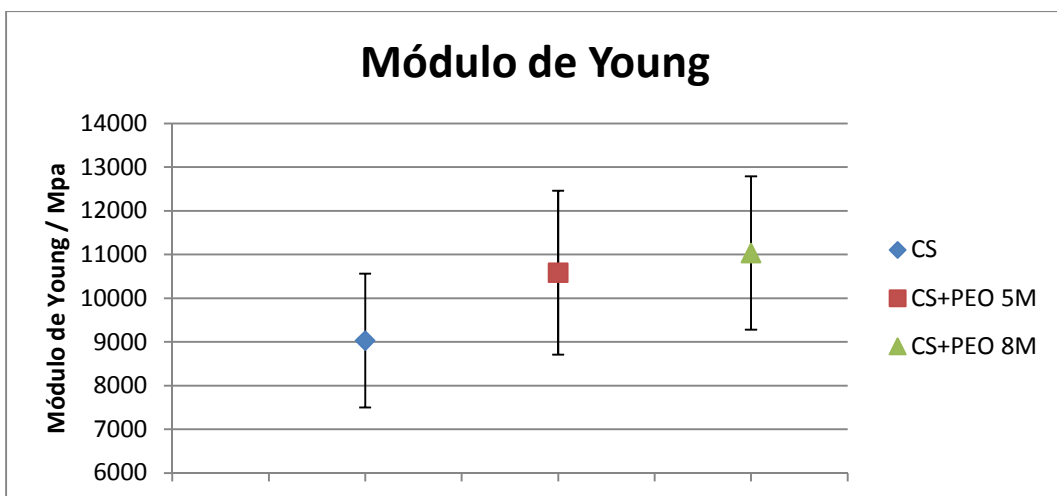


Gráfico 6 – Módulo de Young de fibras de CS e CS+PEO

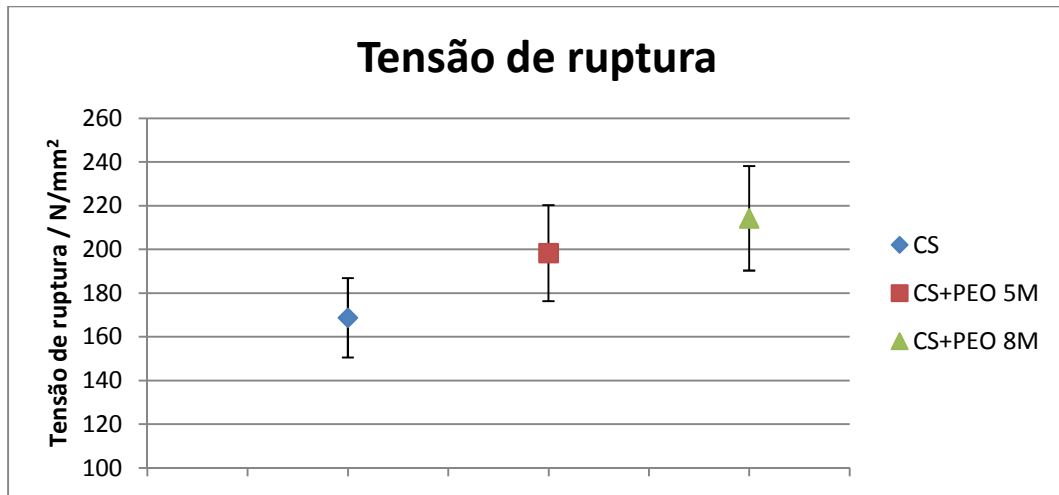


Gráfico 7 – Tensão de ruptura de fibras de CS e de CS+PEO

Como se pode observar, o PEO vai alterar as propriedades mecânicas das fibras: ao adicionar este composto o resultado será uma diminuição de diâmetro e um aumento do módulo de Young e da tensão de ruptura, tanto mais acentuados quanto maior for a massa molecular do PEO.

Estes resultados vêm de encontro ao que foi referido na introdução teórica sobre as aplicações do PEO como aditivo para o quitosano: este polímero pode ser utilizado para produzir fibras estruturalmente viáveis, conferindo-lhes uma maior resistência à tracção e uma maior ductilidade.

▪ Análise química

O estudo químico dos materiais produzidos foi feito utilizando a técnica de FT-IR de duas maneiras diferentes: a primeira utilizando pastilhas de KBr (DQ-FCT) e a segunda utilizando um alvo com um molho de fibras (CENIMAT). Os espectros de absorção são apresentados nos gráficos seguintes, onde se podem comparar com os espectros de CS e PEO puros.

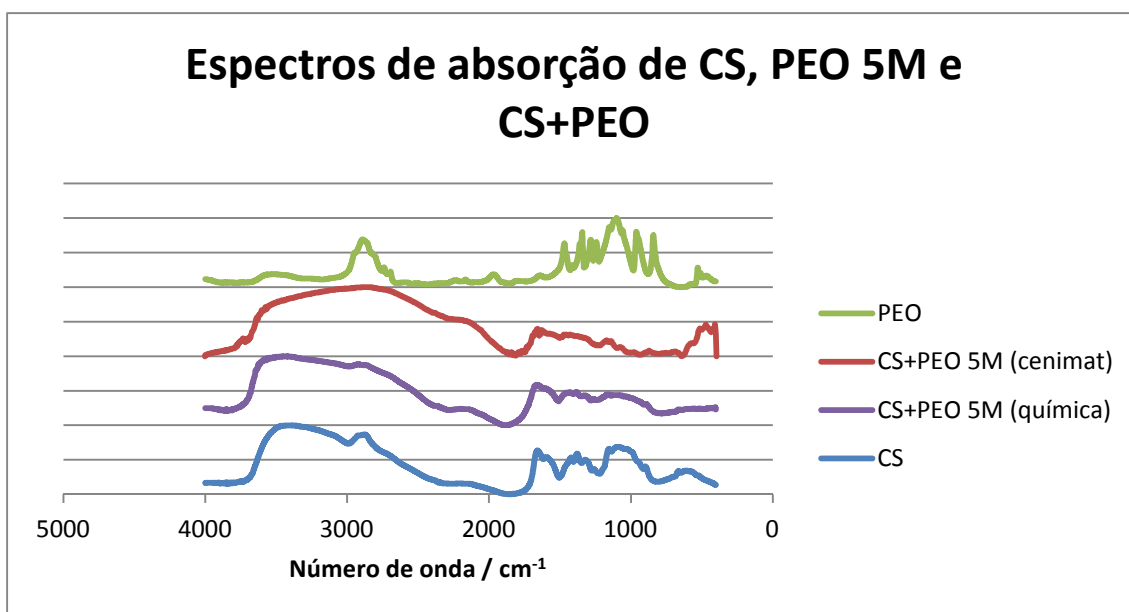


Gráfico 8 – Espectros de absorção para CS, PEO e CS+PEO 5M (obtidos no CENIMAT e no DQ)

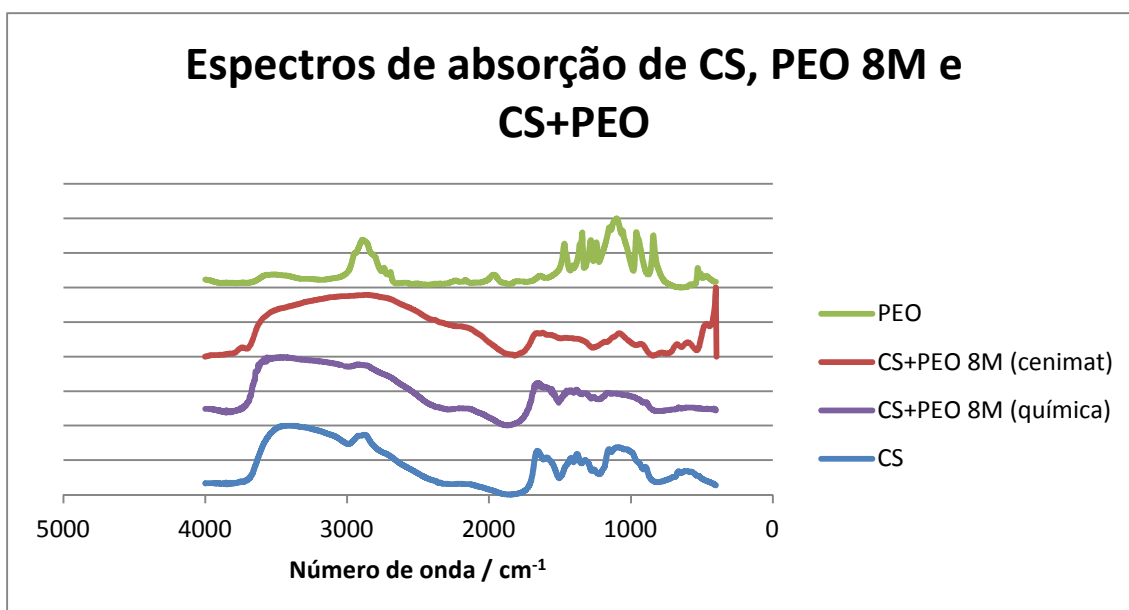


Gráfico 9 – Espectros de absorção de CS, PEO e CS+PEO 8M (obtidos no CENIMAT)

Ao analisar os espectros de CS e de PEO podemos claramente encontrar os picos característicos de ambos: para o CS temos as bandas entre 1000cm^{-1} e 1800cm^{-1} (aproximadamente) correspondentes aos grupos NH_2 e a bossa aos 3500cm^{-1} (aproximadamente) que indica a presença dos grupos OH. Para o PEO temos um pico aos 1152cm^{-1} que corresponde à ligação $\text{C}-\text{O}-\text{C}$ anti-simétrica resultante da ligação dos monómeros e outro aos 2850cm^{-1} devido ao grupo metileno.

O que se passa nas misturas é que os picos característicos do PEO desaparecem. Isto deve-se ao facto de a percentagem utilizada do composto ser demasiado pequena para provocar alterações significativas em termos dos espectros do quitosano, que é o polímero em maior quantidade na solução.

Seria de esperar espectros iguais em ambos os locais onde se fez a análise (CENIMAT e DQ), o que não acontece. Apesar de bastante semelhantes, conseguem-se encontrar algumas diferenças. Isto poderá ser resultado da maneira como se prepara a amostra: enquanto no DQ as fibras são reduzidas a pó e incorporadas em pastilhas de KBr, no CENIMAT é colocado um feixe num alvo que é montado no espectrofotómetro.

Em suma, apesar de o PEO causar alterações testadas e confirmadas a nível das propriedades físicas e mecânicas das fibras, a concentração utilizada não é suficiente para conferir mudanças em termos de absorção de luz na gama do infra-vermelho, pois não possui grupos funcionais únicos que o quitosano não possua também.

▪ **Análise estrutural**

Para estudar o formato e a estrutura das fibras, obtiveram-se várias imagens por SEM, apresentadas seguidamente (figuras 15 e 16).

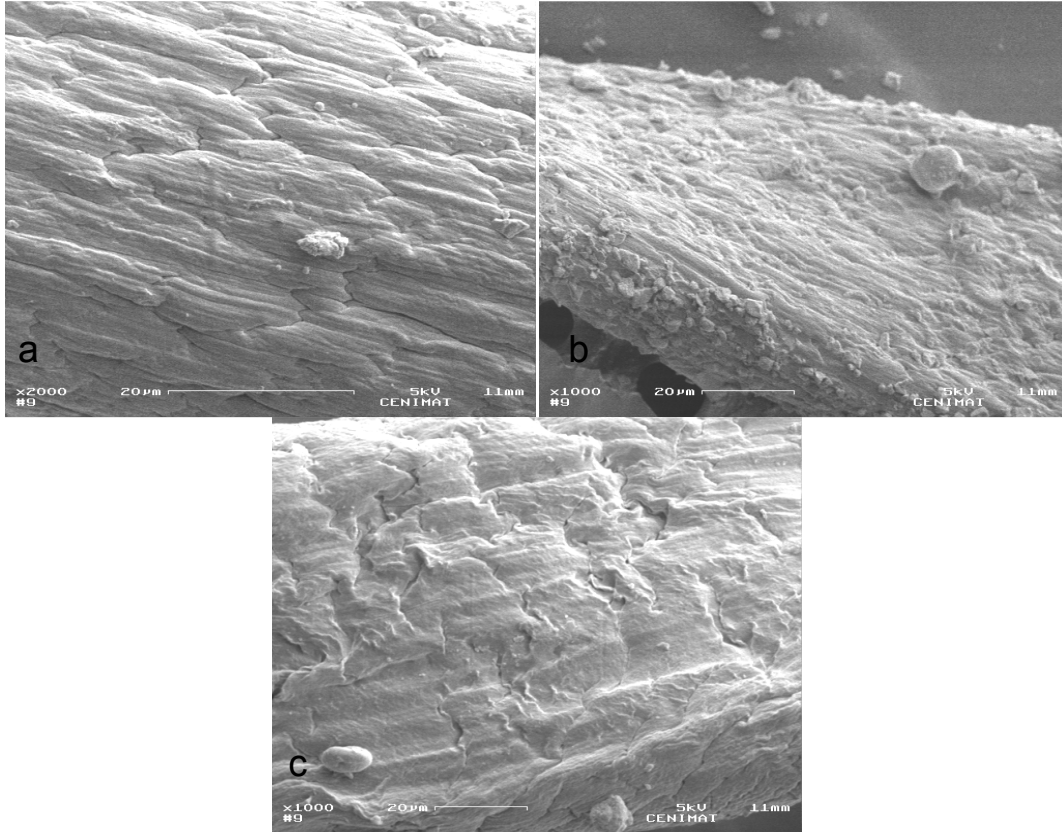


Figura 15 – Imagens SEM de pormenor da superfície das fibras de CS (a), CS+PEO 5M (b) e CS+PEO 8M (c)

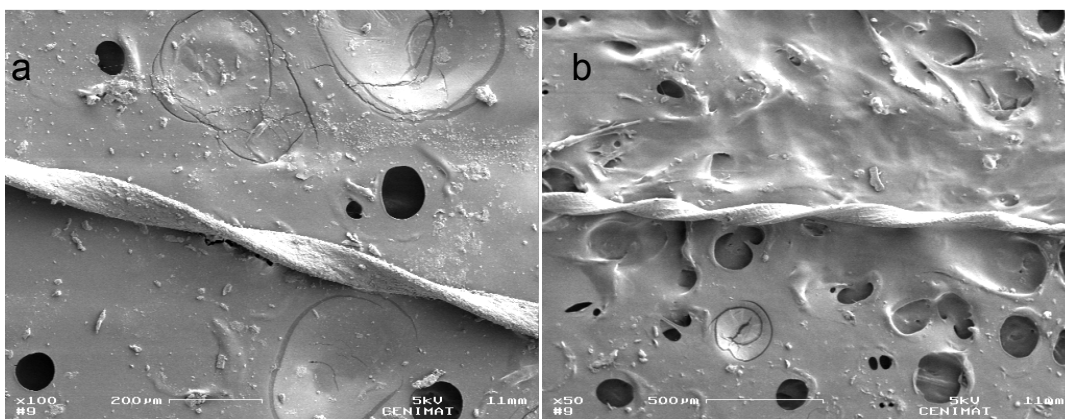


Figura 16 – Imagens SEM das fibras de CS+PEO 5M (a) e CS+PEO 8M (b)

A partir das imagens de SEM da figura 15 podemos concluir que a superfície das fibras às quais se adicionou o PEO se torna um pouco mais lisa. Apesar de ser uma variação bastante

ténue, é possível observá-la (principalmente na fibra de CS+PEO 8M). Esta mudança poderá dever-se à capacidade do PEO se orientar quando sujeito a tensão, o que irá conferir uma direcção mais definida que nas fibras de CS simples, onde são notórios vários “cortes” na superfície.

Curioso é o resultado ilustrado na figura 16: ao adicionar o PEO, as fibras adoptaram um formato espiralado e mais achatado, que se acentua com a maior massa molecular do aditivo. Esta nova orientação espacial acontece devido a assimetrias existentes nas fibras. Uma hipótese para isto acontecer prende-se com a elevada massa molecular do PEO: teoricamente este composto deveria ficar aprisionado no interior do CS, mas a massa molecular elevada do PEO pode promover a desunião entre os dois. As assimetrias podem ser resultantes da separação dos polímeros (CS e PEO). Contudo, apenas com mais estudos se poderia precisar.

Como conclusão final destes testes, pode-se afirmar que apesar de a proporção do PEO ser demasiado baixa para ser detectado por FT-IR, os testes mecânicos e estruturais vêm provar que este aditivo se mantém na fibra, influenciando as suas características: diminuição de diâmetro e aumento do módulo de Young e da tensão de ruptura.

3.2.2. Variação de parâmetros de produção e aditivos

Foram alterados vários parâmetros de produção de modo a atingir as melhores características mecânicas possíveis. Com este intuito, testou-se um novo aditivo, o glicerol numa concentração de 0.3% (ou 10% em relação à massa de CS), variou-se o solvente do CS, trocando ácido acético por ácido láctico e aqueceram-se os banhos de coagulação a uma temperatura entre 42°C e 45°C.

De salientar que a partir deste ponto passou a utilizar-se CS de outra marca (devido ao pouco CS em stock da marca inicial) por isso mesmo os valores de diâmetro, módulo de Young e tensão de ruptura são diferentes dos obtidos anteriormente, apesar de as soluções terem sido preparadas com as mesmas concentrações utilizadas e as fibras terem sido produzidas de maneira idêntica.

Os resultados são ilustrados nas tabelas 16, 17 e 18 e nos gráficos 10, 11 e 12.

Tabela 16 – Diâmetro de fibras de CS em ácido acético, CS+Glicerol, CS em ácido láctico e respectivos banhos aquecidos

Tipo de fibra	Diâmetro / µm	Desvio padrão / µm	Desvio padrão em %
CS 3% em ácido acético	54	3	5
CS 3% + Glicerol 0.3%	47	4	8
CS 3% em ácido láctico	49	3	7
CS 3% em ácido acético (banho aquecido)	49	4	8
CS 3% + Glicerol 0.3% (banho aquecido)	44	3	7
CS 3% em ácido láctico (banho aquecido)	43	3	6

Tabela 17 – Módulo de Young de fibras de CS em ácido acético, CS+Glicerol, CS em ácido láctico e respectivos banhos aquecidos

Tipo de fibra	Módulo de Young / MPa	Desvio padrão / MPa	Desvio padrão em %
CS 3% em ácido acético	5498	411	7
CS 3% + Glicerol 0.3%	6644	987	15
CS 3% em ácido láctico	10065	855	9
CS 3% em ácido acético (banho aquecido)	8964	1118	12
CS 3% + Glicerol 0.3% (banho aquecido)	10486	1150	11
CS 3% em ácido láctico (banho aquecido)	13586	1196	9

Tabela 18 – Tensão de ruptura de fibras de CS em ácido acético, CS+Glicerol, CS em ácido láctico e respectivos banhos aquecidos

Tipo de fibra	Tensão de ruptura / (N/mm ²)	Desvio padrão / (N/mm ²)	Desvio padrão em %
CS 3% em ácido acético	89	20	17
CS 3% + Glicerol 0.3%	115	5	6
CS 3% em ácido láctico	124	15	12
CS 3% em ácido acético (banho aquecido)	113	18	16
CS 3% + Glicerol 0.3% (banho aquecido)	146	19	13
CS 3% em ácido láctico (banho aquecido)	169	14	9

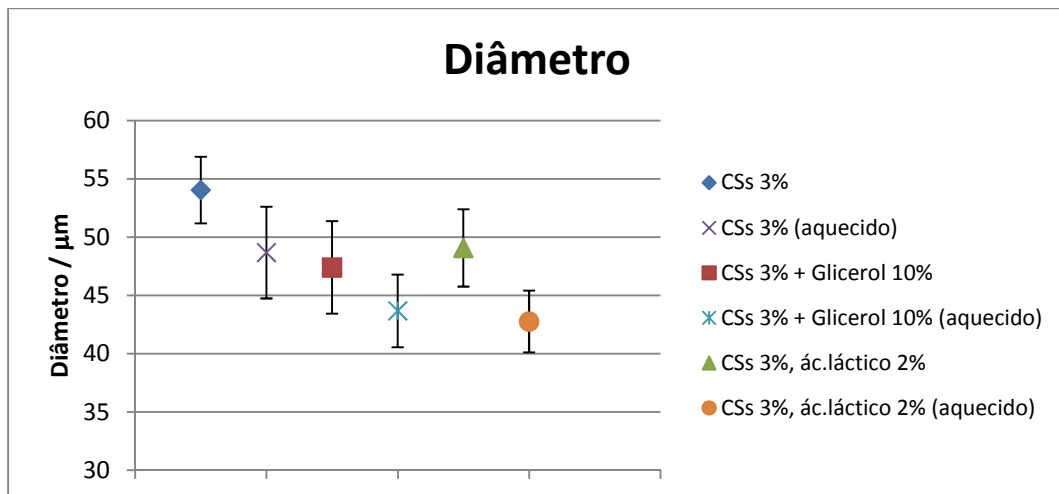


Gráfico 10 – Diâmetro de fibras de CS em ácido acético, CS+Glicerol, CS em ácido láctico e respectivos banhos aquecidos

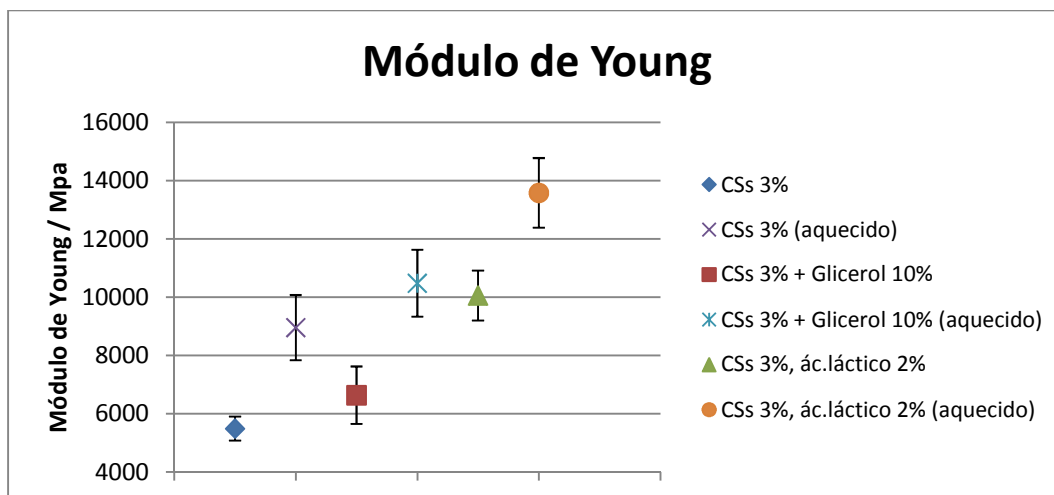


Gráfico 11 – Módulo de Young de fibras de CS em ácido acético, CS+Glicerol, CS em ácido láctico e respectivos banhos aquecidos

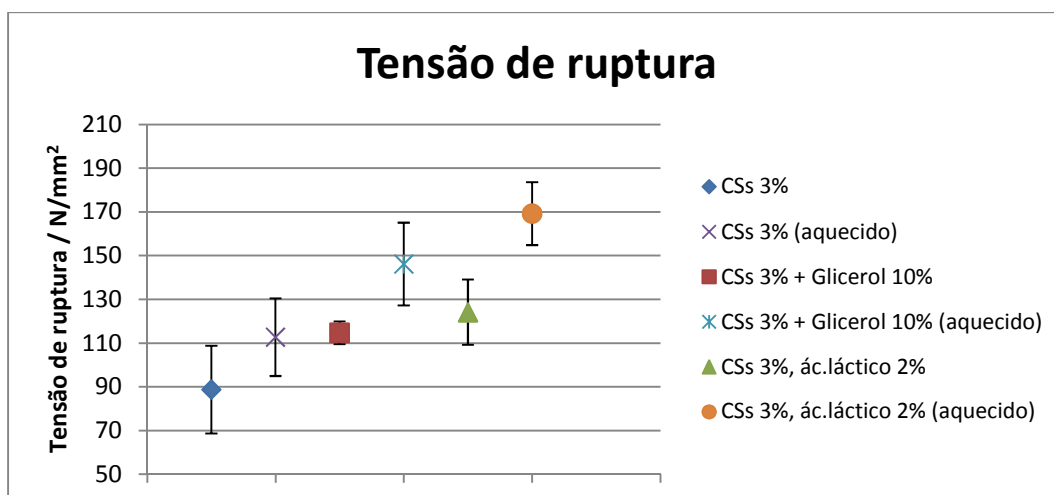


Gráfico 12 – Tensão de ruptura de fibras de CS em ácido acético, CS+Glicerol, CS em ácido láctico e respectivos banhos aquecidos

Destes resultados poderemos tirar várias conclusões, mais facilmente compreendidas se a análise for feita por partes.

Em primeiro lugar, pode-se verificar que o glicerol (tal como o PEO) também contribui para a diminuição do diâmetro das fibras e para o aumento do seu módulo de Young e tensão de ruptura. Este resultado está de acordo com o esperado, já que como foi referido o glicerol é utilizado como fluidificante, conferindo com a sua elevada viscosidade uma maior resistência à tracção e permitindo que as fibras suportem uma maior deformação.

Em relação à mudança do solvente do CS, o ácido láctico revelou grandes vantagens em relação ao ácido acético: as fibras produzidas a partir de CS dissolvido em ácido láctico a 2% revelam uma diminuição de diâmetro, uma ligeira subida da tensão de ruptura e um grande aumento do módulo de Young. Isto é comprovado devido à maior acidez do ácido láctico –

pKa=3.86, enquanto no ácido acético pKa=4.79 (o valor de pKa varia inversamente com o grau de dissociação). Este resultado vem de encontro ao estudo feito anteriormente, onde se comprova que a solubilidade do CS é influenciada pela acidez do solvente (Rinaudo 2006).

Finalmente, analisando os banhos aquecidos, consegue-se observar uma tendência que se repete: em qualquer um dos casos, aquecer o banho de coagulação resultou numa diminuição do diâmetro e aumento do módulo de Young e tensão de ruptura. Para além disso, constata-se que estas variações são aproximadamente todas na mesma proporção, o que sugere uma constância e fidelidade destes resultados. A razão inerente a estas mudanças pode ser observada no processo de fiação: o aquecimento do banho faz com que a fibra coagule mais depressa: enquanto no banho normal existiam 1 ou 2 centímetros onde a fibra se apresentava transparente, ou seja, ainda não estava completamente coagulada, no banho aquecido a coagulação é quase imediata à saída da agulha, ganhando a fibra quase instantaneamente a sua tonalidade esbranquiçada característica. Este factor vai fazer com que a fibra sofra a tensão do colector mais cedo e de forma mais intensa. Como consequência desta tensão, a fibra sofrerá um maior estiramento, diminuindo assim o diâmetro e aumentando o módulo de Young e tensão de ruptura (ao contrário dos testes de velocidade iniciais, onde o módulo de Young diminuía, o que se devia à tensão ser consequência do colector girar mais depressa. Neste caso, a tensão é imprimida devido à maior quantidade de fibra já coagulada a ser puxada).

Resumindo, a partir destes testes pode-se afirmar que o glicerol é um aditivo bastante idêntico ao PEO e funciona como plastificante, a dissolução do CS em ácido láctico ao invés de ácido acético vai melhorar as propriedades das fibras e o aquecimento do banho de coagulação irá influenciar grandemente o resultado final, garantindo uma maior resistência à tracção e à deformação.

3.2.3. Fibras de CS a 3% + PEG 300 a 0.3%

Foi testado um novo aditivo de forma a estudar o efeito de um polímero plastificante diferente do glicerol. Assim, à solução de CS juntou-se PEG 300, que tal como o PEO deriva do etilenoglicol, mas tem uma massa molecular muito mais baixa.

A comparação entre as fibras de quitosano puro e as fibras de quitosano com glicerol e PEG (o PEO não foi comparado devido a ter sido produzido com outro tipo de CS) é apresentada nas tabelas 19, 20 e 21 e nos gráficos 13, 14 e 15.

Tabela 19 – Diâmetro de fibras de CS puro e com dois tipos de aditivo

Tipo de fibra	Diâmetro / μm	Desvio padrão / μm	Desvio padrão em %
CS 3%	54	3	5
CS 3% + Glicerol 0.3%	47	4	6
CS 3% + PEG 300 0.3%	49	3	6

Tabela 20 – Módulo de Young de fibras de CS puro e com dois tipos de aditivo

Tipo de fibra	Módulo de Young / MPa	Desvio padrão / MPa	Desvio padrão em %
CS 3%	5498	411	7
CS 3% + Glicerol 0.3%	6644	987	15
CS 3% + PEG 300 0.3%	8675	1087	13

Tabela 21 – Tensão de ruptura de fibras de CS puro e com dois tipos de aditivo

Tipo de fibra	Tensão de ruptura / (N/mm ²)	Desvio padrão / (N/mm ²)	Desvio padrão em %
CS 3%	89	20	17
CS 3% + Glicerol 0.3%	115	5	6
CS 3% + PEG 300 0.3%	108	15	14

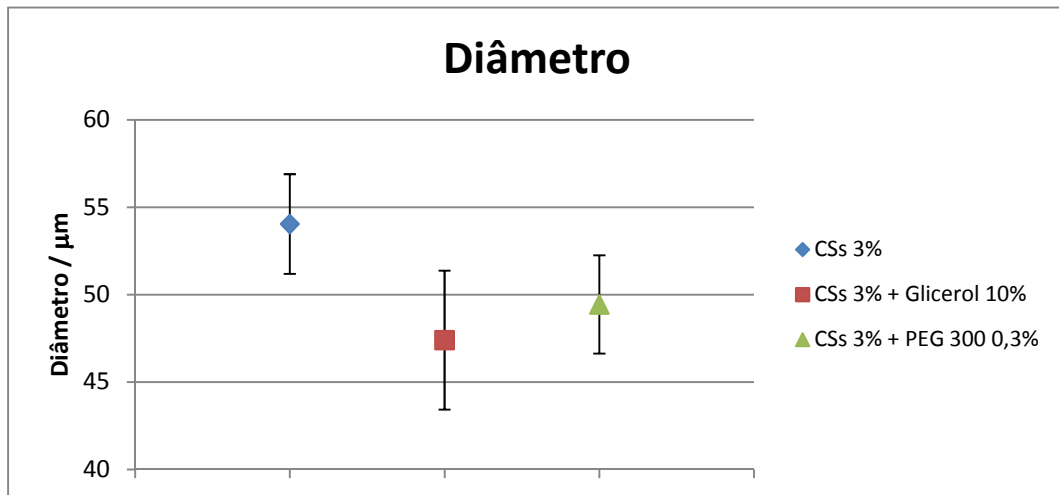


Gráfico 13 – Diâmetro de fibras de CS puro e com dois tipos de aditivo

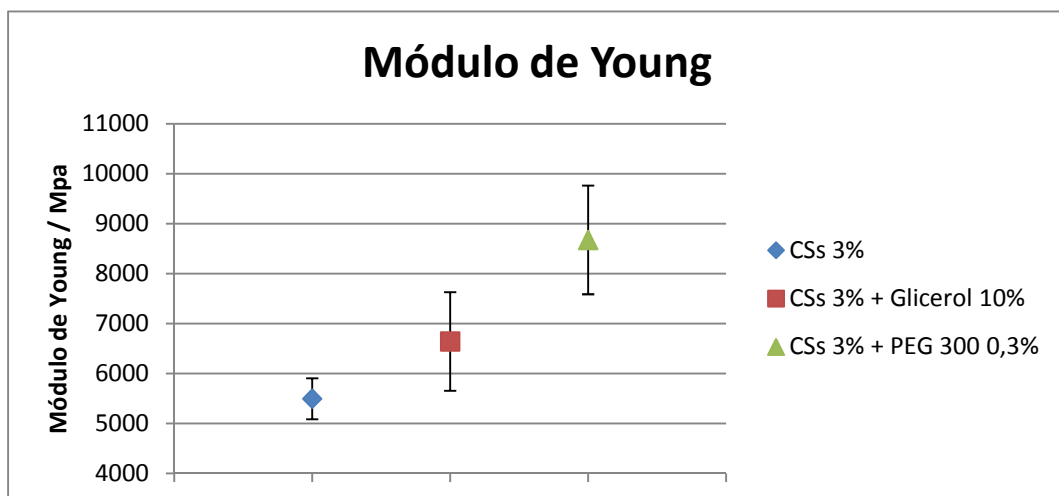


Gráfico 14 – Módulo de Young de fibras de CS puro e com dois tipos de aditivo

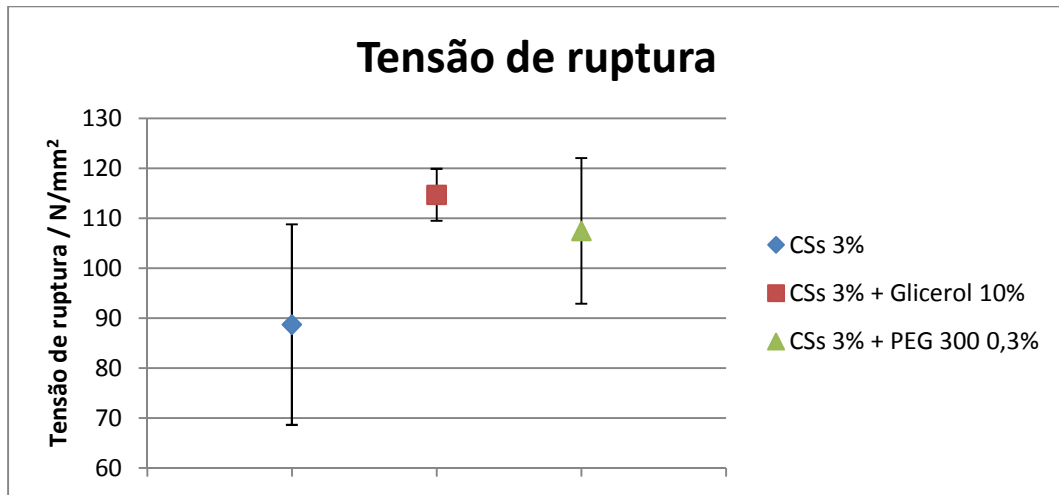


Gráfico 15 – Tensão de ruptura de fibras de CS puro e com dois tipos de aditivo

Como se pode constatar, não existem grandes diferenças nos diâmetros das fibras com glicerol e com PEG, sendo que este parâmetro diminui em relação às fibras de CS. A tensão de ruptura como seria de prever sofre um aumento com a adição dos fluidificantes e apesar de se observar uma ligeira diferença entre a utilização de glicerol e PEG, devido à maior barra de erro deste segundo pode-se afirmar que os valores são coincidentes.

As grandes diferenças surgem no módulo de Young: enquanto a adição de glicerol simbolizava um aumento de aproximadamente 21%, a adição de PEG vai levar a um aumento muito mais significativo de cerca de 58%. Esta discrepância pode ser justificada com a maior capacidade do PEG de conferir ductilidade à fibra, pois é uma molécula mais passível de se ligar ao CS alterando a sua estrutura química (devido às ligações O-H simples que possui e que podem criar pontes de hidrogénio, dando mais resistência ao CS).

Deste estudo conclui-se que de todos os aditivos testados, o que provou imprimir melhores propriedades mecânicas às fibras é o PEG 300.

3.2.4. Testes de pH e perda de massa

Para testar o comportamento das fibras quando sujeitas a vários ciclos de secagem e re-hidratação realizaram-se testes (descritos no procedimento experimental) a quatro tipos de fibra considerados representativos: CS 3% em ácido acético – o caso mais simples, CS 3% em ácido láctico – mudança de solvente, CS 3% + PEG 300 3% – utilização de um aditivo (em maior quantidade para maximizar o seu efeito) e finalmente CS 3% em ácido láctico e banho aquecido – as melhores condições de produção estudadas.

▪ pH

Os resultados dos três ciclos de secagem e re-hidratação são exibidos na tabela 22 e nos gráficos 16 a 19.

Tabela 22 – Valores de pH dos vários tipos de fibras após três ciclos de secagem e re-hidratação

Tipo de fibras	pH _{fibras após 1º ciclo}	pH _{fibras após 2º ciclo}	pH _{fibras após 3º ciclo}
CS 3% em ácido acético	9.6	7.3	6.7
CS 3% + PEG 300 3%	9.3	7.1	6.7
CS 3% em ácido láctico	9.5	7.2	6.6
CS 3% em ácido láctico (banho aquecido)	9.8	7.4	6.7

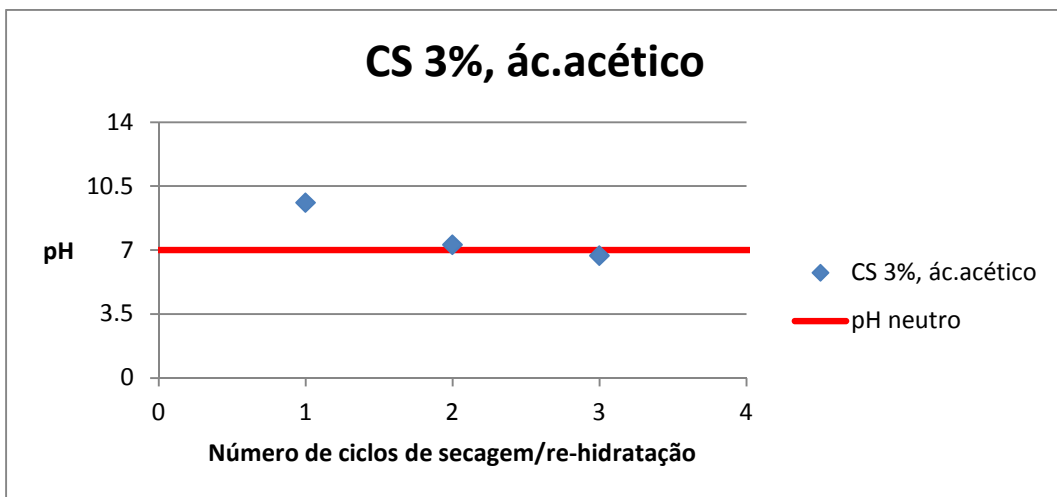


Gráfico 16 – Variação de pH em fibras de CS em ácido acético após ciclos de secagem e re-hidratação

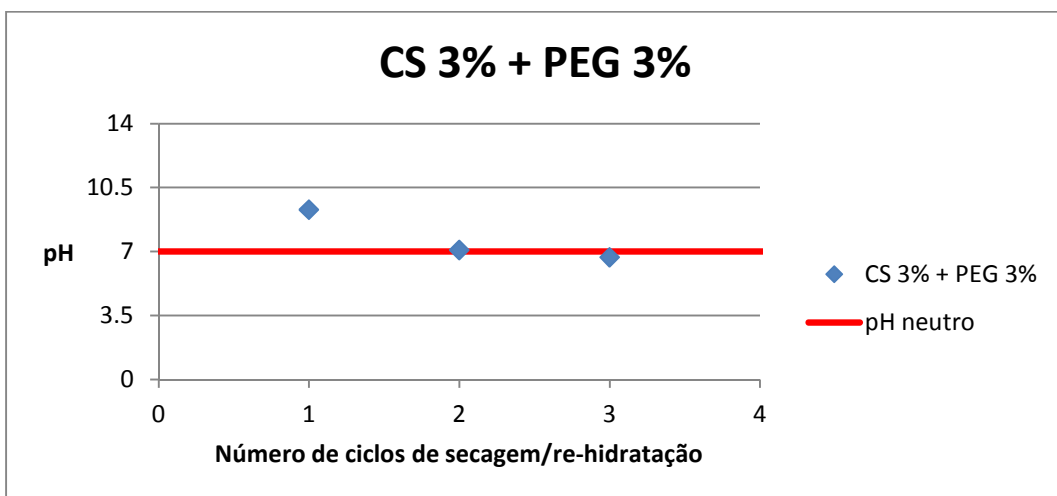


Gráfico 17 – Variação de pH em fibras de CS+PEG após ciclos de secagem e re-hidratação

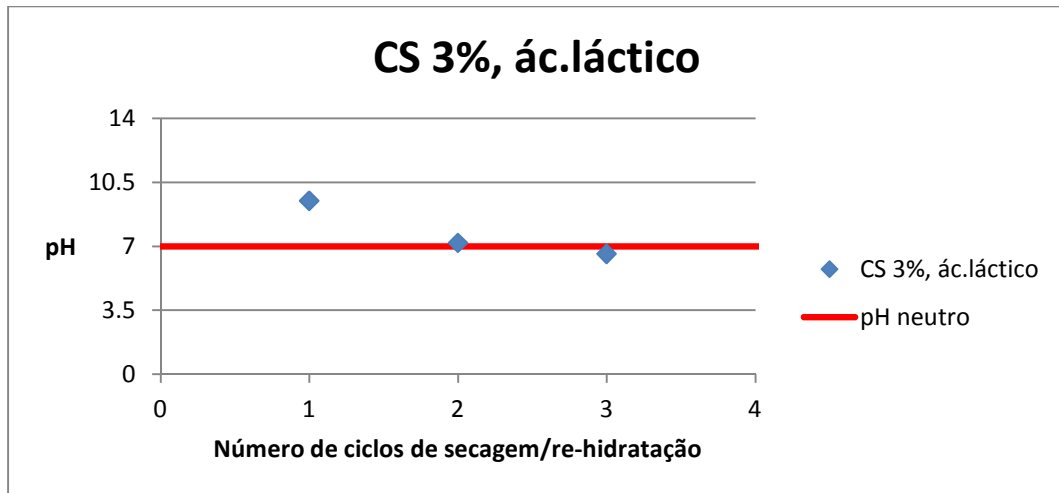


Gráfico 18 – Variação de pH em fibras de CS em ácido láctico após ciclos de secagem e re-hidratação

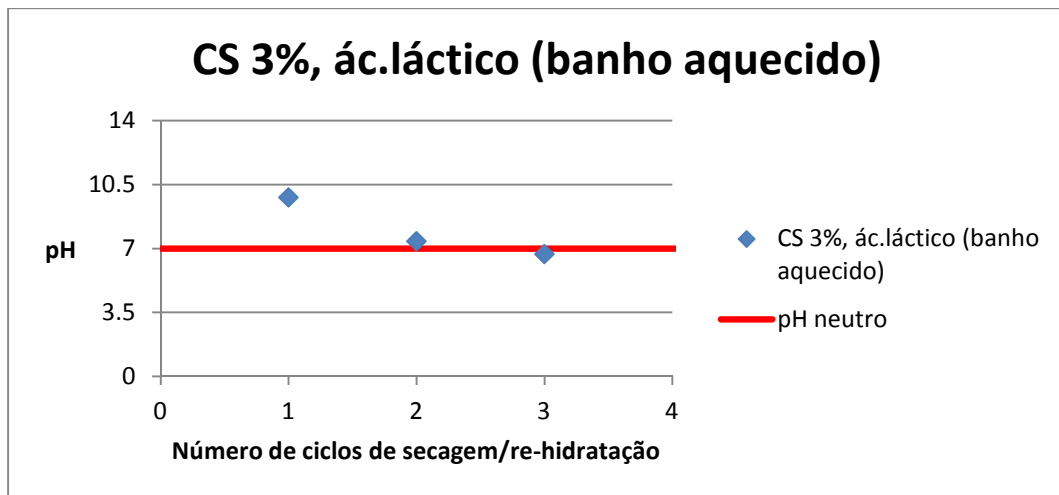


Gráfico 19 – Variação de pH em fibras de CS em ácido láctico com banho aquecido após ciclos de secagem e re-hidratação

A partir da tabela e dos gráficos é possível concluir sobre as variações do pH das fibras estudadas.

Inicialmente, as fibras têm um pH básico (entre 9 e 10) que se deve ao banho de coagulação de NaOH, muito básico. Apesar disso, graças ao ácido utilizado para a dissolução do CS, as fibras não atingem valores de pH tão elevados como o NaOH 1M.

Ao passarem pelo banho de secagem de metanol e expostas ao ar (dentro da estufa), as fibras desidratam e vão perder a água que possuíam no seu interior, proveniente da solução de quitosano original. Após a re-hidratação, observa-se uma ligeira diminuição do pH, consequência da diluição do NaOH na água do banho de re-hidratação. Contudo, é após a segunda secagem que se nota a maior diminuição do valor do pH, que se aproxima bastante

da neutralidade. Pode-se assim concluir que é nesta passagem que a maior parte do NaOH que ficou na fibra é lavado.

Na segunda re-hidratação e no terceiro ciclo de secagem e re-hidratação o processo repete-se, mas de forma menos acentuada. Neste ponto pode-se afirmar que as fibras conseguem atingir um valor estável de pH, que neste caso não é completamente neutro devido à água destilada que se utilizou (com pH=5-7).

▪ **Perdas de massa**

Foi estudado o comportamento das fibras ao nível da sua massa após os ciclos de secagem e re-hidratação. Os resultados são apresentados na tabela 23.

Tabela 23 – Valores de massa dos vários tipos de fibras após três ciclos de secagem e re-hidratação

Primeiro ciclo de secagem e re-hidratação			
Tipo de fibras	m_{fibras secas} / g	m_{fibras re-hidratadas} / g	Razão m_{re-hidratadas}/m_{secas}
CS 3% em ácido acético	0.359	4.015	11.2
CS 3% + PEG 300 3%	0.390	4.123	10.6
CS 3% em ácido láctico	0.394	4.278	10.9
CS 3% em ácido láctico (banho aquecido)	0.425	5.211	12.3
Segundo ciclo de secagem e re-hidratação			
Tipo de fibras	m_{fibras secas} / g	m_{fibras re-hidratadas} / g	Razão m_{re-hidratadas}/m_{secas}
CS 3% em ácido acético	0.285	1.123	3.9
CS 3% + PEG 300 3%	0.309	1.133	3.7
CS 3% em ácido láctico	0.318	1.154	3.6
CS 3% em ácido láctico (banho aquecido)	0.305	1.216	4.0
Terceiro ciclo de secagem e re-hidratação			
Tipo de fibras	m_{fibras secas} / g	m_{fibras re-hidratadas} / g	Razão m_{re-hidratadas}/m_{secas}
CS 3% em ácido acético	0.277	0.959	3.5
CS 3% + PEG 300 3%	0.302	1.002	3.3
CS 3% em ácido láctico	0.311	1.101	3.5
CS 3% em ácido láctico (banho aquecido)	0.300	1.172	3.9

Como se pode constatar, os ciclos de secagem e re-hidratação têm um efeito bastante visível nas fibras.

Ao serem hidratadas uma primeira vez, as fibras demonstram uma grande capacidade de absorção de água, conseguindo aumentar a sua massa entre 11 e 12 vezes a inicial. A olho nu está bem patente esta propriedade, pois as fibras no banho de água destilada incham bastante e tornam-se quase transparentes devido ao líquido absorvido.

Depois da segunda secagem, vê-se claramente que a massa diminuiu em relação à apontada no primeiro ciclo, o que indica que uma parte constituinte da fibra já não está presente. Apoiando a conclusão nos testes anteriores de pH, é aceitável dizer que isto se deve à perda da água que ficou aprisionada no interior da fibra.

Ao serem novamente hidratadas, as fibras voltam a inchar, só que menos pronunciadamente. É notório que adoptam um aspecto mais rígido e tornam-se menos transparentes. De facto, a razão entre as massas passa a ser de apenas 4 (aproximadamente).

No terceiro ciclo de lavagem o resultado é semelhante, com as fibras novamente a não incharem tanto. A razão das massas fixa-se em valores entre 3 e 4.

3.2.5. Testes de tracção a fibras re-hidratadas

Foram feitos testes de tracção a fibras de CS 3% em ácido láctico e em banho aquecido que sofreram um ciclo de secagem, re-hidratação e nova secagem.

Os resultados apresentados nas tabelas 24, 25 e 26 resultam da comparação feita com os resultados obtidos anteriormente para o mesmo tipo de fibras sem re-hidratação.

Tabela 24 – Diâmetro de fibras de CS em ácido láctico e banho aquecido, com e sem re-hidratação

Tipo de fibra	Diâmetro / μm	Desvio padrão / μm	Desvio padrão em %
CS 3% em ácido láctico (banho aquecido)	43	3	6
CS 3% em ácido láctico (banho aquecido) com re-hidratação	49	3	5

Tabela 25 – Módulo de Young de fibras de CS em ácido láctico e banho aquecido, com e sem re-hidratação

Tipo de fibra	Módulo de Young / MPa	Desvio padrão / MPa	Desvio padrão em %
CS 3% em ácido láctico (banho aquecido)	13586	1196	9
CS 3% em ácido láctico (banho aquecido) com re-hidratação	7149	790	11

Tabela 26 – Tensão de ruptura de fibras de CS em ácido láctico e banho aquecido, com e sem re-hidratação

Tipo de fibra	Tensão de ruptura / (N/mm^2)	Desvio padrão / (N/mm^2)	Desvio padrão em %
CS 3% em ácido láctico (banho aquecido)	169	14	9
CS 3% em ácido láctico (banho aquecido) com re-hidratação	101	9	9

Dos resultados apresentados poderemos inferir um facto bastante importante: ao re-hidratar a fibra está-se também a alterar as suas propriedades mecânicas.

Como se pode observar, as fibras que sofreram o processo de re-hidratação têm um diâmetro ligeiramente maior mas um módulo de Young e uma tensão de ruptura bastante menores. A principal razão destas diferenças prende-se com o facto de a nova secagem, por ser feita na placa de circuito impresso, permitir que as fibras possam contrair mais facilmente (no acetato não acontece isto, pois as pontas estão presas com fita-cola). Assim, na segunda secagem as fibras conseguem diminuir em termos de comprimento, enquanto no acetato apenas alteram em diâmetro. Isto leva ao maior valor obtido para as fibras sujeitas a re-hidratação. Para além disso, esta nova configuração, aliada a perdas de massa que se provaram acontecer no banho de água, vai danificar a estrutura da fibra, não visivelmente, mas detectável através de testes mecânicos. O resultado será uma fibra menos propensa a tensões e menos dúctil, com um módulo de Young reduzido quase a 50% do valor original.

Assim, é seguro afirmar que a re-hidratação das fibras é prejudicial para as suas características físicas.

3.3. Culturas celulares

3.3.1. Recta de calibração

Nos gráficos 20 e 21 são apresentadas as rectas de calibração feitas para as HFFF2. Estas rectas foram obtidas semeando um número conhecido de células nos poços e lendo no espectrofotómetro as absorvâncias das amostras. Decidiu utilizar-se duas rectas diferentes tendo em conta os dois perfis distintos existentes.

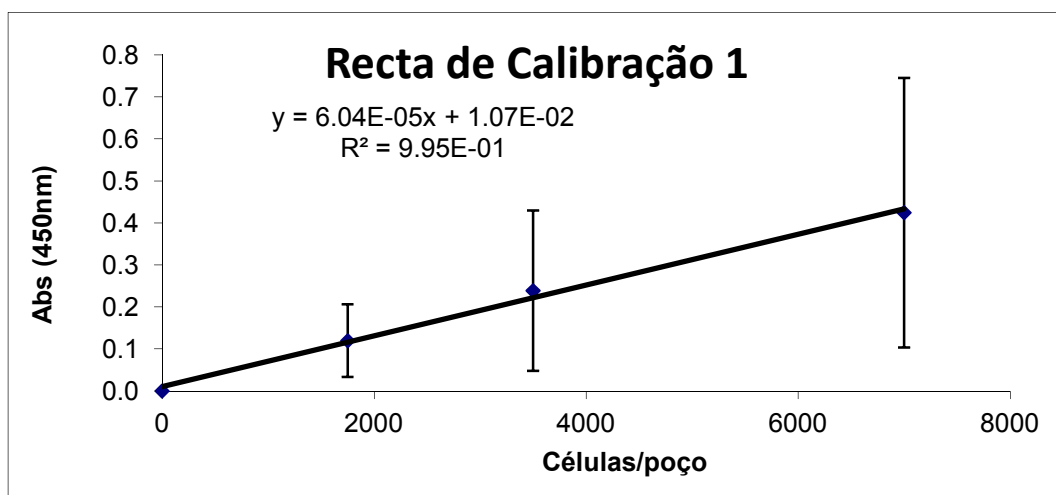


Gráfico 20 – Recta de calibração para as HFFF2 para absorvâncias inferiores a 0,4

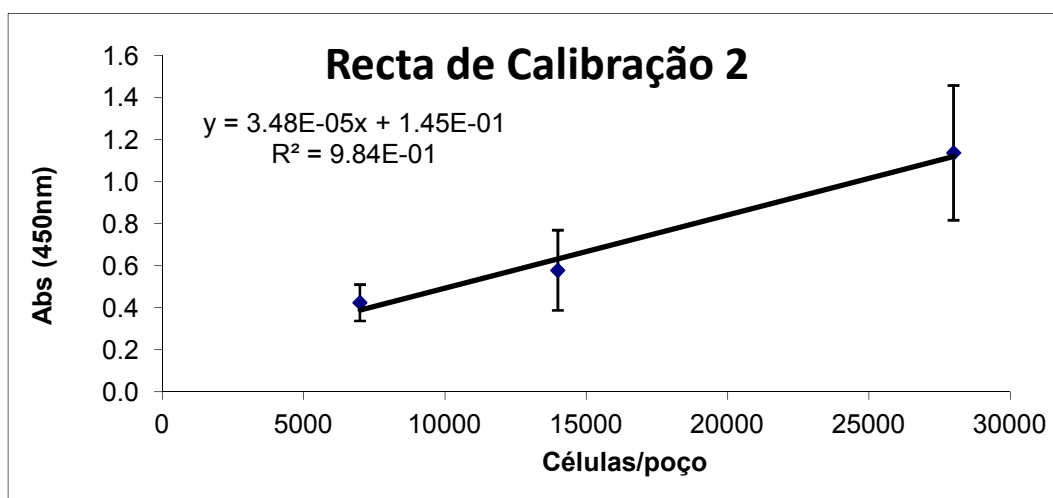


Gráfico 21 – Recta de calibração para as HFFF2 para absorvâncias superiores a 0,4

A partir destas rectas é possível associar um valor de absorvância a um determinado número de células na amostra e assim quantificar a proliferação das HFFF2.

3.3.2. Testes de proliferação

Foram inicialmente semeadas 10000 células em cada poço de forma a medir a sua proliferação em 24, 48 e 72 horas. Os resultados das absorvâncias medidas são apresentados na tabela 27 e a sua conversão para número de células é feito na tabela 28. A representação gráfica da proliferação celular é exibida no gráfico 23.

Tabela 27 – Valores de absorvância a 450nm para as várias amostras em 24, 48 e 72 horas

Tipo de amostra	Absorvância média – 24h	Absorvância média – 48h	Absorvância média – 72h
Matriz+células	0.1297	0.1233	0.1493
Células sem matriz	0.4893	0.8680	1.2425
Branco (controlo)	0.0890	0.0730	0.0670

Tabela 28 – Subtração do valor de absorvância do controlo branco às absorvâncias médias obtidas e extrapolação dos valores pela recta de calibração

Amostra	Número de células por poço (24 horas)	Número de células por poço (48 horas)	Número de células por poço (72 horas)
Matriz+células	496	656	1186
Células sem matriz	11087	22428	33362

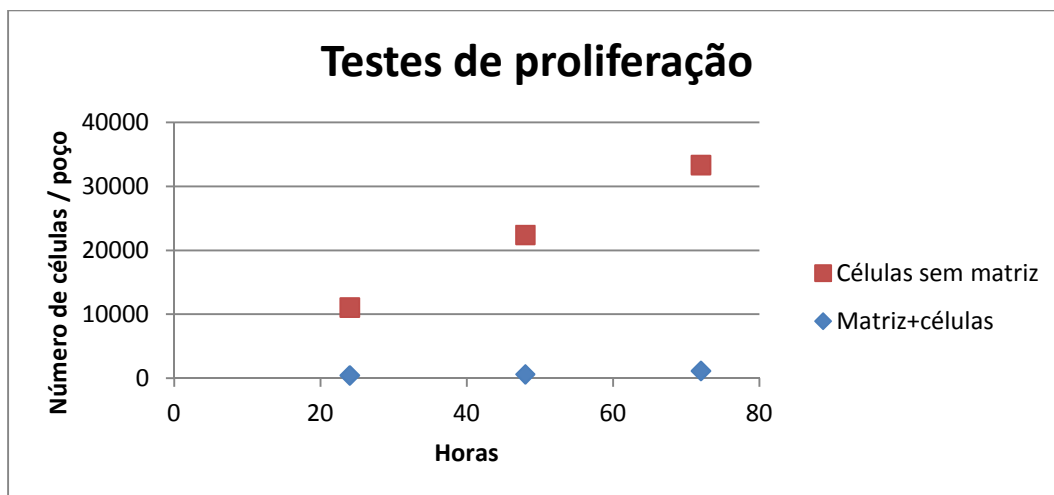


Gráfico 22 – Representação gráfica da proliferação das HFFF2 com e sem matriz

Estes resultados permitem concluir que as células não se fixaram bem na matriz e foram inclusive eliminadas em grande número.

Inicialmente foram semeadas 10000 células (valor aproximado) em cada poço. Tendo em conta o seu período de fixação seria de esperar que passadas 24 horas se verificasse um valor bastante próximo do inicial, o que seria um sinal de que as células estavam fixas e activas. Nas amostras de controlo – células semeadas sem matriz, confere-se realmente esse resultado. Contudo, nas amostras que continham a matriz de fibras de CS, o valor de absorvância obtido é muito baixo, o que indica a quase ausência de células. Daqui se pode afirmar que as HFFF2 não se fixaram devidamente à matriz produzida e podem ter morrido durante as 24 horas em que estiveram na estufa a incubar.

Para 48 e 72 horas, as amostras de controlo revelam a tendência esperada, ou seja, as células a proliferar e a aumentar o seu número – de 11087 passaram para 22428 e finalmente 33362. Este é o comportamento típico das HFFF2, que têm um crescimento característico conhecido e tendencialmente exponencial (duplicando em intervalos de tempo regulares). Nas amostras que dizem respeito ao conjunto matriz e meio celular, para 48 e 72 horas, o valor de número de células aumentou, apesar de muito menos pronunciadamente que o controlo. Isto pode indicar que as poucas células que sobreviveram na amostra e foram detectadas às 24 horas conseguiram proliferar. Apesar disso, a sua percentagem mantém-se bastante pequena em relação ao número de células cultivado inicialmente.

Concluindo, as amostras das células sem matrizes que serviram de controlo revelaram um crescimento concordante com o esperado, o que indica a fiabilidade dos resultados. Para as amostras onde se colocou a matriz de CS pode-se afirmar que grande parte das células não se fixou e morreu, o que indica que a matriz fabricada não se revelou um bom suporte para a cultura celular.

3.3.3. Morfologia

As amostras fixas com PFA que foram observadas em microscópio confocal revelaram o que os testes de proliferação indicavam: não foi possível visualizar células vivas nas amostras. Apenas se conseguiu observar a matriz e esporadicamente algumas células mortas.

Para ter uma ideia sobre os problemas da matriz produzida esta foi fixa com glutaraldeído e observada em SEM. As imagens obtidas são apresentadas na figura 17.

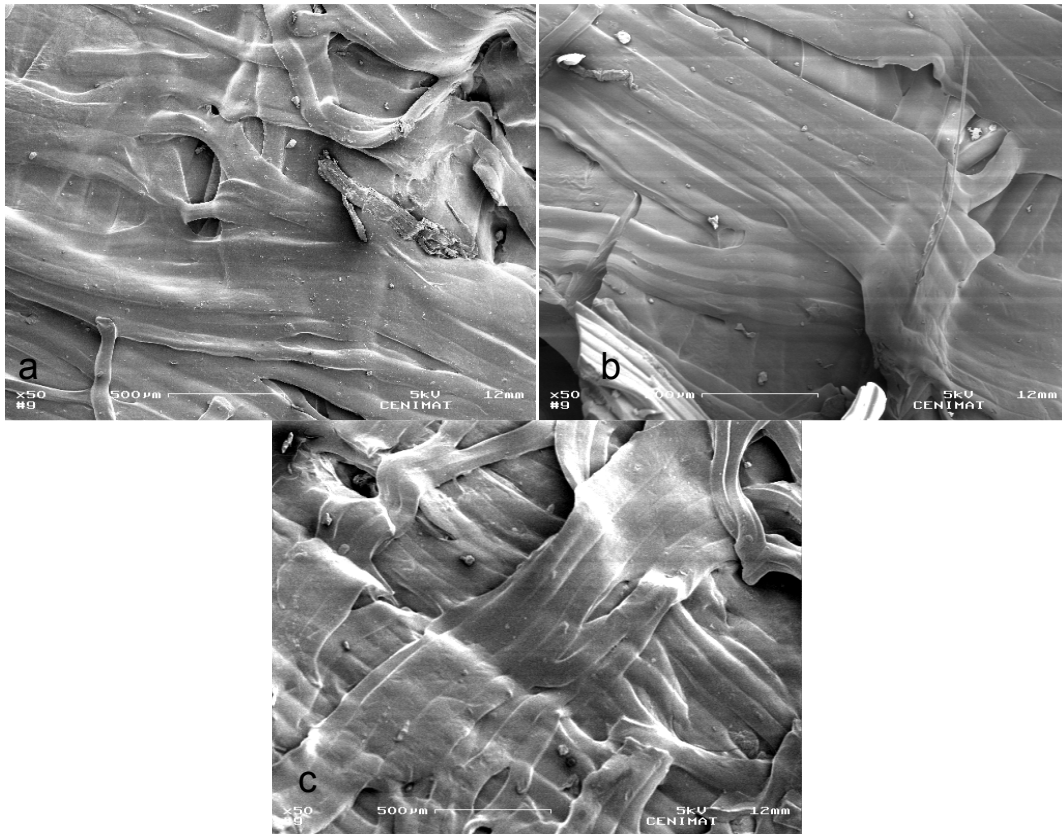


Figura 17 – Imagens de SEM de vários pontos da matriz produzida

Estas imagens podem ser um bom ponto de partida para esclarecer o motivo que levou as células a não se fixarem na matriz.

Como se pode constatar, o processo de fabrico da matriz levou a um resultado inesperado: as fibras fundiram-se entre si. O objectivo inicial seria ter uma estrutura fibrosa bem definida e três camadas perpendiculares. Contudo, como se pode conferir na figura 21a, a superfície obtida é bastante irregular, mas não o suficiente a nível celular (basta ver a escala utilizada). Na imagem 21b observa-se bastante bem essa fusão, pois distinguem-se claramente os contornos do que antes eram fibras separadas. A imagem 21c é a prova que as camadas perpendiculares foram conseguidas, apesar de nas camadas inferiores ter acontecido o mesmo que na superficial.

Este resultado pode ser explicado através do protocolo seguido. Para baixar o pH das fibras e assim as tornar neutras e biocompatíveis foi adicionada água destilada por várias vezes. Contudo, para além de actuar como agente neutralizante, a água permitiu que as fibras colassem e se unissem (os anteriores testes de secagem e re-hidratação demonstram claramente a enorme propensão das fibras para absorver água logo após produção, o que as torna muito gelatinosas. Ao secarem não conservam a sua estrutura singular e unem-se formando os blocos que se vêem na figura 21).

Ao adoptarem esta estrutura não filamentosa e quase compacta, estas matrizes diminuem os pontos de fixação para as células (é mais fácil para as células fixarem-se entre duas fibras bem delineadas do que numa estrutura quase lisa e sem espaços). Para além disso, devido à fusão das camadas inferiores sobram menos espaços para as células conseguirem penetrar na matriz, o que inviabiliza também a sua fixação, pois vários estudos revelaram a propensão que as células têm para proliferar em meios porosos (Wang et al. 2010).

Como conclusão final, é seguro dizer que as células não proliferaram nas matrizes fabricadas devido a problemas estruturais resultantes da fusão das fibras. Apesar de se ter garantido a biocompatibilidade e não toxicidade das matrizes (baixando o pH para neutro e devido às características conhecidas do quitosano), o formato que elas adquiriram revelou-se inviável para a boa fixação e desenvolvimento celular. Apesar disso, estas matrizes não podem ser catalogadas como mau substrato para cultura celular. Convém lembrar que as células utilizadas – as HFFF2 – são células humanas primárias, muito mais difíceis de cultivar do que as células utilizadas preferencialmente em estudos deste género que provêm de roedores e sofrem um processo de imortalização (é caso disso as 3T3).

3.4. Modelo contínuo de fiação húmida

Através de medições de diâmetro e testes de tracção foi possível caracterizar as fibras obtidas a partir do circuito contínuo de fiação húmida. Os resultados são apresentados na tabela 29.

Tabela 29 – Valores de diâmetro, módulo de Young e tensão de quebra para fibras de CS 3% produzidas no modelo contínuo de fiação húmida

Parâmetro	Valor Médio	Desvio Padrão	Desvio Padrão em %
Diâmetro / μm	44	3	8
Módulo de Young / MPa	13847	1455	11
Tensão de Ruptura / N/mm^2	204	21	10

Como se pode constatar, as fibras obtidas neste modelo apresentam propriedades mecânicas bastante satisfatórias.

Em termos de diâmetro, comparando com as fibras de CS a 3% produzidas anteriormente, notamos uma ligeira diminuição do valor (passa de $54\mu\text{m}$ para $44\mu\text{m}$). Esta variação deve-se à

maior tensão aplicada na fibra através deste modelo de fiação em contínuo: passando pelos vários rolos a fibra estará sujeita a mais forças aplicadas.

No que concerne ao módulo de Young e à tensão de ruptura, em comparação com as fibras de CS a 3% produzidas no modelo simples, estas fibras que passaram pelo circuito contínuo de fiação apresentam valores superiores, sendo que o módulo de Young passa de 5,5GPa para 13,8GPa e a tensão de ruptura passa de 89N/mm² para 204N/mm², o que representa em ambos os casos um aumento de mais de duas vezes. Estas características são adquiridas devido ao novo tratamento a que as fibras estão sujeitas: no modelo de fiação em contínuo as fibras sofrem uma maior tensão aplicada, devido à força exercida pela série dos seis rolos colectores. Como já se constatou anteriormente, esta tensão aplicada vai ser benéfica para as propriedades mecânicas da fibra. Para além disso, devido aos banhos de coagulação e secagem serem seguidos sem interrupção do processo, as fibras coagularão e desidratarão em seguida mais facilmente, não permanecendo nos banhos tanto tempo como no sistema simples, o que trará vantagens aquando da sua secagem na folha de acetato: para além de, devido à desidratação, a fibra não colar ao acetato, esta consegue adquirir características bastante melhores que as fibras secas depois de produzidas no modelo de fiação simples e passadas num banho de metanol posteriormente, nomeadamente maior módulo de Young e maior tensão de ruptura.

Em suma, pode-se concluir que o modelo de fiação contínuo projectado e construído permite imprimir às fibras melhores propriedades mecânicas, tornando-as assim mais resistentes à tracção e aumentando a sua ductilidade.

4. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS FUTURAS

Os grandes objectivos desta dissertação prendiam-se com a produção de fibras de quitosano por fiação húmida, análise das propriedades das fibras produzidas e optimização das suas características, bem como do sistema de fiação.

Primeiramente, foram preparadas soluções de quitosano de média e alta massa molecular a 2%, 3% e 4% dissolvidas em ácido acético a 2%. Observou-se que as soluções com maior concentração se tornavam inviáveis para fiação, já que eram demasiado viscosas e tinham muitas bolhas de ar e que as fibras obtidas a partir das soluções a 2% eram bastante frágeis e quebradiças, não sendo possível obter pedaços aceitáveis para testes de tracção. A partir das soluções a 3% conseguiram-se produzir fibras com uma boa estrutura e passíveis de ser submetidas a testes de tracção. Assim, concluiu-se que a concentração de 3% de quitosano é a ideal para fiação húmida.

Foram então feitos testes mecânicos às fibras de CS M e L a 3% que revelaram que apesar de ambas terem diâmetros muito próximos, o módulo de Young das fibras de CS M é bastante superior ao das fibras de CM L ($9,0 \pm 1,5 \text{ GPa}$ contra $3,2 \pm 0,9 \text{ GPa}$), tornando assim o peso molecular médio do quitosano o melhor para utilizar.

Os testes seguintes focaram-se na variação da velocidade de enrolamento da fibra e no tipo de secagem. No primeiro caso adoptou-se uma velocidade imprimida por uma tensão correspondente a 1,35X, 1,7X e 2X a velocidade de saída do quitosano. Dos testes de tracção feitos concluiu-se que a velocidade de enrolamento poderá influenciar ligeiramente as propriedades das fibras devido às diferentes tensões a que estarão sujeitas, apesar dos resultados obtidos não serem estatisticamente significativos, devido aos grandes desvios padrão associados. Para o estudo sobre os tipos de secagem resolveu testar-se três modelos: esferovite com pregos e fibras em folha de acetato com e sem tensão. Descobriu-se que as fibras ao secar sem uma tensão aplicada ganham em termos de diâmetro mas o seu módulo de Young reduz bastante. Portanto, os métodos da esferovite e da folha de acetato são os mais indicados. Tendo em conta a facilidade de execução e o menor desvio padrão associado à medição de diâmetros adoptou-se o método da secagem em folha de acetato.

Atingindo as condições base ideais, procedeu-se à optimização das fibras produzidas. O primeiro passo foi a adição de um polímero – o PEO. Utilizando PEO de duas massas moleculares diferentes (5M e 8M), adicionou-se uma pequena percentagem (0.3%) à solução de CS e produziram-se fibras. Os resultados obtidos são bastante lineares: o diâmetro diminui com a adição do PEO e com o aumento da massa molecular do polímero e o módulo de Young e tensão de ruptura aumentam com os mesmos factores. Isto vem de acordo com a teoria de adição do PEO ao CS: este composto aumenta a resistência à tensão e a ductilidade das fibras.

Para caracterizar melhor este aditivo, analisaram-se quimicamente as fibras de CS e CS+PEO através de espectroscopia de infra-vermelhos. Chegou-se à conclusão que devido à pequena percentagem utilizada, não se conseguem identificar nos espectros das misturas os picos característicos do PEO. Como teste final de certificação que o polímero estava presente nas fibras analisou-se a sua estrutura através de microscopia electrónica de varrimento. As imagens obtidas revelam que existe uma ténue variação na superfície das fibras onde foi adicionado o polímero: ficam mais lisas, o que se deve à capacidade do PEO de se orientar quando sujeito a tracção.

O passo seguinte da optimização foi a variação do aditivo utilizado, a variação do solvente para o CS e o aquecimento do banho de coagulação. Prepararam-se soluções de CS com glicerol e PEG 300. Os resultados dos testes feitos revelam que tal como o PEO estes aditivos também funcionam como fluidificante das fibras, conferindo-lhes um menor diâmetro mas um maior módulo de Young e tensão de ruptura, o que significa uma maior capacidade de suportar deformação.

Outro dos parâmetros em estudo foi o solvente utilizado para diluir o CS e então substituiu-se o ácido acético pelo ácido láctico. As fibras resultantes revelaram um diâmetro menor, uma tensão de ruptura ligeiramente maior e um módulo de Young muito superior, o que se pode dever à maior acidez do ácido láctico.

Finalmente, aqueceu-se o banho de coagulação até uma temperatura entre 42°C e 45°C. Para os três tipos de fibras produzidos (CS, CS+glicerol e CS em ácido láctico) os resultados são coincidentes com diminuição do diâmetro e aumento do módulo de Young e da tensão de ruptura. Ao visualizar o processo de fiação chega-se à razão destas mudanças: no banho aquecido a fibra coagula muito mais depressa (quase imediatamente ao sair da agulha). Isto vai fazer com que as fibras sejam sujeitas a uma tensão maior, adquirindo assim melhores características mecânicas.

Assim, depois deste estudo pode-se afirmar que as fibras com melhores características são obtidas a partir de uma solução de CS a 3%, dissolvido em ácido láctico a 2% e coaguladas em NaOH aquecido a uma temperatura entre 42°C e 45°C.

Sabendo assim quais as melhores fibras para trabalhar, procedeu-se ao estudo dos factores pH e hidratação. Sujeitaram-se porções de fibras a ciclos de secagem e re-hidratação e os resultados são bastante explícitos. Em relação ao pH, a fibra inicial encontra-se básica devido ao NaOH e passado um ciclo de hidratação e nova secagem atinge um valor quase neutro – factor indispensável para a não toxicidade em contacto com o organismo. Em relação à hidratação concluiu-se que no primeiro ciclo as fibras são capazes de absorver bastante água e aumentar entre 11 e 12 vezes a sua massa. Contudo, depois de nova secagem, ao serem novamente hidratadas as fibras perdem drasticamente a capacidade de absorção (a massa apenas aumenta 4 vezes, aproximadamente). Fizeram-se então testes de tracção às fibras após re-hidratadas e os resultados estão de acordo com o esperado: existe uma clara diminuição do módulo de Young e da tensão de ruptura, o que indica a maior rigidez que a fibra adoptou.

Seguidamente, produziu-se uma matriz a partir das fibras estudadas como ideais e fizeram-se culturas celulares, para averiguar a capacidade de proliferação das células num meio composto por microfibras. Os resultados foram desanimadores, já que não se conseguiu detectar um bom crescimento celular nas matrizes. Analisando-as em SEM, foi possível tirar algumas conclusões: ao adicionar água à matriz para baixar o valor de pH, as fibras fundiram-se, não deixando espaços nem superfície favorável para as células se fixarem. Apesar destes resultados, estas matrizes não estão excluídas como material para cultura celular. Alguns estudos feitos revelaram que uma matriz de microfibras como base e nanofibras obtidas por electrofiação conferem uma estrutura bastante favorável para as células crescerem.

O último objectivo da dissertação passou por projectar e montar um sistema contínuo de fiação húmida. Conseguiu criar-se o modelo e pô-lo em funcionamento. Foram produzidas fibras de CS a 3%, que apresentaram propriedades mecânicas bastante superiores às que foram descritas anteriormente. Esta variação deve-se à maior tensão aplicada pelo sistema de seis rolos colectores seguidos e à continuidade entre coagulação e desidratação. Desta forma, pode-se afirmar que o sistema projectado e construído apresenta resultados muito satisfatórios, pois as fibras produzidas no mesmo revelam uma maior resistência à tracção e uma maior ductilidade.

Este sistema vai melhorar bastante o processo de fiação húmida, pois permite produzir fibras com melhores propriedades mecânicas que o sistema simples, daí ser bastante relevante continuar a desenvolvê-lo. O mais importante será resolver o problema da rotação dos motores. Isto pode passar por uma nova configuração de acoplamento, utilizando mais correias e rodas dentadas ou pela utilização de amplificadores operacionais para regular a tensão no motor. Depois de resolvido o problema, poder-se-á maximizar a produção, o que pode por exemplo passar pela inclusão de um injector que produza maior quantidade de fibra no mesmo intervalo temporal.

Noutra vertente de investigação, pode-se criar um programa computadorizado que permita controlar os vários parâmetros envolvidos no sistema contínuo de fiação, sendo que a velocidade de cada rolo destaca-se como o mais importante.

Em relação à melhoria das características das fibras, podem-se testar mais aditivos (PVA ou acetato de celulose, por exemplo) ou os mesmos mas no sistema de fiação em contínuo e tentar garantir melhores propriedades do que as estudadas. Será também interessante estudar o processo de degradação destas fibras, com vista à sua utilização como fios de sutura.

Finalmente, é importante repensar o método de produção das matrizes tridimensionais, que para além de ser bastante rudimentar já revelou falhas graves. Uma solução passa pela integração das referidas nanofibras na estrutura das microfibras. Esta aplicação está a ser estudada e os primeiros resultados são satisfatórios. Quando se conseguir uma matriz viável para culturas celulares, pode-se então proceder a testes *in vitro* e *in vivo* que viabilizem as matrizes à base de microfibras de quitosano como um bom meio de cultura.

5. BIBLIOGRAFIA

Allan, G. G., J. R. Fox, G. D. Crosby & K. V. Sarkanen. 1977. Chitosan, a mediator for fiber-water interactions in paper. Seattle: College of Forest Resources, University of Washington Press.

Assis, O. B. G. & D. de Brito (2008) Processo básico de extração de quitinas e produção de quitosana a partir de resíduos da carcinicultura. In *Revista Brasileira de Agrociência*, 14, 91-100.

Aranaz, I., M. Mengíbar, R. Harris, I. Paños, B. Miralles, N. Acosta, G. Galed & Á. Heras (2009) Functional Characterization Of Chitin And Chitosan. In *Current Chemical Biology*, 3, 203-230.

Azevedo, V. V. C., S. A. Chaves, D. C. Bezerra, M. V. Lia Fook & A. C. F. M. Costa (2007) Quitina e Quitosana: aplicações como biomateriais. *Revista Eletrônica de Materiais e Processos*, v.2.3, 27-34.

Barbucci, R. 2002. Integrated Biomaterials Science. New York: Kluwer Academic/Plenum Publishers.

Boretos, J. W. & M. Eden. 1984. Contemporary Biomaterials, Material and Host Response, Clinical Applications, New Technology and Legal Aspects. William Andrew Publishing/Noyes.

Bronzino, J. D & J. Y. Wong. 2006. Biomaterials. In *The Biomedical Engineering Handbook*. CRC Press.

Bronzino, J. 2006. Biomedical Engineering Fundamentals. In *The Biomedical Engineering Handbook*. 3rd edition. CRC Press.

Bronzino, J. 2008. Tissue Engineering. 1st edition – Mar 25. Academic Press. London, UK.

Bronzino, J. D. & J. B. Park. 2003. Biomaterials. In *Principles and Applications*. CRC Press.

Callister Jr., W. D. 2005. Fundamentals of Materials Science and Engineering. In *An Integrated Approach*. John Wiley & Sons, Inc.

Collier, J. R., S. Petrovan & T. G. Rials. 2006. Cellulosic Carbon Fiber Precursors from Ionic Liquid Solutions. In *2006 Progress Report*. EPA.

David, M. A. & G. S. Henry. 1996. Glycerol: A Jack of All Trades. In *The Chemistry Hall of Fame*. North York (Toronto), Ontario.

Davis, J. R. 2003. Overview of Biomaterials and Their Use in Medical Devices. In *Handbook of Materials for Medical Devices*. ASM International.

Dee, K. C., D. A. Puleo & R. Bizios. 2003. An Introduction to Tissue-Biomaterial Interactions. John Wiley & Sons, Inc.

Ducheyne, P. & D. H. Kohn (1992) Materials for Bone and Joint Replacement. In *Materials Science and Technology – A Comprehensive Treatment*, 14, 29-109.

- El-Tahlawy, K. & S. M. Hudson (2005) Chitosan: Aspects of Fiber Spinnability. In *Wiley InterScience online* (www.interscience.wiley.com).
- Fisher, J. P., A. G. Mikos & J. D. Bronzino. 2006. *Tissue Engineering*. CRC Press.
- Freshney, R. I. 2005. *Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique*. 5th edition. John Wiley & Sons, Inc.
- Freshney, R. I. 2006. Basic Principles of Cell Culture. In *Culture of Cells for Tissue Engineering*. John Wiley & Sons, Inc.
- Habash, R. <http://www.g9toengineering.com/engineering/biomedical.htm>, 19/09/2011.
- Henning, T. (2002) Polyethylene Glycols (PEGs) and the pharmaceutical industry. In *Fine, Specialty & Performance Chemicals*, 57-57.
- Hirano, S. (2001) Wet-spinning and applications of functional fibers based on chitin and chitosan. *Macromolecular Symposia*, 168, 21-30.
- Jayakumar, R., S. V. Nair, T. Furuike & H. Tamura. 2010. Perspectives of Chitin and Chitosan Nanofibrous Scaffolds in Tissue Engineering. In *Tissue Engineering*. InTech.
- João, C. 2010. Produção de microfibras compósitas de Quitosano e Hidroxiapatite pela Técnica de Fiação Úmida – Tese de Mestrado Integrado em Engenharia Biomédica. Monte de Caparica: FCT/UNL.
- Khor, E. & L. Y. Lim (2003) Implantable applications of chitin and chitosan. *Biomaterials*, 24, 2339-2349.
- Knaul, J. Z. & K. A. M. Creber (1997) Coagulation Rate Studies of Spinnable Chitosan Solutions. In *Journal of Applied Polymer Science*, 66, 117-127.
- Knaul, J., M. Hooper, C. Chanyi & K. A. M. Creber (1998) Improvements in the drying process for wet-spun chitosan fibers. *Journal of Applied Polymer Science*, 69, 1435-1444.
- Kolhe, P. & R. M. Kannan (2002) Improvement in Ductility of Chitosan through Blending and Copolymerization with PEG: FTIR Investigation of Molecular Interactions. In *Biomacromolecules*, 4, 173-180.
- Kumar Dutta, P., J. Dutta & V. S. Tripathi (2004) Chitin and Chitosan: Chemistry, properties and applications. In *Journal of Scientific & Industrial Research*, 63, 20-31.
- Lefteri, C. 2008. *The Plastics Handbook*. RotoVision.
- Mohd Nasir, N. F., N. M. Zain, M. G. Raha & N. A. Kadri (2005) Characterization of Chitosan-poly (Ethylene Oxide) Blends as Haemodialysis Membrane. In *American Journal of Applied Sciences* 2, 12, 1578-1583.
- Moscatiello, R. 2011. <http://www.implantodontia.blog.br>. 19/09/2011.
- Park, J. & R. S. Lakes. 1992. *Biomaterials: An Introduction*. 3rd edition. Springer.

Patil, S. S. & V. V. Mane (2009) Biomedical Engineering. *International Journal of Recent Trends in Engineering*, Vol. 1, no. 2, 125-127.

Paulino, A. T., J. I. Simionato, J. C. Garcia & J. Nozaki (2006) Characterization of chitosan and chitin produced from silkworm crysalides. *Carbohydrate Polymers*, 64, 98-103.

Polikar, R. 2004. Principles of Biomedical Systems and Devices. Rowan Electrical & Computer Engineering Class.

Ravi Kumar, M. N. V. (1999) Chitin and chitosan fibres: A review. In *Bulletin of Material Science*, Vol. 22, no. 5, 905-915.

Reyes-Guerra, D. R. & A. M. Fischer. 1985. Engineering High-tech Student's Handbook. Peterson's Guides.

Rinaudo, M. (2006) Chitin and Chitosan: Properties and applications. *Progress in Polymer Science*, 31, 603-632.

Saboormaleki, M., A. R. Barnes & W. S. Schlindwein. 2004. Characterization of Polyethylene Oxide (PEO) Based Polymer Electrolytes. Abs. 726, 205th Meeting. The Electrochemical Society, Inc.

Shi, D. 2006. Introduction to Biomaterials. Tsinghua University Press.

United States Pharmacopeial Convention. <http://www.usp.org/>, 19/09/2011.

Wang, G., Q. Ao, K. Gong, A. Wang, L. Zheng, Y. Gong & X. Zhang (2010) The effect of topology of chitosan biomaterials on the differentiation and proliferation of neural stem cells. In *Acta Biomaterialia*, 6, 3630-3639.

Williams, D. F. 1999. The Williams Dictionary of Biomaterials. Liverpool University Press. Liverpool, UK.

Wise, D. L. 2003. Biomaterials and Bioengineering Handbook. CRC Press.

Zivanovic, S., J. Li, P. M. Davidson & K. Kit (2007) Physical, Mechanical and Antibacterial Properties of Chitosan/PEO Blend Films. In *Biomacromolecules*, 8, 1505-1510.

ANEXOS

ANEXO A - PROTOCOLOS

- **A1 – Preparação das soluções de quitosano**

1. Cobrir o fundo de um balão volumétrico de 100ml com água destilada;
2. Com uma pipeta, adicionar 2ml de CH_3COOH ;
3. Juntar água destilada até perfazer os 100ml;
4. Colocar um frasco para preparação de soluções na balança e tarar;
5. Adicionar CS de acordo com a concentração pretendida (0,2g para 2%, 0,3g para 3% e 0,4g para 4%);
6. Juntar a solução de CH_3COOH até perfazer 10g;
7. Identificar a solução e repetir a partir do passo 4 para as concentrações e pesos moleculares pretendidos.

- **A2 – Preparação do banho de coagulação**

1. Cobrir o fundo de um balão volumétrico de 1000ml com água destilada;
2. Colocar o balão na balança e tarar;
3. Adicionar 40g de NaOH;
4. Juntar água destilada até perfazer os 1000ml;
5. Agitar até as *pellets* de NaOH estarem completamente dissolvidas e se necessário juntar água destilada para acertar os 1000ml no balão;
6. Num balão volumétrico de 1000ml, juntar 700ml da solução de NaOH preparada e 300ml de CH_3OH e agitar.

- **A3 – Protocolo de fiação húmida**

1. Introduzir a solução de quitosano na seringa, limpando-a bem para não deixar vestígios no exterior;
2. Colocar a agulha dobrada a 90° na seringa e seguidamente na bomba infusora;
3. Nos parâmetros variáveis da bomba, seleccionar o caudal de 20 ml/h e o diâmetro correspondente ao da seringa – 9,43mm;
4. Inserir o eixo de rotação no rolo de teflon e ligar ao motor. Deixar algum espaço entre o rolo e a parede da tina de alumínio, para se poder manobrar a fibra;
5. Verter cuidadosamente o banho de coagulação na tina de alumínio, de forma a cobrir a agulha e em contacto com o rolo de teflon;
6. Na fonte de alimentação inserir a tensão de 2,41V, recomendada por estudos anteriores;
7. Ligar a bomba infusora;

8. Nos primeiros instantes é possível que saiam pequenas bolhas de quitosano. Com uma pinça retirá-las até garantir a produção de uma fibra contínua e sem irregularidades;
 9. Ao atingir este ponto, tem de se orientar a fibra para o colector. Com uma pinça puxar a ponta da fibra para o rolo de teflon na direcção de enrolamento;
 10. A partir daqui, o processo é automático, passando a fibra pelo banho de coagulação durante aproximadamente 4 segundos e sendo enrolada no colector giratório;
 11. Quando a solução na seringa acabar, desligar a bomba;
 12. Retirar o rolo de teflon com a fibra enrolada do eixo de rotação e mergulhá-lo numa taça com o primeiro banho de secagem (solução coagulante);
 13. Cuidadosamente, com a pinça, fazer deslizar as fibras até saírem do rolo e passarem para o banho;
 14. Retirar o colector e deixar as fibras no primeiro banho de secagem durante uma hora;
 15. Ao perfazer esse tempo, transferir as fibras do primeiro para o segundo banho de secagem (50% metanol e 50% água destilada), deixando-as assim durante três horas;
 16. No final das três horas, transferir novamente as fibras para o último banho de secagem (100% metanol) e deixar 24 horas.
- **A4 – Preparação de soluções de quitosano e PEO**
 1. Cobrir o fundo de um balão volumétrico de 100ml com água destilada;
 2. Com uma pipeta, adicionar 2ml de CH_3COOH ;
 3. Juntar água destilada até perfazer os 100ml;
 4. Colocar um frasco para preparação de soluções na balança e tarar;
 5. Adicionar 0,3g de CS e 0,03g de PEO 5M;
 6. Juntar a solução de CH_3COOH até perfazer 10g;
 7. Identificar a solução e repetir a partir do passo 4 para PEO 8M.
 - **A5 – Preparação das pastilhas de KBr para FT-IR**
 1. Num almofariz desfazer uma porção de fibras até ficarem reduzidas a pó;
 2. Num vidro de relógio pesar 10mg das fibras desfeitas;
 3. Juntar KBr até perfazer 100mg;
 4. Colocar o preparado no recipiente adequado e prensar durante 5 minutos;
 5. Retirar a pastilha com cuidado, colocar no suporte de FT-IR e fazer a leitura.

• **A6 – Preparação das soluções de quitosano e glicerol, quitosano e PEG, quitosano em ácido láctico e banhos aquecidos**

1. Cobrir o fundo de um balão volumétrico de 100ml com água destilada;
2. Com uma pipeta, adicionar 2ml de CH_3COOH ;
3. Juntar água destilada até perfazer os 100ml;
4. Repetir os passos de 1 a 3 noutra balão volumétrico, adicionando 2,2ml de $\text{C}_3\text{H}_6\text{O}_3$ no passo 2;
5. Colocar um frasco para preparação de soluções na balança e tarar;
6. Adicionar 0.3g de CS;
7. Juntar a solução de CH_3COOH até perfazer 10g;
8. Identificar a solução e repetir a partir do passo 5 para os restantes parâmetros (adicionar 0,3g de CS e 0,03g $\text{C}_3\text{H}_8\text{O}_3$ para o teste com glicerol; adicionar 0,3g de CS e 0,03g de PEG 300 para o segundo factor; juntar $\text{C}_3\text{H}_6\text{O}_3$ no passo 7 até perfazer 10g para o teste com outro solvente).

• **A7 – Produção de uma matriz com fibras de quitosano**

1. Colar numa folha de acetato duas tiras de fita-cola dupla face, paralelas e separadas por 4cm, aproximadamente;
2. Entre as tiras de fita-cola verter um pouco da solução de quitosano e espalhar ligeiramente, de modo a obter uma camada fina que sirva de base às fibras;
3. Após a fiação, retirar o rolo de teflon com as fibras da montagem e colocá-lo em metanol 100% durante alguns segundos. Não se deve largar o rolo dentro do banho e se possível deve-se aplicar alguma rotação no mesmo, para o metanol cobrir toda a sua área;
4. Com um bisturi, cortar as fibras no sentido do comprimento do colector, com cuidado para não danificar o teflon;
5. Pousar uma das pontas cortadas das fibras junto à fita-cola e desenrolar o resto sobre a película de quitosano;
6. Com uma pinça, alisar suavemente a superfície das fibras depositadas de forma a obter uma camada uniforme. Neste passo é importante ter a certeza que as fibras estão bem coladas na fita-cola, pois caso contrário a camada irá desprender e estragar a matriz;
7. Deixar a secar durante um dia;
8. Repetir os passos de 3 a 7, depositando mais duas camadas perpendiculares sobre a primeira;
9. Quando todas as camadas estiverem secas, colocar dois pedaços de fita-cola perpendiculares aos anteriores, de modo a construir um rectângulo;

10. Com o esguicho, verter água destilada nessa área de forma a cobrir a matriz na sua totalidade;
11. Medir o pH com papel indicador;
12. Com papel absorvente, limpar o excesso de água e renovar o banho, controlando o pH. Este passo deve ser repetido várias vezes até atingir um pH neutro, ou seja, o mais próximo de 7 possível.

• **A8 – Recta de calibração**

1. Aspirar o meio de cultura do T75 pelo lado oposto à superfície onde as células estão, para não as aspirar;
2. Lavar com 100µl de PBS 1x. Aspirar novamente;
3. Juntar 15µl de tripsina de forma a cobrir a superfície onde estão as células (neste ponto as células passam para P7);
4. Ir observando ao microscópio até as células estarem completamente soltas. Se formarem agregados agitar levemente a placa;
5. Suspender em 85µl de meio de cultura a 37°C;
6. Com uma pipeta de Pasteur, colocar a suspensão na câmara de um hemocitómetro;
7. Contar o número de células do quadrado central e de quatro quadrados circundantes. O número de células total da amostra é dado pela fórmula

$$N = n / (5 * V)$$

em que N é a concentração de células por µl, n representa o total de células contadas nos cinco quadrados e A é a área de cada quadrado (nos hemocítoímetros utilizados essa área é de 0.1cm²);

8. A partir do valor obtido calcular o volume necessário para obter 28000 células;
9. A partir de diluições sucessivas adicionando meio de cultura, preparar suspensões com 14000, 7000, 3500 e 1750 células;
10. Semear em poços de cultura 3 réplicas de cada concentração celular, mais 3 réplicas de controlo (meio sem células). É aconselhável ter em cada poço 100µl;
11. Deixar na estufa durante a noite;
12. Adicionar o CCK8 completamente descongelado em todos os poços numa proporção de 1:10 (para 100µl de suspensão adicionar 10µl de kit);
13. Deixar na estufa a incubar durante 2 horas;
14. Transferir 80µl para uma placa ELISA e ler no espectrofotómetro para o comprimento de onda de 450nm.

• **A9 – Preparação das matrizes para os testes *in vitro***

1. Na câmara de fluxo, humedecer levemente com água destilada a área das matrizes, para não estilhaçarem ao cortar;
2. Com uma punção, retirar círculos de 6mm de diâmetro de matriz e colocá-los nos poços de uma placa de 96, assinalando bem na tampa a sua localização;
3. Com um bisturi, recortar quadrados de matriz de aproximadamente 1cm x 1cm e colocá-los nos poços de uma placa de 24, assinalando também a sua localização;
4. Esterilizar com etanol a 70%;
5. Deixar a secar durante uma hora na câmara de fluxo, com os ultra-violeta ligados.

• **A10 – Testes de proliferação**

1. Aspirar o meio de cultura da T25 pelo lado oposto à superfície onde as células estão, para não as aspirar;
2. Fazer três lavagens com 3ml de PBS 1x. Aspirar entre as lavagens;
3. Juntar 250µl de tripsina de forma a cobrir a superfície onde estão as células (neste ponto as células passam para P11);
4. Ir observando ao microscópio até as células estarem completamente soltas. Se formarem agregados agitar levemente a placa;
5. Adicionar 3ml de meio de cultura a 37°C;
6. Com uma pipeta, retirar 10µl e colocar a suspensão na câmara de um hemocítmetro;
7. Contar o número de células do quadrado central e de quatro quadrados circundantes. O número de células é dado pela fórmula

$$N = n / (5 * V)$$

em que N é a concentração de células por µl, n representa o total de células contadas nos cinco quadrados e A é a área de cada quadrado (nos hemocítmetros utilizados essa área é de 0.1cm^2);

8. A partir do valor obtido calcular o volume necessário para obter 10000 células;
9. Colocar esse valor de suspensão nos poços indicados e juntar meio para perfazer 100µl;
10. Deixar na estufa durante 24 horas;
11. Adicionar o CCK8 completamente descongelado em todos os poços (controles inclusive) referentes às 24 horas numa proporção de 1:10 (para 100µl de suspensão adicionar 10µl de kit);
12. Deixar na estufa a incubar durante 2 horas;
13. Transferir 80µl para uma placa ELISA e ler no espectrofotómetro para o comprimento de onda de 450nm.

14. Voltar a colocar a placa de 96 poços na estufa e repetir os passos de 10 a 13 para 48 e 47 horas.

• **A11 – Fixação e coloração para observação em microscópio confocal**

1. Aspirar o meio de cultura e substituí-lo por PFA a 4% durante uma hora;
2. Lavar três vezes com PBS 1x durante 5 minutos cada lavagem;
3. Tratar com detergente triton X-100 a 0,5% durante 20 minutos;
4. Lavar três vezes com PBS 1x durante 5 minutos cada lavagem;
5. Num eppendorf colocar 1ml de PBS 1x e adicionar 2 μ l de TO-PRO3, 10 μ l de faloidina e 5 μ l de RNase. Agitar bem em câmara escura;
6. Adicionar 100 μ l da solução de corantes em cada poço e deixar durante a noite no frigorífico a incubar a 4°C;
7. Lavar novamente 3 vezes com PBS 1x durante 5 minutos cada lavagem.

• **A12 – Fixação e coloração para observação em SEM**

1. Aspirar o meio de cultura e substituí-lo por glutaraldeído a 2,5% durante 2 horas;
2. Lavar três vezes com PBS 1x durante 5 minutos cada lavagem;
3. Desidratar com diluições sucessivas de etanol – 10%, 20%, 30%, ..., 100% durante 15 minutos cada;
4. Remover o etanol e deixar na estufa durante 48 horas para secar totalmente.

ANEXO B – DIÂMETROS DAS FIBRAS

Tabela B1 – Valores de diâmetro medidos para as fibras produzidas nos estudos preliminares: variação de massa molecular do quitosano e variação do tipo de secagem (em milímetros)

Nº amostra	Massa molecular e velocidade de enrolamento				Tipos de secagem		
	CS 3L	CS M, vb	CS M, v1,7	CS M, vmáx	Esferovite	Acetato	Sem tensão
1	0.089	0.071	0.062	0.068	0.079	0.082	0.087
2	0.064	0.069	0.073	0.061	0.079	0.082	0.085
3	0.067	0.076	0.073	0.061	0.084	0.079	0.080
4	0.076	0.069	0.061	0.055	0.079	0.080	0.082
5	0.081	0.073	0.067	0.055	0.085	0.079	0.089
6	0.071	0.076	0.069	0.056	0.076	0.079	0.080
7	0.077	0.074	0.073	0.054	0.088	0.080	0.085
8	0.084	0.069	0.065	0.063	0.083	0.081	0.086
9	0.076	0.074	0.071	0.059	0.080	0.081	0.086
10	0.083	0.068	0.062	0.059	0.074	0.079	0.082
11	0.069	0.069	0.061	0.067	0.082	0.079	0.087
12	0.069	0.073	0.064	0.051	0.081	0.078	0.083
13	0.077	0.071	0.067	0.052	0.077	0.080	0.087
14	0.069	0.075	0.061	0.052	0.083	0.077	0.083
15	0.067	0.070	0.058	0.052	0.087	0.079	0.086
16	0.070	0.068	0.063	0.049	0.075	0.081	0.078
17	0.074	0.074	0.064	0.048	0.080	0.079	0.081
18	0.069	0.071	0.066	0.066	0.083	0.080	0.087
19	0.074	0.076	0.059	0.054	0.076	0.081	0.079
20	0.080	0.071	0.073	0.053	0.080	0.080	0.085
21	0.069	0.068	0.060	0.061	0.076	0.078	0.088
22	0.066	0.065	0.058	0.058	0.079	0.082	0.084
23	0.079	0.076	0.068	0.052	0.079	0.077	0.086
24	0.069	0.069	0.064	0.055	0.080	0.083	0.082
25	0.071	0.068	0.061	0.050	0.079	0.078	0.084
Média	0.074	0.071	0.065	0.056	0.080	0.080	0.084
Desvio Padrão	0.006	0.003	0.005	0.006	0.004	0.002	0.003
Desvio Padrão %	8.7	4.4	7.5	10.0	4.4	1.9	3.5

Tabela B2 – Valores de diâmetro medidos para as fibras produzidas nos estudos de otimização: banhos simples e banhos aquecidos (em milímetros)

Nº amostra	CS + PEO		Banhos simples			Banhos aquecidos		
	CS + PEO 5M	CS + PEO 8M	ác.acético	CS + Glicerol	ác.láctico	ác.acético	CS + Glicerol	ác.láctico
1	0.047	0.043	0.049	0.042	0.049	0.045	0.036	0.040
2	0.053	0.045	0.054	0.053	0.051	0.051	0.040	0.039
3	0.050	0.045	0.053	0.050	0.049	0.048	0.044	0.039
4	0.051	0.045	0.050	0.051	0.047	0.053	0.040	0.043
5	0.055	0.044	0.055	0.048	0.052	0.046	0.043	0.045
6	0.048	0.048	0.054	0.051	0.048	0.053	0.048	0.043
7	0.047	0.044	0.056	0.049	0.046	0.050	0.045	0.044
8	0.052	0.044	0.051	0.051	0.045	0.042	0.041	0.044
9	0.052	0.044	0.053	0.044	0.050	0.047	0.045	0.038
10	0.050	0.049	0.055	0.048	0.054	0.052	0.047	0.042
11	0.050	0.042	0.054	0.050	0.056	0.051	0.048	0.045
12	0.050	0.047	0.050	0.049	0.045	0.049	0.041	0.046
13	0.051	0.045	0.057	0.040	0.053	0.052	0.040	0.042
14	0.052	0.047	0.059	0.052	0.048	0.048	0.047	0.044
15	0.049	0.043	0.053	0.047	0.049	0.056	0.045	0.045
16	0.048	0.047	0.057	0.043	0.043	0.053	0.043	0.042
17	0.050	0.045	0.056	0.050	0.044	0.047	0.046	0.043
18	0.048	0.047	0.052	0.046	0.047	0.050	0.043	0.046
19	0.052	0.047	0.051	0.043	0.048	0.044	0.047	0.045
20	0.051	0.046	0.057	0.045	0.053	0.050	0.042	0.041
21	0.051	0.044	0.057	0.039	0.050	0.053	0.041	0.041
22	0.052	0.047	0.050	0.054	0.053	0.048	0.042	0.037
23	0.049	0.045	0.058	0.048	0.046	0.045	0.046	0.047
24	0.047	0.046	0.053	0.046	0.050	0.040	0.044	0.045
25	0.048	0.043	0.057	0.046	0.051	0.044	0.048	0.043
26	0.048	0.047	-	-	-	-	-	-
27	0.049	0.046	-	-	-	-	-	-
28	0.050	0.048	-	-	-	-	-	-
Média	0.050	0.046	0.054	0.047	0.049	0.049	0.044	0.043
Desvio Padrão	0.002	0.002	0.003	0.004	0.003	0.004	0.003	0.003
Desvio Padrão %	4.0	3.9	5.3	8.4	6.8	8.1	7.1	6.2

Tabela B3 – Valores de diâmetro medidos para as fibras produzidas nos estudos finais de otimização: adição de PEG, re-hidratação e modelo contínuo (em milímetros)

Nº amostra	Testes finais		
	CS + PEG 300	Re-hidratação	Modelo contínuo
1	0.047	0.048	0.047
2	0.045	0.047	0.046
3	0.043	0.045	0.045
4	0.053	0.046	0.039
5	0.05	0.052	0.042
6	0.046	0.051	0.046
7	0.049	0.049	0.041
8	0.05	0.052	0.048
9	0.049	0.05	0.042
10	0.048	0.046	0.041
11	0.052	0.047	0.037
12	0.048	0.046	0.043
13	0.053	0.045	0.044
14	0.054	0.051	0.051
15	0.054	0.052	0.043
16	0.049	0.05	0.045
17	0.048	0.045	0.048
18	0.052	0.051	0.051
19	0.05	0.052	0.039
20	0.049	0.044	0.046
21	0.046	0.048	0.043
22	0.052	0.049	0.046
23	0.05	0.05	0.043
24	0.051	0.049	0.044
25	0.048	-	0.042
Média	0.049	0.049	0.044
Desvio Padrão	0.003	0.003	0.003
Desvio Padrão %	5.7	5.4	7.9

ANEXO C – MÓDULOS DE YOUNG E TENSÕES DE QUEBRA DAS FIBRAS

Num ensaio de tracção, um corpo de prova ou provete é submetido a um esforço que tende a alongá-lo ou esticá-lo até à ruptura (figura C1).

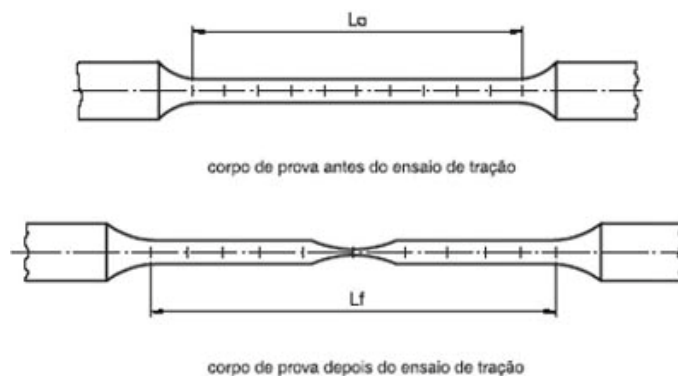


Figura C1 – Esquema ilustrativo de um corpo de prova sujeito a um ensaio de tracção
(http://www.emic.com.br/artigos.php?id_artigo=122&categoria=tecnicos&lang=16)

Geralmente, o ensaio é realizado num corpo de prova de formas e dimensões padronizadas, para que os resultados obtidos possam ser comparados ou, se necessário, reproduzidos. Este é fixado numa máquina de ensaios que aplica esforços crescentes na sua direcção axial, sendo medidas as deformações correspondentes. Os esforços ou cargas são mensurados na própria máquina, e, normalmente, o ensaio ocorre até a ruptura do material. Estes testes permitem construir gráficos *stress/strain* (ou tensão/deformação), representados na figura C2 e que permitem avaliar o comportamento do material sujeito a tensão.

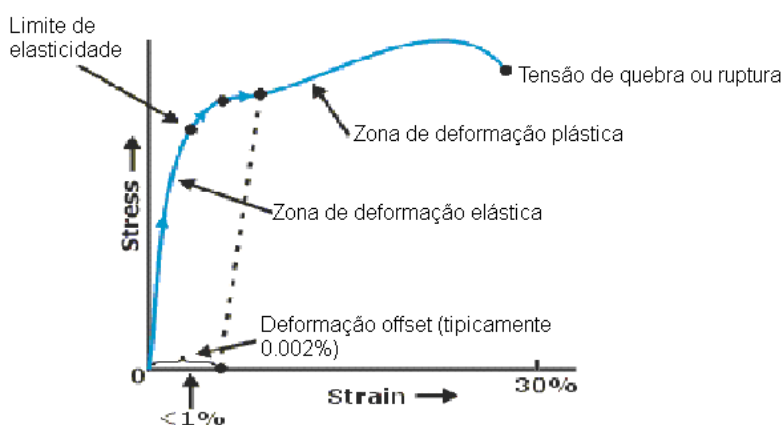


Figura C2 – Gráfico típico de tensão/deformação
(<http://www.tutorvista.com/content/physics/physics-iii/solids-and-fluids/elasticity-modulus.php>)

Na primeira zona do gráfico (zona de deformação elástica), a tensão aplicada e a deformação são proporcionais e seguem a lei de Hooke:

$$E = \frac{\sigma}{\varepsilon}$$

onde σ representa a tensão e ε representa a extensão. Nesta equação, a tensão corresponde à força aplicada por unidade de área e a extensão corresponde à razão entre a variação de comprimento e o comprimento inicial da amostra, ou seja:

$$\sigma = \frac{F}{A} \text{ e } \varepsilon = \frac{\Delta l}{l_0}$$

A constante E obtida denomina-se **Módulo de Young** e caracteriza o material em relação à sua rigidez e ductilidade. Nesta zona as deformações aplicadas no material não são permanentes e quando a carga cessa, o corpo de prova volta ao seu formato original.

A partir do limite de elasticidade o material entra numa zona de deformação plástica e a deformação criada torna-se permanente.

Com o aumento gradual da tensão o material atingirá um ponto de estricção, em que a sua estrutura ficará cada vez mais fragilizada até se partir. Ao valor em que ocorre a fractura chama-se **tensão de quebra ou ruptura**.

Para o estudo das propriedades mecânicas submeteram-se 25 amostras de cada tipo diferente de fibras a ensaios de tracção. Foram elaborados gráficos tensão/deformação para cada exemplar e feita a média de valores de módulo de Young e tensão de quebra. Como critério de aceitação de validade estatística seguiu-se a regra de 2-sigma, ou seja, excluíram-se valores acima e abaixo de duas vezes o desvio padrão (2σ). As respectivas dispersões de valores estão representadas nos gráficos deste anexo.

- **Módulos de Young**

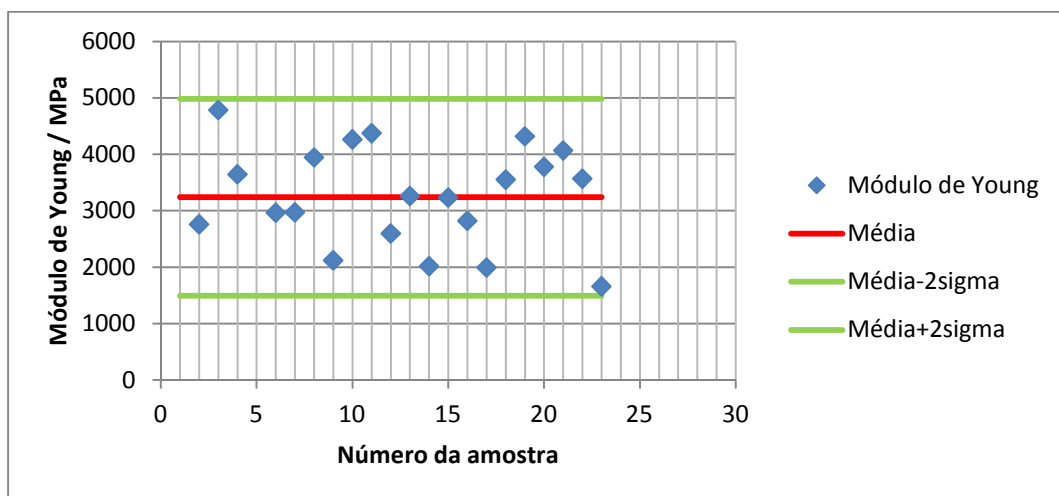


Gráfico C1 – Módulo de Young das fibras de CS L a 3%

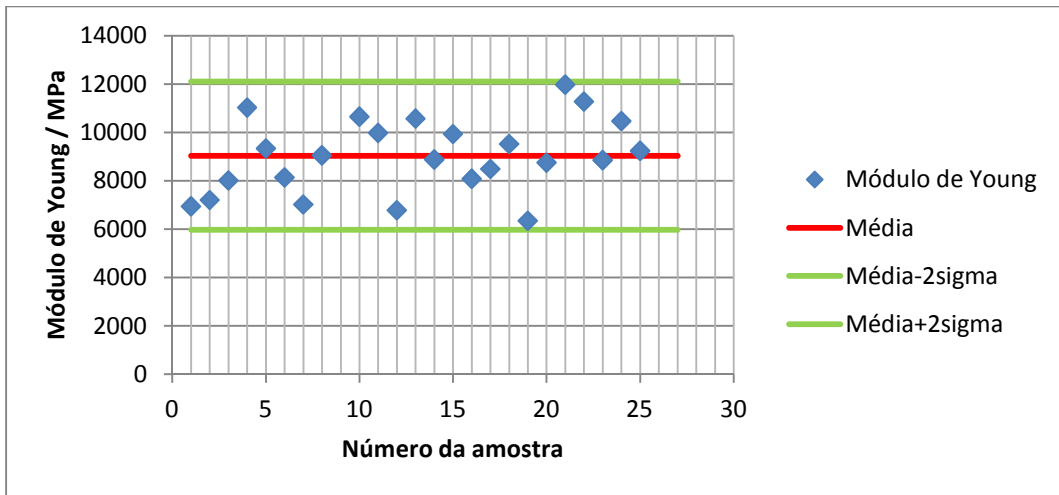


Gráfico C2 – Módulo de Young das fibras de CS M a 3%, com v_b

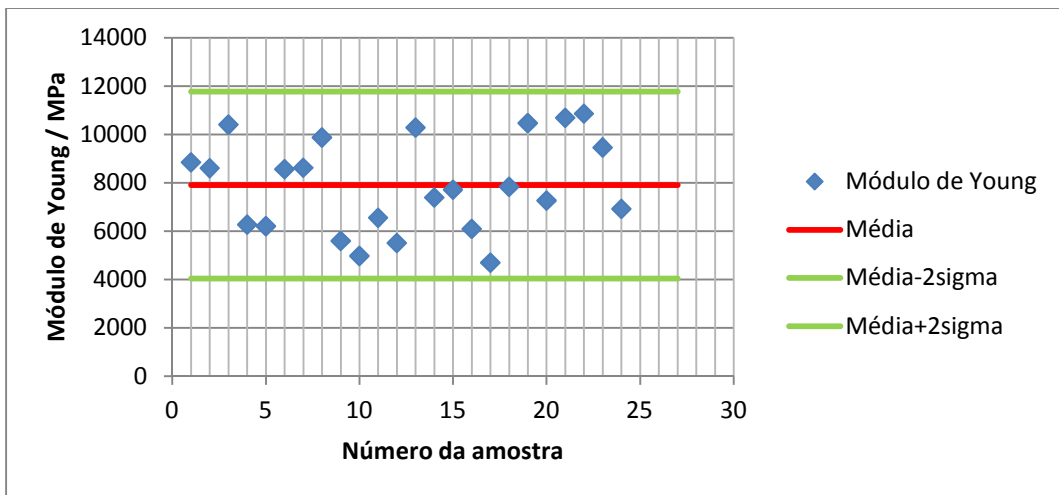


Gráfico C3 – Módulo de Young das fibras de CS M a 3%, com $v_{1,7}$

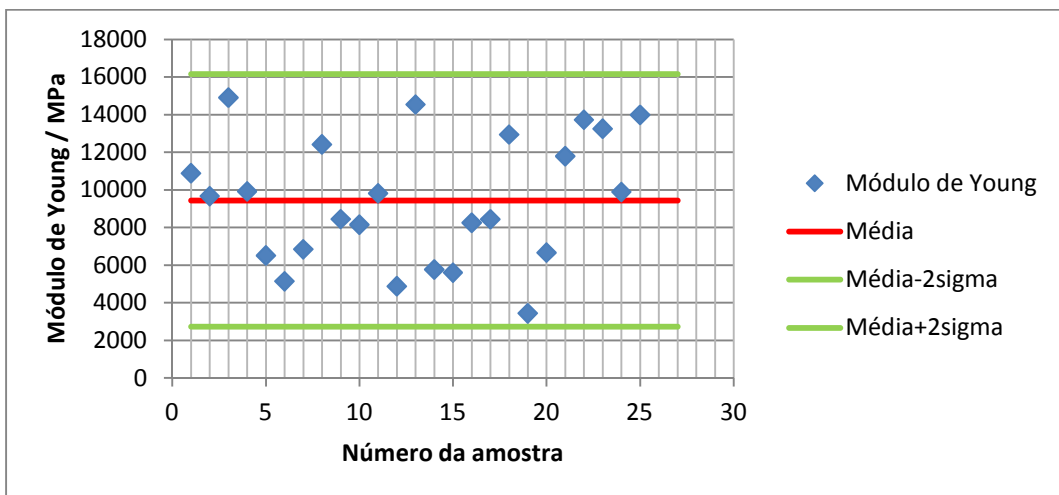


Gráfico C4 – Módulo de Young das fibras de CS M a 3%, com $v_{máx}$

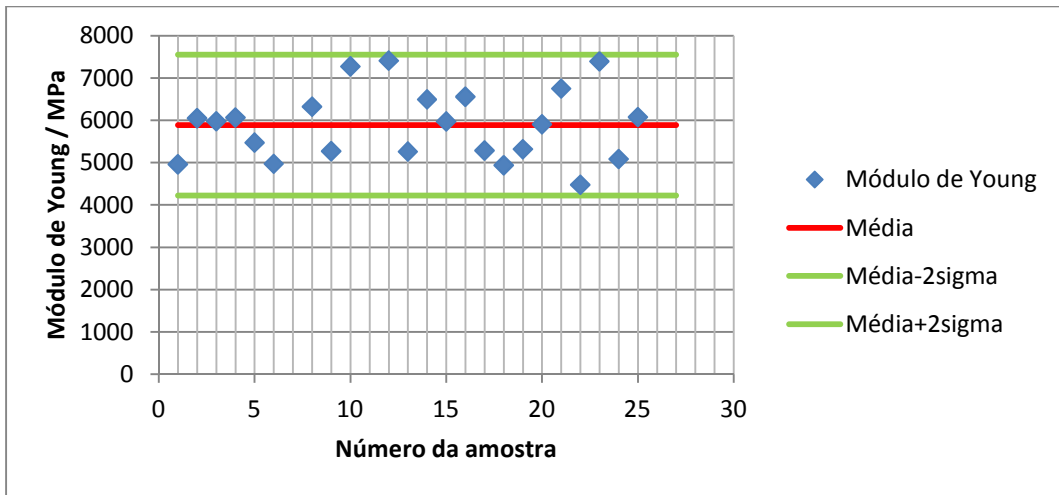


Gráfico C5 – Módulo de Young das fibras de CS M a 3% secas na folha de acetato

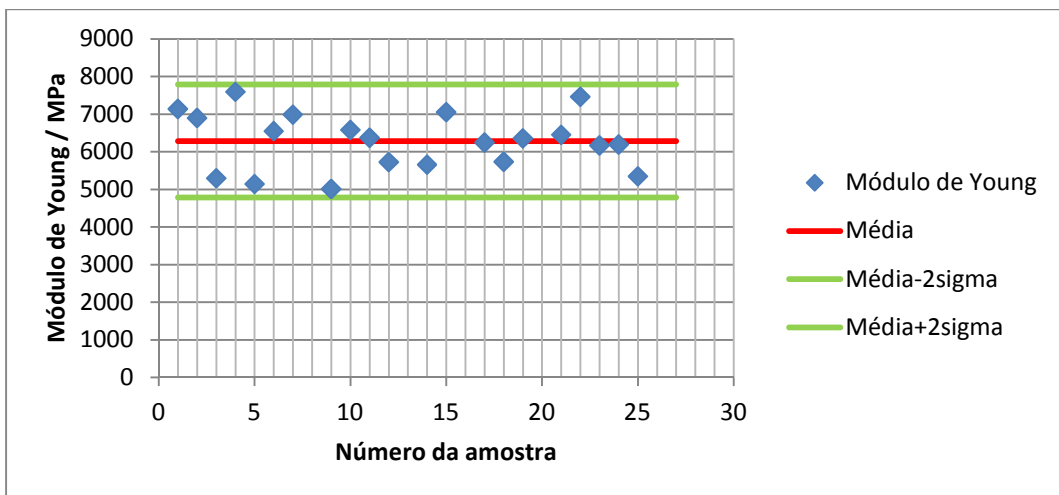


Gráfico C6 – Módulo de Young das fibras de CS a 3% secas na placa de esferovite

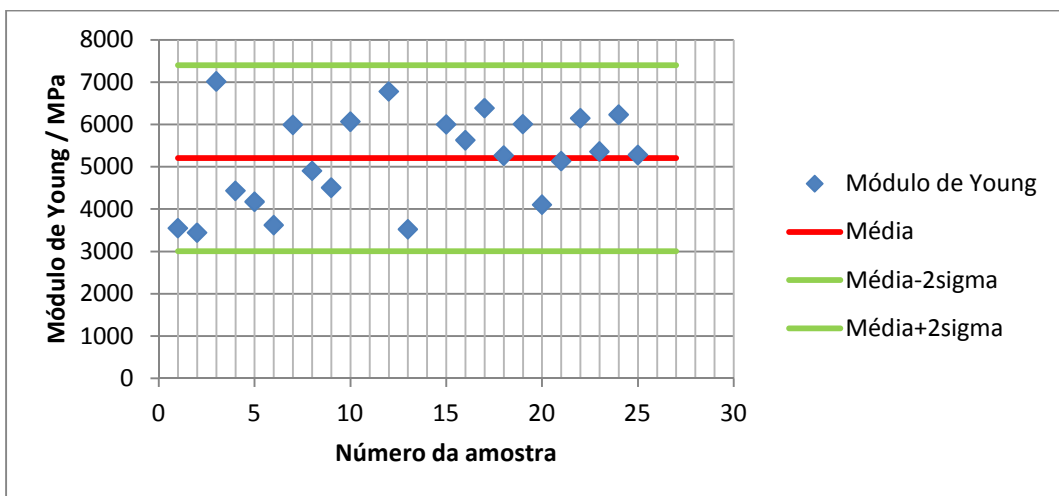


Gráfico C7 – Módulo de Young das fibras de CS M a 3% secas sem tensão

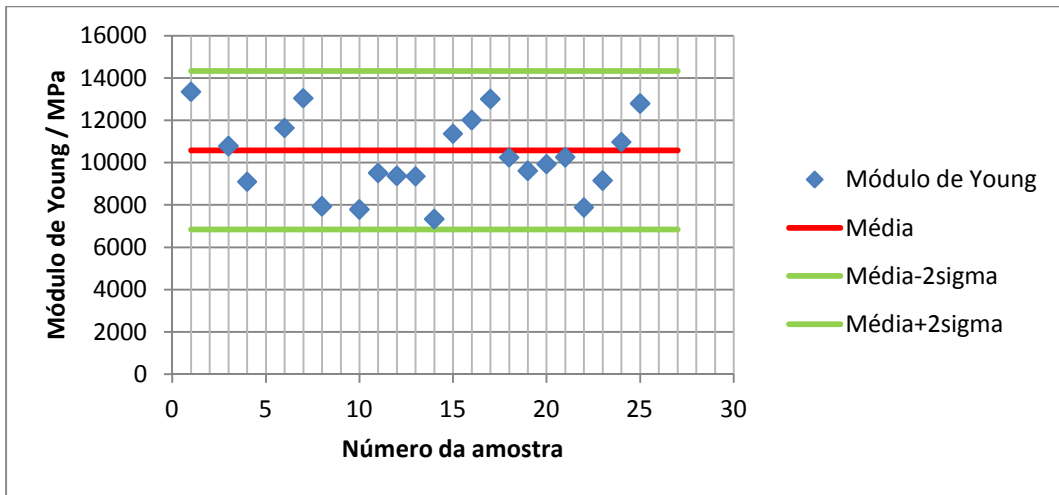


Gráfico C8 – Módulo de Young das fibras de CS M a 3% + PEO 5M a 0.3%

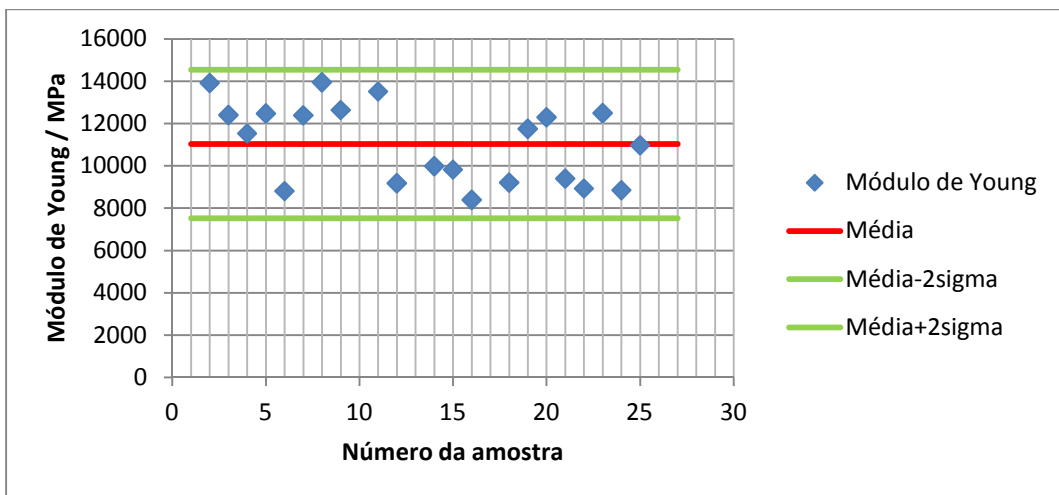


Gráfico C9 – Módulo de Young das fibras de CS M a 3% + PEO 8M a 0.3%

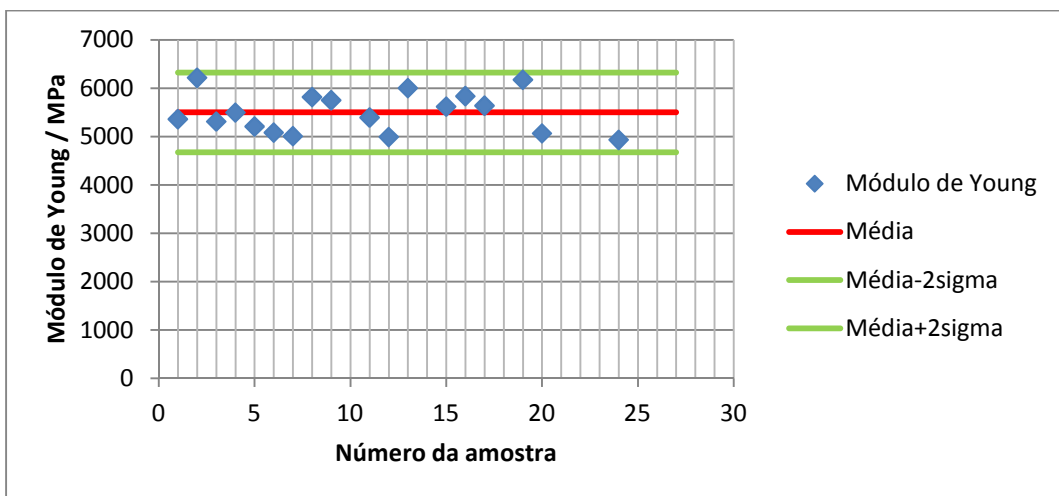


Gráfico C10 – Módulo de Young das fibras de CS S a 3% em ácido acético a 2%

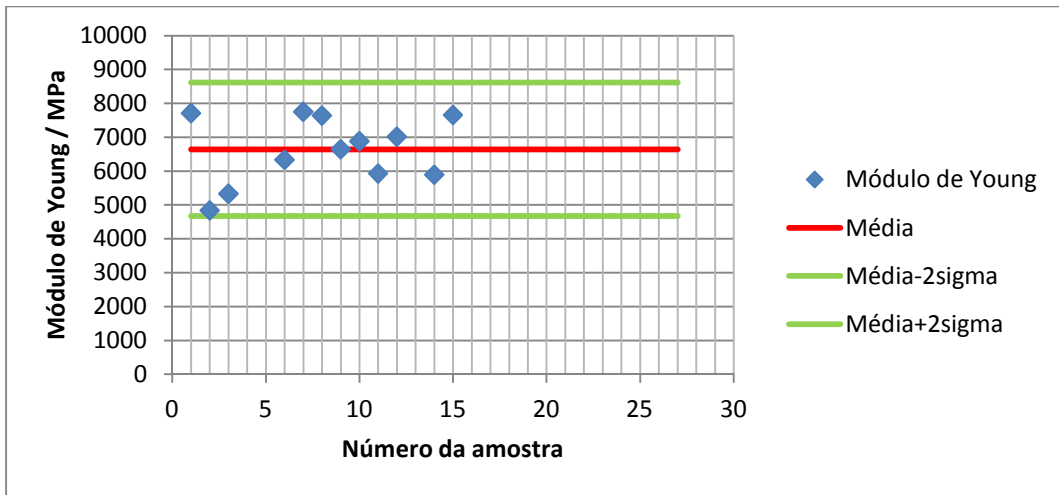


Gráfico C11 – Módulo de Young das fibras de CS S a 3% + Glicerol a 0.3%

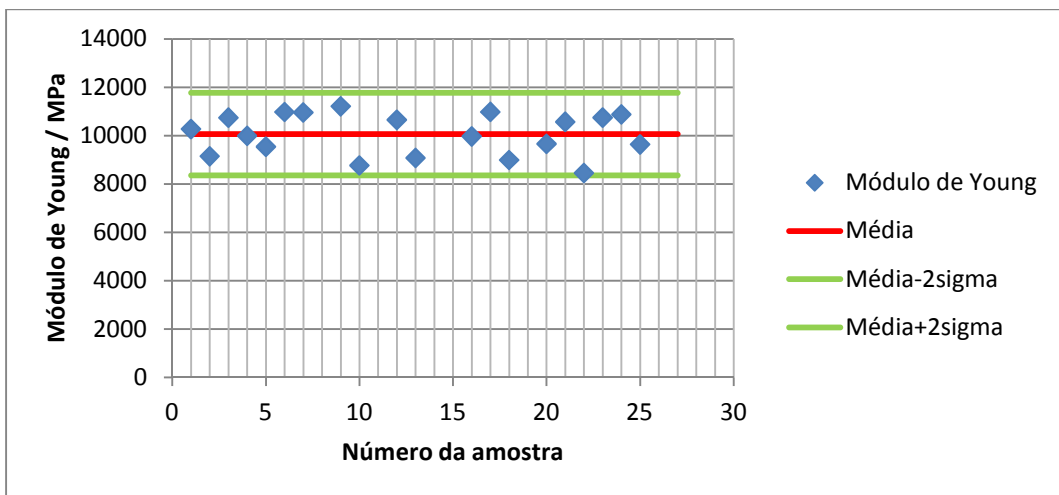


Gráfico C12 – Módulo de Young das fibras de CS S a 3% em ácido láctico a 2%

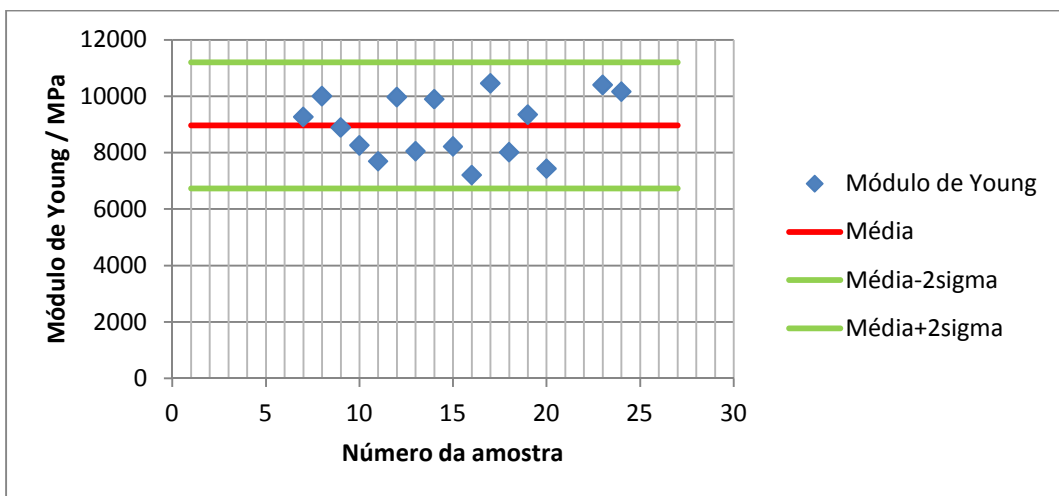


Gráfico C13 – Módulo de Young das fibras de CS S a 3% em ácido acético a 2% em banho aquecido

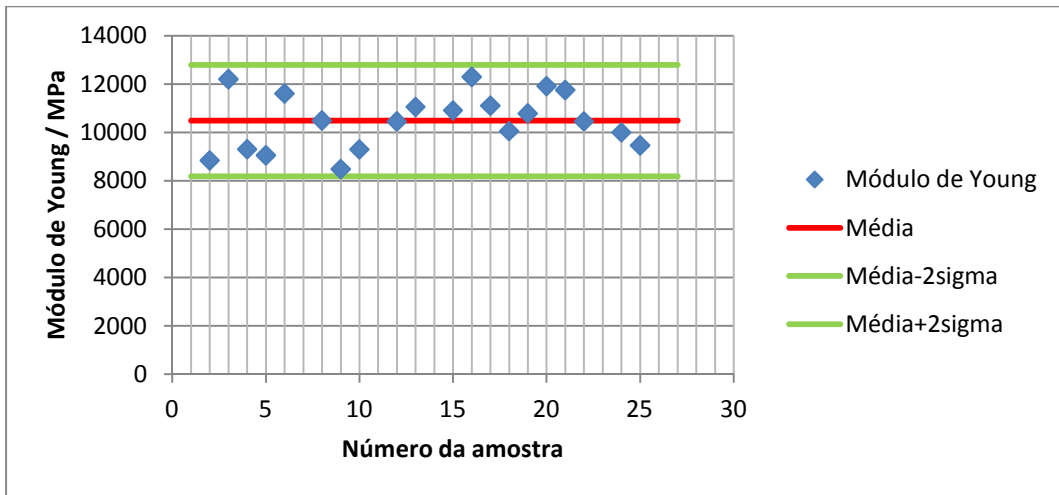


Gráfico C14 – Módulo de Young das fibras de CS S a 3% + Glicerol a 0.3% em banho aquecido

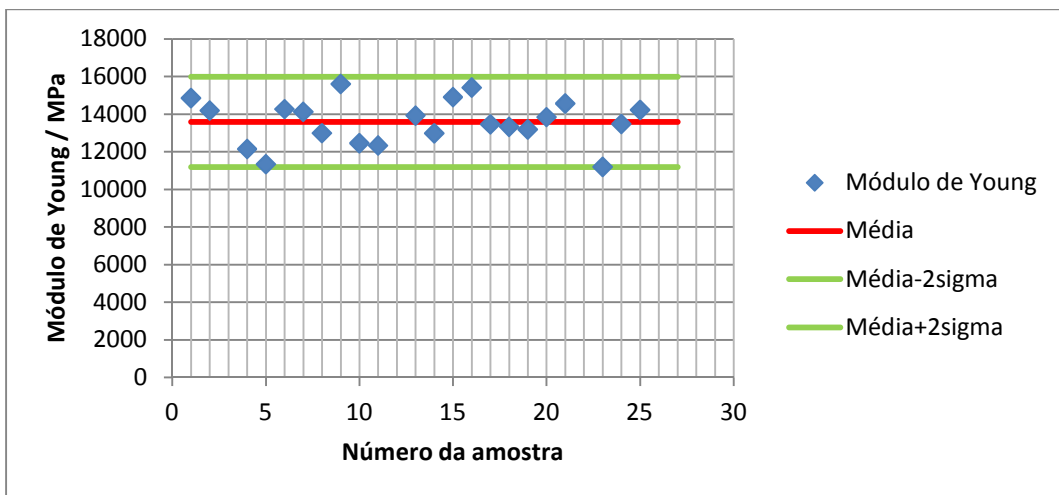


Gráfico C15 – Módulo de Young das fibras de CS S a 3% em ácido láctico a 2% em banho aquecido

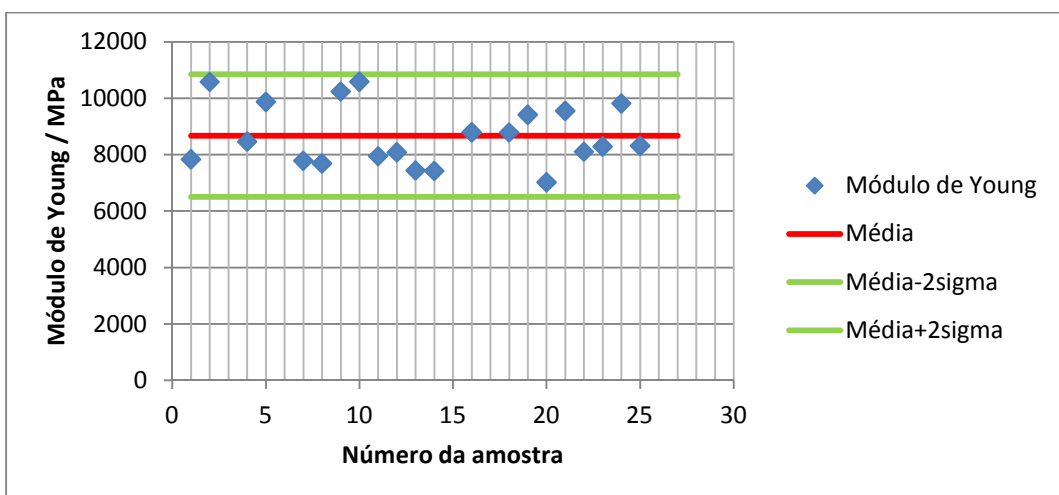


Gráfico C16 – Módulo de Young das fibras de CS S a 3% + PEG 300 a 0.3%

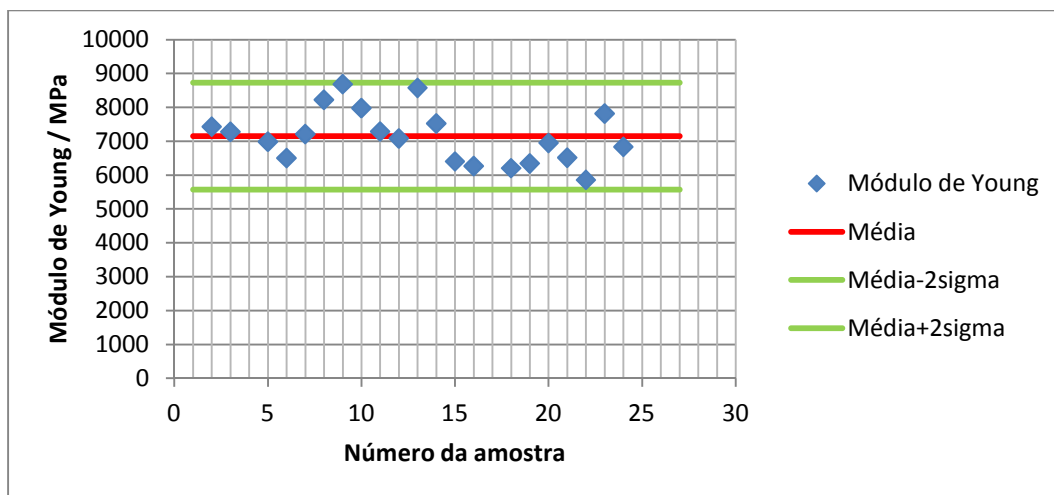


Gráfico C17 – Módulo de Young das fibras de CS S a 3% em ácido láctico a 2% em banho aquecido, após re-hidratação

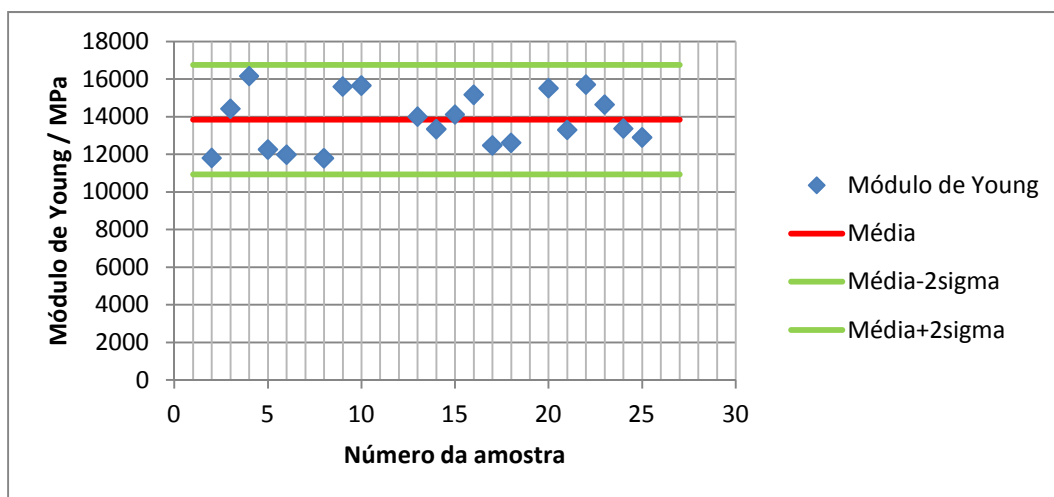


Gráfico C18 – Módulo de Young das fibras de CS S a 3% em ácido acético a 2% produzidas no modelo de fiação contínuo

Será importante ressaltar que para os gráficos C11 e C13 algumas amostras não puderam ser contabilizadas para a estatística (amostras 16 a 25 para o primeiro caso e 1 a 6 para o segundo). Este facto prendeu-se com um problema de descalibração da máquina de tracção, que levou a valores completamente afastados da média e assim ao desprezo das amostras referidas.

- **Tensões de quebra ou ruptura**

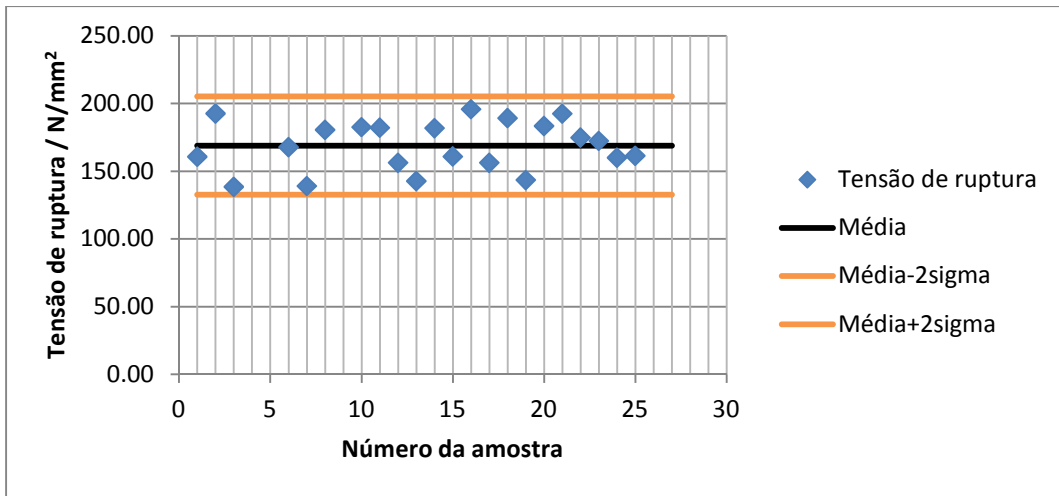


Gráfico C19 – Tensão de ruptura das fibras de CS M a 3%

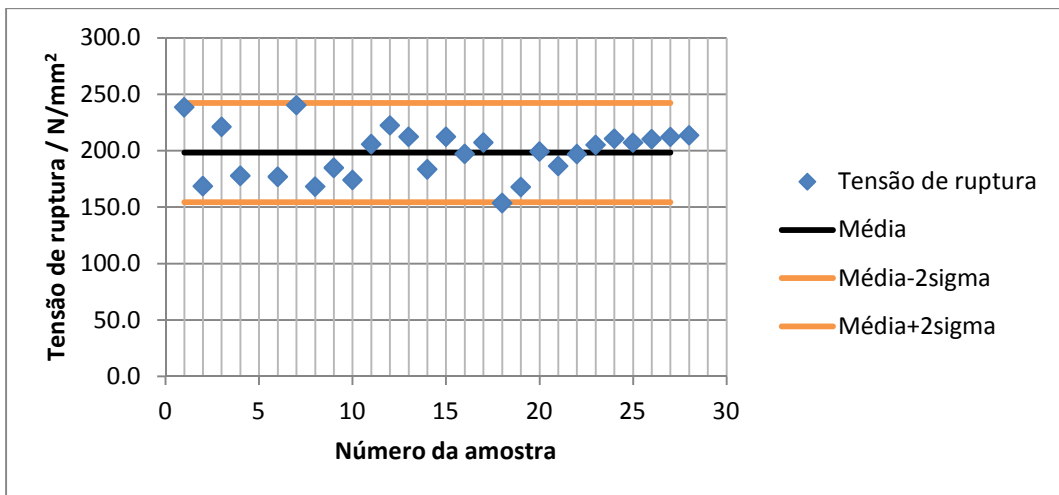


Gráfico C20 – Tensão de ruptura das fibras de CS M a 3% + PEO 5M a 0.3%

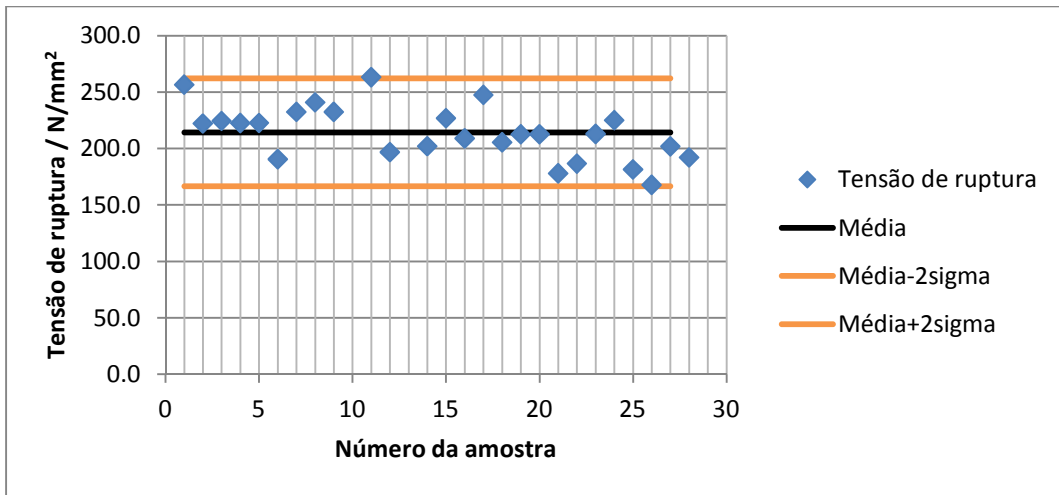


Gráfico C21 – Tensão de ruptura das fibras de CS M a 3% + PEO 8M a 0.3%

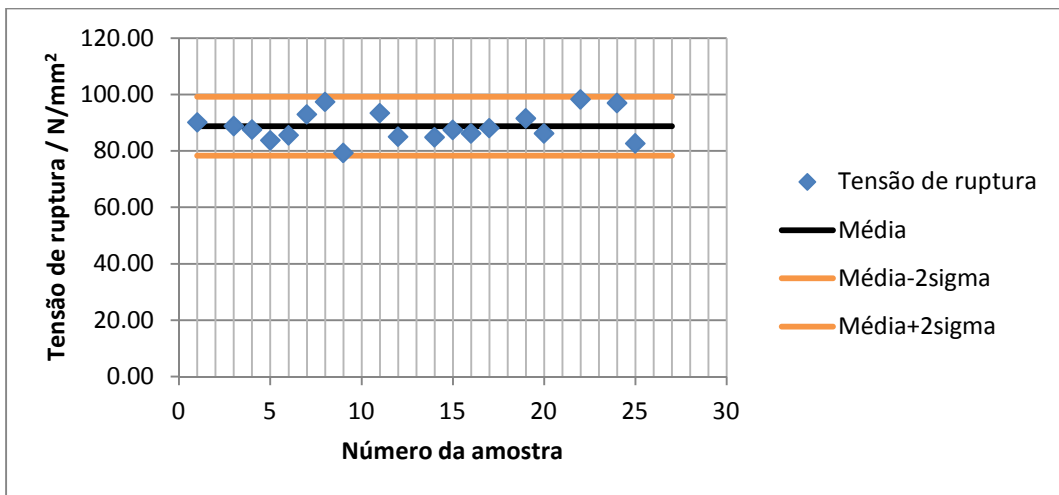


Gráfico C22 – Tensão de ruptura das fibras de CS S a 3% em ácido acético a 2%

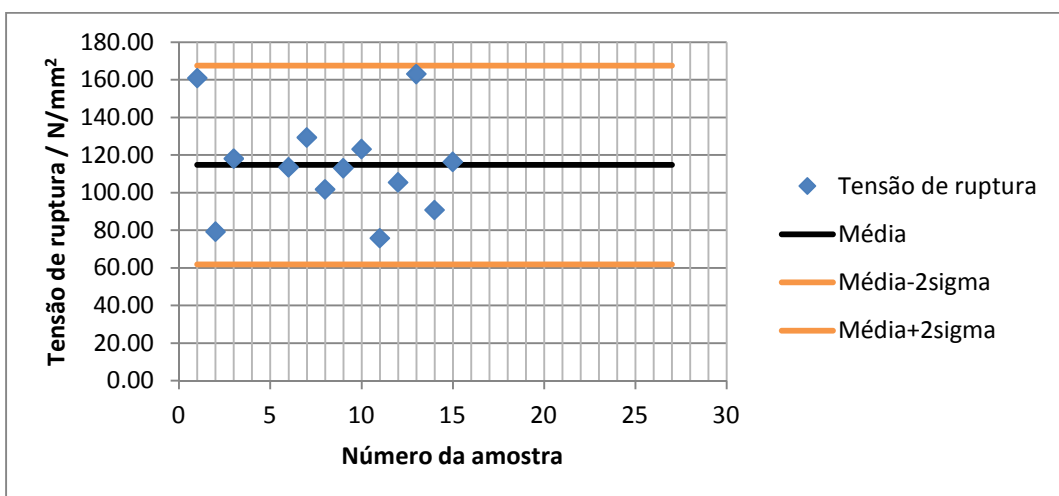


Gráfico C23 – Tensão de ruptura das fibras de CS S a 3% + Glicerol a 0.3%

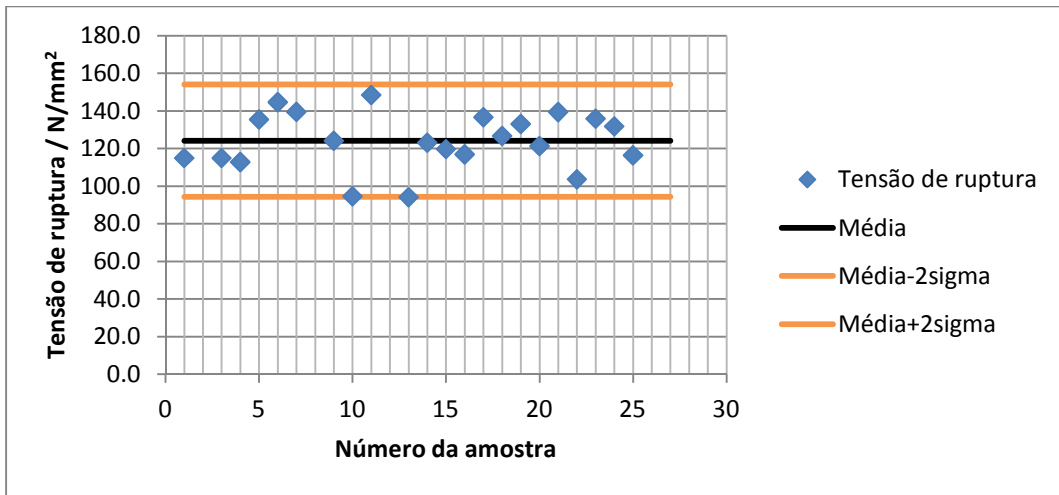


Gráfico C24 – Tensão de ruptura das fibras de CS S a 3% em ácido láctico a 2%

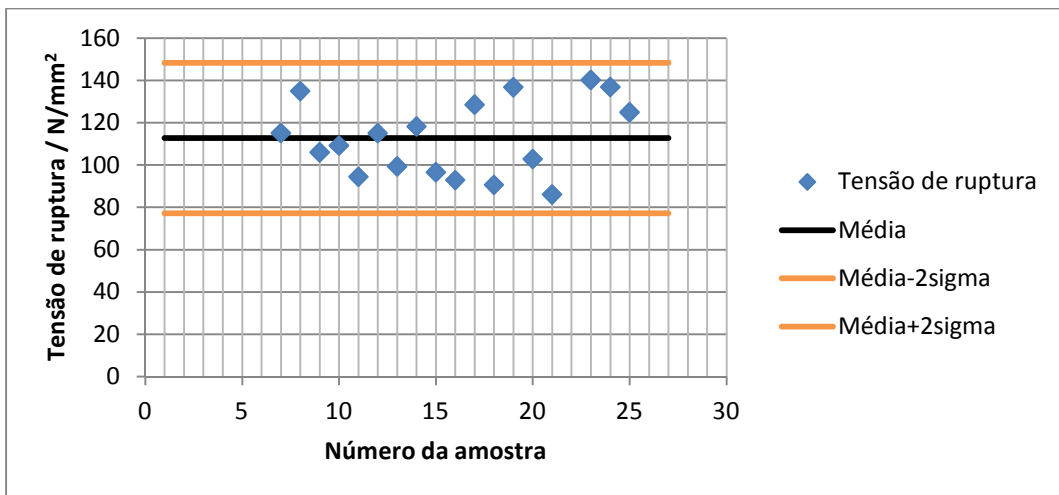


Gráfico C25 – Tensão de ruptura das fibras de CS S a 3% em ácido acético a 2% em banho aquecido

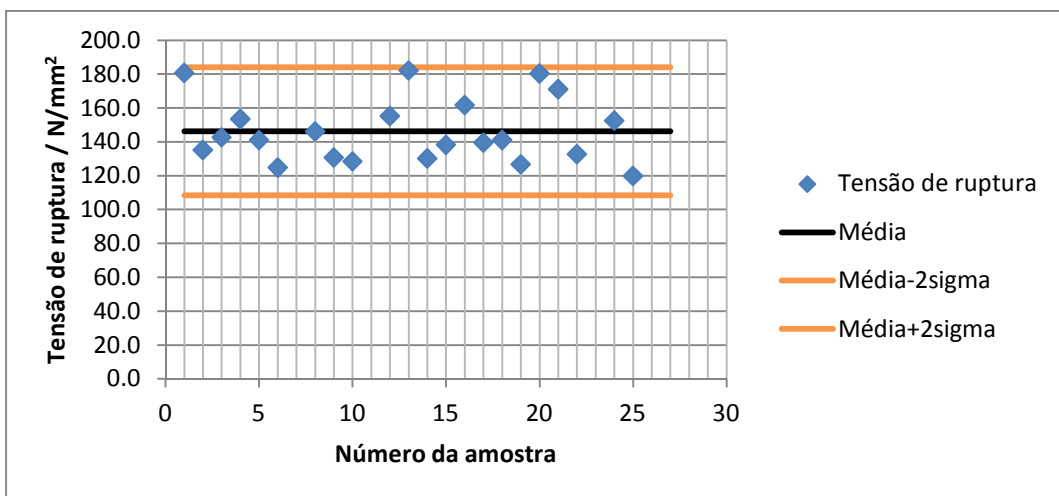


Gráfico C26 – Tensão de ruptura das fibras de CS S a 3% + Glicerol a 0.3% em banho aquecido

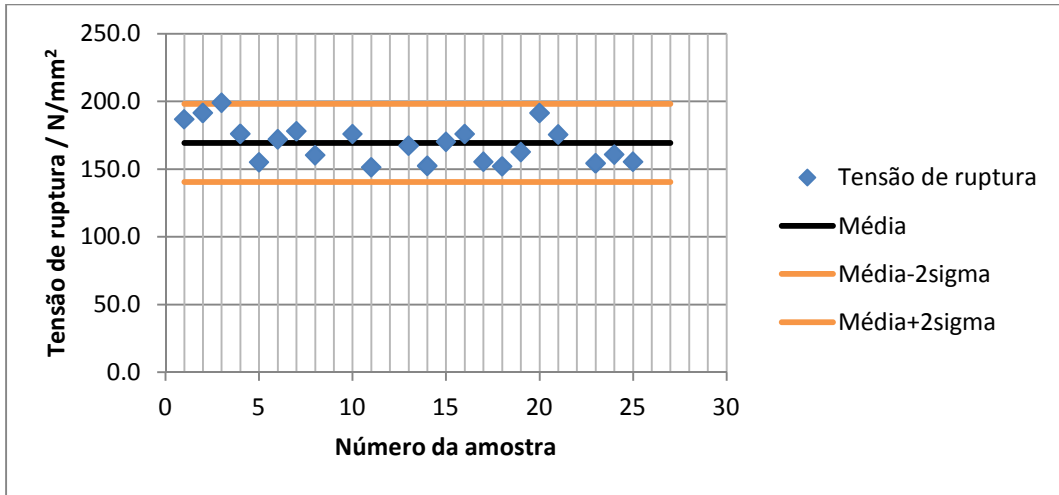


Gráfico C27 – Tensão de ruptura das fibras de CS S a 3% em ácido láctico a 2% em banho aquecido

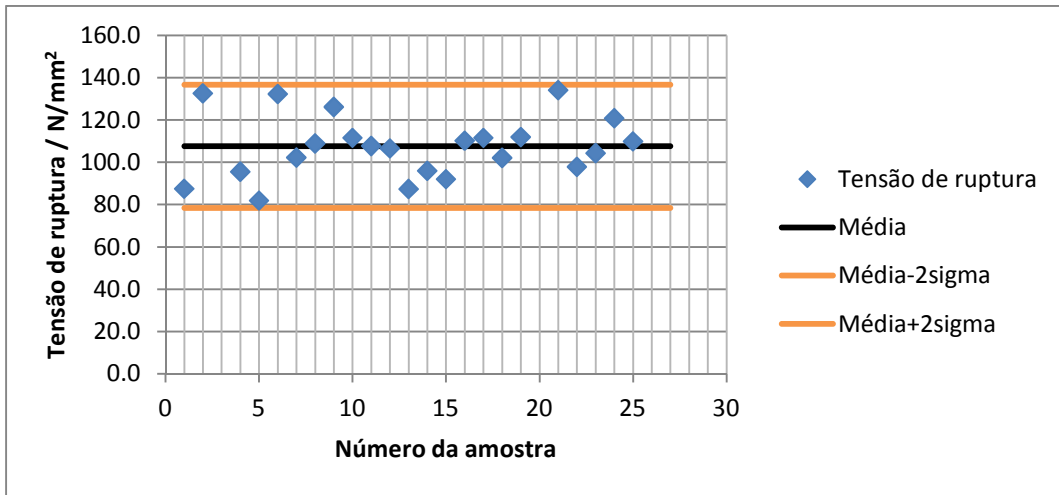


Gráfico C28 – Tensão de ruptura das fibras de CS S a 3% + PEG 300 a 0.3%

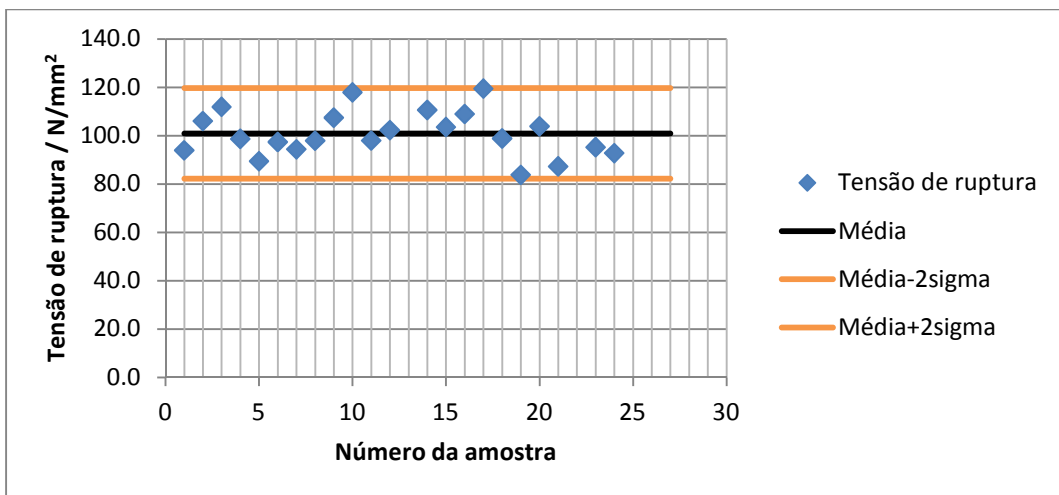


Gráfico C29 – Tensão de ruptura das fibras de CS S a 3% em ácido láctico a 2% em banho aquecido, após re-hidratação

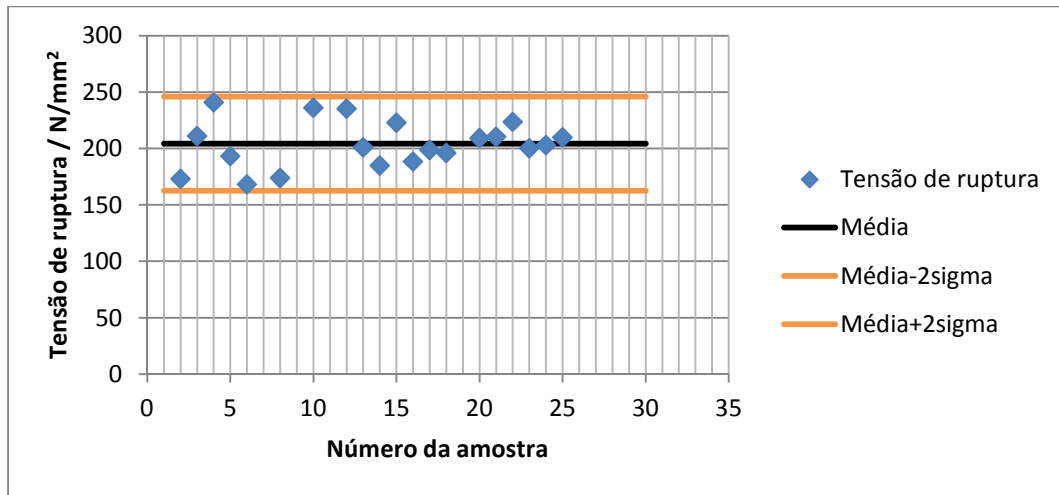


Gráfico C30 – Tensão de ruptura das fibras de CS S a 3% em ácido acético a 2% produzidas no modelo de fiação contínuo

Novamente, para os gráficos C23 e C25 não se puderam englobar os valores das amostras correspondentes aos ensaios em que a máquina descalibrou.