



Susana Raquel Rodrigues Gomes

Mestre em Engenharia Física

**Desenvolvimento de matrizes biomiméticas
como substitutos de pele destinados ao
tratamento de queimaduras**

Dissertação para obtenção do Grau de Doutor em
Engenharia Biomédica

Orientador: Jorge Carvalho Silva, PhD, FCT-UNL
Co-orientador: Célia Reis Henriques, PhD, FCT-UNL

Júri:

Presidente: Prof. Doutor Manuel José Teixeira Carrondo
Arguentes: Doutor Pedro Lopes Granja
Doutor Lino da Silva Ferreira

Vogais: Doutora Maria Angélica Rato da Silva Roberto de Almeida
Doutor Gabriel José Gonçalves Martins



Novembro 2013

Copyright© - Todos os direitos reservados. Susana Raquel Rodrigues Gomes; Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade Nova de Lisboa.

Desenvolvimento de matrizes biomiméticas como substitutos de pele destinados ao tratamento de queimaduras

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.

Agradecimentos

Desejo expressar o meu reconhecimento a algumas pessoas e entidades que considero fundamentais, pelo seu contributo, na realização desta dissertação e sem as quais este trabalho não teria sido possível. Os meus sinceros agradecimentos são para:

A Fundação da Ciência e Tecnologia, pela concessão da bolsa de Doutoramento SFRH / BD / 37854 / 2007 que me permitiu realizar este trabalho.

O *Prof. Doutor Jorge Carvalho Silva* e a *Prof. Doutora Célia Maria Reis Henriques* pela apresentação de um projecto tão aliciante.

A *Prof. Doutora Maria Gabriela Rodrigues* e o *Doutor Gabriel Martins* da Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa (FCUL) pela disponibilidade permanente sempre que surgia alguma dúvida, pelos comentários construtivos e explicações elucidativas que foram fundamentais para a boa execução deste projecto.

A *Doutora Maria Angélica Roberto*, Directora da Unidade de Cuidados Intensivos de Queimados e Serviço Cirurgia Plástica do Hospital de São José, pelo entusiasmo com que me recebeu, pelo conhecimento que me transmitiu, pela disponibilidade incessante sempre que necessitei de ajuda, pela boa disposição e amizade e sobretudo por considerá-la um exemplo a seguir.

A *Doutora Maria Manuela Mafra* do Serviço de Anatomia Patológica do Hospital de S. José pela forma atenciosa com que trabalhou comigo e ajudou.

A *Doutora Maria Helena Casimiro* da FCT-UNL e a *Doutora Maria João Costa* da empresa Biosurfit pela amizade, dedicação e profissionalismo no momento em que mais precisei. Nunca irei esquecer.

Os meus amigos *Prof. Doutor André Wemans*, *Prof. Doutor João Duarte Cruz* e *Prof. Doutora Cláudia Quaresma* que me deram força e incentivo em todos os momentos.

A todos os professores da FCT-UNL que permitiram e confiaram a utilização de equipamento indispensável para a boa execução deste trabalho. Entre eles destacam-se o *Prof. Doutor João Paulo Borges*, o *Prof. Doutor João Sotomayor*, a *Prof. Doutora Maria João Melo*, o *Prof. Doutor António Alberto Dias* e o *Prof. Doutor Grégoire Bonfait*. Da FCUL agradeço à *Prof. Doutora Cristina Cruz*.

O doutorando Telmo Nunes da FCUL pela competência, entusiasmo e dedicação que o caracterizam.

A todos os colegas que ao longo destes anos conviveram comigo e permitiram que trabalhasse num ambiente de amizade e alegria. Um obrigado muito especial para a Ana Espiga, Pedro Anacleto, Fillipo Consolo, Margarida Félix, Patrícia Franco, Andreia Fernandes, Sara Ferreira, Sara Vaz, André Delgado, Ana Luísa Marques, Rita Morais Rosa, Luís Martins, Andreia Duarte e João Lourenço.

A minha avó, *Emília*, os meus pais, *José* e *Adelina*, a minha irmã, *Ana*, o meu marido, *Sandro*, e a minha filha, *Bruna*, que são os pilares e a força da minha vida. Este trabalho deve-se a vocês.

Resumo

A Engenharia de Tecidos apresenta actualmente soluções comerciais, para o tratamento de lesões provocadas por queimadura com perda total de pele, que não preenchem todos os requisitos para serem denominados de substitutos definitivos de pele.

O objectivo deste trabalho consistiu no desenvolvimento e caracterização físico-química e biológica da componente dérmica de um substituto de pele baseada numa matriz de nanofibras, obtida através da técnica de electrofiação. Os polímeros escolhidos foram a gelatina (GEL), o quitosano (CS) e a policaprolactona (PCL), usando como solvente comum o ácido acético. Estes foram depositados individualmente e em mistura, resultando em três tipos de matrizes: unitárias, binárias e ternária.

No sistema de matrizes unitárias apenas a de PCL é hidrofóbica. Em termos de propriedades mecânicas a de PCL é a mais elástica e dúctil e a de GEL a mais rígida e frágil. Os testes *in vitro* revelaram adesão e proliferação celular em todas as matrizes. Porém, apenas nas matrizes de PCL e CS foi observada migração de células em profundidade. Nos testes *in vivo* constatou-se uma boa integração das matrizes de CS e de GEL nas feridas, resultando numa cicatriz re-epitelizada ao final de 4 semanas.

No sistema de matrizes binárias e ternária, a de PCL/GEL é a menos hidrofílica. Relativamente às propriedades mecânicas observou-se um domínio da componente CS nas misturas preparadas com este polímero. Já a matriz de PCL/GEL reflecte a mistura de ambos os componentes. Os testes *in vitro* apresentaram adesão e proliferação celular em todas as matrizes. Foram encontradas evidências de processos de invasão celular em todas as matrizes, excepto na matriz de PCL/GEL. Finalmente, em termos de testes *in vivo* destacou-se uma boa integração das matrizes de CS/GEL e de CS/PCL/GEL na lesão, resultando numa cicatriz re-epitelizada ao final de 4 semanas.

Palavras-chave: Electrofiação, Policaprolactona, Quitosano, Gelatina de peixe, Substitutos de pele, Fibroblastos.

Abstract

Tissue Engineering currently provides commercial solutions for the treatment of burn lesions with complete loss of skin, but these do not fulfill all the requirements of definitive skin substitutes.

The goal of this work was to develop and characterize, both physico-chemically and biologically, a dermal component based on a nanofibre matrix obtained through electrospinning. The polymers chosen were gelatin (GEL), chitosan (CS) and polycaprolactone (PCL). Acetic acid was used as a common solvent. The polymers were deposited both individually and as a mixture, giving rise to three types of matrices: unitary, binary and ternary.

In the unitary matrices system, only PCL was found to be hydrophobic. In what regards mechanical properties, the PCL matrix is more elastic and ductile and the GEL matrix is more rigid and fragile. *In vitro* tests revealed cell adhesion and proliferation in all matrices. However, deep cell migration was only observed in the PCL and CS matrices. In *in vivo* tests, both the CS and GEL matrices had a good integration within the wounds, resulting in a re-epithelized scar after 4 weeks.

In the binary and ternary matrices system, PCL/GEL was found to be the less hydrophilic. In terms of mechanical properties, CS was observed to be the dominant component in the mixtures containing it. On the other hand, the PCL/GEL matrix reflects the mixture of both components. *In vitro* tests revealed cell adhesion and proliferation in all matrices. Deep cell invasion was observed in all matrices except in the PCL/GEL matrix. Finally, in *in vivo* tests both the CS/GEL and CS/PCL/GEL matrices had a good integration in the lesion, resulting in a re-epithelized scar after 4 weeks.

Keywords: Electrospinning, Polycaprolactone, Chitosan, Fish gelatin, Skin substitutes, Fibroblasts

Índice de matérias

Agradecimentos.....	V
Resumo.....	VII
<i>Abstract</i>	IX
Índice de Figuras.....	XV
Índice de Tabelas.....	XXIII
Lista de Símbolos.....	XXVII
Lista de Siglas e Abreviaturas.....	XXIX
Capítulo 1 - Introdução.....	1
Capítulo 2 - Contextualização.....	7
2.1 Pele.....	8
2.1.1 Anatomia e Fisiologia.....	8
2.1.2 Mecanismo de cicatrização de feridas cutâneas.....	13
2.2 Queimaduras.....	17
2.2.1 Tratamento de Queimaduras.....	19
Capítulo 3 – Desenvolvimento de um substituto dérmico.....	23
3.1 Técnica de processamento.....	24
3.1.1 Electrofiação.....	24
3.1.2 Parâmetros de Electrofiação.....	27
3.2 Materiais.....	32
3.2.1 Polímeros.....	33
3.2.1.1 Quitosano.....	33
3.2.1.2 Gelatina.....	36
3.2.1.3 Policaprolactona.....	38
3.2.1.4 Poli(óxido de etileno).....	40
3.2.2 Métodos de Reticulação.....	41
3.2.2.1 GTA.....	42
3.2.2.2 Genipina.....	44
3.2.2.3 DHT.....	46
3.3 Testes <i>in vitro</i>	46
3.3.1 Tipo de Células.....	47
3.3.2 Mecanismo de interacção célula-substrato.....	49
3.3.3 Curva de Crescimento Celular.....	51
3.3.4 Citoquímica.....	53

3.4 Testes <i>in vivo</i>	55
3.4.1 Ética e Legislação	55
3.4.2 Animais	56
3.4.3 Anestesia	57
3.4.4 Eutanásia	58
Capítulo 4 - Procedimento Experimental	61
4.1 Materiais	62
4.2 Caracterização das Soluções	62
4.2.1 Condutividade Eléctrica	62
4.2.2 Tensão Superficial	63
4.2.3 Viscosidade	63
4.3 Processamento das matrizes	64
4.3.1 Técnica de Electrofiação	64
4.3.2 Mecanismo de Reticulação	65
4.4 Caracterização das Matrizes	66
4.4.1 Morfologia	66
4.4.2 Ângulo de Contacto	67
4.4.3 Composição química	67
4.4.4 Porosidade	68
4.4.5 Grau de inchamento	68
4.4.5 Tracção Mecânica	69
4.4.6 Estudo de Perda de massa	71
4.5 Testes <i>in vitro</i>	72
4.5.1 Protocolo de Cultura e Viabilidade Celular	72
4.5.2 Protocolo de Fixação e/ou Marcação	74
4.5.3 Microscopia Confocal	76
4.6 Testes <i>in vivo</i>	76
4.6.1 Planeamento das Experiências	77
4.6.2 Procedimento Cirúrgico	78
4.6.3 Histologia	81
4.7 Tratamento Estatístico	81
Capítulo 5 – Apresentação e Discussão dos Resultados	83
5.1 Matrizes Unitárias	84
5.1.1 Produção e Caracterização	84

5.1.1.1 Matrizes de PCL.....	84
5.1.1.2 Matrizes de CS	96
5.1.1.3 Matrizes de GEL	104
5.1.2 Testes <i>in vitro</i>	120
5.1.2.1 Cultura de Células 3T3.....	120
5.1.2.1.1 Matrizes de PCL.....	120
5.1.2.1.2 Matrizes de GEL	122
5.1.2.2 Cultura de Células HFFF2.....	128
5.1.3 Testes <i>in vivo</i>	134
5.1.3.1 Análise Macroscópica	134
5.1.3.2 Análise Histológica	138
5.2 Matrizes Binárias e Ternária	145
5.2.1 Produção e Caracterização	145
5.2.1.1 Matrizes de CS/PCL.....	145
5.2.1.2 Matrizes de PCL/GEL.....	150
5.2.1.3 Matrizes de CS/GEL	159
5.2.1.4 Matrizes de CS/PCL/GEL.....	166
5.2.2 Testes <i>in vitro</i>	173
5.2.2.1 Cultura de Células HFFF2.....	173
5.2.2.2 Imunocitoquímica para Fibronectina e Colagénio Tipo I da matriz extracelular	179
5.2.3 Testes <i>in vivo</i>	181
5.2.3.1 Análise Macroscópica	181
5.2.3.2 Análise Histológica	184
Capítulo 6 - Conclusões	191
Referências Bibliográficas	195
Anexo I.....	205

Índice de Figuras

Figura 2. 1 Representação esquemática da hipoderme, da pele e de algumas estruturas anexas (adaptado de [32]).	8
Figura 2. 2 Imagens de microscopia que evidenciam: a) as camadas reticular e papilar da derme (adaptado de [34]) e b) a camada papilar dérmica e a estrutura em camadas da epiderme (adaptado de [31]).	11
Figura 2. 3 Estruturas anexas da pele: a) pêlo (adaptado de [35]) e b) principais glândulas da pele: sebácea e sudorípara (adaptado de [31]).	13
Figura 2. 4 Etapas clássicas da cicatrização de feridas: (a) inflamação, (b) proliferação e (c) maturação (adaptado de [40, 41]). (a) A ferida é preenchida com um coágulo rico em fibrina logo após a lesão (hemostase). São accionados os mecanismos de defesa (neutrófilos e macrófagos) para impedir a infecção. Os queratinócitos na margem da lesão entram em processo mitótico e começam a formar nova epiderme. (b) A maioria das células migra para a ferida. Os fibroblastos começam a sintetizar nova matriz extracelular e novos vasos sanguíneos povoam a área. O novo tecido denomina-se tecido de granulação. A ferida contrai. (c) O tecido de granulação é substituído por tecido de cicatriz (colagénio I). As fibras de colagénio reorganizam-se permitindo um aumento da resistência da pele.	16
Figura 2. 5 Exemplo de uma queimadura de 1º grau [42].	17
Figura 2. 6 Exemplos de uma queimadura de 2º grau: a) superficial e b) profunda (imagens cedidas pelo Hospital de São José).	18
Figura 2. 7 Exemplo de uma queimadura de 3º grau (imagem cedida pelo Hospital de São José).	19
Figura 3. 1 Esquema de um sistema de electrofiação na configuração horizontal [52].	24
Figura 3. 2 Representação das a) linhas equipotenciais [53] e b) linhas do campo eléctrico no plano que contém a agulha de um sistema horizontal de electrofiação. Os esquemas foram obtidos numa simulação em que se considerou a agulha polarizada positivamente em relação ao colector [54].	25
Figura 3. 3 Configurações de jactos durante a electrofiação: a) Esquema da trajectória instável de um jacto inicialmente linear em que três perturbações eléctricas geram movimentos em espiral [59]; b) Fotografia de um jacto no início da espiral principal, onde são visíveis várias ramificações (a seta indica a extremidade da agulha [59]; c) Fotografia de um cone de Taylor a partir do qual são ejectados quatro jactos em simultâneo [59].	26
Figura 3. 4 Imagem de MEV de uma deposição de fibras com contas (imagem obtida no âmbito deste trabalho).	27
Figura 3. 5 Representação esquemática da estrutura química da quitina e do quitosano [65].	33
Figura 3. 6 Síntese da PCL por polimerização por abertura do anel ϵ -caprolactona [86].	38

Figura 3. 7 Apresentação de algumas formas químicas que o GTA pode adquirir em soluções aquosas [107].....	42
Figura 3. 8 Mecanismo de reacção do GTA com a gelatina [111].....	43
Figura 3. 9 Mecanismo de reticulação do GTA com o quitosano [110]: a) por formação de duas bases Schiff; b) por formação de aductos tipo Michael com terminais aldeídos.	44
Figura 3. 10 Estrutura química da genipina [112].....	45
Figura 3. 11 Mecanismos de reacção da genipina com biopolímeros, como a gelatina e o quitosano, que contêm grupos amina primários na sua estrutura: a) reacção por ataque nucleófilo da amina primária ao átomo de carbono C - 3 da genipina, b) reacção de substituição nucleofílica S _N 2 [114].	46
Figura 3. 12 Imagens de microscopia confocal onde é possível observar a diferente morfologia das células a) 3T3, exibindo uma forma mais tipo poligonal e b) HFFF2, com uma forma alongada e crescimento paralelo. (Células usadas neste trabalho).	48
Figura 3. 13 Mecanismo de interacção célula-substrato, onde pode ser observado o papel das proteínas como mediadoras da ligação entre as integrinas, proteínas de adesão presentes na membrana plasmática das células, e o substrato (adaptado de [127]).	51
Figura 3. 14 Curva de crescimento celular. Apresenta quatro regiões características correspondentes a quatro fases:1) fase lag, de adaptação celular, 2) fase log, de crescimento exponencial, 3) fase estacionária, onde toda a área disponível para crescimento está coberta de células, e o número de células a dividir-se é igual ao número de células em apoptose e 4) fase de declínio, quando o número de mortes celulares é superior ao número de células em divisão.	52
Figura 3. 15 Rato da estirpe Wistar usado neste trabalho.	56
Figura 3. 16 Caixa de acomodação de roedores. Tampa com separador para colocação de ração e biberão de água.....	57
Figura 4. 1 Curvas de fluxo típicas dos diferentes tipos de fluidos.	64
Figura 4. 2 Fotografia de um sistema de electrofiação usado na produção das matrizes.....	65
Figura 4. 3 Representação esquemática da caracterização de superfícies de acordo com a medição dos ângulos de contacto. Os símbolos γ_{SV} e γ_{LV} representam a energia interfacial sólido-vapor e líquido-vapor (ou tensão superficial), respectivamente (Imagem adaptada de [136, 137]).	67
Figura 4. 4 Esquema representativo do mecanismo de detecção do feixe IV.	68
Figura 4. 5 Curva de tracção, Tensão versus Deformação, onde se destacam os pontos de maior interesse. Na fase elástica, fase que obedece à lei de Hooke, o material retoma às dimensões originais assim que a força deixa de actuar sobre ele. Na fase plástica o material adquire uma deformação permanente. O limite de resistência é a tensão máxima que o material suporta sem romper. Normalmente considera-se que a partir deste ponto o material entra na fase de ruptura. Neste trabalho é definido como o ponto (σ_R , ϵ_R). O limite de ruptura é o ponto em que o material rompe.....	70

Figura 4. 6 Ensaio de tracção realizado na máquina de ensaios da Rheometric Scientific, onde se observa a matriz a ser traccionada presa pelas garras, uma das quais é móvel e a outra encontra-se ligada à célula de carga.	71
Figura 4. 7 Procedimento cirúrgico.....	79
Figura 4. 8 Processo de remoção da biópsia.	80
Figura 5. 1 Imagens de MEV de fibras depositadas a partir de soluções preparadas com diferentes concentrações de PCL em ácido acético glacial: a) PCL 14%, b) PCL 17%, c) PCL 20% e d) PCL 26%. (Ampliação $\times 2000$; Barra de escala = 10 μm). As deposições foram efectuadas 1 dia após a preparação das soluções com os parâmetros do processo fixos (ver texto).	85
Figura 5. 2 Variação do diâmetro médio das fibras em função da viscosidade e concentração das soluções de PCL. As barras verticais representam o intervalo [média \pm desvio padrão].....	86
Figura 5. 3 Imagens de MEV das fibras depositadas, com os mesmos parâmetros experimentais, a partir de soluções de PCL a 23%, com 2 e 4 dias, preparadas em: AcOH 85% (a, b); AcOH 90% (c, d); AcOH 95% (e, f) e AcOH 100% (g, h). Em i) e j) imagens das fibras depositadas com a solução em AcOH 100% com 9 e 13 dias, respectivamente. (Ampliação $\times 3000$ excepto nas imagens g) à j) onde a ampliação é $\times 1000$; Barra de escala = 10 μm).	89
Figura 5. 4 Variação do diâmetro médio das fibras em função da idade das soluções de PCL 23% em diferentes concentrações de ácido acético. As barras verticais representam o intervalo [média \pm desvio padrão].	89
Figura 5. 5 Imagens de MEV das fibras depositadas a partir das soluções de PCL 23% em AcOH 90% após a) electrofiação e b) meio de cultura durante 3 dias e em AcOH 100% após c) electrofiação e d) meio de cultura durante 3 dias (Ampliação $\times 2000$; Barra de escala = 10 μm).	93
Figura 5. 6 Espectros de FTIR-ATR das fibras de PCL após electrofiação (AE) e após imersão em meio de cultura.	94
Figura 5. 7 Imagens de MEV das fibras depositadas com as soluções de CS 2% e diferentes concentrações de PEO (Ampliação $\times 1000$; Barra de escala = 10 μm). Deposições efectuadas 1 dia após a preparação da solução.	97
Figura 5. 8 Imagens de MEV das fibras depositadas com a solução CS 2% PEO 0,25% em AcOH 90% com a) 1 dia, b) 3 dias, c) 6 dias e d) 9 dias. (Ampliação $\times 2000$; Barra de escala = 10 μm).	100
Figura 5. 9 Variação do diâmetro médio das fibras em função da idade da solução de CS 2% PEO 0,25% em AcOH 90%. No gráfico encontram-se os valores da viscosidade da solução ao 1º e 6º dia. As barras verticais representam o intervalo [média \pm desvio padrão].	100
Figura 5. 10 Imagens de MEV de fibras depositadas com a solução CS 2% PEO 0,25% em AcOH 90% após a) electrofiação (AE) e b) meio de cultura (MC) durante 3 dias. (Ampliação $\times 2000$; Barra de escala = 10 μm).	101
Figura 5. 11 Espectros de FTIR-ATR das fibras de CS 2% PEO 0,25% após electrofiação (AE) e após imersão em meio de cultura (MC). Para comparação apresenta-se o espectro representativo da matriz de PEO 2%.	102

Figura 5. 12 Matriz de CS/PEO após electrofiação (AE) e após imersão em água destilada durante 5 h (H ₂ O 5h) e 5 dias (H ₂ O 5d) (a). Variação da dimensão da matriz em função do tempo de permanência em água. Valores apresentados como média ± incerteza (b).	103
Figura 5. 13 Imagens de MEV das fibras depositadas com as soluções: GEL 25% AcOH 90% com a) 1 dia, b) 6 dias, c) 9 dias e d) 15 dias e GEL 18% GEN 2% com e) 1 dia, f) 3 dias, g) 5 dias e h) 6 dias (Ampliação ×2000; Barra de escala = 10 μm).	107
Figura 5. 14 Variação do diâmetro médio das fibras em função do tempo de vida das soluções de GEL 25% e GEL 18% GEN 2% em AcOH 90%. As linhas verticais representam o intervalo [média ± desvio padrão].	108
Figura 5. 15 Estudo de perda de massa realizado em matrizes de GEL 25% reticuladas com diferentes tempos de exposição ao vapor de GTA (0,5 a 24h). As barras verticais representam o intervalo [média ± desvio padrão].	110
Figura 5. 16 Estudo de perda de massa realizado em matrizes de GEL 25% reticuladas pelo processo DHT, a 140 °C e diferentes tempos de exposição (8 a 96h), e em GEL 18% GEN 2% usando diferentes tempos de imersão num banho de GEN 2% EtOH:H ₂ O 90:10 (1 a 5 dias). As barras verticais representam o intervalo [média ± desvio padrão].	111
Figura 5. 17 Imagens de MEV das matrizes GEL 18% GEN 2% com tratamento em banho de GEN 2% EtOH:H ₂ O 90:10 durante 4 dias, seguindo-se 1 dia em H ₂ O, depositadas ao a) 2º dia, b) 3º dia, c) 5º dia e d) 6º dia da solução. (Ampliação ×1000; barra de escala = 10 μm).	112
Figura 5. 18 Imagens de MEV das matrizes de gelatina após reticulação com a) GTA 2h, b) GTA 5h, c) DHT e d) GEN. Imagens das mesmas matrizes após imersão em meio de cultura durante 3 dias: e) GTA 2h-MC, f) GTA 5h-MC, g) DHT-MC e h) GEN (Ampliação ×2000; Barra de escala = 10 μm).	114
Figura 5. 19 Espectros FTIR-ATR das matrizes de gelatina: a) após electrofiação e após reticulação e, b) após electrofiação e após reticulação e posterior imersão em meio de cultura durante 3 dias.	115
Figura 5. 20 Variação das dimensões das matrizes de gelatina, sujeitas a diferentes processos de reticulação, após imersas em água durante 5 horas e 5 dias. Resultados apresentados como [média ± incerteza].	118
Figura 5. 21 População de células 3T3 no controlo e nas matrizes de PCL 23% em AcOH 90 e 100%, ao 3º, 5º e 7º dias de cultura. A linha a tracejado indica que foram semeadas 2×10 ⁴ células. Medidas apresentadas como média ± incerteza.	121
Figura 5. 22 Imagens de microscopia confocal de células 3T3 ao 3º dia de cultura fixadas e marcadas com ToPro no ADN (magenta) e faloidina nos filamentos de actina do citoesqueleto (verde) em: a) controlo, b) PCL 23% em AcOH 100% e c) PCL 23% em AcOH 90%. (Barra de escala = 50 μm)	122
Figura 5. 23 População de células 3T3 no controlo e nas matrizes de GEL reticuladas com GTA, DHT e GEN ao 3º, 5º e 7º dias de cultura. A linha a tracejado indica que foram semeadas 2×10 ⁴ células. O símbolo “#” presente ao 7º dia nas matrizes de GTA e GEN representa uma subestimação do número total de células nesse dia. Resultados apresentados como média ± incerteza.	123

- Figura 5. 24 Imagens de MEV da morfologia de células 3T3 ao 3º dia de cultura sobre a superfície de a) controlo e matriz de GEL reticulada com b) GTA 2h, c) GTA 5h, d) DHT e e) GEN. (Barra de escala = 10 µm). 125
- Figura 5. 25 Imagens de confocal de células 3T3 ao 3º dia de cultura fixadas e marcadas com ToPro no ADN (magenta) e faloidina nos filamentos de actina do citoesqueleto (verde) em: a) controlo e matriz de GEL reticulada com b) GTA 2h, c) GTA 5h, d) DHT e e) GEN (neste caso a genipina interfere com a marcação do ADN e os núcleos não são visíveis). Exemplos de figuras mitóticas (seta, a), filopodia (setas, b e c) e *stress-fibers* (setas, d e e) (Barra de escala = 50 µm). 126
- Figura 5. 26 Representação gráfica do crescimento das células HFFF2 no controlo e nas matrizes de PCL, CS e GEL, reticulada com vapor de GTA durante 5 h, ao 2º, 4º, 6º, 9º, 11º e 13º dias de cultura. A linha a tracejado indica que foram semeadas 2×10^4 células. O símbolo “#” representa apenas uma subestimação do número total de células nesse dia. Medidas apresentadas como média ± incerteza. 129
- Figura 5. 27 Imagens de confocal das células HFFF2 ao 4º e 7º dias de cultura fixadas e marcadas com ToPro no ADN (magenta) e faloidina nos filamentos de actina do citoesqueleto (verde) no controlo (a e b) e matrizes de PCL (c e d), de CS (e e f) e de GEL (g e h). (Barra de escala = 50 µm). 132
- Figura 5. 28 Imagens 2D dos núcleos das células HFFF2 (magenta) ao 7º dia de cultura nas matrizes de PCL, de CS e de GEL (corte em profundidade; barra de escala = 10 µm). 134
- Figura 5. 29 Taxa de encerramento das feridas em função do tempo de cicatrização (1, 2 e 4 semanas) no estudo efectuado com as matrizes unitárias. Resultados comparados ao controlo. As linhas verticais representam o intervalo [média ± incerteza]. 137
- Figura 5. 30 Imagens de histologia, do grupo controlo, representativas da lesão infligida aos ratos à 1ª semana: a) transição úlcera/pele normal, b) superfície da úlcera acompanhada de processo inflamatório; à 2ª semana: c) superfície da úlcera com formação de crosta e proliferação de capilares, d) ampliação da zona ulcerada ainda com processo inflamatório e com proliferação de fibroblastos e 4ª semana: e) transição cicatriz re-epitelizada/pele normal, f) tecido de cicatriz fibroso e epiderme intacta. 139
- Figura 5. 31 Imagens de histologia, do grupo da PCL, representativas da lesão infligida aos ratos à 1ª semana: a) úlcera constituída por três camadas: 1- crosta com matriz de PCL, 2- neutrófilos e detritos celulares 3- proliferação fibroinflamatória de tecido, b) crosta com fibras de PCL; à 2ª semana: c) processo cicatricial da úlcera mais avançado apresentando as mesmas 3 camadas que em a), d) fibras de PCL na crosta e detritos celulares; e 4ª semana: e) cicatriz não re-epitelizada; fibras de PCL na base da úlcera, f) matriz de PCL e células histiocitárias. 140
- Figura 5. 32 Imagens de histologia, do grupo do CS, representativas da reparação da lesão infligida aos ratos à 1ª semana: a) região ulcerada composta por crosta, camada granulocitária e camada fibrohistiocitária onde está presente a matriz de CS, b) fibras de CS na camada fibrohistiocitária; à 2ª semana: c) processo cicatricial mais avançado, com mais proliferação fibroblástica e menos inflamatória, d) epiderme em proliferação sobre o tecido de granulação e por baixo da crosta a fechar a ferida; e 4ª semana: e) transição cicatriz re-epitelizada/ pele normal f) tecido conjuntivo fibroso sem anexos e pouca reacção inflamatória e epiderme intacta. 142

Figura 5. 33 Imagens de histologia, do grupo da GEL, representativas da lesão infligida aos ratos à 1ª semana: a) região ulcerada constituída por crosta, camada granulocitária e camada fibrohistiocitária, b) presença de fibras de GEL na camada fibrohistiocitária; à 2ª semana: c) transição pele normal/cicatriz ainda com pequena úlcera, d) fundo da pequena úlcera - fibroblastos e poucas células inflamatórias; e 4ª semana: e) área totalmente cicatrizada com ligeiro infiltrado inflamatório superficial, f) transição tecido conjuntivo fibroso/derme normal.	144
Figura 5. 34 Imagens de MEV das fibras depositadas com as soluções de a) CS e b) CS/PCL. c) Diâmetro médio das fibras depositadas com estas soluções. As linhas verticais representam o intervalo [média ± desvio padrão]. d) Imagem de MEV das fibras de CS/PCL após imersão em meio de cultura durante 3 dias.....	147
Figura 5. 35 Espectros FTIR-ATR das matrizes de CS/PCL, CS e PCL após electrofiação e da de CS/PCL após imersão em meio de cultura durante 3 dias (CS/PCL - MC).....	148
Figura 5. 36 Matriz de CS/PCL após electrofiação (AE) e após imersão em água destilada durante 5 h (H ₂ O 5h) e 5 dias (H ₂ O 5d) (a). Variação das dimensões das matrizes de CS/PCL e CS em função do tempo de permanência em água. As barras verticais representam o intervalo [valor médio ± incerteza] (b).	149
Figura 5. 37 Solução PCL 10% GEL 10% após: a) agitação magnética e 1 h em ultrassons e b) deixada em repouso 6 h. Observa-se separação de fases: em cima PCL e em baixo GEL.	151
Figura 5. 38 Imagem de MEV das fibras depositadas com a solução PCL/GEL (a). Comparação do diâmetro médio das fibras depositadas com esta solução compósita e com as soluções PCL 23% e GEL 25%. As linhas verticais representam o intervalo [valor médio ± desvio padrão]. (b).	153
Figura 5. 39 Espectros de FTIR-ATR das matrizes de PCL/GEL, GEL e PCL após electrofiação e da de PCL/GEL após imersão em água durante 1 dia (PCL/GEL – H ₂ O).....	154
Figura 5. 40 Imagens de MEV das fibras de PCL/GEL reticuladas com GTA durante 2 h a) após o processo de reticulação e b) após imersão em meio de cultura durante 3 dias.	155
Figura 5. 41 Espectros FTIR-ATR das matrizes de PCL/GEL após electrofiação (PCL/GEL - AE) e após reticulação com GTA, antes e depois de imersas em meio de cultura durante 3 dias (PCL/GEL – GTA e PCL/GEL – GTA/MC, respectivamente).	156
Figura 5. 42 Matriz de PCL/GEL após reticulação em vapor de GTA durante 2 h (AR) e posterior imersão em água destilada durante 5 h (H ₂ O 5h) e 5 dias (H ₂ O 5d) (a). Variação das dimensões das matrizes de PCL/GEL e GEL, ambas reticuladas em GTA durante 2 h, e da matriz de PCL em função do tempo de permanência em água. As barras verticais representam o intervalo [valor médio ± incerteza] (b).	157
Figura 5. 43 Imagens de MEV das fibras depositadas com as soluções de a) CS e b) CS/GEL. c) Diâmetro médio das fibras depositadas com estas soluções. As linhas verticais representam o intervalo [valor médio ± desvio padrão].	160
Figura 5. 44 Espectros FTIR-ATR das matrizes de CS/GEL, GEL e CS após electrofiação e da de CS/GEL após imersão em água durante 1 dia (CS/GEL – H ₂ O).	161
Figura 5. 45 Imagens de MEV das fibras de CS/GEL reticuladas com GTA durante 2 h a) após o processo de reticulação e b) depois de imersas em meio de cultura durante 3 dias.	162

Figura 5. 46 Espectros FTIR-ATR das matrizes de CS/GEL após electrofiação (CS/GEL – AE) e após reticulação com GTA, antes e depois de colocadas em meio de cultura durante 3 dias (CS/GEL – GTA e CS/GEL – GTA/MC, respectivamente).	163
Figura 5. 47 Matriz de CS/GEL após reticulação em vapor de GTA durante 2 h (AR) e após imersão em água destilada durante 5 h (H ₂ O 5h) e 5 dias (H ₂ O 5d) (a). Variação das dimensões das matrizes de CS/GEL reticulada e da de CS em função do tempo de permanência em água. As barras verticais representam o intervalo [valor médio ± incerteza] (b).....	164
Figura 5. 48 Imagens de MEV das fibras depositadas com as soluções de a) CS, b) CS/PCL, c) CS/GEL e d) CS/PCL/GEL. e) Diâmetro médio das fibras depositadas com estas soluções. As linhas verticais representam o intervalo [valor médio ± desvio padrão].....	167
Figura 5. 49 Espectros FTIR-ATR das matrizes de CS/PCL/GEL, CS e PCL após electrofiação.	168
Figura 5. 50 Imagens de MEV das fibras de CS/PCL/GEL reticuladas com GTA durante 2 h a) após o processo de reticulação e b) depois de imersas em meio de cultura durante 3 dias.....	169
Figura 5. 51 Espectros FTIR-ATR adquiridos nas matrizes de CS/PCL/GEL após electrofiação e após reticulação com GTA, antes e depois de imersas em meio de cultura durante 3 dias (CS/PCL/GEL – GTA e CS/PCL/GEL – GTA/MC).	170
Figura 5. 52 Matriz de CS/PCL/GEL após reticulação em vapor de GTA durante 2 h (AR) e após imersão em água destilada durante 5 h (H ₂ O 5h) e 5 dias (H ₂ O 5d) (a). Variação das dimensões das matrizes de CS/PCL/GEL e CS/GEL reticuladas nas mesmas condições e das de CS/PCL e CS em função do tempo de permanência em água.). As barras verticais representam o intervalo [valor médio ± incerteza] (b).....	171
Figura 5. 53 População de células HFFF2 no controlo e nas matrizes CS/PCL, PCL/GEL, CS/GEL e CS/PCL/GEL. A linha a tracejado indica que foram semeadas 2×10 ⁴ células por poço. O símbolo “#” representa uma subestimação do número total de células nesse dia. As linhas verticais representam o intervalo [média ± incerteza].....	173
Figura 5. 54 Imagens de confocal das células ao 4º e 7º dias de cultura fixadas e marcadas com ToPro no ADN (magenta) e faloidina nos filamentos de actina do citoesqueleto (verde) em: controlo (a e b) e matrizes de CS/PCL (c e d), de PCL/GEL (e e f), de CS/GEL (g e h) e de CS/PCL/GEL (i e j). (Barra de escala = 50 µm)	176
Figura 5. 55 Reconstruções 3D (vista superior e vista em profundidade) de alguns campos representativos da cultura de células HFFF2, ao 7º dia, nas matrizes de: a) CS/PCL, b) PCL/GEL, c) CS/GEL e d) CS/PCL/GEL. Células marcadas no núcleo (magenta) e citoesqueleto (verde). Nanofibras também marcadas com a cor verde. As dimensões representam a profundidade da matriz analisada. No caso da matriz de PCL/GEL foi utilizada uma imagem 2D para ilustrar a migração celular em profundidade.	178
Figura 5. 56 Imagens de microscopia de confocal das células ao 4º e 7º dias de cultura em matrizes de CS/PCL/GEL fixadas e marcadas no ADN (vermelho), no citoesqueleto (verde) e nas moléculas de colagénio I e fibronectina (azul). As fibras também estão marcadas com a cor verde. (Barra de escala = 50 µm)	180

Figura 5. 57 Taxa de encerramento das feridas em função do tempo de cicatrização (2 e 4 semanas) no estudo efectuado com as matrizes binárias e ternária. Resultados comparados com o controlo. As linhas verticais representam o intervalo [média ± incerteza].	183
Figura 5. 58 Imagens de histologia, do grupo CS/PCL, representativas da lesão infligida aos ratos à 2ª semana: a) úlcera com crosta, b) fibras de CS/PCL entre as células inflamatórias que são predominantemente histiócitos; à 4ª semana: c) úlcera mais fibroblástica, d) fibras de CS/PCL dentro de histiócitos multinucleados.	185
Figura 5. 59 Imagens de histologia, do grupo PCL/GEL, representativas da lesão infligida aos ratos à 2ª semana: a) transição pele normal / úlcera, b) proliferação fibroinflamatória, predominantemente histiocitária; à 4ª semana: c) cicatriz dérmica re-epitelizada, d) epitélio contínuo.	186
Figura 5. 60 Imagens de histologia, do grupo CS/GEL, representativas da lesão infligida aos ratos à 2ª semana: a) úlcera com reacção fibroinflamatória e com fibras de CS/GEL, b) ampliação da superfície da úlcera destacando o material na crosta e em profundidade; à 4ª semana: c) transição cicatriz re-epitelizada / pele normal, d) cicatriz dérmica sem folículos pilosos.	187
Figura 5. 61 Imagens de histologia, do grupo CS/PCL/GEL representativas da lesão infligida aos ratos à 2ª semana: a) lesão avançada na cicatrização, b) presença de matriz ternária na crosta e em profundidade; à 4ª semana: c) transição cicatriz re-epitelizada sem anexos/ pele normal, d) epiderme regenerada.	188

Índice de Tabelas

Tabela 4. 1 Materiais utilizados para preparar as soluções deste trabalho.....	62
Tabela 4. 2 Distribuição do número de ratos por matriz.....	77
Tabela 5. 1 Viscosidade (η), tensão superficial (γ) e condutividade eléctrica (σ) das diferentes soluções de PCL em ácido acético glacial. Dados apresentados como média \pm desvio padrão. ...	85
Tabela 5. 2 Viscosidade (η), tensão superficial (γ) e condutividade eléctrica (σ) das soluções de PCL a 23% em diferentes concentrações de ácido acético. Estas propriedades foram medidas em função da idade da solução. Valores apresentados como média \pm desvio padrão.	87
Tabela 5. 3 Ângulo de contacto (θ) e propriedades mecânicas (módulo de Young (E), tensão (σ_R) e deformação (ϵ_R) de ruptura) determinados para as matrizes depositadas a partir de soluções de PCL a 23% em diferentes concentrações de ácido acético. Valores apresentados como média \pm desvio padrão.....	91
Tabela 5. 4 Diâmetro médio das fibras, ângulo de contacto, porosidade e propriedades mecânicas das matrizes de PCL em AcOH a 90 e 100%, depositadas ao 2º dia da solução com 12 kV, 25 cm e 0,3 ml/h. Valores apresentados como média \pm desvio padrão.	93
Tabela 5. 5 Principais bandas de absorção no IV da PCL [20, 144].....	94
Tabela 5. 6 Matrizes de PCL 23% em AcOH 90 e 100%, após electrofiação (AE) e após água durante 5 h (H ₂ O 5h) e 5 dias (H ₂ O 5d).	95
Tabela 5. 7 Viscosidade (η), tensão superficial (γ) e condutividade eléctrica (σ) das soluções de CS/PEO (CS 2% e diferentes concentrações de PEO). A primeira coluna indica a razão entre as massas de CS e PEO e a última o diâmetro médio das fibras depositadas. Valores apresentados como média \pm desvio padrão.....	98
Tabela 5. 8 Principais bandas de absorção no IV do CS e PEO [151, 152].....	102
Tabela 5. 9 Ângulo de contacto, porosidade e propriedades mecânicas da matriz de CS/PEO depositada ao 2º dia da solução com 18 kV, 25 cm e 0,3 ml/h. Valores apresentados como média \pm desvio padrão.	104
Tabela 5. 10 Viscosidade (η), tensão superficial (γ) e condutividade eléctrica (σ) das soluções de gelatina. Valores apresentados como média \pm desvio padrão.	106
Tabela 5. 11 Principais bandas de absorção no IV da Gelatina [153, 158].....	116
Tabela 5. 12 Matrizes de gelatina em AcOH 90% após reticulação (AR) com GTA, DHT e GEN, e posterior imersão em água durante 5 h (H ₂ O 5h) e 5 dias (H ₂ O 5d).	117
Tabela 5. 13 Porosidade e propriedades mecânicas das matrizes de gelatina após reticulação via GTA, DHT e GEN. Valores apresentados como média \pm desvio padrão.	119
Tabela 5. 14 Área média de cobertura celular estimada a partir das imagens de microscopia confocal ao 3º dia de cultura e principais características dos fibroblastos 3T3 nas matrizes de gelatina tratadas com diferentes métodos de reticulação. Comparação com os valores de	

percentagem relativa (ao controlo) de células viáveis. Valores apresentados como média \pm desvio padrão.....	127
Tabela 5. 15 Área média de cobertura celular e número de núcleos/campo nas matrizes unitárias ao 4º e 7º dias de cultura (a partir de imagens de confocal). Valores apresentados como média \pm desvio padrão.....	133
Tabela 5. 16 Imagens representativas do aspecto macroscópico das feridas após a aplicação das matrizes de PCL, de CS e de GEL no dia da operação (0d) e após 1, 2 e 4 semanas. Resultados comparados com o controlo (sem material). (Barra de escala = 5 mm).....	135
Tabela 5. 17 Viscosidade (η), tensão superficial (γ), e condutividade eléctrica (σ) da solução CS 2% PCL 2% PEO 0,25% em AcOH 90%. Para comparação apresentam-se as propriedades da solução CS 2% PEO 0,25% preparada no mesmo solvente. Valores apresentados como média \pm desvio padrão.....	146
Tabela 5. 18 Ângulo de contacto, porosidade e propriedades mecânicas determinados nas matrizes de CS/PCL, CS e PCL. Valores apresentados como média \pm desvio padrão.....	150
Tabela 5. 19 Viscosidade (η), tensão superficial (γ), e condutividade eléctrica (σ) da solução PCL 10% GEL 10% em AcOH 95%. Para comparação apresentam-se as propriedades da solução de PCL 23% dissolvido no mesmo solvente (a solução de GEL não foi estudada neste solvente). Valores apresentados como média \pm desvio padrão.....	152
Tabela 5. 20 Ângulo de contacto, porosidade e propriedades mecânicas determinados nas matrizes de PCL/GEL – GTA, PCL e GEL - GTA. Valores apresentados como média \pm desvio padrão.....	158
Tabela 5. 21 Viscosidade (η), tensão superficial (γ), e condutividade eléctrica (σ) da solução CS 2% GEL 2% PEO 0,15% em AcOH 90% e da solução de CS 2% PEO 0,25% preparada no mesmo solvente. Valores apresentados como média \pm desvio padrão.....	159
Tabela 5. 22 Ângulo de contacto, porosidade e propriedades mecânicas determinados nas matrizes de CS/GEL – GTA, CS e GEL - GTA. Valores apresentados como média \pm desvio padrão.....	165
Tabela 5. 23 Viscosidade (η), tensão superficial (γ), e condutividade eléctrica (σ) da solução CS/PCL/GEL em AcOH 90% e das soluções CS/GEL, de CS/PCL e de CS preparadas com o mesmo solvente. Valores apresentados como média \pm desvio padrão.....	166
Tabela 5. 24 Ângulo de contacto, porosidade e propriedades mecânicas das matrizes de CS/PCL/GEL - GTA, CS/GEL – GTA, CS/PCL e CS. Resultados apresentados como média \pm desvio padrão.....	172
Tabela 5. 25 Estimativa do número de núcleos/campo nas matrizes binárias e ternária ao 4º e 7º dias de cultura (a partir de imagens de confocal). Valores apresentados como média \pm desvio padrão.....	177
Tabela 5. 26 Imagens representativas do aspecto macroscópico das feridas após a aplicação das matrizes de CS/PCL, de PCL/GEL, de CS/GEL e de CS/PCL/GEL no dia da operação (0d) e após 2 e 4 semanas. Os resultados estão comparados com o controlo. A imagem à 2ª semana foi	

observada ao microscópio óptico. As setas indicam pele cicatrizada (brilhante e sem pêlo) (Barra de escala = 5 mm)..... 181

Lista de Símbolos

Δl	Alongamento do material
θ	Ângulo de contacto
A	Área
A_s	Área da matriz após electrofiação e seca no exsiccador
A_m	Área da matriz após imersão em água
l_0	Comprimento inicial
σ	Condutividade eléctrica
ρ	Densidade
ρ_a	Densidade aparente
ε_R	Deformação à ruptura
$D_{méd}$	Diâmetro médio
e	Espessura
F	Força
I	Inchamento
m	Massa
m_i	Massa da matriz após electrofiação e seca no exsiccador
m_f	Massa da matriz após imersão em água
E	Módulo de Young
M	Peso molecular médio
P	Porosidade
τ	Tensão de corte
γ	Tensão superficial
γ_{SL}	Tensão superficial sólido-vapor
γ_{LV}	Tensão superficial líquido-vapor
σ_R	Tensão de ruptura
dv	Variação da velocidade do fluido
dy	Variação espacial na direcção perpendicular à velocidade
η	Viscosidade

Lista de Siglas e Abreviaturas

AcOH	Ácido acético
ADN	Ácido desoxirribonucleico
AE	Após electrofiação
Al	Alumínio
AR	Após reticulação
ARN	Ácido ribonucleico
BSA	<i>Bovine serum albumin</i>
BSE	Encefalopatia espongiforme bovina
CCK-8	<i>Cell Counting Kit – 8</i>
c.d.o.	Comprimento de onda
CS	Quitosano
CAMs	<i>Cell adhesion molecules</i>
DCM	Diclorometano
ddp	Diferença de potencial
DHT	Processo desidrotérmico
DGAV	Direcção Geral de Alimentação e Veterinária
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
ECACC	<i>European Collection of Cell Cultures</i>
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
EGF	Factor de crescimento epidérmico
EtOH	Etanol
FCM	Faculdade de Ciências Médicas
FCT	Faculdade de Ciências e Tecnologia
FCUL	Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa
FDA	<i>Food and drug administration</i>
FBS	<i>Foetal bovine serum</i>
FGF	Factor de crescimento de fibroblastos
FT	Transformada de Fourier
FTIR -ATR	Espectroscopia de infravermelho com reflexão total atenuada
GA	Grau de acetilação
GAGs	Glicosaminoglicanos
GEL	Gelatina

GEN	Genipina
GL ₂ NAG	Monómeros N-acetil-glucosamina
GPC	Cromatografia de Permeação em Gel
GTA	Vapor de glutaraldeído
H ₂ O	Água
HFFF2	<i>Human Caucasian foetal foreskin fibroblasts</i>
HFIP	Hexafluoro-2-propanol
IgGs	Imunoglobulina com função de anticorpo
IGT-1	Factor de crescimento do tipo insulina-1
IgMs	Imunoglobulina com função de anticorpo
IL-1	Interleucina
IP	Anestesia intraperitoneal
IV	Infravermelho
MC	Meio de Cultura
MEV	Microscópio electrónico de varrimento
MMPs	Metaloproteínases da matriz
NA	<i>Numerical Aperture</i>
NAG	Monómeros N-glucosamina
PCL	Policaprolactona
PDGF	Factor de crescimento derivado de plaquetas
PDT	Período de tempo que uma população de células leva a duplicar o seu número
PEC	Complexo polielectrólito
PEO	Poli(óxido de etileno)
PFA	Paraformaldeído
pI	Ponto isoeléctrico
PLLA	Poli(ácido L-láctico)
PLGA	Poli-(D, L-láctico-co-glicólico)
SPF	<i>Specific Pathogen Free</i>
TFA	Ácido trifluoroacético
TFE	Trifluoretanol
TFH	Tetraidrofurano
TGF- β	Factor de crescimento transformador β
RGD	Arginina-Glicina-Ácido Aspártico
RMN	Ressonância Magnética Nuclear

UNL	Universidade Nova de Lisboa
UV	Ultravioleta
VIH	Vírus da Imunodeficiência Humana
TNF	Factor de crescimento de necrose tumoral
T _g	Temperatura de transição vítrea
VEGF	Factor de crescimento do endotélio vascular
WST-8	Sal tetrazólio

Capítulo 1 - Introdução

A Engenharia de Tecidos é uma área emergente da Engenharia Biomédica que procura desenvolver alternativas terapêuticas às técnicas actuais de transplante de tecidos ou órgãos e de próteses permanentes. Tem por base a utilização de materiais biocompatíveis e biodegradáveis que podem ser combinados com células e moléculas bioactivas. O propósito é desenvolver estruturas poliméricas ou compósitas 3D que possam ser utilizadas como facilitadoras da regeneração de um tecido *in vivo* ou como substrato celular que permita a formação de um tecido *in vitro*. O sucesso destes suportes depende do preenchimento de determinadas características fundamentais, estruturais e químicas, das quais se destacam [1]:

- arquitectura tridimensional com volume, forma e resistência mecânica adequada ao tecido/órgão a reparar;
- estrutura porosa com dimensão de poros que permita uma boa ancoragem, proliferação e migração celular;
- composição química e produtos de degradação biocompatíveis de modo a minimizar a resposta imunitária e inflamatória;
- taxa de degradação controlada para permitir a substituição gradual e ordenada do suporte por tecido novo e funcional.

As lesões cutâneas provocadas por queimadura são frequentes. Em 2004 a incidência destes casos a nível mundial encontrava-se em 4º lugar no *ranking* relativo a casos clínicos suficientemente graves para necessitar de cuidados médicos, superando o número combinado de casos de infecção pelo bacilo de Koch (tuberculose) e pelo e vírus da imunodeficiência humana (VIH) [2]. O tratamento deste tipo de lesões é um problema clínico relevante já que a destruição do tecido cutâneo pode ser de tal forma extensa que exige enxertos de pele, que podem não estar disponíveis ou não constituir soluções definitivas. Assim, o desenvolvimento de substitutos de pele apresenta-se como uma mais-valia, sendo necessário ter em linha de conta alguns aspectos [3, 4]:

- devem ser aderentes;
- são desejáveis porosidades entre 60 a 90% [5] para permitir a passagem de nutrientes e resíduos metabólicos, exsudar e absorver fluidos da lesão e assegurar uma suficiente permeação a gases (oxigénio);
- devem possuir um diâmetro mínimo de poros de 20 µm para permitir a invasão de fibroblastos para o interior da matriz [6] . O intervalo de diâmetros de poros entre 20 e 125 µm vem referido como o mais eficaz para atrasar e minimizar a contracção de feridas [7].
- devem exhibir propriedades antibacterianas e antifúngicas. A prática adoptada vai no sentido de incorporar substâncias bactericidas em certos materiais, tal como iodo em silicone ou o nitrato de prata (0,5%), o que reduz consideravelmente o risco de infecção nas feridas [3, 8];

- é importante que apresente uma baixa antigenicidade e toxicidade para que possa estar em contacto com a lesão;
- deve permitir taxas de evaporação de água semelhantes à pele, pois caso esse índice seja superior ocorre desidratação provocando danos nos tecidos circundantes. No caso de ser menor, existirá retenção de água sob o material, prejudicando a sua aderência;
- devem ser flexíveis para permitir que o paciente se movimente de uma forma o mais natural possível. Está descrito na literatura que o módulo de elasticidade deve estar compreendido entre 0,1 e 0,2 MPa [9].
- fáceis de preparar, armazenar e usar;
- baixo custo.

Actualmente existem vários produtos no mercado dedicados ao tratamento de queimados. Em termos de substitutos de pele, poucos são os comercializados. São produtos tipicamente acelulares que actuam ou como substitutos de epiderme, como por exemplo o *Suprathel*[®], ou como substitutos de derme, como o *Integra*[®] e o *Biobrane*[®]. Nesse sentido observa-se que o mercado ainda não apresentou uma solução que preencha os critérios para um substituto ideal. Em particular, são caros e mantém-se a necessidade de realizar enxertos de pele para finalizar o tratamento. Existe assim espaço para o desenvolvimento de substitutos de pele mais completos que apresentem um desempenho superior aos actuais.

Entre as estratégias comumente utilizadas destaca-se a produção de matrizes poliméricas de nanofibras. Estas recriam um ambiente adequado para a adesão e proliferação celular devido à semelhança com as dimensões físicas da matriz extracelular natural dos tecidos conjuntivos. As nanofibras podem ser produzidas usando diversas técnicas como *drawing* [10], *template synthesis* [11], separação de fases [12], auto-montagem [13] e electrofiação [14-16]. O interesse em utilizar neste trabalho a técnica de electrofiação deve-se essencialmente à facilidade com que as propriedades mecânicas, biológicas e cinéticas (ex.: cinética de regeneração e de degradação) da matriz resultante podem ser modeladas pela alteração da composição do polímero e parâmetros de processamento. Na electrofiação, a solução polimérica é injectada, através de um capilar, numa zona do espaço onde existe um campo eléctrico intenso. À medida que o solvente evapora, o polímero carregado electricamente executa um movimento oscilatório caótico até à sua deposição num colector.

A investigação científica utilizando matrizes de nanofibras produzidas por electrofiação está documentada na literatura com resultados, de estudos *in vitro* e *in vivo*, bastante promissores no que diz respeito à adesão e proliferação de fibroblastos e consequentemente à capacidade de regeneração do tecido cutâneo.

Relativamente aos estudos *in vitro*, destacam-se alguns trabalhos. Por exemplo, Zhang *et al.* [17] observaram proliferação de fibroblastos dérmicos humanos numa matriz de nanofibras de gelatina de porco, reticuladas com vapor de glutaraldeído (GTA), durante 3 dias. Chong *et al.* [5] semearam fibroblastos dérmicos humanos sobre nanofibras de policaprolactona e gelatina, depositadas num suporte facilmente removível e sobre um substituto epidérmico, o *Tegaderm*[®], usado para proteger a ferida e os fibroblastos de contaminações. Os resultados demonstraram crescimento e adesão em ambas as situações mas pouca infiltração celular no seu interior. Para estimular o crescimento 3D semearam com sucesso fibroblastos em ambos os lados da matriz. Shalumon *et al.* [18] desenvolveram uma matriz de nanofibras de quitosano/policaprolactona onde a adesão e a proliferação de fibroblastos NIH3T3 foi demonstrada pelos resultados promissores do 4º dia de cultura celular. Javed *et al.* [19] produziram uma matriz de nanofibras de quitosano/gelatina reticuladas com vapor de GTA durante 1h. A biocompatibilidade foi demonstrada pela adesão e proliferação celular de fibroblastos dérmicos humanos. Os resultados de Gautam *et al.* [20] confirmaram a biocompatibilidade de nanofibras de policaprolactona/gelatina, as quais promoveram a adesão de fibroblastos de rato (L929) que mantiveram o fenótipo.

Quanto aos estudos *in vivo* tomam-se como exemplo alguns trabalhos como o de Rho *et al.* [21] em que uma matriz de colagénio I, reticulada com vapor de GTA durante 12h, foi aplicada sobre feridas cutâneas induzidas em ratos. Os resultados demonstraram uma boa adesão e proliferação celular sobre as matrizes, resultando numa cicatrização mais rápida após uma semana, face ao grupo de ratos que utilizou apenas uma gaze. Blackwood *et al.* [22] desenvolveram matrizes constituídas por poli(ácido L-láctico) (PLLA) e três copolímeros poli-(D,L-láctico-co-glicólico) (PLGA) com o objectivo de serem utilizados como substitutos de derme. Os materiais foram implantados subcutaneamente em ratos Wistar e em todos os casos foi demonstrada uma boa infiltração celular e ausência de resposta inflamatória aguda. Os melhores resultados foram obtidos com os copolímeros PLGA 85:15 e 75:25. Também Rnjak-Kovacina *et al.* [23] produziram matrizes de nanofibras à base de tropoelastina e colagénio, reticuladas em vapor de GTA durante 1h, para reparação da derme. Estas, assim como um controlo positivo, o produto comercial *Integra*[®], foram implantadas subcutaneamente em murganhos tendo-se verificado um comportamento semelhante: tolerância ao material e a sua persistência pelo menos durante as 6 semanas após a implantação. A matriz gerou uma ligeira resposta inflamatória que não impediu a proliferação de fibroblastos, deposição de colagénio e formação de capilares.

O presente trabalho insere-se no âmbito de um projecto nacional, o Skin2: uma segunda pele bio-sintética, concebida para tratar queimaduras extensas (PTDC/SAU-BMA/109886/2009). Trata-se de um

projecto que pretende desenvolver uma estrutura biomimética, com componentes dérmica e epidérmica usando apenas materiais biodegradáveis e células autólogas.

O objectivo da tese consistiu no desenvolvimento de matrizes de nanofibras, usando a técnica de electrofiação, que integrasse na sua composição três polímeros biocompatíveis e biodegradáveis, escolhidos em função das suas propriedades, favoráveis à regeneração da derme.

A escolha desses polímeros teve em consideração os constituintes da matriz extracelular do tecido conjuntivo. O colagénio é a principal proteína da matriz extracelular da derme e estudos publicados demonstram uma boa adesão, migração e proliferação de fibroblastos em nanofibras de colagénio [24, 25]. Neste trabalho pretendeu-se evitar a utilização de proteínas de origem animal mamífero (como acontece, por exemplo, no primeiro substituto de pele a ser desenvolvido, o *Integra*[®], que usa colagénio de origem bovina [26, 27]). Como substituto do colagénio utilizou-se a gelatina (GEL, origem de peixe de água fria) cuja estrutura contém domínios de reconhecimento celular, como a sequência de aminoácidos tipo Arg-Gly-Asp (RGD), que promovem a adesão, diferenciação e proliferação celular. Esta gelatina não gelifica em água fria, facilitando a sua electrofiação. No entanto é necessário proceder à sua reticulação de modo a evitar a dissolução em meios aquosos ou húmidos.

Um outro polímero natural usado foi o quitosano (CS), um polissacarídeo derivado da quitina, o segundo polímero natural mais abundante na natureza, cuja estrutura é semelhante aos glicosaminoglicanos (GAGs) presentes na constituição da matriz extracelular. O quitosano apresenta boas propriedades de adesão a feridas [28], acção bacteriostática e fungistática [29] e em conjugação com a gelatina proporciona uma boa adesão celular [30].

Os polímeros naturais têm a vantagem de exibirem boas propriedades de compatibilidade e produtos de degradação benignos. Todavia são mecanicamente instáveis e apresentam uma rápida taxa de degradação. Por outro lado, embora os polímeros sintéticos se caracterizem por uma baixa afinidade celular, exibem boas propriedades mecânicas e uma taxa de degradação lenta. O polímero sintético adoptado neste trabalho foi a policaprolactona (PCL), um poliéster hidrofóbico biodegradável que possui elevada plasticidade e ductilidade. É degradado lentamente no corpo por hidrólise das suas ligações éster.

Este trabalho está focado em três aspectos fundamentais.

O primeiro está relacionado com o desenvolvimento, optimização e produção de matrizes de nanofibras.

O segundo diz respeito a um estudo *in vitro*, onde foi avaliada a resposta celular às diferentes matrizes produzidas. O trabalho foi realizado em colaboração com a Professora Gabriela Rodrigues e com

o Doutor Gabriel Martins tendo decorrido no Departamento de Biologia Animal da Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa.

O último aspecto culmina numa análise do desempenho das diferentes matrizes em testes *in vivo*, nomeadamente em ratos Wistar, usados como modelo da pele humana. Os testes *in vivo* foram realizados numa colaboração com o Centro Hospitalar de Lisboa Central. A Dr^a Angélica Rosado foi a responsável pela parte cirúrgica e a Dr^a Manuela Mafra a responsável pela análise histológica.

A estratégia seguida baseou-se na produção de dois conjuntos de matrizes. Um primeiro, de matrizes unitárias, isto é matrizes de cada um dos polímeros considerados, e um segundo, de matrizes obtidas pela mistura dos polímeros - matrizes binárias e uma ternária. O conjunto de matrizes unitárias permitiu avaliar a contribuição de cada polímero para as propriedades físico-químicas e resposta biológica ao sistema combinado.

A tese está organizada em 6 capítulos: introdução, contextualização, desenvolvimento de um substituto dérmico, procedimento experimental, apresentação e discussão dos resultados e conclusões.

Na introdução é identificado o problema e a motivação para este trabalho. É apresentada uma proposta de resolução enquadrada num projecto do grupo de investigação e são descritos os objectivos do trabalho.

O segundo capítulo é dedicado à contextualização do tema da tese. Inicia-se com a descrição da anatomia e fisiologia da pele, seguindo-se a do processo de regeneração de feridas, classificação das queimaduras e terapêuticas clínicas disponíveis.

O terceiro capítulo discute o plano seguido para o desenvolvimento de um substituto dérmico, apresentando o método de produção das matrizes – a electrofiação – bem como as principais características dos materiais usados e os métodos de caracterização da resposta biológica através de testes *in vitro* e *in vivo*.

No quarto capítulo é descrito o procedimento experimental seguido, que inclui desde a caracterização das soluções, processamento e caracterização das nanofibras produzidas até à apresentação dos protocolos usados nas culturas celulares e experimentação animal.

No quinto capítulo são apresentados e discutidos os resultados deste trabalho. A apresentação dos mesmos encontra-se dividida em dois subcapítulos: matrizes unitárias e matrizes binárias e ternária. Em ambos os grupos encontra-se abordada a produção e caracterização das matrizes de nanofibras, os testes *in vitro* e os testes *in vivo*.

No sexto capítulo são sumariadas as principais conclusões do trabalho e apresentam-se um conjunto de propostas a investigar no futuro.

Capítulo 2 - Contextualização

2.1 Pele

2.1.1 Anatomia e Fisiologia

O sistema tegumentar estabelece a fronteira entre o corpo humano e o meio ambiente. É constituído pela hipoderme, pela pele (derme e epiderme) e pelas estruturas anexas, tais como pêlos, unhas e glândulas (Figura 2.1). As suas principais funções são [31]:

- Proteger o corpo da entrada de bactérias ou de substâncias estranhas e de traumatismos das estruturas nobres como as veias, as artérias e os nervos.
- Contribuir para a regulação da temperatura corporal não só através da radiação, condução e convecção do calor mas também através da produção de suor.
- Conferir percepção sensorial ao toque, temperatura e dor.
- Excretar pequenas quantidades de ureia, ácido úrico e amónia.
- Contribuir para a produção de vitamina D3 por exposição à radiação ultravioleta da molécula 7-de-hidrocolesterol presente na pele.

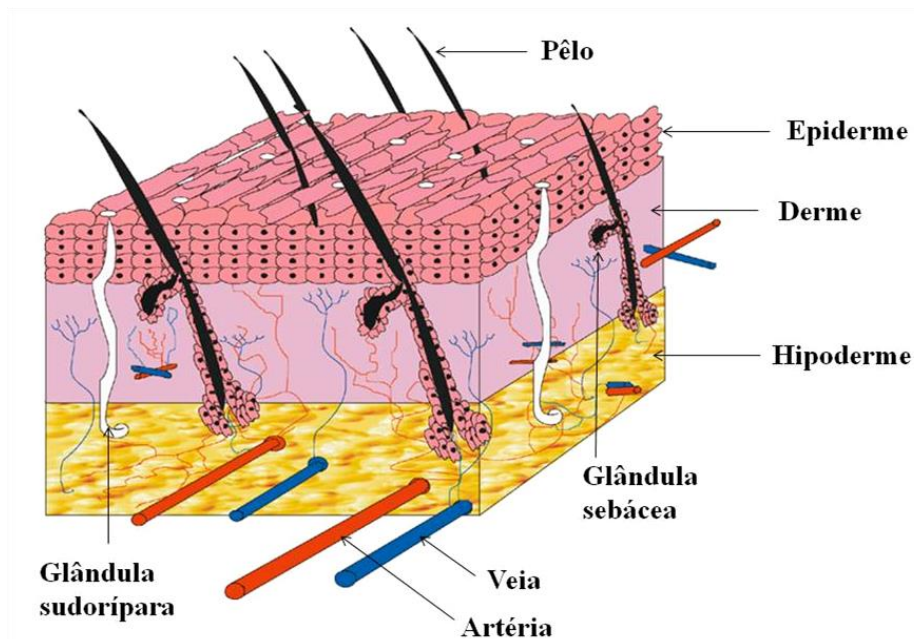


Figura 2. 1 Representação esquemática da hipoderme, da pele e de algumas estruturas anexas (adaptado de [32]).

A pele é o maior órgão do corpo humano podendo, num adulto, estender-se por uma área de 2 m² e pesar 3 kg. Em termos de espessura, pode variar entre 1,5 e 5,0 mm, dependendo da maturidade da pele (idade) e da região do corpo [5]. É constituída por duas camadas principais que se encontram separadas

por uma membrana basal. A epiderme, a camada mais superficial, tipicamente com uma espessura entre 0,1 e 0,2 mm [33], é formada por tecido epitelial. Segue-se-lhe a derme, uma camada espessa de tecido conjuntivo, que por sua vez, assenta na hipoderme.

A hipoderme é uma região provida de nervos e vascularizada constituída por tecido conjuntivo laxo. As principais células presentes são os fibroblastos, as células adiposas e os macrófagos. Cerca de metade da gordura do corpo encontra-se nesta região que funciona como um isolante, uma camada protectora dos órgãos internos e um armazém de energia.

Derme

Tal como a hipoderme, a derme é constituída por tecido conjuntivo onde estão presentes fibroblastos e, em menor quantidade, células adiposas e macrófagos. É na derme que se encontram as terminações nervosas, músculos lisos, vasos sanguíneos e linfáticos, os folículos pilosos e as glândulas sudoríparas e sebáceas.

A derme divide-se em duas camadas: uma camada principal, denominada reticular, e uma camada mais superficial, a papilar (Figura 2.2a).

A camada reticular é constituída por tecido conjuntivo denso e irregular composto essencialmente por fibras de colagénio e elastina que conferem resistência e elasticidade à pele.

A camada papilar é constituída por tecido conjuntivo laxo e deve o seu nome a prolongamentos chamados papilas, que contêm vasos sanguíneos que fornecem nutrientes à epiderme, removem produtos de excreção e ajudam a regular a temperatura corporal.

Epiderme

A epiderme é constituída por tecido epitelial pavimentoso e estratificado. Não contém vasos sanguíneos sendo alimentada por difusão a partir dos capilares da camada papilar da derme.

Na epiderme existem diversos tipos de células:

- os queratinócitos são a grande maioria e têm como responsabilidade a produção de queratina, uma proteína que confere resistência estrutural e impermeabilidade à água;

- os melanócitos que sintetizam um grupo de pigmentos - a melanina - responsáveis pela cor da pele e que a protege da radiação UV;

- as células de Langerhans que fazem parte do sistema imunitário e asseguram a imunovigilância cutânea;
- as células de Merkel que estão associadas a terminações nervosas que detectam o tacto e a pressão superficial.

As células multiplicam-se por mitose na camada mais profunda da epiderme e vão-se deslocando dessa camada para a superfície até descamarem (perderem-se para o exterior). Durante esse processo, designado por queratinização, as células mudam de forma e composição química, acabando por morrer e formar uma camada protectora. A queratinização é um processo contínuo, que dá origem a células em diferentes estádios de modificação. O número de células em cada estrato depende da região do corpo a analisar, podendo distinguir-se até cinco camadas (Figura 2.2b).

A camada basal é a mais profunda e é constituída por um único estrato de células cúbicas e cilíndricas. A estrutura é-lhe conferida pelos hemidesmossomas e pelos desmossomas (complexos proteicos) que fixam a epiderme à membrana basal e mantêm os queratinócitos unidos, respectivamente. Tem como função a produção constante de queratinócitos e é nesta camada que os melanócitos produzem a melanina que protege contra a radiação UV.

A camada espinhosa encontra-se acima da camada basal. É constituída por 8 a 10 estratos de células poligonais ou multifacetadas. No geral as células encontram-se em processo de crescimento - dentro dos queratinócitos formam-se mais fibras de queratina e novos organelos contendo membranas e lípidos, designados por corpos lamelares.

Seguidamente tem-se a camada granulosa constituída por 2 a 5 estratos de células aplanadas, em forma de losango. Aqui são produzidos grânulos de queratohialina que se acumulam no citoplasma das células. Os corpos lamelares destas células aproximam-se da membrana celular e libertam o seu conteúdo lipídico no espaço intercelular. Dentro da célula é formado um invólucro proteico sob a membrana celular; entretanto o núcleo e organelos degeneram e a célula morre.

A camada translúcida surge como uma zona fina e clara assente na camada granulosa e é constituída por 3 a 5 estratos de células mortas. A queratohialina já não se encontra em grânulos mas sim dispersa em torno das fibras de queratina, pelo que as células apresentam um aspecto transparente. Esta camada só está presente em algumas regiões do corpo, por exemplo nas palmas das mãos, nas plantas dos pés e nas pontas dos dedos.

Por fim, a camada córnea, a mais superficial da epiderme, que é composta por 25 ou mais estratos de células queratinizadas mortas unidas por desmossomas. Quando os desmossomas se fragmentam as células descamam na superfície da pele. As células estão rodeadas por um invólucro proteico duro e

preenchidas com a proteína queratina. O invólucro e a queratina são ambos responsáveis pela resistência estrutural do estrato córneo. A envolver as células estão os lípidos libertados pelos corpos lamelares, que previnem a perda de água.

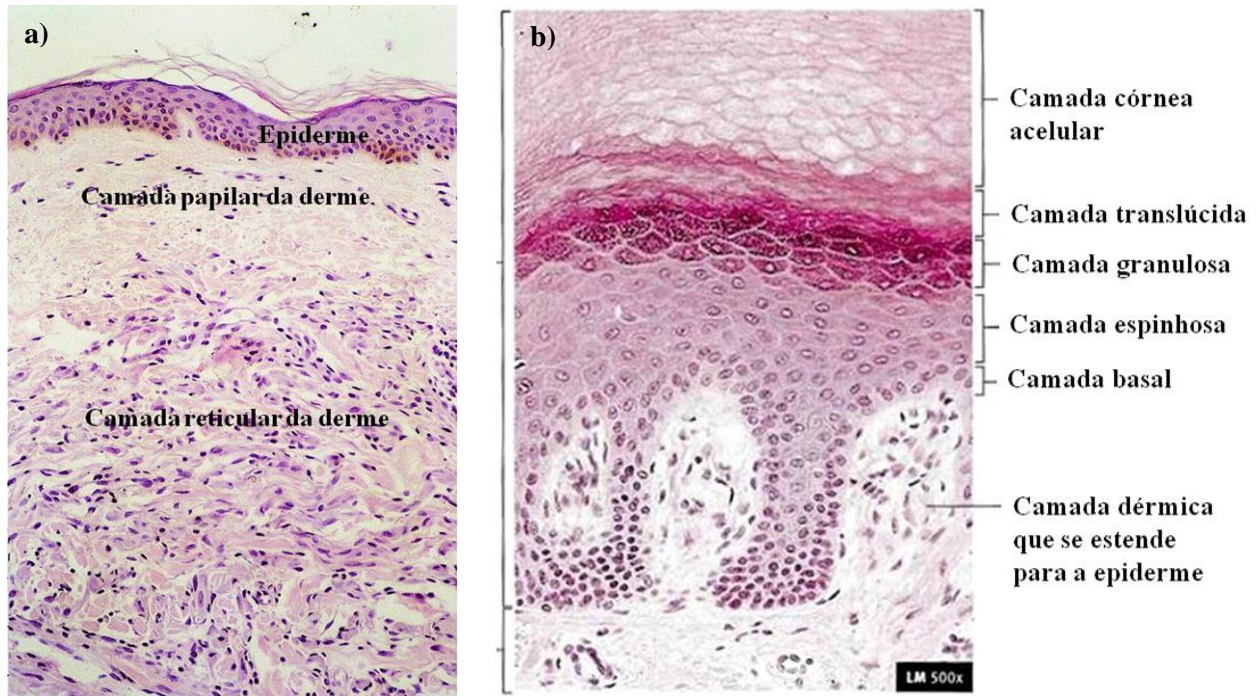


Figura 2. 2 Imagens de microscopia que evidenciam: a) as camadas reticular e papilar da derme (adaptado de [34]) e b) a camada papilar dérmica e a estrutura em camadas da epiderme (adaptado de [31]).

Estruturas Anexas

Os pêlos e as glândulas são estruturas anexas à pele com contributos importantes na manutenção das suas funcionalidades. As glândulas sebáceas e as sudoríparas são as principais glândulas da pele.

Pêlos

A presença de pêlos é comum a todos os mamíferos. Nos seres humanos cobrem quase todo o corpo à excepção das palmas das mãos, plantas dos pés, segmentos distais dos dedos das mãos e dos pés, lábios, mamilos e parte dos órgãos genitais externos.

O pêlo é formado por uma haste que se projecta para o exterior da pele e por uma raiz interior que se expande para formar o bulbo piloso na base da raiz (Figura 2.3). A raiz e a haste são maioritariamente

compostas por colunas de células epiteliais queratinizadas mortas, dispostas em 3 camadas concêntricas denominadas de medula, córtex e cutícula. O pêlo está contido num folículo piloso formado pelas bainhas radiculares epitelial e dérmica. A parte interior da bainha radicular epitelial encontra-se entrelaçada com o pêlo mantendo-o fixo; a exterior possui todas as camadas que constituem a epiderme (à excepção da camada translúcida) e é envolvida pela bainha radicular dérmica.

No interior do bulbo piloso uma massa de células epiteliais indiferenciadas é responsável pela produção do pêlo e da bainha radicular epitelial interior. A derme projecta-se para dentro do bulbo piloso sob a forma de papila que contém vasos sanguíneos que alimentam as células do bulbo. Em caso de lesão da pele em que haja preservação da parte do folículo piloso que fica sob a derme, este pode constituir uma fonte de novo epitélio e portanto regenerar novo pêlo.

Glândulas

As glândulas sebáceas estão localizadas na derme e têm especto alveolar simples ou composto. Produzem sebo, uma substância oleosa, branca e rica em lípidos que é libertado por lise e morte das células secretoras. A maioria destas glândulas está ligada à parte superior dos folículos pilosos via canais, permitindo que o sebo lubrifique o pêlo e a superfície da pele.

As glândulas sudoríparas dividem-se em dois tipos: glândulas sudoríparas merócrinas e apócrinas. As merócrinas são no geral glândulas glomerulares tubulares simples que têm origem na derme e que se abrem directamente na superfície da pele através dos poros sudoríparos. Produzem um líquido isotónico que é libertado sob a forma de suor quando a temperatura do corpo excede os níveis normais, actuando assim como reguladoras da temperatura corporal. As apócrinas são glândulas glomerulares tubulares compostas que no geral se abrem nos folículos pilosos acima da abertura das glândulas sebáceas. Estão localizadas em regiões específicas do corpo tais como axilas, órgãos genitais externos e ânus e estão associadas ao odor corporal e maturidade sexual.

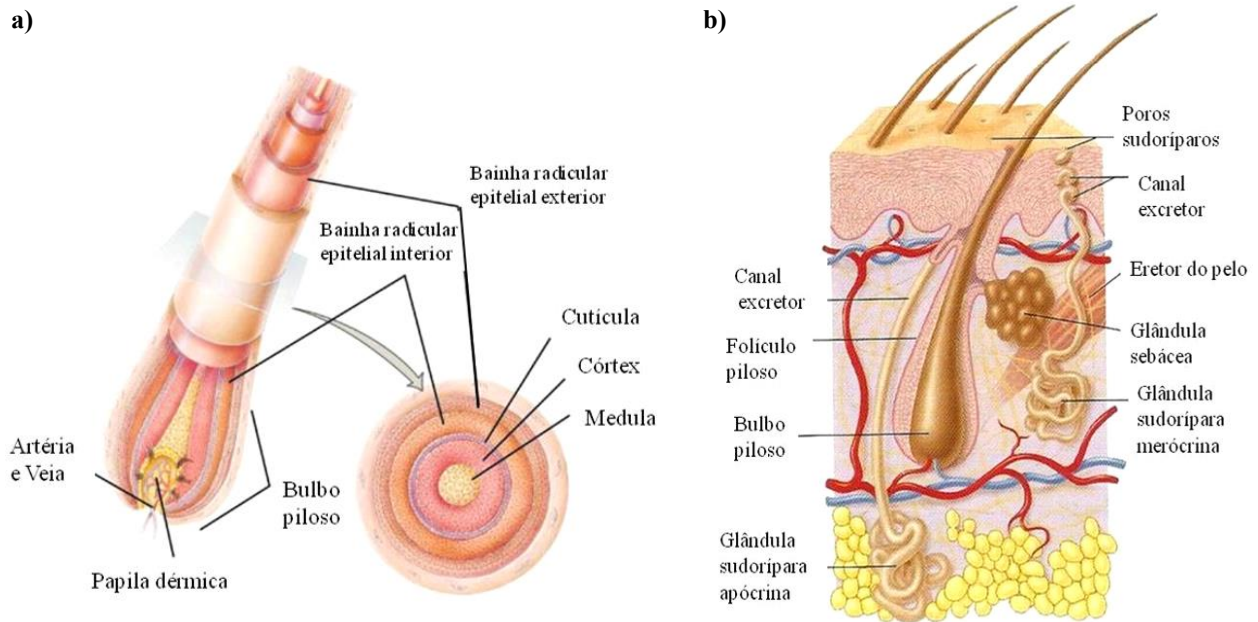


Figura 2. 3 Estruturas anexas da pele: a) pêlo (adaptado de [35]) e b) principais glândulas da pele: sebácea e sudorípara (adaptado de [31]).

2.1.2 Mecanismo de cicatrização de feridas cutâneas

Define-se como ferida uma solução de continuidade da pele, quase sempre de origem traumática, que além da pele pode atingir a hipoderme e o músculo.

Em termos clínicos a cicatrização de uma ferida envolve a conjugação de três processos: (1) re-epitelização, (2) deposição de um tecido conjuntivo específico, a cicatriz, com propriedades funcionais diferentes do tecido original, e (3) contração. Dependendo do tipo de lesão, geralmente um dos processos é dominante [36].

O mecanismo de cicatrização de feridas cutâneas é um processo biológico complexo que envolve múltiplos mecanismos intracelulares e intercelulares indispensáveis ao restauro do organismo. Este mecanismo pode ser dividido em três fases que se sobrepõem parcialmente: inflamação, proliferação e maturação [37-40].

Inflamação

A fase de inflamação tem início no exacto momento da lesão, com a paragem da hemorragia resultante da ruptura dos vasos sanguíneos (hemostase) e dura aproximadamente três dias, período durante

qual são iniciados os mecanismos de defesa contra os agentes externos e são estabelecidas as condições que desencadeiam a cicatrização (Figura 2.4a).

Imediatamente após a lesão as plaquetas são activadas para coagular o sangue libertado. O coágulo, composto maioritariamente por plaquetas, eritrócitos e fibrina, funciona como uma matriz provisória para a migração celular e dará origem a uma crosta que protege os tecidos expostos. As plaquetas libertam os seus grânulos alfa que contêm factores de crescimento (como o PDGF – derivado de plaquetas, EGF – epidérmico e TGF- β - transformador β) e iniciam o processo de cicatrização, por atracção e activação de fibroblastos, células endoteliais e macrófagos. Estes factores activam ainda o sistema complemento¹.

Na fase seguinte, que ocorre entre as 24 e 48h, uma série de agentes quimioatractivos, tais como fragmentos proteicos da matriz extracelular, factor de crescimento TGF- β , produtos peptídicos de bactérias, accionam a migração de neutrófilos para o interior da ferida. Estas células têm como função a fagocitose de bactérias e outras partículas estranhas, por acção enzimática e radicais livres de oxigénio, minimizando a contaminação e impedindo a infecção. Durante este período, os queratinócitos não danificados na margem da ferida (e também os das estruturas anexas, no caso de ferimentos de espessura parcial da pele) aumentam a actividade mitótica e começam a migrar para dentro da ferida depositando componentes da membrana basal, iniciando a re-epitelização.

Nas últimas 48 a 78h, torna-se mais importante a actuação dos macrófagos, que são activados por um conjunto de agentes quimioatractivos que incluem componentes de coagulação, fragmentos de imunoglobulina G, produtos resultantes da quebra do colagénio e elastina e citocinas (leucotrina B4, factor plaquetário IV, factores de crescimento PDGF e TGF- β). Além de funcionarem como células fagocíticas são as principais produtoras dos factores de crescimento responsáveis pela activação dos fibroblastos e proliferação de células musculares lisas e endoteliais necessárias ao crescimento de novos vasos sanguíneos (angiogénese).

Proliferação

Esta fase começa aproximadamente ao 3º dia após o ferimento e demora cerca de 2 semanas. É caracterizada pela proliferação de fibroblastos e de células endoteliais na ferida, dando início ao processo fibroplasia (síntese de colagénio) e de angiogénese, e respectivamente (Figura 2.4b).

Os fibroblastos surgem no processo entre o 2º e 4º dias da lesão. Os seus principais estímulos são os factores FGF (factor de crescimento de fibroblastos), PDGF, TGF- β , IL-1(interleucina), TNF (factor de

¹ Sistema de proteínas funcionalmente ligadas entre si que interage de forma regulada, permitindo uma amplificação da resposta imunológica.

necrose tumoral) e IGT-1 (factor de crescimento do tipo insulina-1). Os fibroblastos começam por produzir fibronectina e ácido hialurónico, seguindo-se o colagénio (essencialmente dos tipos I e III) e os proteoglicanos. Estes componentes irão ajudar a construir uma nova matriz extracelular que irá preencher o defeito tecidual causado pela lesão e suportar o movimento e crescimento de células atraídas para o local. Os factores PDGF e TGF- β induzem também a diferenciação dos fibroblastos em miofibroblastos (tipo de fibroblastos dotados de proteínas contrácteis), que ligando-se às fibras de colagénio III, promovem a contracção das feridas.

Em simultâneo, os factores de crescimento PDGF, FGF, VEGF (factor de crescimento do endotélio vascular) e TGF- β estimulam a migração e proliferação de novos vasos sanguíneos.

Entre o 3º e 5º dias a matriz encontra-se povoada por uma rede microvascular, fibroblastos e células inflamatórias, configurando o tecido de granulação.

Com a evolução do processo, a densidade de células inflamatórias e vasos sanguíneos diminui e o tecido de granulação vai sendo substituído principalmente por colagénio I, finalizando com a formação de tecido de cicatriz.

Maturação

É um período caracterizado pela alteração do tipo de colagénio que compõe a matriz extracelular, transitando para um tecido mais organizado e conseqüentemente mais resistente (Figura 2.4c). A re-epitelização da lesão finaliza.

Inicialmente, o colagénio III é o mais abundante na ferida, e vai sendo degradado com o decorrer do processo de cicatrização. Por sua vez, o colagénio I é produzido pelos fibroblastos que migraram para a ferida. Por exemplo, o factor de crescimento PDGF estimula uma maior degradação de colagénio I e síntese de colagénio III enquanto o factor TGF- β induz uma maior síntese do tipo I e uma menor degradação do mesmo por influência das metaloproteínases da matriz (MMPs) e seus inibidores.

Deste modo, a razão entre estes dois constituintes tem um papel decisivo na contracção da ferida e no processo de maturação.

Paralelamente à substituição do tipo de colagénio dá-se uma alteração na sua organização. As fibras de colagénio dispostas de uma forma aleatória evoluem para um estado de alinhamento ao longo das linhas de tensão. Este processo é o responsável pelo aumento da resistência da estrutura danificada. Geralmente é necessário esperar alguns meses para que resistência da pele atinja cerca de 80% do valor antes de ter sofrido a lesão. Este tempo depende de certos factores que podem ser divididos em dois tipos fundamentais. Primeiro, tem a ver com os aspectos relativos a toda a terapêutica que foi aplicada. Em

segundo, existem os aspectos relacionados com o próprio paciente, nomeadamente, os dados relativos à sua idade, estado nutricional e a existência de doenças de base.

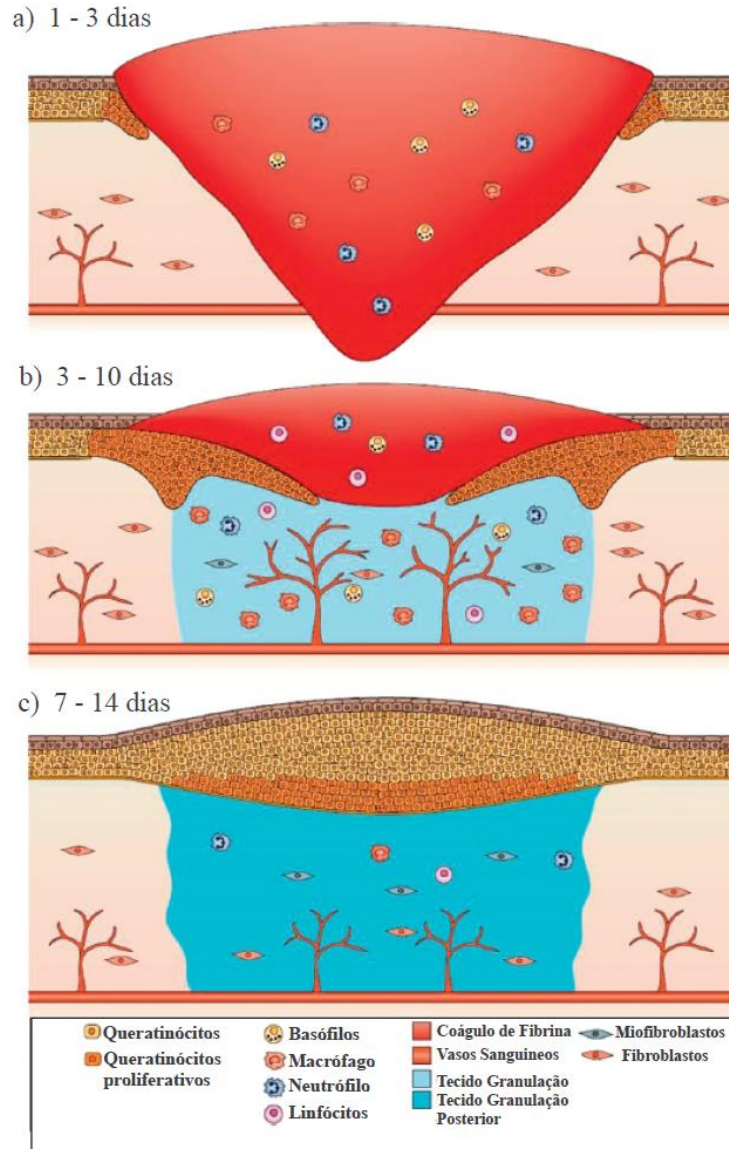


Figura 2. 4 Etapas clássicas da cicatrização de feridas: (a) inflamação, (b) proliferação e (c) maturação (adaptado de [40, 41]). (a) A ferida é preenchida com um coágulo rico em fibrina logo após a lesão (hemostase). São acionados os mecanismos de defesa (neutrófilos e macrófagos) para impedir a infecção. Os queratinócitos na margem da lesão entram em processo mitótico e começam a formar nova epiderme. (b) A maioria das células migra para a ferida. Os fibroblastos começam a sintetizar nova matriz extracelular e novos vasos sanguíneos povoam a área. O novo tecido denomina-se tecido de granulação. A ferida contrai. (c) O tecido de granulação é substituído por tecido de cicatriz (colagénio I). As fibras de colagénio reorganizam-se permitindo um aumento da resistência da pele.

2.2 Queimaduras

As queimaduras são um tipo de ferida cutânea que pode ser classificada mediante a extensão da superfície corporal afectada e a profundidade de pele lesada.

O cálculo da extensão de área queimada depende da faixa etária do indivíduo e normalmente é avaliada através da “regra dos nove” (Wallace), uma regra que divide o corpo em segmentos corporais e atribui a cada parte uma percentagem de nove por cento (ou um múltiplo dele) da área total da superfície do corpo. Esta avaliação é posteriormente corrigida e quantificada pela utilização de cartas corporais. Mediante a extensão da lesão estas podem classificar-se em leves (menos de 10% da superfície corporal), médias (entre 10 a 20%) e graves (mais de 20%).

Relativamente à profundidade da queimadura, estas classificam-se consoante a espessura de pele danificada: se for uma espessura parcial, podem ser queimaduras de 1º ou 2º grau; se a espessura for total é considerada uma queimadura de 3º grau. Ainda existe uma queimadura de 4º grau, que corresponde a um estado de carbonização e nesta situação a lesão atinge o músculo e osso. Os agentes de queimaduras podem ser térmicos (por exemplo: chama, líquido, objecto quente, frio - geladura), químicos, eléctricos ou radiação (radioterapia ou agente radioactivo).

Nas queimaduras de 1º grau apenas a epiderme é lesada. Apresentam um aspecto ruborizado (avermelhado), são dolorosas e podem ser acompanhadas por um ligeiro edema (inchaço) (Figura 2.5). A cura é espontânea, caso não se observem complicações, como por exemplo infecção, pois os folículos pilosos e glândulas sudoríparas estão conservados, assegurando a re-epitelização ao fim de uma semana. Normalmente não deixam sequelas.



Figura 2. 5 Exemplo de uma queimadura de 1º grau [42].

As queimaduras de 2º grau envolvem a epiderme e parte da derme. Se a lesão na derme for superficial (na camada papilar), os sintomas são semelhantes às queimaduras de 1º grau, com a exceção do aparecimento de flictenas volumosas (bolhas) (Figura 2.6a). A regeneração também é espontânea e demora entre 7-14 dias. Geralmente não deixam cicatriz.

No caso de uma lesão dérmica mais profunda, o ferimento aparece vermelho ou esbranquiçado (Figura 2.6b). Apenas poupa a base dos folículos pilosos e glândulas sudoríparas e são pouco dolorosas. As flictenas são pequenas ou ausentes e a pele está endurecida, embora maleável. A recuperação é espontânea mas lenta, sendo sempre superior a 15 dias e acontece frequentemente com cicatrização hipertrófica (cicatriz elevada em relação ao tecido original, isto é, com uma densidade de fibras de colagénio superior ao normal).

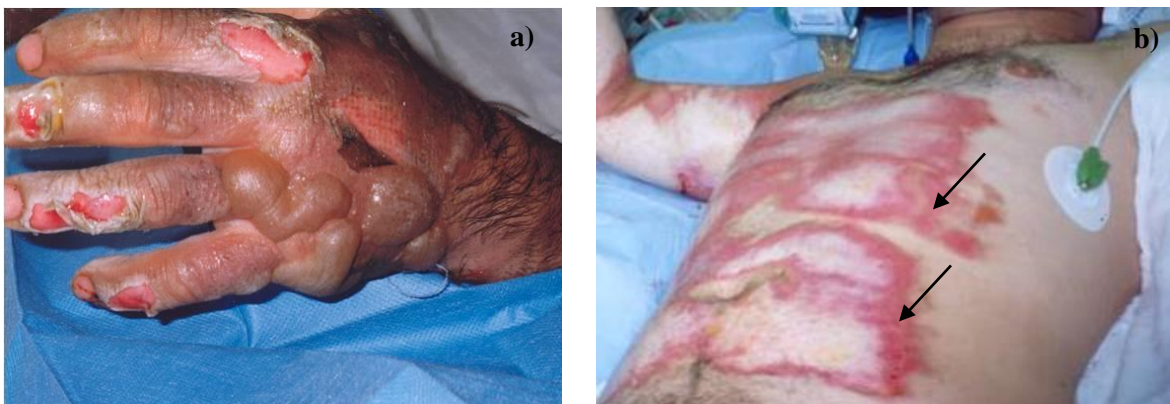


Figura 2. 6 Exemplos de uma queimadura de 2º grau: a) superficial e b) profunda (imagens cedidas pelo Hospital de São José).

Nas queimaduras de 3º grau há perda total da epiderme e derme, podendo ser atingido tecido mais profundo. No geral, encontram-se rodeadas por queimaduras de primeiro e segundo grau. Enquanto as queimaduras de 1º e 2º grau são dolorosas, a terceira não o é pois os receptores sensoriais foram destruídos. O ferimento pode ser branco, acastanhado ou negro (Figura 2.7). Neste tipo de queimaduras não há regeneração espontânea da pele. O fecho da lesão ocorre parcialmente por contracção das margens na direcção do centro, as sequelas são constantes e no geral são necessários protocolos mais complexos, onde se inserem, entre outros, actos cirúrgicos.



Figura 2. 7 Exemplo de uma queimadura de 3º grau (imagem cedida pelo Hospital de São José).

2.2.1 Tratamento de Queimaduras

Em 2004 cerca de 11 milhões de pessoas a nível mundial recorreram a serviços de saúde com queimaduras severas [2]. Nas últimas décadas, o tratamento deste tipo de lesões sofreu avanços disruptivos muito significativos, reflectindo-se numa melhoria da qualidade de vida das pessoas após os acidentes. A evolução da ciência médica e de procedimentos hospitalares permitiu identificar as principais áreas no que diz respeito aos cuidados médicos de lesões provocadas por queimaduras [43]:

- Fluidoterapia endovenosa segundo protocolos específicos, visando o restabelecimento dos líquidos e electrólitos que estão a sair dos capilares, devido a um aumento de permeabilidade destes pelo corpo todo.

- Adição de suplementos nutricionais no sentido de fazer face à resposta hipermetabólica que o organismo tem nestas situações de agressão violenta.

- Protocolos médicos para controlo das infecções associadas a este tipo de lesões, como a colocação dos pacientes em ambiente asséptico, administração de antibióticos, remoção dos tecidos desvitalizados ou necróticos (desbridamento) e a cobertura temporária ou definitiva das áreas queimadas.

Quando os clínicos estão perante lesões de 1º grau, dependendo da extensão, geralmente optam pela aplicação de cremes hidratantes não havendo necessidade de tapar a ferida (tratamento exposto ou aberto).

Quando as queimaduras são de 2º grau superficial ou profundo mas pouco extenso, a abordagem para o tratamento incide, fundamentalmente, na limpeza da ferida, aplicação de soluções antissépticas e a

posterior aplicação de agentes tópicos, entre os quais, os que utilizam o princípio activo sulfadiazina de prata a 1%, cujas propriedades antibacterianas oferecem a garantia dos melhores resultados para o tratamento deste tipo de queimaduras.

No que diz respeito a queimaduras de 2º grau profundas e 3º grau a terapia padrão visa o desbridamento e o encerramento da área cruenta. Os métodos utilizados na recuperação deste tipo de lesões podem classificar-se em autoenxertos, xenoenxertos, aloenxertos e substitutos sintéticos ou biosintéticos [44].

Os autoenxertos são procedimentos cirúrgicos que transplantam para a região lesada pele do próprio paciente. Este procedimento pode ocorrer por remoção parcial ou total (ocorre em locais muito específicos como por exemplo as pálpebras, zonas de flexão, à volta da boca, pois a pele não retrai depois de um autoenxerto total) de pele saudável em determinadas regiões do corpo do paciente ou pelo transplante de uma cultura de queratinócitos e fibroblastos autólogos. Por exemplo, o *Laserskin*® (Anika Therapeutics Inc.) é um produto cujo conceito assenta no transplante de epiderme cultivada *in vitro*. É efectuada uma recolha de queratinócitos do paciente que são cultivados em laboratório e semeados em matrizes compostas por ácido hialurónico, previamente microfurado a laser, constituindo um ambiente propício à formação do tecido a regenerar.

Os xenoenxertos ou heteroenxertos correspondem a enxertos transplantados entre espécie diferentes. O animal mais utilizado tem sido o porco e os produtos comerciais disponíveis dirigem-se essencialmente à substituição temporária da derme. Um produto exemplo é o *OASIS*® (Healthpoint), um produto acelular composto por alguns componentes da matriz extracelular como glicosaminoglicanos, fibronectina e proteoglicanos e factores de crescimentos. O *MatriDerm*® (MedSkin Solutions) é um produto semelhante, mas de origem bovina, constituído pelas proteínas colagénio e elastina. Uma abordagem um pouco diferente mas que se insere na categoria dos xenoenxertos é o *Epicel*® (Genzyme Tissue Repair Corporation), um produto feito a partir da colheita de queratinócitos do próprio paciente, os quais regeneram a epiderme em ambiente *in vitro* mediante a presença de fibroblastos de rato. Embora seja um método que permite uma substituição permanente da epiderme, enquanto produto apresenta algumas desvantagens tais como o preço, o tempo de preparação e fragilidade.

Os aloenxertos ou homoenxertos referem-se ao transplante entre indivíduos geneticamente diferentes mas da mesma espécie, podendo ser de doadores vivos ou de cadáver. Geralmente classificam-se em acelulares e celulares. Os aloenxertos acelulares são assim denominados pois resultam no transplante de um tecido cujas componentes celulares foram previamente removidas. Entre estes destacam-se os derivados da derme de doadores cadáveres humanos. A preparação deste tipo de tecidos

passa por um conjunto de etapas que envolve a sua criopreservação e liofilização com o intuito de remover agentes infecciosos e antigénicos. A estrutura acelular resultante serve de suporte para o crescimento de fibroblastos hospedeiros e promover a revascularização. Alguns produtos comerciais que assentam nesta metodologia são o *AlloDerm*[®] (LifeCell), o *GraftJacket*[®] (Wright Medical Technologies, Inc.) e o *DermaMatrix*[®] (Musuloskeletal Transplant Foundation). Estes substitutos são reconhecidos por controlar a dor mas apresentam limitações na protecção contra a invasão de agentes externos. Outra solução comercializada é a membrana amniótica humana criopreservada, em Portugal disponibilizada pelo Centro de Histocompatibilidade. Esta membrana, imunologicamente inerte, é caracterizada por assegurar um bom transporte de vapor de água, barreira de protecção e o ambiente propício à adesão e proliferação de fibroblastos e células epiteliais que coordenam o processo de reparação. A grande desvantagem reside na dificuldade em obter, preparar e armazenar.

Na base de concepção dos aloenxertos celulares está a produção de um suporte onde são semeados fibroblastos humanos, que sintetizam proteínas e outros componentes da matriz extracelular, nomeadamente factores de crescimento que irão ser usados para estimular as células dentro da ferida promovendo a sua recuperação. Alguns produtos que utilizam este método são o *TransCyte*[®] (Advanced BioHealing, Inc.) e o *Dermagraft*[®] (Advanced Biohealing, Inc.). O primeiro utiliza uma matriz de nylon revestida com colagénio dérmico de porco onde são semeados fibroblastos neonatais. Os fibroblastos são criopreservados, mas no processo de implante apenas se mantêm intactos a matriz extracelular sintetizada e os factores de crescimento. Como usa colagénio de porco e proteína de bovino no meio de crescimento, a hipersensibilidade a estes produtos são a sua principal contra-indicação. Tipicamente são utilizados como substitutos permanentes de feridas superficiais ou substitutos temporários de feridas mais profundas que requerem enxerto de pele numa fase posterior. No segundo produto os fibroblastos são semeados em matrizes de poliglactina e mantêm-se preservados após implantação na ferida, permitindo que continuem a secretar factores de crescimento e a recrutar células hospedeiras até que o crescimento interno de tecido substitua gradualmente o implante.

Os aloenxertos compósitos são os produtos mais avançados e próximos da pele real actualmente disponíveis no mercado. São produtos constituídos por multicamadas onde crescem em paralelo queratinócitos (regeneração da epiderme) e fibroblastos (regeneração da derme). Dentro dos produtos existentes comercialmente destacam-se o *Apligraf*[®] (Organogenesis, Inc.), que utiliza gel de colagénio de bovino tipo I para semear fibroblastos e uma camada de epiderme composta por queratinócitos e o *Orcel*[®] (Ortec International, Inc.), que utiliza uma esponja composta por colagénio de bovino tipo I onde em cada

face são semeados fibroblastos e queratinócitos, respectivamente. Tipicamente, estes produtos são mais utilizados no tratamento de feridas crônicas.

Os substitutos sintéticos ou biosintéticos são produtos tipicamente acelulares que podem ser concebidos em monocamada ou bicamada. Um exemplo de produto concebido em monocamada é o *Suprathel*[®] (Institute of Textile and Process Engineering, Denkendorf, Germany; Burn Department of Marienhospital, Stuttgart, Germany) que atua como substituto de epiderme. É composto essencialmente pelo copolímero sintético DL-Láctico (> 70%), trimetilcarbonato e ϵ -caprolactona. Apresenta uma boa plasticidade e permeabilidade à água. É uma membrana de estrutura porosa, com poros de diâmetro variável entre 2 a 50 μm , que exibe tempos de cicatrização aceitáveis. Quanto a produtos concebidos em bicamada são geralmente substitutos dérmicos mas que contêm uma camada epidérmica à base de silicone removível que ajuda a proteger a ferida. Os produtos que se evidenciam nesta categoria são o *Integra*[®] (Integra Life Sciences Corporation) e o *Biobrane*[®] (UDL Laboratories, Inc.). No primeiro produto a matriz dérmica é formada por colagénio de bovino e glicosaminoglicanos. A matriz é concebida para ter diâmetros de poros entre 20 a 50 μm para promover a infiltração de fibroblastos e células endoteliais da ferida. A matriz é gradualmente reabsorvida à medida que a derme é regenerada e vascularizada. No final, a camada epidérmica é removida e a ferida é encerrada com a aplicação de um autoenxerto. No segundo produto a matriz dérmica é composta por uma malha de nylon coberta com peptídeos derivados de colagénio de porco tipo I que permite a actuação dos fibroblastos hospedeiros e capilares na reparação da derme. Todavia, a aplicação deste produto requer uma ferida previamente vascularizada.

De todos os produtos existentes no mercado ao dispor dos clínicos, ainda não existe um que preencha todos os requisitos para ser denominado, verdadeiramente, de substituto definitivo de pele. Os substitutos descritos estão limitados na cicatrização completa das queimaduras de 3º grau, por rejeição imunitária e por necessidade da realização de um autoenxerto.

Nesse sentido o desenvolvimento de um verdadeiro substituto de pele torna-se uma necessidade premente, sendo por isso uma área com grande espaço para desenvolvimentos e com grande impacto clínico no tratamento de lesões com perda total de pele [3].

Capítulo 3 – Desenvolvimento de um substituto dérmico

3.1 Técnica de processamento

3.1.1 Electrofiação

A electrofiação é um processo que recorre à força electrostática para produzir fibras de base polimérica [45, 46]. Embora centenária, foi apenas na década de 1990 que Doshi e Reneker dirigiram esta técnica para a produção de fibras à escala submicrométrica [16, 47]. A comunidade científica reconheceu então que esta técnica de concepção simples abria a oportunidade para produzir materiais competitivos em áreas tão distintas como vestuário, sensores, energia e engenharia de tecidos [48-51].

Do ponto de vista experimental, a técnica de electrofiação requer apenas algum equipamento:

- uma fonte de alta tensão, capaz de estabelecer diferenças de potencial (ddp) da ordem dos kV;
- um reservatório para manter uma solução polimérica a fiar (tipicamente usa-se uma seringa);
- pode ser usada uma bomba infusora para controlar o caudal de saída da solução do reservatório;
- dois eléctrodos entre os quais a fonte estabelece a ddp: um acoplado ao reservatório (normalmente uma agulha) e um alvo condutor ligado à terra (colector) onde o material é depositado. A geometria do colector bem como o seu estado de movimento permitem controlar algumas características da deposição [45]. O esquema típico de um sistema de electrofiação horizontal, utilizando um colector plano, encontra-se representado na Figura 3.1.

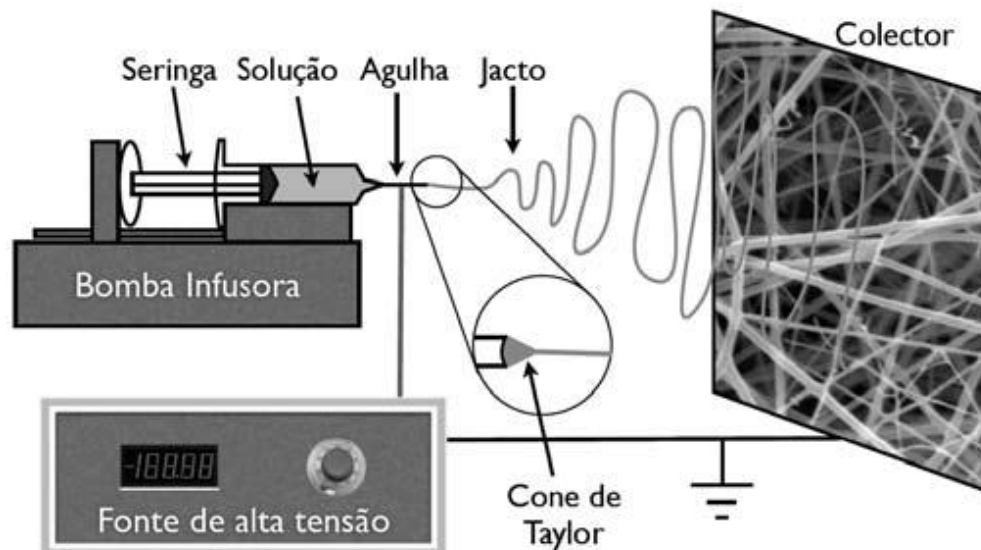


Figura 3. 1 Esquema de um sistema de electrofiação na configuração horizontal [52].

O processo de electrofiação envolve a formação de um jacto da solução polimérica que é estirado enquanto se move em direcção ao colector. Geralmente o processo decorre em condições atmosféricas normais mas também pode ser estabelecido em vácuo [53] ou em ambiente com temperatura ou grau de humidade controlados.

Considerando a montagem da Figura 3.1, quando se estabelece a ddp entre a agulha e o colector plano é gerado um campo eléctrico no espaço entre estes eléctrodos. A Figura 3.2 mostra as linhas equipotenciais e as linhas de campo eléctrico nessa região, obtidas numa simulação da polarização eléctrica dos eléctrodos. Como se observa, o campo eléctrico é particularmente intenso junto à agulha, e diminui com a distância a ela tendendo a ser relativamente uniforme na região mais próxima do colector.

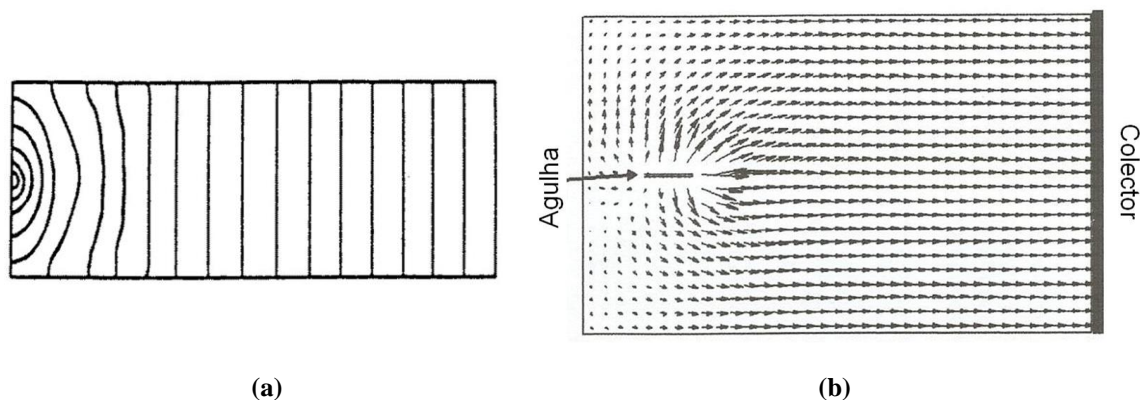


Figura 3. 2 Representação das a) linhas equipotenciais [53] e b) linhas do campo eléctrico no plano que contém a agulha de um sistema horizontal de electrofiação. Os esquemas foram obtidos numa simulação em que se considerou a agulha polarizada positivamente em relação ao colector [54].

Na ausência de tensão aplicada, a solução polimérica não está carregada e ao sair da extremidade da agulha tende a adoptar a forma de uma gota esférica devido à acção da tensão superficial.

Quando a agulha é polarizada, a gota carrega com carga de sinal igual ao da tensão aplicada. Para além do efeito da repulsão entre as cargas à sua superfície, a gota sente o efeito da força exercida pelo campo eléctrico que se estabelece entre a agulha e o colector e adquire uma forma cónica, denominada cone de Taylor (Figura 3.1) [55]. Se a tensão aplicada for suficientemente elevada a força electrostática de repulsão supera a tensão superficial da solução e um fino jacto emerge da ponta do cone de Taylor em direcção ao colector, conduzido pelo campo eléctrico [46, 56-58]. Se a taxa de extracção electrostática for maior do que a taxa de infusão, o cone de Taylor tende a colapsar e o jacto emerge do interior da agulha. De acordo com Reneker et. al. [55] a mobilidade dos transportadores de carga nas soluções poliméricas é em geral muito reduzida, da ordem de $10^{-6} \text{ ms}^{-1}/(\text{V/m})$, e por isso em muitos casos assume-

se que os iões estão fixos na solução e movem-se com o jacto. As correntes envolvidas são tipicamente baixas não excedendo alguns μA .

A trajectória descrita pelo jacto entre a agulha e o colector depende da competição que se estabelece entre as forças de tensão superficial, electrostáticas (de repulsão entre as cargas transportadas pelo jacto e entre estas e o campo eléctrico existente na região entre a agulha e o colector) e viscoelásticas. Enquanto a fibra não solidifica por evaporação do solvente, a repulsão electrostática entre as cargas que transporta é responsável pelo seu estiramento evitando o aparecimento de acumulações locais de polímero, designadas por contas, por acção da tensão superficial. As forças viscoelásticas devem garantir que a fibra não quebre durante o estiramento que conduz à redução do seu diâmetro.

Em geral distingue-se no início do jacto uma primeira região de movimento linear que precede uma região de movimento caótico.

Em 2008, Reneker e Yarin [59] publicaram um extenso trabalho onde descreveram pormenorizadamente a formação de jactos na electrofiação.

Perturbações causadas por acumulações locais de carga no jacto provocam instabilidades que resultam na produção de movimentos em espiral, em ramificações ou até na formação de jactos múltiplos (Figura 3.3).

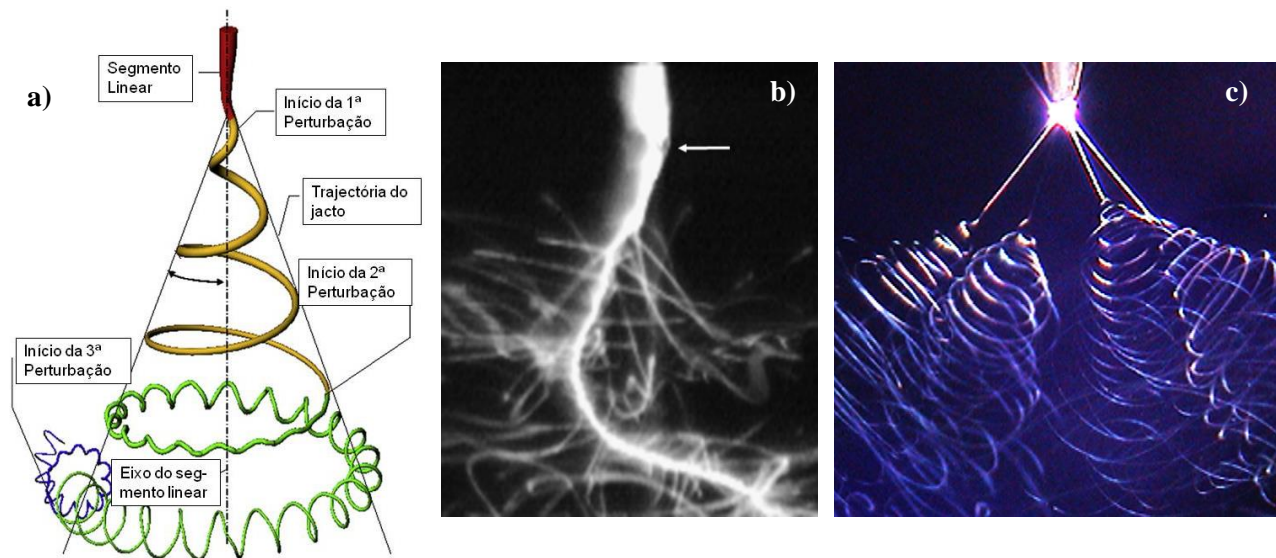


Figura 3. 3 Configurações de jactos durante a electrofiação: a) Esquema da trajectória instável de um jacto inicialmente linear em que três perturbações eléctricas geram movimentos em espiral [59]; b) Fotografia de um jacto no início da espiral principal, onde são visíveis várias ramificações (a seta indica a extremidade da agulha [59]; c) Fotografia de um cone de Taylor a partir do qual são ejectados quatro jactos em simultâneo [59].

Perturbações no jacto provocadas por uma diminuição local de carga permitem o domínio da tensão superficial e são responsáveis por surgirem contos nas fibras depositadas (Figura 3.4).

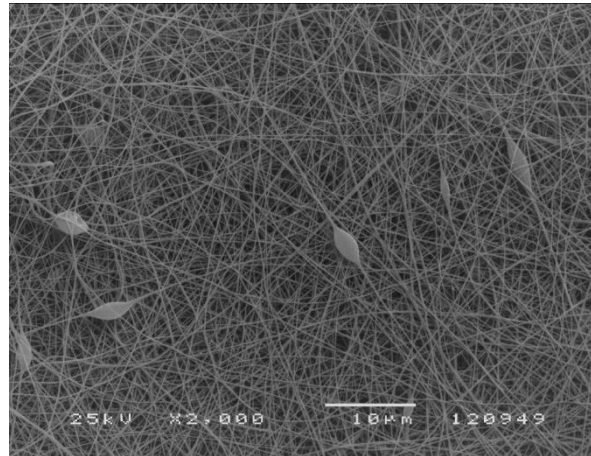


Figura 3. 4 Imagem de MEV de uma deposição de fibras com contos (imagem obtida no âmbito deste trabalho).

Quando chega ao colector, a fibra deposita-se e liberta, para a terra, a carga que transporta. A morfologia da deposição depende da configuração da fibra ao chegar ao colector. Esta configuração, por sua vez, depende de um conjunto de parâmetros que influenciam o processo de electrofiação e que, em certa medida, podem ser ajustados permitindo ter algum controlo sobre a morfologia da deposição.

A morfologia da deposição pode ainda ser afectada pelo impacto da fibra no alvo, em particular se não tiver ocorrido a completa evaporação do solvente durante o tempo de voo.

3.1.2 Parâmetros de Electrofiação

O processo de electrofiação é influenciado por um conjunto de variáveis [45]. Desde logo, assumem particular importância as propriedades da solução a electrofiar, tais como a viscosidade, a tensão superficial e a condutividade eléctrica que dependem da constituição da solução e portanto do solvente escolhido para um determinado polímero. As propriedades do solvente, tais como a volatilidade, a condutividade e a tensão superficial, influenciam significativamente a morfologia e o diâmetro das fibras [15].

As forças a que o fio polimérico está sujeito durante a electrofiação dependem, para além das propriedades da solução, das condições de processamento, entre as quais se salientam, o caudal da solução, o diâmetro da agulha, a ddp estabelecida entre a agulha e o colector, a distância entre estes

eléctrodos e o tipo de colector. Por fim, as condições ambientais, tais como a temperatura e humidade, também afectam o processo.

Um bom ajuste dos parâmetros atrás referidos é essencial para electrofiar um polímero e, dentro do possível, obter uma deposição de fibras sem defeitos (isto é, de secção recta circular e com pouca dispersão de diâmetros). A seguir apresentam-se os principais efeitos dos parâmetros mais relevantes no processo de electrofiação.

Viscosidade

A viscosidade de uma solução, η , é a propriedade física que quantifica a resistência da solução ao escoamento, para uma dada temperatura. Numa solução polimérica, essa resistência depende do peso molecular médio e da concentração do polímero em solução e da sua interacção com o solvente.

Para um determinado solvente de viscosidade η_0 , a capacidade do polímero aumentar a viscosidade da solução é expressa pela viscosidade específica, η_{sp} :

$$\eta_{sp} = \frac{\eta}{\eta_0} - 1, \quad (3.1)$$

A viscosidade intrínseca, $[\eta]$, para um dado par polímero-solvente é definida pelo limite para a concentração, c , nula de η_{sp}/c . A equação de Staudinger-Mark-Houwink relaciona a viscosidade intrínseca com o peso molecular médio do polímero, M :

$$[\eta] = \lim_{c \rightarrow 0} \frac{\eta_{sp}}{c} = KM, \quad (3.2)$$

onde K e a são parâmetros característicos de cada sistema polímero solvente. A viscosidade intrínseca dá informação sobre o tamanho das macromoléculas em solução e sobre a qualidade do solvente [9]. Num bom solvente as cadeias poliméricas estão envolvidas por moléculas de solvente, o que reduz o contacto entre segmentos de polímero e favorece uma configuração estendida. Num mau solvente os segmentos de polímero podem ser atraídos entre si e, neste caso, as cadeias adoptam a configuração enrolada. Uma configuração estendida está associada a uma maior viscosidade enquanto uma configuração enrolada está associada a um decréscimo deste parâmetro.

Quanto mais elevado for o peso molecular de um dado polímero maior é o tamanho médio das cadeias e maior é a probabilidade de ocorrerem entrelaçamentos entre elas. Estes entrelaçamentos são responsáveis pelo aumento da viscosidade da solução polimérica. Uma outra forma de aumentar a viscosidade, para M constante, é aumentar a concentração de polímero na solução aumentando assim o número de cadeias.

As forças viscoelásticas, proporcionais à viscosidade da solução, desempenham um papel

importante durante a electrofiação. Elas devem garantir que o jacto estire sem partir evitando a formação de contas devidas à prevalência da tensão superficial da solução. Soluções com viscosidades demasiado baixas, produzem fibras com contas esféricas. À medida que a viscosidade aumenta processa-se uma alteração gradual na forma das contas, de esféricas para fusiformes, até se obterem fibras de secção recta circular uniforme. O diâmetro destas fibras tende a aumentar com a viscosidade já que a intensidade das forças viscoelásticas que se opõem ao estiramento aumenta. Este aumento contribui também para uma redução/eliminação de ramificações do jacto. Para fiar soluções muito viscosas são necessárias tensões relativamente elevadas.

Tensão superficial

A tensão superficial de um fluido é uma consequência de uma força resultante não nula associada às interacções a que as moléculas à superfície do fluido estão sujeitas. Esta resultante aponta para o interior do fluido (as interacções com outras moléculas do fluido são mais intensas do que com as moléculas de ar) e tende a minimizar a superfície de fluido (configuração de menor energia). O efeito físico de resistência de um líquido, em alterar a configuração de menor energia, mediante a aplicação de forças externas é uma consequência desta tensão. A tensão superficial de uma solução polimérica depende principalmente do solvente usado [45].

Como já foi referido, para que o processo de electrofiação tenha início é necessário que as forças electrostáticas de repulsão entre as cargas em conjunto com a força eléctrica a que as cargas estão sujeitas por acção do campo eléctrico externo superem a tensão superficial da solução. Um domínio da tensão superficial no jacto devido a uma baixa viscosidade da solução ou à redução local de cargas no jacto pode ser responsável por surgirem contas ou gotas na deposição.

Condutividade Eléctrica

A condutividade eléctrica é a propriedade que caracteriza a capacidade da solução em conduzir corrente eléctrica.

A formação e o estiramento do jacto dependem da capacidade do jacto transportar cargas. Numa solução mais condutora mais cargas são transportadas pelo jacto o que favorece o estiramento devido à repulsão electrostática. O diâmetro da zona de instabilidade aumenta (Figura 3.3a) e formam-se fibras mais finas. Condutividades baixas podem favorecer a formação de contas ou gotas. No geral, a condutividade eléctrica dos solventes é muito baixa (tipicamente abaixo das dezenas de $\mu\text{S}/\text{cm}$) visto que

contêm poucos íons livres. Este facto pode ser corrigido adicionando compostos iónicos à solução (por exemplo sais) [45].

Diferença de potencial

A ddp aplicada entre a agulha e o colector está no cerne da técnica de electrofiação já que promove o carregamento eléctrico da solução e estabelece o campo eléctrico que permite formar e manter o jacto.

O aumento da tensão aplicada pode resultar em dois efeitos opostos. Por um lado, o aumento da carga no jacto faz aumentar a repulsão electrostática, o que provoca um maior estiramento e a tendência é a de uma diminuição do diâmetro médio das fibras. Por outro lado, o aumento do campo eléctrico implica uma maior aceleração do jacto, um menor tempo de voo que pode significar um menor tempo de estiramento e um maior diâmetro das fibras. Nem sempre um aumento de tempo de voo significa mais tempo para o estiramento pois este só ocorre enquanto a repulsão entre as cargas transportadas pelo jacto for dominante sobre as forças viscoelásticas. À medida que o solvente evapora maior é a viscosidade da solução no jacto que se torna mais difícil de estirar. O efeito da tensão aplicada no diâmetro das fibras não é facilmente previsível e depende da taxa de evaporação do solvente e da distância entre agulha e colector [60].

A aplicação de tensões muito elevadas pode conduzir à formação de contas o que tem sido apontado como resultado de instabilidades no cone de Taylor para estas tensões [45].

A ddp aplicada afecta também a cristalinidade das fibras depositadas. Mas mais uma vez a consequência de um aumento da ddp não é sempre no mesmo sentido: o aumento do campo electrostático pode induzir um maior ordenamento das cadeias poliméricas, aumentando o grau de cristalinidade, mas, acima de uma certa tensão, a cristalinidade diminui. Isto acontece pois a redução no tempo de voo pode não deixar tempo às cadeias para se orientarem [45].

Caudal

O caudal a que a solução é ejectada determina a taxa de transferência de massa para o jacto e tem influência nas condições de extracção que devem ser estabelecidas pela ddp aplicada [15]. Para uma ddp fixa, um caudal demasiado pequeno conduz a interrupções no jacto. Em contrapartida, um caudal demasiado elevado provoca acumulação de solução na extremidade da agulha. Em geral, em condições que se mantenham estáveis, um aumento do caudal corresponde a um aumento do diâmetro médio das fibras. Nesta situação há mais solvente no jacto e é necessário assegurar que o tempo de voo é suficiente

para ocorrer a sua evaporação antes do jacto atingir o colector. Caso contrário, pode observar-se fusão das fibras no colector.

Distância agulha-colector

A variação da distância entre a agulha e o colector influencia o tempo de voo do jacto e a intensidade do campo eléctrico. Menores distâncias contribuem para um menor tempo de voo: não só a distância que o jacto tem de percorrer encurta como a sua velocidade aumenta devido ao aumento de intensidade do campo. Em geral, para distâncias curtas (mas suficientes para evitar descargas entre eléctrodos) o solvente não tem tempo para evaporar e quando o jacto chega ao colector causa dissolução das fibras já depositadas nos pontos em que se cruza com estas. Para além destes pontos de aspecto fundido, as fibras não apresentam uma morfologia cilíndrica devido à deformação que sofrem na colisão com o colector.

Maiores distâncias proporcionam maiores tempos de voo. Por um lado, um maior tempo de voo contribui para um maior estiramento das fibras e para a diminuição dos seus diâmetros. Por outro lado, se o número de cargas distribuídas ao longo do jacto diminuir (devido à diminuição do campo eléctrico e ao aumento da resistência) o estiramento das fibras será menor, permitindo a deposição de fibras com diâmetros maiores. O efeito da variação da distância pode influenciar a morfologia das fibras, porém está muito dependente da variação das propriedades das soluções durante o trajecto em direcção ao colector [45].

Para distâncias grandes, a configuração do campo eléctrico (tendo em conta as vizinhanças do sistema) pode não conduzir as fibras para o colector.

Diâmetro interno da agulha

O diâmetro interno da agulha tem influência na velocidade com que a solução é ejectada (para um determinado caudal a velocidade é maior para diâmetros menores) e na intensidade do campo eléctrico na ponta da agulha. Ambos os factores contribuem para uma extracção mais eficiente da solução da ponta da agulha e podem contribuir para eliminar pequenas acumulações de solução polimérica que aí ocorram [61].

Temperatura

A temperatura afecta directamente as propriedades da solução e a taxa de evaporação do solvente. A taxa de evaporação do solvente impõe variações nas propriedades da solução ao longo do jacto que afectam a morfologia das fibras. Alterações devidas ao aumento da viscosidade que decorre da evaporação do solvente foram descritas anteriormente.

Humidade

Um aumento na humidade relativa faz diminuir a taxa de evaporação dos solventes de base aquosa. Para estas soluções, humidades baixas favorecem um rápido aumento da viscosidade ao longo do jacto e consequentemente a formação de fibras com diâmetros maiores [45].

Humidades altas podem conduzir à condensação de água na superfície do jacto e induzir a formação de poros nas fibras [60].

3.2 Materiais

Um dos desafios da Engenharia de Tecidos está relacionado com a escolha do material a usar, uma vez que este deve obedecer a alguns requisitos, nomeadamente, ser biocompatível, biodegradável e permitir a adesão celular, a migração e a proliferação no tecido desejado [62]. Actualmente vários materiais, tanto de origem natural como sintética, processados individualmente ou combinados, têm sido estudados para diversas aplicações em Engenharia de Tecidos.

Os materiais naturais são preferíveis do ponto de vista da resposta biológica mas geralmente apresentam limitações ao nível da resistência estrutural. Entre os mais usados na electrofiação estão as proteínas, tais como o colagénio, a gelatina e o fibrinogénio e os polissacarídeos, como o acetato de celulose, o ácido hialurónico e o quitosano [63, 64].

Os materiais sintéticos apresentam vantagens no que diz respeito às suas propriedades mecânicas, porém, facilmente induzem uma resposta inflamatória crónica nos tecidos o que limita a sua utilização [62]. Polímeros sintéticos tais como a policaprolactona (PCL), o poli(óxido de etileno) (PEO), poli(ácido láctico) (PLA) e os poliuretanos são alguns exemplos de materiais usados na electrofiação.

Neste trabalho foram utilizados dois polímeros naturais, o quitosano e a gelatina, e dois polímeros sintéticos, a policaprolactona e o poli(óxido de etileno). Seguidamente são descritas as principais propriedades de cada um destes polímeros.

3.2.1 Polímeros

3.2.1.1 Quitosano

O quitosano é obtido a partir do segundo polímero mais abundante na natureza, a quitina. Esta, por sua vez, é o principal componente da parede celular dos fungos e compõe o exoesqueleto dos artrópodes (crustáceos e insectos) e a rádula de alguns moluscos.

Ambos, quitina e quitosano, são copolímeros formados pelos monómeros N-glucosamina (ou NAG, $C_6H_{13}NO_5$) e N-acetil-glucosamina (ou GlcNAG, $C_8H_{15}NO_6$), distribuídos aleatoriamente ou em bloco na cadeia polimérica, unidos por ligações glicosídicas $\beta(1\rightarrow4)$ (Figura 3.5). Diferem entre si quanto à proporção relativa dessas unidades na estrutura e quanto à solubilidade. Quando mais de 50% das unidades presentes na estrutura do copolímero são N-acetil-glucosamina, então o copolímero é designado por quitina. Na situação inversa, em que mais de 50% das unidades presentes na estrutura são N-glucosamina, então o copolímero designa-se por quitosano [65, 66]. Como o quitosano é pouco abundante na natureza, tendo sido observado até à data apenas em alguns microorganismos, nomeadamente em fungos, é obtido essencialmente pela N-desacetilação da quitina (remoção do grupo acetil, $COCH_3$, e substituição por um H), sob condições alcalinas ou por hidrólise enzimática.

A unidade NAG é um dos dois monossacáridos que constituem os dissacarídeos dos glicosaminoglicanos (GAGs) que são compostos polissacarídeos (como por exemplo o ácido hialurónico) da matriz extracelular [66].

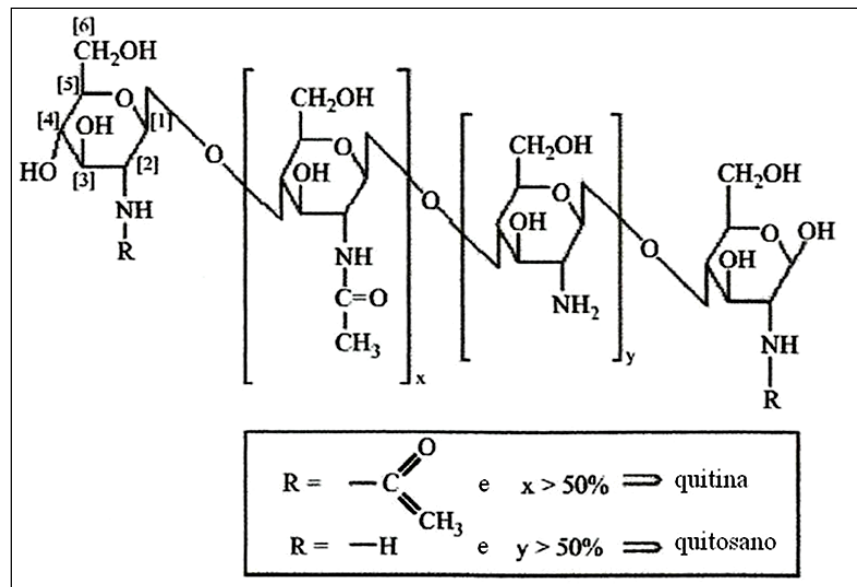


Figura 3. 5 Representação esquemática da estrutura química da quitina e do quitosano [65].

A solubilidade do quitosano depende do grau de acetilação (GA) e do peso molecular médio que são propriedades difíceis de controlar no processo de produção pois dependem directamente da fonte de quitina e do método utilizado. Em geral, o peso molecular médio dos quitosano comercial situa-se entre 30 kDa e 1000 kDa, e o grau de acetilação encontra-se abaixo de 30% [67].

A quitina, é insolúvel em água devido ao carácter hidrofóbico dos grupos metil e grupos $-CH$ e $-CH_2$ nos anéis glucosídicos (Figura 3.5). Estes permitem estabelecer um grande número de ligações por pontes de hidrogénio com o oxigénio do grupo carbonilo ($C=O$) não deixando grupos OH disponíveis para ligação com a água.

No quitosano a protonação dos grupos amina (NH_2) que ocorre em soluções de ácidos diluídos (tipicamente ácidos carboxílicos tais como o acético, fórmico e láctico), é responsável pela carga positiva que o polímero adquire transformando-se num polielectrólito catiónico. A repulsão entre grupos carregados contribui para que se estabeleça um menor número de ligações de hidrogénio e consequentemente aumenta a solubilidade do polímero [66, 68]. Para GA baixos (da ordem dos 10%), o quitosano é solúvel numa gama típica de valores de pH entre 2 e 6. Para um valor de GA próximo de 50% a solubilidade do quitosano estende-se a um intervalo de valores de pH mais largo [66]. O GA influencia a solubilidade do copolímero (através da disponibilidade dos grupos OH) e a sua cristalinidade. A cristalinidade, por sua vez, tem também consequências na solubilidade. A cristalinidade atinge valores mínimos para GA da ordem dos 50% e máximos para $GA=0$ e $GA=1$ (quitina) [69].

Um maior peso molecular médio de um polímero diminui em geral a sua solubilidade num solvente. A viscosidade da solução aumenta à medida que a concentração do polímero se aproxima do limite de solubilidade. No caso do quitosano há outros dois factores importantes a ter em conta quando se considera a dissolução em meio aquoso ácido: o carácter polielectrólito das soluções e o estabelecimento de pontes de hidrogénio intra- e intermoleculares. O último influencia a formação de domínios cristalinos que limitam a solubilidade. O primeiro confere às cadeias uma conformação linear rígida que permite a sua solubilidade abaixo de um certo valor máximo de pH. No entanto, abaixo de um valor mínimo de pH a dissolução deixa de ser possível porque a força iónica da solução torna-se tão elevada que não favorece a condensação dos contra-íões [66]. Estes efeitos são mais acentuados nos pesos moleculares médios mais elevados para os quais é difícil preparar soluções com concentrações acima de 3% (% m/m).

Além dos factores já referidos a solubilidade do quitosano é ainda afectada por outros factores tais como a polarização do solvente usado (solventes polares favorecem interacções iónicas e dipolares o que melhora a solubilidade do quitosano), a natureza do ácido usado para a protonação dos grupos amina em

soluções aquosas, a origem e qualidade dos materiais e processo de produção (como presença de impurezas), e a temperatura [66].

No que diz respeito à sua utilização em engenharia de tecidos, o quitosano apresenta propriedades importantes: é biodegradável, biocompatível e bioactivo.

A degradação térmica do quitosano ocorre a partir dos 180 °C. A sua biodegradação é influenciada por várias propriedades como GA, peso molecular médio e grau de cristalinidade [66].

Estudos *in vitro* mostraram que é degradado pela acção de enzimas que catalisam a hidrólise das ligações glicosídicas, como a quitinase, quitosanase e lisozimas, e por enzimas que catalisam a quebra de ligações C-O como as pectinases [62, 70]. *In vivo* o quitosano é degradado principalmente por lisozimas [62]. Ambos os testes evidenciam uma elevada taxa de degradação para baixos pesos moleculares médios do quitosano e quando $GA > 30\%$; a degradação é mais lenta quando $GA < 30\%$ [62, 70, 71]. Verifica-se ainda que a cinética de hidrolisação por lisozimas é inversamente proporcional ao grau de cristalinidade [66, 69].

A biocompatibilidade do quitosano foi testada em diversos trabalhos que o apontam como não sendo tóxico nem imunogénico [62], e por não produzir reacção alérgica quer em tecidos saudáveis quer em tecidos lesados [72]. É hemostático e apresenta propriedades bacterio e fungistáticas [66]. Estudos efectuados com fibroblastos em filmes de quitosano revelaram que é citocompatível independentemente do GA e que a adesão celular aumenta consideravelmente com a diminuição do GA. A forte adesão destas células à superfície do quitosano limita o seu desenvolvimento. Esta forte adesão é explicada pelo carácter catiónico do quitosano que permite estabelecer ligações inespecíficas às membranas celulares carregadas negativamente a pH fisiológico [62, 66]. Uma característica interessante dos polielectrólitos catiónicos é a sua capacidade para induzir a formação de agregados de células [66].

Em termos de bioactividade o quitosano possui várias características tais como actividade hemostática [69, 73], propriedades anti-tumorais [66] e tem um papel significativo na neovascularização do tecido que se desenvolve durante a regeneração de uma ferida [73]. Quanto a reacções inflamatórias desencadeadas por implantes de quitosano, vários estudos *in vivo* apontam para o aparecimento de reacções inflamatórias agudas a subagudas. Ambos, quitina e quitosano, mostraram ser quimioattractivos para os neutrófilos, resultando numa alta concentração destes no local implantado nos primeiros dias após a realização do implante. Porém, a população de neutrófilos tende a dissipar, não se desenvolvendo uma resposta inflamatória crónica [62].

3.2.1.2 Gelatina

A gelatina é uma proteína obtida por desnaturação do colagénio, o principal componente da matriz extracelular do tecido conjuntivo dos animais vertebrados. Até à data foram identificados 28 tipos de colagénio sendo o de tipo I, presente em muitos órgãos e em particular na pele, nos tendões e ossos, o mais abundante. O colagénio é composto por 3 cadeias polipeptídicas, cada uma constituída por 20 tipos de aminoácidos presentes em diferentes proporções [74].

Na sequência de aminoácidos os motivos mais comuns envolvem a glicina (Gli): Gli-X-Y. Frequentemente a prolina (Pro) aparece na posição X (Gli-Pro-Y) ou a hidroxoprolina (Hipro) na posição Y (Gli-X-Hipro). Completam estes motivos outros aminoácidos. A presença abundante dos aminoácidos Gli, Pro e Hipro é responsável pela configuração em tripla hélice adoptada pelas cadeias, a qual confere rigidez à estrutura [75].

A conversão de colagénio, proteína insolúvel em água, em gelatina, proteína solúvel, envolve um tratamento que separa as cadeias polipeptídicas, podendo também hidrolisá-las. Pode assim obter-se uma ampla gama de pesos moleculares médios [75]. Em termos de propriedades mecânicas, o processo conduz a um enfraquecimento estrutural da proteína, a qual fica dependente da capacidade de renaturação de alguns fragmentos [76, 77].

Consoante a extracção da gelatina seja efectuada em condições ácidas ou alcalinas obtém-se gelatina dita do tipo A ou do tipo B, respectivamente. Estes dois tipos diferem no ponto isoeléctrico (pI): o da gelatina do tipo A é semelhante ao do colagénio (pI ~ 6 – 9,5) enquanto a do tipo B apresenta um valor menor (pI ~ 4,5 a 5,6) [78]. Independentemente do tipo de gelatina, como a sua estrutura possui muitos grupos que podem ser ionizados, como grupos amina e carboxílicos, a tendência é para ficar carregada positivamente em meios ácidos e negativamente em meios alcalinos [79]. No pI, a proteína fica neutra devido à ocorrência de um igual número de radicais NH_3^+ e COO^- [80]. No geral, o processo de desnaturação não envolve alteração na sequência dos aminoácidos, sendo por isso frequente a presença dos motivos Gli-X-Y [74].

Como se pode depreender, as propriedades físicas e químicas da gelatina vão depender de vários factores, nomeadamente da fonte colagénio (mamífero ou peixe; e a espécie), o tipo de colagénio, idade do animal e método de produção [77].

Embora as propriedades da gelatina de origem de peixe venham a ser estudadas desde 1950, a maioria dos trabalhos que envolvem a utilização de gelatina recorrem a gelatina de mamífero [74]. A principal diferença entre a gelatina de peixe e a de mamífero está no conteúdo em aminoácidos prolina e hidroxiprolina, que é menor na gelatina de peixe, em particular na de peixe de água fria (tipo de gelatina usada neste trabalho). Genericamente, o conteúdo destes dois aminoácidos é de cerca de 30% nas gelatinas de mamífero (porco e bovino), 22-25% nas gelatinas de peixe de água quente (ex.: tilapia e perca-do-nylo) e 17% nas de peixe de água fria (ex.: bacalhau, polaca do Alasca, pescada) [74]. Um baixo teor destes aminoácidos limita as propriedades mecânicas e as temperaturas de gelificação e fusão da gelatina, visto serem os fragmentos que conduzem à formação de estruturas de tripla hélice [76, 77, 81]. Os pontos de gelificação e fusão, típicos das gelatinas de porco e bovino, variam desde 20 °C a 25 °C e entre 28 °C e 31°C, respectivamente. Nas gelatinas de peixe estes mesmos pontos variam desde 8 °C a 25 °C e entre 11 °C e 28 °C, respectivamente, sendo que os menores valores correspondem em geral às gelatinas de peixe de água fria. Devido a estas diferenças, as gelatinas de mamífero dão origem a géis à temperatura ambiente enquanto as gelatinas de peixe de água fria se comportam como um líquido viscoso. O baixo valor do ponto de gelificação das gelatinas de peixe pode limitar a sua utilização em algumas aplicações [76, 77].

Apesar da sua fragilidade mecânica, as gelatinas de peixe, têm ganho interesse relativamente às de mamífero sobretudo devido a razões de saúde pública (risco de transmissão de certas doenças como a encefalopatia espongiforme bovina, BSE, e febre aftosa), motivações religiosas (onde é banido o uso de certos animais) e o facto da pele de peixe ser um dos maiores resíduos da indústria de peixe que pode ser aproveitado para promover o crescimento económico [76, 77, 81-83]. Para conferir estabilidade estrutural (melhorar o desempenho termomecânico e diminuir a solubilização em água), essenciais para a aplicação em engenharia de tecidos, têm sido estudados vários métodos de reticulação. Alguns exemplos incluem a reticulação química com recurso à utilização de glutaraldeído (GTA) e genipina e um método físico designado por tratamento desidrotérmico (DHT) [17, 76, 81, 84].

As propriedades mais importantes da gelatina dividem-se em dois grupos [85]:

i) Capacidade para formar hidrogéis, isto é, um estado de organização estrutural em volume caracterizado pela sua hidroflicidade e insolubilidade em água. Um material neste estado tem a capacidade de inchar mantendo a sua forma. O pH e a carga da molécula são parâmetros importantes que determinam a gelificação pois influenciam o número de interacções electrostáticas que estão na sua origem.

ii) Propriedades de superfície, são responsáveis por propriedades de adesão e pela formação de emulsões. As propriedades superficiais da gelatina baseiam-se na presença de grupos carregados em certos locais da cadeia e/ou de certas sequências da cadeia com mais aminoácidos hidrofílicos ou hidrofóbicos. Uma estrutura deste tipo, ambifílica, confere propriedades emulsificantes, uma vez que se situa na interface de duas fases imiscíveis, reduzindo a tensão superficial, permitindo que se misturem e formem uma emulsão. Por exemplo, com gelatinas do tipo A ($pI \geq 7$) são criadas emulsões do tipo água-óleo, carregadas positivamente, numa ampla gama de pH. A presença de sequências de aminoácidos tipo Arg-Gly-Asp (RGD) promove a adesão celular.

Em termos funcionais, a gelatina apresenta características tão diversas, como, actividades antimicrobiana, antioxidante, inibidora da hipertensão [85].

Quanto a aplicações, a gelatina é usada desde a indústria alimentar (como espessante, na película de filme protector dos alimentos, entre outros) até às aplicações biomédicas (foi um dos primeiros materiais a serem usados como transportadores de componentes bioactivos no fabrico de microcápsulas) [85].

3.2.1.3 Policaprolactona

A policaprolactona (PCL) é um poliéster alifático linear que pode ser obtida pela policondensação de um ácido hidrocarboxílico ou mais frequentemente pela polimerização por abertura do anel monómero cíclico ϵ -caprolactona, como se ilustra na Figura 3.6 [86]. Consoante o tipo de catalisador utilizado, características como o peso molecular médio e a polidispersão e a composição dos grupos terminais da cadeia são afectadas [87].

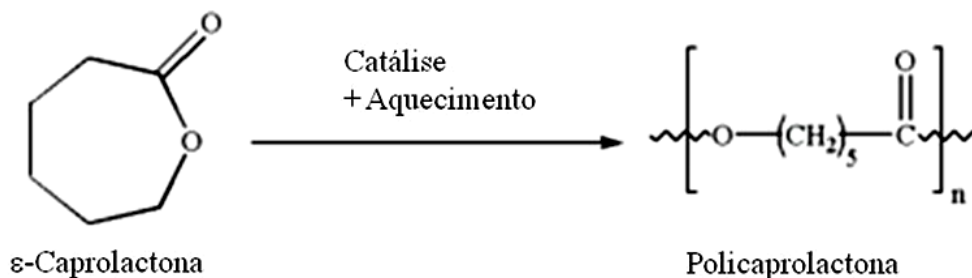


Figura 3. 6 Síntese da PCL por polimerização por abertura do anel ϵ -caprolactona [86].

Do ponto de vista estrutural, a PCL é um polímero semicristalino, cujo grau de cristalinidade pode atingir os 69% [88], com uma temperatura de transição vítrea (T_g) de -60 °C e um ponto de fusão entre os

59 a 64 °C [62]. O peso molecular médio varia entre 3 a 100 kDa e no geral, a cristalinidade tende a diminuir com o aumento do peso molecular médio. O processamento do material, por exemplo por electrofiação, também pode alterar o grau de cristalinidade [88]. É um polímero conhecido pelo carácter hidrofóbico e pelas suas propriedades de elevada plasticidade, ductilidade e alongação [89].

Relativamente à solubilidade, a PCL é solúvel em solventes orgânicos como clorofórmio, diclorometano, tetracloreto de carbono, benzeno, tolueno e ciclohexanona. É pouco solúvel em acetona, 2-butanona, acetato de etila, dimetilformamida e acetonitrilo e é insolúvel em álcoois, éter de petróleo, éter etílico e água. A PCL é miscível com muitos outros polímeros, tanto sintéticos como naturais, podendo resultar numa melhoria das propriedades mecânicas e características das misturas produzidas [87].

A hidrofobicidade deste polímero tem sido associada à dificuldade na adesão celular [90]. Para colmatar este problema, várias soluções foram encontradas, desde a sua mistura com materiais biologicamente activos (por exemplo, seda, quitosano, etc) [91], a tratamentos com plasma que diminuem a hidrofobicidade ao gerar grupos contendo oxigénio na superfície do material [92], ou usando hidróxido de sódio, de forma a diminuir, por hidrólise, a massa molecular média do polímero, aumentando assim o número de grupos -OH terminais e a hidrofilicidade [93, 94].

A utilização da PCL em aplicações biomédicas foi aprovada pela FDA (*Food and Drug Administration*) na década de 1970 [89] e desde essa altura tem sido utilizado em diversas funções como em sistemas de transporte de fármacos, em dispositivos médicos, como suturas, pensos para tratamento de feridas, medicina dentária, em engenharia de tecidos, aplicada por exemplo à cartilagem, tendões e ligamentos, vasos sanguíneos, pele, entre outros [87].

Sendo um material utilizado em aplicações biomédicas, torna-se fundamental discutir as suas propriedades enquanto material biodegradável e biocompatível.

A PCL pode ser biodegradada por bactérias ou fungos mas de acordo com a literatura, o mecanismo de degradação da PCL *in vivo* ocorre em duas fases [87]:

i) Degradação hidrolítica, não enzimática (geralmente catalisada por ácidos ou bases), das ligações éster. Um dos produtos resultantes desta reacção é um ácido carboxílico ($RC(=O)OH$), que pode catalisar hidrólise, tornando esta reacção autocatalítica [95]. A degradação hidrolítica pode processar-se por erosão superficial ou volúmica, dependendo da razão entre a velocidade de difusão das moléculas de água no material e a velocidade de degradação. Se difundirem pouco, as ligações começam a ser quebradas à superfície, os subprodutos do processo difundem-se para as redondezas, havendo perda de material à superfície mas permanecendo o interior inalterado (erosão superficial). Quando a água difunde mais rapidamente do que ataca as ligações superficiais, o mecanismo de degradação é homogéneo no interior do material, conduzindo a uma redução do seu peso molecular médio, até ser possível a difusão dos

subprodutos para fora da estrutura (erosão volúmica) [57]. Estudos realizados demonstraram que o tipo de mecanismo envolvido na degradação da PCL depende do tamanho da amostra e que neste caso ocorre via erosão volúmica quando esse valor é inferior a 1,3 cm [96]. A fase amorfa é degradada em primeiro lugar, resultando num aumento do grau de cristalinidade do polímero restante [88, 97].

ii) Por degradação intracelular que pode ocorrer quando o peso molecular médio é inferior a 3 kDa. A observação de fragmentos de PCL em fagossomas de macrófagos assim como dentro de fibroblastos (são caracterizados por conter enzimas hidrolíticas embora em menor quantidade do que nos macrófagos) evidencia este processo de degradação por via intracelular [98].

O processo de bioreabsorção da PCL é muito moroso [87]. O tempo de degradação deste polímero pode ir de alguns meses até vários anos dependendo do peso molecular, do grau de cristalinidade do polímero e das condições de degradação.

A biocompatibilidade é avaliada tanto pela resposta do tecido hospedeiro numa determinada aplicação *in vivo* (através de análises histológicas e patológicas) como, *in vitro*, mediante a avaliação detalhada da actividade celular [87]. Vários estudos *in vitro* mostram que a PCL suporta a adesão e proliferação de células, tendo sido utilizadas várias linhas celulares de fibroblastos, osteoblastos, queratinócitos, entre outros [99].

Em testes *in vivo*, é sobretudo avaliada a resposta imunogénica, carcinogénica e trombogénica do organismo. A presença de alguns produtos de degradação, como produtos ácidos, ou a presença de impurezas, desencadeia respostas inflamatórias. Se a capacidade de eliminação destes produtos, por parte dos tecidos circundantes, for baixa, devido a uma pobre vascularização ou baixa actividade metabólica, estes componentes podem levar a distúrbios locais temporários. Estudos efectuados indicam que em implantes à base de PCL estes efeitos desaparecem num intervalo de tempo que pode variar de 15 semanas até 2 anos [87].

3.2.1.4 Poli(óxido de etileno)

O poli(óxido de etileno), PEO, é um poliéster obtido a partir da catálise do óxido de etileno, formando uma cadeia linear neutra, de fórmula molecular $(\text{CH}_2\text{OCH}_2)_n$ e estrutura semicristalina. É solúvel em água e em muitos solventes orgânicos e inorgânicos, e é facilmente electrofiado [47]. Entre as suas características é de salientar a sua baixa toxicidade, o que o torna biocompatível, e o ser biodegradável. Por ser hidrofílico, é muito usado como bioadesivo (mucoadesivo) [100, 101].

O PEO foi utilizado neste trabalho apenas para facilitar a electrofiação do quitosano [102, 103]. A miscibilidade do PEO com o quitosano deve-se a interacções por pontes de hidrogénio entre grupos éter

no PEO e grupos amina no quitosano [104]. Numa solução acidificada as cargas positivas do quitosano causam repulsões electrostáticas entre cadeias reduzindo o seu entrelaçamento. O estabelecimento de ligações suficientemente fortes com o PEO (polímero neutro) vem diminuir essas repulsões, facilitando o entrelaçamento das cadeias e, conseqüentemente, a electrofiação.

O facto de o PEO ser solúvel em água pode, no entanto, vir a comprometer a estabilidade das matrizes. Neste sentido é preferível usar pequenas quantidades de PEO de alto peso molecular médio [105].

3.2.2 Métodos de Reticulação

A reticulação de polímeros é um processo que se baseia no estabelecimento de ligações covalentes entre cadeias, levando à formação de uma estrutura tridimensional mais rígida e de maior peso molecular médio. O aumento do peso molecular médio reduz a solubilidade em água [106]. Dado que no trabalho que aqui se apresenta a gelatina usada é solúvel em água à temperatura ambiente, foi necessário proceder à sua reticulação. Foram testados três processos de reticulação:

- dois químicos, usando glutaraldeído (GTA) e genipina.
- um físico, o tratamento desidrotérmico (DHT);

A reticulação química utiliza tipicamente compostos bifuncionais, o que permite o estabelecimento de ligações entre duas cadeias poliméricas. A principal desvantagem destes agentes são os possíveis efeitos tóxicos gerados pela presença de grupos funcionais não reagidos. O risco depende da concentração de agente usado, do tempo e da temperatura de exposição ao agente [107] e pode ser reduzido se os materiais, após a reticulação, forem submetidos a tratamentos adequados (como térmicos ou vácuo) [17].

Os métodos físicos de reticulação envolvem geralmente processos de secagem, aquecimento e irradiação. A principal vantagem, face aos métodos químicos, é que não introduzem agentes químicos tóxicos no sistema. No entanto, o processo de reticulação depende do método utilizado: pode ocorrer principalmente à superfície dos materiais (ex.: radiação UV, tratamento por plasma) ou em volume (DHT, radiação gama) [84].

3.2.2.1 GTA

O glutaraldeído, GTA, um reagente sintético, é o reticulante mais estudado pois é fácil de adquirir comercialmente, não é caro e forma soluções aquosas bastante voláteis cujo vapor pode ser usado para reticular rápida e eficazmente. No geral, está disponível em soluções aquosas ácidas (pH 3-4), podendo estar presente até 70% m/v [108].

O GTA é uma molécula alifática com cinco carbonos e com um grupo aldeído (H-C=O) em cada terminal da cadeia, o que a torna bifuncional [107]. Os grupos aldeído reagem rapidamente com grupos amina, sobretudo em pH neutro, gerando ligações térmica e quimicamente estáveis. A estrutura do GTA em soluções aquosas não está limitada à sua forma simples monomérica, podendo apresentar-se sob formas diferentes, dependendo das condições das soluções tais como pH, concentração, temperatura, etc.[108]. A Figura 3.7 apresenta algumas formas moleculares que o GTA pode assumir em meios aquosos.

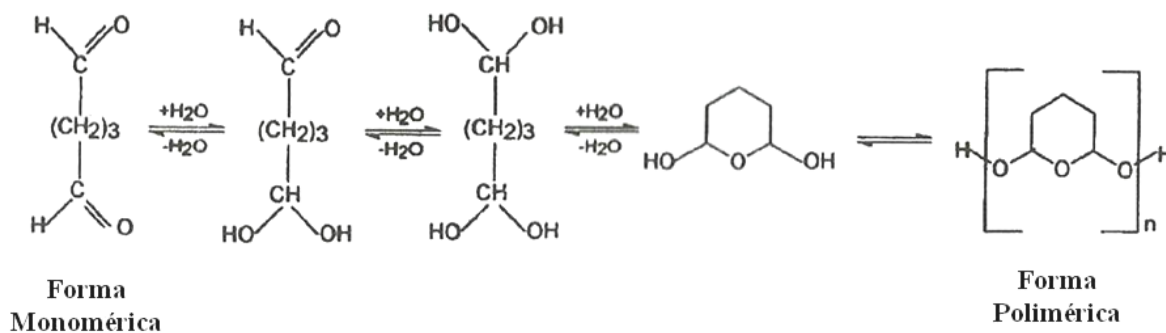


Figura 3. 7 Apresentação de algumas formas químicas que o GTA pode adquirir em soluções aquosas [107].

O GTA é frequentemente utilizado na reticulação de proteínas, como o colagénio e a gelatina, e de quitosano [108-110].

A reticulação das proteínas em solução aquosa de GTA pode envolver vários mecanismos, uma vez que o reticulante pode exibir várias formas químicas na solução e reage com diversos grupos funcionais das proteínas [108]. No caso particular da gelatina, os grupos aldeído do GTA reagem sobretudo com os grupos amina livres dos resíduos de lisina e hidroxilo-lisina originando grupos aldimina, HC=N (bases de Schiff) [107] (Figura 3.8). Os grupos aldimina assim originados são responsáveis por incutir uma cor amarelada ao material reticulado.

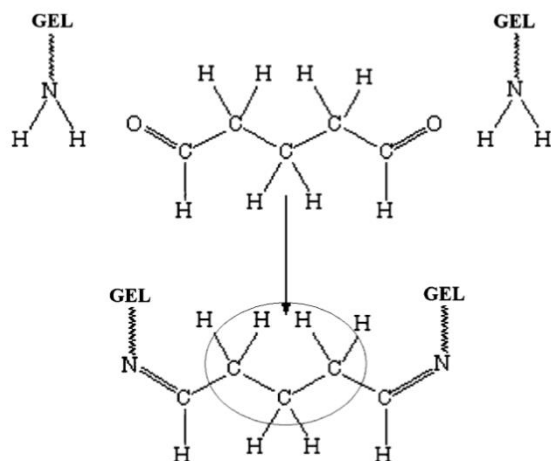


Figura 3. 8 Mecanismo de reacção do GTA com a gelatina [111].

A presença dos grupos amina no quitosano proporciona também a sua reticulação com o GTA. Foram propostos dois mecanismos para a reacção: um que envolve a formação de duas bases Schiff (Figura 3.9a) e outro que conduz a aductos do tipo Michael com terminais aldeídos e formação de novos grupos carbonilos (Figura 3.9b) [109].

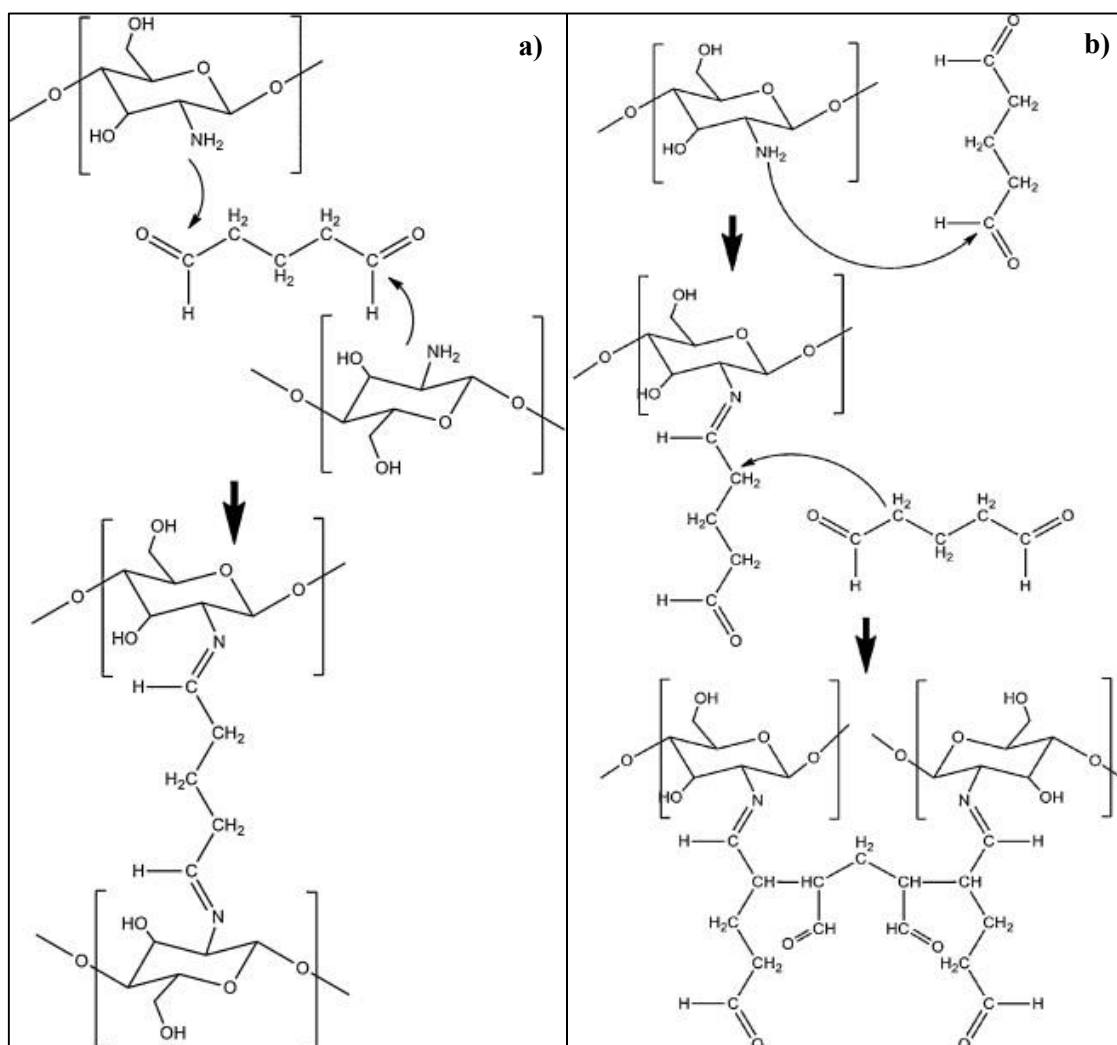


Figura 3. 9 Mecanismo de reticulação do GTA com o quitosano [110]: a) por formação de duas bases Schiff; b) por formação de aductos tipo Michael com terminais aldeídos.

3.2.2.2 Genipina

A genipina, de fórmula molecular $\text{C}_{11}\text{H}_{14}\text{O}_5$, é uma aglicona que deriva da hidrólise da geniposida, um constituinte dos frutos da *Genipa americana* e *Gardenia jasminoides*. É muito utilizada na medicina tradicional chinesa, por exemplo no tratamento de infecções. Por ser uma molécula de origem natural, biodegradável e considerada pouco tóxica, tem sido cada vez mais utilizada em aplicações biológicas.

A sua estrutura química encontra-se representada na Figura 3.10.

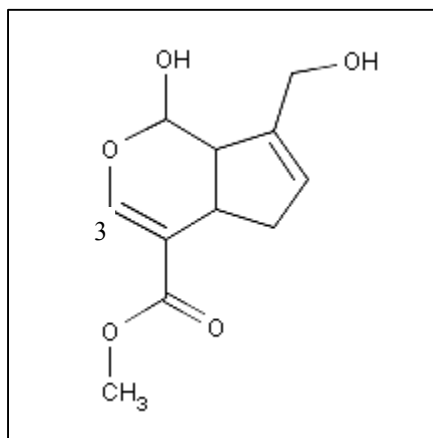


Figura 3. 10 Estrutura química da genipina [112].

A genipina é incolor, solúvel em água, metanol, etanol e éter dietílico, com um ponto de fusão entre 120-121 °C e que reage espontaneamente com os aminoácidos formando pigmentos azuis. Estas reacções ocorrem com aminas primárias e é essencial a presença de oxigénio para a formação da cor azul [113].

O mecanismo de reticulação da gelatina com a genipina ainda não está totalmente compreendido e continua a ser investigado. No entanto, alguns autores propõem que o mecanismo de reacção deverá ser semelhante ao da genipina com a metilamina (CH_3NH_2 , a amina primária mais simples), o qual envolve duas reacções em dois locais diferentes da molécula da genipina [113]:

- a primeira ocorre por ataque nucleófilo da amina primária ao átomo de carbono C-3 da genipina, causando a abertura do anel dihidropirano e posterior formação de uma amina heterocíclica. Um esquema exemplificativo desta reacção mostra-se na Figura 3.11 a;

- a segunda reacção, mais lenta, é uma substituição nucleofílica $\text{S}_{\text{N}}2$ que envolve a substituição do grupo éster (CH_3COO) da genipina por uma amida secundária com libertação de metanol (Figura 3.11 b), [81, 112].

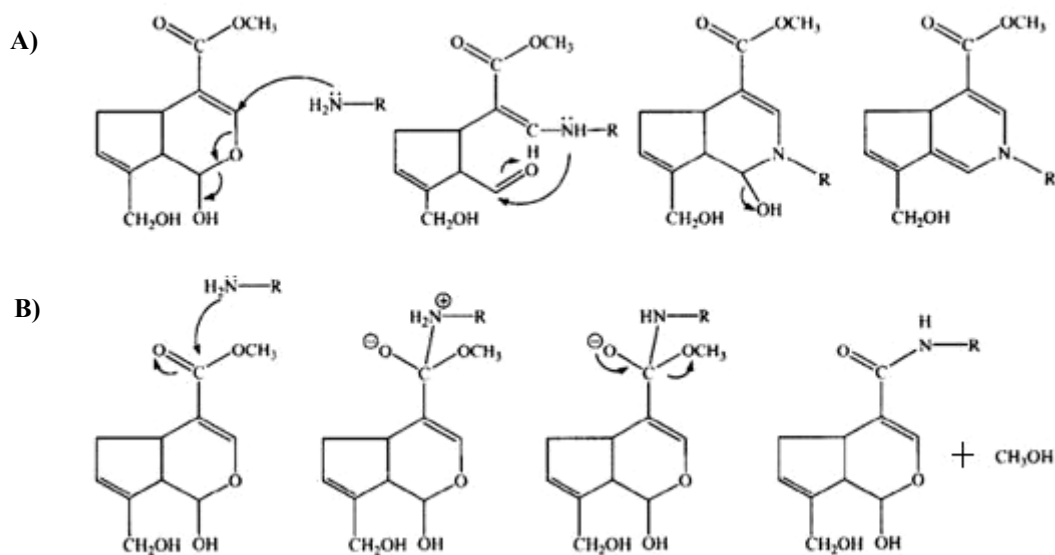


Figura 3. 11 Mecanismos de reacção da genipina com biopolímeros, como a gelatina e o quitosano, que contêm grupos amina primários na sua estrutura: a) reacção por ataque nucleófilo da amina primária ao átomo de carbono C - 3 da genipina, b) reacção de substituição nucleofílica S_N2 [114].

3.2.2.3 DHT

No processo desidrotérmico, DHT, o polímero é mantido a altas temperaturas (> 90 °C) em vácuo durante vários dias. Nestas condições, é removida água das moléculas através de reacções de condensação, por reacções de esterificação ou formação de amidas, resultando na formação de ligações intermoleculares.

Dadas as condições em que se processa, este método tem ainda a vantagem de esterilizar o material.

Alguns estudos mostraram que as propriedades mecânicas das fibras de colagénio melhoram após reticulação pelo DHT. Contudo, as altas temperaturas desnaturam o colagénio, alterando o arranjo da estrutura de tripla hélice para uma configuração aleatória. Apesar de ser considerada indesejável, a desnaturação pode reduzir a resposta inflamatória dos tecidos ao material e aumentar a infiltração celular *in vivo* [115].

3.3 Testes *in vitro*

A cultura de células animais em laboratório, isoladas do organismo de que derivam, iniciou-se no princípio do séc. XX com os estudos de G. Harrison sobre o desenvolvimento embrionário de neurónios

de sapo [116]. Desde então, vários desenvolvimentos transformaram a cultura de células em laboratório numa técnica fundamental em investigação biomédica: o estabelecimento de linhas celulares contínuas, a técnica asséptica e o controlo das contaminações, os meios de cultura, nomeadamente os meios definidos, etc. Recentemente, a demonstração da possibilidade de manipulação genética das células que permite induzir a pluripotência e diferenciá-las noutros fenótipos abre novas possibilidades no desenvolvimento de tecidos e órgãos usando células autólogas para uso em Medicina Regenerativa.

A vantagem de se usar culturas celulares em estudos de biologia celular e molecular, farmacologia, toxicologia, imunologia, inflamação, etc, assenta na consistência e reprodutibilidade dos resultados. Estes estudos podem ser realizados em condições controladas e minimizando a utilização animal, e nas experiências onde se querem estudar a interacção dos fármacos com as células, as doses a serem administradas podem ser melhor controladas e assim elaborar estudos mais sistemáticos e de melhor qualidade.

No que diz respeito às desvantagens, está a alteração do metabolismo celular entre passagens, a perda das características fenotípicas das células em cultura e por fim as limitações nas extrapolações de resultados do comportamento de células cultivadas em ambientes simplificados para comportamentos em organismos vivos onde a interacção entre os vários tipos de células com o meio extracelular desempenha um papel relevante [117, 118].

3.3.1 Tipo de Células

As células usadas em culturas têm origem em fragmentos de tecidos ou órgãos de organismos vivos. Quando na cultura são utilizadas células, obtidas por desagregação mecânica ou enzimática, denomina-se por cultura primária. É usual serem utilizadas técnicas de selecção celular no sentido de ter apenas um tipo de célula na cultura. A partir do momento em que é efectuada a primeira passagem das células, são definidas linhas celulares:

- i) Caso a linha seja obtida a partir de apenas uma célula obtém-se um clone celular.
- ii) Se o tempo de vida das células for finito, admitindo apenas um número limitado de passagens, denomina-se de linha celular finita.
- iii) Se admitir um número infinito de passagens, designa-se por linha imortalizada. Se o processo for espontâneo diz-se uma linha contínua, se for transformado (ex. quimicamente, vírus, irradiação) diz-se uma linha transformada.

Uma linha celular seleccionada por possuir uma característica específica denomina-se de estirpe celular [117, 119].

Neste trabalho foram usadas duas linhas de fibroblastos, uma linha imortalizada espontânea, 3T3, e uma linha finita, HFFF2. A linha 3T3 foi estabelecida em 1962 a partir de fibroblastos primários de embriões de murganhos albinos Suíços. Esta linha celular tornou-se uma linha padrão de células fibroblásticas. Dentro desta linha existem várias sub-linhas, ou estirpes, que derivam da linha original, por exemplo, as 3T3-NIH, as 3T3 Swiss Albino, 3T3-L1, etc. As células HFFF2 (*Human Caucasian foetal foreskin fibroblast*) consistem numa linha de fibroblastos isolados a partir da derme de feto humano.

As linhas de fibroblastos caracterizam-se por sintetizar intracelularmente colagénio tipo I que depois é secretado para o meio. Este tipo de colagénio é o principal constituinte da matriz extracelular do tecido conjuntivo.

O modo de crescimento destas células é por aderência ao substrato, isto é, dependem da ancoragem a um substrato para sobreviver.

Morfologicamente, os fibroblastos humanos, de hamsters, e galinha apresentam uma forma diferente, na confluência, das de murganho. No primeiro caso, são típicos fibroblastos de forma fusiforme, e crescem paralelamente entre si, enquanto os do murganho são mais poligonais, aproximando-se da forma de células epiteliais. Esta diferença pode ser observada na Figura 3.12 [118].

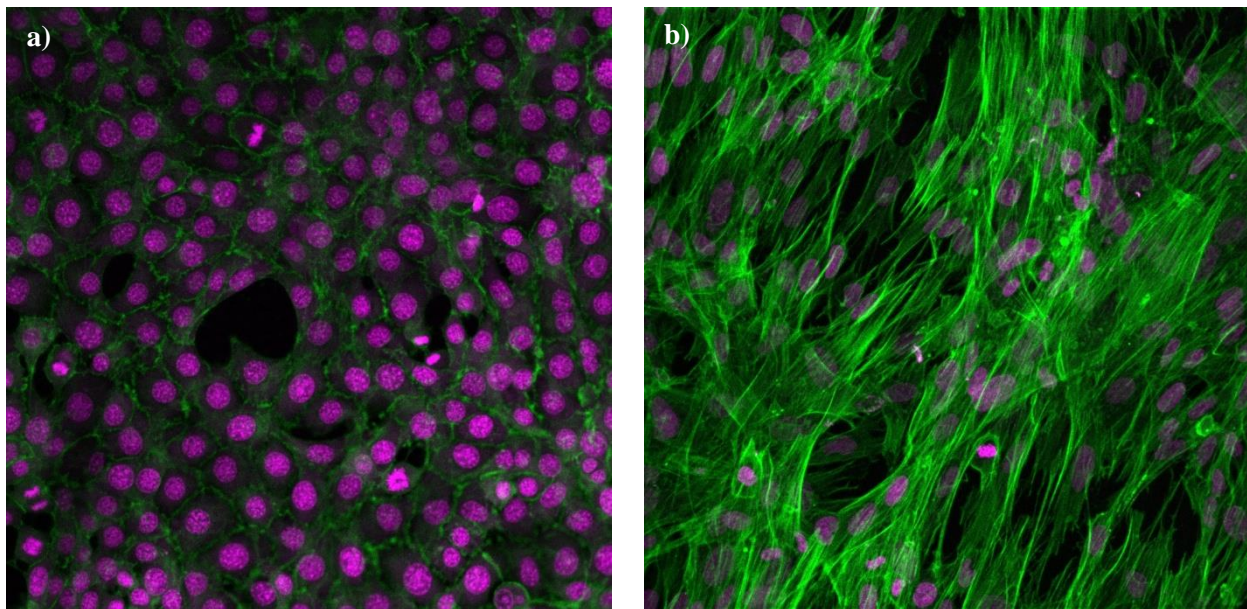


Figura 3. 12 Imagens de microscopia confocal onde é possível observar a diferente morfologia das células a) 3T3, exibindo uma forma mais tipo poligonal e b) HFFF2, com uma forma alongada e crescimento paralelo. (Células usadas neste trabalho).

As culturas celulares são feitas em salas específicas seguindo protocolos rigorosos de forma a

proteger as culturas e os operadores. Uma técnica asséptica correcta é fundamental para evitar contaminações que possam adulterar os resultados.

Numa cultura celular, deve-se proporcionar às células um ambiente que simule tanto quanto possível o existente num ser vivo. Nesse sentido, o meio de cultura e o local onde é mantida a cultura devem recriar as condições físicas, nutritivas e hormonais de modo que os testes possam ser validados, e tenham resultados concordantes com os testes realizados em animais. Entre as variáveis a controlar estão a temperatura, o pH, a osmolalidade, o meio gasoso e a nutrição [117, 118].

As células humanas e de outros animais de sangue quente são normalmente cultivadas a 37 °C, apesar de vários tipos de células crescerem a temperaturas inferiores (ex.: células epidérmicas).

O controlo do pH é essencial para manter o equilíbrio iónico da solução, para providenciar as condições óptimas para a actividade das enzimas e a ligação das hormonas e factores de crescimento à membrana citoplasmática. A maioria dos meios de cultura apresenta pH entre 7,2 e 7,4, mas como as células produzem ácido láctico e CO₂ como sub-produtos do seu metabolismo, tornando o meio ácido é necessário regular o pH, o que normalmente, é feito com soluções tampão e incubadoras que controlam a concentração de CO₂.

A osmolalidade tem em conta os níveis de sais, glucose e aminoácidos que representam os maiores contribuintes para a pressão osmótica característica de um meio. A maioria das células cresce em meios com osmolalidade entre 290 mOsm/kg e 310 mOsm/kg. Para valores acima ou abaixo deste intervalo a pressão osmótica pode colocar em causa a integridade das membranas celulares: o equilíbrio das pressões, conseguido através do fluxo de água através das aquaporinas, pode levar ao colapso ou explosão, respectivamente, das membranas.

A manutenção do pH do meio e a osmolalidade são essenciais para manter a vitalidade celular. O fornecimento de nutrientes e fontes de energia são essenciais para garantir o crescimento. Portanto, um meio de cultura deve garantir a sobrevivência celular e fornecer as substâncias que as células não sintetizam e de que necessitam para o seu metabolismo. Tipicamente, o meio de cultura é uma solução salina equilibrada, tamponada, constituída por vitaminas, oligoelementos, fontes de energia (glucose e aminoácidos), soro (hormonas e factores de crescimento, proteínas, factores de adesão celular, entre outros) e antibiótico [120].

3.3.2 Mecanismo de interacção célula-substrato

O processo de adesão celular a um substrato é um processo complexo, que depende de vários aspectos, entre os quais, o tipo de células, as propriedades superficiais dos materiais e os factores

ambientais. As propriedades superficiais que desempenham um papel fundamental na interacção celular com os substratos são [62, 118, 121]:

- A natureza hidrofóbica ou hidrofílica do material. Vem referido na literatura que as superfícies hidrofílicas apresentam uma maior afinidade pelas proteínas da membrana plasmática das células face a outro tipo de proteínas, do que as superfícies hidrofóbicas [121, 122].

- A distribuição superficial de cargas. A barreira para uma ligação proteína-superfície depende da carga efectiva que se encontra numa determinada região onde acontece a interacção. Assim, superfícies com grupos NH_2 ou COOH ionizam em solução dando origem a cargas locais líquidas positiva e negativa, respectivamente. Dado que as proteínas, de uma forma geral, apresentam cargas negativas na superfície, é mais fácil acontecerem ligações mais estáveis a substratos carregados positivamente.

- A topografia. Vem frequentemente referido na literatura que as superfícies rugosas estimulam a diferenciação e o crescimento celular, em comparação com as superfícies planas [123, 124]. No entanto a resposta celular a este parâmetro depende do tipo de células considerado.

- A rigidez do substrato. Tem influência sobre a adesão, a proliferação e a diferenciação celular mas depende do tipo de células. Por exemplo, foi demonstrado num estudo *in vitro* que os fibroblastos NIH 3T3 migram preferencialmente em direcção a superfícies mais rígidas, estabelecendo nas mesmas forças de tracção mais fortes e um maior espalhamento [125].

- A composição química. A natureza química dos materiais que constituem o substrato é essencial para uma boa adesão celular. Alguns processos permitem introduzir alterações na estrutura química da superfície por forma a facilitar essa adesão. São exemplos o ataque químico com NaOH , a degradação enzimática, o ataque por plasma ou a deposição de um filme, que expõem grupos funcionais que facilitam a adesão.

As células aderem aos substratos, de uma forma geral, formando uma monocamada. As interacções célula-substrato são mediadas por receptores específicos existentes na superfície das células que informam a célula sobre o ambiente à sua volta (como por exemplo o tipo de moléculas, rigidez da matriz extracelular). O tipo de receptor mais bem estudado é a integrina, uma glicoproteína heterodimérica composta por duas subunidades α e β ligadas não covalentemente. Cada combinação entre α e β forma um receptor para uma ou mais moléculas da matriz extracelular. No caso do colagénio e da fibronectina, a ligação é feita de uma forma específica ao local RGD da sequência de aminoácidos. A Figura 3.13 representa esquematicamente este mecanismo de interacção. Em alguns casos as integrinas também medeiam a interacção célula-célula [126].

A adesão das células aos substratos pode igualmente ocorrer através de proteoglicanos transmembranares, que também interactuam com os constituintes da matriz extracelular, como o colagénio, mas não pela sequência RGD. Neste caso as proteínas transmembranares envolvidas são as denominadas CAM's (*Cell Adhesion Molecules* - independentes da presença do ião Ca^{2+}) e das caderinas (dependentes da presença do ião Ca^{2+}). O meio extracelular desempenha um papel fundamental no equilíbrio deste processo. Nesse sentido, qualquer perturbação ou alteração, pode levar, no limite, a uma desagregação da monocamada estabelecida.

Após a adesão, inicia-se a proliferação das células no substrato. As células são caracterizadas por terem ciclos celulares regulados por sinais vindos do exterior. Antes de entrar na fase de proliferação a célula tem de estar na presença de factores de crescimento mitogénicos para se iniciar o ciclo de divisão celular e proliferação [118].

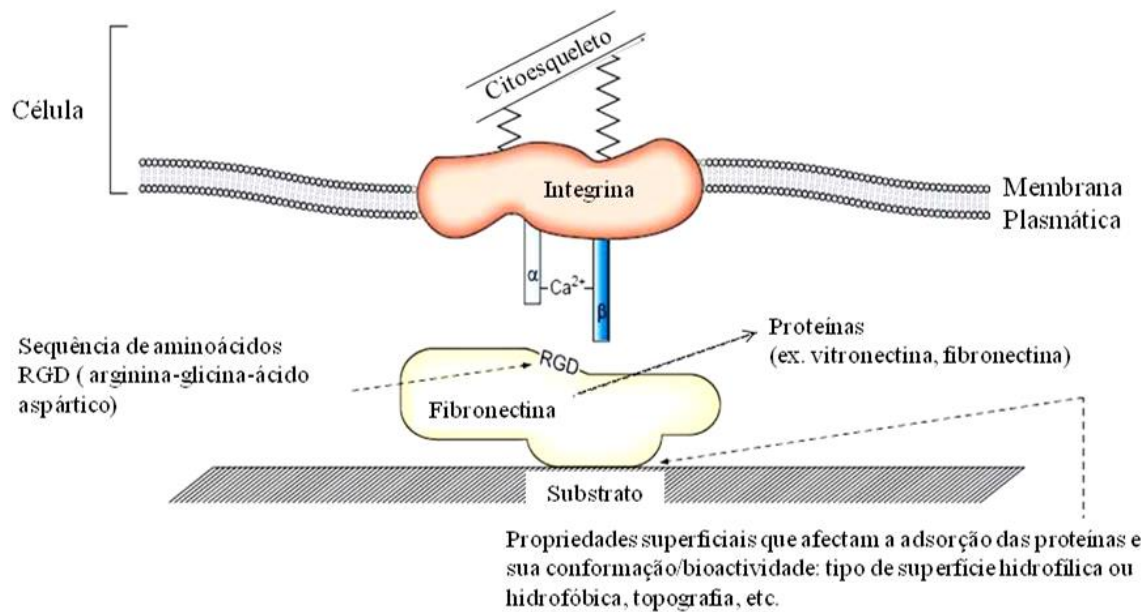


Figura 3. 13 Mecanismo de interação célula-substrato, onde pode ser observado o papel das proteínas como mediadoras da ligação entre as integrinas, proteínas de adesão presentes na membrana plasmática das células, e o substrato (adaptado de [127]).

3.3.3 Curva de Crescimento Celular

A curva de crescimento típico de uma população de células em cultura é caracterizada por quatro fases: latência (lag) , crescimento (log) , estacionária e declínio. Na Figura 3.14 mostra-se uma curva típica de crescimento.

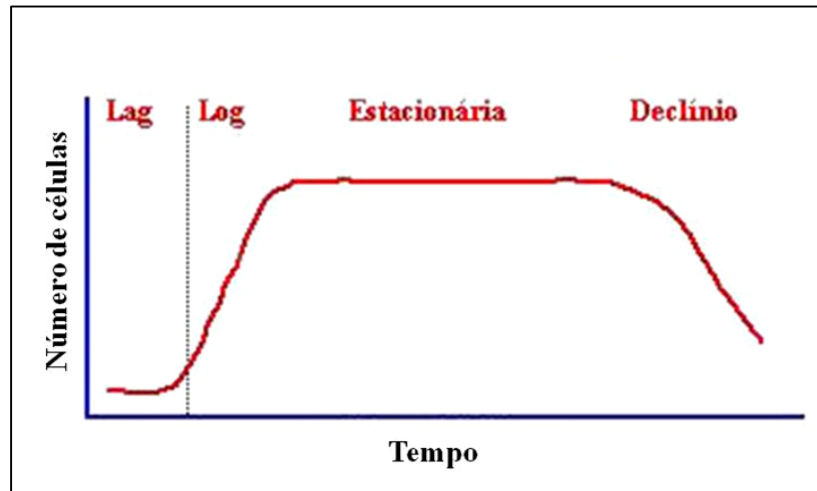


Figura 3. 14 Curva de crescimento celular. Apresenta quatro regiões características correspondentes a quatro fases: 1) fase lag, de adaptação celular, 2) fase log, de crescimento exponencial, 3) fase estacionária, onde toda a área disponível para crescimento está coberta de células, e o número de células a dividir-se é igual ao número de células em apoptose e 4) fase de declínio, quando o número de mortes celulares é superior ao número de células em divisão.

Fase de latência: também conhecida como fase lag, corresponde ao início da cultura, durante a qual as células não se dividem. É um período de adaptação às novas condições a que estão sujeitas, durante o qual substituem elementos da superfície celular e matriz extracelular perdidas durante a passagem, aderem ao substrato e se espalham. Durante o espalhamento, o citoesqueleto reorganiza-se. A actividade das enzimas aumenta, seguindo-se a síntese de novo ADN e de proteínas estruturais.

Fase de crescimento: também conhecida como fase exponencial ou log, nesta fase as células encontram-se perfeitamente adaptadas, com todo o seu metabolismo normalizado e com os nutrientes à disposição. Nesse sentido, encontram-se a crescer e a duplicar-se. O período log é variável pois depende do tipo de células, da sua taxa característica de crescimento, da densidade inicial cultivada, do meio e por fim, das características do substrato.

Fase estacionária: neste período o sistema atinge o estado de confluência, isto é, toda a superfície livre para adesão está ocupada e a vizinhança das células são outras células. A taxa de crescimento reduz significativamente e o número total de células estabiliza, ou seja, o número de células a morrer é igual ao número que se divide. As células interactivam entre si de uma forma mais intensa e são mesmo obrigadas a ocupar uma área menor do substrato. Esse facto, aliado a uma cessação da mobilidade celular é descrito como um fenómeno de inibição por contacto. No caso particular dos fibroblastos, estes começam a orientar-se entre si, formando um padrão paralelo típico.

É usual que as células epiteliais e endoteliais formem um filme de acordo com o equilíbrio referido. Todavia, existem células, por exemplo, fibroblastos que continuam a proliferar, formando multicamadas (mas só em células transformadas).

Fase de declínio: Última fase do ciclo em que o número de divisões celulares é menor do que a taxa de apoptose. Atinge-se esta fase por falta de espaço para crescer ou por falta de nutrientes.

As fases de crescimento e estacionária fornecem informação importante relativa às características da linha celular: qual o período de tempo que a população leva a duplicar o seu número (PDT) durante o crescimento exponencial e a densidade máxima de células em confluência. O PDT é utilizado para quantificar o crescimento da população de células perante diferentes condições da cultura, tais como concentração dos nutrientes presentes no meio, presença de hormonas, níveis de toxicidade e substratos de biomateriais [118].

Os estudos de crescimento celular podem apresentar uma variabilidade associada a diversos factores que dificultam a obtenção de conclusões válidas num número reduzido de experiências. Por exemplo, a variabilidade das condições ambientais, a reprodutibilidade dos biomateriais que se colocam em contacto com as células, o estado em que se encontram as células, que pode variar entre as sucessivas passagens, o meio de cultura usado, em particular quando é usado soro cuja composição exacta é desconhecida e pode variar entre lotes. Estes estudos requerem assim alguma estatística.

3.3.4 Citoquímica

A citoquímica é uma técnica usada no estudo dos processos biológicos ao nível celular que permite identificar e localizar substâncias intracelulares que compõem as células, sendo assim possível inferir sobre o seu estado após uma etapa de cultura. A identificação desses compostos é possível usando técnicas auxiliares de marcação, que aumentam o contraste em imagens microscópicas. Normalmente usam-se corantes fluorescentes para destacar as estruturas específicas das células que se pretendem visualizar.

Antes da marcação com os corantes, tipicamente procede-se à imobilização, e preservação, das células viáveis (fixação) e à abertura dos poros da membrana celular das células de modo a facilitar a entrada dos corantes (permeabilização). Podem usar-se diversos fixadores, como formaldeído, glutaraldeído ou metanol. A permeabilização é feita mediante incubação com um detergente, normalmente Triton X-100 (esta é desnecessária quando se usa metanol pois este dissolve a membrana plasmática) [128, 129].

Neste trabalho usaram-se os corantes ToPro 3 e a Alexa 488 ou 568 -conjugada com Faloidina. O ToPro3 é um monómero carbocianina que marca os ácidos nucleicos, ADN e ARN, com fluorescência vermelha. É muito usado como marcador de núcleos das células e indicador de células mortas, sendo considerado um dos marcadores mais sensíveis na detecção de ácidos nucleicos. A Faloidina é um peptídeo bicíclico, pertencente à família das toxinas, e é usada na marcação dos filamentos de actina, F-actina, presente no citoesqueleto. A Faloidina é caracterizada por apresentar uma alta afinidade com a F-actina enquanto a Alexa Fluor 488 proporciona uma fluorescência verde muito estável, ou no caso da Alexa Fluor 568, uma fluorescência laranja [130, 131].

No caso particular em que os marcadores são anticorpos, a técnica denomina-se de imunocitoquímica, pois permite localizar proteínas específicas numa célula, ou população de células. O sistema de detecção baseia-se na utilização de anticorpos específicos (geralmente as imunoglobulinas IgGs, mas também as IgMs) contra a proteína que se pretende identificar e localizar, que recebe o nome de antigénio. O processo consiste na detecção de um segundo anticorpo (anticorpo secundário), previamente marcado com um fluoróforo, que reconhece e se liga ao anticorpo que reconhece o antigénio (anticorpo primário).

Os anticorpos podem ser monoclonais ou policlonais. Os primeiros são mais específicos pois ligam-se apenas numa região do antigénio/proteína (epítipo) que nos interessa estudar. Os policlonais ligam-se em várias regiões pelo que há a possibilidade de poderem reconhecer outras proteínas, com regiões semelhantes, dando origem a sinais inespecíficos. Normalmente os anticorpos monoclonais são produzidos em murganhos e os policlonais em coelhos, entre outros. Os anticorpos secundários a utilizar devem assim reconhecer regiões nos anticorpos primários que são comuns a todos os anticorpos de murganho ou de coelho, denominando-se, nesses casos, de anticorpos anti-murganho ou anti-coelho, respectivamente. Geralmente, os anticorpos secundários só detectam os primários. Ambos os anticorpos podem ser usados numa mesma célula desde que os respectivos anticorpos secundários tenham marcadores distintos (por exemplo, uma fluorescência vermelha para o secundário anti-coelho e uma fluorescência verde para o secundário anti-murganho). Todavia, importa salientar que a fixação (sobretudo com aldeídos) pode criar zonas hidrofóbicas na célula que ligam inespecificamente anticorpos, o que pode falsear o resultado. O procedimento comum antes da incubação das células com anticorpos é a utilização de uma solução de bloqueio, em cuja composição se incluem moléculas que se ligam a esses locais hidrofóbicos [129, 132].

3.4 Testes *in vivo*

Uma parte importante da investigação na área das ciências médicas envolve a experimentação em animais não humanos vivos, ou testes *in vivo*, como instrumento para a compreensão e desenvolvimento de métodos de diagnóstico e terapia para benefício da saúde humana. Embora seja um tema que gera controvérsia, a experimentação animal é apoiada pela maioria da comunidade científica e pelas entidades legislativas. As experiências com animais têm sido fundamentais no progresso da medicina, cobrindo várias áreas desde o desenvolvimento de vacinas, tratamentos de várias doenças infecciosas, como o antraz, varíola, febre-amarela, o estudo de doenças não infecciosas, como o desenvolvimento de insulina para o tratamento da diabetes, técnicas de hemodiálise para doentes com insuficiência renal, técnicas de transplante e avanços em diversos tipos de cirurgia.

O desenvolvimento de métodos alternativos à utilização de animais mantém-se uma aposta. No entanto, existem processos que, actualmente, só podem ser estudados num organismo vivo.

Nesse sentido, esta secção aborda as regras a observar quando se trabalha em experimentação animal, começando com a apresentação da legislação subjacente a este tipo de prática seguindo-se o tipo de animais autorizados para este fim, a importância da anestesia e as regras da eutanásia.

3.4.1 Ética e Legislação

A legislação em vigor é sensível ao bem-estar dos animais envolvidos em fins experimentais e/ou outros fins científicos, protegendo-os com a aplicação de uma política assente genericamente nos seguintes aspectos [133]:

- O propósito claro dos estudos em animais.
- Assegurar que as pessoas envolvidas no processo possuem as competências exigidas.
- Providenciar a inspecção das instalações onde os animais estão alojados e o controlo dos procedimentos que lhes são efectuados.
- Controlar o nível de dor e sofrimento infligidos aos animais.
- Assegurar padrões humanitários de manuseio dos animais.
- Assegurar que as experiências com animais são conduzidas apenas quando não existem alternativas.

A legislação incorpora um conjunto de princípios que é genericamente apelidada de “Política dos 3Rs”, isto é:

- *Replacement*: substituição de animais por métodos alternativos sempre que possível (ex., uso de métodos cientificamente satisfatórios como métodos *in vitro* ou métodos computacionais, etc).

- *Reduction*: redução do número de animais a usar (ex., apenas o número adequado para obtenção de dados credíveis).
- *Refinement*: refinamento de técnicas e procedimentos para reduzir o impacto negativo que a sua utilização causa nos animais (ex., execução de procedimentos com o menor desconforto; melhoria das condições de alojamento dos animais; utilização de anestésicos e analgésicos, etc).

A experimentação animal, na Europa, está regulada por três documentos relevantes:

- A Convenção Europeia (ETS 123) sobre a Protecção dos Animais Vertebrados Utilizados para Fins Experimentais e/ou Outros Fins Científicos, adoptada em 1983.
- A Directiva do Conselho 86/609/EEC relativa à Protecção dos Animais Utilizados para Fins Científicos e/ou Outros Fins Científicos, adoptada em 1986.
- A Directiva 2010/63/EU do Parlamento Europeu e do Conselho de 22 de Setembro de 2010 relativa à protecção dos animais utilizados para fins científicos.

A nível de legislação nacional, o uso de animais rege-se pela Directiva 86/609/CEE do Conselho, de 24 de Novembro, que foi transposta para o direito nacional pelo Decreto-Lei nº 129/92, de 6 de Julho e pela portaria n.º 1005/92, de 23 de Outubro.

A Direcção Geral de Alimentação e Veterinária (Divisão de Bem-estar Animal) é a entidade responsável por fiscalizar o cumprimento do disposto na legislação nacional podendo delegar competências nas autoridades veterinárias regionais e locais.

3.4.2 Animais

A experimentação animal é autorizada na seguinte lista de espécies de animais: murganho, rato, cobaio, hamster dourado, coelho, primatas não humanos, cão, gato e codorniz. O animal escolhido para efectuar este estudo foi o rato da estirpe Wistar (Figura 3.15).

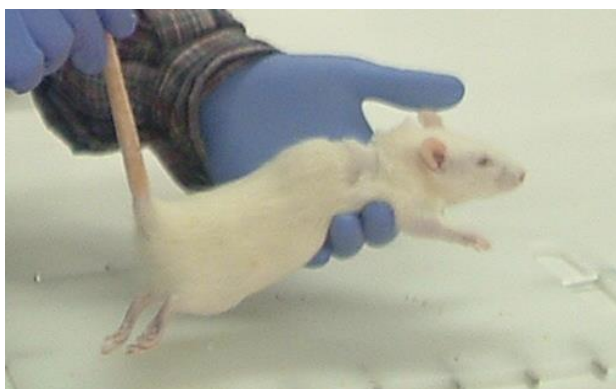


Figura 3. 15 Rato da estirpe Wistar usado neste trabalho.

Os ratos pertencem à classe dos roedores que são espécies vertebradas, caracterizadas pela presença de coluna vertebral segmentada e de crânio. Frequentemente os animais utilizados para fins experimentais são albinos, pelo que possuem uma visão deficiente dependendo sensorialmente dos bigodes e do olfacto.

As instalações de produção ou manutenção destes animais são frequentemente referidas como Biotérios, que asseguram os padrões de higiene, qualidade microbiológica e segurança, legalmente exigidos. Estes espaços obedecem ainda a determinados critérios, adequados ao bem-estar dos animais, entre os quais se constam a ventilação, a temperatura (o valor recomendado é de $21 \pm 3^\circ\text{C}$), a humidade (pode variar entre $60 \pm 10\%$ ou, como limite, entre $60 \pm 15\%$), a iluminação (em geral é programada para um ciclo de 12 h de luz e 12 h de escuridão ou 14h de luz e 10h de escuridão), a vibração (os ratos ouvem sons entre 1 e 60 kHz) e ruído (inferior a 50 dB) [133].

A acomodação dos animais é feita geralmente em gaiolas com um fundo liso, base geralmente de policarbonato e cobertas por uma grade de inox sobre a qual se coloca a alimentação e se apoia o biberão para fornecimento de água (Figura 3.16).

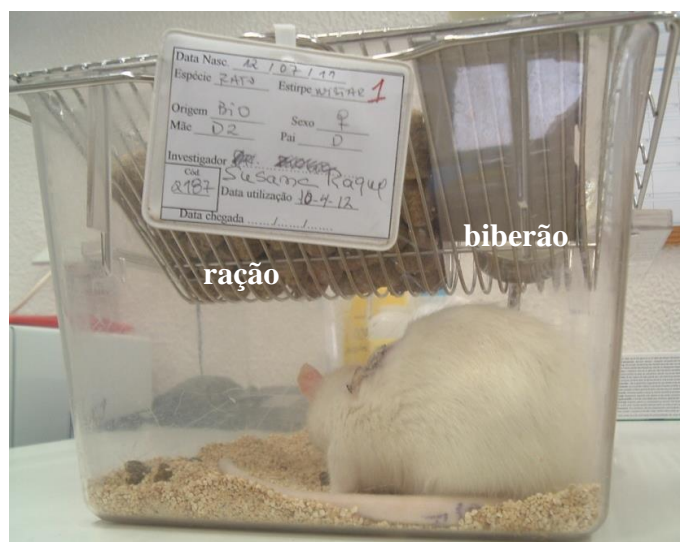


Figura 3. 16 Caixa de acomodação de roedores. Tampa com separador para colocação de ração e biberão de água.

3.4.3 Anestesia

Uma das maiores preocupações na experimentação animal é a garantia de que é assegurada a ausência ou redução significativa da dor e do stress nos animais. A dor é uma sensação incómoda, relacionada com a potencial destruição tecidual, associada a trauma, cirurgia e algumas condições médicas, pelo que o seu controlo é essencial. Os investigadores devem manter-se informados sobre as técnicas anestésicas mais recentes e introduzi-las sempre que possível.

Durante a anestesia os animais perdem os seus reflexos protectores e associado a isso a produção de lágrima diminui, sendo desejável a utilização de um gel oftálmico tópico nos olhos logo após a indução da anestesia para evitar complicações (ex. úlceras da córnea ou ceratoconjuntivites).

A anestesia geral pode ser induzida e mantida com anestésicos voláteis (através da utilização de uma câmara de indução) ou injectáveis (método usado neste trabalho). Na anestesia injectável são importantes questões como:

- Local de administração: Local onde o fármaco é depositado, podendo classificar-se em subcutâneo, intraperitoneal e endovenoso. Neste trabalho a anestesia administrada foi a intraperitoneal (IP). É uma via muito popular nestes animais, pois é de fácil execução e normalmente não resulta em lesões ou sinais de dor. O fármaco é administrado na cavidade abdominal do animal com uma velocidade de absorção pouco inferior à da via endovenosa. Não é, contudo, isenta de riscos como sejam a perfuração de órgãos abdominais pelo que deve ser executada com precaução.

- Volume: Deve estar de acordo com a capacidade de absorção e com a via de distribuição do fármaco no corpo e depende, entre outras coisas, da espécie e do tamanho do animal. Por exemplo nos ratos o volume IP a administrar é 1ml/100g.

A resposta aos anestésicos nas diferentes espécies, estirpes, e mesmo entre machos e fêmeas é muito variável, por isso é recomendada a administração de fármacos que tenham a maior margem de segurança possível. Uma alternativa muito usada em Portugal é a administração de medetomidina e cetamina. A medetomidina, se aplicada uma dose baixa produz uma ligeira sedação, com uma dose mais elevada os animais perdem o reflexo de postura. O grau de analgesia deste fármaco é insuficiente para procedimentos cirúrgicos mas potencia muito o efeito de outros agentes. A cetamina produz sedação profunda. Outra alternativa usualmente administrada é a combinação de cetamina com diazepam. Este último pertence à classe das benzodiazepinas que produzem sedação ligeira mas não apresentam qualquer poder analgésico.

3.4.4 Eutanásia

Na experimentação animal a eutanásia pode surgir em diversas situações: no final de um procedimento experimental, para evitar sofrimento ou stress, depois de terminados os estudos para obtenção de tecidos (biópsias) para fins científicos, quando o nível de dor ou sofrimento ultrapassa os níveis aceitáveis, quando o estado de saúde e bem-estar não estão garantidos ou para eliminar animais excessivos. A selecção do método para o executar depende de diversos factores como: a espécie animal

em causa, a disponibilidade dos meios de contenção do animal, perícia do operador, disponibilidades técnicas e de equipamento, número de animais, idade, entre outros.

Os métodos de eutanásia podem ser físicos ou químicos. Os métodos físicos envolvem a perda imediata de consciência, através de trauma físico no cérebro (exs. penetração por um dardo, deslocamento cervical, decapitação, choque eléctrico). Os métodos químicos, podem ser injectáveis ou inaláveis. Os injectáveis consistem na aplicação de anestésicos em sobredosagem de modo a induzir a morte do animal. De um modo geral, são processos controlados, que fomentam a ausência de percepção de todas as sensações, como perda de consciência, analgesia, e relaxamento muscular, provocando a morte sem sofrimento e sem dor, pelo que constituem um método adequado de eutanásia. Os inalantes, consistem na aplicação de um gás ou anestésicos por vaporização ou condução, em câmaras ou circuitos de anestesia (exs. dióxido de carbono (CO_2), monóxido de carbono (CO), atmosfera rica em azoto (N_2) ou árgon (Ar), anestésicos inalantes voláteis - halotano, isoflurano e enflurano).

Capítulo 4 - Procedimiento Experimental

4.1 Materiais

Os polímeros e o solvente utilizados neste trabalho encontram-se apresentados na Tabela 4.1. O conjunto de soluções preparadas foram definidas como unitárias, binárias e ternária - consoante na sua composição tinham apenas um polímero, dois polímeros ou três polímeros. Todas as soluções foram preparadas em % m/m.

Tabela 4. 1 Materiais utilizados para preparar as soluções deste trabalho.

Materiais (Nome/Abreviatura)	M (kDa)	Fabricante
Quitosano / CS	500 ^{a)}	Cognis
Gelatina / GEL	60	Sigma-Aldrich
Policaprolactona / PCL	70 a 90	Sigma-Aldrich
Poli(óxido de etileno) / PEO	800	Sigma-Aldrich
Ácido acético glacial / AcOH glacial	0,060	Panreac Química

^{a)} Valor determinado por Cromatografia de Permeação em Gel (GPC).

O quitosano tem um grau de desacetilação mínimo, garantido pelo fabricante, de 70%. Esta propriedade foi medida com a técnica de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) tendo-se obtido um valor de 75,5%.

O ponto isoeléctrico da gelatina é de aproximadamente 6 (dado do fabricante).

Os agentes químicos usados para reticular as matrizes produzidas foram: solução aquosa de glutaraldeído, GTA (50% m/v em H₂O da Sigma-Aldrich) e genipina, GEN (Challenge Bioproducts Co.).

4.2 Caracterização das Soluções

As soluções foram caracterizadas quanto às propriedades condutividade eléctrica, tensão superficial e viscosidade.

4.2.1 Condutividade Eléctrica

A determinação da condutividade eléctrica foi efectuada num medidor de bancada HI 4521 da Hanna Instruments Inc. que mediu esta propriedade a uma temperatura de referência de 25 °C. Antes de se efectuar qualquer medida o aparelho foi sempre calibrado com soluções padrão.

4.2.2 Tensão Superficial

As medidas de tensão superficial foram efectuadas num instrumento CAM101 da KSV Instruments.

O equipamento é totalmente controlado por computador e baseia-se na análise da forma de uma gota mediante a captura automática de imagens de vídeo. O perfil da gota é extraído da imagem sendo aplicada uma curva ajustada à equação de Young-Laplace [134], que permite o cálculo da tensão superficial.

4.2.3 Viscosidade

A viscosidade das soluções foi determinada num reómetro rotacional Bohlin Gemini HRnano da Malvern Instruments.

As medidas foram efectuadas com a geometria prato e cone. Trata-se de um sistema onde o prato se encontra fixo e o cone, neste caso com 40 mm de diâmetro e 2 ° de inclinação, é colocado em movimento (de rotação). Entre ambos é colocada a solução a medir. Os ensaios foram realizados a uma temperatura de 25 °C. Antes das medições foi aplicado um pré-corte para garantir o estado estacionário. No geral, as medidas foram efectuadas em modo contínuo para taxas de corte entre 0,1 s⁻¹ e 1000 s⁻¹.

Newton descobriu que num fluido em escoamento estacionário (a velocidade e a pressão num determinado ponto não variam com o tempo) e laminar (as suas partículas tendem a percorrer trajectórias paralelas) a tensão de corte entre as camadas do fluido, τ , é proporcional à razão da variação da velocidade do fluido, dv , pela variação espacial na direcção perpendicular à velocidade, dy , como se mostra na expressão:

$$\tau = \eta \frac{dv}{dy} \quad (4.1)$$

onde a constante η denomina-se de viscosidade do fluido e a razão dv/dy é conhecida como o gradiente da velocidade na direcção y , taxa de deformação ou taxa de corte.

Um fluido que obedece a esta equação designa-se por fluido newtoniano (a viscosidade é constante e independente da taxa de corte), caso contrário designa-se por fluido não-newtoniano, em que os mais comuns são os fluidos reofluidificantes (a viscosidade diminui com o aumento da taxa de corte) e os fluidos reoespessantes (a viscosidade aumenta com o aumento da taxa de corte) [135], como se mostra na Figura 4.1:

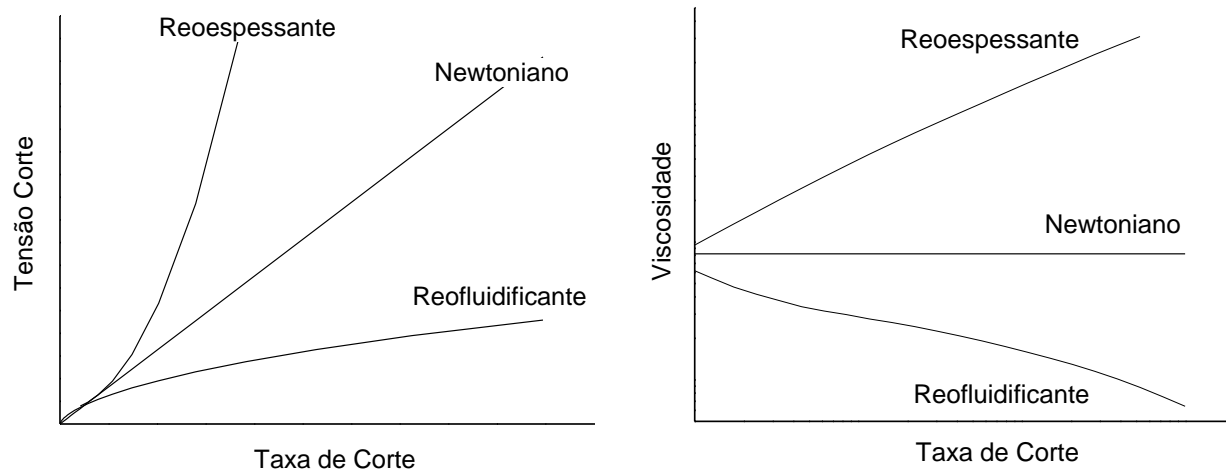


Figura 4. 1 Curvas de fluxo típicas dos diferentes tipos de fluidos.

No caso particular deste trabalho, as soluções de PCL, de GEL e de PCL/GEL são fluidos newtonianos. As soluções preparadas com CS (individualmente ou em mistura) apresentam um comportamento típico de fluidos reofluidificantes.

4.3 Processamento das matrizes

4.3.1 Técnica de Electrofiação

As matrizes foram produzidas num sistema de electrofiação horizontal constituído por uma fonte de alta tensão DC (Iseg Spezialelektronik), uma bomba infusora (New Era Pump Systems, Inc. ou uma Fusion 100 Classic Syringe Pump da Chemix), uma seringa de 5 ml (Injekt, B. Braun) ligada a uma agulha de calibre 23 (diâmetro interno 0,337 mm) e um colector, uma placa de alumínio com dimensões $20 \times 20 \text{ cm}^2$ colocada verticalmente. O colector executa um movimento rotacional e translacional (a distância agulha-colector mantém-se constante) de forma a permitir uma maior uniformidade da espessura das membranas. Na Figura 4.2 mostra-se uma fotografia do sistema experimental utilizado.

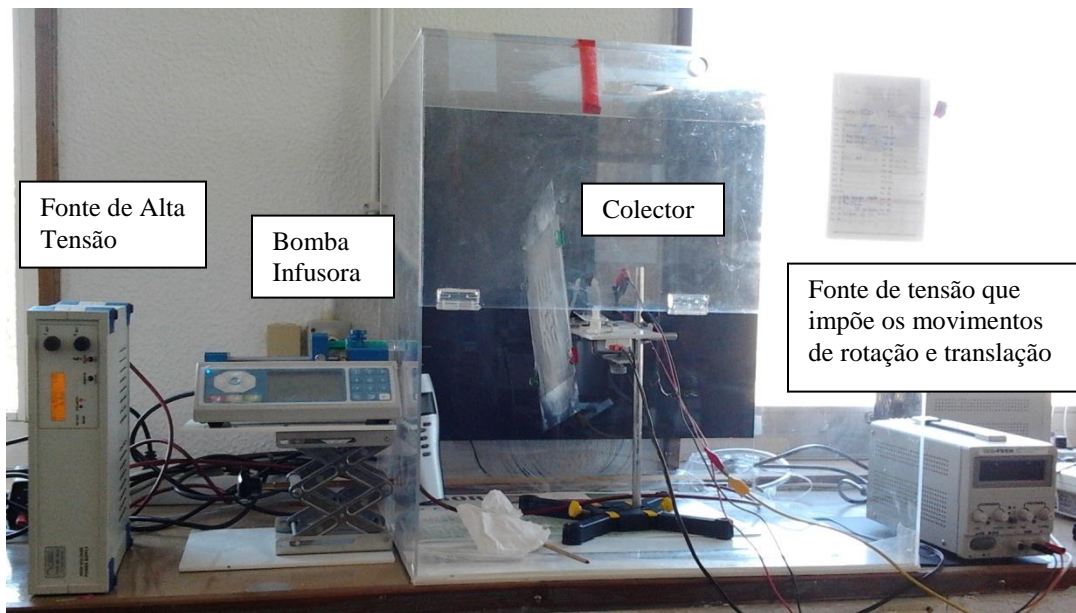


Figura 4. 2 Fotografia de um sistema de electrofiação usado na produção das matrizes.

As soluções foram depositadas em condições ambientais de temperatura e humidade de *ca.* de 23 ± 3 °C e de 40 ± 5 %, respectivamente.

O suporte utilizado na deposição dos diversos materiais foi a folha de Al, excepto nas deposições usadas para:

- os ensaios de tracção mecânica do PCL e GEL, onde se utilizou cartolina, visto ser um melhor suporte para remover as membranas sem as danificar;
- o estudo de perda de massa onde se utilizaram lamelas de vidro quadradas de dimensão 22×22 mm²;
- as culturas celulares onde se utilizaram lamelas de vidro redondas com 12 mm de diâmetro.

4.3.2 Mecanismo de Reticulação

As matrizes foram reticuladas por GTA na fase gasosa. O procedimento seguido baseou-se na introdução das matrizes electrofiadas numa caixa de vidro com tampa. Um reservatório aberto, contendo 10 ml de solução de GTA 5% v/v foi inserido no interior dessa caixa de modo a criar uma atmosfera saturada de vapor de GTA. O sistema fechado foi introduzido numa estufa, mantida a 40 °C, entre 0,5 e 24 h. As amostras foram retiradas e introduzidas num exsiccador durante 3 dias para remover qualquer resíduo de GTA.

No processo DHT, utilizou-se uma estufa (EV 018, Nüve) que permite a realização das experiências em atmosfera controlada (gases inertes ou vácuo). A reticulação das matrizes ocorreu em vácuo de 2 mbar produzido por uma bomba de diafragma (MD 1, Vacuubrand). Numa primeira fase as temperaturas usadas foram 100, 120, 140 e 160 °C, usando tempos de exposição de 24, 48 e 72 h. Deste estudo adoptou-se a temperatura de 140 °C, variando-se o tempo de reticulação desde 8 até 96 h.

O mecanismo de reticulação com a genipina iniciou-se imediatamente na preparação das soluções a electrofiar, onde este agente reticulante foi incorporado. As matrizes electrofiadas foram posteriormente imersas num banho de GEN 2% m/m em EtOH:H₂O 90:10 (% m/m) onde permaneceram entre 1 a 5 dias, seguindo-se um tratamento em água destilada durante 1 dia e secagem no exsiccador durante 3 dias.

4.4 Caracterização das Matrizes

As matrizes foram caracterizadas quanto à morfologia, ângulo de contacto, composição química, porosidade, grau de inchamento e propriedades mecânicas. Em alguns materiais foram ainda realizados ensaios de perda de massa.

4.4.1 Morfologia

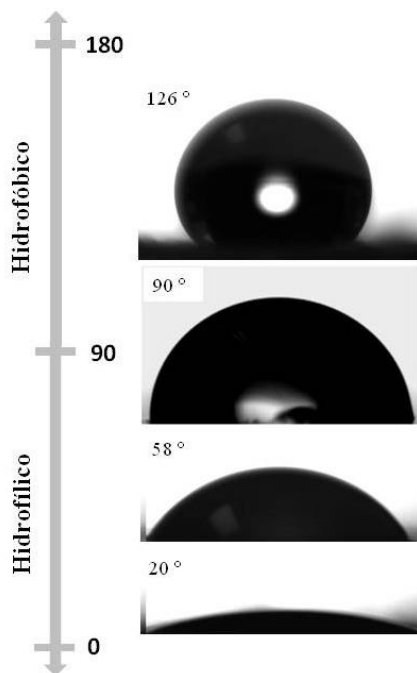
Foram utilizados dois tipos de microscópios, óptico e electrónico de varrimento (MEV). O primeiro foi utilizado essencialmente na fase preliminar de produção das matrizes para se obter uma visão geral das estruturas produzidas e estabelecer algumas condições experimentais. Um estudo mais detalhado da morfologia das fibras, bem como a determinação do seu diâmetro médio, foi obtido com o microscópio electrónico de varrimento.

O microscópio óptico utilizado foi um Nikon Eclipse LV100 tendo incorporado lentes objectivas com ampliações de 10x, 50x e 100x e uma ocular com ampliação de 10x. As imagens foram obtidas em suporte digital utilizando uma câmara Nikon DS-Fi1.

Neste trabalho foram utilizados 2 microscópios electrónicos de varrimento, MEV. A análise morfológica de fibras de PCL, depositadas em função da idade da solução, foi efectuada com um equipamento Hitachi modelo S2400. As restantes medidas foram obtidas num microscópio JEOL JSM-5200LV. Antes de serem observadas, as amostras foram revestidas a ouro.

4.4.2 Ângulo de Contacto

O ângulo de contacto é o ângulo formado entre a interface líquido/vapor e uma superfície sólida cujo carácter hidrofílico ou hidrofóbico se pretende avaliar (Figura 4.3).



Energia Interfacial	Ângulo de Contacto	Propriedade
$\gamma_{SV} \ll \gamma_{LV}$	$\theta > 150^\circ$	Super-hidrofóbico
$\gamma_{SV} < \gamma_{LV}$	$\theta > 90^\circ$	Hidrofóbico
$\gamma_{SV} > \gamma_{LV}$	$\theta < 90^\circ$	Hidrofílico

Figura 4. 3 Representação esquemática da caracterização de superfícies de acordo com a medição dos ângulos de contacto. Os símbolos γ_{SV} e γ_{LV} representam a energia interfacial sólido-vapor e líquido-vapor (ou tensão superficial), respectivamente (Imagem adaptada de [136, 137]).

Esta propriedade superficial das matrizes foi medida com o instrumento CAM101 da KSV. O volume de gota utilizado foi cerca de 10 μL .

4.4.3 Composição química

A composição química das matrizes foi analisada por espectroscopia de infravermelho, uma técnica que se baseia no facto das ligações químicas das substâncias possuírem frequências de vibração específicas.

Os espectros foram adquiridos num espectrómetro de infravermelho baseado na transformada de Fourier, operando no modo de reflexão total atenuada, usualmente designado por ATR-FTIR - *Attenuated Total Reflectance Fourier Transform Infrared Spectrometer* (Nicolet Nexus Continuum, Thermo Scientific). O espectro foi adquirido na gama 4000-400 cm^{-1} .

Este tipo de configuração é particularmente utilizado na obtenção de espectros de absorção de filmes pouco espessos e de substâncias opacas. O seu modo de operação baseia-se no fenómeno de reflexão interna total (Figura 4.4). O feixe IV penetra um cristal e sofre uma reflexão interna total quando o ângulo de incidência na interface entre a amostra e o cristal é superior ao ângulo crítico. A reflexão total interna gera uma onda evanescente capaz de sondar o material em contacto com o cristal até uma profundidade típica de 1 μm . O feixe perde energia no comprimento de onda em que o material absorve, medindo-se a radiação atenuada resultante. Esta radiação é detectada e usada para formar o interferograma, ou seja, um gráfico de intensidade versus tempo. A operação matemática transformada de Fourier (FT) separa as frequências das absorções individuais contidas no interferograma, produzindo um espectro com as características espectrais de absorção da amostra.

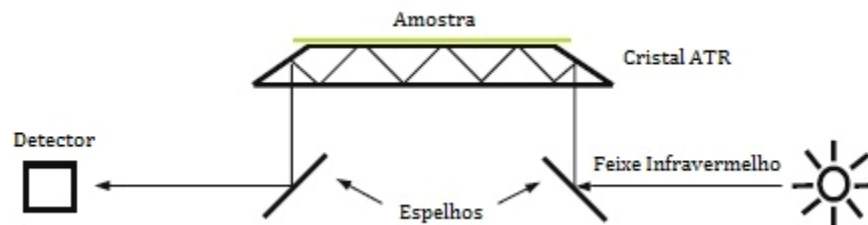


Figura 4. 4 Esquema representativo do mecanismo de detecção do feixe IV.

4.4.4 Porosidade

A porosidade, P , das matrizes foi estimada através da determinação da densidade aparente das matrizes, ρ_a , e a respectiva densidade do material, ρ , de acordo com a equação 4.2 [5]. A densidade aparente foi calculada a partir da medição da massa, m , e dimensões (área, A , e espessura, e) das matrizes (equação 4.3).

$$P = \left(1 - \frac{\rho_a}{\rho}\right) \quad (4.2)$$

$$\rho_a = \frac{m}{A \times e} \quad (4.3)$$

4.4.5 Grau de inchamento

As matrizes foram analisadas quanto à capacidade de inchamento quando mergulhadas em água. Este parâmetro foi avaliado tendo em conta apenas alterações das dimensões superficiais. Para o efeito o procedimento seguido consistiu em fotografar as matrizes e determinar as suas dimensões (área) através

do programa *ImageJ*. A análise foi realizada com as matrizes secas (A_s) e após imersão em água destilada (A_m) durante 5 h e 5 dias. Este parâmetro denominou-se por grau de inchamento, I , e calculou-se através da seguinte equação:

$$I = \frac{A_m}{A_s} \quad (4.4)$$

4.4.5 Tracção Mecânica

As propriedades mecânicas compreendem as respostas características dos materiais quando sujeitos a forças externas, manifestando-se pela capacidade de desenvolverem deformações reversíveis, irreversíveis e pela resistência à fractura. Neste trabalho a relação tensão-deformação foi avaliada através de ensaios de tracção. Neste tipo de testes são aplicadas cargas (forças) de tracção ao longo dos eixos ortogonais do material (x, y, z), provocando o seu alongamento a uma taxa de deformação constante até ocorrer ruptura.

Quando são aplicadas forças com determinada direcção ao longo de uma secção de material perpendicular a essas forças, define-se uma tensão uniaxial, σ , dada por $\sigma = F/A$ (N/m² ou Pa). A deformação, ε , é uma grandeza adimensional definida como a razão entre o alongamento do material (Δl) e o seu comprimento original (l_0), ou seja, $\varepsilon = \Delta l/l_0$. Uma curva típica de tracção traduz-se num gráfico $\sigma(\varepsilon)$, como se mostra na Figura 4.5. Geralmente, esta curva possui duas regiões distintas: uma zona inicial linear, onde a resposta do material à tracção é bem descrita pela lei de Hooke ($\sigma = E \times \varepsilon$) o que significa que o material exhibe um comportamento elástico. O declive, E , é o parâmetro que define o módulo elástico do material também designado por módulo de Young. A outra região, designada por plástica, corresponde a um regime onde o material sofre deformações permanentes e termina quando o material rompe.

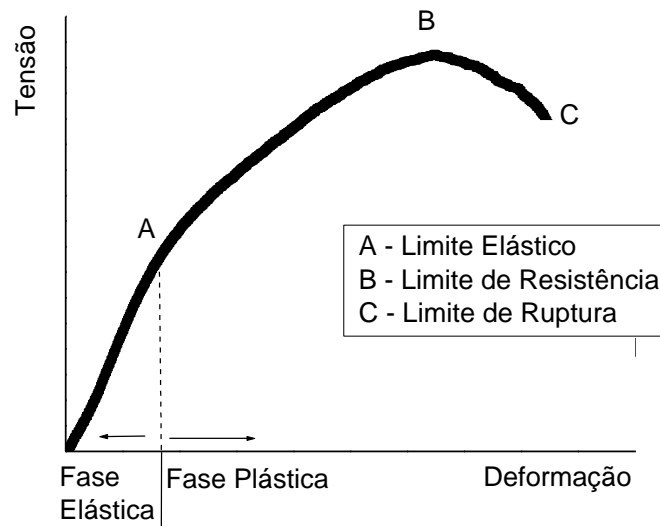


Figura 4. 5 Curva de tração, Tensão versus Deformação, onde se destacam os pontos de maior interesse. Na fase elástica, fase que obedece à lei de Hooke, o material retoma às dimensões originais assim que a força deixa de actuar sobre ele. Na fase plástica o material adquire uma deformação permanente. O limite de resistência é a tensão máxima que o material suporta sem romper. Normalmente considera-se que a partir deste ponto o material entra na fase de ruptura. Neste trabalho é definido como o ponto (σ_R, ϵ_R) . O limite de ruptura é o ponto em que o material rompe.

As propriedades mecânicas das matrizes secas, à temperatura ambiente, foram medidas numa máquina de ensaios de tração da Rheometric Scientific, com o Minimat-Firmware 3.1 como software incorporado no computador IBM (Figura 4.6).

Para estes ensaios foram depositadas três réplicas de cada material, seguindo-se um tratamento em vácuo para remoção do solvente, durante 2 dias. Todas as matrizes cuja composição envolvia a gelatina foram seguidamente reticuladas de acordo com os mecanismos de reticulação enunciados. De cada réplica foram cortados no mínimo cinco pedaços com 10 mm de largura e 30 mm de comprimento. A espessura das amostras, entre 150 e 200 μm , foi determinada em três zonas distintas com uma craveira digital Mitutoyo (500-196-20 Digimatic Digital Caliper, 0-150 mm).

Os ensaios de tração foram efectuados com uma célula de carga de 20 N, a uma velocidade até 5 mm/min, dependendo do tipo de amostra. Apenas 10 mm do comprimento da amostra foi traccionado, destinando-se os restantes 20 mm para a fixação no suporte.

Os dados da força de tração e do deslocamento correspondentes a cada amostra foram gravados pelo software do computador e convertidos em curvas de tração para obtenção do módulo de Young, E , tensão e deformação à ruptura, σ_R e ϵ_R , respectivamente. Todos os dados da força foram convertidos para valores de tensão por normalização individual à área da secção recta de cada amostra e os dados do

deslocamento convertidos para valores de deformação por normalização ao comprimento inicial de cada amostra traccionada.

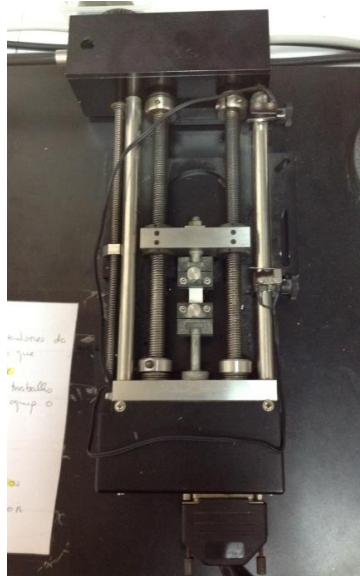


Figura 4. 6 Ensaio de tracção realizado na máquina de ensaios da Rheometric Scientific, onde se observa a matriz a ser traccionada presa pelas garras, uma das quais é móvel e a outra encontra-se ligada à célula de carga.

4.4.6 Estudo de Perda de massa

O grau de reticulação das matrizes de gelatina foi avaliado através da determinação da sua perda de massa durante o contacto com água. Para este estudo, as matrizes foram depositadas em lamelas de vidro quadradas, de $22 \times 22 \text{ mm}^2$, cuja massa foi previamente determinada numa balança (Radwag AS 220/X). As amostras foram colocadas num exsiccador durante 2 dias por forma a remover algum resíduo de solvente. Após esse período, procedeu-se à sua reticulação, a qual foi sempre realizada em triplicado para cada procedimento. Todas as matrizes voltaram a ser colocadas no exsiccador, excepto as reticuladas por DHT, para que fosse removido qualquer resíduo de agente reticulante. Após esse período a massa das matrizes foi determinada, designando-se por m_i . O passo seguinte consistiu em imergir cada matriz num banho de água destilada, durante 3 dias, à temperatura ambiente. Seguidamente, as matrizes foram retiradas do banho e deixadas a secar durante algumas horas à temperatura ambiente, permitindo que a maior parte da água evaporasse, e depois introduzidas novamente no exsiccador durante 3 dias. Após esse período fez-se uma nova medida da massa de cada matriz, designada por m_f . A perda de massa foi determinada de acordo com a seguinte expressão:

$$\text{Perda de Massa (\%)} = \frac{m_i - m_f}{m_f} \quad (4.5)$$

4.5 Testes *in vitro*

4.5.1 Protocolo de Cultura e Viabilidade Celular

Nas culturas celulares foram utilizadas células fibroblásticas de duas linhagens diferentes:

- uma linha contínua, 3T3-NIH [138, 139];

- uma linha finita de células, HFFF2 (*Human Caucasian foetal foreskin fibroblast*) adquirida à ECACC. Estas células foram sempre semeadas na passagem P8.

O meio de cultura adoptado foi o meio *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM)-Glutamax, complementado com 10% v/v de soro proveniente de feto de bovino (foetal bovine serum - FBS) e 100 U/ml de antibiótico composto por estreptomicina e penicilina. As células foram removidas dos frascos de cultura com Tripsina-EDTA 0,05% (todos estes materiais foram adquiridos à Invitrogen).

O número de células foi monitorizado durante o processo de cultura através da aplicação de dois reagentes químicos: o Cell Counting Kit-8, CCK-8, (96992, BioChemika) e o PrestoBlue (A123262, Invitrogen).

O Kit de contagem de células CCK-8 é composto por um sal altamente solúvel em água, denominado por sal tetrazólio (WST-8). O WST-8 é reduzido pelas desidrogenases das células formando um produto de cor amarelada (formazano), solúvel no meio de cultura. A quantidade de formazano gerado pela actividade das desidrogenases é directamente proporcional ao número de células vivas.

O principal composto do PrestoBlue é a resazurina, que tem uma cor azul e um nível basal de fluorescência virtualmente nulo. Quando é adicionada a um meio com células, a resazurina é reduzida em resorufina pelo ambiente redutor mantido pelas células viáveis no seu citosol. A resorufina é um composto de cor vermelha e fluorescente. A conversão da resazurina em resorufina é proporcional ao número de células e função da sua viabilidade.

As culturas foram efectuadas numa câmara estéril de fluxo laminar horizontal tendo-se seguido os protocolos de rotina, típicos deste tipo de experiências.

Foram efectuadas sementeiras nas seguintes situações:

i) Para traçar curvas de calibração, por forma a ser possível quantificar o número de células viáveis que crescem nas matrizes produzidas;

ii) Para estabelecer curvas de crescimento das células nas diferentes matrizes;

iii) Para observação morfológicas das células ao microscópio confocal e MEV.

A espessura das matrizes depositadas para os ensaios *in vitro* variou entre 70 µm e 100 µm.

Curvas de Calibração

São curvas que representam graficamente a absorvância/fluorescência em função do número de células vivas em cultura e foram estabelecidas para ambas as linhagens celulares do seguinte modo:

- Fez-se sementeira de diferentes quantidades de células sobre a superfície dos poços (placa de 48 poços).

- Colocou-se a incubar a 37 °C e CO₂ 5% durante 1 dia.

- Aplicou-se o kit CCK8 (nas células 3T3) ou PrestoBlue (nas células HFFF2) no meio de cultura, ficando a incubar durante 2 h, de acordo com as instruções do fabricante.

- O meio com o kit foi removido para uma placa de 96 poços (preta no caso das medidas de fluorescência); meio fresco com o kit foi usado como controlo. A placa foi colocada num espectrofotómetro leitor de placas (leitor Elisa) definido para medir a absorvância a 450 nm - no caso em que se aplicou o kit CCK8, ou num fluorímetro de filtro (Zenyth 3100) definido para medir a fluorescência a 535 nm (excitação) e 595 nm (emissão) - no caso em que se aplicou o kit PrestoBlue.

- Remoção das células presentes nos poços com tripsina-EDTA e contagem num hemocitómetro.

Desta forma foi estabelecida uma relação directa da absorvância/fluorescência com o número de células vivas na cultura.

Curvas de Crescimento

Antes da sementeira, todos os materiais foram imersos em água ultra-pura até 24 h. Depois seguiu-se etanol 70% v/v, lavagem em PBS 1x e água ultra-pura e por fim esterilização com radiação UV durante 1h.

As células foram semeadas em caixas de 48 poços com uma densidade de 2×10^4 células/poço:

- até 7 dias, com mudança de meio ao 3º e 5º dias, no estudo efectuado com as 3T3;

- até 13 dias, com mudança de meio ao 2º, 4º, 6º, 9º e 11º dias, no estudo efectuado com as HFFF2.

Os controlos foram semeados directamente sobre a superfície dos poços.

O crescimento de células nos materiais foi avaliado periodicamente, mediante a aplicação dos *kits* correspondentes no meio de cultura, seguindo-se a medida de absorvância ou fluorescência, duas horas depois. O número de células nos materiais foi determinado com base na curva de calibração determinada para cada linha de células.

4.5.2 Protocolo de Fixação e/ou Marcação

MEV

O MEV foi utilizado para observar a distribuição e a morfologia das células cultivadas nos materiais. As matrizes contendo células 3T3 foram observadas ao 3º dia de cultura enquanto as matrizes contendo HFFF2 foram-no ao 4º dia. O protocolo de preparação dos materiais foi o seguinte:

- fixação das células às matrizes com uma solução aquosa de GTA 2,5% v/v durante 4 h;
- lavagem com PBS 1x;
- desidratação gradual em séries de etanol (entre 10 a 100% v/v com um intervalo de 10%);
- tratamento de secagem por ponto crítico (Polaron E3100);
- revestimento com filme de ouro.

A secagem por ponto crítico é um método normalmente utilizado com tecidos biológicos e consiste na secagem de materiais antes de serem examinados por MEV. Baseia-se na aplicação de um fluido inerte adequado, geralmente CO₂, que é muito pouco miscível com água mas é miscível com etanol ou acetona (não utilizada neste trabalho pois é solvente da PCL). Nesse sentido o material biológico é previamente desidratado com etanol. No início do processo de secagem por ponto crítico é inserido o CO₂ em fase líquida, que substitui o meio desidratante. Após este processo que demora em média uma hora por cada milímetro de espessura da amostra, é elevada a temperatura para se atingir o ponto crítico do CO₂ (Temperatura crítica: 31 °C, Pressão crítica: 73.825 bar); nesta altura existe a passagem da fase líquida para a gasosa sem alteração da densidade, o que garante a não aplicação de tensões sobre a amostra e consequentemente sem deformações da mesma. O processo finaliza com a libertação muito lenta do CO₂ até ser atingida a pressão ambiente, permanecendo uma amostra seca sem alterações morfológicas.

Citoquímica

Foram efectuadas culturas, com ambas as linhas de células, para observação por microscopia confocal. Nas culturas com células 3T3 as imagens obtidas correspondem ao 3º dia de cultura. Quanto às HFFF2, as imagens obtidas correspondem ao 4º e 7º dias de cultura.

As células para controlo foram semeadas directamente sobre lamelas de vidro.

O protocolo seguido para efectuar a marcação citoquímica das células nas matrizes e lamelas foi:

- fixação das células vivas com paraformaldeído 2% (PFA), durante 1h à temperatura ambiente;
- lavagem com PBS 1x;

- nas amostras reticuladas com GTA, redução com borohidreto de sódio 0,1% (Merck) até 5 min (um agente com capacidade de reduzir aldeídos e cetonas em álcoois);
- lavagem com PBS 1x;
- permeabilização das células com Triton X-100 0,2% (Sigma-Aldrich) durante 20-30 minutos;
- lavagem com PBS 1x;
- preparação da solução de marcação citoquímica:
 - BSA 1% (m/v) (*bovine serum albumin*) como meio de preparação;
 - RNase (1:50) para degradar o ARN (pois o ToPro detecta ARN e ADN e só se pretende ver os núcleos, portanto o ADN);
 - ToPro3 (1:500) (Molecular Probes) para marcação do ADN das células;
 - Alexa488-conjugada com faloidina (1:100) no caso das células 3T3 e Alexa568-conjugada com faloidina (1:100) no caso das células HFFF2 para observação dos filamentos de actina do citoesqueleto (ambas da Molecular Probes).
- preparação de uma câmara húmida onde foram introduzidas as matrizes a estudar e nelas 80 μ L da solução de marcação. A caixa foi mantida a 4 °C durante 1 dia.

Imunocitoquímica

O protocolo de marcação com anticorpos foi aplicado somente em matrizes produzidas com os três polímeros e cultivadas com células HFFF2. As imagens foram adquiridas ao 4º e 7º dia de cultura.

O processo de marcação foi feito em dois dias. No primeiro dia seguiu-se o protocolo descrito anteriormente até à aplicação do Triton X-100. Depois, prepararam-se duas soluções de marcação com os anticorpos primários:

- 1) BSA 1% (m/v) e anticorpo primário específico para a fibronectina (*Anti-human fibronectin, rabbit pAb*, Sigma-Aldrich) (1:400)
- 2) BSA 1% (m/v) e anticorpo primário específico para colagénio I (*Anti-human collagen I, rabbit pAb*, Abcam) (1:100)

Preparou-se uma câmara húmida onde cada matriz foi marcada somente com uma das soluções de marcação (50 μ L); o primário não se aplicou nos controlos. A caixa foi mantida a 4 °C.

No segundo dia preparou-se a solução com o anticorpo secundário, da seguinte forma:

- BSA 1% (m/v)
- RNase (1:50)

- ToPro3 (1:500)
- Alexa568- conjugada com Faloidina (1:100)
- Anticorpo secundário (*goat-anti rabbit IgG(ab')₂*, Alexa 488, Molecular Probes) (1:100)

Aplicou-se 50 µL de solução nas matrizes e controlos e manteve-se a caixa a 4 °C mais 1 dia até observação no confocal.

4.5.3 Microscopia Confocal

O microscópio confocal de fluorescência por varrimento laser, ou simplesmente confocal, tem sobre os microscópios de fluorescência a vantagem de usar uma fonte de luz pontual e de captar a luz proveniente de um único ponto da amostra, o ponto focal do sistema. Ao eliminar a luz proveniente de outros pontos elimina-se a luz não focada e obtêm-se imagens com melhor resolução e contraste.

Neste trabalho utilizou-se um confocal LeicaSPE, acoplado a um microscópio Leica DMI4000B, com lasers com comprimento de onda no visível, 488 nm (azul), 532 nm (verde) e 635 nm (vermelho) + 1 detector (PMT) spectral (400-700nm) + 1 de luz transmitida. O microscópio tem também um iluminador de fluorescência usado apenas para posicionar e centrar a amostra.

As amostras foram montadas em PBS sobre uma lamela de vidro e observadas no confocal com as lentes de 10x 0,3NA ou 20x 0,7NA (NA – *Numerical aperture*). As imagens foram adquiridas em 2-5 campos diferentes, escolhidos aleatoriamente, os quais foram usados para estimar a área de cobertura celular.

4.6 Testes *in vivo*

O animal usado durante todo o estudo foi o rato da estirpe Wistar existente no Biotério da Faculdade de Ciências Médicas (FCM) da Universidade Nova de Lisboa (UNL) creditado pelo alvará emitido pela DGAV de onde consta a autorização de utilização de animais, pequenos roedores, ao abrigo do disposto na Portaria 1005/92 de 23 de Outubro. É um Biotério que garante o estatuto sanitário SPF (*Specific Pathogen Free*), ou seja, garante que os animais são mantidos em sistemas de barreiras sanitárias rigorosas, de forma a manter a boa qualidade microbiológica.

Os procedimentos praticados nos animais regem-se pela Legislação Portuguesa e Europeia apresentada no capítulo 3 secção 3.4.1.

Os animais estão todos em gaiolas individuais com cama de serradura específica e no pós-operatório permanecem no recobro do biotério até ao dia da eutanásia. No recobro existe ventilação, humidade e temperatura controladas, ciclo de luz/escuro de 12 h/12 h e água e alimentos de acordo com as normas.

A prática de experimentação animal foi da responsabilidade da Doutora Maria Angélica Rato da Silva Roberto, médica investigadora devidamente creditada ao abrigo do ponto iii), da alínea e), do nº3 da Portaria nº 1005/92, de 23 de Outubro.

As experiências com os animais envolveram três fases: planeamento das experiências, procedimento cirúrgico e histologia.

4.6.1 Planeamento das Experiências

Seguindo a estratégia transversal a toda a tese foram em primeiro lugar analisadas as matrizes unitárias. Mediante os resultados destas, usaram-se as matrizes binárias e ternária. No geral as matrizes apresentavam espessuras entre 120 µm e 150 µm. O procedimento envolveu a utilização de um total de 26 ratos (peso médio: 250 g, idade: 6 a 12 meses) distribuídos como mostra a Tabela 3.2.

Tabela 4. 2 Distribuição do número de ratos por matriz.

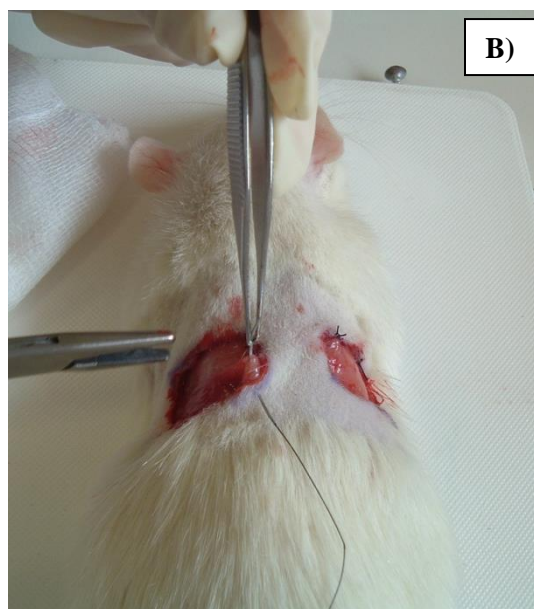
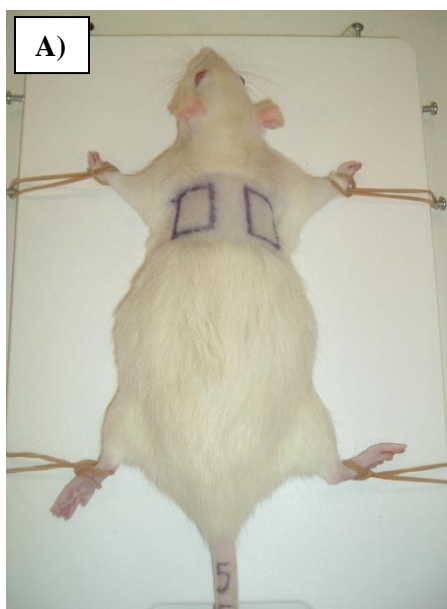
Matriz	Nº de Ratos	Matriz	Nº de Ratos
M1 – PCL	6	M4 – CS/PCL	2
M2 - Quitosano (CS)	6	M5 – CS/GEL	2
M3 – Gelatina (GEL)	6	M6 – PCL/GEL	2
		M7 – CS PCL/GEL	2

O protocolo seguido nas matrizes unitárias envolveu a utilização de 3 réplicas dos materiais em 3 tempos distintos de permanência na ferida, definidos como T1 - material removido após 1 semana, T2 - material removido após 2 semanas e T3 - material removido após 4 semanas. A experiência foi planeada de forma a que em cada rato fossem aplicadas duas matrizes, a serem removidas em tempos diferentes ou 1 matriz e um controlo (neste a ferida apenas era tapada com gaze gorda). Os controlos também foram feitos em triplicado para cada tempo.

Nas matrizes binárias e ternária foram utilizadas 2 réplicas dos materiais em 2 tempos distintos de permanência, T2 - material removido após 2 semanas e T3 - material removido após 4 semanas. A experiência foi conduzida de forma que dos dois ratos disponíveis para cada matriz, num deles fossem aplicadas duas matrizes as quais eram removidas em tempos diferentes e no outro fossem aplicadas 2 matrizes e 2 controlos.

4.6.2 Procedimento Cirúrgico

Em primeiro lugar procedeu-se à identificação do animal, seguindo-se a sua anestesia com uma mistura de cetamina e diazepam na proporção 2:1. Uma vez sob efeito anestésico, o pêlo do animal foi removido com uma máquina de barbear. Seguidamente foi aplicado um spray antisséptico sobre a pele e depois com uma caneta dermatográfica marcaram-se dois quadrados com cerca de $2 \times 2 \text{ cm}^2$, com uma distância mínima de 1 cm entre eles, sob a zona dorsal do rato. Nas matrizes binárias e ternária aplicou-se um passo extra, que consistiu na lavagem com água, na zona onde se removeu o pêlo, de modo a diminuir a probabilidade de caírem alguns resíduos de pêlos para dentro da ferida. O passo seguinte consistiu no procedimento cirúrgico, demonstrado e descrito na Figura 4.7.



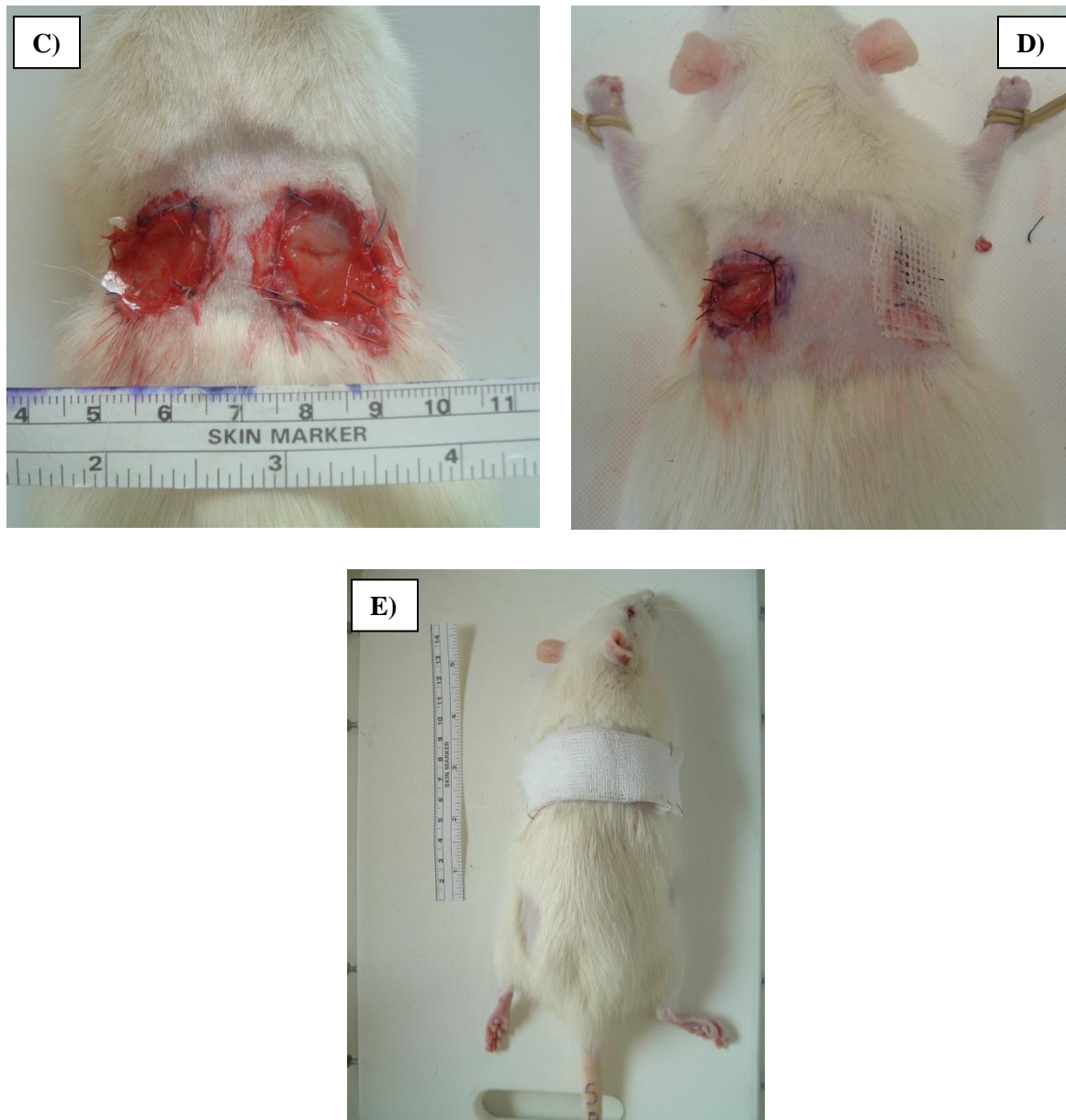


Figura 4. 7 Procedimento cirúrgico.

- A) Desenharam-se no animal com uma caneta dermatográfica as regiões cuja pele total se pretendia retirar.
- B) Procedeu-se à remoção da pele cosendo-se em seguida os bordos da pele ao plano interno para tentar minimizar a contracção da ferida;
- C) Colocaram-se as matrizes sobre as feridas (sempre do mesmo material); apenas se cosia a membrana à pele caso esta não aderisse totalmente à ferida (por ex. o PCL).
- D) Neste exemplo colocou-se uma membrana, à direita, e um controlo, à esquerda.
- E) Fim dos actos cirúrgicos; a ferida é tapada com uma gaze normal e agrafada, apenas para evitar que o rato removeesse as membranas após acordar da anestesia.

Concluídos os actos cirúrgicos, os ratos foram colocados no recobro até à altura de remoção das biópsias. Todos os períodos foram acompanhados por registo fotográfico. O procedimento seguido na remoção da primeira biópsia consistiu em anestésiar novamente o animal, proceder à remoção da biópsia, a qual era cuidadosamente colocada num frasco com formaldeído a 4% tamponado, para posterior análise histológica. A ferida era encerrada, cosendo-se ou agrafando. Estas etapas podem ser visualizadas na Figura 4.8. Finalmente, a remoção da última biópsia coincidia com a eutanásia do animal. O rato era eutanasiado com CO₂ e depois então removida a biópsia. No final, o rato era colocado num saco, onde se indicava o seu código e era colocado num frigorífico para subsequente incineração.

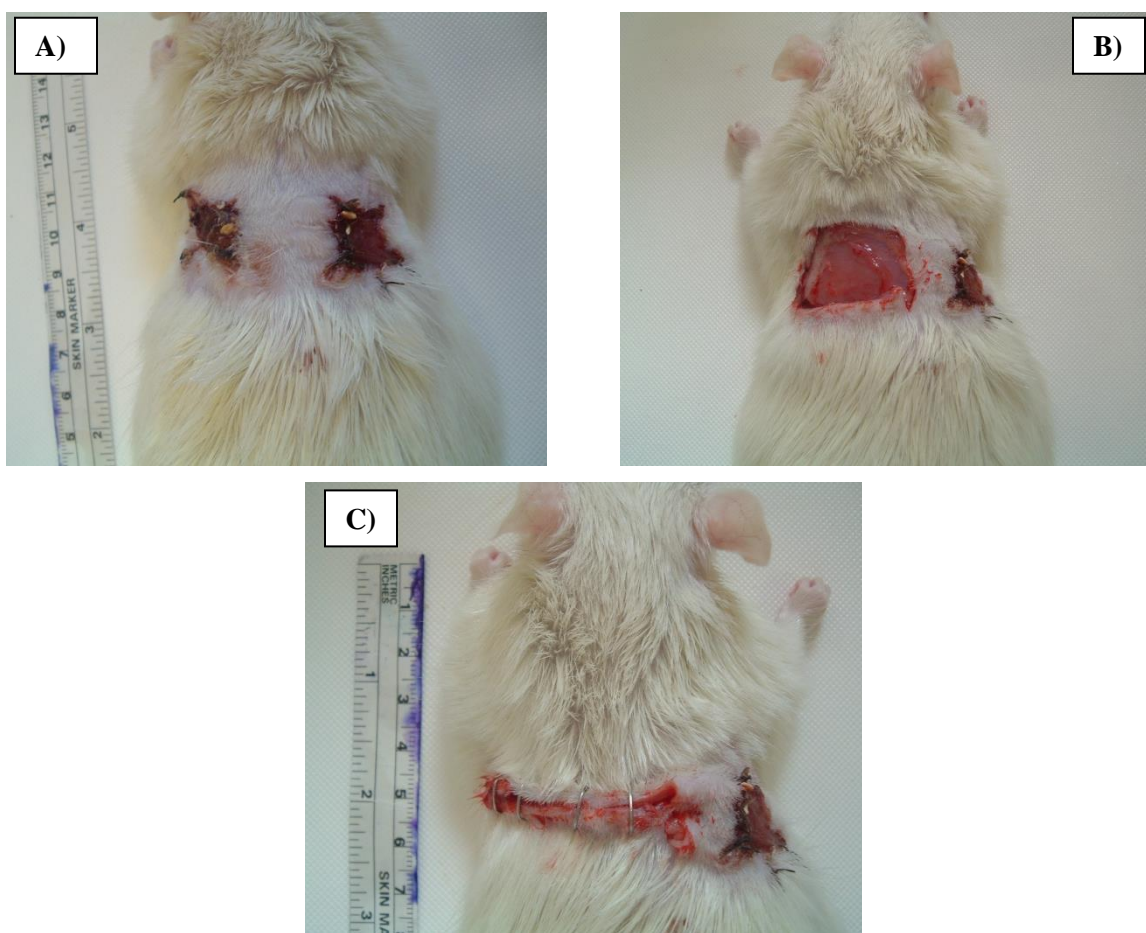


Figura 4.8 Processo de remoção da biópsia.

- A) Aspecto das feridas 7 dias após a cirurgia. Animal anestesiado.
- B) Remoção da primeira biópsia (lado esquerdo).
- C) Encerramento da ferida com agrafos.

4.6.3 Histologia

As biópsias permaneceram em formol tamponado a 4% até ao processamento histológico no Serviço de Anatomia Patológica do Hospital de São José.

O processamento histológico seguiu o protocolo:

- processamento automático no processador de tecidos onde os fragmentos provenientes da macroscopia são sujeitos a uma série de etapas com o objectivo de os desidratar, diafanizar e impregnar com parafina;

- inclusão em parafina em moldes próprios de forma a obter um bloco de parafina contendo os fragmentos processados;

- corte dos blocos de parafina em aparelho próprio (micrótomo de corrediça) a uma espessura de 2 a 4 μm . Estes cortes são colocados em lâminas de vidro depois de esticadas em água quente (cerca de 60 °C). As lâminas de seguida vão para uma estufa a cerca de 80 °C para que os cortes adiram bem à lâmina;

- coloração de hematoxilina-eosina no colorador automático. A hematoxilina, de origem natural, funciona como corante básico e tem atracção por substâncias ácidas que compõem os tecidos, como as proteínas, ricas em radicais amina, como os núcleos e o retículo endoplasmático rugoso e ácidos nucleicos. Já a eosina, corante sintético ácido, é atraída pelos elementos básicos das proteínas do citoplasma das células, fibras de colagénio e outras estruturas compostas de substâncias com carácter básico. A hematoxilina cora em azul-púrpura enquanto a eosina produz uma coloração vermelha, permitindo a detecção de alguma patologia nos tecidos;

- montagem em meio de montagem sintético à base de xilol, em aparelho automático.

4.7 Tratamento Estatístico

Todas as experiências foram efectuadas no mínimo em triplicado e os valores encontram-se apresentados como média \pm desvio padrão, com excepção do número de células em cultura, que foi calculado a partir de uma curva de calibração (Anexo I), as experiências relativas ao grau de inchamento e as taxas de encerramento das feridas infligidas nos animais encontrando-se assim apresentados como média \pm incerteza (incerteza determinada através da lei de propagação das incertezas).

Os diâmetros das fibras foram medidos nas imagens de MEV com o programa de análise de imagem, *ImageJ*.

As imagens adquiridas por microscopia confocal foram também analisadas com o programa *ImageJ*, para contar automaticamente o número de núcleos e determinar a área coberta por células, por campo de imagem, e para permitir a contagem manual do número de células em mitose ou inferir de uma forma qualitativa sobre a abundância de filopodia e *stress fibers*. A área coberta por células, determinada a partir das imagens de microscopia confocal, e a proliferação celular, determinada a partir das curvas de crescimento, foram comparadas usando o teste-t de Student considerando como valores com diferenças estatisticamente significativas aqueles para os quais o parâmetro de comparação verificar a condição $p < 0,05$. O tratamento das imagens em 3D foi efectuado com o programa *Amira v5.3.3*.

A evolução das feridas infligidas nos animais foi acompanhada por registo fotográfico e a sua área determinada com o programa *ImageJ*.

Capítulo 5 – Apresentação e Discussão dos Resultados

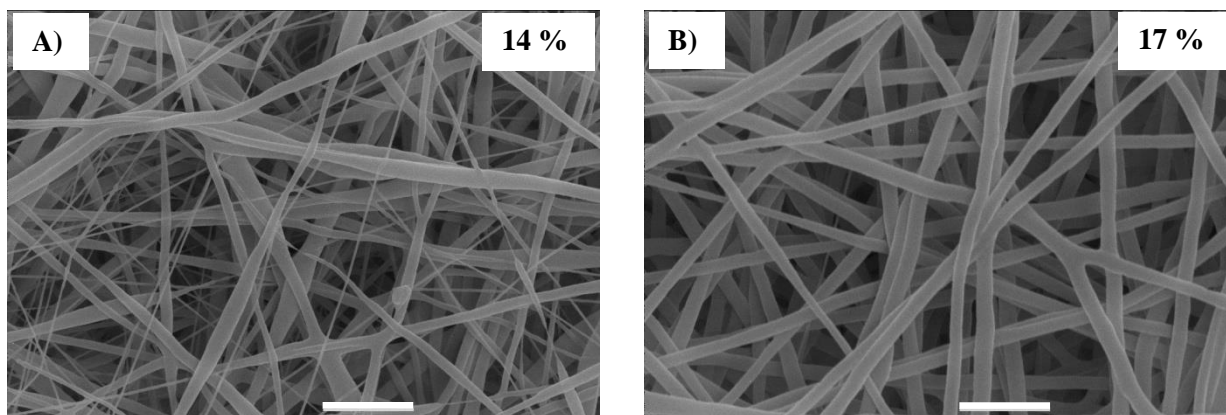
5.1 Matrizes Unitárias

5.1.1 Produção e Caracterização

5.1.1.1 Matrizes de PCL

No início do trabalho experimental aqui reportado, existiam já na literatura inúmeras publicações sobre a electrofiação da PCL a partir de soluções preparadas em solventes orgânicos como clorofórmio, acetona, diclorometano (DCM), tetraidrofurano (TFH), entre outros [99, 140-142]. Porém, apesar do ácido acético ser um dos solventes menos tóxicos da PCL a sua utilização não era conhecida para este tipo de aplicação.

A preparação das matrizes de PCL começou com a realização de um estudo preliminar, utilizando como solvente ácido acético glacial, tendo sido averiguadas as condições de processamento que conduziam à formação de fibras. Verificou-se que soluções contendo entre 5 a 12% (m/m) de PCL não eram electrofiáveis, começando a observar-se deposição de fibras somente a partir de uma concentração de 14% e para uma tensão mínima de 5 kV. Estabelecendo como parâmetros fixos um potencial de 6 kV, uma distância agulha-colector de 10 cm e um caudal de 0,3 ml/h, variou-se a concentração de PCL entre 14 e 26%, de forma a identificar a concentração óptima para a deposição de fibras. A morfologia das fibras depositadas com estas soluções mostra-se na Figura 5.1. Determinaram-se então a viscosidade, tensão superficial e condutividade eléctrica das soluções para analisar de que modo estas propriedades poderiam explicar a evolução da morfologia das fibras com a concentração (Tabela 5.1).



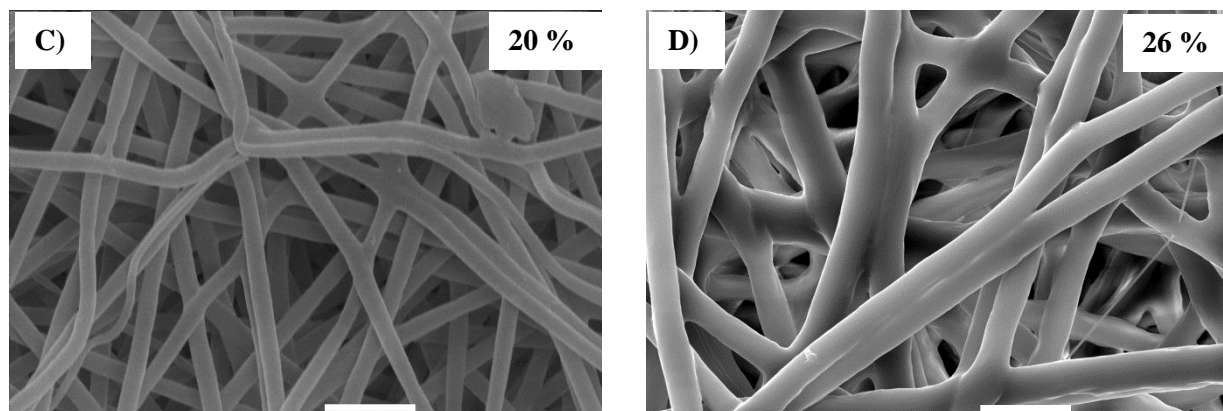


Figura 5. 1 Imagens de MEV de fibras depositadas a partir de soluções preparadas com diferentes concentrações de PCL em ácido acético glacial: a) PCL 14%, b) PCL 17%, c) PCL 20% e d) PCL 26%. (Ampliação $\times 2000$; Barra de escala = 10 μm). As deposições foram efectuadas 1 dia após a preparação das soluções com os parâmetros do processo fixos (ver texto).

Tabela 5. 1 Viscosidade (η), tensão superficial (γ) e condutividade eléctrica (σ) das diferentes soluções de PCL em ácido acético glacial. Dados apresentados como média \pm desvio padrão.

% PCL	η (Pa.s)	γ (mN/m)	σ ($\mu\text{S/cm}$)
14	$7,2 \pm 0,6$	$28,5 \pm 0,5$	$0,067 \pm 0,008$
17	12 ± 1	$28,7 \pm 0,7$	$0,057 \pm 0,007$
20	26 ± 2	$30,6 \pm 0,7$	$0,056 \pm 0,006$
23	61 ± 5	$32,7 \pm 0,4$	$0,058 \pm 0,008$
26	106 ± 15	$33,0 \pm 0,6$	$0,053 \pm 0,007$
AcOH	$0,00153^a$	$28,2 \pm 0,4$	$0,047 \pm 0,008$

^a Valor Tabelado: *Panreac® Analytical Reagents & Fine Chemicals*

De acordo com os valores apresentados na Tabela 4.1 verifica-se que o aumento da concentração da PCL não altera significativamente a condutividade eléctrica e aumenta ligeiramente a tensão superficial. Já a viscosidade é fortemente afectada, aumentando exponencialmente com a concentração e, como tal, com o número de cadeias poliméricas, como consequência do aumento das interações entre estas.

Consequentemente o efeito desta variação reflecte-se no diâmetro médio das fibras depositadas como mostra a Figura 5.2.

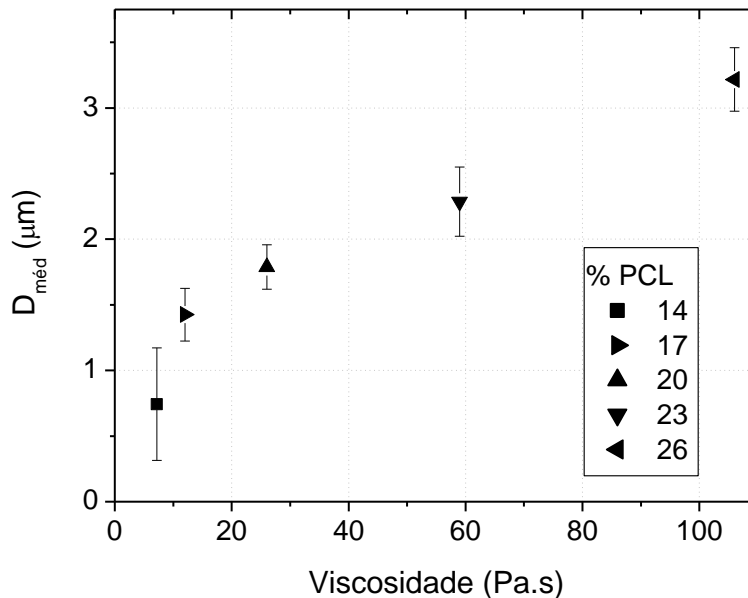


Figura 5. 2 Variação do diâmetro médio das fibras em função da viscosidade e concentração das soluções de PCL. As barras verticais representam o intervalo [média \pm desvio padrão].

Da análise da figura anterior verifica-se que, com os mesmos parâmetros de processamento, a partir de soluções menos viscosas se obtêm fibras mais finas, o que advém da menor viscosidade permitir um maior estiramento das fibras. O efeito da tensão superficial tende a destacar-se no processo na solução preparada com PCL a 14%. Sendo esta solução menos viscosa, estira mais rapidamente, e as forças repulsivas entre cargas diminuem mais depressa. Isto permite que a tensão superficial domine o sistema causando mínimos locais da razão área/volume (as contas) antes do solvente evaporar por completo e as fibras solidificarem. Observa-se ainda que soluções mais viscosas, como a de PCL 26%, originam fibras de diâmetros superiores, apresentando já alguma fusão, consequências de uma forte oposição das forças viscoelásticas ao estiramento do jacto e a uma evaporação mais lenta do solvente, respectivamente. Fibras uniformes obtiveram-se usando concentrações de PCL entre 17 e 23%.

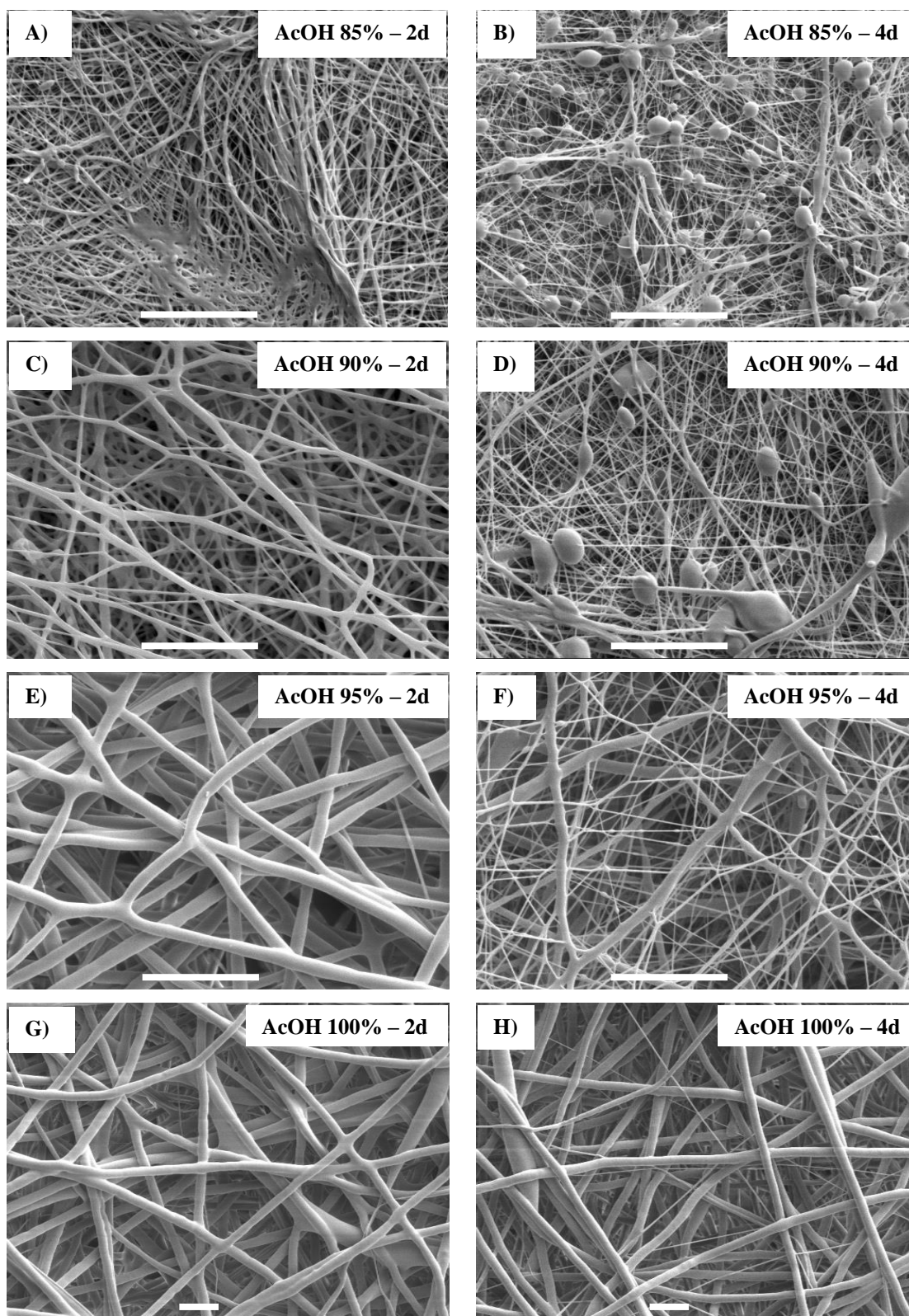
O estudo seguinte consistiu em avaliar o efeito da variação da concentração de ácido acético na morfologia das fibras depositadas. A concentração máxima de água adicionada ao ácido acético, sem que se observasse precipitação do polímero, foi de 15% m/m. Nesse sentido, as soluções foram preparadas usando uma concentração de ácido acético variável entre 85 e 100%.

Nessas condições começou-se por estudar a solução PCL 20%. Contudo os resultados obtidos revelaram-se difíceis de reproduzir dado que a adição de água ao sistema provocou uma rápida degradação da PCL e consequentemente um decréscimo da viscosidade da solução, deixando rapidamente de se

observar a deposição de fibras. Optou-se então pela concentração de 23% para prosseguir o estudo, tendo-se ainda otimizado os parâmetros de electrofiação para estas soluções: 8 kV, 10 cm e 0,3 ml/h (pois assim observou-se uma maior estabilidade do processo). A electrofiação das soluções foi realizada em diferentes dias após a sua preparação com o objectivo de estudar também a influência da idade da solução na morfologia das fibras depositadas. Todas as soluções foram caracterizadas quanto à sua viscosidade, tensão superficial e condutividade eléctrica. Os resultados constam da Tabela 5.2. Na Figura 5.3 apresentam-se imagens das fibras depositadas em função do tempo das soluções.

Tabela 5. 2 Viscosidade (η), tensão superficial (γ) e condutividade eléctrica (σ) das soluções de PCL a 23% em diferentes concentrações de ácido acético. Estas propriedades foram medidas em função da idade da solução. Valores apresentados como média \pm desvio padrão.

Idade da solução (dias)	% AcOH	η (Pa.s)	γ (mN/m)	σ (μ S/cm)
1		$1,2 \pm 0,2$	$32,9 \pm 0,4$	$5,5 \pm 0,6$
2	85	$0,5 \pm 0,2$	$33,5 \pm 0,3$	$5,6 \pm 0,6$
4		$0,24 \pm 0,03$	$32,0 \pm 0,3$	$5,8 \pm 0,6$
1		$2,2 \pm 0,3$	$33,7 \pm 0,4$	$1,9 \pm 0,2$
2	90	$1,2 \pm 0,2$	$34,2 \pm 0,4$	$1,9 \pm 0,2$
4		$0,6 \pm 0,1$	$32,0 \pm 0,3$	$2,0 \pm 0,2$
1		$7,8 \pm 0,8$	$33,2 \pm 0,4$	$0,49 \pm 0,05$
2	95	$4,6 \pm 0,5$	$32,6 \pm 0,3$	$0,50 \pm 0,05$
4		$2,9 \pm 0,2$	$32,5 \pm 0,4$	$0,53 \pm 0,06$
1		61 ± 5	$32,7 \pm 0,4$	$0,058 \pm 0,008$
2		42 ± 4	$32,6 \pm 0,5$	$0,057 \pm 0,006$
4	100	27 ± 4	$31,8 \pm 0,7$	$0,059 \pm 0,007$
9		11 ± 1	$32,1 \pm 0,5$	$0,063 \pm 0,007$
13		$5,9 \pm 0,8$	$31,8 \pm 0,4$	$0,061 \pm 0,006$



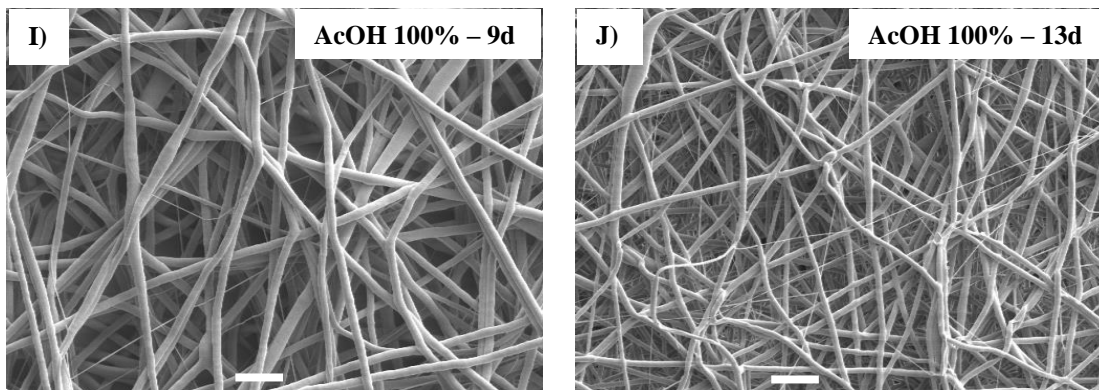


Figura 5.3 Imagens de MEV das fibras depositadas, com os mesmos parâmetros experimentais, a partir de soluções de PCL a 23%, com 2 e 4 dias, preparadas em: AcOH 85% (a, b); AcOH 90% (c, d); AcOH 95% (e, f) e AcOH 100% (g, h). Em i) e j) imagens das fibras depositadas com a solução em AcOH 100% com 9 e 13 dias, respectivamente. (Ampliação $\times 3000$ excepto nas imagens g) à j) onde a ampliação é $\times 1000$; Barra de escala = $10\ \mu\text{m}$).

Na Figura 5.4 mostra-se a variação do diâmetro médio das fibras com o tempo de vida das soluções. Não são apresentados valores relativos à deposição obtida com a solução de AcOH a 85% dada a presença de contos e defeitos que fazem com que as fibras possuam diâmetros muito variáveis ao longo do seu comprimento. Com a solução de AcOH a 100% observou-se deposição de fibras até ao 13º dia, limite a partir do qual começam a surgir fibras com defeitos.

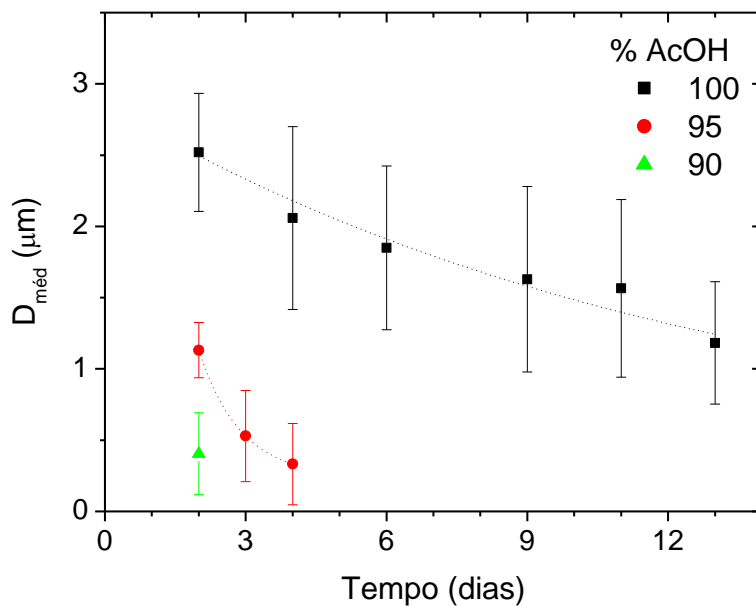


Figura 5.4 Variação do diâmetro médio das fibras em função da idade das soluções de PCL 23% em diferentes concentrações de ácido acético. As barras verticais representam o intervalo [média \pm desvio padrão].

Como se observa nas Figuras 5.3 e 5.4 o solvente usado e a idade das soluções têm impacto sobre a morfologia das fibras depositadas.

Relativamente ao efeito do solvente conclui-se que a adição de água ao ácido acético:

- não afecta significativamente a tensão superficial das soluções;
- aumenta a condutividade eléctrica das soluções, resultado de um aumento do número de iões em solução;
- reduz acentuadamente a viscosidade das soluções pois vai contribuir para uma menor interacção entre as cadeias poliméricas devido por um lado à ionização do ácido (a PCL não tem afinidade com carga) e por outro lado via efeito hidrofóbico (repulsão da água que se deve concentrar entre as cadeias poliméricas);
- o diâmetro médio das fibras obtidas diminui. Por exemplo, ao 2º dia observa-se uma variação de 2,5 µm para 0,4 µm quando a concentração de AcOH diminui de 100% para 85%. Esta redução significativa é inerente não só à diminuição da viscosidade mas também ao facto de aumentar a repulsão electrostática (e, conseqüentemente, do estiramento das fibras) devido ao aumento da condutividade.

No que diz respeito ao impacto da idade da solução, constata-se que a viscosidade das soluções diminui com o tempo enquanto as propriedades condutividade e tensão superficial não variam significativamente. Novamente, a viscosidade desempenha um papel fundamental no que diz respeito ao decréscimo observado no diâmetro médio das fibras à medida que as soluções envelhecem, desta feita devido a uma contínua degradação da PCL. No caso da solução preparada em AcOH 100%, ocorre uma ampla distribuição dos diâmetros. Isto contribui para uma grande dispersão em torno do valor médio fazendo com que os intervalos dos diâmetros das fibras para os vários tempos de observação se intersectem como se pode observar na Figura 5.4. Apenas a diferença entre os valores obtidos ao 2º dia da solução (2,5 µm) e ao 13º dia (1,2 µm) é estatisticamente significativa ($p < 0,01$).

O aparecimento de fibras com defeitos também aumenta à medida que a viscosidade diminui, sobretudo para valores próximos de 1 Pa·s.

As matrizes seleccionadas foram caracterizadas quanto ao ângulo de contacto e propriedades mecânicas, encontrando-se os resultados na Tabela 5.3.

Tabela 5. 3 Ângulo de contacto (θ) e propriedades mecânicas (módulo de Young (E), tensão (σ_R) e deformação (ε_R) de ruptura) determinados para as matrizes depositadas a partir de soluções de PCL a 23% em diferentes concentrações de ácido acético. Valores apresentados como média \pm desvio padrão.

Tempo (dias)	% AcOH	θ (°)	E (MPa)	σ_R (MPa)	ε_R (%)
2	90	141 \pm 3	8,6 \pm 1,4	4,3 \pm 0,3	88 \pm 5
4		140 \pm 3	4,0 \pm 0,8	1,8 \pm 0,2	59 \pm 4
2	95	134 \pm 2	5,4 \pm 0,8	*	> 500
4		140 \pm 3	4,3 \pm 1,3	1,5 \pm 0,2	80 \pm 8
2	100	125 \pm 2	4,7 \pm 0,7	*	> 500
4		136 \pm 2	6,9 \pm 1,4	*	> 500
9		130 \pm 3	5,2 \pm 1,1	*	> 500
13		132 \pm 2	5,6 \pm 1,1	*	> 500

* As matrizes não partiram no percurso do aparelho.

Conforme se verifica na Tabela 5.3 o carácter hidrofóbico característico da PCL mantém-se, independentemente da concentração de ácido acético usada ou do tempo da solução. Embora nas medidas efectuadas ao 2º dia se observe um ligeiro aumento do ângulo de contacto com o teor de água, seria necessária uma maior estatística para reforçar a ideia desta tendência.

No que diz respeito às propriedades mecânicas, observa-se uma diminuição dos valores do módulo de Young, tensão e deformação máximas, com a idade da solução, nas matrizes preparadas com AcOH 90% e 95%. Relativamente à matriz preparada em AcOH 100% os valores associados às propriedades mecânicas não são significativamente diferentes. Como se verifica nas Figuras 5.3 e 5.4 a adição de água ao ácido acético resulta na deposição de fibras com diâmetros médios menores e acelera o aparecimento de contos e defeitos, que contribuem para um enfraquecimento da estrutura das matrizes. No caso da matriz preparada em AcOH 100%, a ausência de água leva a um enfraquecimento da estrutura mais lento não sendo por isso detectadas alterações destas propriedades no período e condições testadas.

O estudo realizado com as soluções de PCL com diferentes concentrações do polímero, de ácido acético e idade permitiu relacionar estas diferenças com algumas características importantes das deposições obtidas. As principais conclusões enumeram-se seguidamente:

- diâmetro médio: além de poder ser ajustado por optimização das condições de electrofiação, observou-se que o diâmetro médio das fibras pode ser ajustado variando a concentração de polímero, o

teor de água no solvente ou deixando envelhecer as soluções. Com qualquer uma das estratégias é possível diminuir o diâmetro para valores inferiores a 1 μm , embora a formação de nanofibras seja conseguida de uma forma mais eficaz adicionando água ao sistema. Com esta última metodologia, que tem como desvantagem a rápida degradação do polímero, conseguiram-se diâmetros médios da ordem dos 400 nm. Resultados da mesma ordem de grandeza são encontrados na literatura utilizando solventes mais tóxicos. Como exemplo, encontra-se reportada a formação de diâmetros na gama de (630 ± 40) nm com uma solução de PCL a 15% em clorofórmio/metanol (75:25 v/v) [143], ou diâmetros no intervalo (431 ± 118) nm com uma solução de PCL dissolvido em hexafluoro-2-propanol (HFIP) [144];

- hidrofobicidade: as matrizes produzidas apresentam carácter hidrofóbico com ângulos de contacto que variam entre 125 e 140 °, ligeiramente superiores aos reportados para matrizes electrofiadas a partir de outros solventes. Por exemplo, foi encontrado na literatura um ângulo de 118 ± 6 ° para matrizes electrofiadas a partir de soluções que utilizam o HFIP ou o sistema clorofórmio/metanol [143, 144]; e de 109 ° para matrizes electrofiadas a partir de soluções de trifluoretanol (TFE) [145];

- propriedades mecânicas: o módulo de Young das matrizes preparadas nestas condições variou entre 4 e 8 MPa. Conseguiram-se deformações superiores a 500% sem ruptura mas este valor é reduzido substancialmente (abaixo dos 100%) com a hidrólise ácida da PCL. Alguns valores típicos indicados na literatura são: $E = 35,4$ MPa e $\epsilon_R = 145\%$ usando o sistema clorofórmio/metanol [143] e $E = 4,98$ MPa usando TFE [145].

A fase seguinte consistiu em considerar deposições efectuadas a partir de soluções de AcOH a 90 e 100%, para posteriormente ser seleccionada a matriz de PCL para efectuar o estudo comparativo de resposta celular a vários materiais. Os parâmetros de electrofiação foram novamente ajustados com o intuito de reduzir um pouco mais o diâmetro médio das fibras. Nesse sentido procedeu-se a um aumento da distância entre agulha e colector e da tensão aplicada. Os novos parâmetros que resultaram deste ajuste foram: 12 kV, 25 cm e 0,3 ml/h. As deposições foram efectuadas ao 2º dia após a preparação das soluções. As matrizes foram novamente caracterizadas quanto ao diâmetro médio das fibras, ângulo de contacto e propriedades mecânicas e neste caso foi também calculada a porosidade. Os resultados apresentam-se na Tabela 5.4.

Tabela 5. 4 Diâmetro médio das fibras, ângulo de contacto, porosidade e propriedades mecânicas das matrizes de PCL em AcOH a 90 e 100%, depositadas ao 2º dia da solução com 12 kV, 25 cm e 0,3 ml/h. Valores apresentados como média \pm desvio padrão.

% AcOH	$D_{méd}$ (nm)	θ (°)	Porosidade (%)	E (MPa)	σ_R (MPa)	ϵ_R (%)
90	377 \pm 277	132 \pm 4	88 \pm 2	7,1 \pm 0,5	3,2 \pm 0,5	81 \pm 12
100	1833 \pm 369	124 \pm 3	85 \pm 2	6,7 \pm 0,4	2,3 \pm 0,1	587 \pm 162

Os resultados da Tabela 5.4 revelam que não existem diferenças significativas nas propriedades avaliadas das nanofibras de PCL em função da concentração de ácido acético, excepto no diâmetro médio das fibras e na deformação à ruptura.

A estabilidade das matrizes após imersão em meio de cultura (MC) durante 3 dias foi também avaliada como mostra a Figura 5.5.

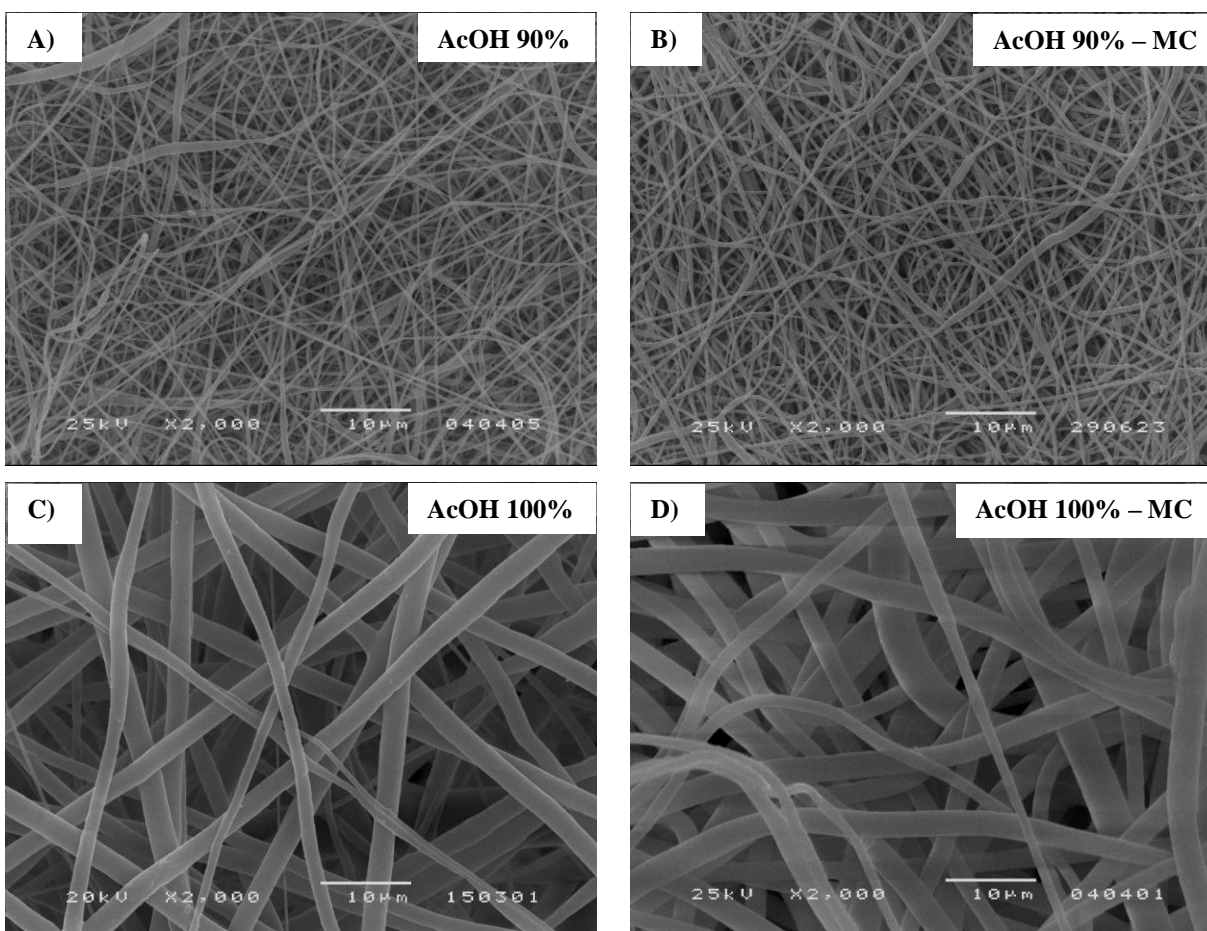


Figura 5. 5 Imagens de MEV das fibras depositadas a partir das soluções de PCL 23% em AcOH 90% após a) electrofiação e b) meio de cultura durante 3 dias e em AcOH 100% após c) electrofiação e d) meio de cultura durante 3 dias (Ampliação \times 2000; Barra de escala = 10 μ m).

Como se observa pela figura anterior, a morfologia das fibras não se altera após imersão em meio de cultura. Sendo a PCL um polímero hidrofóbico este resultado era expectável.

Com o intuito de inferir sobre alguma alteração da estrutura química da PCL causada pela imersão no meio de cultura as matrizes foram analisadas por espectroscopia de infravermelho com reflexão total atenuada (FTIR-ATR). A Figura 5.6 mostra os espectros da matriz de PCL depositada com a solução de AcOH 100%, sendo estes representativos do que foi obtido com a de AcOH 90%.

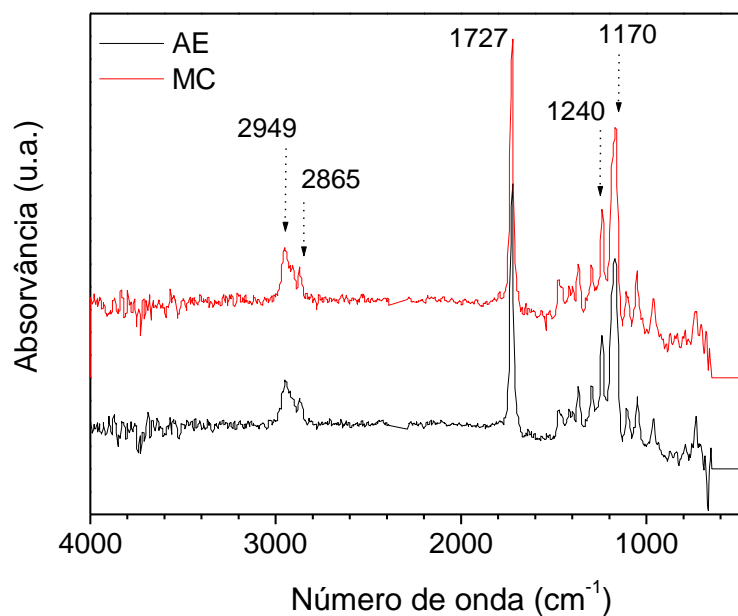


Figura 5. 6 Espectros de FTIR-ATR das fibras de PCL após electrofiação (AE) e após imersão em meio de cultura.

Ambos os espectros, após electrofiação e após imersão em MC, apresentam bandas idênticas que correspondem às frequências de vibração características dos grupos funcionais constituintes da PCL.

Na Tabela 5.5 encontram-se resumidas as principais bandas de absorção do espectro de FTIR da PCL.

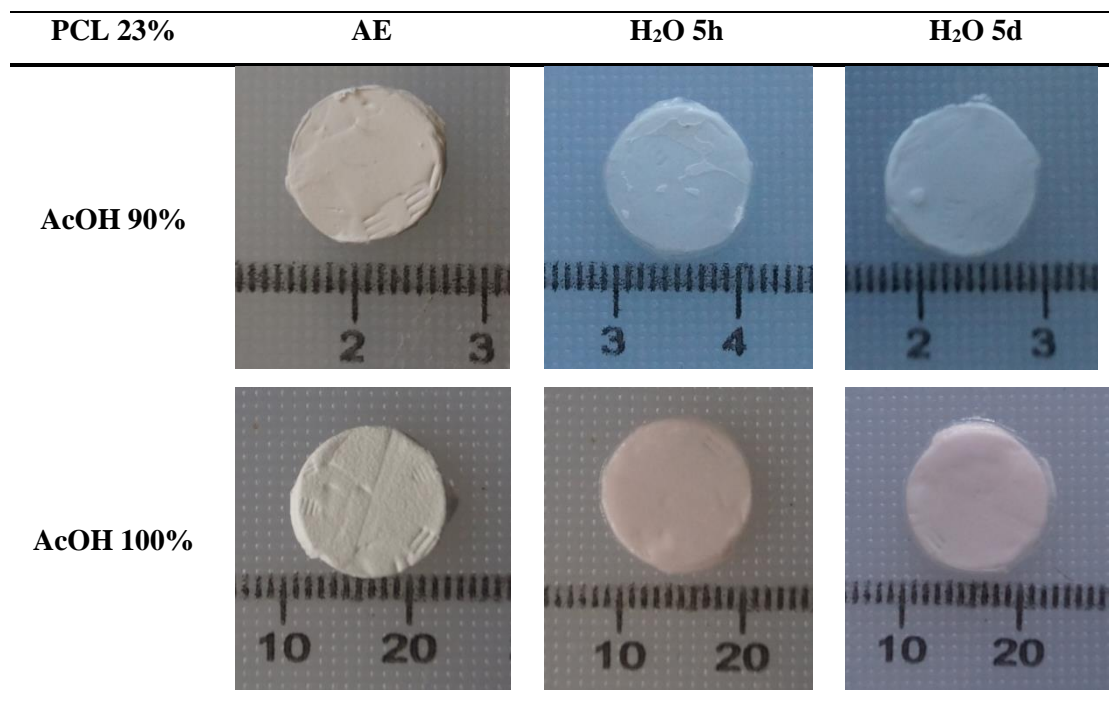
Tabela 5. 5 Principais bandas de absorção no IV da PCL [20, 144].

Bandas de absorção (cm ⁻¹)	Vibração Molecular / Ligação
2949	Estiramento assimétrico do grupo CH ₂
2865	Estiramento simétrico do grupo CH ₂
1727	Estiramento da ligação C=O do grupo éster
1293	Estiramento das ligações C-O e C-C
1240	Estiramento assimétrico da ligação C-O-C
1170	Estiramento simétrico da ligação C-O-C

Da observação da Figura 5.6 verifica-se não só a presença de todas as bandas características da PCL em ambos os espectros, como também não se registam diferenças significativas em termos das suas intensidades, permitindo deste modo confirmar que a imersão em meio de cultura não afecta a estrutura química do polímero.

A caracterização das matrizes de PCL 23% em AcOH 90 e 100% finalizou com um último ensaio relativo ao seu grau de inchamento em água. A Tabela 5.6 apresenta algumas imagens representativas destas matrizes após electrofiação (AE) e após imersão em água durante 5 h (H₂O 5h) e 5 dias (H₂O 5d).

Tabela 5. 6 Matrizes de PCL 23% em AcOH 90 e 100%, após electrofiação (AE) e após água durante 5 h (H₂O 5h) e 5 dias (H₂O 5d).



Conforme se observa, não ocorre alteração da área das matrizes devido à imersão em água, resultado da pouca afinidade deste polímero com a água.

5.1.1.2 Matrizes de CS

O quitosano (CS) é facilmente dissolvido em soluções aquosas ácidas devido à protonação dos grupos amina presentes nos grupos glucosamina. Porém, as soluções formadas frequentemente apresentam valores de condutividade eléctrica e densidades de carga elevados limitando assim a sua electrofiação. Para além disso, as soluções de CS são, ainda que para baixas concentrações do polímero, muito viscosas. Portanto, quando conseguida, a literatura geralmente refere a formação de fibras de CS usando o ácido trifluoroacético (TFA) [146], todavia este possui a desvantagem de ser um solvente perigoso e tóxico.

Um dos objectivos do presente trabalho foi a obtenção de matrizes dérmicas por electrofiação de soluções de CS em ácido acético concentrado. Foi encontrada bibliografia mencionando algum trabalho nesse sentido o que contribuiu para estabelecer alguns parâmetros iniciais de referência a usar neste estudo. Por exemplo, Geng *et al.* [147] descreveram a formação de nanofibras uniformes (*ca.* de 130 nm) usando soluções de CS a 7-7,5% em AcOH 90%. O peso molecular médio do CS foi apontado como um factor fundamental para a formação de fibras (apenas foi conseguido para $M_w = 106$ kDa). Já De Vrieze *et al.* [148] referem a formação de nanofibras uniformes (50-100 nm) com soluções de CS entre 2 a 4% ($M_w = 190$ a 310 kDa) em AcOH 90% usando como parâmetros de electrofiação 20 kV, 10 cm e 0,3 ml/h.

A produção de matrizes de CS começou então pela tentativa de reprodução de algumas das deposições descritas nos estudos acima referidos. Estabeleceu-se como solvente AcOH 90% e variou-se a concentração de CS desde 2 a 6% m/m. Porém, as soluções revelaram não ser electrofiáveis tal como aconteceu com outros autores que também mencionaram a irreprodutibilidade dos resultados [102, 103, 149, 150].

A introdução de polímeros sintéticos, como o PEO, no sistema é referida como uma solução que torna possível a electrofiação do CS. A formação de pontes de H entre os grupos éter do PEO e os grupos OH do quitosano diminui a repulsão entre as moléculas carregadas positivamente do CS, possibilita o entrelaçamento das cadeias poliméricas e torna possível a electrofiação destas misturas [102, 103, 149, 150]. O estudo realizado por Zhang *et al.* [105] refere que, embora a presença de PEO seja importante para permitir a electrofiação das soluções de CS, é necessário reduzir o seu conteúdo atendendo a que este polímero é solúvel em água, o que pode alterar significativamente a estrutura das matrizes após imersão em meios aquosos. Geralmente são utilizados teores de PEO entre 10 a 60% da concentração de polímero total. Estes autores conseguiram electrofiar nanofibras de CS com uma concentração de PEO de elevado peso molecular (> 5 MDa) inferior a 5%. Deste modo, escolheu-se para este trabalho um peso molecular médio do PEO de 8 MDa.

As soluções foram preparadas tomando como referência o trabalho de Zhang *et al.* [105] onde tipicamente foi utilizada uma concentração total de polímero de 3%. No caso particular deste trabalho, considerou-se uma concentração de CS de 2% e variou-se a concentração de PEO entre 0,05 e 0,5%, tendo as soluções sido depositadas com os seguintes parâmetros de processamento: 10 kV, 20 cm e 0,2 ml/h. Esta condição de electrofiação resultou de um estudo prévio efectuado para estabelecer uma gama de trabalho adequada. As imagens correspondentes às fibras depositadas com estas soluções mostram-se na Figura 5.7. As propriedades das soluções e o diâmetro médio das fibras foram medidas e apresentam-se na Tabela 5.7.

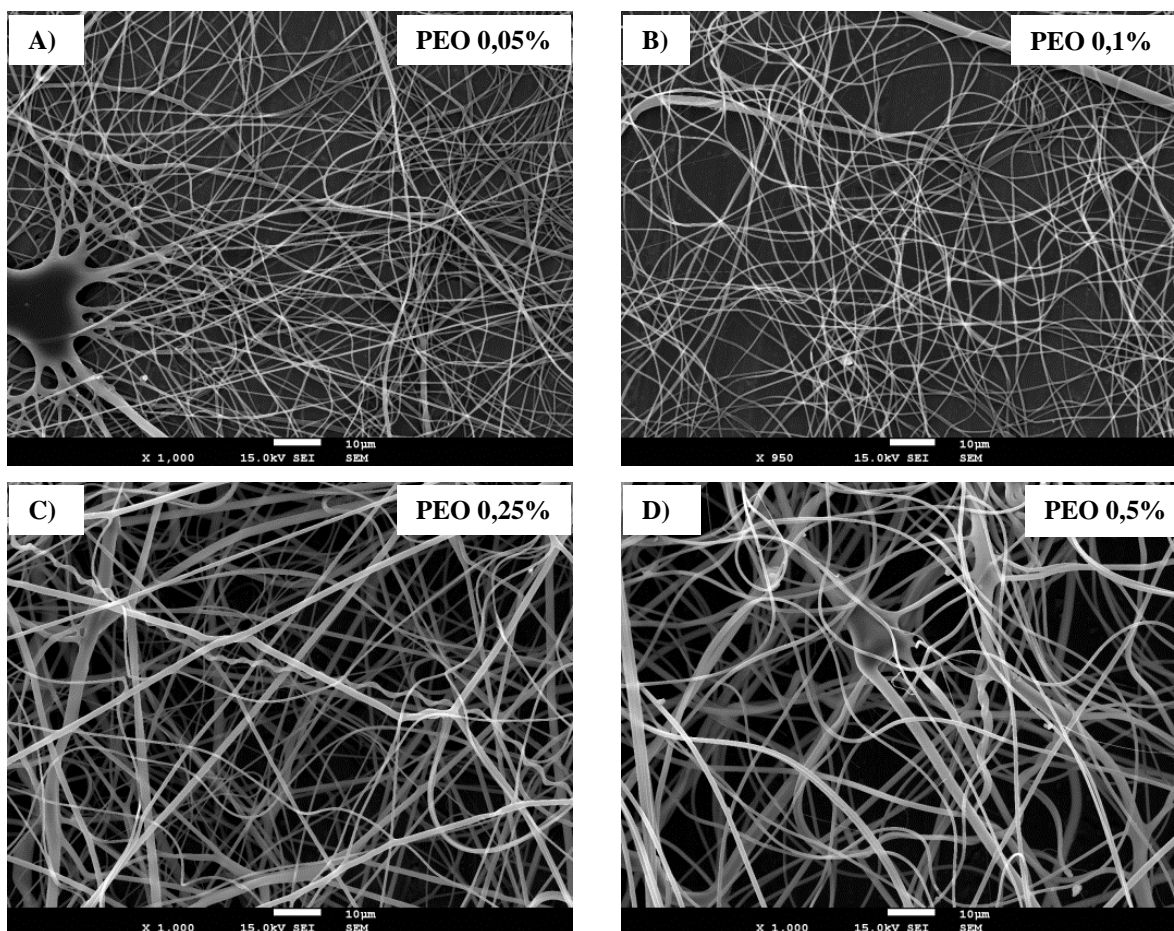


Figura 5. 7 Imagens de MEV das fibras depositadas com as soluções de CS 2% e diferentes concentrações de PEO (Ampliação $\times 1000$; Barra de escala = 10 μm). Deposições efectuadas 1 dia após a preparação da solução.

Tabela 5. 7 Viscosidade (η), tensão superficial (γ) e condutividade eléctrica (σ) das soluções de CS/PEO (CS 2% e diferentes concentrações de PEO). A primeira coluna indica a razão entre as massas de CS e PEO e a última o diâmetro médio das fibras depositadas. Valores apresentados como média \pm desvio padrão.

CS/PEO	% PEO	η^a (Pa.s)	γ (mN/m)	σ (μ S/cm)	$D_{méd}$ (nm)
100/0	0	3,76	33,1 \pm 0,6	187 \pm 2	-
98/2	0,05	4,86	32,4 \pm 0,7	189 \pm 3	439 \pm 111
95/5	0,1	5,90	33,1 \pm 0,9	191 \pm 4	455 \pm 60
89/11	0,25	7,63	31,5 \pm 0,4	194 \pm 3	853 \pm 350
80/20	0,5	25,34	32,7 \pm 0,5	195 \pm 8	1239 \pm 460
Solvente	90% AcOH	0,002386 ^b	29,1 \pm 0,3	14 \pm 1	-

^a Valores extraídos das curvas de fluxo para uma taxa de corte de 0,5 s⁻¹.

^b Valor tabelado: *Handbook of Chemistry and Physics, David R. Lide, 85th Edition, 2004-2005.*

De acordo com a Tabela 5.7 os valores médios da condutividade eléctrica das soluções preparadas apresentam uma tendência para aumentar com o aumento da concentração de PEO, ainda que esta tendência não corresponda a valores com diferenças estatísticas significativas. No que diz respeito à tensão superficial das soluções verifica-se que esta se mantém com a adição de PEO. Já o aumento da concentração total de polímero aumenta a viscosidade das soluções. Consequentemente observa-se um aumento do diâmetro médio das fibras, por um factor de três, ao aumentar o teor em PEO de 0,05 para 0,5%. Comparando com o trabalho de outros autores que utilizaram AcOH como solvente verifica-se que as fibras depositadas neste estudo são mais espessas. Foram obtidos valores superiores a 400 nm enquanto na bibliografia estão reportados valores inferiores a 200 nm, porém as condições experimentais utilizadas são diferentes. Por exemplo, esses valores foram obtidos em matrizes depositadas a partir de soluções de CS 1,2% PEO 0,4% em AcOH 90% (CS $M_v = 1400$ kDa e PEO $M = 900$ kDa) [103]; a partir de soluções de CS/PEO (CS $M = 148$ kDa e PEO $M = 900$ kDa), usando uma concentração total de polímero entre 2,5% e 4% e vários rácios CS/PEO, preparadas em AcOH entre 30 a 45% [149] ou a partir de soluções de 6% CS/PEO (1:1, m/m) em AcOH 2% (CS $M_v = 654$ kDa e PEO com pesos moleculares médios entre 600 kDa e 4 MDa) [150].

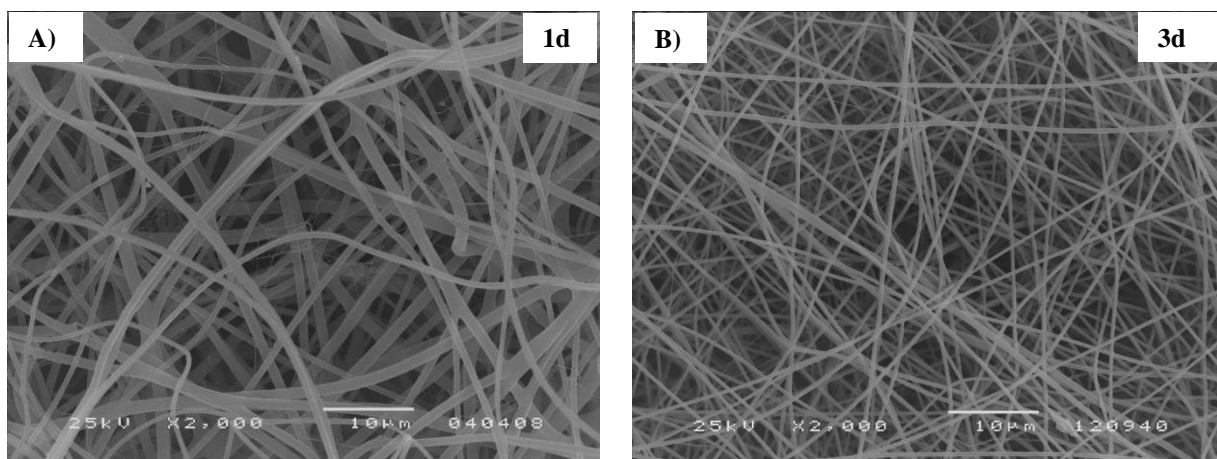
Para além do diâmetro médio das fibras aumentar com o conteúdo de PEO, a presença simultânea de nanofibras e microfibras tende também a aumentar, o que foi igualmente relatado por Duan *et al.* [150] e justificado como devido a uma separação de fases entre o CS e o PEO durante o processo de electrofiação.

Nas deposições efectuadas foi observado ainda a presença de várias projecções para a menor concentração de PEO, conforme exemplifica a Figura 5.7 a), que tende a desaparecer com o aumento da quantidade de PEO. Este fenómeno pode estar associado a um número reduzido de entrelaçamentos das cadeias poliméricas durante a evaporação do solvente. A situação pode conduzir assim a uma distribuição não homogénea da densidade de cargas ao longo do jacto, explicando a sua “explosão” e deposição em forma de defeito. Um aumento da concentração de polímero resulta num aumento do número de entrelaçamentos e a formação de uma estrutura pré-fibra mais forte.

Mediante os resultados obtidos, a deposição com a solução CS 2% PEO 0,25% foi a escolhida para prosseguir o estudo devido ao facto de se pretender uma deposição sem projecções e que garantisse o menor diâmetro das fibras, o que acontece nas matrizes obtidas com as soluções contendo PEO a 0,25%. As matrizes preparadas com esta solução possuem uma concentração de PEO de 11%.

A etapa seguinte consistiu na caracterização da matriz escolhida. No entanto, o seu estudo coincidiu com uma mudança de lote de CS. Desta forma as propriedades da solução foram novamente medidas tendo-se obtido valores semelhantes de tensão superficial e viscosidade. Apenas o valor da condutividade eléctrica se mostrou ligeiramente superior, nomeadamente, $(258 \pm 3) \mu\text{S}/\text{cm}$ em vez de $(194 \pm 3) \mu\text{S}/\text{cm}$, provavelmente devido a uma variação no grau de desacetilação. Os parâmetros de electrofição para esta nova solução foram optimizados com o intuito de garantir uma matriz sem projecções e com diâmetros das fibras semelhantes, tendo sido escolhidos os parâmetros 18 kV, 25 cm e 0,3 ml/h.

A variação da morfologia das fibras com a idade da solução foi analisada e apresenta-se na Figura 5.8.



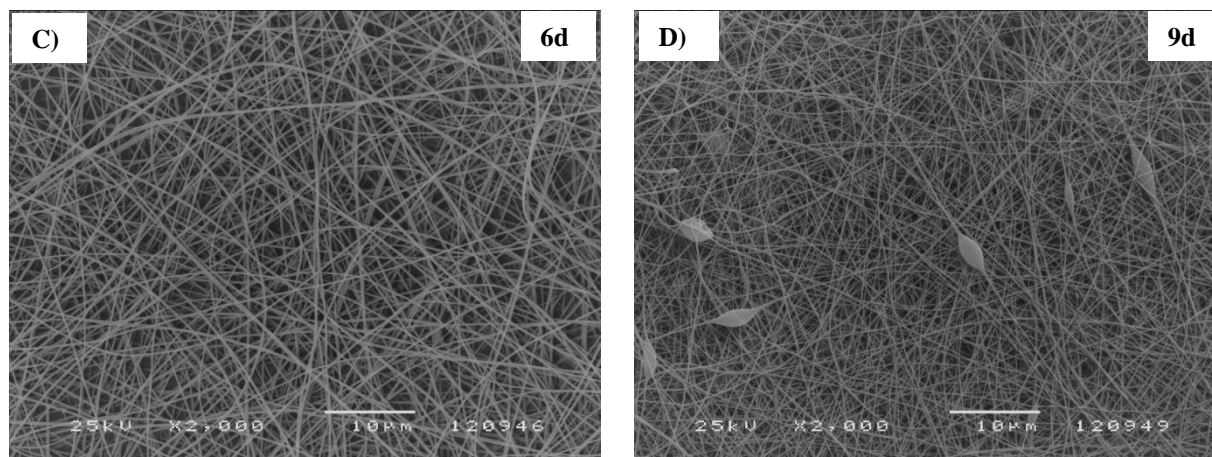


Figura 5.8 Imagens de MEV das fibras depositadas com a solução CS 2% PEO 0,25% em AcOH 90% com a) 1 dia, b) 3 dias, c) 6 dias e d) 9 dias. (Ampliação $\times 2000$; Barra de escala = 10 μm).

Na Figura 5.9 mostra-se a variação dos diâmetros médios das fibras depositadas.

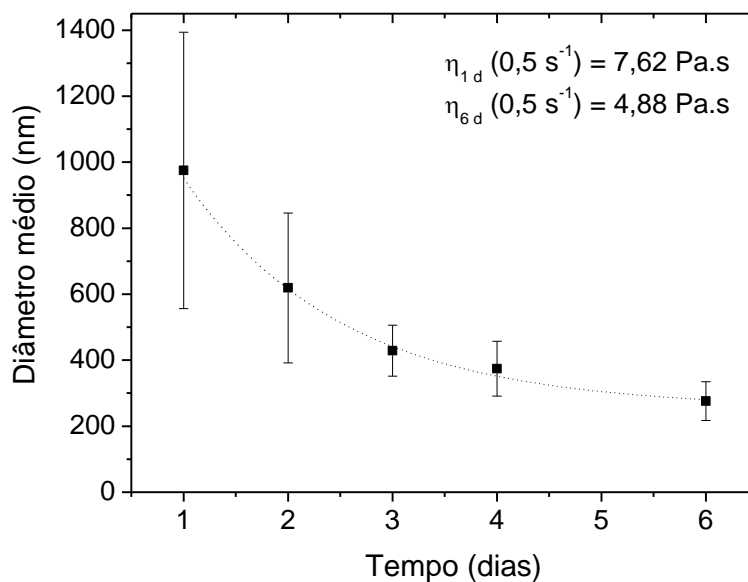


Figura 5.9 Variação do diâmetro médio das fibras em função da idade da solução de CS 2% PEO 0,25% em AcOH 90%. No gráfico encontram-se os valores da viscosidade da solução ao 1º e 6º dia. As barras verticais representam o intervalo [média \pm desvio padrão].

Da observação da Figura 5.8 verifica-se que no geral, as fibras não apresentam defeitos. São mais espessas e exibem uma ampla distribuição de diâmetros quando depositadas ao 1º dia da solução (975 ± 419 nm), mas rapidamente evoluem para valores inferiores a 400 nm e tornam-se bastante mais uniformes. Esta redução nos diâmetros pode ser explicada por uma diminuição da viscosidade resultante de uma degradação das cadeias poliméricas, nomeadamente a quebra das ligações glicosídicas entre as várias

unidades estruturais. O aparecimento de contas ocorre a partir do 9º dia da solução. Estes resultados permitem concluir que é possível com um bom ajuste dos parâmetros de electrofiação, em particular com o tempo de vida da solução, diminuir o valor do diâmetro médio. Com o intuito de uniformizar o trabalho a desenvolver (estabelecendo a mesma idade para todas as soluções) optou-se por escolher o 2º dia desta solução ($D_{med} = 619 \pm 227$ nm) para efectuar as deposições e caracterizar a matriz de CS.

Tal como já foi mencionado o PEO é um polímero com uma grande solubilidade em água e portanto a estabilidade da matriz em solução aquosa foi avaliada. A matriz foi colocada em meio de cultura durante 3 dias e o resultado comparativo das morfologias encontra-se na Figura 5.10.

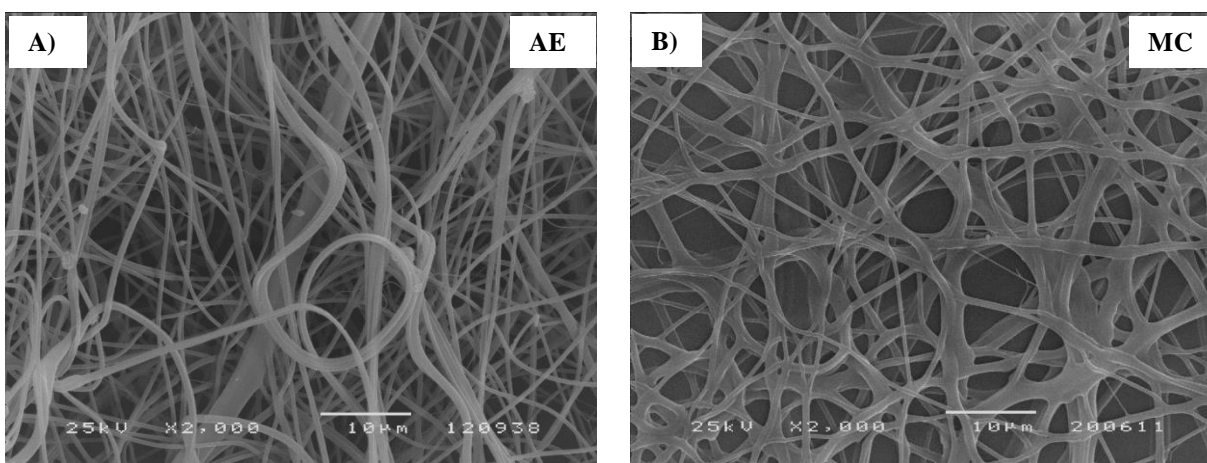


Figura 5. 10 Imagens de MEV de fibras depositadas com a solução CS 2% PEO 0,25% em AcOH 90% após a) electrofiação (AE) e b) meio de cultura (MC) durante 3 dias. (Ampliação $\times 2000$; Barra de escala = 10 μm).

Como se observa da figura anterior, a morfologia das fibras após imersão em meio de cultura altera-se ligeiramente, apresentando alguns sinais de fusão, embora a estrutura porosa se mantenha. Bhattarai *et al.*[102] efectuaram um estudo semelhante, onde referiram que a estrutura das nanofibras de CS/PEO produzidas com uma razão de 90:10 em 0,5M de AcOH (para uma percentagem de polímero total de *ca.* de 2,1%) se mantinha sem alterações significativas até 4 semanas de imersão em água.

Para avaliar eventuais alterações em termos de estrutura química, as matrizes foram analisadas por FTIR-ATR. A Figura 5.11 mostra os espectros da matriz de CS/PEO assim como de uma matriz de PEO 2% em AcOH 90% depositada previamente (8 kV, 20 cm e 0,3 ml/h) para comparação.

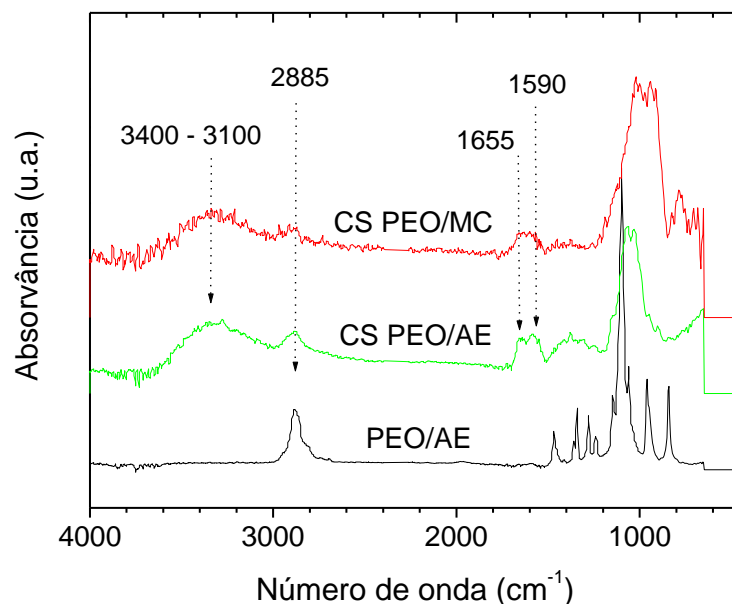


Figura 5. 11 Espectros de FTIR-ATR das fibras de CS 2% PEO 0,25% após electrofiação (AE) e após imersão em meio de cultura (MC). Para comparação apresenta-se o espectro representativo da matriz de PEO 2%.

Na Tabela 5.8 encontram-se resumidas as principais bandas de absorção dos espectros do CS e PEO.

Tabela 5. 8 Principais bandas de absorção no IV do CS e PEO [151, 152].

Polímero	Bandas de absorção (cm ⁻¹)	Vibração Molecular / Ligação
CS	3400 – 3100	Estiramento das ligações N-H e O-H
	2922	Estiramento assimétrico CH ₂ do grupo CH ₂ OH
	2880	Estiramento C-H
	1655	Estiramento C=O (amida I)
	1590	Deformação angular NH da amina primária e banda amida II
	1380, 1255	Deformação C-CH ₃ e banda amida III
	1150	Estiramento assimétrico C-O-C da ligação glicosídica
	1060, 1029	Estiramento C-O do anel polissacárido
PEO	2885	Estiramento C-H do grupo CH ₂
	1148, 1101, 1062	Estiramento C-O-C
	1467	Deformação C-H
	1358, 1340	Deformação C-H do grupo CH ₂

A análise dos espectros de FTIR-ATR das fibras depositadas com CS/PEO indica que as principais bandas de absorção do CS se mantêm mesmo com a adição de PEO. Após imersão em meio de cultura todas as bandas continuam a manter-se sem alterações significativas.

O estudo com esta matriz de CS 2% PEO 0,25% prosseguiu com a caracterização quanto à capacidade de inchamento em água, ângulo de contacto, porosidade e propriedades mecânicas. O primeiro parâmetro foi determinado a partir da expressão 4.4 após imersão em água destilada durante 5 h (H₂O 5 h) e 5 dias (H₂O 5d), conforme ilustra a Figura 5.12.

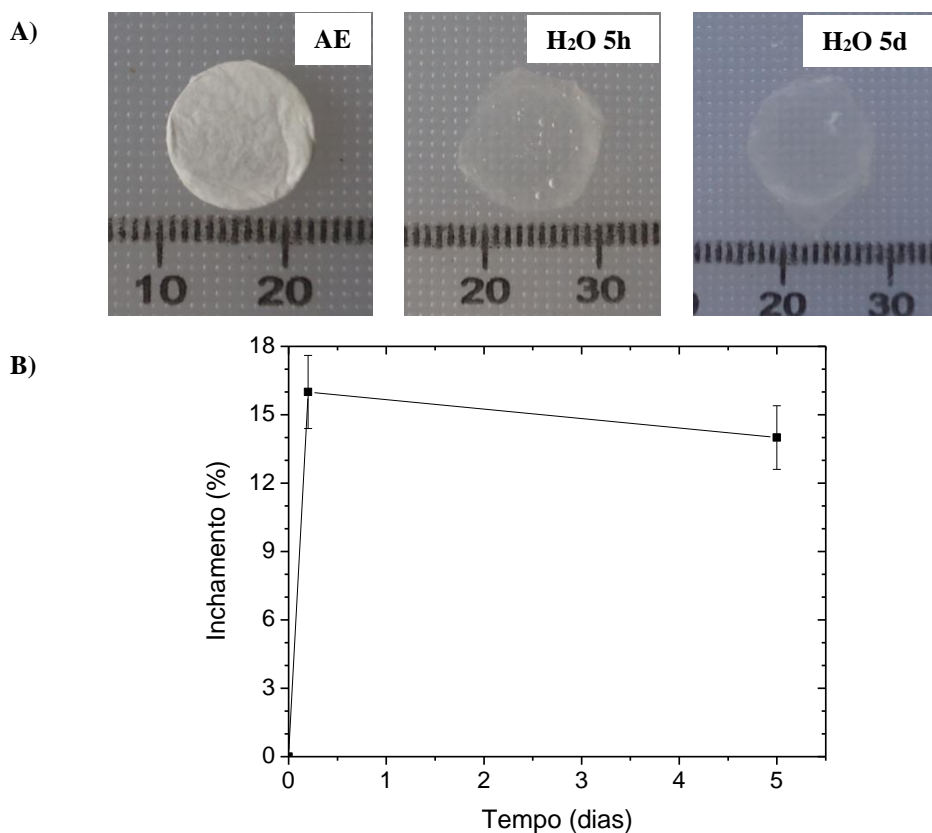


Figura 5. 12 Matriz de CS/PEO após electrofiação (AE) e após imersão em água destilada durante 5 h (H₂O 5h) e 5 dias (H₂O 5d) (a). Variação da dimensão da matriz em função do tempo de permanência em água. Valores apresentados como média \pm incerteza (b).

Da observação da Figura 5.12 verifica-se que a matriz de CS/PEO aumenta a sua área em *ca.* de 15%, nas primeiras 5h de imersão, valor que mantém durante pelo menos 5 dias. O seu aspecto também se altera, ficando transparente.

Os resultados relativos ao ângulo de contacto, porosidade e propriedades mecânicas apresentam-se na Tabela 5.9.

Tabela 5. 9 Ângulo de contacto, porosidade e propriedades mecânicas da matriz de CS/PEO depositada ao 2º dia da solução com 18 kV, 25 cm e 0,3 ml/h. Valores apresentados como média \pm desvio padrão.

θ (°)	Porosidade (%)	E (MPa)	σ_R (MPa)	ε_R (%)
0	72 ± 3	38 ± 10	$4,5 \pm 1,8$	28 ± 6

A matriz de CS/PEO é uma matriz hidrofílica (a gota é absorvida em *ca.* de 3s), mais rígida e com uma menor capacidade para se alongar quando sujeita a tracção do que a matriz de PCL. Estes resultados vão de encontro aos referidos na literatura. Prabhakaran *et al.*[143] prepararam uma matriz com CS 8% em TFA/DCM (75/25 v/v) com fibras de diâmetro médio da ordem de 450 ± 48 nm e obtiveram igualmente um ângulo de contacto de 0°. A rigidez da matriz é ligeiramente menor, $E = 28,7$ MPa e possui uma menor tensão e deformação à ruptura, $\sigma_R = 0,22$ MPa e $\varepsilon_R = 7,10\%$, respectivamente.

5.1.1.3 Matrizes de GEL

A produção de matrizes de gelatina (GEL) encontra-se amplamente difundida. Porém, na maioria dos casos é utilizada gelatina de mamífero [17, 84, 153-155]. Tal como já foi referido anteriormente, a gelatina usada neste trabalho é proveniente de pele de peixe de água fria. Uma das principais diferenças, face à de mamífero, é a sua solubilidade em água à temperatura ambiente. Para além de ter sido necessário estudar as condições experimentais que permitem electrofiar soluções de gelatina, procedeu-se ainda a um extenso estudo após produção das matrizes, que envolveu a utilização de vários métodos de reticulação, de modo a melhorar a sua resistência à água. Os métodos de reticulação devem não só prevenir a dissolução da gelatina em água como manter a morfologia das fibras depositadas, pelo que foram avaliados estes dois aspectos.

A literatura existente sobre a electrofiação de gelatina de peixe é escassa [82, 83]. No entanto, a que existe serviu não só de base, como permitiu uma boa comparação com o trabalho desenvolvido e aqui apresentado, sendo de referir em particular o trabalho descrito por Songchotikunpan *et al.* [82] que utilizaram soluções de gelatina em ácido acético e ácido fórmico.

Tendo em consideração o trabalho desenvolvido na preparação das matrizes de PCL e das matrizes de CS, manteve-se o solvente AcOH 90% para a obtenção das matrizes de GEL.

Começou por ser feito um estudo preliminar onde foram averiguadas as condições de processamento que conduziam à formação de fibras com este solvente. Verificou-se que soluções preparadas com uma concentração $\leq 15\%$ (m/m) não são electrofiáveis, tendo-se observado o aparecimento de fibras a partir de GEL 18% embora com muitas contas, facto que melhorou com o aumento da concentração. Soluções preparadas com uma concentração de 40% são já muito viscosas para electrofiar. Foram produzidas fibras sem defeitos com uma solução de GEL 25% tendo por isso sido adoptada esta concentração para produzir a matriz de GEL.

A matriz depositada com esta solução foi reticulada com três métodos de reticulação: por exposição ao vapor de glutaraldeído (GTA), o processo desidrotérmico (DHT) e utilizando a genipina (GEN). Os dois primeiros foram utilizados com sucesso na matriz. A reticulação com genipina utilizando o processo típico de imergir a matriz numa solução de genipina dissolvida em etanol ou etanol/água não foi conseguido, pois a mesma acabava por dissolver em contacto com meios aquosos. Sisson *et al.* [153] também referiram esta dificuldade atribuindo-a a uma taxa de reticulação lenta quando comparada com a taxa de dissolução da gelatina. Uma das soluções que outros autores [154, 155] propuseram para otimizar o processo de reticulação foi electrofiar uma solução que incorporasse algum teor de genipina. Este método foi também aqui adoptado com a particularidade de se electrofiarem soluções com diferentes tempos de actuação da genipina, ou seja, as soluções foram electrofiadas com diferentes graus de reticulação, foi analisada a morfologia das fibras e a integridade da estrutura quando em contacto com água. A adição de genipina às soluções faz com que estas sejam electrofiáveis com concentrações de gelatina menores. A concentração de genipina foi estabelecida mediante um estudo preliminar tendo-se optado por usar 2%. A solução estudada foi então GEL 18% GEN 2% AcOH 90%.

Ambas as soluções (com e sem genipina) foram depositadas com os seguintes parâmetros de electrofiação: 15 kV, 25 cm e 0,3 ml/h, valores semelhantes aos utilizados por outros autores [82, 84, 155].

As propriedades das soluções foram medidas após a dissolução dos componentes, o que ocorre em algumas horas após a sua preparação (0D) e ainda no caso da solução de gelatina com genipina ao 6º dia (6D). Os valores obtidos constam da Tabela 5.10.

Tabela 5. 10 Viscosidade (η), tensão superficial (γ) e condutividade eléctrica (σ) das soluções de gelatina. Valores apresentados como média \pm desvio padrão.

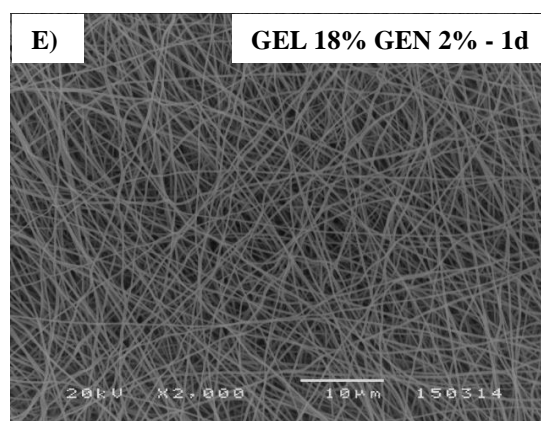
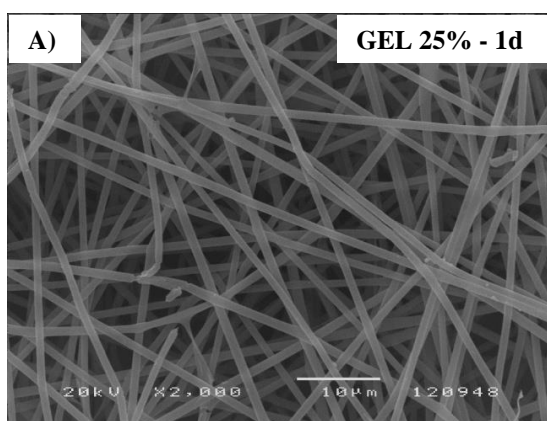
Solução	η (Pa.s)	γ (mN/m)	σ (μ S/cm)
GEL 25% (0D)	$0,9 \pm 0,1$	$34,0 \pm 0,5$	583 ± 7
GEL 18% GEN 2% (0D)	$0,20 \pm 0,02$	34 ± 1	551 ± 7
GEL 18% GEN 2% (6D)	$1,7 \pm 0,2$	36 ± 1	550 ± 6
AcOH 90%	14 ± 1	$0,002386^a$	$29,1 \pm 0,3$

^a Valor tabelado: *Handbook of Chemistry and Physics, David R. Lide, 85th Edition, 2004-2005.*

Por observação da Tabela 5.10 verifica-se que logo após a preparação (0D) a influência da genipina não é significativa. A viscosidade aumenta com o aumento da concentração, resultado directo de um acréscimo de entrelaçamentos das cadeias poliméricas. De forma análoga, a condutividade eléctrica também aumenta, consequência de um aumento do número total de iões na solução resultantes da dissolução da gelatina em condições ácidas. Esta tendência foi igualmente observada por outros autores [82, 156]. A tensão superficial não varia com a concentração de gelatina e é independente da presença de genipina.

Relativamente à solução preparada com genipina observa-se um aumento da viscosidade em uma ordem de grandeza entre após a preparação e 6 dias depois. Este valor supera o valor da viscosidade da solução preparada com GEL 25%, apesar da concentração desta ser superior. Isto é a indicação e a consequência do aumento do peso molecular médio das cadeias poliméricas de gelatina causada pela reticulação com a genipina.

A variação da morfologia das fibras depositadas em função do tempo de vida das soluções foi analisada em ambos os casos. As imagens de MEV apresentam-se na Figura 5.11.



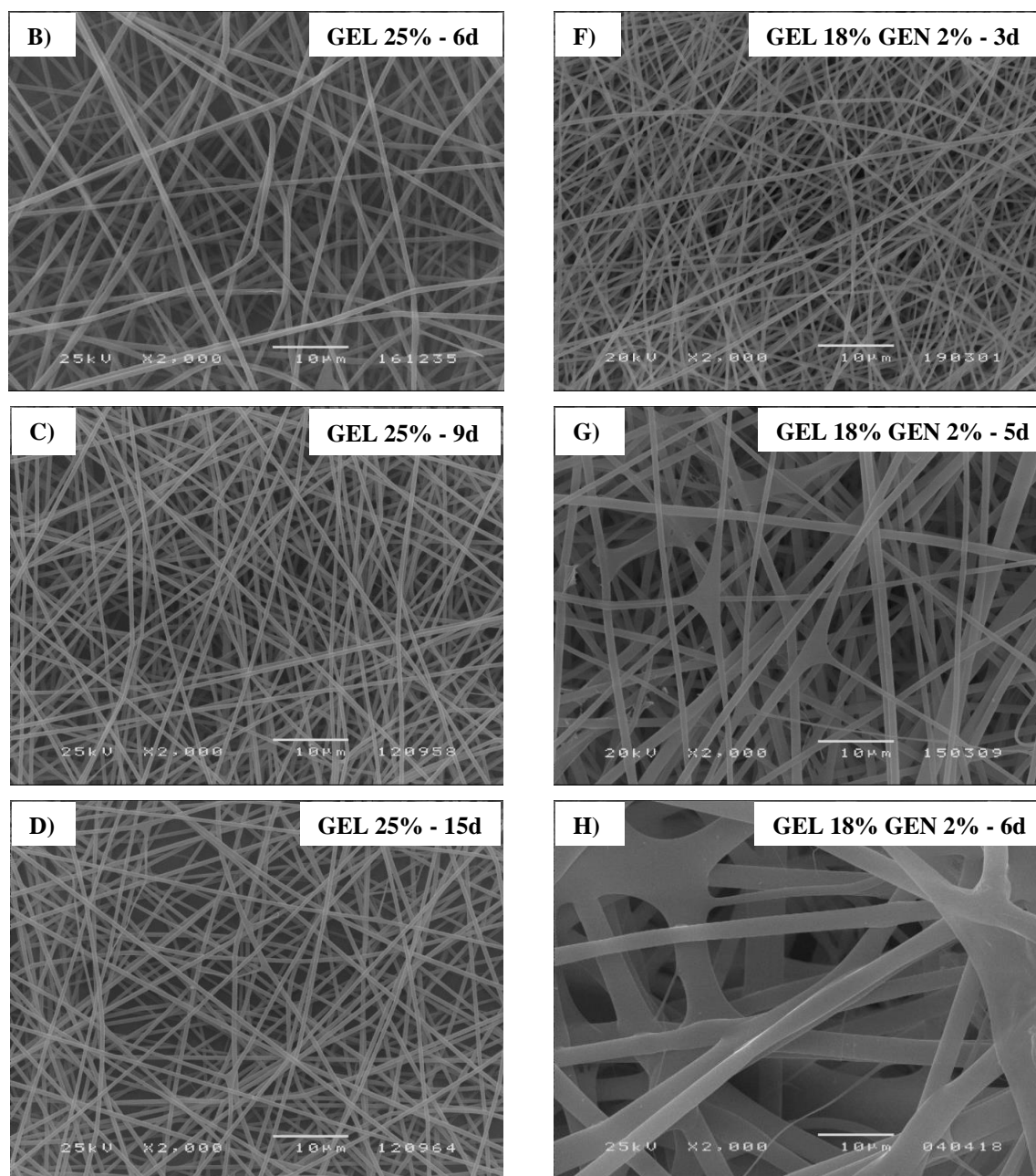


Figura 5. 13 Imagens de MEV das fibras depositadas com as soluções: GEL 25% AcOH 90% com a) 1 dia, b) 6 dias, c) 9 dias e d) 15 dias e GEL 18% GEN 2% com e) 1 dia, f) 3 dias, g) 5 dias e h) 6 dias (Ampliação $\times 2000$; Barra de escala = 10 μm).

A variação do diâmetro médio das fibras depositadas a partir de ambas as soluções apresenta-se na Figura 5.14.

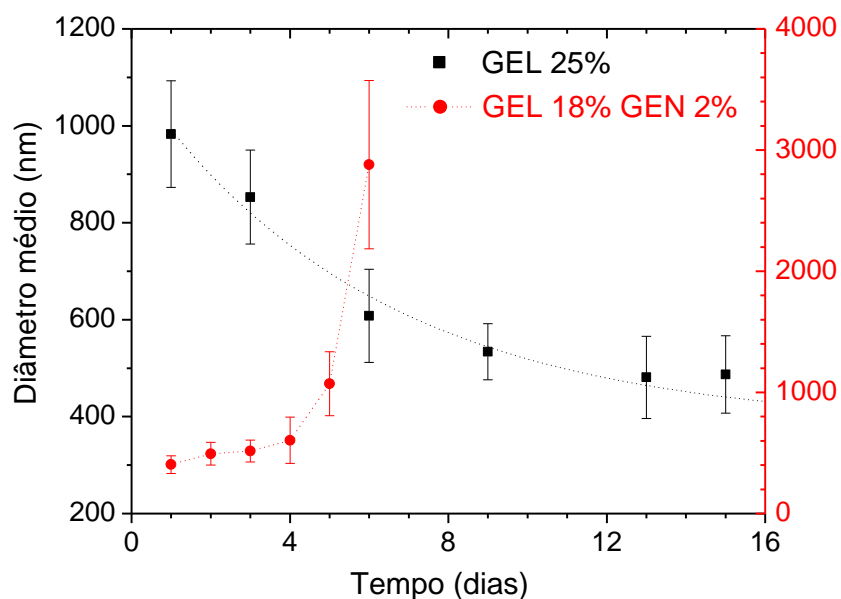


Figura 5. 14 Variação do diâmetro médio das fibras em função do tempo de vida das soluções de GEL 25% e GEL 18% GEN 2% em AcOH 90%. As linhas verticais representam o intervalo [média \pm desvio padrão].

As deposições efectuadas com a solução de GEL 25% revelam no geral a presença de fibras sem defeitos que se mantêm usando a solução até um mês após a preparação. O diâmetro médio das fibras é da ordem de 1 μm ao 1º dia mas decresce com o tempo, chegando a atingir valores próximos dos 500 nm. Songchotikunpan *et al.* [82] obtiveram com uma solução de GEL 15% em AcOH 90% um valor médio de (805 ± 95) nm.

Nas soluções preparadas com genipina importa salientar que a velocidade da reacção de reticulação depende consideravelmente da temperatura. Neste trabalho e no caso particular das soluções de genipina, a electrofiação foi realizada a 20 °C de temperatura e 46% de humidade. Como se verifica nas Figuras 5.13 e 5.14 a morfologia das fibras depositadas depende do tempo de vida da solução. Até ao 4º dia, o diâmetro médio das fibras situa-se entre os 300 e os 400 nm e a sua variação é pouco significativa. Do 4º ao 6º dia, o aumento do diâmetro é abrupto sendo atingido um valor médio de 3 μm , resultado também de alguma fusão das fibras. A viscosidade da solução aumenta acentuadamente neste período devido ao aumento do grau de reticulação (que conduz ao aumento do peso molecular médio). Isto dificulta o estiramento normal das fibras devido à repulsão entre as cargas transportadas pelo jacto, resultando na deposição de fibras mais grossas. Jong Hyun Ko *et al.* [154] dissolveram 20% de gelatina de bovino e 2% de genipina em TFE e obtiveram um diâmetro médio de (820 ± 180) nm, um valor substancialmente superior ao aqui apresentado, atendendo a que naquele caso a genipina apenas reagiu 3 h na solução antes de ser electrofiada.

Com a adição de genipina à solução a electrofiar, as fibras são depositadas já com algum grau de reticulação do polímero mas continua a ocorrer a dissolução das fibras quando expostas à água, inclusive ao 6º dia. Nesse sentido foi necessário considerar outra estratégia que envolvesse a continuação do processo de reticulação após electrofiação. A metodologia adoptada seguiu o critério base descrito por alguns autores [153, 155], de submeter as matrizes a um banho de genipina dissolvida num não-solvente da gelatina, como o etanol (EtOH) ou num sistema EtOH/H₂O apropriado à actuação da genipina mas que não conduza à dissolução da matriz. A concentração de genipina utilizada nestes estudos variou entre 0,1 e 11% e o tempo de permanência no banho entre 19 h e 7 dias. Mediante a realização de um estudo prévio, o banho composto por GEN 2% em EtOH:H₂O 90:10 revelou-se uma boa opção neste trabalho.

O grau de reticulação das matrizes electrofiadas, reticuladas de acordo com os métodos acima descritos, foi avaliado através do estudo da perda de massa decorrente da imersão em água durante 3 dias.

Seleccionou-se a deposição referente ao 2º dia da solução de GEL 25% ($D_{méd} = (858 \pm 96)$ nm) e procedeu-se à sua reticulação com GTA e por DHT.

Relativamente à reticulação com vapor de GTA, as matrizes contraem ligeiramente face à dimensão original e apresentam um aspecto amarelado, tanto mais evidente quanto maior o tempo de exposição. Este facto também foi evidenciado noutros trabalhos científicos, onde é referido que a alteração de cor se deve à formação de ligações aldimina (HC=N) entre os grupos amina livres da gelatina e o GTA [17, 82].

Quanto ao tratamento por DHT, a temperatura do forno foi escolhida com base num estudo preliminar onde se variou a temperatura do forno entre 100 °C e 160 °C, usando tempos de exposição de 24 h, 48 h e 72 h. Os resultados mostraram que é necessário uma temperatura mínima de 140 °C para se obter uma boa preservação das fibras. Aos 160 °C a matriz apresenta uma cor amarelada.

Quanto à solução GEL 18% GEN 2% escolheu-se a deposição referente ao 6º dia da solução, por corresponder à matriz com maior grau de reticulação, para completar o processo de reticulação.

Os resultados da avaliação da perda de massa apresentam-se na Figura 5.15 para o caso da reticulação com GTA e na Figura 5.16 para o recurso ao processo DHT e à utilização de genipina.

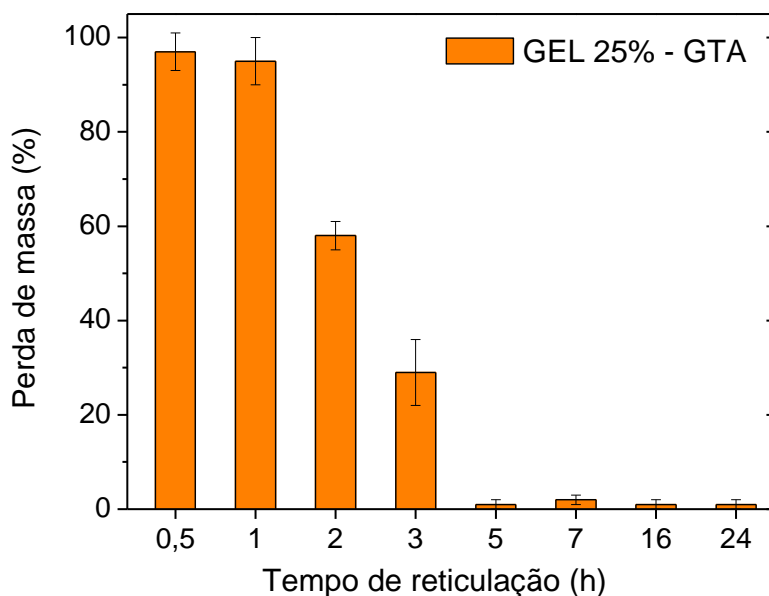


Figura 5. 15 Estudo de perda de massa realizado em matrizes de GEL 25% reticuladas com diferentes tempos de exposição ao vapor de GTA (0,5 a 24h). As barras verticais representam o intervalo [média \pm desvio padrão].

As matrizes reticuladas por GTA apresentam uma perda de massa quase total para tempos de exposição inferiores a 2 h, facto consistente com imagens observadas ao microscópio óptico onde apenas estavam presentes restos de fibras. A partir das 2 h a estrutura fibrosa da matriz mantém-se, porém somente para tempos superiores a 5 h, inclusive, é que a perda de massa é menor que 5%. Tendo por base estes resultados, decidiu-se avaliar a viabilidade celular usando a matriz reticulada durante 2 h (o tempo de exposição mínimo que permite continuar a observar-se uma estrutura fibrosa), e reticulada durante 5 h (o tempo de exposição necessário para otimizar a reticulação).

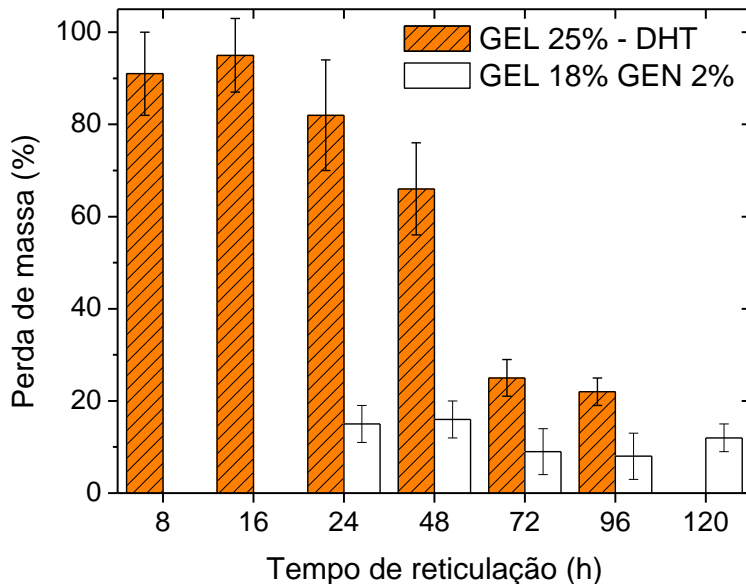


Figura 5. 16 Estudo de perda de massa realizado em matrizes de GEL 25% reticuladas pelo processo DHT, a 140 °C e diferentes tempos de exposição (8 a 96h), e em GEL 18% GEN 2% usando diferentes tempos de imersão num banho de GEN 2% EtOH:H₂O 90:10 (1 a 5 dias). As barras verticais representam o intervalo [média ± desvio padrão].

Os resultados com o tratamento DHT a 140 °C mostram uma perda de massa significativa até às 48h, estabilizando na ordem dos 20% a 30% de perda a partir das 72 h inclusive. Este resultado é consistente com imagens de microscopia óptica, onde a estrutura fibrosa permanecia sem grandes alterações a partir desse tempo. Desta forma, o período de 72 h foi o seleccionado para reticular fibras de gelatina através deste método.

Relativamente à optimização do processo de reticulação usando a genipina, variou-se o tempo de permanência das matrizes no banho de GEN 2% EtOH:H₂O 90:10 de 1 a 5 dias. A perda de massa após exposição à água variou entre 10 a 20% independentemente do número de dias em que as matrizes permaneceram na solução. Apesar dos resultados anteriores terem sido obtidos com a matriz depositada a partir da solução com 6 dias (já com um maior grau de reticulação), as matrizes depositadas a partir da solução com um tempo de vida até 4 dias apresentam nanofibras de menor diâmetro ($D_{méd} \leq 600$ nm) e mais próximo do das fibras de outros materiais. No sentido de manter próximos os diâmetros das fibras de todas as matrizes realizou-se uma última experiência procedendo-se à imersão durante 4 dias no banho de GEN 2% EtOH:H₂O 90:10 de todas as matrizes depositadas entre o 1º e o 6º dia da solução. Avaliou-se então a morfologia das fibras assim tratadas e depois de permanecerem 1 dia em água, para seleccionar uma matriz final de GEL a considerar nos testes *in vitro* (Figura 5.17).

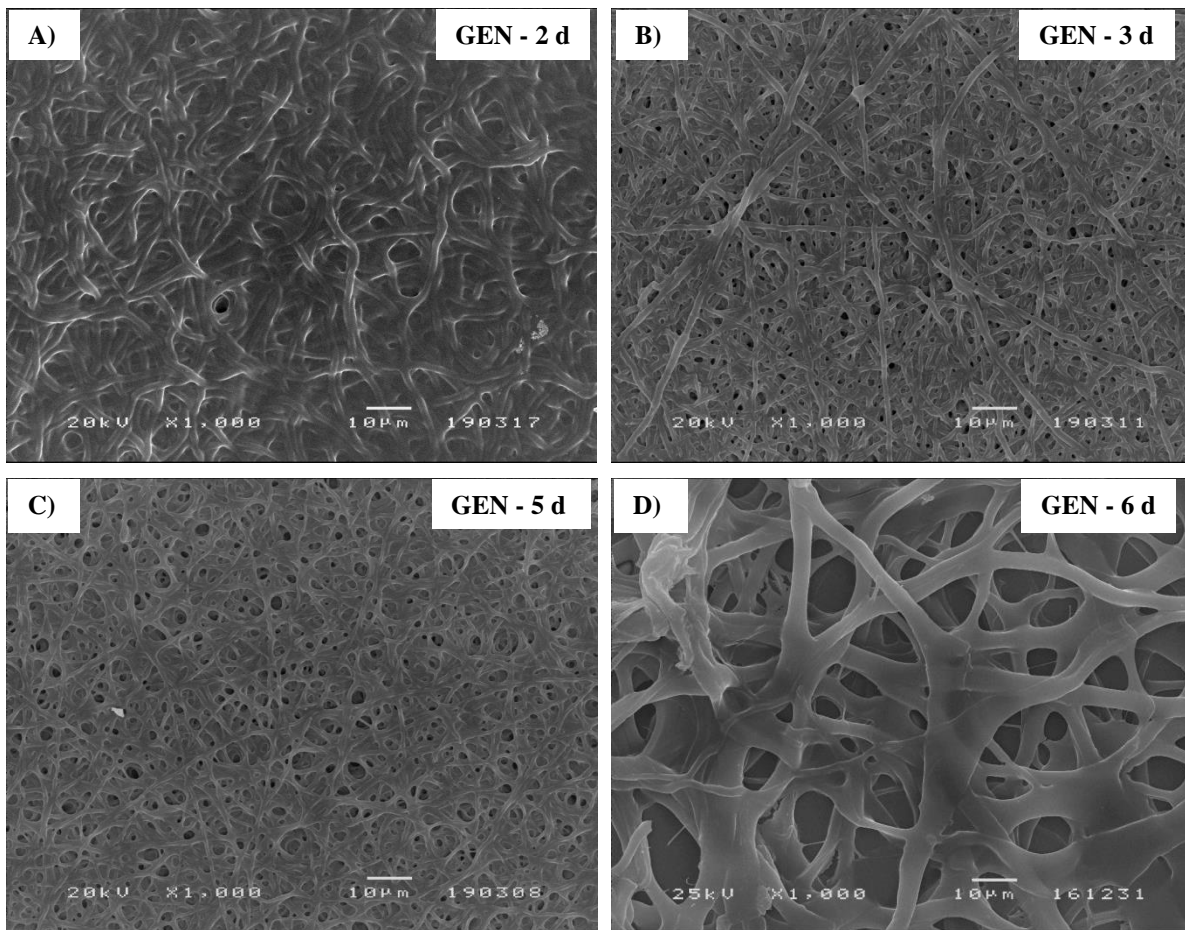
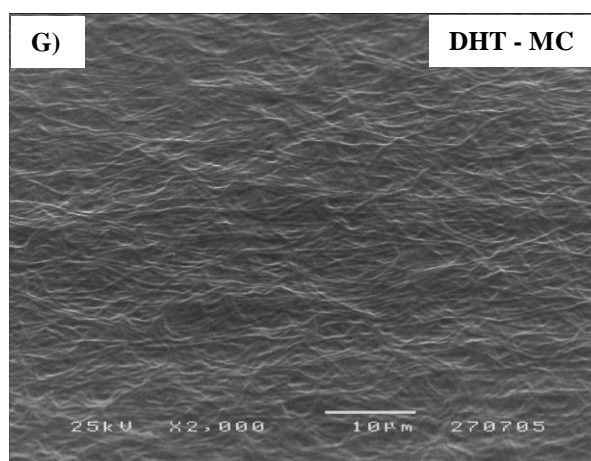
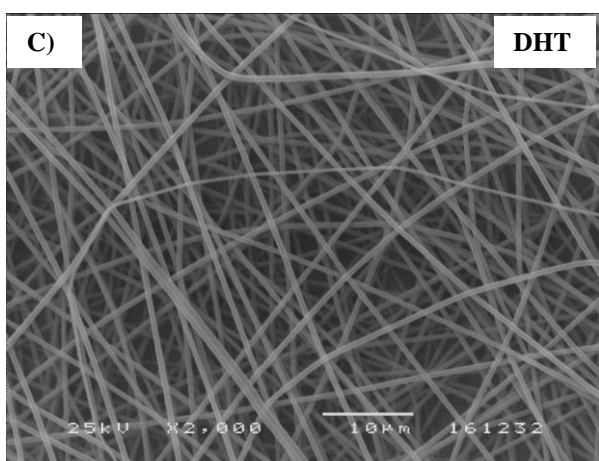
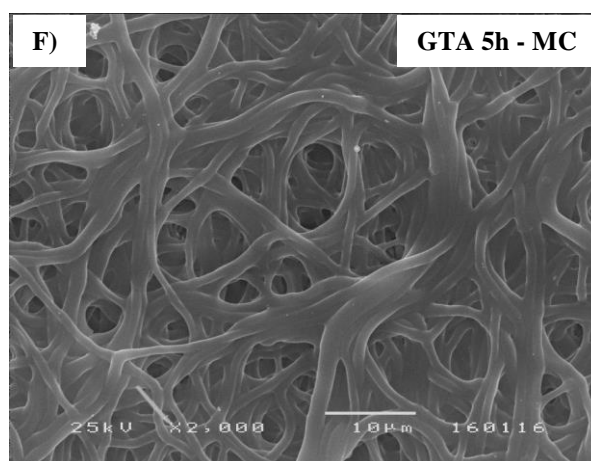
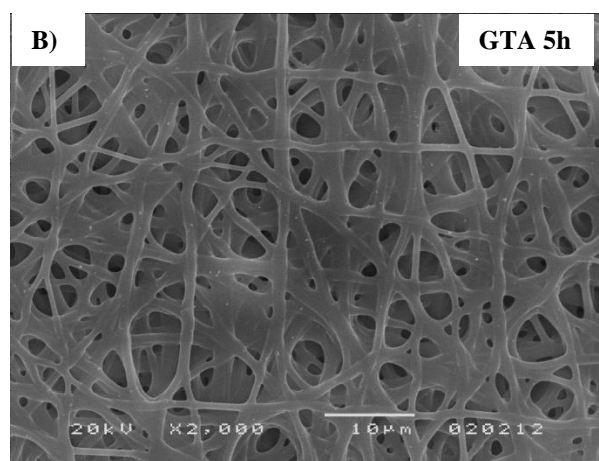
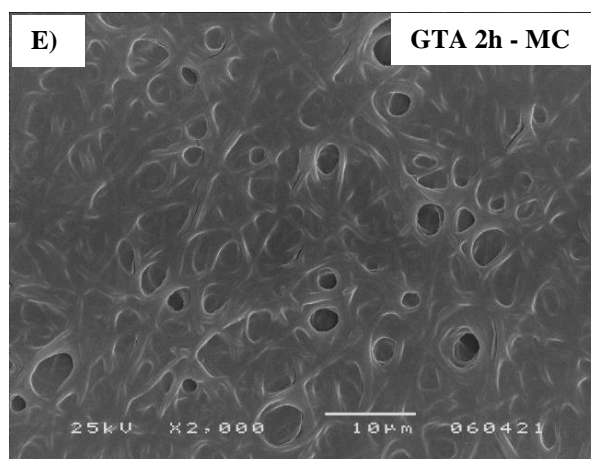
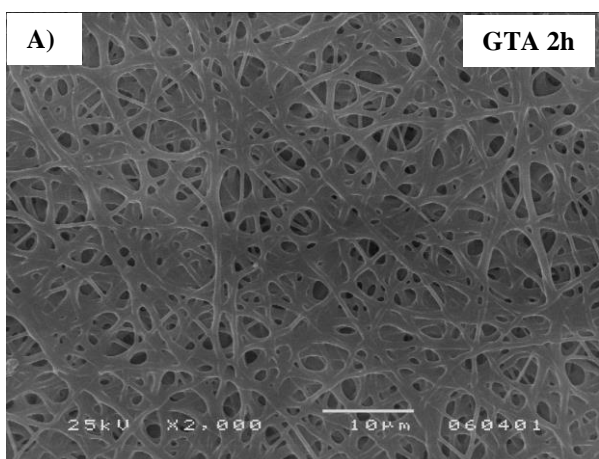


Figura 5.17 Imagens de MEV das matrizes GEL 18% GEN 2% com tratamento em banho de GEN 2% EtOH:H₂O 90:10 durante 4 dias, seguindo-se 1 dia em H₂O, depositadas ao a) 2º dia, b) 3º dia, c) 5º dia e d) 6º dia da solução. (Ampliação $\times 1000$; barra de escala = 10 μm).

Conforme ilustra a Figura 5.17, a solução depositada com maior grau de reticulação, embora apresente valores de diâmetro médio muito elevados, *ca.* de 3 μm (Figura 5.13), é a que estruturalmente retém uma estrutura fibrosa, ainda que algumas zonas exibam alguma fusão. As restantes matrizes da Figura 5.17 possuem antes do tratamento final em banho de genipina um menor grau de reticulação. Pensa-se que este facto associado a uma lenta reacção de reticulação no banho, faz com que da competição entre os processos de reticulação e dissolução resulte fusão entre fibras e a matriz apresente uma estrutura menos porosa após os 4 dias de tratamento. Mediante estes resultados seleccionou-se a matriz, depositada ao 6º dia da solução, para prosseguir o estudo.

Uma vez seleccionadas as melhores condições de reticulação das fibras de gelatina para cada um dos métodos de reticulação em estudo, a morfologia das fibras após reticulação e posterior imersão em meio de cultura durante 3 dias foi averiguada. Os resultados obtidos encontram-se na Figura 5.18.



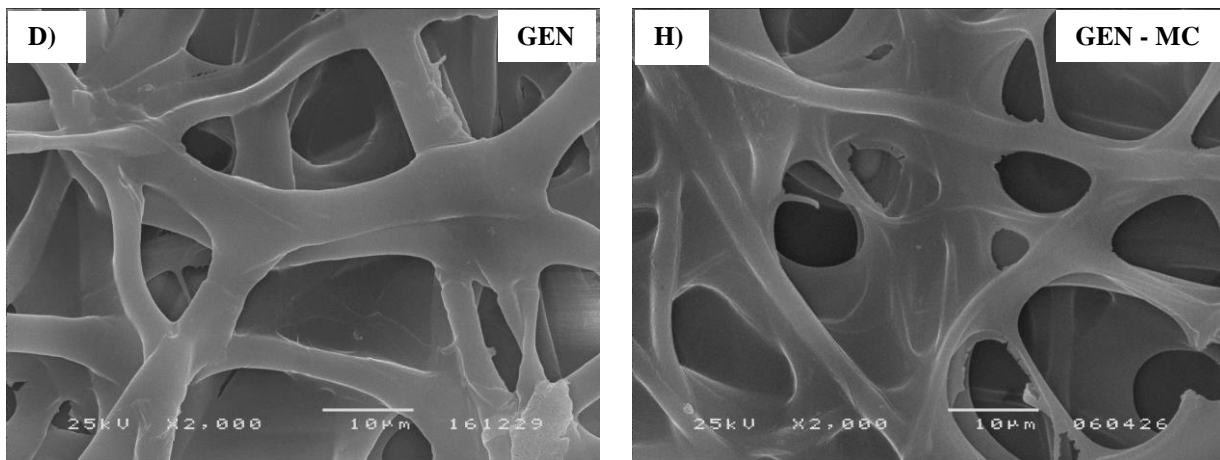


Figura 5. 18 Imagens de MEV das matrizes de gelatina após reticulação com a) GTA 2h, b) GTA 5h, c) DHT e d) GEN. Imagens das mesmas matrizes após imersão em meio de cultura durante 3 dias: e) GTA 2h-MC, f) GTA 5h-MC, g) DHT-MC e h) GEN (Ampliação $\times 2000$; Barra de escala = 10 μm).

Tendo em conta as matrizes reticuladas com vapor de GTA, as imagens da Figura 5.18 mostram alguma fusão das fibras nos seus pontos de intersecção, fenómeno também observado no trabalho de outros autores e que normalmente é atribuído à presença de vapor de água durante o processo de reticulação [17, 82, 153]. O fenómeno é mais evidente na matriz reticulada durante 2 h, em princípio devido ao menor número de ligações estabelecidas neste tempo de exposição, em comparação com a reticulação de 5 h. Estes resultados indicam que durante a reticulação com o método GTA a morfologia original das fibras se altera. O efeito de fusão entre as fibras surge mais acentuado após a exposição a meio de cultura enquanto a morfologia se apresenta menos alterada no caso da matriz reticulada durante 5 h.

No que diz respeito à reticulação com a genipina, é evidente uma certa alteração na morfologia das fibras, resultado também de alguma fusão. Porém, esta mantém-se sem grandes alterações após imersão em meio de cultura. Na literatura encontra-se mencionada a estabilidade deste tipo de matrizes em meio aquoso pelo menos durante 1 semana [153].

Finalmente, a reticulação com o processo DHT não afecta a morfologia inicial das fibras (Figura 5.13 para comparação), um efeito também referido na literatura por outros autores [84, 157]. A situação tende a alterar-se após imersão das fibras em meio de cultura. Neste caso a presença de fibras deixa de ser evidente na matriz, o que a aproxima de um suporte tipo filme. Uma possível razão para este efeito pode ser a falta de fortes uniões entre as fibras nos locais de intersecção o que permite uma compactação da matriz quando seca. Nas imagens das matrizes reticuladas com GTA e genipina são evidentes fortes

uniões nos pontos de cruzamento, por isso a sua porosidade e estrutura continuam visíveis nas imagens de MEV.

De forma a avaliar como os processos de electrofiação, reticulação e estabilidade em meio aquoso afectam a estrutura primária da gelatina, as matrizes foram analisadas por FTIR-ATR. Os resultados mostram-se na Figura 5.19.

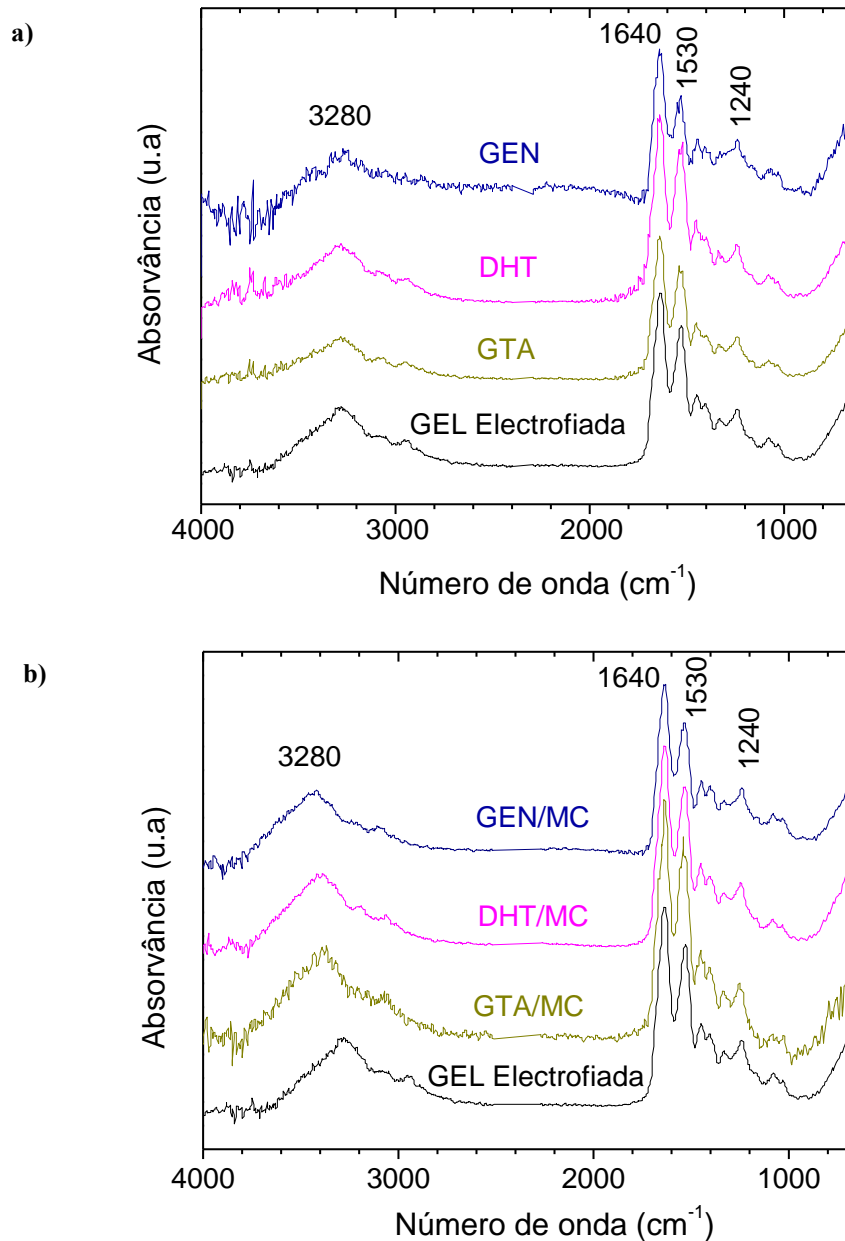


Figura 5. 19 Espectros FTIR-ATR das matrizes de gelatina: a) após electrofiação e após reticulação e, b) após electrofiação e após reticulação e posterior imersão em meio de cultura durante 3 dias.

Na Tabela 5.11 encontram-se resumidas as principais bandas de absorção do espectro da gelatina.


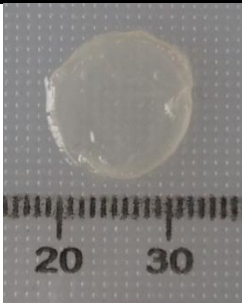





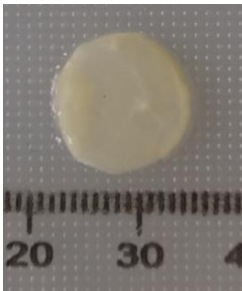

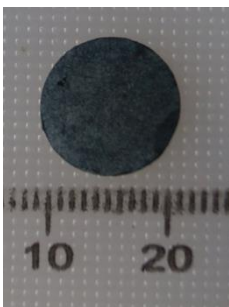


Tabela 5. 11 Principais bandas de absorção no IV da Gelatina [153, 158].

Bandas de absorção (cm⁻¹)	Vibração Molecular / Ligação
3280	Estiramento N-H (amida A)
1640	Estiramento C=O (amida I)
1530	Deformação angular N-H e estiramento C-N (amida II)
1240	Deformação angular N-H e estiramento C-N (amida III)

Como se pode observar na Figura 5.19, os espectros das matrizes analisadas são semelhantes e apresentam as bandas de absorção características da gelatina. Isto significa que a estrutura química não é significativamente afectada pelo processo de reticulação dado que não surgem no espectro de infravermelho novos picos devidos a novas ligações químicas formadas durante a reticulação. Esta técnica também não revelou indícios de degradação química estrutural devida à imersão das fibras em meio de cultura durante 3 dias.

As matrizes foram seguidamente caracterizadas quanto ao grau de inchamento, ângulo de contacto, porosidade e propriedades mecânicas. Relativamente à capacidade de inchamento em água, os principais resultados resumem-se na Tabela 5.12.

Tabela 5. 12 Matrizes de gelatina em AcOH 90% após reticulação (AR) com GTA, DHT e GEN, e posterior imersão em água durante 5 h (H₂O 5h) e 5 dias (H₂O 5d).

	AR	H ₂ O 5h	H ₂ O 5d
GEL 25% GTA 2h			
GEL 25% GTA 5h			
GEL 25% DHT			
GEL 18% GEN 2% GEN			

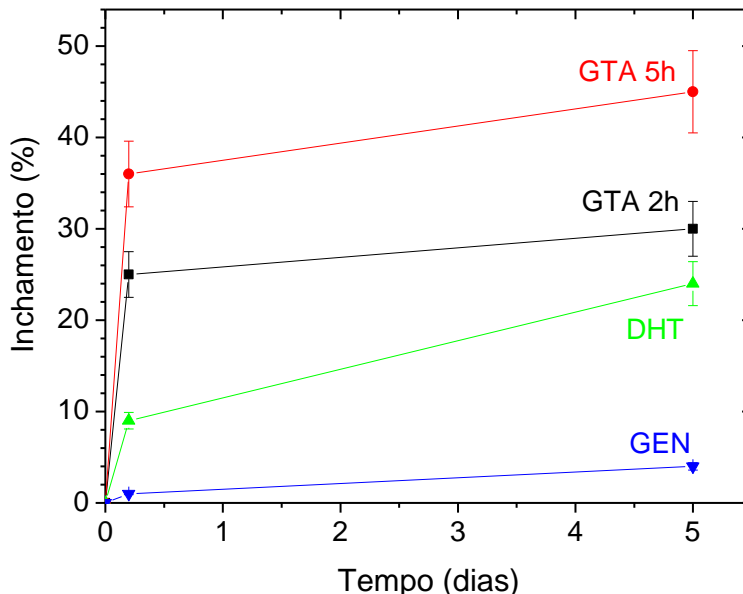


Figura 5. 20 Variação das dimensões das matrizes de gelatina, sujeitas a diferentes processos de reticulação, após imersas em água durante 5 horas e 5 dias. Resultados apresentados como [média \pm incerteza].

Do gráfico da Figura 5.20 conclui-se que as matrizes reticuladas com vapor de GTA são as que apresentam o maior grau de inchamento, chegando a atingir *ca.* de 50% para um tempo de exposição à água de 5 h. O menor valor conseguido com GTA 2h em comparação com GTA 5h está relacionado com o menor grau de reticulação estabelecido na matriz durante este período. Apesar da dissolução parcial das fibras (Figura 5.15) o aumento da área superficial da amostra inerente à natureza hidrofílica do polímero é evidente. Em ambas as situações a expansão ocorre nas primeiras 5 h, não havendo alteração posterior da dimensão até ao 5º dia. Já no caso das matrizes reticuladas com o tratamento DHT, o grau de inchamento aumenta com o tempo de permanência em água até 25% ao 5º dia.

Relativamente às matrizes reticuladas com GEN, estas são as que apresentam a menor capacidade de inchamento em água. Este resultado evidencia que de todos os processos de reticulação estudados, foi com a genipina que se estabeleceu uma maior densidade de ligações cruzadas contribuindo assim para um maior grau de reticulação.

As imagens na Tabela 5.12 permitem constatar ainda que somente as matrizes reticuladas por GTA alteram o seu estado passando de opacas para transparentes.

No que diz respeito ao ângulo de contacto, todas as matrizes apresentam um comportamento hidrofílico. Nas matrizes reticuladas com GTA e DHT a gota demora entre 2 a 3 s a ser absorvida. A reticulada com genipina é um pouco mais lenta, demorando cerca de 13 s a desaparecer, o que está de

acordo com a análise anteriormente efectuada relativamente ao maior grau de reticulação e conseqüente menor alteração da superfície em água desta matriz.

Do ponto de vista da porosidade e propriedades mecânicas, os resultados apresentam-se na Tabela 5.13.

Tabela 5. 13 Porosidade e propriedades mecânicas das matrizes de gelatina após reticulação via GTA, DHT e GEN. Valores apresentados como média \pm desvio padrão.

Matriz/Reticulação	Porosidade (%)	E (MPa)	σ_R (MPa)	ε_R (%)
GEL 25% / GTA 2h	87 ± 3	30 ± 4	$0,8 \pm 0,2$	8 ± 3
GEL 25% /GTA 5h	78 ± 10	162 ± 96	$2,2 \pm 0,6$	9 ± 5
GEL 25% /DHT	86 ± 2	23 ± 4	$1,5 \pm 0,2$	9 ± 1
GEL 18% GEN 2% / GEN	50 ± 17	548 ± 247	17 ± 2	$5,6 \pm 0,8$

Relativamente à porosidade das matrizes de gelatina, os valores médios estimados situam-se entre os 60 e os 90%, valores considerados desejáveis para o tipo de aplicação em estudo [5], com excepção da matriz de gelatina reticulada com genipina, cujo valor médio é menor.

As matrizes de gelatina reticuladas com GTA durante 5 h e com genipina são consideravelmente mais rígidas como se depreende dos valores elevados do seu módulo de Young. O valor superior registado na matriz reticulada com genipina indica ainda que se trata de uma matriz onde se estabeleceram um maior número de ligações cruzadas. Uma comparação com outros trabalhos em que a gelatina foi reticulada por estes processos permite verificar que os resultados obtidos situam-se dentro da mesma ordem de grandeza. Por exemplo, numa deposição efectuada com uma solução de GEL 23% em AcOH 40% reticulada com GTA registaram-se os seguintes valores: $E = (570 \pm 69)$ MPa, $\sigma = (6,0 \pm 0,2)$ MPa e $\varepsilon = (26 \pm 17)\%$ [82]. Já numa deposição com uma solução de GEL 26% GEN 0,5% em AcOH 60% os valores encontrados foram $E = (990 \pm 40)$ MPa, $\sigma = (20,9 \pm 0,4)$ MPa e $\varepsilon = (3,5 \pm 0,2)\%$ [155].

No caso das matrizes preparadas com GTA 2 h, como o grau de reticulação não é tão elevado, ocorre uma menor interligação das cadeias poliméricas, facto que se reflecte numa menor rigidez da matriz. Em todas as situações a deformação máxima das matrizes é muito reduzida ($\leq 11\%$), o que pode limitar a sua aplicação enquanto substituto dérmico. No entanto nessa aplicação as matrizes estarão hidratadas o que alterará o seu comportamento mecânico.

5.1.2 Testes *in vitro*

5.1.2.1 Cultura de Células 3T3

O estudo de viabilidade de células 3T3 nas matrizes unitárias teve como propósito a escolha de uma matriz de PCL e a selecção de um método de reticulação da GEL, para prosseguir para a próxima etapa, ou seja, a cultura de fibroblastos dérmicos humanos com as células HFFF2.

Este estudo envolveu, numa primeira fase, a construção de uma curva de crescimento da população de células 3T3 em cada material testado, tendo-se utilizado como controlo células cultivadas no fundo dos poços da placa de cultura. As células foram monitorizadas ao 3º, 5º e 7º dias de cultura. A confluência destas células estimou-se ocorrer com aproximadamente 300 000 células nos controlos ao 4º dia (área do poço = 0,95 cm²). Ao 5º dia as células começavam a destacar-se do controlo e portanto não foram efectuadas mais medidas. A curva de calibração (Anexo I) estabelecida para o cálculo do número de células deixa de ser linear para valores superiores a 150 000 células, de modo que não se conseguiu obter uma estimativa precisa do seu número com este método, quando próximo da confluência. Neste caso apenas se fez uma subestimação do número total de células, estando estas representadas com o símbolo "#", que significa "> 150 000 células" (o valor máximo do intervalo linear da curva de calibração).

O estudo foi complementado com a análise de imagens de MEV e/ou confocal das culturas ao 3º dia de cultura.

5.1.2.1.1 Matrizes de PCL

A biocompatibilidade das fibras de PCL depositadas usando diferentes concentrações de AcOH, nomeadamente 100 e 90%, foi avaliada no que diz respeito à adesão e proliferação de células 3T3. As curvas de crescimento obtidas encontram-se representadas na Figura 5.21.

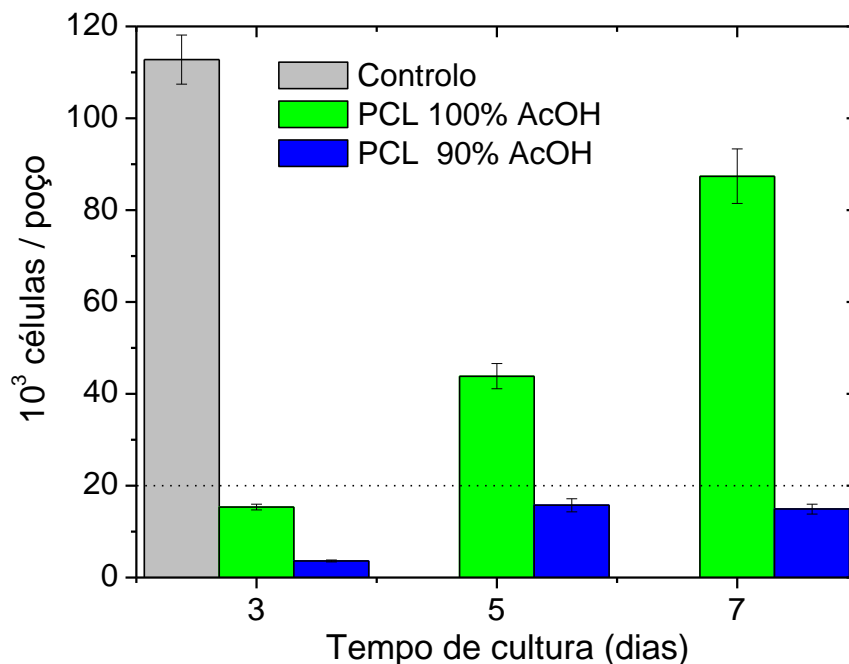


Figura 5. 21 População de células 3T3 no controlo e nas matrizes de PCL 23% em AcOH 90 e 100%, ao 3º, 5º e 7º dias de cultura. A linha a tracejado indica que foram semeadas 2×10^4 células. Medidas apresentadas como média \pm incerteza.

Como se observa na Figura 5.21, a proliferação de células 3T3 é significativamente mais lenta nas matrizes de PCL face ao controlo. O número reduzido de células ao 3º dia pressupõe uma inibição inicial da adesão e da proliferação celular consequência da PCL ser um polímero hidrofóbico e com poucos grupos funcionais reactivos à sua superfície, o que do ponto de vista de adesão celular é frequentemente referido como limitante [159]. A partir desse dia, o crescimento celular na matriz de PCL AcOH 100% é aproximadamente linear, demonstrando que as células que conseguiram aderir nas primeiras horas de cultura multiplicam-se.

No que diz respeito à matriz de PCL em AcOH 90% os resultados revelam uma fraca interacção celular com este suporte, que se mantém com o tempo de cultura. Em termos de propriedades desta matriz, destacam-se algumas diferenças face à anterior. O diâmetro médio das fibras é significativamente menor, o que do ponto de vista da adesão das células é considerado um factor favorável, é ligeiramente mais hidrofóbica e menos resistente à fractura. Nesse sentido, especula-se que a presença de água no solvente actua durante a fase de processamento da matriz, no sentido de reduzir ainda mais os locais reactivos disponíveis para interacção celular, não proporcionando condições para a sua proliferação.

Na Figura 5.22 apresentam-se as imagens de microscopia confocal registadas ao 3º dia de cultura.

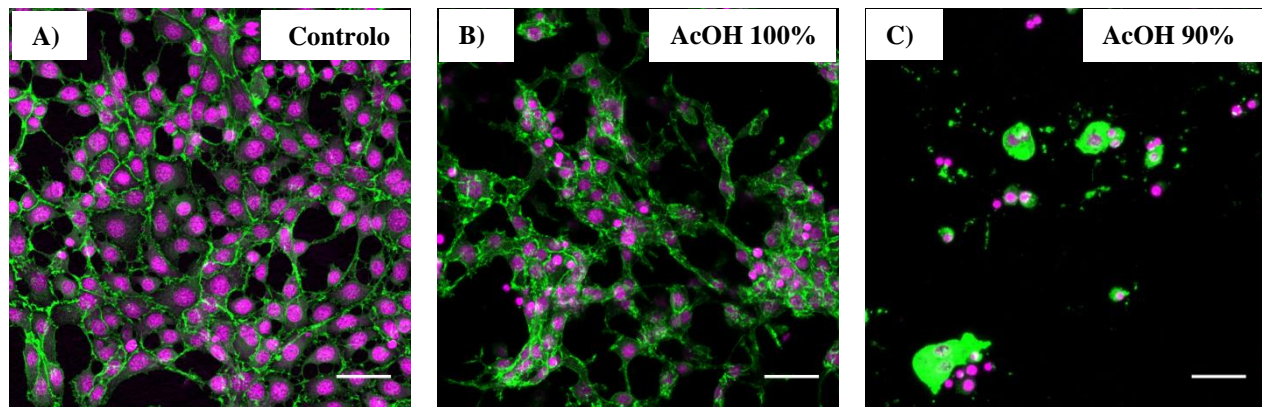


Figura 5. 22 Imagens de microscopia confocal de células 3T3 ao 3º dia de cultura fixadas e marcadas com ToPro no ADN (magenta) e faloidina nos filamentos de actina do citoesqueleto (verde) em: a) controle, b) PCL 23% em AcOH 100% e c) PCL 23% em AcOH 90%. (Barra de escala = 50 μ m)

Conforme se verifica na Figura 5.22 as células cultivadas sobre as matrizes de PCL em AcOH 100% encontram-se, tal como no controle, a aderir e a proliferar. A morfologia celular é semelhante em ambos, sendo as células poligonais. No entanto nas fibras de PCL parece haver uma maior tendência para as células se agruparem. Resultados semelhantes foram obtidos por Serrano *et al.* [160]. A razão para este efeito não se encontra bem fundamentada na literatura, pelo que especula-se que possa resultar de uma fraca adesão das células à matriz e por isso aderem umas às outras ou então células que já se dividiram e ficaram juntas por dificuldade em migrar.

Uma situação oposta observa-se na matriz de PCL em AcOH 90% onde as células presentes são poucas e as existentes, apresentam sinais de apoptose: corpo celular arredondando e ausência de protrusões, e os núcleos fragmentados.

Mediante o estudo efectuado prosseguiu-se com a matriz de PCL em AcOH 100% para a fase seguinte.

5.1.2.1.2 Matrizes de GEL

Tal como já foi referido anteriormente uma das características da gelatina utilizada neste trabalho é a solubilidade em água à temperatura ambiente, sendo portanto necessária a sua reticulação. Embora o tratamento de reticulação aumente a resistência à dissolução e melhore as propriedades termo-mecânicas [77], é importante que o mesmo não seja citotóxico para as células. Está presente na literatura que uma potencial fonte de citotoxicidade dos biomateriais quimicamente reticulados pode advir de resíduos de agentes reticulantes que não reagiram e que são libertados à medida que o material se degrada ou que se mantêm activos, podendo reticular as proteínas presentes na membrana citoplasmática das células [17,

153]. Nesse sentido foi estudada a viabilidade de células 3T3 sobre as matrizes reticuladas com os três processos, glutaraldeído (GTA), processo desidrotérmico (DHT) e genipina (GEN), de forma a ser possível concluir acerca da biocompatibilidade das matrizes reticuladas e seleccionar um dos métodos para prosseguir o estudo.

As curvas de crescimento obtidas em cada condição estudada apresentam-se na Figura 5.23.

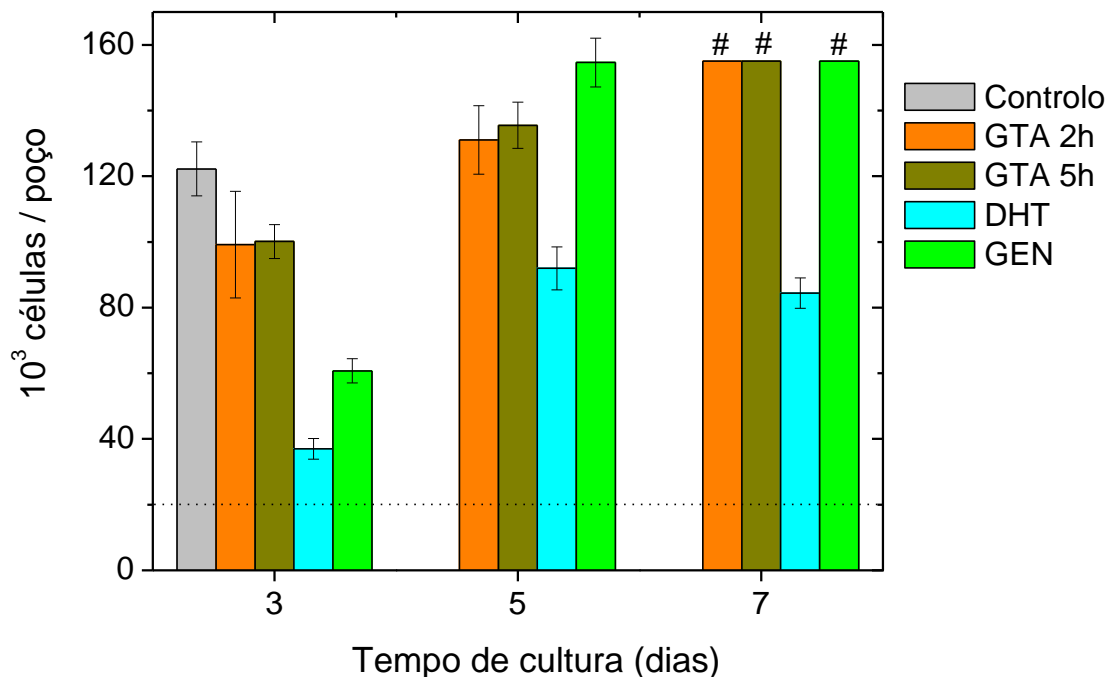


Figura 5. 23 População de células 3T3 no controlo e nas matrizes de GEL reticuladas com GTA, DHT e GEN ao 3º, 5º e 7 dias de cultura. A linha a tracejado indica que foram semeadas 2×10^4 células. O símbolo “#” presente ao 7º dia nas matrizes de GTA e GEN representa uma subestimação do número total de células nesse dia. Resultados apresentados como média \pm incerteza.

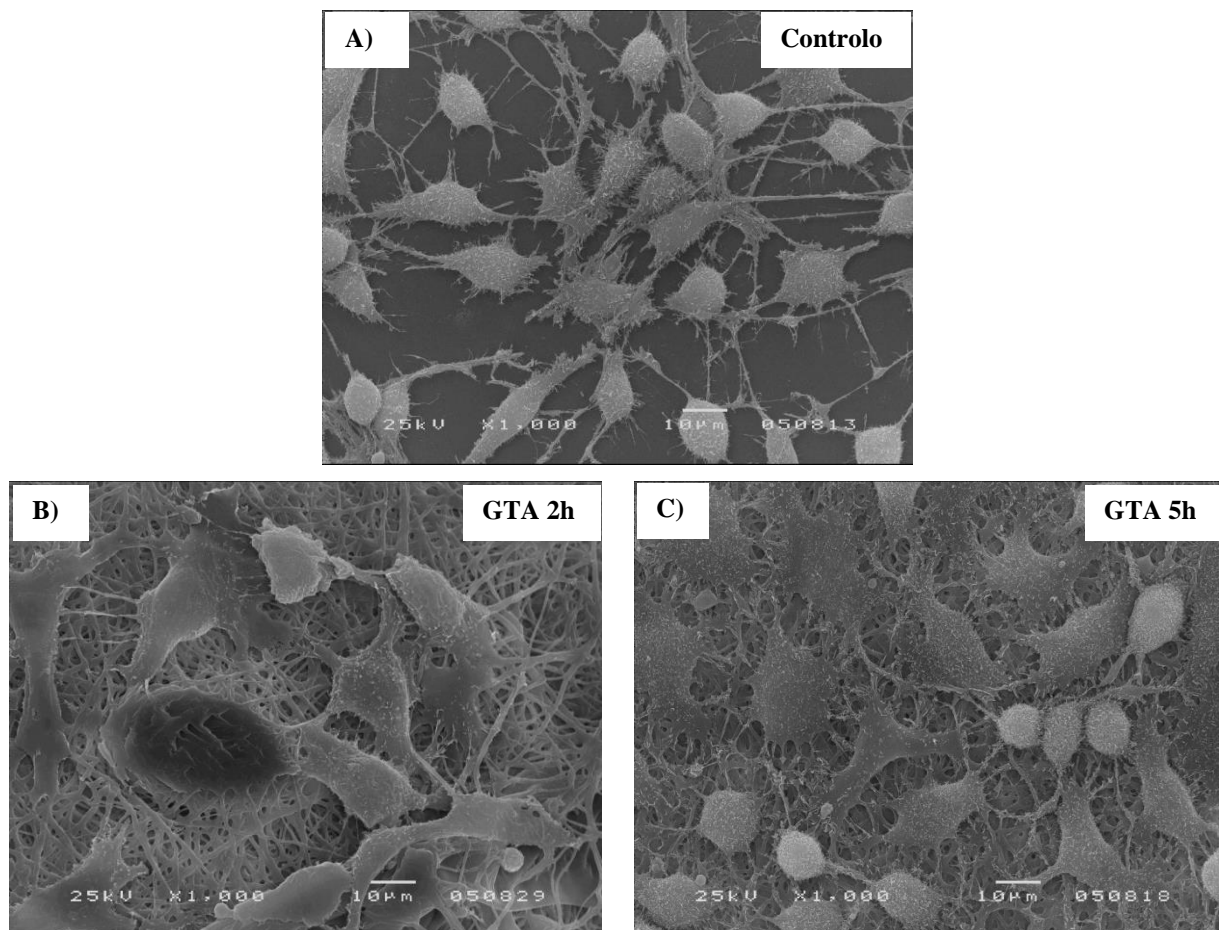
Como se observa na Figura 5.23, a proliferação de células 3T3 é significativamente mais lenta nas matrizes reticuladas com DHT e GEN do que no controlo durante os três primeiros dias de cultura. No caso das matrizes reticuladas com vapor de GTA, a taxa média de proliferação aproxima-se da do controlo embora seja estatisticamente inferior ($p < 0,05$). O número de células aumenta em todas as matrizes ao 5º dia de cultura, superando ao 7º dia as 150 000, excepto na matriz reticulada com o processo DHT que nem mesmo chega a igualar o número de células do controlo ao 3º dia.

Relativamente à reticulação com o processo DHT encontram-se na bibliografia considerações que destacam algumas implicações do processo ao nível da energia superficial das nanofibras, nomeadamente

o aumento de regiões hidrofóbicas, reflectindo-se numa menor adesão celular [157]. No entanto, este é um mecanismo que ainda não está claro e que necessita de um estudo mais aprofundado.

No caso da reticulação com a GEN, o crescimento começou por ser lento, recuperando ao 5º dia. Um comportamento semelhante a este foi observado por J. H. Ko *et al.* [154], com a condicionante de que a viabilidade celular é fortemente dependente da concentração de genipina usada, diminuindo com o aumento da concentração desta. Embora este agente reticulante seja apresentado na literatura como potencialmente menos tóxico do que o GTA, os resultados obtidos não se dirigem nesse sentido. A toxicidade da genipina é relatada por outros autores, que a consideram dependente do tipo de células a estudar e dependente da dose [161, 162]. Note-se que a matriz escolhida para este estudo foi a que esteve exposta mais tempo à actuação da genipina. Com o aumento do tempo de cultura os resultados sugerem que o meio de cultura cancela o potencial citotóxico.

Nas Figuras 5.24 e 5.25 apresentam-se as imagens de MEV e confocal, respectivamente, das células ao 3º dia de cultura.



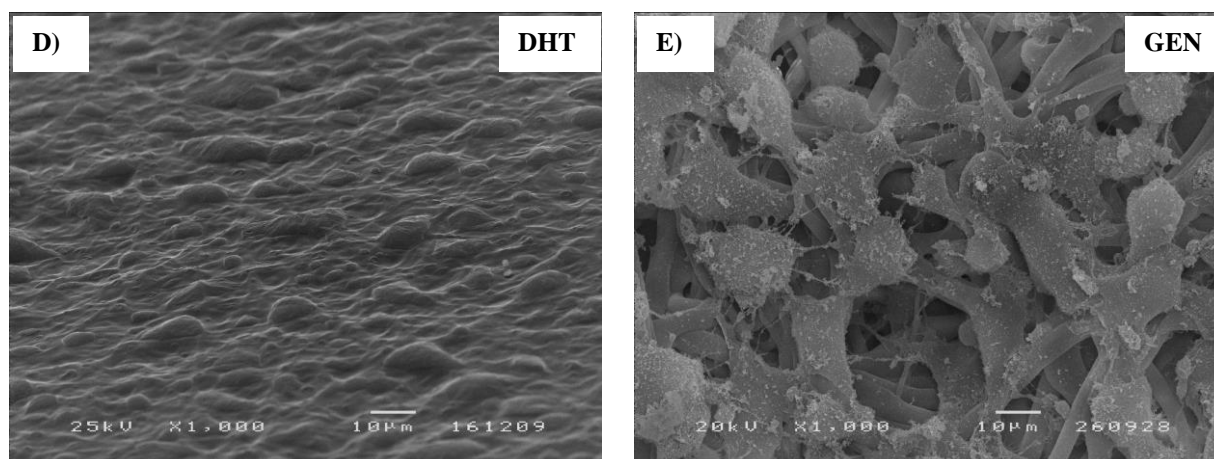
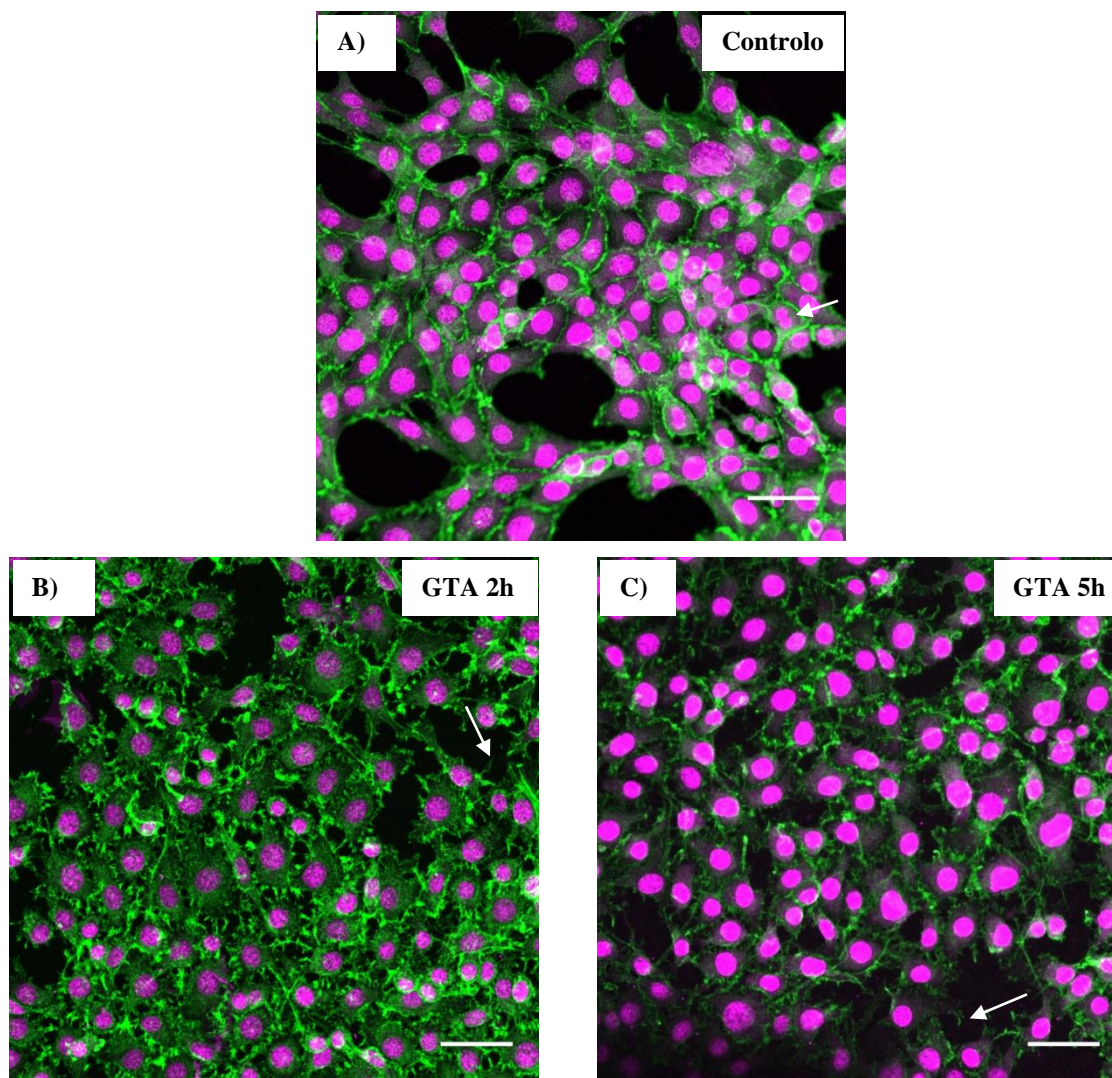


Figura 5. 24 Imagens de MEV da morfologia de células 3T3 ao 3º dia de cultura sobre a superfície de a) controle e matriz de GEL reticulada com b) GTA 2h, c) GTA 5h, d) DHT e e) GEN. (Barra de escala = 10 µm).



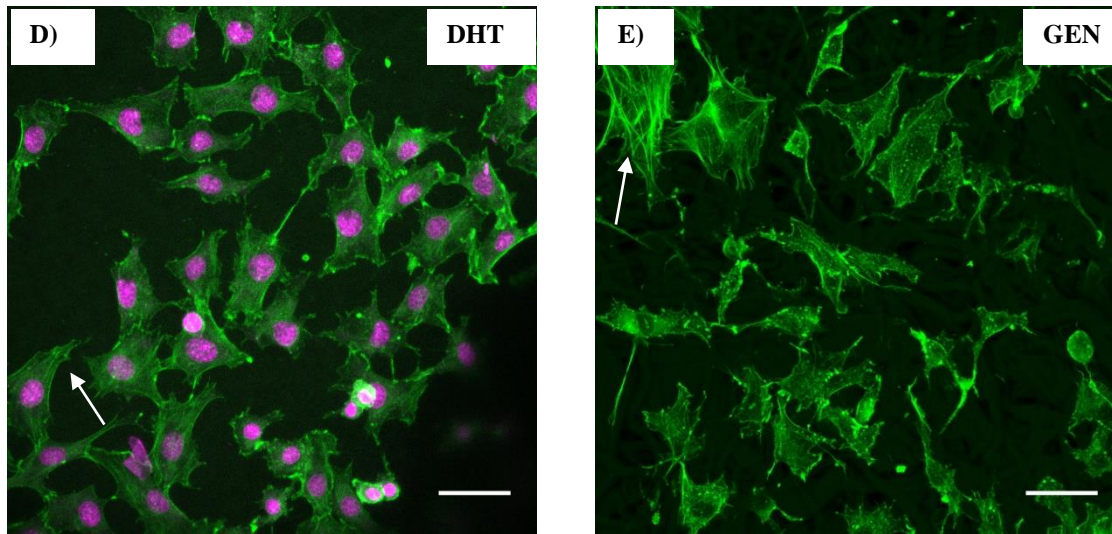


Figura 5. 25 Imagens de confocal de células 3T3 ao 3º dia de cultura fixadas e marcadas com ToPro no ADN (magenta) e faloidina nos filamentos de actina do citoesqueleto (verde) em: a) controlo e matriz de GEL reticulada com b) GTA 2h, c) GTA 5h, d) DHT e e) GEN (neste caso a genipina interfere com a marcação do ADN e os núcleos não são visíveis). Exemplos de figuras mitóticas (seta, a), filopodia (setas, b e c) e *stress-fibers* (setas, d e e) (Barra de escala = 50 μ m).

Tanto nas imagens de MEV (Figura 5.24), como nas imagens de confocal (Figura 5.25) observa-se que as células estabelecem ligações e aderem à superfície dos diferentes substratos estudados. A morfologia das células é a esperada, ou seja, apresentam uma forma poligonal.

Relativamente às imagens de confocal, foi efectuada para o 3º dia uma estimativa da área média de cobertura celular e destacadas algumas características das células 3T3, que se resumem na Tabela 5.14 onde também se apresentam os valores de percentagem relativa (ao controlo) de células viáveis. Os valores de cobertura estimados indicam uma taxa de proliferação relativa ao controlo superior a 50%, excepto na matriz reticulada por DHT.

Tabela 5. 14 Área média de cobertura celular estimada a partir das imagens de microscopia confocal ao 3º dia de cultura e principais características dos fibroblastos 3T3 nas matrizes de gelatina tratadas com diferentes métodos de reticulação. Comparação com os valores de percentagem relativa (ao controlo) de células viáveis. Valores apresentados como média \pm desvio padrão.

Método de Reticulação	% células viáveis ao 3º dia	% Cobertura celular Área/Campo	Quantidade Filopodia ¹	Quantidade <i>Stress-fibers</i> ¹	% Figuras mitóticas
Controlo (vidro)	100	75 \pm 10	2,6	0,7	2,3
GTA 2h	81	79 \pm 8	4,0	0,8	4,0
GTA 5h	82	79 \pm 10	2,0	0,7	3,3
DHT	30	41 \pm 10	1,5	1,5	4,0
GEN	50	51 \pm 7	1,6	1,7	N/A ²

¹ O número de filopodia ou *stress fibers* presente nas imagens foram contabilizadas como 0 para nenhuma presença, 1 para poucas, 2 para algumas e 4 para muitas. Os valores apresentados são valores médios.

² As fibras de genipina interferem com a marcação do ADN e portanto os núcleos não são visíveis.

A área média de cobertura celular estimada a partir das imagens de confocal é coerente com a percentagem de células viáveis, apresentando uma menor proliferação nas matrizes tratadas com GEN e DHT. As células cultivadas nas matrizes reticuladas com GTA mostram uma área de cobertura comparável à dos controlos ($p = 0,37$ para GTA 2h e $p = 0,41$ para GTA 5h), salientando-se uma maior presença de filopodias (ver setas nas Figuras 5.25 b e c, respectivamente) relativamente às outras matrizes. Este facto é indicador de um comportamento celular dinâmico e, possivelmente, de comportamento invasivo. O tempo de reticulação com GTA não parece causar diferenças na morfologia das células. Em todas as situações as células encontram-se bem dispersas nas matrizes, sem polarização e sem formarem agregados.

Nas imagens de microscopia confocal também se observaram figuras mitóticas (exceptuando na GEN, em que devido à coloração intensa e autofluorescência das fibras, não foi possível observar núcleos de forma distinta) indicando que as células estavam num estado de proliferação. Como se verifica na Tabela 5.14, a identificação de figuras mitóticas, por si só, não explica as diferenças obtidas entre as culturas nas várias matrizes, o que indicia alguma discrepância ao nível das características físico-químicas dos substratos, nomeadamente com a capacidade das células aderirem e interagirem eficazmente com os mesmos. No caso das matrizes reticuladas por DHT, as imagens de MEV apresentam uma redução da área superficial de contacto disponível para a ligação de células após a imersão em meio (Figura 5.24 d). De acordo com o que já foi mencionado anteriormente, o próprio processo de reticulação envolve a remoção de grupos OH o que pode traduzir-se numa redução do número de locais disponíveis para interacção

celular. Por outro lado é possível que durante o período de cultura a superfície se torne menos estável não permitindo uma adesão celular eficaz. Ambos os fenómenos podem explicar a menor viabilidade e menor contagem de filopodias acompanhada de uma menor área de cobertura de células em crescimento nesta matriz (Figura 5.25d e Tabela 5.14).

Relativamente às matrizes reticuladas com GEN, o facto de se contabilizar uma menor propensão para formar filopodia sugere que as células seriam menos móveis. Esta inibição do movimento pode estar associada à conjugação de uma menor porosidade da matriz ($50 \pm 17\%$), um elevado diâmetro médio das fibras produzidas (*ca.* de $3 \mu\text{m}$) e uma estrutura rígida ($E = 548 \pm 247 \text{ MPa}$), fazendo as células responder com adesões mais fortes. O número de *stress-fibers* aumenta o que é consistente com esta última observação. Esta hipótese, assim como alguma toxicidade induzida por este agente reticulante, podem explicar o menor crescimento celular observado ao 3º dia de cultura.

Quanto às matrizes reticuladas com vapor de GTA, a observação de uma taxa de crescimento celular semelhante à dos controlos mostra que a topografia destas matrizes e as propriedades físicas das fibras contribuem para uma superfície mais adequada para adesão e crescimento de fibroblastos. Este resultado sugere que este processo de reticulação não modifica a afinidade celular da proteína e que o eventual potencial citotóxico dos resíduos de GTA foi eficazmente cancelado.

Com base nos resultados obtidos concluiu-se que as matrizes reticuladas com vapor de GTA oferecem as melhores condições para a adesão e proliferação de células 3T3. O método DHT, embora potencialmente menos tóxico, origina matrizes que são menos biocompatíveis. No caso da GEN, o crescimento celular ocorre a uma taxa menor, embora se observe recuperação ao 5º dia. Contudo, visando o tipo de aplicação que se pretende com estes materiais, considerou-se mais vantajosa uma proliferação celular inicial mais rápida. Nesse sentido o processo de reticulação escolhido foi o vapor de GTA. No que diz respeito à matriz de GEL seleccionou-se a condição de reticulação GTA 5h.

5.1.2.2 Cultura de Células HFFF2

O estudo de viabilidade de células HFFF2 nas matrizes produzidas teve como objectivo fundamental a validação biológica dos resultados com uma linha celular mais adequada, a linha de fibroblastos dérmicos humanos HFFF2, visto serem células que representam mais fidedignamente as que existem no tecido real. Além disso, um estudo mais aprofundado permite uma maior confiança nos materiais produzidos antes de os aplicar na experimentação animal (*in vivo*).

A metodologia seguida na caracterização das culturas com as células HFFF2 foi semelhante à utilizada com as células 3T3, envolvendo a determinação de curvas de crescimento da população destas

células em cada material testado, tendo-se utilizado como controlo o fundo do poço da placa de 48 poços. As células foram monitorizadas ao 2º, 4º, 6º, 9º, 11º e 13º dias de cultura. A confluência destas células estimou-se ocorrer com aproximadamente 150 000 células nos controlos (área do poço = 0,95 cm²). No entanto estas células continuam a proliferar lentamente após atingirem a confluência, empurrando-se umas às outras para terem espaço de adesão, pelo que o valor da fluorescência do teste de viabilidade celular apenas diminui a partir do 9º dia de cultura, indicando o início do destacamento. A curva de calibração (Anexo I) estabelecida para o cálculo do número de células deixa de ser linear para valores superiores a 70 000 células, de modo que não se consegue obter uma estimativa precisa do número de células com este método, quando próximo da confluência. Neste caso apenas se fez uma subestimação do número total de células, estando estas representadas com o símbolo "#", que significa "> 70 000 células". O estudo termina com a apresentação de imagens de microscopia confocal, ao 4º e 7º dias de cultura, para comparação.

As curvas de crescimento de células HFFF2 sobre as matrizes de fibras obtidas a partir de soluções de PCL 23% em 100% AcOH, de CS 2% PEO 0,25% em AcOH 90% e de GEL 25% em AcOH 90% reticulada com vapor de GTA durante 5 h apresentam-se na Figura 5.26.

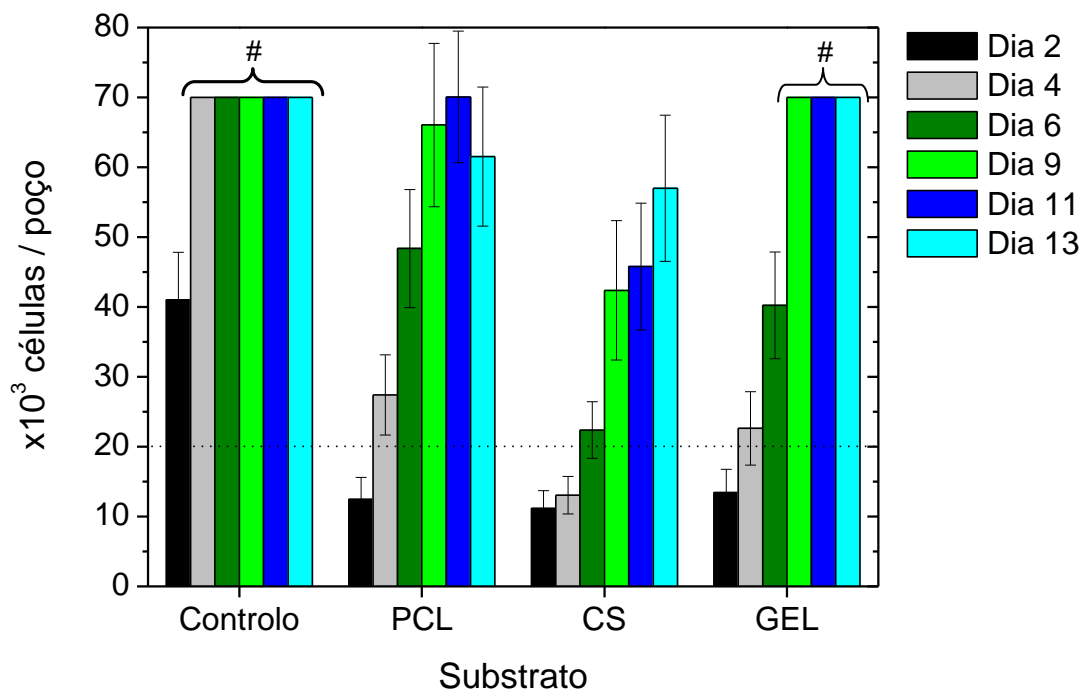


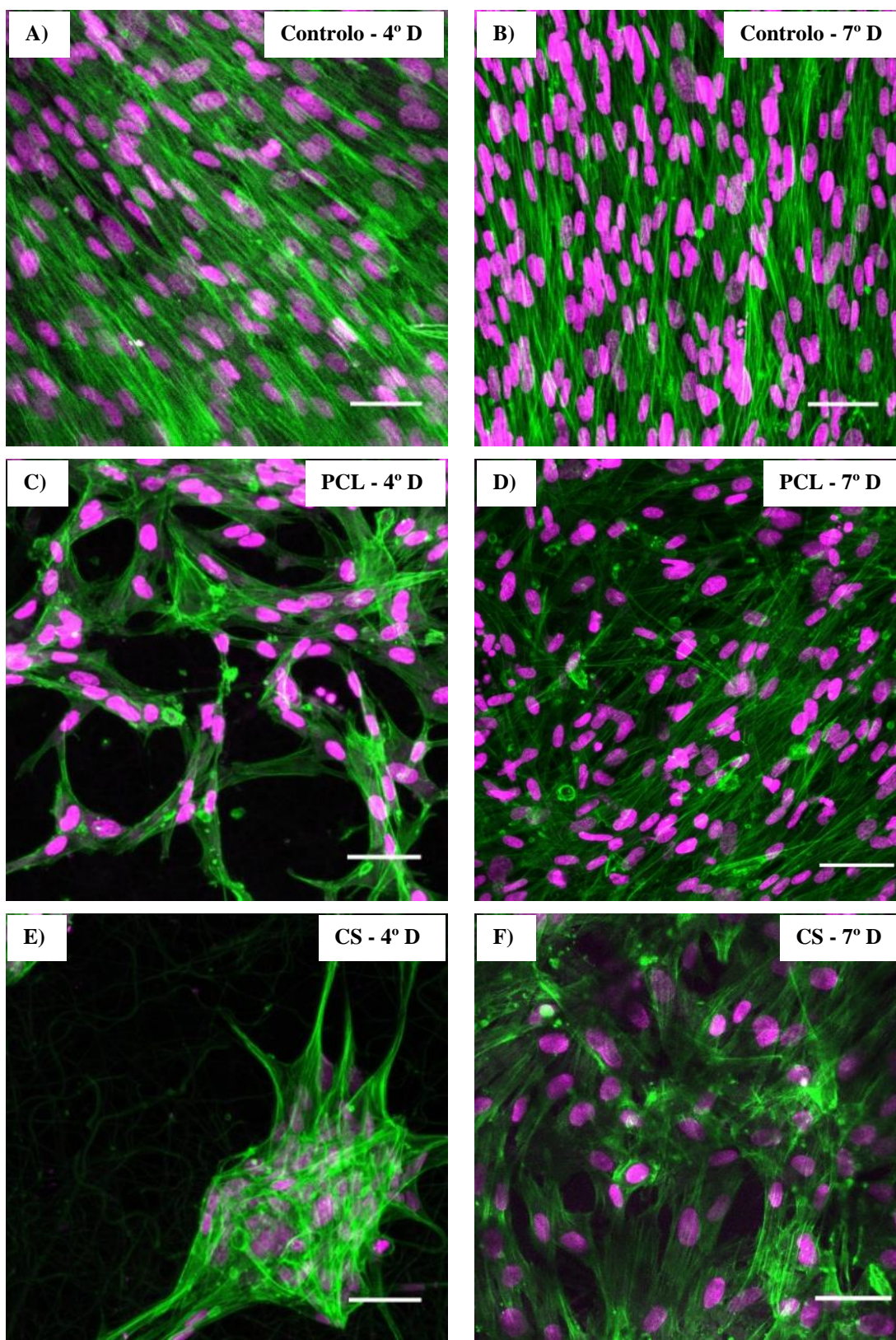
Figura 5. 26 Representação gráfica do crescimento das células HFFF2 no controlo e nas matrizes de PCL, CS e GEL, reticulada com vapor de GTA durante 5 h, ao 2º, 4º, 6º, 9º, 11º e 13º dias de cultura. A linha a tracejado indica que foram semeadas 2×10^4 células. O símbolo “#” representa apenas uma subestimação do número total de células nesse dia. Medidas apresentadas como média \pm incerteza.

De acordo com a Figura 5.26 as células HFFF2 aderem e proliferam nos três materiais embora a uma taxa significativamente mais lenta do que no controlo. Ao 2º dia de cultura (48h após a sementeira) o número de células aderidas nos diferentes materiais é semelhante entre si mas menor do que o número de células semeadas. Este resultado sugere morte por apoptose das células que não conseguiram aderir aos substratos. No caso da matriz de PCL a sua natureza hidrofóbica e os poucos locais reactivos disponíveis à superfície para interacção celular podem explicar este resultado. Pelo contrário, as propriedades intrínsecas dos polímeros CS e GEL (estrutura semelhante aos glicosaminoglicanos e a presença de domínios RGD, respectivamente) são reconhecidas por favorecer a adesão e proliferação celular. Nesse sentido a fraca adesão observada nos dois materiais deverá estar relacionada com uma maior sensibilidade destas células no que diz respeito à topografia e rigidez destes substratos.

O crescimento celular ocorre em todos os materiais até ao 9º dia de cultura mas somente na matriz de GEL é que o valor se dirige para a confluência, à semelhança do controlo. A partir desse dia a cultura tende para o estado estacionário na matriz de PCL ($p > 0,05$ entre os dias 9 a 13), enquanto na matriz de CS, observa-se uma contínua tendência de crescimento celular, embora não seja estatisticamente significativa ($p = 0,327$ entre os dias 9 e 13 e $p = 0,257$ entre os dias 11 e 13). A matriz de GEL mantém-se fora da região de linearidade, mas os valores de fluorescência do teste de viabilidade celular começam a diminuir à semelhança do controlo.

Das três matrizes a de CS é a que apresenta menor afinidade celular. Fang *et al.* [163] observaram uma maior adesão de fibroblastos 3T3 em filmes de GEL face aos de CS apontando como razão a presença de domínios RGD na gelatina como mediadores directos da ligação entre as células e os materiais, domínios esses que o CS não tem. Também Y. Huang *et al.* [164] descrevem uma baixa proliferação celular em matrizes de CS como consequência de uma fraca aderência das células.

Na Figura 5.27 apresentam-se as imagens de microscopia confocal adquiridas ao 4º e 7º dias de cultura.



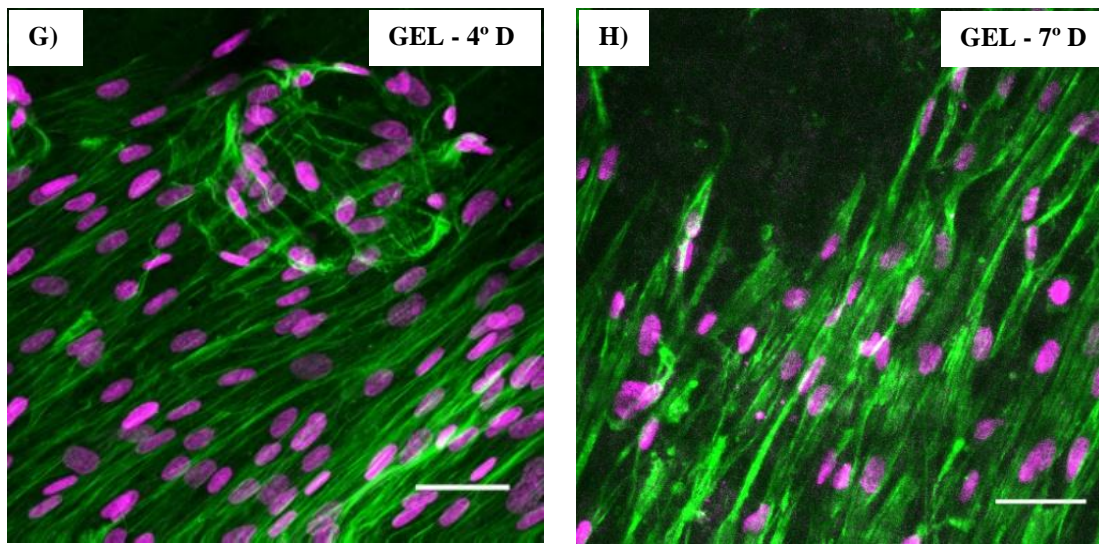


Figura 5. 27 Imagens de confocal das células HFFF2 ao 4º e 7º dias de cultura fixadas e marcadas com ToPro no ADN (magenta) e faloidina nos filamentos de actina do citoesqueleto (verde) no controlo (a e b) e matrizes de PCL (c e d), de CS (e e f) e de GEL (g e h). (Barra de escala = 50 μ m).

De acordo com as imagens da Figura 5.27 observa-se que as células HFFF2 estabelecem ligações e aderem à superfície dos diferentes materiais. A morfologia é do tipo fusiforme, que é o fenótipo normal dos fibroblastos, todavia a resposta celular depende do material em questão.

Considerando o 4º dia de cultura observa-se que as células aderidas na matriz de PCL apresentam protrusões em múltiplas direcções o que indica que as células estão a migrar mas não consistentemente na mesma direcção. Também é evidente a presença de *stress fibers*, indicativo de fortes adesões e forças aplicadas ao substrato.

No caso da matriz de CS as células tendem a formar aglomerados de células capazes estender múltiplas protrusões em todas as direcções, sugerindo que o aglomerado é constituído por células com mobilidade. No entanto, a distribuição confinada a aglomerados sugere que neste tipo de matriz as células, embora móveis, não são capazes de migrar livremente. S.C. Neves *et al.* [165] também observaram a formação de aglomerados nas suas matrizes de CS embora a causa não seja referida. A nossa hipótese é que se deva a uma distribuição não uniforme de cargas à superfície deste material e que nessas regiões ocorram interacções electrostáticas que permitem às células manter a adesão, mas dificultam o movimento livre.

Na matriz de GEL as células encontram-se alinhadas à semelhança do que acontece no controlo. Y. Huang *et al.* [164] referem que a presença de múltiplos domínios de reconhecimento permite que as células estabeleçam pontos de ancoragem ao longo de uma direcção.

Com o tempo de cultura, em particular ao 7º dia, observa-se um aumento da densidade celular e as células tendem a alinhar. No caso do CS as células deixam de adoptar a configuração de agregado encontrando-se mais espalhadas. Relativamente à matriz de GEL, observou-se que o processo de fixação e marcação causou o destacamento de algumas células em certas zonas da matriz, tendo-se por isso escolhido uma dessas imagens como referência. Este fenómeno acontece essencialmente quando a adesão célula-substrato ou célula-célula não é muito forte.

Considerando ainda as imagens de confocal efectuou-se uma estimativa da área média de cobertura celular, assim como o número de núcleos por campo de visão, os quais se apresentam na Tabela 5.15.

Tabela 5. 15 Área média de cobertura celular e número de núcleos/campo nas matrizes unitárias ao 4º e 7º dias de cultura (a partir de imagens de confocal). Valores apresentados como média \pm desvio padrão.

Substrato	% Cobertura celular 4º D Área/Campo	% Cobertura celular 7º D Área/Campo	Quantidade Núcleos/Campo 4º D	Quantidade Núcleos/Campo 7º D
Controlo (vidro)	80 \pm 10	92 \pm 3	135 \pm 51	286 \pm 57
PCL	47 \pm 11	93 \pm 3	90 \pm 27	226 \pm 34
CS	36 \pm 9	92 \pm 7	99 \pm 18	115 \pm 39
GEL	81 \pm 5	84 \pm 9	122 \pm 19	180 \pm 25

Os valores estimados ao 4º dia de cultura indicam uma cobertura celular inferior a 50% nas matrizes de PCL e CS. No controlo e na matriz de GEL a área coberta é *ca.* de 80%. A contagem do número de núcleos por campo de visão encontra-se consistente com esta tendência. Ou seja os fibroblastos interagem com os materiais a uma taxa mais lenta comparativamente com o controlo, o que está de acordo com as curvas de crescimento, excepto no caso da gelatina. Nesta última, a diferença observada pode estar relacionada com uma distribuição de células não homogénea ao longo da matriz.

Ao 7º dia de cultura observa-se um aumento da cobertura celular dos materiais, salvo na matriz de GEL devido ao destacamento das células durante o processo de fixação e marcação. A contagem do número de núcleos é consistente com o aumento da cobertura.

O número de núcleos por campo de visão determinados a partir das imagens de confocal segue a mesma tendência da percentagem de células viáveis resultante das curvas de crescimento, revelando uma menor proliferação celular na matriz de CS.

Por último e de forma a inferir sobre a invasão das células no interior das três matrizes efectuou-se um varrimento em profundidade ao 7º dia de cultura. Os resultados obtidos encontram-se na Figura 5.28.

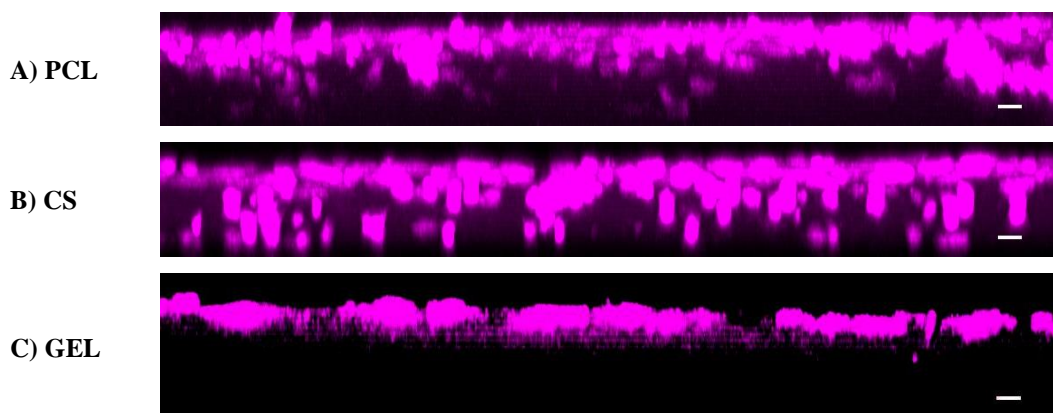


Figura 5. 28 Imagens 2D dos núcleos das células HFFF2 (magenta) ao 7º dia de cultura nas matrizes de PCL, de CS e de GEL (corte em profundidade; barra de escala = 10 μ m).

Da análise da figura anterior verifica-se que as células tendem a aderir sobre a superfície dos diferentes suportes. No entanto, nas matrizes de PCL e de CS é possível observar algumas células que migraram por poros, permitindo a proliferação celular para o seu interior.

No caso da matriz de GEL não se encontraram evidências de que as células são capazes de invadir as matrizes activamente. Embora seja uma matriz porosa ($78 \pm 10 \%$) é a que apresenta o maior grau de inchamento em meio aquoso. Esta característica pode contribuir para uma redução da dimensão dos poros, condicionando deste modo a migração destas células em profundidade.

5.1.3 Testes *in vivo*





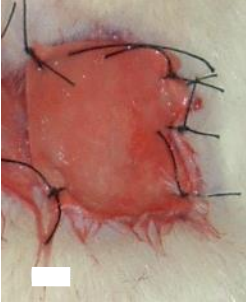








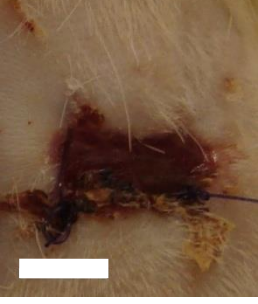

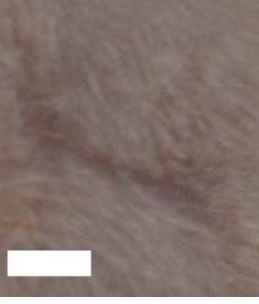
5.1.3.1 Análise Macroscópica

A realização de testes em ratos serve como modelo que permite antever a transposição dos resultados para seres humanos. A cicatrização das feridas cutâneas infligidas aos animais foi seguida macroscopicamente durante 4 semanas. Ao fim de 1, 2 e 4 semanas os animais foram fotografados para registo da evolução da cicatrização da ferida. A escolha destes períodos teve como critério as principais fases do processo de implantação de um enxerto de pele em ambiente clínico:

- a 1ª semana, o período onde se observa se o enxerto foi bem-sucedido e está sobrevivente (“pega do enxerto”);
- a 2ª semana, um período de evolução e observação da estabilidade da sobrevivência do enxerto;
- e a 4ª semana, fase onde o enxerto está totalmente vascularizado e integrado.

Na Tabela 4.16 apresentam-se algumas imagens representativas da evolução das lesões cobertas com as matrizes de PCL, de CS e de GEL as quais se comparam com o controlo (feridas sem material).

Tabela 5. 16 Imagens representativas do aspecto macroscópico das feridas após a aplicação das matrizes de PCL, de CS e de GEL no dia da operação (0d) e após 1, 2 e 4 semanas. Resultados comparados com o controlo (sem material). (Barra de escala = 5 mm).

	0d	1 semana	2 semanas	4 semanas
Controlo				
PCL				
CS				
GEL GTA				

No que diz respeito à interação do material com a ferida verificou-se que as matrizes de CS e de GEL são fáceis de aplicar e apresentam boas propriedades de adesão. Já com a matriz de PCL, que é uma matriz hidrofóbica e pouco flexível, a adesão não acontece espontaneamente, mesmo previamente hidratada com soro fisiológico, pelo que foi suturada aos bordos da ferida.

Em nenhum dos grupos analisados foi evidente um sinal de infecção durante a experimentação. No entanto, destacaram-se algumas diferenças macroscópicas entre os diferentes grupos durante o processo de regeneração das feridas.

Uma semana após a lesão, todos os ensaios apresentaram a formação de uma crosta. No caso particular em que foi utilizada a matriz de PCL, a ferida apresentou material exsiccado (seco) cobrindo a área da ferida, não permitindo a visualização do seu aspecto e demonstrando uma integração difícil com a mesma. Nas experiências com os restantes materiais, CS e GEL, assim como no controlo, as feridas apresentaram sinais de cicatrização por contracção.

Na segunda semana as feridas continuaram a contrair, estando as feridas que foram cobertas com CS e GEL praticamente encerradas. Relativamente aos ensaios com a PCL, a matriz mantém-se a cobrir a ferida, no entanto já são visíveis sinais de contracção.

À quarta semana, as feridas encerraram em todos os grupos - excepto no da PCL - com visível alopecia (falta de pêlo), tal como ocorre na clínica, no autoenxerto. A ferida do controlo converteu-se numa cicatriz tipo linha consequência do fenómeno típico de contracção da pele. Um resultado semelhante foi observado utilizando a matriz de GEL, o que se interpreta por esta ser um material mais frágil. Embora esta matriz, enquanto seca, possua um módulo de elasticidade elevado ($E = 162 \pm 96$ MPa) torna-se bastante maleável e frágil após contacto com água. Desse modo, o balanço entre as forças tensoras da pele e a própria matriz pende a favor da pele o que explica a evolução do processo de encerramento por contracção da ferida semelhante ao controlo.

Nos ensaios com a matriz de PCL a cicatrização assemelha-se à do controlo mas mais retardada. Neste caso torna-se necessário mencionar que esta matriz apresenta o menor módulo de elasticidade ($E = 6,7 \pm 0,4$ MPa) mas também é a única hidrofóbica ($\theta = 124 \pm 3^\circ$). Esta última característica pode explicar o facto de não se observar uma boa integração da matriz na ferida. A sua permanência sobre a ferida à 2ª semana indicia um comportamento de barreira física à contracção retardando o processo de cicatrização.

No caso em que foi usada a matriz de CS observa-se a formação de uma cicatriz re-epitelizada, com uma área de *ca* 15%, relativamente à dimensão inicial. Relativamente às matrizes anteriores, esta apresenta um módulo de elasticidade em seca intermédio ($E = 38 \pm 10$ MPa) e é hidrofílica. A reduzida percentagem de re-epitelização pode ser interpretada atendendo ao facto da taxa de contracção cutânea nestes animais ser muito elevada.

Ainda relativamente à caracterização macroscópica das feridas a taxa de encerramento das mesmas foi igualmente avaliada durante os períodos de observação (pelo rácio das áreas das feridas com matriz e controlo para cada período), mostrando-se os resultados na Figura 5.29.

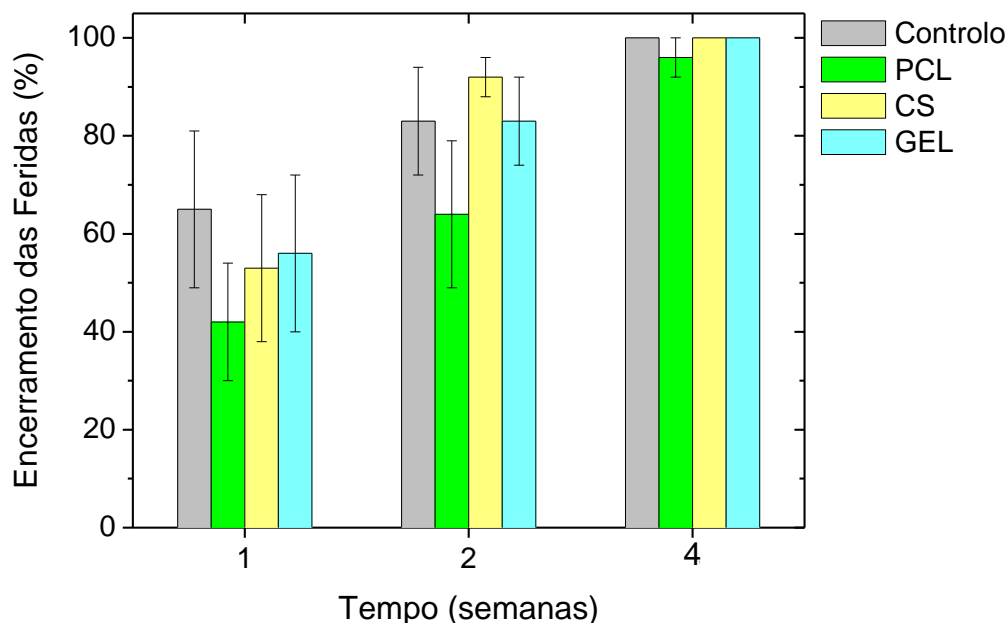


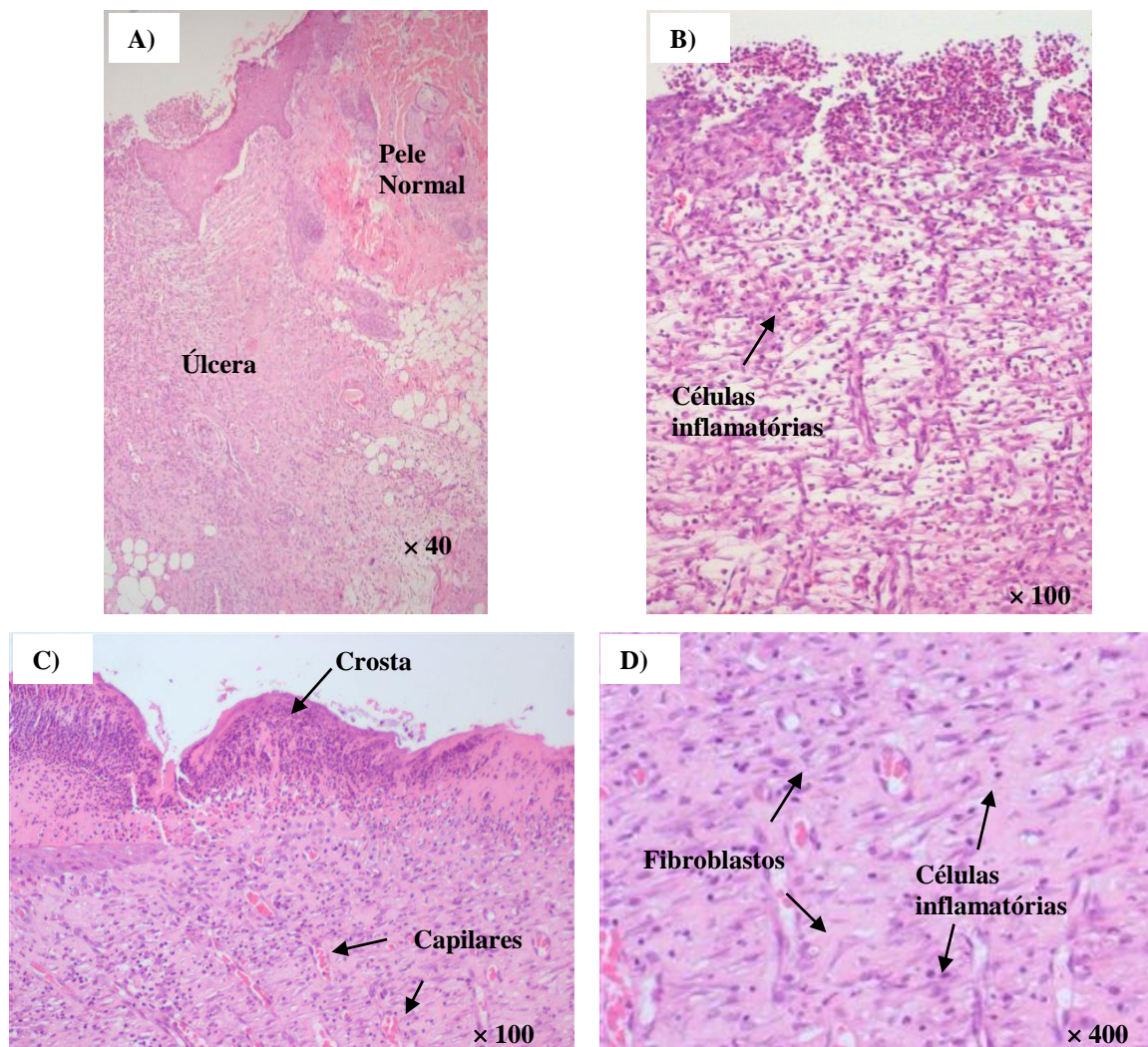
Figura 5. 29 Taxa de encerramento das feridas em função do tempo de cicatrização (1, 2 e 4 semanas) no estudo efectuado com as matrizes unitárias. Resultados comparados ao controlo. As linhas verticais representam o intervalo [média \pm incerteza].

De acordo com a Figura 5.29 observa-se, no geral, que a evolução do encerramento das feridas ocorre de forma semelhante nas matrizes e no controlo, com excepção do grupo da PCL onde, em média, o encerramento das feridas é um pouco mais lento. A PCL é um polímero mais resistente à degradação, não se integra tão bem na ferida e a matriz demora algum tempo a destacar-se da região lesada, o que faz com que a ferida não feche tão depressa.

Relativamente aos grupos CS e GEL o que os distingue é o tamanho da área re-epitelizada. No grupo da GEL a cicatriz formada é do tipo linha como a do controlo. Este tipo de cicatriz é característico de um encerramento dominado pelo fenómeno de contracção, onde a produção de novo tecido conjuntivo é mínima. Ao invés, nos ensaios realizados com a matriz de CS, a regeneração ocorreu com produção mais evidente de tecido conjuntivo resultando numa área re-epitelizada um pouco maior. Este resultado revela que o CS teve uma participação activa no processo de re-epitelização, embora limitada devido à elevada taxa de contracção do modelo animal utilizado.

5.1.3.2 Análise Histológica

Para finalizar o estudo *in vivo* das matrizes unitárias procedeu-se à análise histológica das biópsias removidas nos três períodos considerados. Na Figura 5.30 apresentam-se algumas imagens histológicas representativas do grupo controlo, ou seja, o grupo onde não foi aplicado qualquer material.



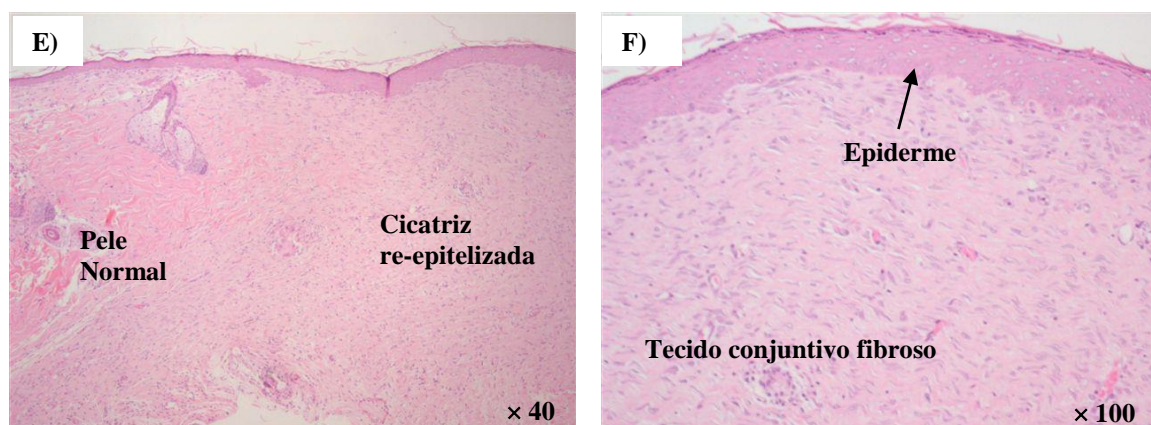


Figura 5. 30 Imagens de histologia, do grupo controlo, representativas da lesão infligida aos ratos à 1ª semana: a) transição úlcera/pele normal, b) superfície da úlcera acompanhada de processo inflamatório; à 2ª semana: c) superfície da úlcera com formação de crosta e proliferação de capilares, d) ampliação da zona ulcerada ainda com processo inflamatório e com proliferação de fibroblastos e 4ª semana: e) transição cicatriz re-epitelizada/pele normal, f) tecido de cicatriz fibroso e epiderme intacta.

Na primeira semana após a lesão as imagens histológicas do grupo controlo revelam uma região ulcerada ao nível da derme total (Figura 5.30 a) acompanhada por um processo inflamatório, representado pelo aparecimento de um grande número de células inflamatórias (Figura 5.30 b).

Duas semanas depois, a ferida está coberta por uma crosta e apresenta sinais de regeneração, evidenciados pela proliferação de capilares e a presença de fibroblastos. Nesta fase ainda se observam células inflamatórias (Figura 5.30 c e d).

Por fim, à quarta semana o tecido lesado é substituído por uma cicatriz fibrosa, sem anexos, com pouca reacção inflamatória e com a epiderme intacta (Figura 5.30 e e f).

O estudo seguinte consistiu na análise das experiências realizadas com a matriz de PCL. Os principais resultados podem observar-se na Figura 5.31.

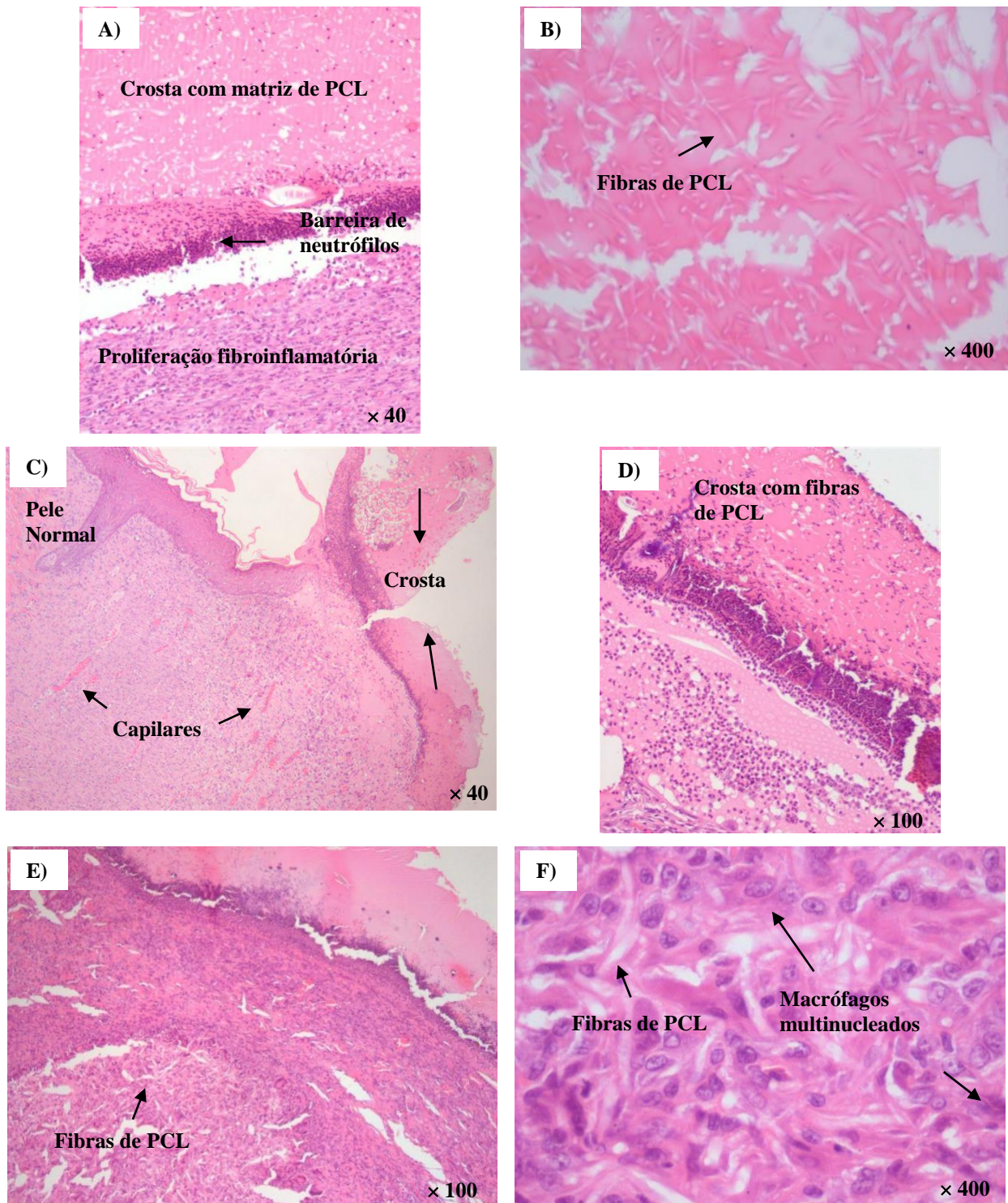


Figura 5. 31 Imagens de histologia, do grupo da PCL, representativas da lesão infligida aos ratos à 1ª semana: a) úlcera constituída por três camadas: 1- crosta com matriz de PCL, 2- neutrófilos e detritos celulares 3- proliferação fibroinflamatória de tecido, b) crosta com fibras de PCL; à 2ª semana: c) processo cicatricial da úlcera mais avançado apresentando as mesmas 3 camadas que em a), d) fibras de PCL na crosta e detritos celulares; e 4ª semana: e) cicatriz não re-epitelizada; fibras de PCL na base da úlcera, f) matriz de PCL e células histiocitárias.

No que diz respeito às experiências com a matriz de PCL a análise histológica realizada à primeira semana mostra que a ferida está coberta por uma crosta (fibrina) com matriz de PCL. Segue-se uma camada intermédia composta por uma barreira de neutrófilos e detritos celulares e por fim uma camada onde se destaca a proliferação de fibroblastos, capilares sanguíneos e células inflamatórias, à semelhança de um tecido de granulação (Figura 5.31 a e b).

Na segunda semana o processo de cicatrização está mais avançado, mantendo-se a proliferação fibroinflamatória de tecido, assim como a presença da matriz de PCL na crosta (Figura 5.31 c e d).

À quarta semana, o tecido de cicatriz ainda não está re-epitelizado (Figura 5.31 e). Para além disso, observou-se a presença de fibras de PCL na lesão (Figura 5.31 f) ou por migração da crosta para a base da úlcera ou porque neste corte (ou rato) ocorreu alguma integração da matriz na ferida a qual permanece à 4ª semana devido à taxa de degradação da PCL ser muito lenta. O corpo reagiu com a invasão de macrófagos (histiócitos), muitos dos quais multinucleados, indicando uma reacção de corpo estranho.

O trabalho prosseguiu com a análise histológica das biópsias das feridas onde foram aplicadas matrizes de CS. Algumas das imagens consideradas representativas podem ser visualizadas na Figura 5.32.

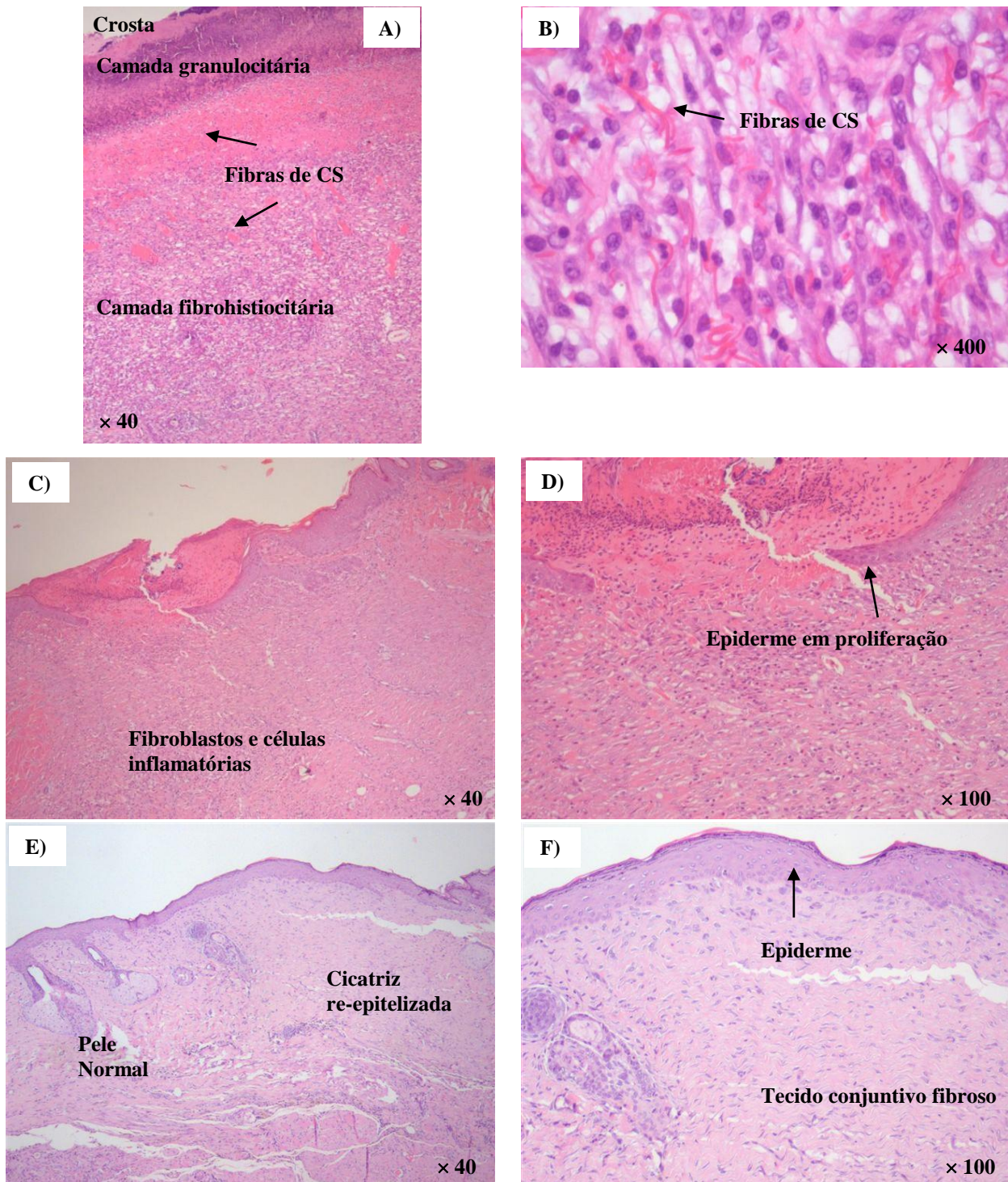


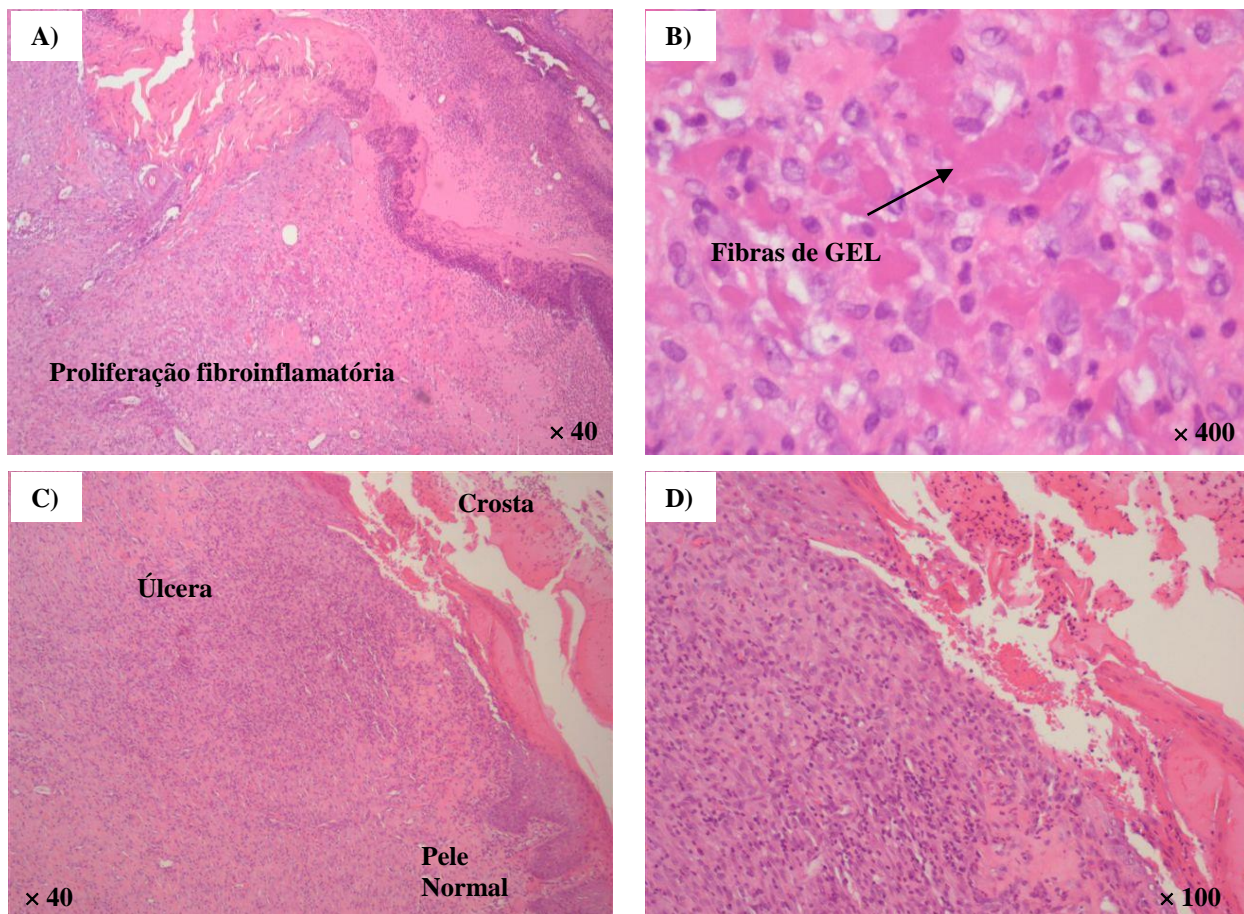
Figura 5. 32 Imagens de histologia, do grupo do CS, representativas da reparação da lesão infligida aos ratos à 1ª semana: a) região ulcerada composta por crosta, camada granulocitária e camada fibrohistiocitária onde está presente a matriz de CS, b) fibras de CS na camada fibrohistiocitária; à 2ª semana: c) processo cicatricial mais avançado, com mais proliferação fibroblástica e menos inflamatória, d) epiderme em proliferação sobre o tecido de granulação e por baixo da crosta a fechar a ferida; e 4ª semana: e) transição cicatriz re-epitelizada/pele normal f) tecido conjuntivo fibroso sem anexos e pouca reação inflamatória e epiderme intacta.

Analisando as imagens a) e b) da Figura 5.32, relativas à experiência com o CS, verifica-se que uma semana após o ferimento a região lesada é composta por três camadas: fibrina, camada granulocitária e camada fibrohistocitária. A matriz de CS encontra-se bem integrada na camada fibrohistocitária, sendo evidente pela presença de fibras (pequenos filamentos rosa vivo).

Na segunda semana observa-se um aumento da presença de fibroblastos e uma redução do número de células inflamatórias o que indica que a ferida está a cicatrizar. O epitélio encontra-se em processo de regeneração (Figura 5.32 c e d).

Finalmente, à quarta semana o processo de reparação da pele encontra-se concluído mas sem folículos pilosos.

O estudo *in vivo* das matrizes unitárias finalizou com a aplicação de matrizes de GEL. Novamente os três períodos foram investigados e as imagens obtidas resumem-se na Figura 5.33.



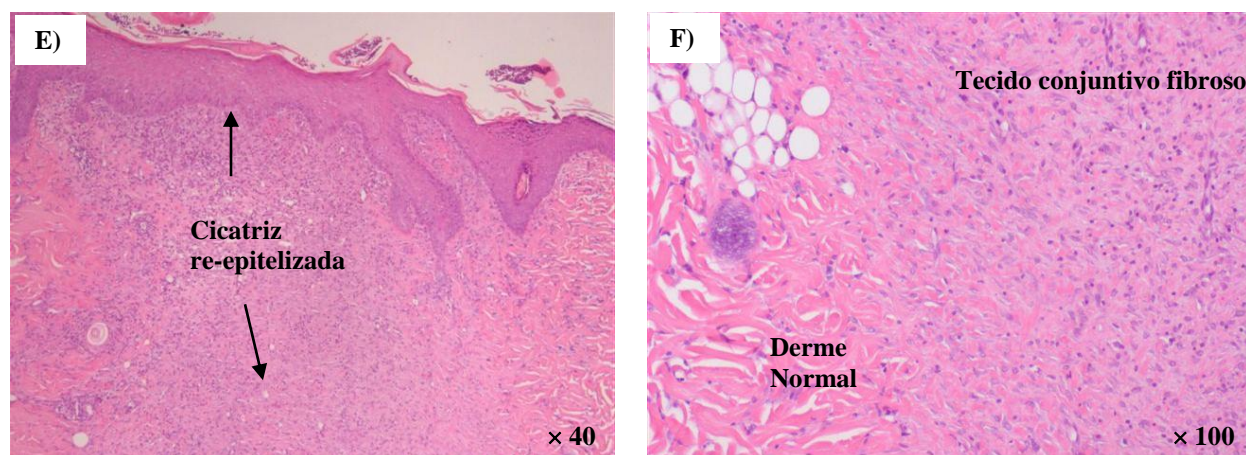


Figura 5. 33 Imagens de histologia, do grupo da GEL, representativas da lesão infligida aos ratos à 1ª semana: a) região ulcerada constituída por crosta, camada granulocitária e camada fibrohistiocitária; b) presença de fibras de GEL na camada fibrohistiocitária; à 2ª semana: c) transição pele normal/cicatriz ainda com pequena úlcera, d) fundo da pequena úlcera - fibroblastos e poucas células inflamatórias; e 4ª semana: e) área totalmente cicatrizada com ligeiro infiltrado inflamatório superficial, f) transição tecido conjuntivo fibroso/derme normal.

Relativamente à experimentação com a matriz de GEL as imagens histológicas referentes à primeira semana mostram igualmente uma região ulcerada constituída por crosta, fibroblastos e macrófagos que se encontram a digerir as fibras de GEL (Figura 5.31 a e b).

Na segunda semana, o processo de cicatrização continua, à semelhança do que acontece no grupo controlo. O processo inflamatório continua e a proliferação fibroblástica aumenta.

Por fim, à quarta semana, o tecido lesado encontra-se re-epitelizado, com pouca inflamação e sem anexos.

Em resumo, a análise macroscópica e histológica são complementares e permitiram estabelecer algumas conclusões acerca do desempenho destas matrizes *in vivo*. As principais diferenças a destacar estão relacionadas com a adesão dos materiais à ferida e a dimensão da área re-epitelizada após 4 semanas. Dos três materiais, a matriz de PCL é a menos aderente, consequência da sua natureza hidrofóbica. Ao invés, as matrizes de CS e de GEL apresentam boas propriedades de aderência. Estas últimas evidenciaram ainda uma boa integração na ferida logo após a primeira semana da lesão. A sua presença deixa de ser evidente na segunda semana o que indica que foram degradadas. Note-se que estes polímeros caracterizam-se por possuírem uma elevada taxa de degradação.

No estudo com a matriz de PCL a matriz ainda é visível na cicatriz à 4ª semana e encontra-se acompanhada de processo inflamatório com a presença de macrófagos multinucleados, característico de uma reacção de corpo estranho dado que, na fase inicial da degradação, este polímero é degradado lentamente por hidrólise não enzimática.

Após 4 semanas todas as feridas apresentaram uma cicatriz re-epitelizada, com excepção das cobertas com a matriz de PCL. Em todos os grupos analisados o encerramento das lesões é dominado pelo fenómeno de contracção, em virtude da elevada taxa de contracção do modelo animal utilizado. Apenas o grupo do CS apresentou indícios de promoção activa de re-epitelização, revelada por uma área de cicatriz maior (e não tipo linha).

5.2 Matrizes Binárias e Ternária

5.2.1 Produção e Caracterização

O interesse em combinar polímeros de origem diferente vem extensamente referido na literatura como uma possibilidade de se obterem novos biomateriais cujas propriedades permitem melhorar a bioactividade, através do encontro sinérgico entre topografia, nomeadamente diâmetro das fibras, propriedades mecânicas e sinais bioquímicos dos seus constituintes.

Embora a concepção deste tipo de matrizes seja considerada vantajosa, encontram-se registadas várias limitações no que diz respeito à miscibilidade dos polímeros, sobretudo devido à sua distinta natureza físico-química (por exemplo: hidrofóbica/hidrofílica, dissolução). Por isso, é muito frequente encontrar trabalhos referindo a formação de matrizes compósitas porosas, com separação ou segregação de fases devido a uma fraca interacção molecular entre os seus constituintes, podendo deste modo não ser favoráveis em termos de aplicação [166, 167]. Por estes motivos é essencial encontrar um solvente comum para assim preparar soluções homogéneas.

5.2.1.1 Matrizes de CS/PCL

A mistura de CS e PCL corresponde à situação em que a miscibilidade é um factor limitante pois existem poucos solventes comuns [168-170]. Apesar desta limitação, a electrofiação desta mistura vem descrita na literatura por alguns autores. Nomeadamente, foi reportada a formação de nanofibras compósitas usando como solvente a mistura de hexafluoro-2-propanol (HFIP), ácido trifluoracético (TFA) e diclorometano (DCM) [143], TFA/trifluoretanol (TFE) [171], ácido fórmico/acetona [18, 170] e ácido acético/ácido fórmico [172, 173]. Neste trabalho o solvente utilizado foi AcOH 90%.

Por forma a determinar a composição óptima de CS/PCL foi realizado um estudo preliminar em que se variou a concentração de CS desde 1,5% a 3% (m/m) para uma concentração de PCL de 2%, 5% e

10% (m/m). A pouca afinidade destes polímeros foi evidenciada pela separação de fases observada em todas as soluções preparadas. Conseguiu-se atenuar este efeito colocando as soluções em banho de ultrassons previamente à sua electrofiação, no entanto verificou-se que estas não eram electrofiáveis. Partindo então do facto da solução de composição CS 2% PEO 0,25% ser electrofiável neste solvente (independentemente da utilização do banho de ultrassons) considerou-se esta como base, à qual o PCL seria adicionado. A concentração de PCL estabeleceu-se igual à de CS, ou seja 2%. As propriedades físicas desta solução de interesse para a electrofiação foram medidas e apresentam-se na Tabela 5.17.

Tabela 5. 17 Viscosidade (η), tensão superficial (γ), e condutividade eléctrica (σ) da solução CS 2% PCL 2% PEO 0,25% em AcOH 90%. Para comparação apresentam-se as propriedades da solução CS 2% PEO 0,25% preparada no mesmo solvente. Valores apresentados como média \pm desvio padrão.

Solução	η^a (Pa.s)	γ (mN/m)	σ (μ S/cm)
CS/PCL	8,46	$30,2 \pm 0,4$	234 ± 6
CS	7,63	$31,5 \pm 0,4$	258 ± 3
AcOH 90%	$0,002386^b$	$29,1 \pm 0,3$	14 ± 1

^a Valores extraídos das curvas de fluxo para uma taxa de corte de $0,5 \text{ s}^{-1}$.

^b Valor tabelado: *Handbook of Chemistry and Physics, David R. Lide, 85th Edition, 2004-2005.*

Como se verifica na Tabela 5.17, a adição da PCL à solução de CS reflectiu-se numa ligeira variação das propriedades desta. A adição de PCL 2% provocou um aumento da concentração total de polímero na solução e, conseqüentemente, um aumento de viscosidade. Por outro lado, a condutividade diminuiu, ou seja a concentração ou a mobilidade (ou ambos) dos portadores de carga diminuiu na solução, o que sugere uma interacção entre os polímeros. A variação da tensão superficial é pouco significativa. Como a adição da PCL nesta concentração não afectou significativamente as propriedades da solução, esta foi fiada com os mesmos parâmetros usados para a solução de CS, ou seja, 18 kV, 25 cm e 0,3 ml/h. Também se estabeleceu que as deposições seriam realizadas ao 2º dia após a preparação da solução.

A Figura 5.34 apresenta imagens de MEV mostrando a morfologia das fibras depositadas com as soluções CS/PCL e de CS. A estabilidade das fibras CS/PCL em meio de cultura foi também avaliada.

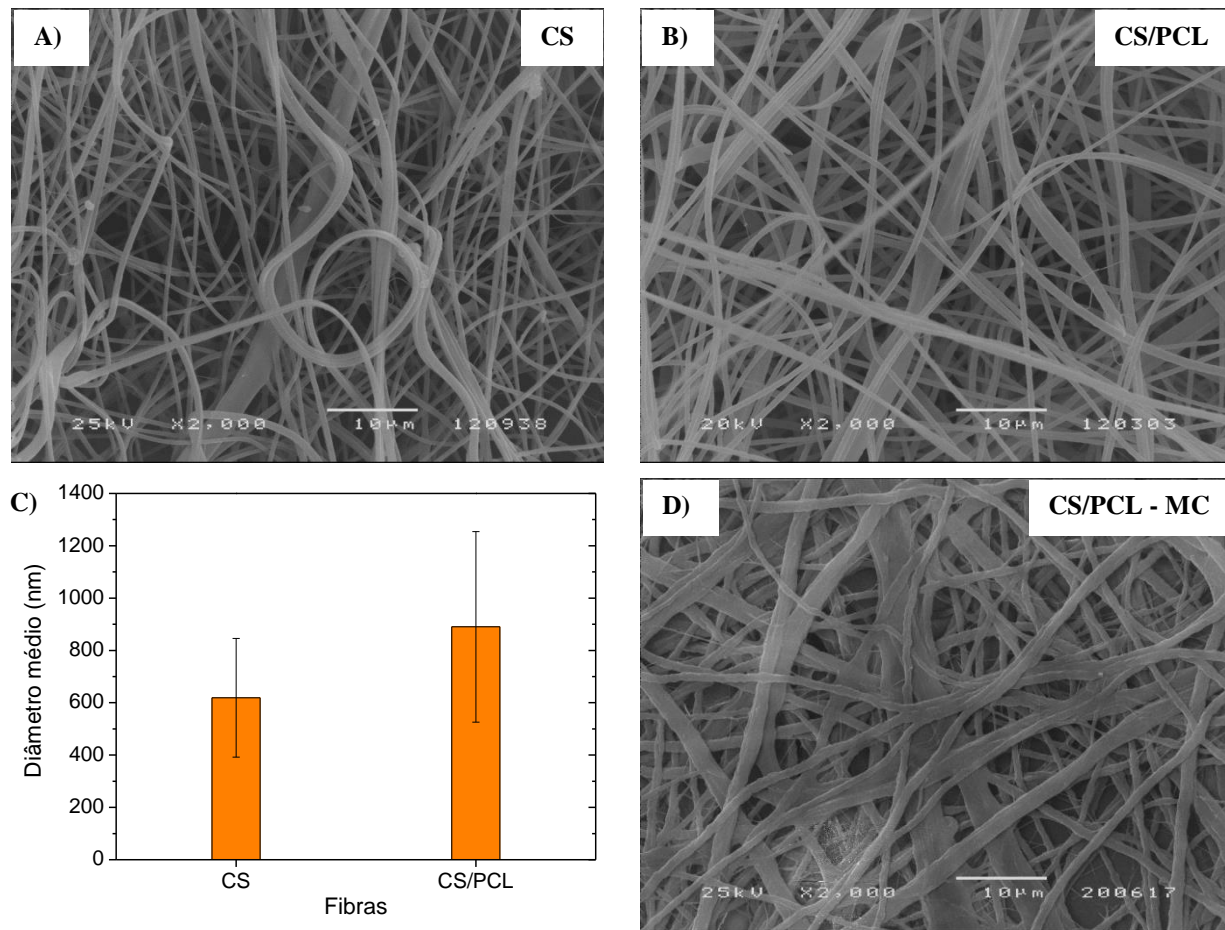


Figura 5. 34 Imagens de MEV das fibras depositadas com as soluções de a) CS e b) CS/PCL. c) Diâmetro médio das fibras depositadas com estas soluções. As linhas verticais representam o intervalo [média \pm desvio padrão]. d) Imagem de MEV das fibras de CS/PCL após imersão em meio de cultura durante 3 dias.

Tal como era esperado, a adição da PCL à solução de CS aumenta o diâmetro médio das fibras de 619 nm para 890 nm, resultado de um acréscimo da viscosidade causado por um aumento da concentração total de polímero na solução.

Relativamente à estabilidade das fibras de CS/PCL em meio de cultura verifica-se que a morfologia se mantém mesmo após imersão durante 3 dias no referido meio.

A presença de CS e PCL na matriz compósita foi avaliada por FTIR-ATR através da identificação dos picos característicos dos seus grupos funcionais. A Figura 5.35 apresenta os espectros adquiridos nas três matrizes, CS/PCL, CS e PCL 23% (PCL) após electrofiação, e ainda o espectro da matriz de CS/PCL após imersão em meio de cultura durante 3 dias.

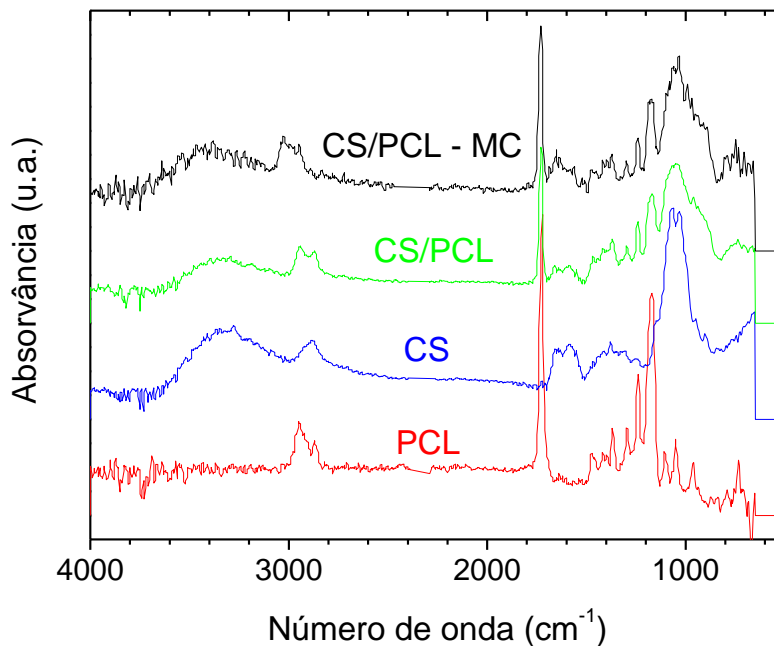


Figura 5. 35 Espectros FTIR-ATR das matrizes de CS/PCL, CS e PCL após electrofiação e da de CS/PCL após imersão em meio de cultura durante 3 dias (CS/PCL - MC).

Na matriz CS/PCL são evidentes as principais bandas que caracterizam o CS e a PCL:

- o estiramento da ligação C=O do grupo éster da PCL a 1724 cm^{-1} ;
- os estiramentos assimétrico e simétrico da ligação C-O-C da PCL, localizados a 1240 cm^{-1} e 1170 cm^{-1} , respectivamente;
- a 3400 e 3100 cm^{-1} a banda correspondente ao estiramento dos grupos OH e N-H do CS;
- a 1680 cm^{-1} o estiramento do C=O (amida I) do CS;
- a 1544 cm^{-1} a deformação da ligação N-H da amina primária e a banda amida II do CS;
- as bandas de ressonância entre 1150 e 1000 cm^{-1} características da estrutura sacarídea do CS.

Não foram observados outros picos para além dos característicos da PCL e do CS, indicando que não se estabeleceu uma ligação covalente nova entre os dois polímeros [171]. Em princípio, permanecem interações físicas, tais como ligações por pontes de hidrogénio entre os grupos carbonilo da PCL e os hidroxilos ou os grupos amina protonados do CS [171].

A etapa seguinte consistiu na determinação da capacidade de inchamento da matriz de CS/PCL em água. Os resultados obtidos mostram-se na Figura 5.36 e comparam-se com a matriz de CS.

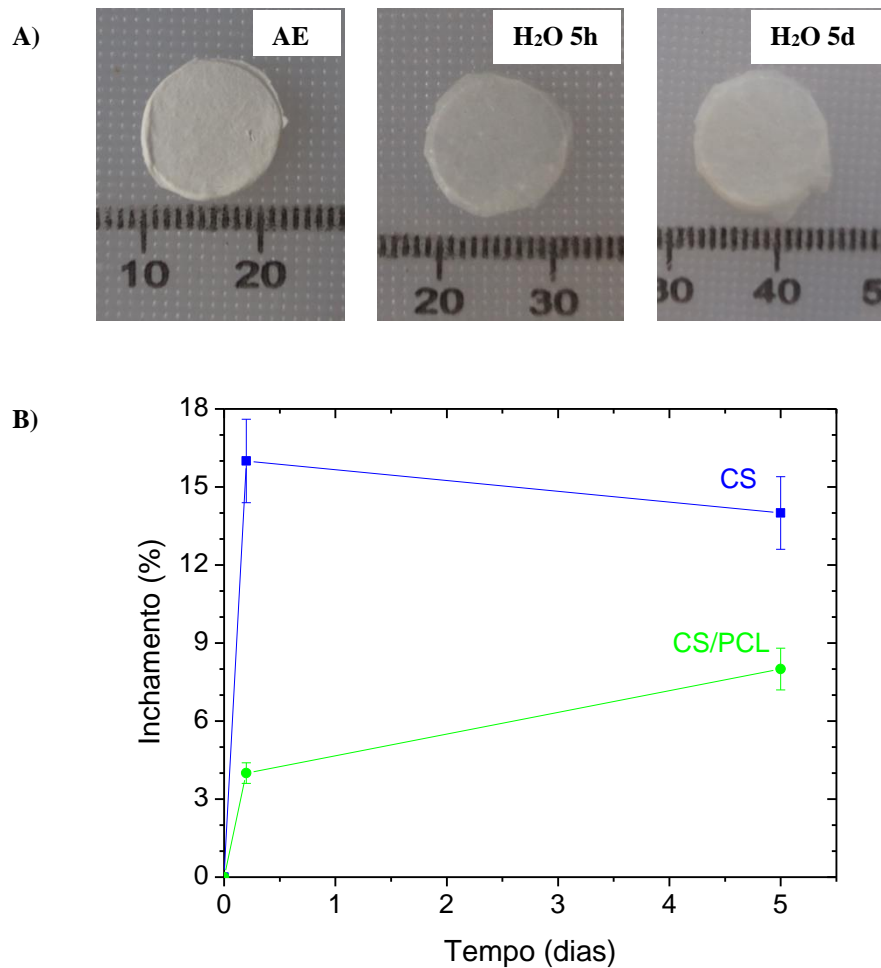


Figura 5. 36 Matriz de CS/PCL após electrofiação (AE) e após imersão em água destilada durante 5 h (H₂O 5h) e 5 dias (H₂O 5d) (a). Variação das dimensões das matrizes de CS/PCL e CS em função do tempo de permanência em água. As barras verticais representam o intervalo [valor médio ± incerteza] (b).

Como se observa nas imagens da Figura 5.36 a matriz mantém-se opaca em água, tal como sucede com a matriz de PCL. Relativamente ao inchamento em água verifica-se que a adição da PCL à matriz de CS reduz o seu grau de inchamento em cerca de 43%.

A matriz de CS/PCL foi ainda caracterizada quanto ao ângulo de contacto, porosidade e propriedades mecânicas em termos do módulo de Young (E), tensão (σ_R) e deformação (ϵ_R) à ruptura. Os valores obtidos encontram-se resumidos na Tabela 5.18 juntamente com os valores obtidos na matriz CS e na matriz de PCL 23% (PCL), com ambos os polímeros dissolvidos no solvente utilizado na matriz compósita.

Tabela 5. 18 Ângulo de contacto, porosidade e propriedades mecânicas determinados nas matrizes de CS/PCL, CS e PCL. Valores apresentados como média \pm desvio padrão.

Matriz	θ (°)	Porosidade (%)	E (MPa)	σ_R (MPa)	ϵ_R (%)
CS/PCL	0	71 \pm 12	43 \pm 9	2,7 \pm 0,8	22 \pm 3
CS	0	72 \pm 3	38 \pm 10	4,5 \pm 1,8	28 \pm 6
PCL	132 \pm 4	88 \pm 2	7,1 \pm 0,5	3,2 \pm 0,5	81 \pm 12

Da análise da Tabela 5.18 verifica-se que as propriedades da matriz compósita são fortemente dominadas pela presença de CS. A superfície da matriz de CS/PCL é hidrofílica, mostrando um ângulo de contacto de 0° (desaparecimento da gota em *ca.* de 4-5 s), tal como sucede na matriz de CS. Também a porosidade e as propriedades mecânicas, sobretudo o módulo de Young e a deformação à ruptura, seguem a mesma tendência.

Em suma, o estudo realizado com a matriz de CS/PCL permitiu concluir que ambos os polímeros, CS e PCL, estão presentes e coexistem na mistura. No que diz respeito à PCL, a presença desta componente é evidente na morfologia das fibras depositadas, originando fibras mais espessas, assim como a opacidade e a menor taxa de inchamento que a matriz compósita apresenta em água. No entanto verifica-se que as suas propriedades são fortemente dominadas pela fase do CS. Mediante estes resultados, indicativos de um suporte com propriedades promissoras para a aplicação pretendida, prosseguiu-se com esta matriz para os testes *in vitro*.

5.2.1.2 Matrizes de PCL/GEL

Considerando as características semelhantes da GEL e do CS (hidrofílicos e polielectrólitos), também os polímeros PCL e GEL são imiscíveis [167]. Apesar das dificuldades que daí advêm, a electrofiação desta mistura encontra-se descrita na literatura, sendo o TFE o solvente mais utilizado. O TFE é um solvente que dissolve os polímeros individualmente formando soluções transparentes, mas a mistura origina soluções opacas com tendência para ocorrer separação de fases quando deixada em repouso algumas horas [166, 167]. Outro solvente utilizado com esta característica é a mistura clorofórmio/metanol/ácido acético [20]. No entanto nesse caso, as soluções foram preparadas e electrofiadas enquanto emulsão e analisadas as suas propriedades (ignorando a separação de fases).

A mistura PCL/GEL pode ser utilizada para tirar partido do facto da gelatina se dissolver em meio aquoso permitindo a produção de fibras porosas [167] ou aumentar a porosidade melhorando a migração celular [145] ou para conjugar as propriedades de ambos os polímeros no sentido de melhorar a adesão celular e as propriedades mecânicas e diminuir a taxa de degradação das matrizes.

No trabalho que aqui se apresenta a PCL e a GEL foram dissolvidas num sistema de ácido acético/água. Os polímeros foram misturados numa proporção 1:1, usando 10% (m/m) de cada um, uma concentração frequentemente utilizada noutros trabalhos [5, 145, 167]. O rácio do solvente foi estabelecido num estudo preliminar em que se observou a deposição de fibras mais uniformes e com um menor número de defeitos usando AcOH 95% / H₂O 5%. Para esta observação, foi determinante o facto de se colocarem as soluções num banho de ultra-sons durante pelo menos 1h, pois permite uma melhor homogeneização da mistura. As soluções formadas são opacas, conseguindo-se manter uma emulsão durante 2 horas (Figura 4.37 a), momento a partir do qual tem início a separação de fases, sendo esta total após 6 h (Figura 5.37 b). Tal como nas restantes soluções em estudo, também algumas das propriedades físicas da solução de PCL/GEL (antes de se observar a separação de fases) foram medidas encontrando-se resumidas na Tabela 5.19.

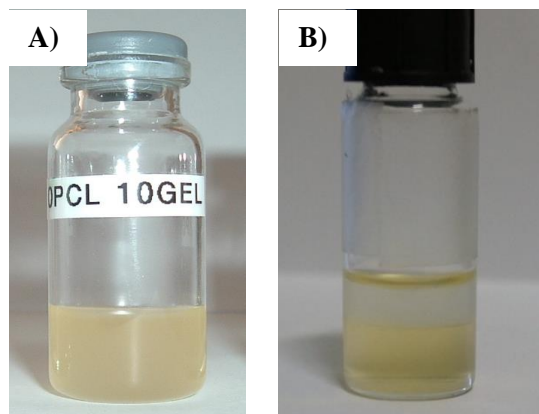


Figura 5. 37 Solução PCL 10% GEL 10% após: a) agitação magnética e 1 h em ultrassons e b) deixada em repouso 6 h. Observa-se separação de fases: em cima PCL e em baixo GEL.

Tabela 5. 19 Viscosidade (η), tensão superficial (γ), e condutividade eléctrica (σ) da solução PCL 10% GEL 10% em AcOH 95%. Para comparação apresentam-se as propriedades da solução de PCL 23% dissolvido no mesmo solvente (a solução de GEL não foi estudada neste solvente). Valores apresentados como média \pm desvio padrão.

Solução	η (Pa.s)	γ (mN/m)	σ (μ S/cm)
PCL/GEL	$1,3 \pm 0,2$	$31,1 \pm 0,4$	243 ± 3
PCL	$4,6 \pm 0,5$	$32,6 \pm 0,3$	$0,50 \pm 0,05$
AcOH 95%	$0,001813^a$	$28,5 \pm 0,4$	$2,45 \pm 0,04$

^a Valor tabelado: *Handbook of Chemistry and Physics, David R. Lide, 85th Edition, 2004-2005.*

De notar que a solução de PCL apresentada na Tabela 5.19 foi preparada com 23%, uma concentração superior à utilizada na mistura PCL/GEL. Em termos de viscosidade este facto resulta num valor superior, mas em relação às restantes propriedades o impacto da diferente concentração de PCL é pouco significativo. Nesse sentido, considerou-se adequada para comparação.

Como se verifica pelos dados obtidos, a adição de GEL à solução de PCL afecta significativamente a sua condutividade, o que seria de esperar atendendo ao carácter polielectrólito deste polímero. Já a tensão superficial praticamente não varia. Relativamente à viscosidade, é também esperado que aumente, visto que a concentração total de polímero aumentou (não foram feitas medidas de viscosidade em soluções de PCL 10% ou GEL 10% para uma comparação directa).

Foram utilizadas as mesmas condições de processamento da solução de CS, ou seja, 18 kV, 25 cm e 0,3 ml/h. Estabeleceu-se também que as deposições seriam realizadas ao 2º dia após a preparação da solução tal como aconteceu com as soluções de CS. As deposições obtidas não apresentavam defeitos nem ao nível macroscópico nem quando observadas ao microscópio óptico.

A Figura 5.38 apresenta a morfologia das fibras depositadas com a solução PCL/GEL. As soluções preparadas com PCL 10% ou GEL 10%, não são electrofiáveis neste solvente, por serem pouco viscosas. O aumento de concentração de polímero na solução origina uma solução mais viscosa com a qual foi possível observar a deposição de fibras. Nesta mesma figura encontra-se o diâmetro médio das fibras depositadas com esta solução compósita, o qual se compara aos obtidos com as soluções de PCL 23% em AcOH 95% e GEL 25% em AcOH 90%.

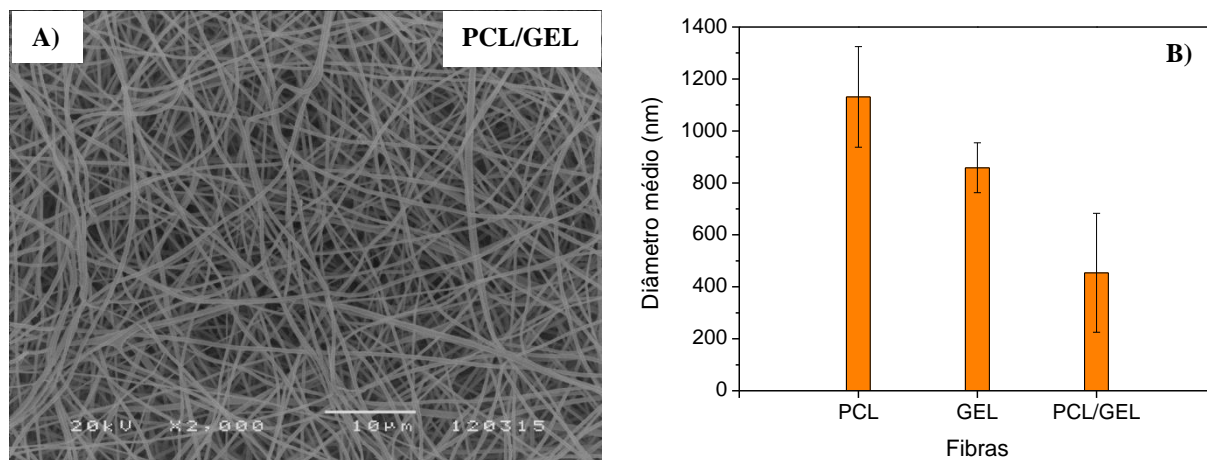


Figura 5.38 Imagem de MEV das fibras depositadas com a solução PCL/GEL (a). Comparação do diâmetro médio das fibras depositadas com esta solução composta e com as soluções PCL 23% e GEL 25%. As linhas verticais representam o intervalo [valor médio \pm desvio padrão]. (b).

A solução de PCL 10% GEL 10% produz fibras sem contos e de diâmetros relativamente reduzidos, *ca.* (454 \pm 229) nm, um valor significativamente menor do que usando os polímeros individualmente mas com uma percentagem de polímero apenas ligeiramente superior. Numa publicação recente [166] em que a mesma concentração de polímeros foi usada mas dissolvidos em TFE os autores verificaram que a adição de uma pequena percentagem de AcOH à solução permitia electrofiar fibras com diâmetro médio mais reduzido. Naquele caso a redução foi atribuída à alteração das propriedades da solução resultante da presença de AcOH. No caso particular deste trabalho a redução observada também deverá estar associada às propriedades da solução, nomeadamente à baixa viscosidade e à elevada condutividade, permitindo um maior estiramento do jacto. Note-se que o valor da condutividade da solução de CS/PCL é semelhante a este porém é uma solução mais viscosa, resultando por isso na deposição de fibras mais grossas.

A presença de PCL e de GEL na matriz composta foi avaliada por FTIR-ATR. Sendo a GEL um polímero solúvel em água, a estabilidade química das fibras compostas em água foi também averiguada por esta técnica. A Figura 5.39 apresenta os espectros de infravermelho das matrizes de PCL, GEL e PCL/GEL após electrofiação e ainda desta última após imersão em água durante 1 dia.

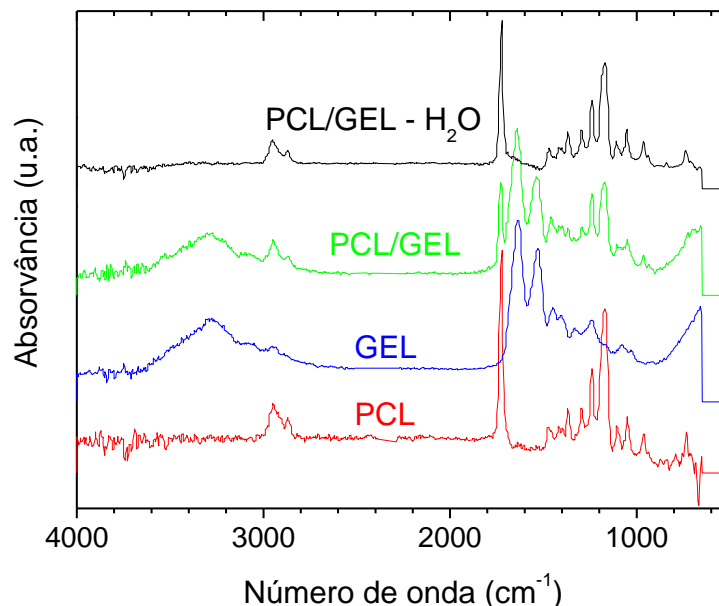


Figura 5. 39 Espectros de FTIR-ATR das matrizes de PCL/GEL, GEL e PCL após electrofiação e da de PCL/GEL após imersão em água durante 1 dia (PCL/GEL – H₂O).

Na matriz de PCL/GEL as bandas características da GEL e da PCL estão presentes, não se observando o aparecimento de outros picos, indicando, tal como na matriz de CS/PCL, para a não formação de novas ligações covalentes.

A imersão da matriz compósita em água mostra o desaparecimento da componente de gelatina, reforçando a necessidade de reticulação da matriz. Esta observação contraria alguns comentários encontrados na literatura que referem a utilização de PCL como um método que evita a reticulação das matrizes dada a sua tolerância a soluções aquosas [174].

Deste modo, a etapa seguinte consistiu na reticulação desta matriz em vapor de GTA. O tempo de exposição escolhido foi de 2 h, ou seja, o tempo de reticulação mínimo necessário para reticular a matriz de gelatina produzida neste trabalho. Na Figura 5.40 apresentam-se imagens de MEV de fibras de PCL/GEL reticuladas por GTA antes e depois de imersas em meio de cultura durante 3 dias.

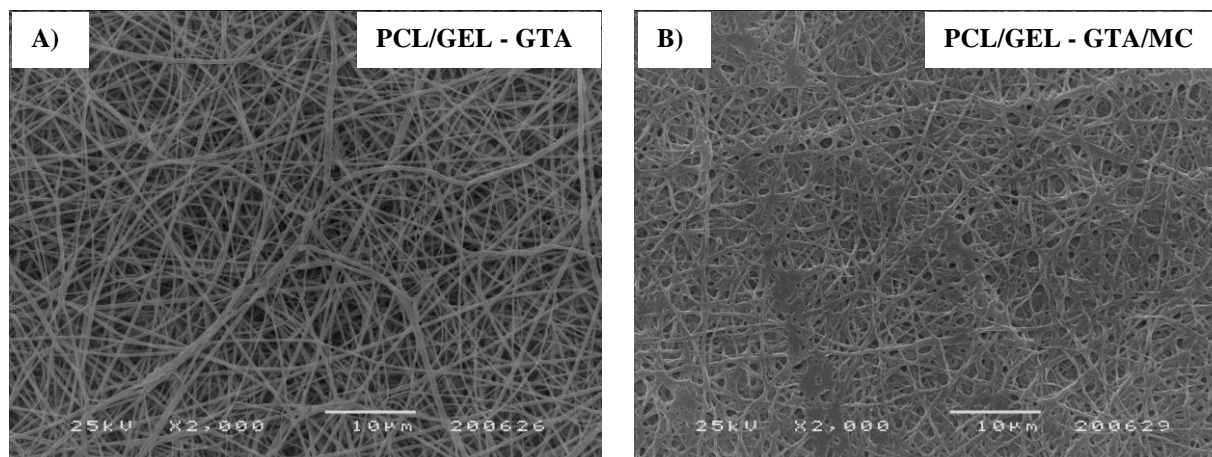


Figura 5. 40 Imagens de MEV das fibras de PCL/GEL reticuladas com GTA durante 2 h a) após o processo de reticulação e b) após imersão em meio de cultura durante 3 dias.

De acordo com a imagem da Figura 5.40 a) o processo de reticulação não altera a morfologia das fibras, que mantêm sem variações significativas o valor do diâmetro médio ($D_{med} = 424 \pm 177$ nm). O mesmo não se observa na Figura 4.40 b) onde ocorre uma redução do tamanho médio dos poros, causada por alguma fusão das fibras resultante do inchamento da gelatina após imersão em meio de cultura. No entanto, é necessário salientar que esta figura não mostra a verdadeira morfologia das fibras e a estrutura da matriz em meio de cultura mas sim após secagem, o que pode alterar significativamente a matriz que aparentemente assume uma estrutura muito mais compacta.

Com o intuito de inferir sobre uma eventual alteração química na estrutura da matriz compósita induzida pelo processo de reticulação e/ou imersão em meio de cultura, as matrizes foram novamente caracterizadas por FTIR-ATR. Os espectros obtidos apresentam-se na Figura 5.41.

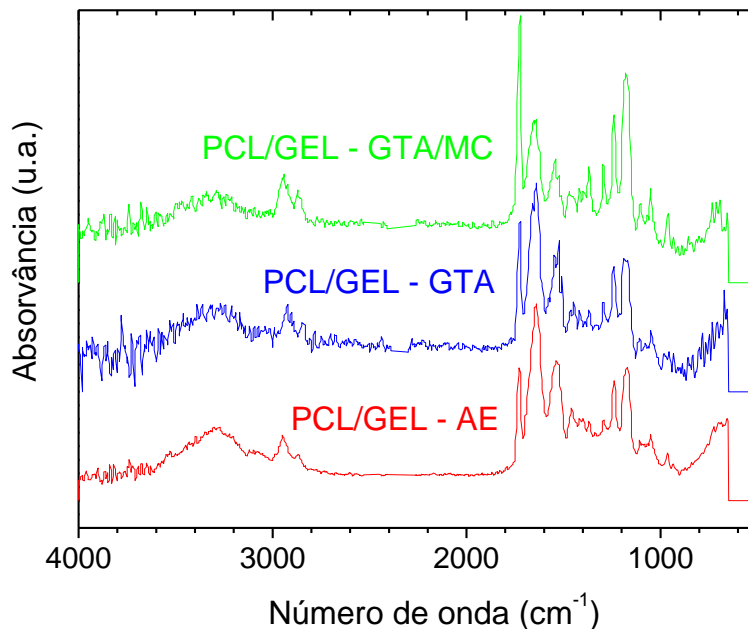


Figura 5. 41 Espectros FTIR-ATR das matrizes de PCL/GEL após electrofiação (PCL/GEL - AE) e após reticulação com GTA, antes e depois de imersão em meio de cultura durante 3 dias (PCL/GEL - GTA e PCL/GEL - GTA/MC, respectivamente).

Como se observa, as principais bandas da PCL e da GEL continuam presentes na matriz compósita reticulada antes e após imersão em meio de cultura. Porém, após imersão em meio de cultura, os picos característicos da gelatina, a 1640 cm⁻¹ (estiramento C=O, amida I) e a 1530 cm⁻¹ (deformação angular NH e estiramento C-N, amida II) diminuíram significativamente de intensidade face ao pico característico da PCL, a 1724 cm⁻¹ (estiramento da ligação C=O do grupo éster), o que indica que houve uma dissolução parcial da GEL. O facto de não surgirem novos picos significa que não são estabelecidas novas ligações e que ambos os processos não afectam a estrutura química da matriz, na gama do infravermelho.

O passo seguinte consistiu na análise da capacidade de inchamento da matriz PCL/GEL reticulada por GTA durante 2 h em água. Na Figura 5.42 podem ser visualizados os resultados obtidos, os quais se comparam com os das matrizes de PCL e GEL reticulada nas mesmas condições.

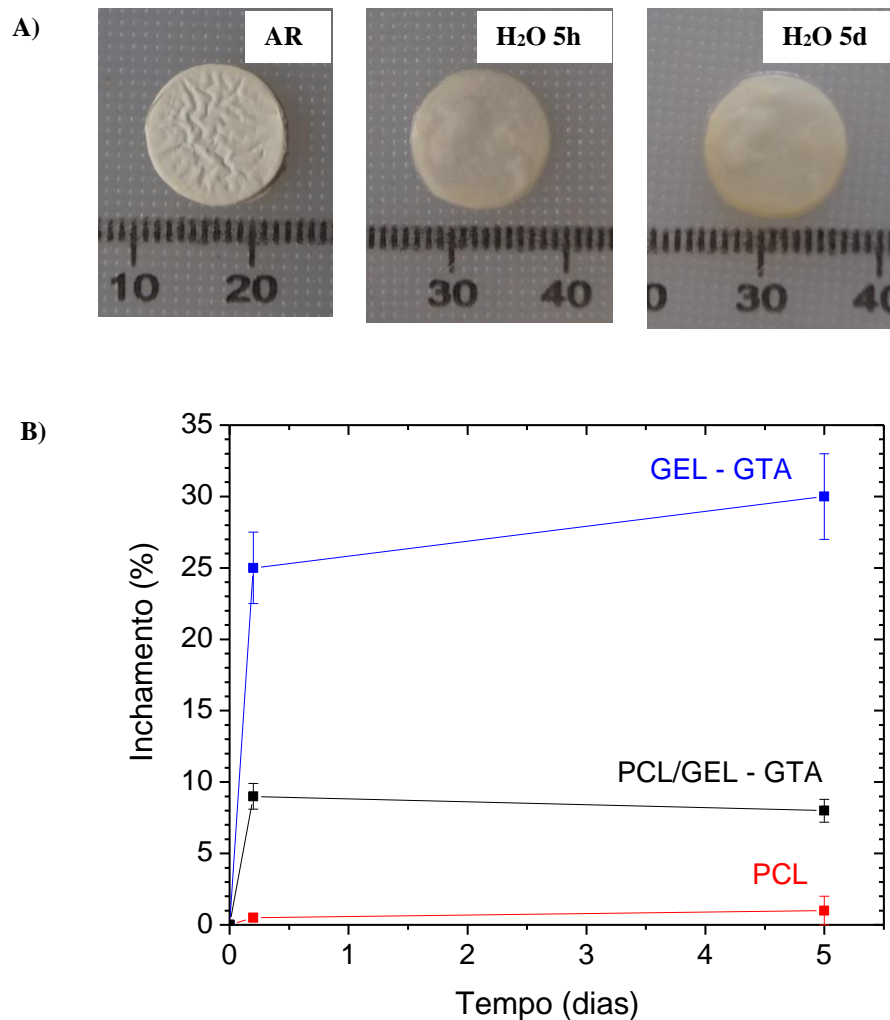


Figura 5. 42 Matriz de PCL/GEL após reticulação em vapor de GTA durante 2 h (AR) e posterior imersão em água destilada durante 5 h (H₂O 5h) e 5 dias (H₂O 5d) (a). Variação das dimensões das matrizes de PCL/GEL e GEL, ambas reticuladas em GTA durante 2 h, e da matriz de PCL em função do tempo de permanência em água. As barras verticais representam o intervalo [valor médio \pm incerteza] (b).

Conforme se verifica na figura anterior, a opacidade desta matriz mantém-se em água, revelando as características da PCL. No que diz respeito à capacidade de inchamento, a PCL tem um papel dominante sendo responsável por uma redução da taxa de inchamento da GEL em cerca de 73%.

Na continuidade do estudo realizado, a matriz compósita reticulada foi caracterizada quanto ao ângulo de contacto, porosidade e propriedades mecânicas em termos do módulo de Young (E), tensão (σ_R) e deformação (ϵ_R) à ruptura. Os valores medidos encontram-se resumidos na Tabela 5.20 e são comparados com os das matrizes de PCL 23% em AcOH 95% e GEL 25% em AcOH 90% reticulada por GTA durante 2 h.

Tabela 5. 20 Ângulo de contacto, porosidade e propriedades mecânicas determinados nas matrizes de PCL/GEL – GTA, PCL e GEL - GTA. Valores apresentados como média \pm desvio padrão.

Matriz	θ (°)	Porosidade (%)	E (MPa)	σ_R (MPa)	ϵ_R (%)
PCL/GEL - GTA	58 ± 3	90 ± 1	20 ± 5	$1,0 \pm 0,3$	20 ± 10
PCL	134 ± 2	84 ± 5	$5,4 \pm 0,8$	*	> 500
GEL - GTA	0	87 ± 3	30 ± 4	$0,8 \pm 0,2$	8 ± 3

* As matrizes não partiram no percurso do aparelho.

Embora as matrizes de PCL e de GEL tenham sido processadas em condições que não são directamente comparáveis com as da matriz compósita, os valores apresentados permitem concluir que esta exibe propriedades intermédias entre os dois constituintes. Em termos de propriedades superficiais a matriz de PCL/GEL é hidrofílica como a matriz de GEL, embora apresente um ângulo de contacto superior, *ca.* de (58 ± 3) °. Trabalhos realizados por outros autores também mencionam o carácter hidrofílico desta matriz, mas no seu caso mediram 0 ° [144, 145, 166]. A porosidade estimada também é a típica da sua estrutura.

Em termos mecânicos é possível verificar que a combinação de PCL com GEL não permitiu a formação de um material tão dúctil quanto o PCL, mas também não tão rígido quanto a GEL, tal como se observa pelo valor do módulo de Young e deformação máxima desta matriz. Outros grupos de investigação referem a mesma tendência [144, 145] sugerindo que o pouco domínio da PCL nas propriedades mecânicas dever-se-á a fenómenos de imiscibilidade e separação de fases a nível micrométrico, resultando num menor entrelaçamento e interações físicas fracas entre as cadeias poliméricas [145].

Portanto, enquanto matriz compósita, observou-se que a PCL e a GEL estão presentes na matriz, porém não há indicação para a formação de novas ligações covalentes, sugerindo uma interação mais fraca, do tipo pontes de hidrogénio ou interações de van der Waals, entre as cadeias poliméricas. As propriedades da matriz reflectem a mistura das propriedades dos compostos originais. Esta matriz seguiu para os testes *in vitro* para ser avaliada em termos de resposta biológica.

5.2.1.3 Matrizes de CS/GEL

O interesse em misturar dois polímeros naturais como o CS e a GEL advém da possibilidade de se poder formar uma matriz com actividade biológica melhorada uma vez que combina propriedades antimicrobiana e de facilitador da regeneração do CS com propriedades da GEL que promovem a adesão e migração celular, as quais, como já anteriormente mencionado, são muito relevantes em termos de aplicação como substitutos de pele [175]. Ambos os polímeros são polielectrólitos e podem formar um complexo polielectrólito (PEC) através da interacção electrostática entre os grupos amina protonados, NH_3^+ , do quitosano e os iões carboxilato, COO^- , da gelatina [19, 176, 177]. No entanto, o CS e a GEL são polímeros muito polares, sendo por isso pouco solúveis na maioria dos solventes orgânicos. Além disso, o carácter polielectrólito e a elevada condutividade torna difícil a sua electrofiação. A maioria dos autores encontrou no TFA um bom co-solvente destes polímeros pois forma sais com os grupos amina [175, 176, 178]. A formação de sais destrói as interacções rígidas existentes entre as moléculas dos polímeros permitindo a sua electrofiação. Acresce que a elevada volatilidade deste solvente permite uma rápida solidificação das fibras [176]. Outro solvente referido com sucesso foi o ácido acético diluído (< 40% AcOH) [19]. Em ambos os casos é possível obter fibras uniformes e sem defeitos usando soluções preparadas com uma maior percentagem de GEL face à de CS [19, 175, 176].

Neste estudo o solvente adoptado foi AcOH 90%. A solução formada é homogénea, porém, em termos de electrofiação, a adição de PEO revelou-se fundamental. Partindo do facto da solução de composição CS 2% PEO 0,25% ser electrofiável neste solvente, considerou-se esta como base, à qual a GEL seria adicionada. A concentração de GEL estabeleceu-se igual à de CS, ou seja 2% (m/m). A solução formada era muito viscosa e por isso reduziu-se a concentração de PEO para 0,15% (m/m). À semelhança do realizado com as soluções mencionadas nas secções anteriores, as propriedades físicas de interesse para a electrofiação desta solução foram medidas e encontram-se resumidas na Tabela 5.21.

Tabela 5. 21 Viscosidade (η), tensão superficial (γ), e condutividade eléctrica (σ) da solução CS 2% GEL 2% PEO 0,15% em AcOH 90% e da solução de CS 2% PEO 0,25% preparada no mesmo solvente. Valores apresentados como média \pm desvio padrão.

Solução	η^a (Pa.s)	γ (mN/m)	σ ($\mu\text{S/cm}$)
CS/GEL	14,96	$32,9 \pm 0,9$	290 ± 3
CS	7,63	$31,5 \pm 0,4$	258 ± 3
90% AcOH	0,002386 ^b	$29,1 \pm 0,3$	14 ± 1

^a Valores extraídos das curvas de fluxo para uma taxa de corte de $0,5 \text{ s}^{-1}$.

^b Valor tabelado: *Handbook of Chemistry and Physics, David R. Lide, 85th Edition, 2004-2005.*

A adição de GEL à solução de CS reflectiu-se num aumento significativo da viscosidade, resultado que se explica não só por um aumento da concentração total de polímero na solução, mas também pela interacção entre ambos os polímeros que conduz à formação de um complexo polielectrólito [176]. A condutividade também aumenta ligeiramente, facto atribuído à formação de um sal [176, 178]. A tensão superficial mantém-se. Apesar das diferenças esta solução foi fiada com os mesmos parâmetros usados para a solução de CS, ou seja, 18 kV, 25 cm e 0,3 ml/h. Também se estabeleceu que as deposições seriam realizadas ao 2º dia após a preparação da solução.

A Figura 5.43 apresenta imagens de MEV mostrando a morfologia das fibras depositadas com as soluções de CS e CS/GEL assim como os respectivos diâmetros médios.

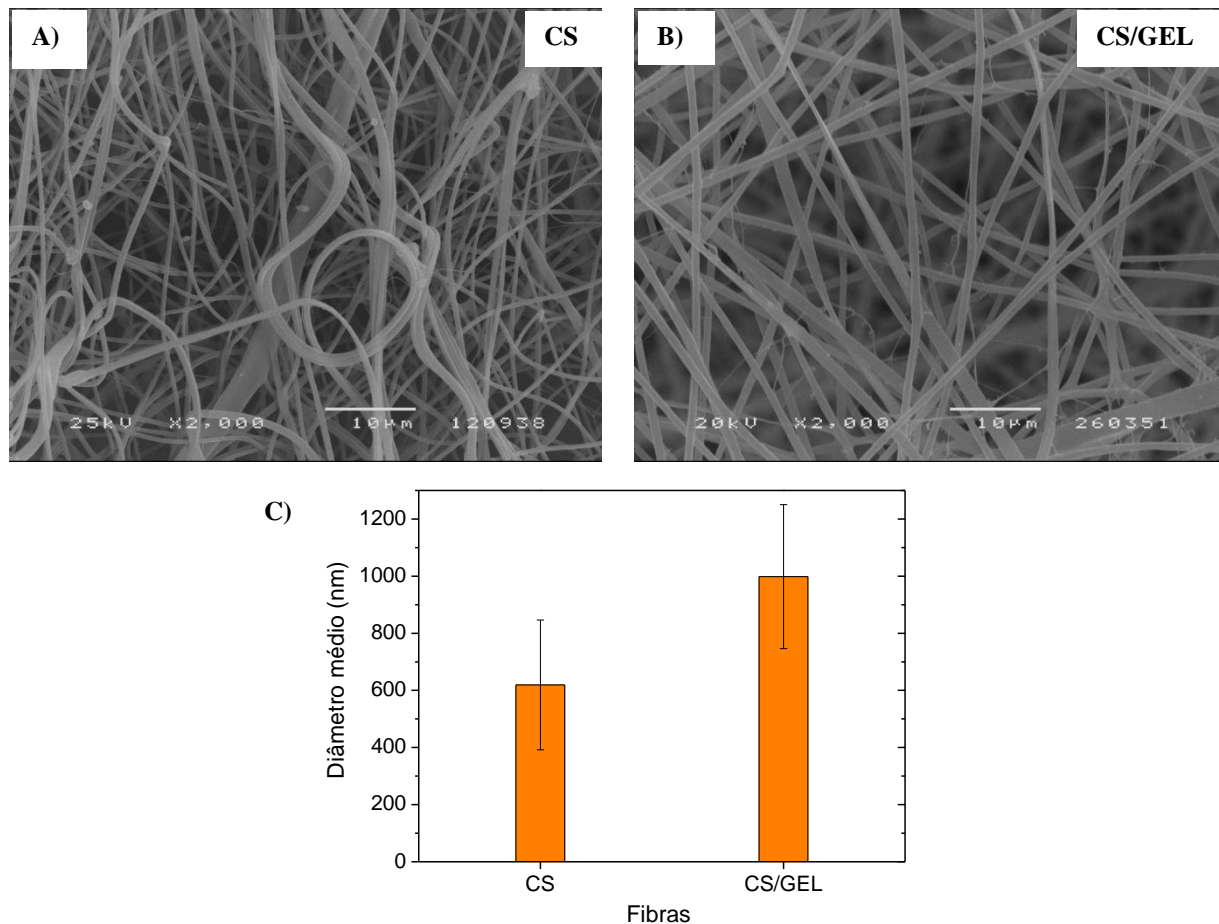


Figura 5. 43 Imagens de MEV das fibras depositadas com as soluções de a) CS e b) CS/GEL. c) Diâmetro médio das fibras depositadas com estas soluções. As linhas verticais representam o intervalo [valor médio \pm desvio padrão].

A introdução de GEL na solução de CS permitiu a deposição de uma matriz com fibras sem defeitos, mais regulares mas também mais espessas, aumentando o seu diâmetro médio de 619 nm para 998 nm, facto que se explica pelo aumento de viscosidade da solução.

A presença de CS e GEL na matriz que combina ambos os polímeros foi avaliada por FTIR-ATR. Sendo a GEL um polímero solúvel em água, a estabilidade química das fibras CS/GEL foi também sujeita a avaliação. A Figura 5.44 apresenta os espectros de infravermelho das matrizes de CS, GEL e CS/GEL após electrofiação e ainda para esta última após imersão em água durante 1 dia.

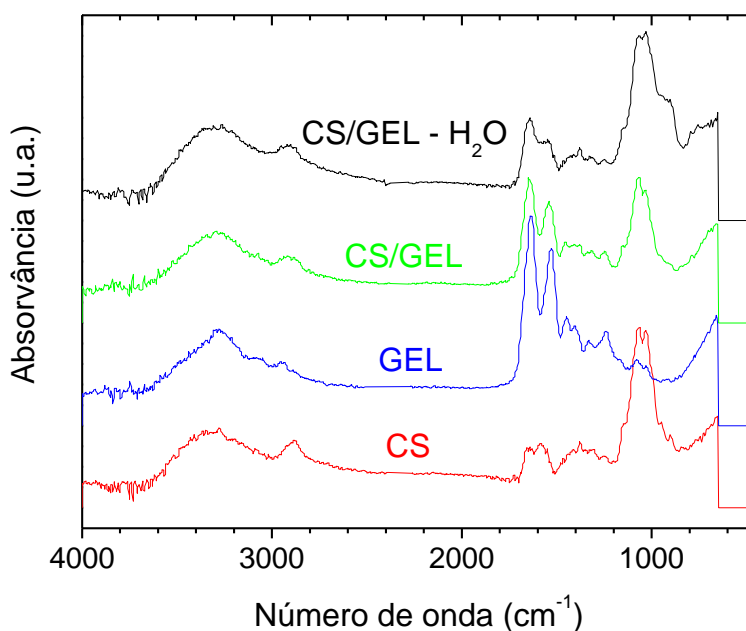


Figura 5. 44 Espectros FTIR-ATR das matrizes de CS/GEL, GEL e CS após electrofiação e da de CS/GEL após imersão em água durante 1 dia (CS/GEL – H₂O).

Dada a natureza do CS e da GEL, a maioria dos seus grupos funcionais são comuns, facto que dificulta a interpretação do espectro da matriz que combina os dois polímeros. Por exemplo, em ambos se destaca a banda situada entre 3400 e 3100 cm⁻¹ devida ao estiramento das ligações NH e OH, o pico a 1640 cm⁻¹ correspondente ao estiramento da ligação C=O (banda amida I) e o pico localizado entre 1590 e 1530 cm⁻¹ correspondente à deformação angular da ligação NH e à banda amida II. Todavia são observadas algumas diferenças, nomeadamente na intensidade dos dois últimos picos, os quais são mais intensos no espectro da GEL. Além disso, o espectro do CS apresenta uma banda situada entre 1150 até 1000 cm⁻¹ característica da sua estrutura sacarídea, a qual não é visível no espectro da GEL. A presença desta última e a maior intensidade dos picos localizados a 1640 e a 1540 cm⁻¹ no espectro do CS/GEL

evidencia a presença de ambos os polímeros na mistura. O ligeiro desvio no pico de absorção do grupo carbonilo face ao correspondente no espectro da GEL pode sugerir a formação de alguma ligação por pontes de hidrogénio entre os dois polímeros [178].

A imersão da matriz que mistura os dois polímeros em água revela um espectro muito semelhante ao do CS observando-se um decréscimo acentuado na intensidade dos picos situados a 1640 e a 1540 cm^{-1} em resultado da dissolução parcial da gelatina. Esta observação está em conformidade com alguns trabalhos encontrados na literatura que mencionam a necessidade de reticular estas matrizes [19, 176, 178]. Tal como sucedeu na matriz PCL/GEL, também esta matriz de CS/GEL foi reticulada com vapor de GTA, usando um tempo de exposição de 2 h. Durante o processo de reticulação a matriz permanece intacta e adquire uma cor amarelada, atribuída à formação da ligação aldimina, $\text{HC} = \text{N}$, entre os grupos amina da gelatina e os grupos aldeído do GTA [176, 178]. Na Figura 5.45 é possível visualizar as imagens de MEV de fibras de CS/GEL reticuladas por GTA antes e depois de imersas em meio de cultura durante 3 dias.

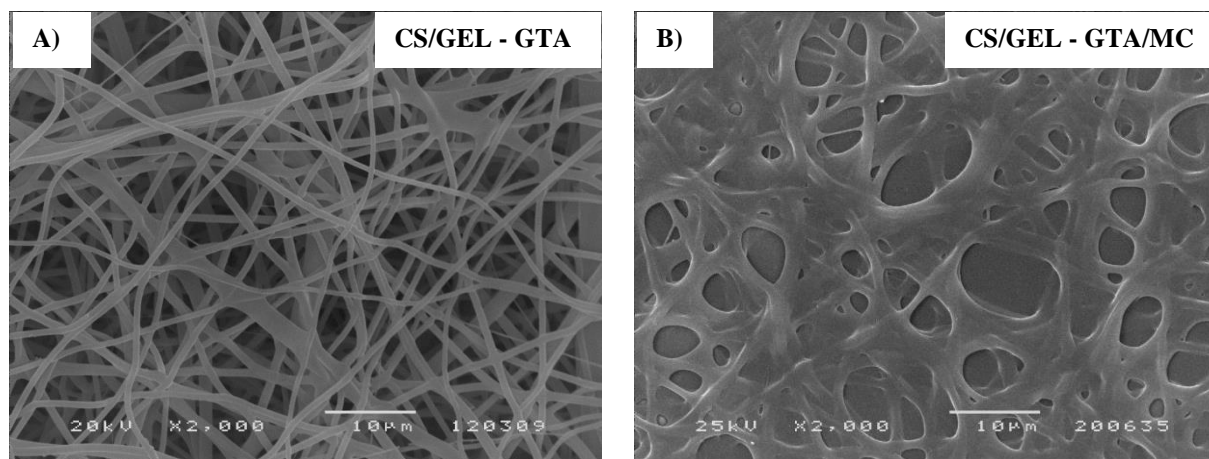


Figura 5. 45 Imagens de MEV das fibras de CS/GEL reticuladas com GTA durante 2 h a) após o processo de reticulação e b) depois de imersas em meio de cultura durante 3 dias.

De acordo com a imagem da Figura 5.45 a) observa-se que o processo de reticulação não altera significativamente a morfologia das fibras, que mantêm o valor do diâmetro médio ($D_{med} = 919 \pm 230\text{ nm}$). O mesmo não acontece na Figura 5.45 b) onde se observa fusão entre as fibras após imersão em meio de cultura. No caso particular desta matriz é de salientar que o vapor de GTA reticula não só a gelatina assim como o quitosano. Nesse sentido, a fusão entre as fibras reflecte a necessidade de otimizar o tempo de reticulação, de forma a aumentar o número de ligações entre os polímeros. Por exemplo, Qian *et al.* descreveram a produção de uma matriz de CS/GEL que mantém a

estrutura preservada após 4 dias imersa em água, mas neste caso a reticulação demorou 3 dias em vapor de GTA.

Dando continuidade ao trabalho as matrizes foram caracterizadas por FTIR-ATR para verificar uma eventual alteração química na estrutura da matriz que combina os dois polímeros naturais induzida pelo processo de reticulação e/ou imersão no meio de cultura. Os espectros adquiridos apresentam-se na Figura 5.46.

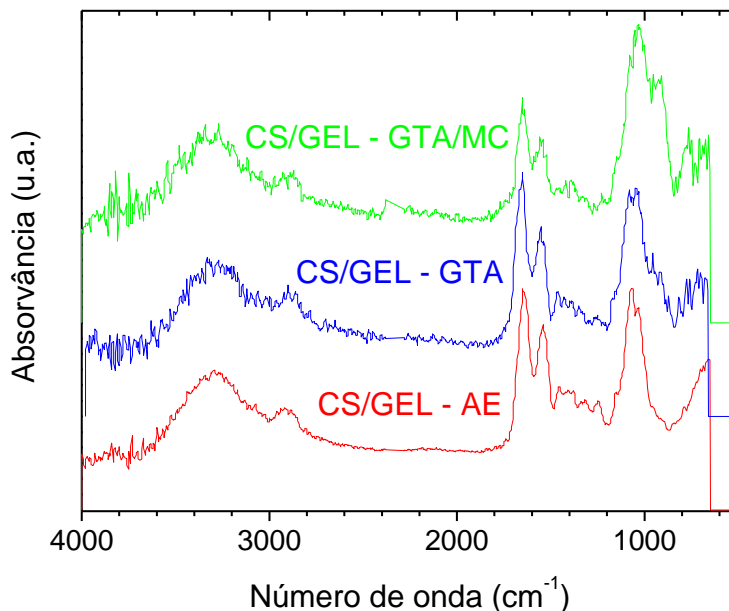


Figura 5. 46 Espectros FTIR-ATR das matrizes de CS/GEL após electrofiação (CS/GEL – AE) e após reticulação com GTA, antes e depois de colocadas em meio de cultura durante 3 dias (CS/GEL – GTA e CS/GEL – GTA/MC, respectivamente).

Como se observa na Figura 5.47, as principais bandas do CS e GEL continuam presentes na matriz reticulada que combina ambos os polímeros, antes e depois do meio de cultura, sobretudo no que diz respeito à presença bem definida dos picos localizados a 1640 e 1540 cm⁻¹. O estiramento da ligação aldimina, HC = N, estabelecida entre o CS e GEL e o GTA não é evidente no espectro pois situa-se entre 1640 e 1690 cm⁻¹, sobrepondo-se ao estiramento da ligação C=O do grupo amida I de ambos os polímeros, CS e GEL. Porém, a razão entre os picos a 1640 e a 1540 aumenta com a reticulação, o que sugere a contribuição do grupo aldimina para o pico a 1640 cm⁻¹. O aparecimento de um pequeno pico em 950 cm⁻¹ na matriz reticulada antes e após imersão no meio de cultura é típico do estiramento da ligação =C=O. O seu aparecimento vem na literatura atribuído à reacção entre os grupos hidroxilos, -OH, do CS e os grupos carbonilos, =CO, do GTA, que conduzem à formação da estrutura R'-O-C-O-R' (o GTA pode reagir com

o CS através de reacções base de Schiff formando uma estrutura imina, $C=N$, ou por reacções de acetalização, formando um acetal, $R_2C(OR')_2$. A reacção com a gelatina ocorre via base de Schiff) [178].

O comportamento da matriz de CS/GEL em água foi também avaliado quanto ao grau de inchamento. Os resultados foram comparados com os obtidos na matriz de CS e apresentam-se na Figura 5.47.

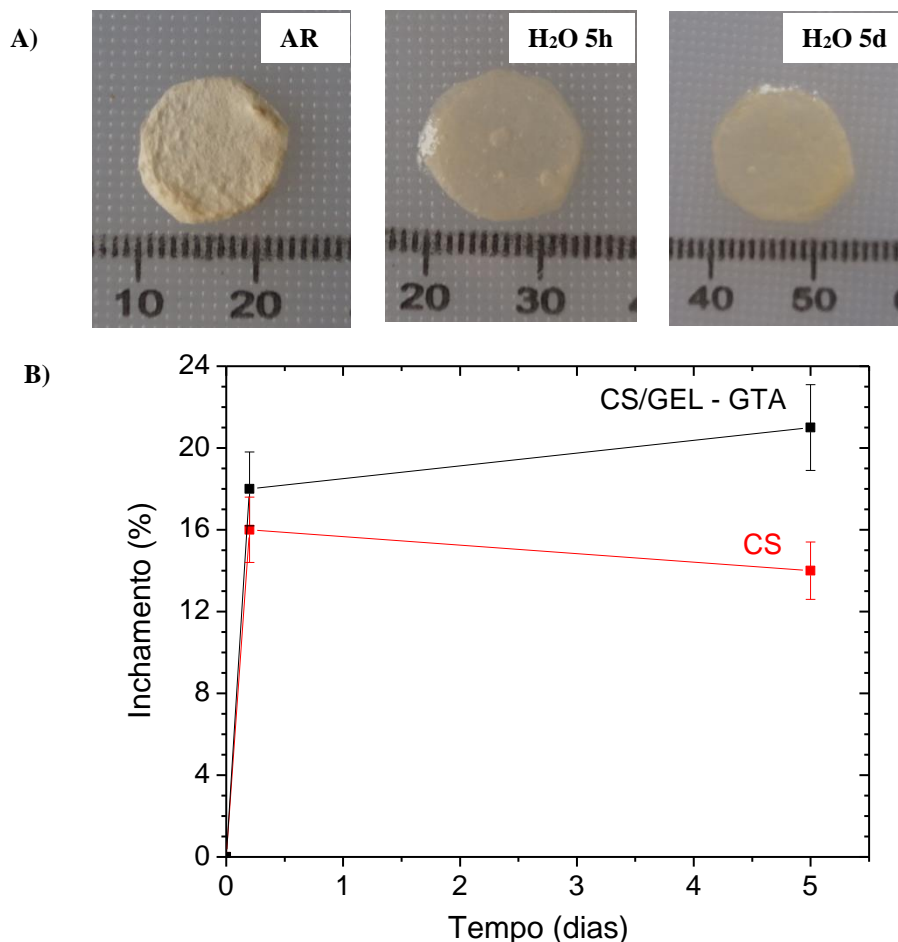


Figura 5. 47 Matriz de CS/GEL após reticulação em vapor de GTA durante 2 h (AR) e após imersão em água destilada durante 5 h (H₂O 5h) e 5 dias (H₂O 5d) (a). Variação das dimensões das matrizes de CS/GEL reticulada e da de CS em função do tempo de permanência em água. As barras verticais representam o intervalo [valor médio ± incerteza] (b).

Conforme se verifica, o aspecto amarelado adquirido durante o processo de reticulação permanece na matriz de CS/GEL em água, sendo também translúcida, como acontece nas matrizes unitárias. A introdução de GEL na solução de CS contribuiu para aumentar em *ca.* de 50% a capacidade de inchamento da matriz resultante.

Tal como sucedeu com as matrizes preparadas anteriormente, procedeu-se à caracterização da matriz de CS/GEL reticulada em vapor de GTA durante 2 h quanto ao ângulo de contacto, porosidade e propriedades mecânicas em termos do módulo de Young (E), tensão (σ_R) e deformação (ϵ_R) à ruptura. Os valores obtidos encontram-se sumariados na Tabela 5.22 juntamente com os valores da matriz de CS e de 25% GEL reticulada com GTA durante 2 h (soluções também preparadas em AcOH 90%).

Tabela 5. 22 Ângulo de contacto, porosidade e propriedades mecânicas determinados nas matrizes de CS/GEL – GTA, CS e GEL - GTA. Valores apresentados como média \pm desvio padrão.

Matriz	θ (°)	Porosidade (%)	E (MPa)	σ_R (MPa)	ϵ_R (%)
CS/GEL - GTA	0	84 \pm 9	22 \pm 9	3,1 \pm 0,9	31 \pm 6
CS	0	72 \pm 3	38 \pm 10	4,5 \pm 1,8	28 \pm 6
GEL - GTA	0	87 \pm 3	30 \pm 4	0,8 \pm 0,2	8 \pm 3

De acordo com a Tabela 5.22 verifica-se que a matriz de CS/GEL é hidrofílica (a gota é absorvida em 1-2 s), tal como sucede nas matrizes preparadas com os polímeros isoladamente, sugerindo que, existindo a formação de um complexo polielectrólito, este não afecta esta propriedade. Quanto à porosidade está mais próxima do valor associado à componente GEL.

Em termos mecânicos a adição de GEL à solução de CS surtiu influência sobre as propriedades da matriz de CS, tendo o módulo de Young diminuído para cerca de metade e a tensão à ruptura diminuído ligeiramente.

De um modo geral os resultados obtidos neste estudo parecem ir de encontro ao que se refere na literatura, ou seja a tendência para a formação de um complexo polielectrólito, atendendo ao aumento significativo observado na viscosidade da solução CS/GEL. A presença dos dois polímeros foi identificada por FTIR-ATR, sendo no entanto evidente ser necessário proceder à sua reticulação. As propriedades analisadas sugerem que os compostos originais se misturam. A alteração da morfologia desta matriz, após contacto com o meio de cultura, indicia a necessidade de otimizar o tempo de reticulação. Todavia esta matriz será usada nos testes *in vitro* com o objectivo de analisar de que modo suporta a adesão e proliferação de fibroblastos.

5.2.1.4 Matrizes de CS/PCL/GEL

O objectivo principal deste trabalho, em termos de produção de um substituto dérmico, consistiu na obtenção e caracterização físico-química de uma matriz constituída pela mistura dos três polímeros em estudo. Partindo do facto da solução de composição CS 2% GEL 2% PEO 0,15% ser electrofiável em AcOH 90% considerou-se esta como base, à qual o PCL seria adicionado. A concentração de PCL estabeleceu-se igual à de CS e de GEL, ou seja 2% (m/m).

As propriedades físicas desta solução foram medidas encontrando-se presentes na Tabela 5.23 em conjunto com as das soluções de CS 2% GEL 2% PEO 0,15%, CS 2% PCL 2% PEO 0,25% e CS 2% PEO 0,25% preparadas com o mesmo solvente.

Tabela 5. 23 Viscosidade (η), tensão superficial (γ), e condutividade eléctrica (σ) da solução CS/PCL/GEL em AcOH 90% e das soluções CS/GEL, de CS/PCL e de CS preparadas com o mesmo solvente. Valores apresentados como média \pm desvio padrão.

Solução	η^a (Pa.s)	γ (mN/m)	σ (μ S/cm)
CS/PCL/GEL	18,99	34 ± 1	255 ± 3
CS/GEL	14,96	$32,9 \pm 0,9$	290 ± 3
CS/PCL	8,46	$30,2 \pm 0,4$	234 ± 6
CS	7,63	$31,5 \pm 0,4$	258 ± 3
90% AcOH	0,002386 ^b	$29,1 \pm 0,3$	14 ± 1

^a Valores extraídos das curvas de fluxo para uma taxa de corte de $0,5 \text{ s}^{-1}$.

^b Valor tabelado: *Handbook of Chemistry and Physics, David R. Lide, 85th Edition, 2004-2005.*

Como se verifica pela observação da Tabela 5.23 a adição dos dois polímeros PCL e GEL à solução de CS reflectiu-se num aumento da viscosidade para mais do dobro. Este resultado explica-se não só por um aumento da concentração total de polímero na solução, mas também pela interacção entre os polímeros, mais evidente na solução de CS/GEL. Observou-se também um ligeiro aumento da tensão superficial. Relativamente à condutividade eléctrica verifica-se que esta se manteve semelhante à do CS, pois o aumento introduzido pela GEL é contrabalançado pela baixa condutividade da PCL.

Apesar das diferenças observadas entre soluções, a solução CS/PCL/GEL foi fiada com os mesmos parâmetros usados para a electrofiação da solução de CS, ou seja, 18 kV, 25 cm e 0,3 ml/h. Do mesmo modo, estabeleceu-se também que as deposições seriam realizadas ao 2º dia da solução. A Figura 5.48 mostra as imagens obtidas por MEV onde se evidencia a morfologia das fibras depositadas com as

soluções de CS, CS/PCL, CS/GEL e CS/PCL/GEL, assim como a variação dos respectivos diâmetros médios.

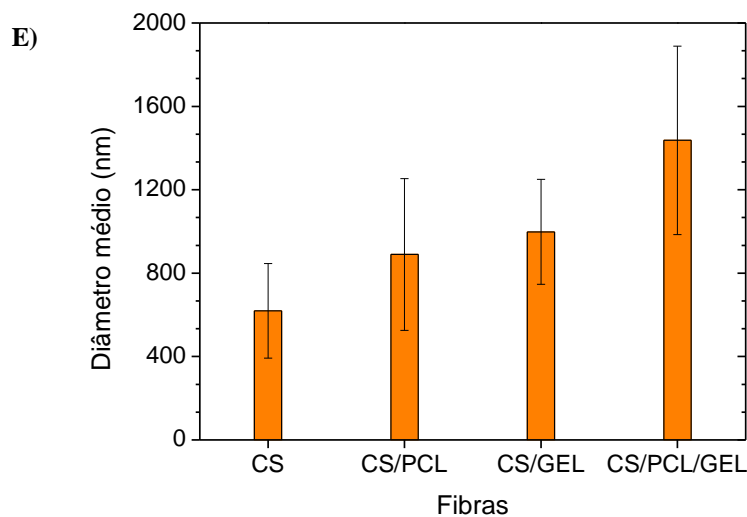
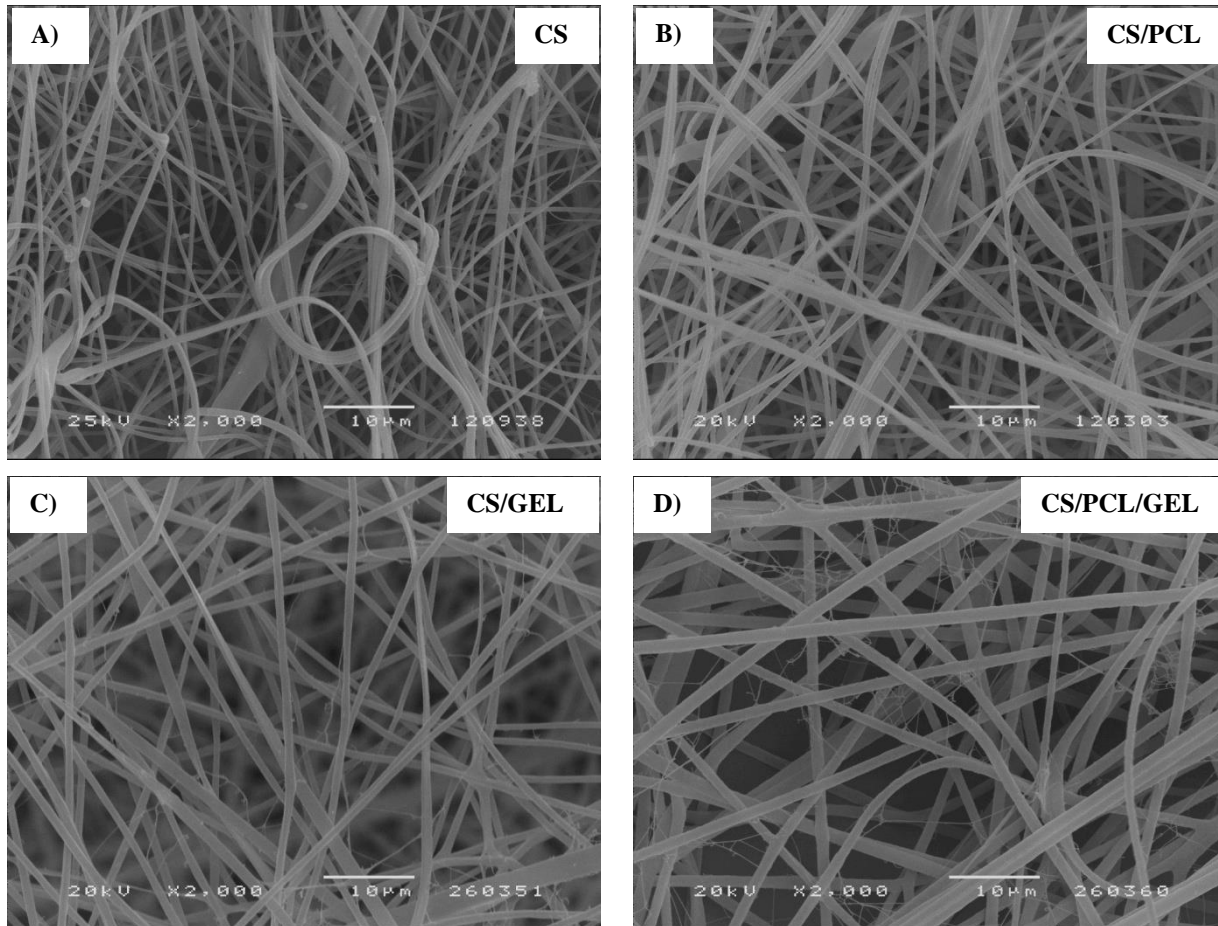


Figura 5. 48 Imagens de MEV das fibras depositadas com as soluções de a) CS, b) CS/PCL, c) CS/GEL e d) CS/PCL/GEL. e) Diâmetro médio das fibras depositadas com estas soluções. As linhas verticais representam o intervalo [valor médio \pm desvio padrão].

Do ponto de vista morfológico, as fibras depositadas com a solução envolvendo a mistura dos três polímeros (Figura 5.48 d) são semelhantes às obtidas com a solução preparada com CS/GEL (Figura 5.48 c), observando-se fibras mais regulares - resultado da introdução da GEL nas soluções com CS - mas mais grossas. O diâmetro médio das fibras aumentou de 619 nm, na matriz de CS, para 1437 nm na matriz ternária, facto que se explica pelo aumento significativo da viscosidade, atendendo a que a condutividade da solução se mantém constante.

A presença dos três polímeros CS, PCL e GEL na matriz ternária foi avaliada por FTIR-ATR. A Figura 5.49 apresenta os espectros das matrizes preparadas com os polímeros individualmente e na matriz ternária após electrofiação.

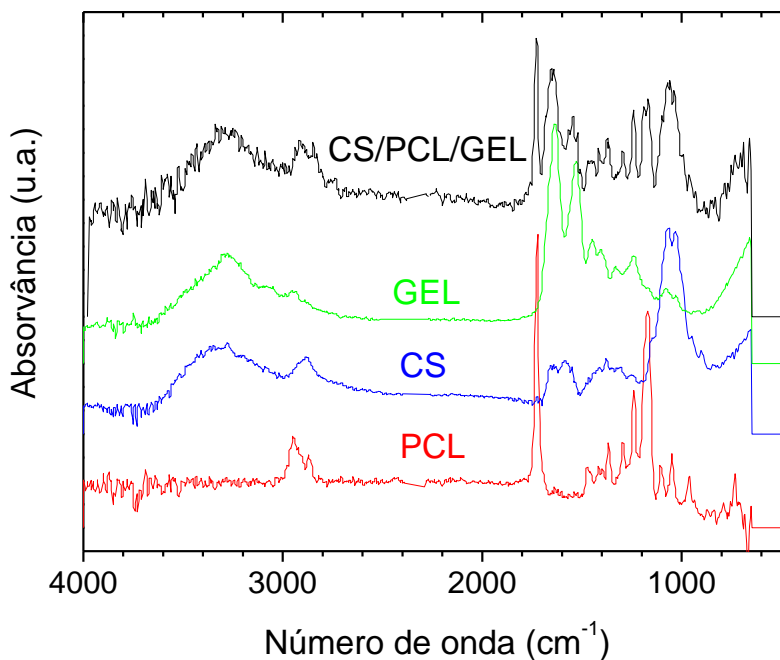


Figura 5. 49 Espectros FTIR-ATR das matrizes de CS/PCL/GEL, CS e PCL após electrofiação.

De acordo com a Figura 5.49 observa-se que os principais picos característicos dos polímeros individuais estão presentes no espectro da matriz constituída pelos três polímeros. Da PCL encontram-se o estiramento do grupo éster a 1724 cm^{-1} e o estiramento assimétrico e simétrico da ligação C-O-C localizados a 1240 cm^{-1} e 1170 cm^{-1} , respectivamente. Do CS e da GEL observa-se a banda situada entre 3400 e 3100 cm^{-1} devida ao estiramento das ligações NH e OH, a banda situada entre 1150 e 1000 cm^{-1} característica da estrutura sacarídea do CS, e os picos localizados a 1640 cm^{-1} e 1530 cm^{-1} correspondentes ao estiramento da ligação C=O do grupo amida e à deformação angular da ligação NH e à banda amida II,

respectivamente. Nenhum outro pico, senão os característicos da PCL, CS e GEL, foram observados no espectro das fibras da matriz ternária.

Visto que a composição desta matriz envolve a presença de gelatina, e tendo em conta os resultados anteriores onde se observou a necessidade de reticulação, também esta foi reticulada com vapor de GTA, usando um tempo de exposição de 2 h. Na Figura 5.50 apresentam-se imagens MEV das fibras de CS/PCL/GEL reticuladas por GTA antes e depois de imersas em meio de cultura durante 3 dias.

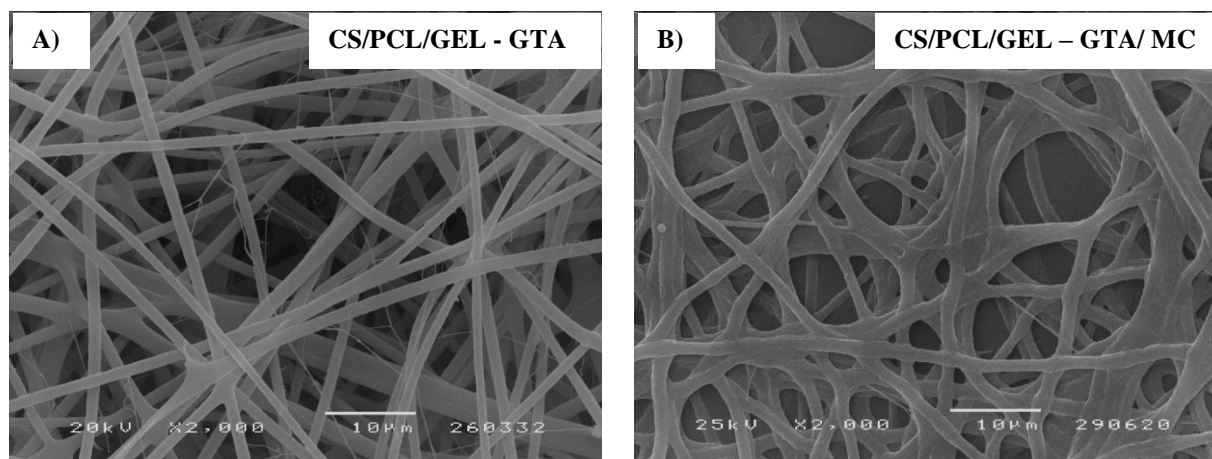


Figura 5. 50 Imagens de MEV das fibras de CS/PCL/GEL reticuladas com GTA durante 2 h a) após o processo de reticulação e b) depois de imersas em meio de cultura durante 3 dias.

A observação da Figura 5.50 a) permite concluir que o processo de reticulação não altera significativamente a morfologia das fibras e que estas mantêm o valor de diâmetro médio ($D_{med} = 1236 \pm 254$ nm). No que diz respeito à Figura 5.50 b) verifica-se que ocorreu alguma fusão entre as fibras após imersão em meio de cultura. No entanto, embora na imagem seja evidente alguma dissolução e fusão das fibras, esta é menor em comparação com a matriz constituída por CS/GEL, mostrando a acção fundamental da PCL na integridade estrutural.

A eventual alteração química na estrutura da matriz ternária induzida pelo processo de reticulação e/ou imersão no meio de cultura, foi caracterizada por FTIR-ATR. Os espectros adquiridos apresentam-se na Figura 5.51.

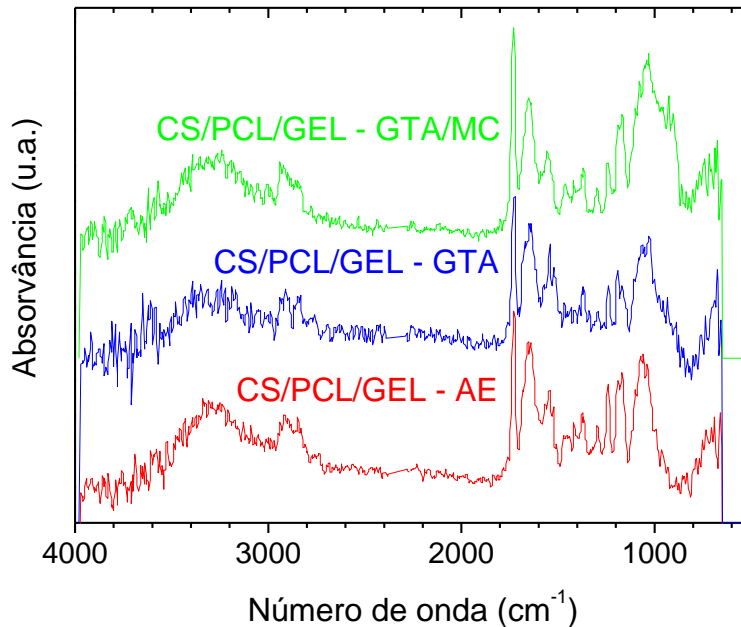


Figura 5. 51 Espectros FTIR-ATR adquiridos nas matrizes de CS/PCL/GEL após electrofiação e após reticulação com GTA, antes e depois de imersas em meio de cultura durante 3 dias (CS/PCL/GEL – GTA e CS/PCL/GEL – GTA/MC).

Como se observa, os espectros obtidos são semelhantes e apresentam as bandas de absorção características da PCL, CS e GEL. Isto significa que a estrutura química, na gama do infravermelho, não é afectada pelo processo de reticulação. Após imersão das fibras em meio de cultura durante 3 dias verifica-se uma diminuição da intensidade dos picos característicos da gelatina, a 1640 cm^{-1} (estiramento C=O, amida I) e a 1530 (deformação angular NH e estiramento C-N, amida II) relativamente ao pico característico da PCL, a 1724 cm^{-1} (estiramento da ligação C=O do grupo éster), indicando uma dissolução parcial da GEL.

Continuando o estudo com esta matriz constituída pelos três polímeros seguiu-se a análise da sua capacidade de inchamento em água. Os resultados foram comparados com os das matrizes de CS, CS/PCL e CS/GEL também reticulada com as mesmas condições, e mostram-se na figura seguinte.

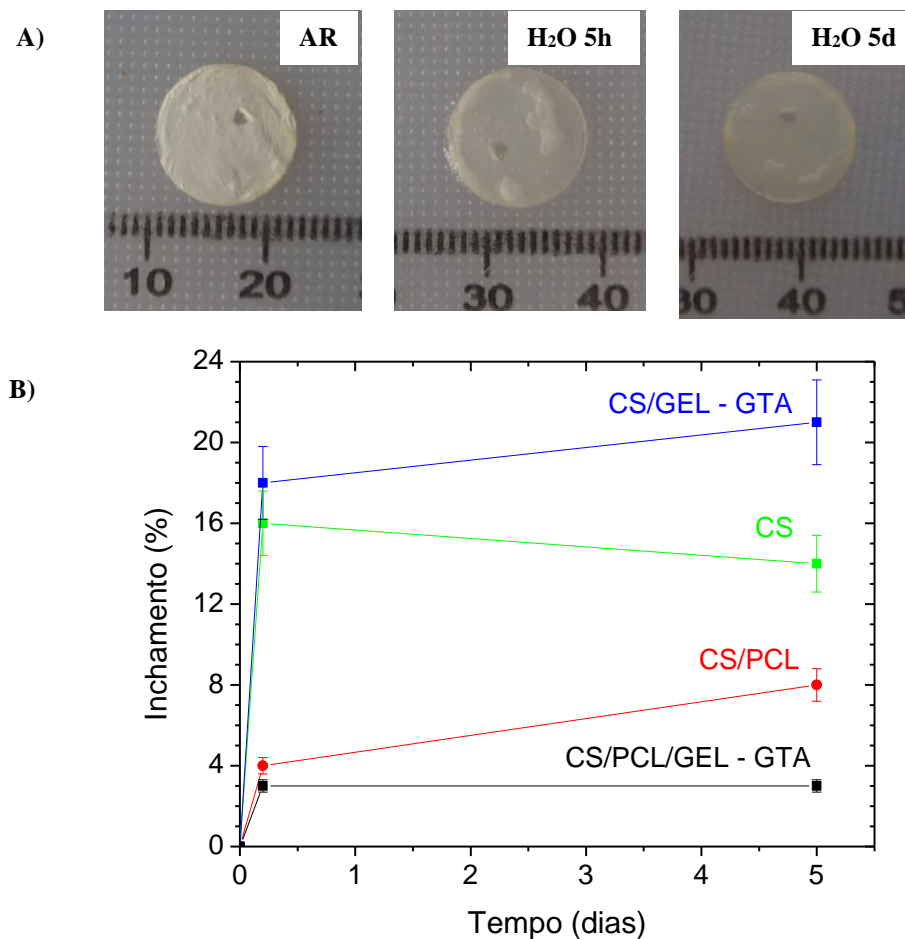


Figura 5. 52 Matriz de CS/PCL/GEL após reticulação em vapor de GTA durante 2 h (AR) e após imersão em água destilada durante 5 h (H₂O 5h) e 5 dias (H₂O 5d) (a). Variação das dimensões das matrizes de CS/PCL/GEL e CS/GEL reticuladas nas mesmas condições e das de CS/PCL e CS em função do tempo de permanência em água.). As barras verticais representam o intervalo [valor médio \pm incerteza] (b).

Da observação da Figura 5.52 verifica-se que a aparência, após permanência em água, da matriz de CS/PCL/GEL reticulada em vapor de GTA durante 2 h é semelhante à de CS/GEL reticulada nas mesmas condições. No entanto, no que diz respeito à sua capacidade de absorção de água é evidente a presença e a contribuição da PCL na matriz resultante. O facto de se observar a menor taxa de inchamento na matriz ternária, sobretudo face à composta por CS/PCL, sugere que este polímero sintético se encontra bem distribuído entre os dois polímeros naturais.

Para concluir o estudo com esta matriz de CS/PCL/GEL, reticulada com vapor de GTA durante 2 h, procedeu-se à sua caracterização quanto ao ângulo de contacto, porosidade e propriedades mecânicas em termos do módulo de Young (E), tensão (σ_R) e deformação (ϵ_R) à ruptura. Os resultados encontram-se na

Tabela 5.24, juntamente com os obtidos com as matrizes de CS/GEL – GTA, CS/PCL e CS para comparação.

Tabela 5. 24 Ângulo de contacto, porosidade e propriedades mecânicas das matrizes de CS/PCL/GEL - GTA, CS/GEL – GTA, CS/PCL e CS. Resultados apresentados como média \pm desvio padrão.

Matriz	θ (°)	Porosidade (%)	E (MPa)	σ_R (MPa)	ϵ_R (%)
CS/PCL/GEL - GTA	0	90 \pm 4	48 \pm 10	3,8 \pm 0,5	18 \pm 3
CS/GEL - GTA	0	84 \pm 9	22 \pm 9	3,1 \pm 0,9	31 \pm 6
CS/PCL	0	71 \pm 12	48 \pm 13	2,7 \pm 0,8	22 \pm 3
CS	0	72 \pm 3	38 \pm 10	4,5 \pm 1,8	28 \pm 6

Os resultados relativos às medidas do ângulo de contacto permitem concluir que a matriz de CS/PCL/GEL mantém-se hidrofílica (a gota de água demora entre 1 a 2 s a desaparecer), uma propriedade característica dos polímeros naturais que a constituem. De salientar que, em todas as combinações preparadas usando CS 2%, o ângulo de contacto medido foi de 0°. Quanto à porosidade, o valor estimado é próximo do obtido na matriz de CS/GEL, onde se destaca um maior impacto da GEL.

Em termos de propriedades mecânicas a matriz ternária exibe um comportamento muito semelhante à de CS/PCL que por sua vez é fortemente dominada pela presença de CS.

Resumindo, pode afirmar-se que enquanto matriz foi possível observar a presença e a contribuição dos três polímeros, CS, PCL e GEL. O facto de não se terem identificado novos picos no espectro FTIR-ATR sugere que a interação entre os polímeros deverá ocorrer, por pontes de hidrogénio e/ou interações de van der Waals, e não através da formação de novas ligações covalentes. Os resultados obtidos reflectem a mistura das propriedades dos compostos originais, em particular na morfologia das fibras após imersão em meio de cultura e na redução da taxa de inchamento em água, revelando o efeito significativo da PCL na integridade estrutural. Mediante estes resultados foi dada continuidade ao estudo desta matriz com a realização de testes *in vitro*.

5.2.2 Testes *in vitro*

5.2.2.1 Cultura de Células HFFF2

Os testes *in vitro* realizados nas matrizes binárias e ternária serviram para avaliar estes suportes em termos de preservação da viabilidade celular. A contribuição de cada componente da matriz foi considerada para explicar os resultados de adesão e proliferação celular obtidos. A metodologia seguida neste estudo foi idêntica à efectuada nas matrizes unitárias, ou seja, começou pela determinação de curvas de crescimento destas células, até ao 13º dia de cultura, em cada material testado, tendo-se utilizado como controlo o fundo dos poços da placa de cultura. Complementou-se este trabalho com medidas de microscopia confocal ao 4º e 7º dias de cultura.

As curvas de crescimento de células HFFF2 foram estabelecidas nas matrizes binárias CS/PCL, PCL/GEL e CS/GEL e na matriz ternária CS/PCL/GEL e encontram-se representadas na Figura 5.53.

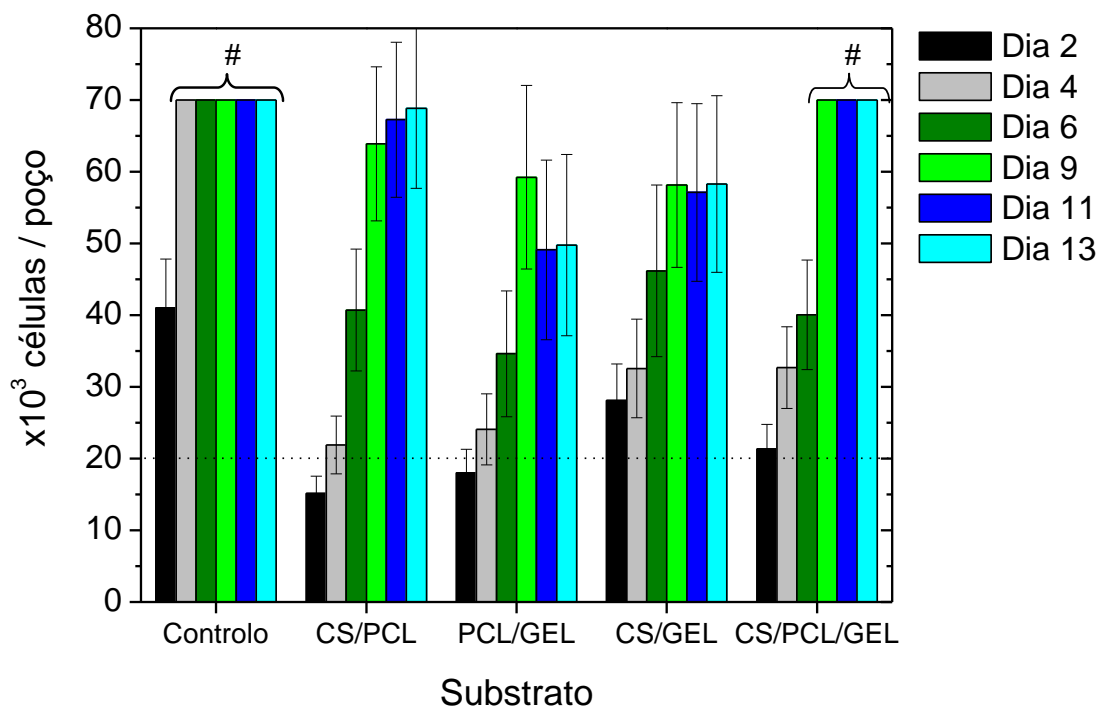
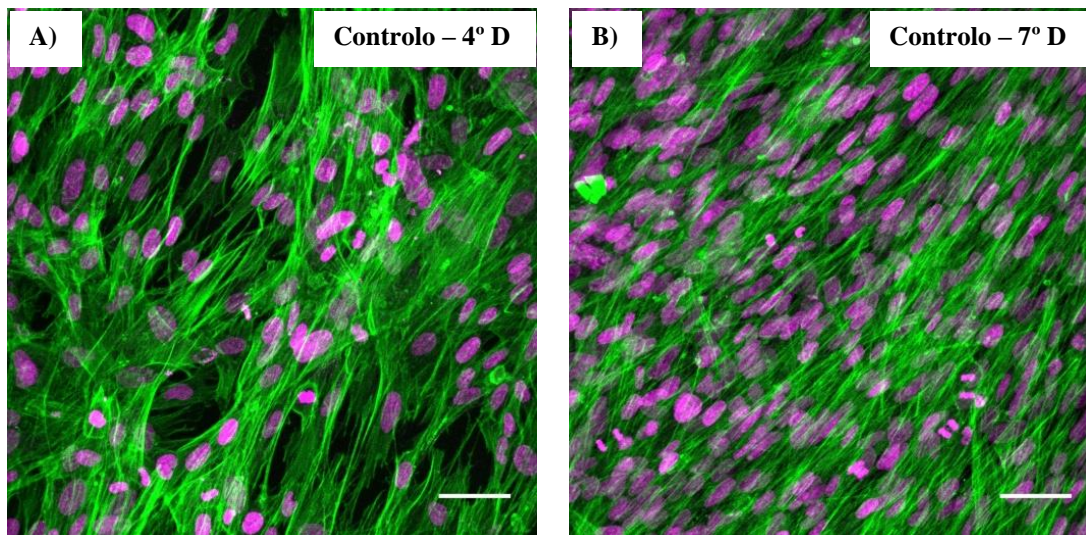


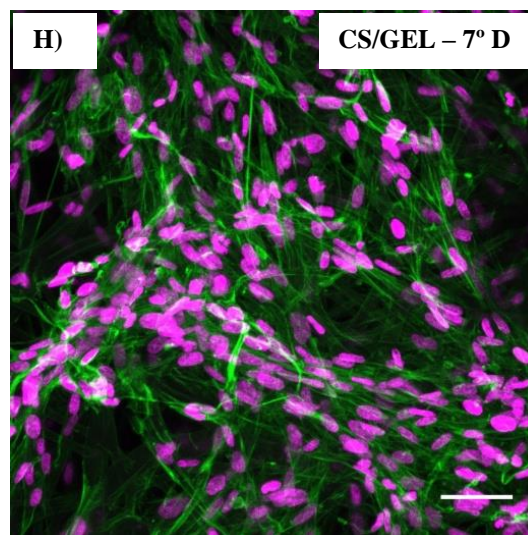
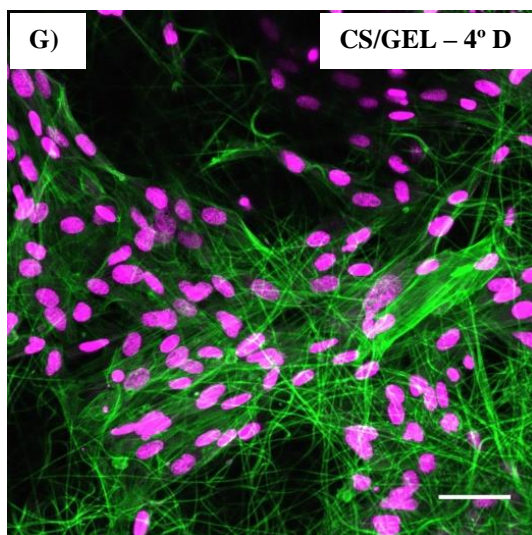
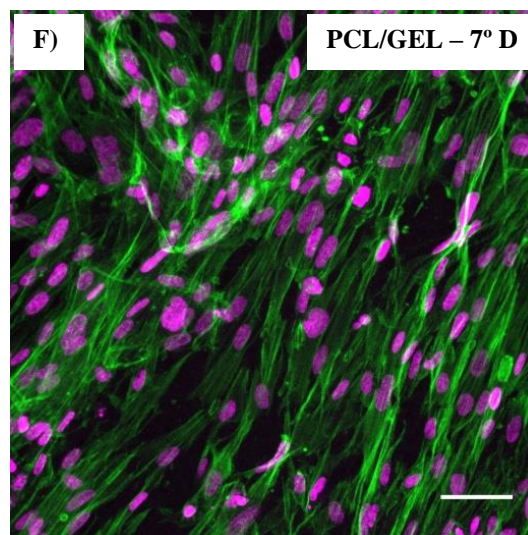
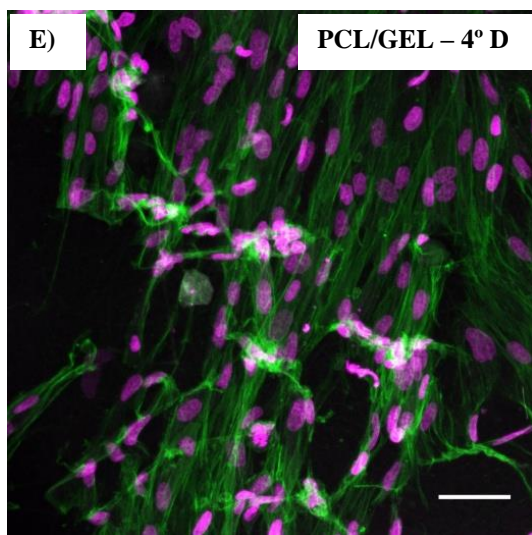
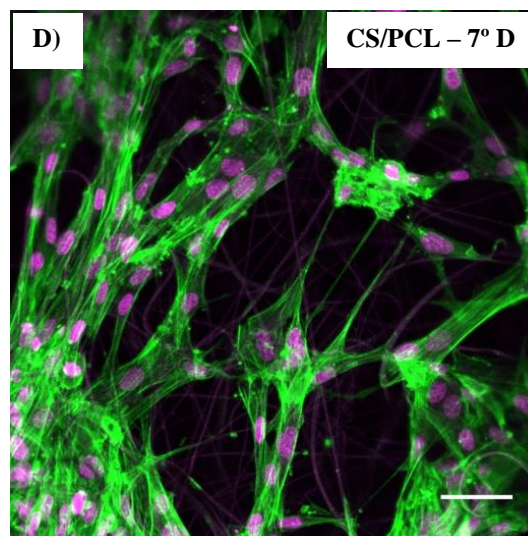
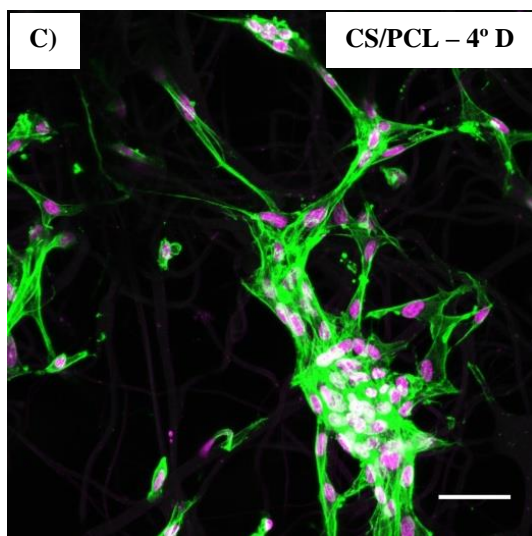
Figura 5. 53 População de células HFFF2 no controlo e nas matrizes CS/PCL, PCL/GEL, CS/GEL e CS/PCL/GEL. A linha a tracejado indica que foram semeadas 2×10^4 células por poço. O símbolo “#” representa uma subestimação do número total de células nesse dia. As linhas verticais representam o intervalo [média \pm incerteza].

De acordo com a Figura 5.53 as células HFFF2 aderem em todas as composições estudadas e proliferam nas matrizes, embora a uma taxa mais lenta do que no controlo. Ao 2º dia de cultura (48h após a sementeira) o número de células aderidas nos diferentes substratos iguala ou supera o número de células semeadas, excepto na matriz de CS/PCL onde o valor é menor.

Tal como aconteceu nas matrizes unitárias, o crescimento celular ocorre em todos os materiais até ao 9º dia de cultura mas apenas na matriz CS/PCL/GEL é que o número de células se dirige para a confluência, à semelhança do controlo. A partir desse dia a cultura tende para o estado estacionário em todas as matrizes ($p > 0,05$ entre os dias 9 a 13), mesmo na matriz de ternária, de acordo com os valores de fluorescência medidos.

A etapa seguinte consistiu na observação, por microscopia confocal, da cultura ao 4º e 7º dias, de forma a correlacionar e validar os dados resultantes das curvas de crescimento. Algumas imagens consideradas representativas apresentam-se na Figura 5.54.





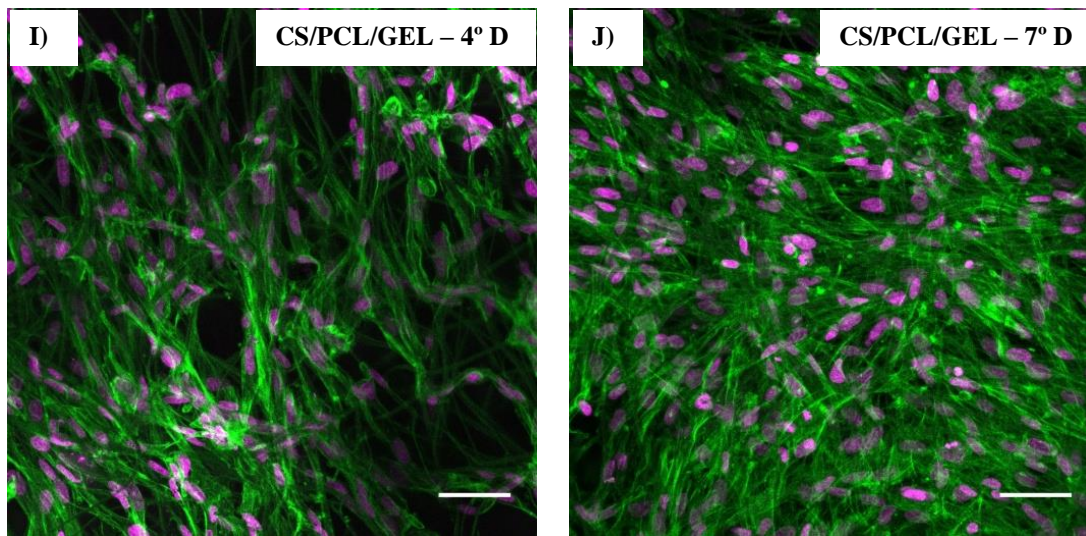


Figura 5. 54 Imagens de confocal das células ao 4º e 7º dias de cultura fixadas e marcadas com ToPro no ADN (magenta) e faloidina nos filamentos de actina do citoesqueleto (verde) em: controlo (a e b) e matrizes de CS/PCL (c e d), de PCL/GEL (e e f), de CS/GEL (g e h) e de CS/PCL/GEL (i e j). (Barra de escala = 50 μ m)

Conforme ilustra a Figura 5.54 as células HFFF2 estabelecem ligações e aderem em todos os substratos, mantendo o fenótipo comum de fibroblastos, isto é, a forma fusiforme. Contudo, observam-se diferentes respostas celulares consoante o material.

No caso da matriz CS/PCL verifica-se a formação de agregados celulares, o que reflecte o domínio da componente CS na matriz. Este comportamento era expectável atendendo a que as suas propriedades físico-químicas já revelavam a influência deste polímero. Ao 7º dia de cultura, e tal como acontece na matriz unitária de CS, o aumento da densidade celular permite encontrar as células dispostas de uma forma mais regular ao longo da matriz atenuando assim o efeito de agregados.

Já na matriz de PCL/GEL, as células encontram-se alinhadas, tal como sucede no controlo e na matriz unitária de GEL. Ao 7º dia de cultura observa-se um aumento da densidade celular, mantendo-se o alinhamento característico das células.

Quanto às matrizes de CS/GEL e CS/PCL/GEL a distribuição celular é predominantemente homogénea, não se observando somente agregados nem as células se encontram dispostas de forma alinhada. Esta constatação evidencia que não existe uma componente dominante a contribuir de forma decisiva para a resposta biológica. Ao 7º dia de cultura o número de células aumenta em ambas as matrizes, mantendo-se a dispersão celular.

Ainda de acordo com as imagens de confocal, estimou-se o número de núcleos por campo de visão ao 4º e 7º dias de cultura. O número de núcleos contabilizado nas matrizes foi normalizado ao controlo,

para comparação com o número de células viáveis obtido na curva de crescimento. Também foi calculado o aumento relativo de células entre o 4º e 7º dias para os vários substratos. Os resultados resumem-se na Tabela 5.25. A área média de cobertura celular não foi determinada devido à autofluorescência das fibras, no c.d.o. da faloidina, observada em algumas imagens das matrizes reticuladas com GTA, inviabilizando assim qualquer comparação.

Tabela 5. 25 Estimativa do número de núcleos/campo nas matrizes binárias e ternária ao 4º e 7º dias de cultura (a partir de imagens de confocal). Valores apresentados como média \pm desvio padrão.

Substrato	Quantidade Núcleos/Campo 4º D	Quantidade Núcleos/Campo 7º D	% relativa ao controle 4º D e 7º D	% aumento celular 7º D - 4º D
Controlo (vidro)	135 \pm 51	286 \pm 57	100	53
CS/PCL	39 \pm 17	110 \pm 17	29 / 38	65
PCL/GEL	93 \pm 41	206 \pm 50	69 / 72	55
CS/GEL	89 \pm 42	219 \pm 72	66 / 77	59
CS/PCL/GEL	108 \pm 55	203 \pm 56	80 / 71	47

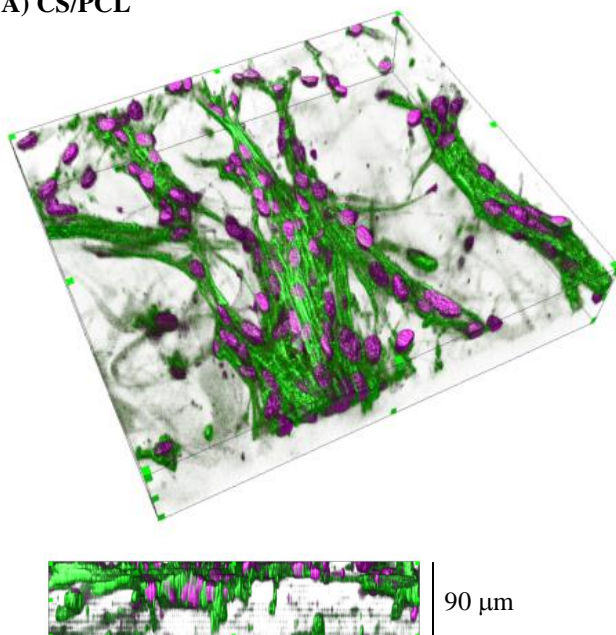
Conforme se constata da tabela anterior, os fibroblastos aderem ou proliferam nos materiais a uma taxa mais reduzida do que no controlo, o que está de acordo com as curvas de crescimento. A grande diferença está na razão entre o crescimento de células nas matrizes e no controlo, obtida com os dois métodos. Nas curvas de crescimento verificou-se que a densidade de população celular, nos vários substratos, é semelhante entre si nos dois períodos em análise, observando-se *ca.* de 20% de confluência ao 4º dia e um valor na ordem dos 40 - 50% de confluência ao 7º dia de cultura. Estima-se que a confluência no controlo é atingida entre estes dias.

Com as imagens de confocal estimou-se, para ambos os períodos, um crescimento da população celular nas matrizes na ordem dos 70 a 80% do que ocorre no controlo. A única exceção foi para a matriz de CS/PCL cujos resultados estão coerentes com os obtidos na curva de crescimento. Como hipótese para explicar estas variações considera-se a distribuição não homogénea de células ao longo das matrizes, como mostra a grande dispersão de valores em torno do valor médio.

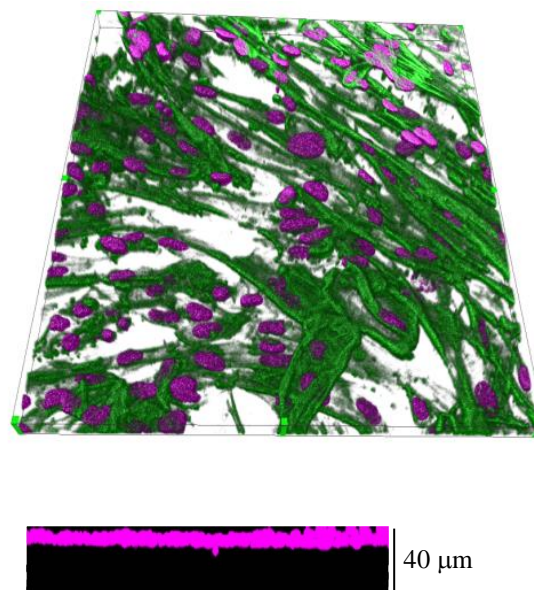
Porém, ambos os métodos apresentam um aumento relativo de *ca.* de 50% do número células entre o 4º e 7º dias de cultura.

Tal como sucedeu no estudo *in vitro* das matrizes unitárias, também as matrizes binárias e ternária foram analisadas quanto à migração celular em profundidade, ao 7º dia de cultura. Na Figura 5.55 podem observar-se algumas reconstruções 3D (vista superior e vista em profundidade) das matrizes e células.

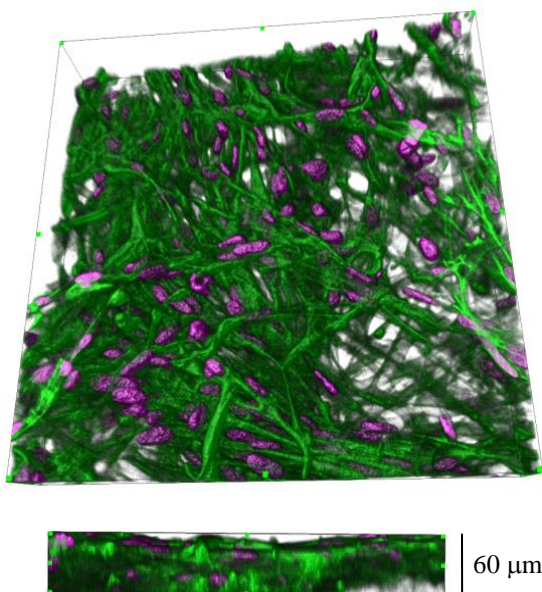
A) CS/PCL



B) PCL/GEL



C) CS/GEL



D) CS/PCL/GEL

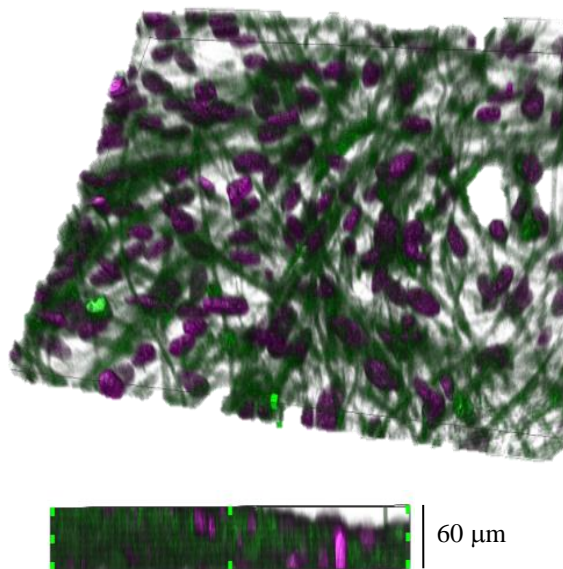


Figura 5.55 Reconstruções 3D (vista superior e vista em profundidade) de alguns campos representativos da cultura de células HFFF2, ao 7º dia, nas matrizes de: a) CS/PCL, b) PCL/GEL, c) CS/GEL e d) CS/PCL/GEL. Células marcadas no núcleo (magenta) e citoesqueleto (verde). Nanofibras também marcadas com a cor verde. As dimensões representam a profundidade da matriz analisada. No caso da matriz de PCL/GEL foi utilizada uma imagem 2D para ilustrar a migração celular em profundidade.

De acordo com a Figura 5.55, foram encontradas evidências de processos de invasão celular em todas as matrizes, excepto na matriz de PCL/GEL. Nesta última apenas se observa uma camada de células, embora algumas possam encontrar-se sobrepostas. Este resultado mantém a consistência sobre o domínio da fase GEL na mistura, tendo em conta a semelhança dos resultados obtidos com a matriz preparada somente com GEL.

Relativamente à matriz de CS/PCL, a distribuição celular em forma de agregados mantém-se bem evidente à sua superfície. Já nas composições de CS/GEL e de CS/PCL/GEL as células encontram-se distribuídas de forma aleatória. Nos três casos, a infiltração de algumas células em profundidade deve ocorrer essencialmente pelos poros e não por digestão da matriz.

5.2.2.2 Imunocitoquímica para Fibronectina e Colagénio Tipo I da matriz extracelular

No início deste trabalho considerou-se promissor, para o tipo de aplicação desejada, o desenvolvimento de uma matriz que conjugasse as propriedades de três polímeros: CS, PCL e GEL. Os bons resultados da cultura celular obtidos com esta matriz compósita de CS/PCL/GEL permitiram que fosse seleccionada para observar se as células HFFF2 produzem e secretam moléculas da matriz extracelular do tecido conjuntivo à semelhança do que se passa *in vivo*. Nesse sentido, foram utilizados dois anticorpos primários específicos para a fibronectina (glicoproteína com funções específicas de adesão) e para o colagénio I (a proteína estrutural da matriz extracelular). As medidas por microscopia confocal foram realizadas ao 4º e 7º dias de cultura e os resultados apresentam-se na Figura 5.56. O estudo foi acompanhado por um controlo negativo cujo resultado não apresentou marcação.

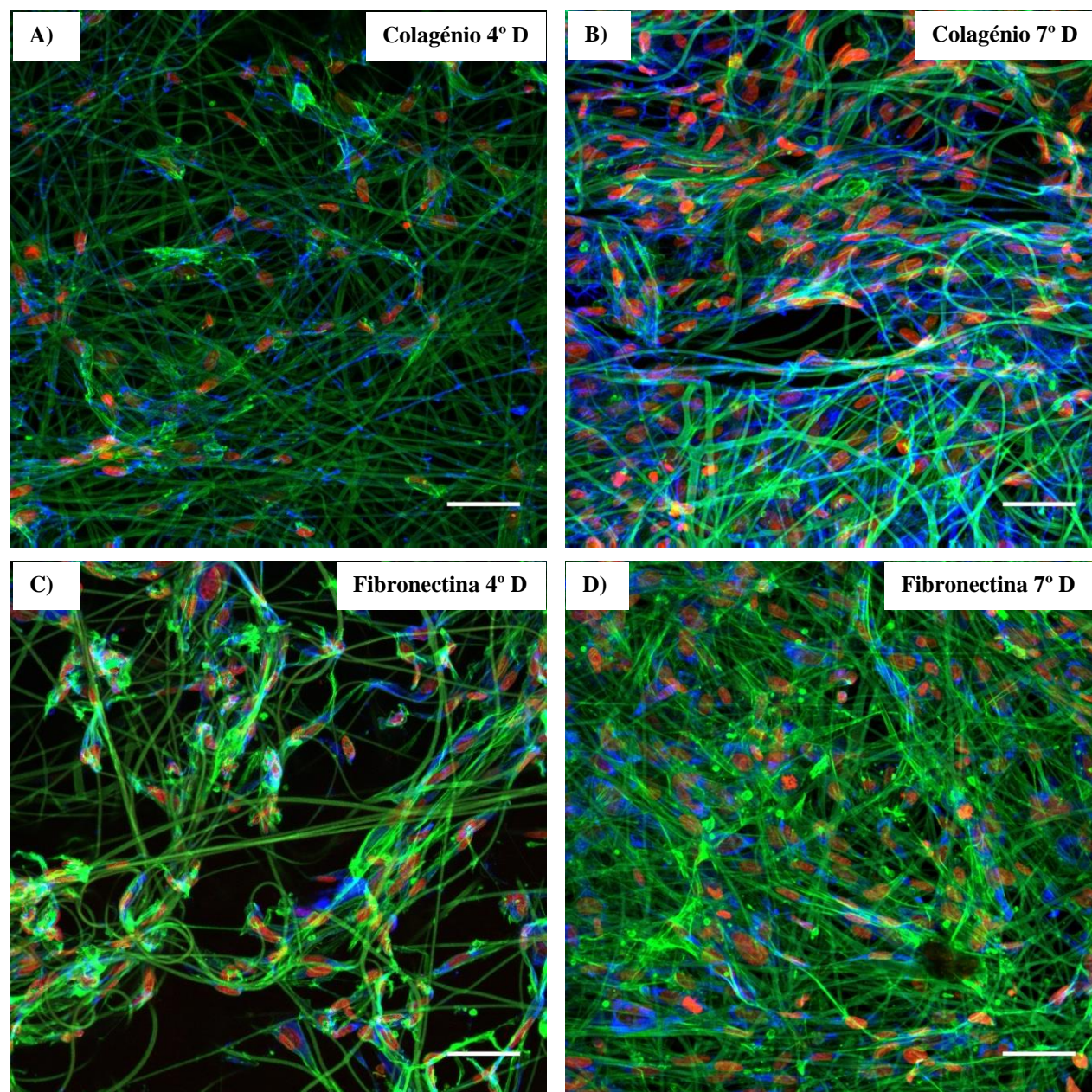


Figura 5.56 Imagens de microscopia de confocal das células ao 4º e 7º dias de cultura em matrizes de CS/PCL/GEL fixadas e marcadas no ADN (vermelho), no citoesqueleto (verde) e nas moléculas de colagénio I e fibronectina (azul). As fibras também estão marcadas com a cor verde. (Barra de escala = 50 µm)

De acordo com as imagens da Figura 5.56 verifica-se que ao 4º dia de cultura os fibroblastos HFFF2 estão a produzir e a sintetizar colagénio I (está intra e extracelular) e a produzir fibronectina (está essencialmente intracelular), demonstrando que esta matriz ternária possui características físico-químicas que permitem manter a capacidade fisiológica, de produção e secreção de matriz extracelular, dos fibroblastos.

Ao 7º dia de cultura, a síntese e a secreção de colagénio I continua e aumenta na matriz ternária assim como a produção de fibronectina, que permanece essencialmente intracelular. O facto de esta glicoproteína continuar intracelular pode dever-se a uma questão de dinâmica das moléculas, e ser apenas necessário mais tempo para as células a secretarem.

Portanto, estes resultados mostram que as células HFFF2 produzem e secretam moléculas da matriz extracelular, o que evidencia um comportamento típico do que seria esperado *in vivo*.

5.2.3 Testes *in vivo*

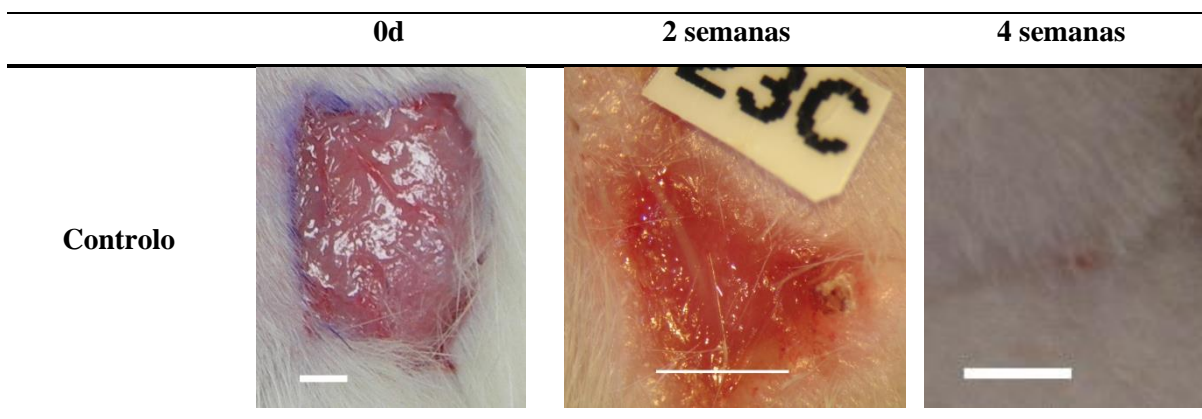
5.2.3.1 Análise Macroscópica

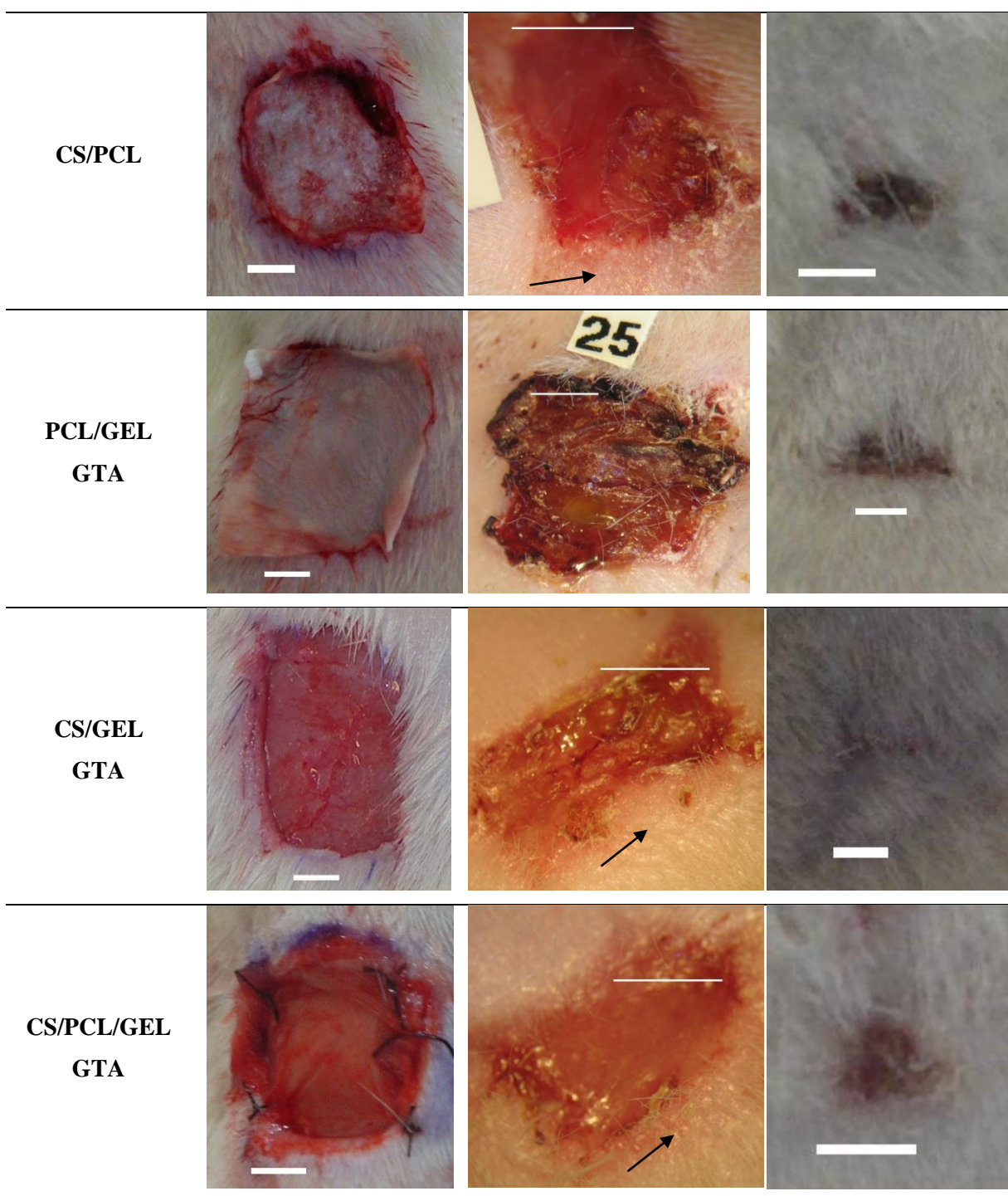
Tal como sucedeu nas matrizes unitárias, foi igualmente efectuado um estudo *in vivo* com as matrizes binárias e ternária.

Devido a limitações de tempo para executar todas as experiências, a investigação prosseguiu com a redução do número de réplicas para duas e a avaliação das feridas à 2ª e 4ª semanas.

A evolução da cicatrização das feridas, após a aplicação de matrizes binárias de CS/PCL, de PCL/GEL, de CS/GEL e ternária de CS/PCL/GEL, foi avaliada macroscopicamente à 2ª e 4ª semanas. Os resultados obtidos apresentam-se na Tabela 5.26 e comparam-se com o grupo controlo (feridas sem material).

Tabela 5. 26 Imagens representativas do aspecto macroscópico das feridas após a aplicação das matrizes de CS/PCL, de PCL/GEL, de CS/GEL e de CS/PCL/GEL no dia da operação (0d) e após 2 e 4 semanas. Os resultados estão comparados com o controlo. A imagem à 2ª semana foi observada ao microscópio óptico. As setas indicam pele cicatrizada (brilhante e sem pêlo) (Barra de escala = 5 mm).





Nos testes realizados com estas matrizes verificou-se que todas elas apresentaram boas propriedades de adesão e manuseamento, com exceção da matriz de PCL/GEL que é menos flexível e menos

hidrofílica (ângulo de contacto igual a $58 \pm 3^\circ$). Tal como sucedeu nas matrizes unitárias, não foi detectado, em nenhum dos grupos analisados, qualquer sinal de infecção das feridas.

À segunda semana todas as feridas apresentaram sinais de contracção. No caso particular da matriz de PCL/GEL a ferida continuava coberta com crosta, à semelhança do que ocorreu nos ensaios com a matriz de PCL. Nas experiências envolvendo as restantes matrizes, observou-se, em redor da região lesada, pele de aspecto brilhante e sem pêlo (indicado por setas), típico de uma cicatriz re-epitelizada. Note-se que os grupos onde este fenómeno aconteceu apresentam CS na composição da matriz, ou seja, o único material das matrizes unitárias onde se observou um grau de fibrose ligeiramente superior ao controlo.

À quarta semana, a lesão correspondente ao grupo CS/GEL encontrava-se totalmente encerrada. Nas restantes matrizes o processo de reparação ainda permanece, sobretudo mais lento nas matrizes de CS/PCL e PCL/GEL.

Analogamente ao que foi realizado nas matrizes unitárias, foi igualmente efectuado nestas matrizes uma avaliação da taxa de encerramento das feridas (a partir da razão entre as áreas das feridas com matriz e controlo) durante os períodos de observação. Os resultados obtidos resumem-se na Figura 5.57.

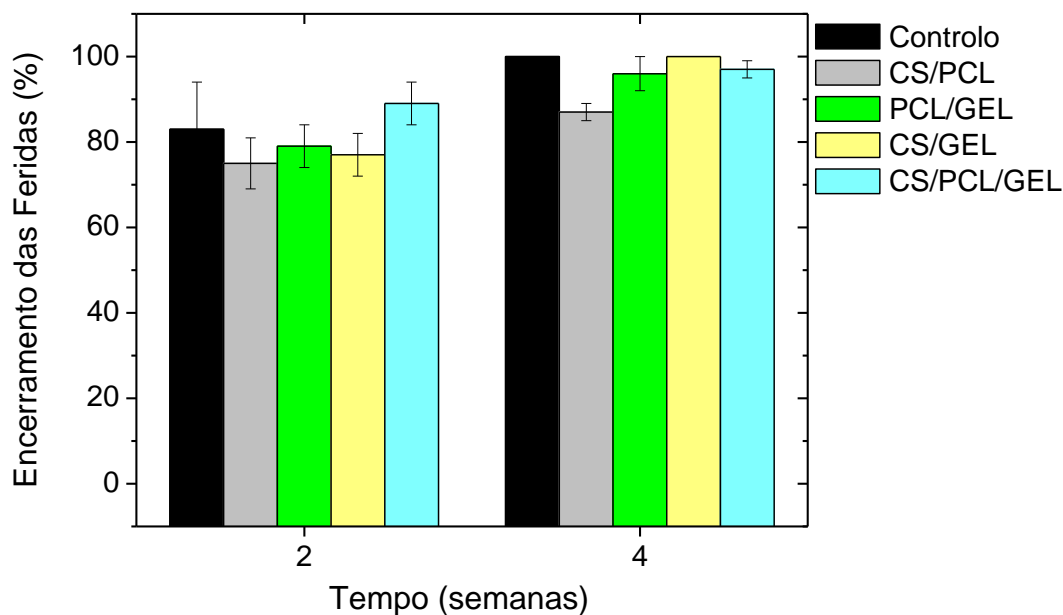
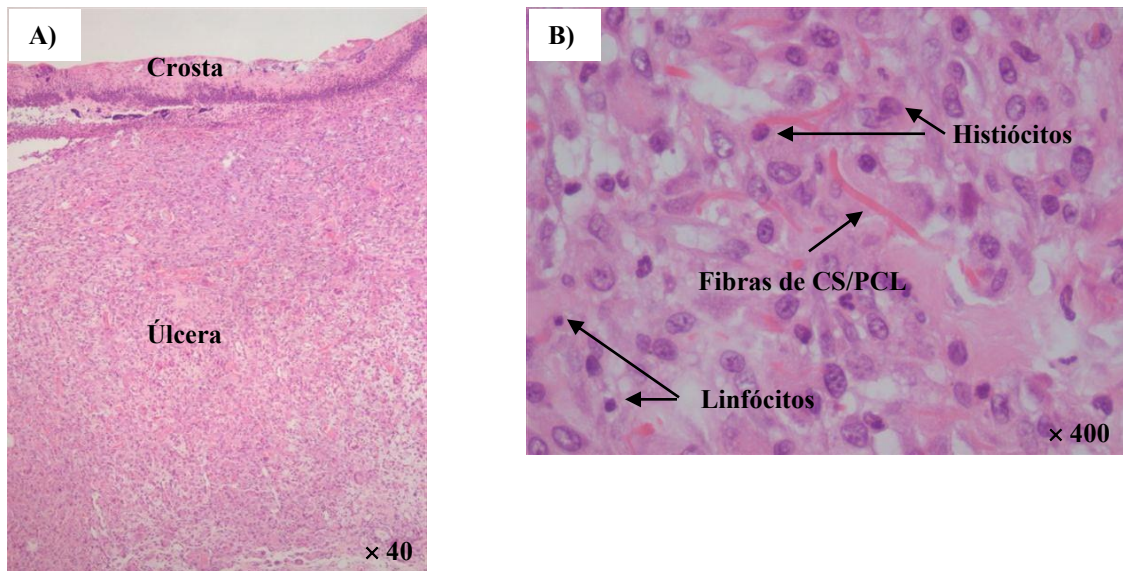


Figura 5. 57 Taxa de encerramento das feridas em função do tempo de cicatrização (2 e 4 semanas) no estudo efectuado com as matrizes binárias e ternária. Resultados comparados com o controlo. As linhas verticais representam o intervalo [média \pm incerteza].

Mais uma vez os ensaios realizados sugerem que a taxa de encerramento das feridas não difere da matriz utilizada, assemelhando-se ao controlo. Apenas no grupo CS/GEL foi possível observar uma área de cicatriz re-epitelizada, ligeiramente superior ao controlo. Nos restantes grupos as feridas ainda se encontram na fase da maturação.

5.2.3.2 Análise Histológica

O estudo *in vivo* das matrizes binárias e ternária foi complementado com a análise histológica das biópsias removidas nos dois períodos escolhidos. Tal como sucedeu com as matrizes unitárias, também este grupo de matrizes foi comparado com um grupo controlo (sem material). Do ponto de vista da análise histológica, as imagens adquiridas e a informação recolhida foi semelhante à da Figura 5.30 pelo que não serão novamente apresentadas. Deste modo, a Figura 5.58 começa por apresentar algumas imagens histológicas representativas do grupo CS/PCL.



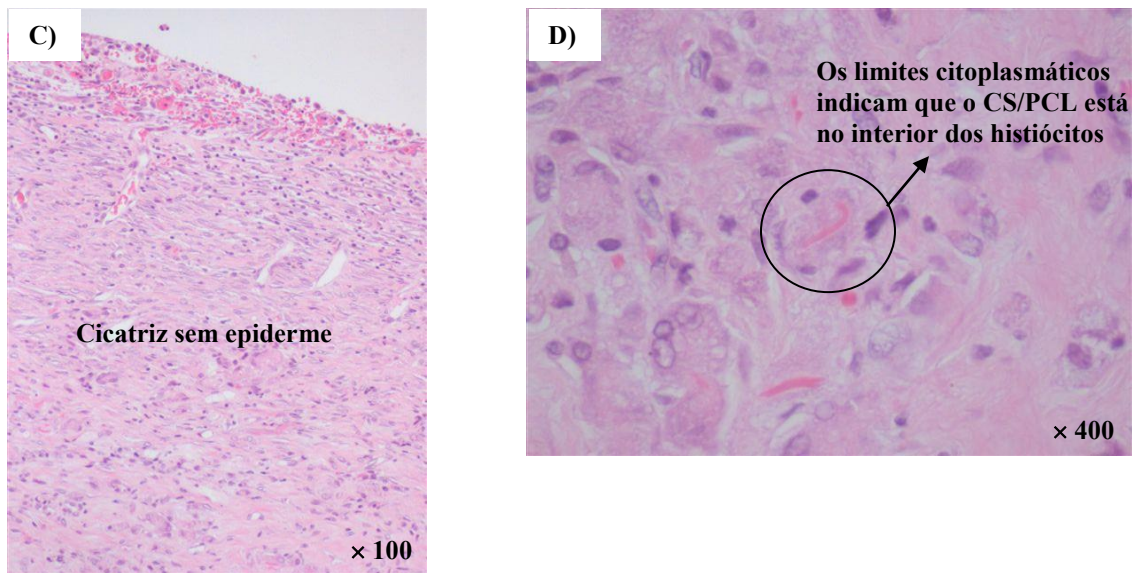


Figura 5. 58 Imagens de histologia, do grupo CS/PCL, representativas da lesão infligida aos ratos à 2ª semana: a) úlcera com crosta, b) fibras de CS/PCL entre as células inflamatórias que são predominantemente histiócitos; à 4ª semana: c) úlcera mais fibroblástica, d) fibras de CS/PCL dentro de histiócitos multinucleados.

Como se verifica nas imagens da Figura 5.58 a) e b), à segunda semana a lesão está coberta por uma crosta e num processo de proliferação fibroinflamatória. O infiltrado é predominantemente histiocitário. O material encontra-se entre as células inflamatórias e os histiócitos.

À quarta semana continuam a não existir evidências da presença de epiderme, parecendo que a matriz de CS/PCL retarda (ou diminui) a contracção da ferida e por isso também o seu fecho por re-epitelização. A cicatriz é predominantemente fibroblástica e sem anexos. O material continua dentro de histiócitos multinucleados (Figura 5.58 c e d).

O trabalho prosseguiu com a aquisição das imagens histológicas referentes às experiências com a matriz de PCL/GEL. Os principais resultados encontram-se representados na Figura 5.59.

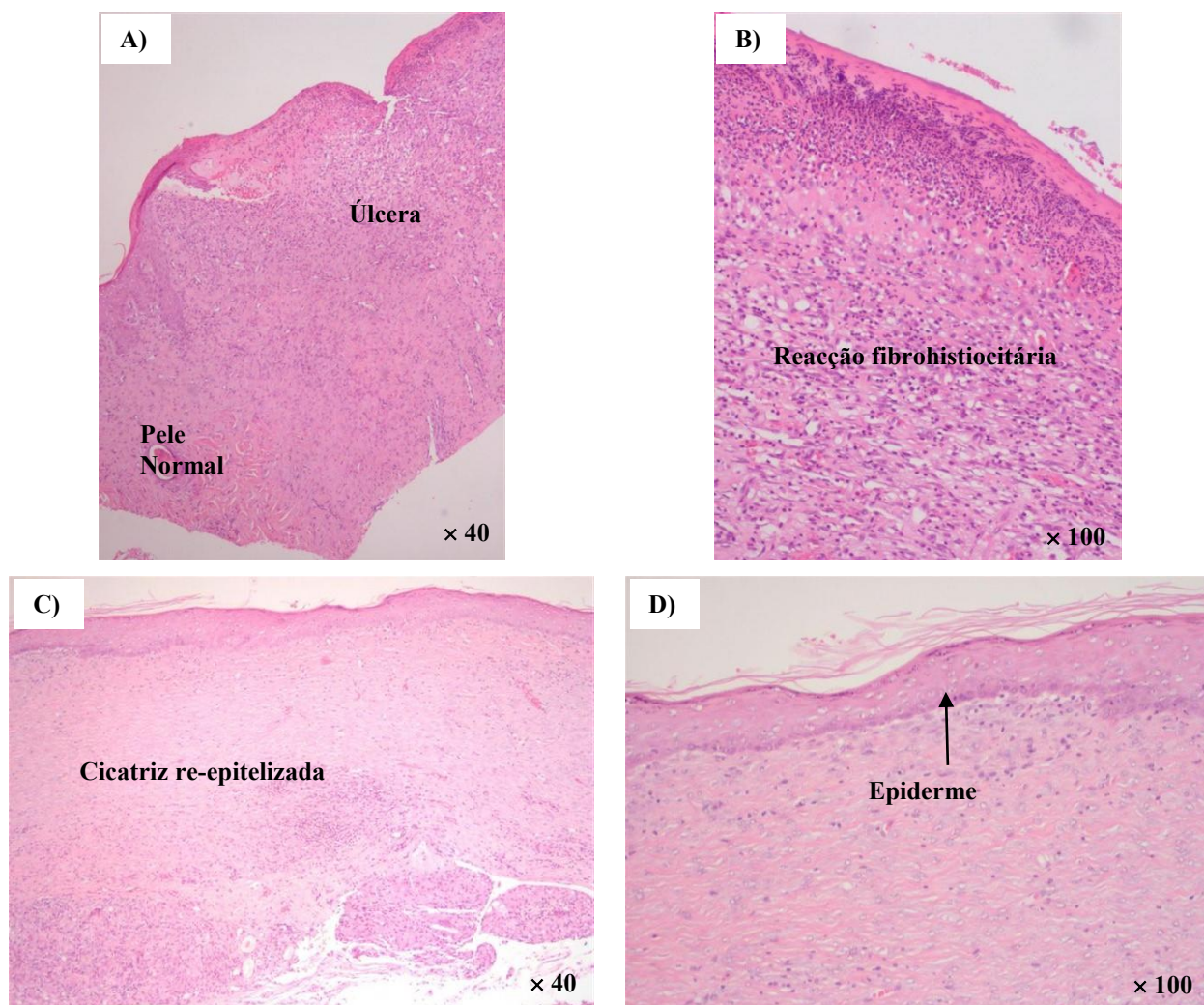


Figura 5. 59 Imagens de histologia, do grupo PCL/GEL, representativas da lesão infligida aos ratos à 2ª semana: a) transição pele normal / úlcera, b) proliferação fibroinflamatória, predominantemente histiocitária; à 4ª semana: c) cicatriz dérmica re-epitelizada, d) epitélio contínuo.

No que diz respeito aos ensaios efectuados com a matriz de PCL/GEL, as imagens adquiridas na 2ª semana após a lesão, revelam um processo inflamatório, onde é visível a presença significativa de histiócitos em simultâneo com proliferação fibroblástica (Figura 5.59 a e b).

À quarta semana, o número de células inflamatórias é reduzido e a lesão está coberta por um tecido fibroso sem os típicos organelos (pêlos, glândulas) da pele e com o epitélio contínuo como ilustram as imagens da Figura 5.59 c e d).

O passo seguinte consistiu na análise dos resultados obtidos com a matriz de CS/GEL, os quais se resumem na Figura 5.60.

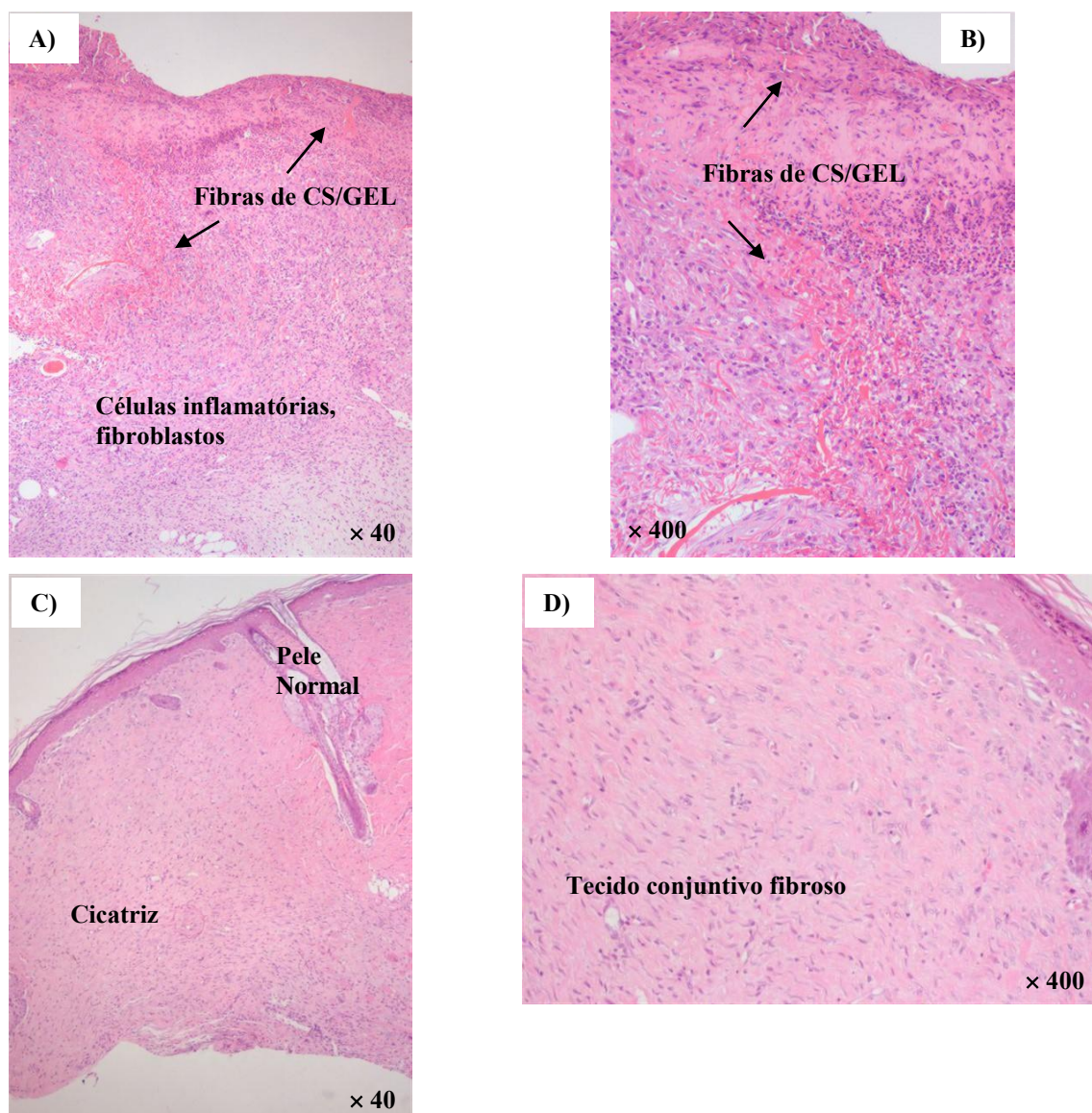


Figura 5. 60 Imagens de histologia, do grupo CS/GEL, representativas da lesão infligida aos ratos à 2ª semana: a) úlcera com reação fibroinflamatória e com fibras de CS/GEL, b) ampliação da superfície da úlcera destacando o material na crosta e em profundidade; à 4ª semana: c) transição cicatriz re-epitelizada/pele normal, d) cicatriz dérmica sem folículos pilosos.

Como se observa nas imagens da Figura 5.60 a) e b), à segunda semana a ferida encontra-se invadida de células inflamatórias, sobretudo histiócitos, de fibroblastos, e com especial destaque de matriz de CS/GEL que se encontra distribuída quer à superfície quer em profundidade. Observam-se ainda células inflamatórias junto da matriz.

Na quarta semana a ferida encontra-se regenerada, apresentando derme e epiderme intactas (Figura 5.60 c e d).

O estudo *in vivo* destas matrizes finalizou com a análise da matriz ternária CS/PCL/GEL. A Figura 5.61 mostra alguns dos resultados mais representativos obtidos com esta composição.

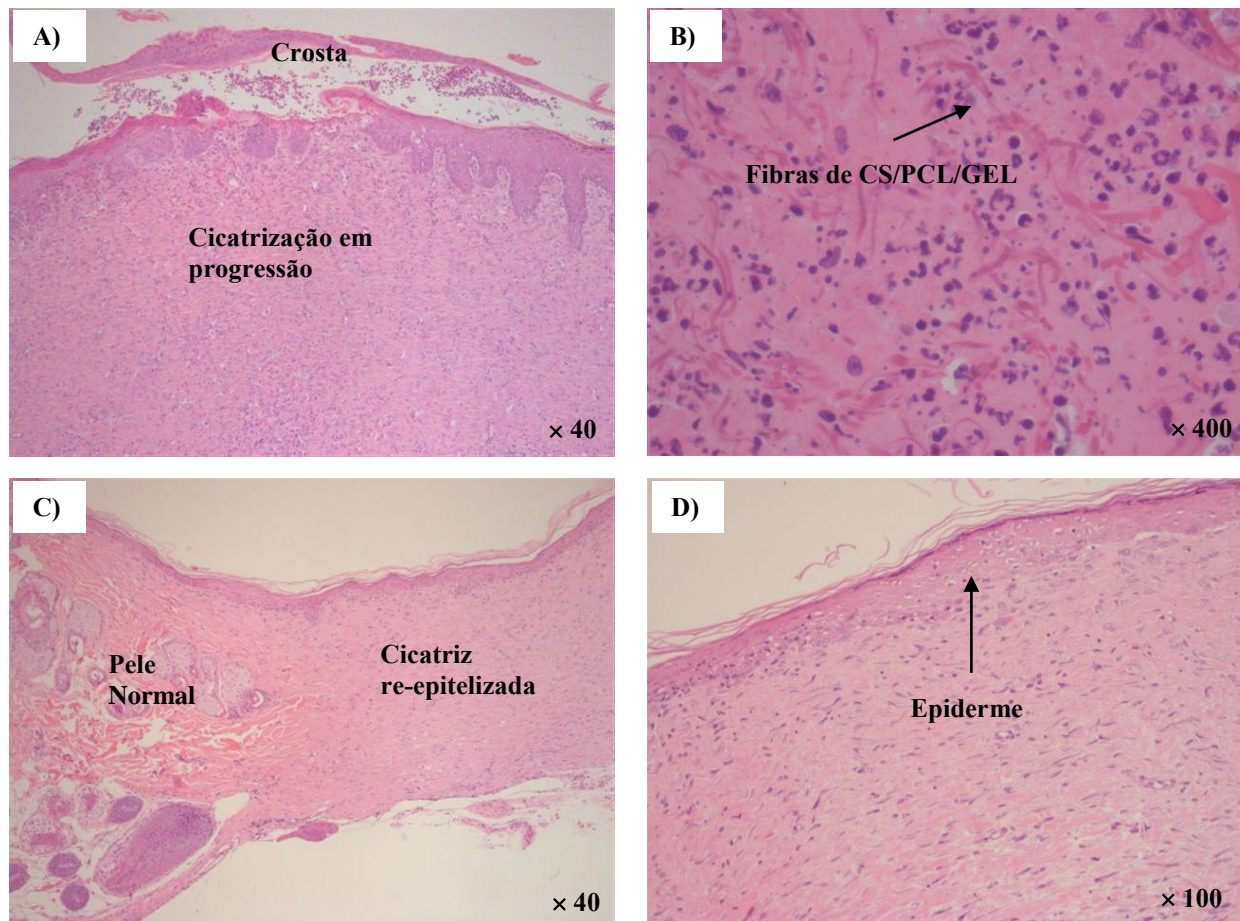


Figura 5. 61 Imagens de histologia, do grupo CS/PCL/GEL representativas da lesão infligida aos ratos à 2ª semana: a) lesão avançada na cicatrização, b) presença de matriz ternária na crosta e em profundidade; à 4ª semana: c) transição cicatriz re-epitelizada sem anexos/ pele normal, d) epiderme regenerada.

Relativamente aos resultados obtidos com a matriz ternária, as imagens histológicas na segunda semana após a lesão revelam uma cicatriz em boa progressão. A matriz encontra-se distribuída na crosta e em profundidade. São também observadas algumas células inflamatórias a fagocitar a matriz (Figura 5.61 a e b).

Às quatro semanas observa-se uma redução significativa do processo inflamatório e a densidade celular na pele normal e na cicatriz é semelhante o que indica que o processo reparativo está em fase final de resolução (Figura 5.61 c e d).

Em suma, com a análise macroscópica e histológica foi possível estabelecer algumas diferenças importantes entre as quatro matrizes.

Dos quatro materiais, a matriz de PCL/GEL foi a menos aderente, resultado de uma natureza menos hidrofílica. Também foi o único grupo onde não se verificou a migração de matriz para a ferida. Em todos os outros foram identificadas fibras na úlcera à segunda semana da lesão. A sua presença deixa de observar-se nas matrizes de CS/GEL e de CS/PCL/GEL à quarta semana após o ferimento o que indica que foram degradadas, à semelhança do que aconteceu nas matrizes unitárias constituídas pelos polímeros naturais. O resultado da matriz ternária mostra que os polímeros naturais são dominantes no processo. Já nos ensaios realizados com a matriz de CS/PCL mantém-se a presença de fibras à 4ª semana, como na matriz de PCL, acompanhada de processo inflamatório. Neste caso, trata-se de uma reacção típica de corpo estranho e que estará a ser o responsável pelo atraso na reparação.

Após 4 semanas todos os grupos apresentaram uma cicatriz re-epitelizada, excepto o CS/PCL cuja ferida não encerrou (sem epiderme).

Capítulo 6 - Conclusões

O objectivo principal do trabalho descrito nesta tese consistia no desenvolvimento e na caracterização física, química e biológica da componente dérmica de um substituto de pele destinado ao tratamento de queimaduras extensas. A componente dérmica basear-se-ia numa matriz de nanofibras, obtidas usando a técnica de electrofiação e integraria na sua composição polímeros biocompatíveis e biodegradáveis, escolhidos em função das suas propriedades favoráveis à regeneração da derme. Em face deste objectivo, foram desenvolvidos três tipos de matrizes: matrizes unitárias, matrizes binárias e uma matriz ternária. Os 3 polímeros usados na composição destas matrizes foram a gelatina, o quitosano e a policaprolactona. Como solvente comum foi usado o ácido acético.

No caso do sistema de matrizes unitárias, as soluções de GEL foram as que permitiram a deposição de fibras por electrofiação com diâmetros mais uniformes, com um diâmetro médio de 858 nm, em contraste com os das fibras de PCL, mais espessas, com um diâmetro médio de 1833 nm, e com os das fibras de CS, mais finas, com um diâmetro médio de 619 nm, ambas com uma maior dispersão nos diâmetros das fibras. Em relação à necessidade de reticulação das matrizes de GEL, devido à sua solubilidade em água, o método que revelou melhores resultados, em termos de adesão e proliferação celular, foi aquele onde se utilizou vapor de glutaraldeído tendo sido por isso utilizado também aquando do desenvolvimento das matrizes binárias e ternária com GEL.

No que diz respeito à caracterização físico-química das matrizes unitárias, verificou-se que as matrizes de PCL apresentam um carácter hidrofóbico (ângulo de contacto igual a $(124 \pm 3)^\circ$) enquanto as matrizes de CS e GEL são hidrofílicas (ângulo de contacto igual a 0°). Em termos de porosidade os valores estimados para a PCL ($85 \pm 2\%$), o CS ($72 \pm 3\%$) e a GEL ($78 \pm 10\%$) situam-se dentro do intervalo 60 a 90% considerado adequado para um substituto de pele.

Relativamente às propriedades mecânicas, e tal como seria esperado, a matriz de PCL é a mais elástica ($E = (6,7 \pm 0,4)$ MPa) e a que possui maior deformação à ruptura ($\epsilon_r = (587 \pm 162)\%$). Já a de GEL é a mais rígida ($E = (162 \pm 96)$ MPa), consequência do processo de reticulação, e a que rompe mais rapidamente ($\epsilon_r = (9 \pm 5)\%$). Por sua vez a matriz de CS exhibe propriedades intermédias, ou seja um módulo de elasticidade $E = (38 \pm 10)$ MPa e uma deformação à ruptura de $(28 \pm 6)\%$.

Quanto aos testes *in vitro* os resultados permitiram concluir que as matrizes de PCL e CS são as mais promissoras para serem utilizadas como substitutos de pele visto ter-se observado migração de algumas células através dos seus poros, permitindo assim a proliferação celular para o seu interior. Em termos de adesão e proliferação celular, é de salientar o bom comportamento da matriz de GEL, tendo-se observado uma elevada densidade de células alinhadas, ainda que somente à superfície, à semelhança do

que aconteceu no controlo. Já em relação à matriz de PCL foi observada uma boa adesão, superior até à da matriz de CS, o que constitui um resultado surpreendente atendendo a que se trata de um suporte hidrofóbico e sem domínios de reconhecimento biológico, enquanto a matriz de CS revelou formação de agregados celulares sobre as suas fibras.

Por fim, os testes *in vivo* permitiram concluir que dos três polímeros a PCL é a menos aderente e a que apresenta a menor taxa de integração na ferida. Durante o período que permanece a cobrir a lesão funciona como uma barreira física que retarda a contracção mas no organismo actua como um corpo estranho. Ambos os fenómenos contribuem para um encerramento da ferida mais lento. As matrizes de CS e de GEL apresentaram uma boa integração na ferida e uma rápida degradação. No final das 4 semanas ambas evidenciaram uma cicatriz re-epitelizada, a do CS ligeiramente superior revelando indícios de promoção activa de re-epitelização. Porém, em todos os grupos analisados o encerramento das lesões é fortemente dominado pelo fenómeno de contracção, dada a elevada taxa de contracção na derme do modelo animal utilizado.

No caso do sistema de matrizes binárias e ternária, a técnica desenvolvida permitiu a deposição de fibras de CS/PCL com um diâmetro médio de 890 nm, fibras de PCL/GEL com um diâmetro médio de 454 nm, fibras de CS/GEL com um diâmetro médio de 998 nm e fibras de CS/PCL/GEL com um diâmetro médio de 1437 nm. É de salientar que a solução de PCL/GEL apenas é electrofiável enquanto emulsão durante 2h, pois os polímeros são imiscíveis, e que a presença de PEO permitiu a formação, e consequente electrofiação, de soluções homogéneas onde estava presente o CS.

Relativamente à caracterização físico-química efectuada a estas matrizes, observou-se que a PCL apenas projecta a sua hidrofobicidade na matriz de PCL/GEL (ângulo de contacto igual a $(58 \pm 3)^\circ$). As restantes matrizes são hidrofílicas (ângulo de contacto igual a 0°). Tal como aconteceu com as matrizes unitárias, os valores de porosidade estimados nas matrizes de CS/PCL ($71 \pm 12\%$), de PCL/GEL ($90 \pm 1\%$), de CS/GEL ($84 \pm 9\%$) e de CS/PCL/GEL ($90 \pm 4\%$) situam-se dentro do intervalo 60 a 90% considerado adequado para um substituto de pele. Em termos de composição química, os resultados sugerem que nas quatro composições analisadas, os polímeros coexistem na mistura, ligando-se por pontes de hidrogénio e interacções de van der Waals.

Relativamente às propriedades mecânicas, nomeadamente módulo de elasticidade e deformação máxima, observou-se um domínio da componente CS nas misturas preparadas com este polímero (CS/PCL: $E = (48 \pm 13)$ MPa e $\varepsilon_r = (22 \pm 3)\%$; CS/GEL: $E = (22 \pm 9)$ MPa e $\varepsilon_r = (31 \pm 6)\%$ e

CS/PCL/GEL: $E = (48 \pm 10)$ MPa e $\varepsilon_r = (18 \pm 3)$ %). Na matriz de PCL/GEL os resultados obtidos, $E = (20 \pm 5)$ MPa e $\varepsilon_r = (20 \pm 10)$ %, reflectem a mistura de ambos os componentes.

Relativamente aos testes *in vitro* foram encontradas evidências de processos de invasão celular em todas as matrizes, excepto na matriz de PCL/GEL. Em termos combinados de adesão e proliferação celular os melhores resultados foram obtidos com a matriz ternária. Nas matrizes de CS/GEL e CS/PCL/GEL a distribuição das células aconteceu de forma essencialmente aleatória, reflectindo assim a mistura dos componentes. Na matriz de CS/PCL as células crescem em agregados, evidenciando o domínio da componente CS nas propriedades biológicas desta matriz. Já na matriz de PCL/GEL o crescimento celular ocorreu de forma alinhada, como na GEL.

Finalmente, em termos de testes *in vivo*, verificou-se que das quatro matrizes, a de PCL/GEL é a menos aderente e a única onde não se detectou a incorporação de material na ferida. Em todas as outras foram identificadas fibras na úlcera à segunda semana da lesão. Apenas as matrizes de CS/GEL e de CS/PCL/GEL apresentaram indícios de degradação, à semelhança do que aconteceu nas matrizes unitárias constituídas pelos polímeros naturais. Na matriz de CS/PCL a presença de fibras na úlcera manteve-se até à 4ª semana, acompanhada de processo inflamatório, atrasando por este motivo o encerramento da lesão. Os restantes grupos apresentaram uma cicatriz re-epitelizada no final do período. Também neste conjunto de matrizes se destaca um encerramento das lesões fortemente dominado por contracção.

Em síntese, dos materiais testados apenas a PCL e o sistema CS/PCL retardam o processo de encerramento das feridas. Em todos os outros grupos foi observada uma cicatriz re-epitelizada, fechada em cerca de 90% por contracção e o restante por formação de cicatriz coberta de epiderme.

Em termos de perspectivas futuras e face ao objectivo inicial deste trabalho, os resultados aqui apresentados, em termos de principais propriedades e potencialidades das matrizes obtidas, poderão constituir um bom ponto de partida para a optimização das mesmas matrizes tendo em vista não só a sua aplicação, como também a sua eventual comercialização. Entre alguns dos aspectos que podem ser optimizados destacam-se a variação da percentagem de cada polímero nas matrizes, sobretudo na ternária, visando uma melhor associação das propriedades dos seus constituintes, a optimização do tempo de reticulação, a produção de matrizes com tamanhos de poro maiores, um estudo detalhado sobre a permeabilidade de gases, a determinação da taxa de degradação das matrizes e por fim a utilização de um animal com pele mais parecida com a humana, por exemplo um coelho ou um cobaio, e onde o fenómeno de contracção não seja tão acelerado, de forma a ser possível observar com mais rigor a dimensão da cicatriz re-epitelizada.

Referências Bibliográficas

- [1] Chung HJ, Park TG. Surface engineered and drug releasing pre-fabricated scaffolds for tissue engineering. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2007;59:249-62.
- [2] Peck MD. Epidemiology of burns throughout the world. Part I: Distribution and risk factors. *Burns*. 2011;37:1087-100.
- [3] Ferreira E, Lucas R, Rossi LA, Andrade D. Curativo do paciente queimado: uma revisão de literatura. *Revista da Escola de Enfermagem da USP*. 2003;37:44-51.
- [4] Shores JT, Gabriel A, Gupta S. Skin Substitutes and Alternatives: A Review. *Advances in Skin & Wound Care*. 2007;20.
- [5] Chong EJ, Phan TT, Lim IJ, Zhang YZ, Bay BH, Ramakrishna S, et al. Evaluation of electrospun PCL/gelatin nanofibrous scaffold for wound healing and layered dermal reconstitution. *Acta Biomater*. England2007. p. 321-30.
- [6] Whang K, Thomas CH, Healy KE, Nuber G. A novel method to fabricate bioabsorbable scaffolds. *Polymer*. 1995;36:837-42.
- [7] Yannas IV, Lee E, Orgill DP, Skrabut EM, Murphy GF. Synthesis and characterization of a model extracellular matrix that induces partial regeneration of adult mammalian skin. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1989;86:933-7.
- [8] Monafo WW, West MA. Current treatment recommendations for topical burn therapy. *Drugs*. 1990;40:364-73.
- [9] Sumit Pramanik and Belinda Pinguan-Murphy and Noor Azuan Abu O. Progress of key strategies in development of electrospun scaffolds: bone tissue. *Science and Technology of Advanced Materials*. 2012;13:043002.
- [10] Joachim TOaC. Drawing a single nanofibre over hundreds of microns. *EPL (Europhysics Letters)*. 1998;42:215.
- [11] Huczko A. Template-based synthesis of nanomaterials. *Applied Physics A*. 2000;70:365-76.
- [12] Ma PX, Zhang R. Synthetic nano-scale fibrous extracellular matrix. *J Biomed Mater Res*. 1999;46:60-72.
- [13] Yu Y-C, Berndt P, Tirrell M, Fields GB. Self-Assembling Amphiphiles for Construction of Protein Molecular Architecture. *Journal of the American Chemical Society*. 1996;118:12515-20.
- [14] Frenot A, Chronakis IS. Polymer nanofibers assembled by electrospinning. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*. 2003;8:64-75.
- [15] Martins A, Reis R, Neves N. Electrospinning: processing technique for tissue engineering scaffolding. *International Materials Reviews*. 2008;53.
- [16] Teo, Ramakrishna. A review on electrospinning design and nanofibre assemblies. *Nanotechnology*. 2006;17:89.
- [17] Zhang YZ, Venugopal J, Huang ZM, Lim CT, Ramakrishna S. Crosslinking of the electrospun gelatin nanofibers. *Polymer*. 2006;47:2911-7.
- [18] Shalumon KT, Anulekha KH, Chennazhi KP, Tamura H, Nair SV, Jayakumar R. Fabrication of chitosan/poly(caprolactone) nanofibrous scaffold for bone and skin tissue engineering. *International Journal of Biological Macromolecules*. 2011;48:571-6.
- [19] Jafari J, Emami SH, Samadikuchaksaraei A, Bahar MA, Gorjipour F. Electrospun chitosan-gelatin nanofiberous scaffold: fabrication and in vitro evaluation. *Biomed Mater Eng. Netherlands*2011. p. 99-112.
- [20] Gautam S, Dinda AK, Mishra NC. Fabrication and characterization of PCL/gelatin composite nanofibrous scaffold for tissue engineering applications by electrospinning method. *Materials Science and Engineering: C*. 2013;33:1228-35.
- [21] Rho KS, Jeong L, Lee G, Seo BM, Park YJ, Hong SD, et al. Electrospinning of collagen nanofibers: effects on the behavior of normal human keratinocytes and early-stage wound healing. *Biomaterials*. 2006;27:1452-61.
- [22] Blackwood KA, McKean R, Canton I, Freeman CO, Franklin KL, Cole D, et al. Development of biodegradable electrospun scaffolds for dermal replacement. *Biomaterials*. 2008;29:3091-104.

- [23] Rnjak-Kovacina J, Wise SG, Li Z, Maitz PKM, Young CJ, Wang Y, et al. Electrospun synthetic human elastin:collagen composite scaffolds for dermal tissue engineering. *Acta Biomaterialia*. 2012;8:3714-22.
- [24] Venugopal J, Ramakrishna S. Biocompatible nanofiber matrices for the engineering of a dermal substitute for skin regeneration. *Tissue Eng*. 2005;11:847-54.
- [25] Venugopal JR, Zhang Y, Ramakrishna S. In vitro culture of human dermal fibroblasts on electrospun polycaprolactone collagen nanofibrous membrane. *Artif Organs*. 2006;30:440-6.
- [26] Yannas IV, Burke JF. Design of an artificial skin. I. Basic design principles. *J Biomed Mater Res*. 1980;14:65-81.
- [27] Yannas IV, Burke JF, Gordon PL, Huang C, Rubenstein RH. Design of an artificial skin. II. Control of chemical composition. *J Biomed Mater Res*. 1980;14:107-32.
- [28] Wang X, Yan Y, Zhang R. A Comparison of Chitosan and Collagen Sponges as Hemostatic Dressings. *Journal of Bioactive and Compatible Polymers*. 2006;21:39-54.
- [29] Wu Y, Jia W, An Q, Liu Y, Chen J, Li G. Multi-action antibacterial nanofibrous membranes fabricated by electrospinning: an excellent system for antibacterial applications. *Nanotechnology*. 2009;20:245101.
- [30] Pulieri E, Chiono V, Ciardelli G, Vozzi G, Ahluwalia A, Domenici C, et al. Chitosan/gelatin blends for biomedical applications. *J Biomed Mater Res A*. 2008;86:311-22.
- [31] Seeley R, Stephens T, Tate P. *Anatomy & Physiology*. 6th ed 2003.
- [32] Metcalfe AD, Ferguson MWJ. Bioengineering skin using mechanisms of regeneration and repair. *Biomaterials*. 2007;28:5100-13.
- [33] MacNeil S. Progress and opportunities for tissue-engineered skin. *Nature*. 2007;445:874-80.
- [34] Klemke C-D, Dippel E, Geilen CC, Koenigsmann MP, Thiel E, Orfanos CE, et al. Atypical generalized eruptive histiocytosis associated with acute monocytic leukemia. *Journal of the American Academy of Dermatology*. 2003;49:233-6.
- [35] Wosicka H, Cal K. Targeting to the hair follicles: Current status and potential. *Journal of Dermatological Science*. 2010;57:83-9.
- [36] Achauer BM, Eriksson E, Guyuron B, Coleman III JJ, Russell RC, Kolk CV. Plastic surgery: indications, operations, and outcomes. Volume 1: Principles and Techniques (Part I) and General Reconstructive Surgery (Part II).
- [37] Enoch S, Leaper DJ. Basic science of wound healing. *Surgery (Oxford)*. 2008;26:31-7.
- [38] Martin P. Wound Healing--Aiming for Perfect Skin Regeneration. *Science*. 1997;276:75-81.
- [39] Gurtner GC, Werner S, Barrandon Y, Longaker MT. Wound repair and regeneration. *Nature*. 2008;453:314-21.
- [40] Singer AJ, Clark RAF. Cutaneous Wound Healing. *New England Journal of Medicine*. 1999;341:738-46.
- [41] Yildirimer L, Thanh NTK, Seifalian AM. Skin regeneration scaffolds: a multimodal bottom-up approach. *Trends in Biotechnology*. 2012;30:638-48.
- [42] Pinheiro P. Queimaduras simples/Tratamento e cuidados básicos. *MDSaúde* 2010.
- [43] Branski L, Dibildox M, Shahrokhi S, Jeschke M. Treatment of burns — established and novel technology. In: Jeschke M, Kamolz L-P, Sjöberg F, Wolf S, editors. *Handbook of Burns*: Springer Vienna; 2012. p. 311-24.
- [44] Helfman T, Ovington L, Falanga V. Occlusive dressings and wound healing. *Clinics in Dermatology*. 1994;12:121-7.
- [45] Ramakrishna S, Fujihara K, Teo W-E, Lim T-C, Ma Z. An Introduction to Electrospinning and Nanofibers.
- [46] Rutledge GC, Fridrikh SV. Formation of fibers by electrospinning. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2007;59:1384-91.
- [47] Doshi J, Reneker DH. Electrospinning process and applications of electrospun fibers. *Journal of Electrostatics*. 1995;35:151-60.

- [48] Gibson P, Schreuder-Gibson H, Rivin D. Transport properties of porous membranes based on electrospun nanofibers. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*. 2001;187–188:469-81.
- [49] Ding B, Wang M, Wang X, Yu J, Sun G. Electrospun nanomaterials for ultrasensitive sensors. *Materials Today*. 2010;13:16-27.
- [50] Chang J, Dommer M, Chang C, Lin L. Piezoelectric nanofibers for energy scavenging applications. *Nano Energy*. 2012;1:356-71.
- [51] Pham Q, Sharma U, Mikos A. Electrospinning of Polymeric Nanofibers for Tissue Engineering Applications: A Review. *Tissue Engineering*. 2006;12.
- [52] Franco P, Silva J, Borges J. Produção de fibras de hidroxiapatite por electrofiação. *Ciência & Tecnologia dos Materiais*. 2010;22.
- [53] Reneker D, Chun I. Nanometre diameter fibres of polymer, produced by electrospinning. *Nanotechnology*. 1996;7.
- [54] Deitzel JM, Kleinmeyer JD, Hirvonen JK, Beck Tan NC. Controlled deposition of electrospun poly(ethylene oxide) fibers. *Polymer*. 2001;42:8163-70.
- [55] Reneker D, Yarin A, Fong H, Koombhongse S. Bending instability of electrically charged liquid jets of polymer solutions in electrospinning. *Journal of Applied Physics*. 2000;87.
- [56] Hohman M, Shin M, Rutledge G, Brenner M. Electrospinning and electrically forced jets. II. Applications. *Physics of Fluids*. 2001;13.
- [57] Hohman M, Shin M, Rutledge G, Brenner M. Electrospinning and electrically forced jets. I. Stability theory. *Physics of Fluids*. 2001;13.
- [58] Yarin A, Koombhongse S, Reneker D. Taylor cone and jetting from liquid droplets in electrospinning of nanofibers. *Journal of Applied Physics*. 2001;90.
- [59] Reneker DH, Yarin AL. Electrospinning jets and polymer nanofibers. *Polymer*. 2008;49:2387-425.
- [60] Bhardwaj N, Kundu SC. Electrospinning: A fascinating fiber fabrication technique. *Biotechnology Advances*. 2010;28:325-47.
- [61] Pant HR, Neupane MP, Pant B, Panthi G, Oh H-J, Lee MH, et al. Fabrication of highly porous poly (ϵ -caprolactone) fibers for novel tissue scaffold via water-bath electrospinning. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 2011;88:587-92.
- [62] Atala A, Lanza R, Thomson J, Nerem R. *Principles of Regenerative Medicine*. 1st ed. Elsevier: Academic Press; 2008.
- [63] Sell SA, Wolfe PS, Garg K, McCool JM, Rodriguez IA, Bowlin GL. The Use of Natural Polymers in Tissue Engineering: A Focus on Electrospun Extracellular Matrix Analogues. *Polymers*. 2010;2:522-53.
- [64] Huang Z-M, Zhang YZ, Kotaki M, Ramakrishna S. A review on polymer nanofibers by electrospinning and their applications in nanocomposites. *Composites Science and Technology*. 2003;63:2223-53.
- [65] Khor E, Lim LY. Implantable applications of chitin and chitosan. *Biomaterials*. 2003;24:2339-49.
- [66] Alain D, Monique D. *Polymeric Biomaterials, Revised and Expanded*. Severian Dumitriu; 2001.
- [67] Torres-Giner S, Ocio MJ, Lagaron JM. Development of active antimicrobial fiber based chitosan polysaccharide nanostructures using Electrospinning Engineering in Life Sciences. 2008;8:11.
- [68] Rinaudo M, Pavlov G, Desbrières J. Influence of acetic acid concentration on the solubilization of chitosan. *Polymer*. 1999;40:7029-32.
- [69] Mathew HWT. Polymer for tissue engineering scaffolds. In: Dumitru S, editor. *Polymeric Materials*. New York, USA 2002.
- [70] Zhang H, Neau SH. In vitro degradation of chitosan by a commercial enzyme preparation: effect of molecular weight and degree of deacetylation. *Biomaterials*. 2001;22:1653-8.
- [71] Tomihata K, Ikada Y. In vitro and in vivo degradation of films of chitin and its deacetylated derivatives. *Biomaterials*. 1997;18:567-75.
- [72] Dumitriu S. Polysaccharides as biomaterials. In: Dumitriu S, editor. *Polymeric Biomaterials*. New York, USA: Marcel Dekker, Inc; 2002.

- [73] Singh DK, Ray AR. Biomedical Applications of Chitin, Chitosan, and their Derivatives. *Polymer Reviews*. 2000;14.
- [74] Karim AA, Bhat R. Fish gelatin: properties, challenges, and prospects as an alternative to mammalian gelatins. *Food Hydrocolloids*. 2009;23:563-76.
- [75] Djabourov M, Leblond J, Papon P. Gelation of aqueous gelatin solutions. I. Structural investigation. *J Phys France*. 1988;49:13.
- [76] Chiou B-S, Avena-Bustillos RJ, Bechtel PJ, Jafri H, Narayan R, Imam SH, et al. Cold water fish gelatin films: Effects of cross-linking on thermal, mechanical, barrier, and biodegradation properties. *European Polymer Journal*. 2008;44:3748-53.
- [77] Gómez-Guillén MC, Pérez-Mateos M, Gómez-Estaca J, López-Caballero E, Giménez B, Montero P. Fish gelatin: a renewable material for developing active biodegradable films. *Trends in Food Science & Technology*. 2009;20:3-16.
- [78] Salgueiro A. Hidrogéis nanocompósitos de ouro para a libertação de fármacos: Universidade de Aveiro; 2011.
- [79] Huang Z-M, Zhang YZ, Ramakrishna S, Lim CT. Electrospinning and mechanical characterization of gelatin nanofibers. *Polymer*. 2004;45:5361-8.
- [80] Rousselot. Ponto Isoelétrico. 2012.
- [81] Chiou B-S, Avena-Bustillos RJ, Shey J, Yee E, Bechtel PJ, Imam SH, et al. Rheological and mechanical properties of cross-linked fish gelatins. *Polymer*. 2006;47:6379-86.
- [82] Songchotikunpan P, Tattiyakul J, Supaphol P. Extraction and electrospinning of gelatin from fish skin. *International Journal of Biological Macromolecules*. 2008;42:247-55.
- [83] An K, Liu H, Guo S, Kumar DNT, Wang Q. Preparation of fish gelatin and fish gelatin/poly(l-lactide) nanofibers by electrospinning. *International Journal of Biological Macromolecules*. 2010;47:380-8.
- [84] Ratanavaraporn J, Rangkupan R, Jeeratawatchai H, Kanokpanont S, Damrongsakkul S. Influences of physical and chemical crosslinking techniques on electrospun type A and B gelatin fiber mats. *International Journal of Biological Macromolecules*. 2010;47:431-8.
- [85] Gómez-Guillén MC, Giménez B, López-Caballero ME, Montero MP. Functional and bioactive properties of collagen and gelatin from alternative sources: A review. *Food Hydrocolloids*. 2011;25:1813-27.
- [86] Polycaprolactone. wikipedia: wikimedia; 2012.
- [87] Woodruff MA, Hutmacher DW. The return of a forgotten polymer—Polycaprolactone in the 21st century. *Progress in Polymer Science*. 2010;35:1217-56.
- [88] Labet M, Thielemans W. Synthesis of polycaprolactone: a review. *Chemical Society Reviews*. 2009;38:3484-504.
- [89] Sravanthi R. Preparation and characterization of poly (ϵ -caprolactone) PCL scaffolds for tissue engineering applications: National Institute of Technology Rourkela-769008 (ORISSA); 2009.
- [90] Cipitria A, Skelton A, Dargaville TR, Dalton PD, Hutmacher DW. Design, fabrication and characterization of PCL electrospun scaffolds—a review. *Journal of Materials Chemistry*. 2011;21:9419-53.
- [91] Chen G, Zhou P, Mei N, Chen X, Shao Z, Pan* L, et al. Silk fibroin modified porous poly(ϵ -caprolactone) scaffold for human fibroblast culture in vitro. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*. 2004;15:671-7.
- [92] Martins A, Pinho ED, Faria S, Pashkuleva I, Marques AP, Reis RL, et al. Surface Modification of Electrospun Polycaprolactone Nanofiber Meshes by Plasma Treatment to Enhance Biological Performance. *Small*. 2009;5:1195-206.
- [93] Araujo JV, Martins A, Leonor IB, Pinho ED, Reis RL, Neves NM. Surface controlled biomimetic coating of polycaprolactone nanofiber meshes to be used as bone extracellular matrix analogues. *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition*. 2008;19:1261-78.
- [94] Park J, Kim J-M, Lee S, Lee S, Jeong Y-K, Kim S, et al. Surface hydrolysis of fibrous poly(ϵ -caprolactone) scaffolds for enhanced osteoblast adhesion and proliferation. *Macromolecular Research*. 2007;15:424-9.

- [95] Lieshout MIV. Tissue engineered aortic valves based on a knitted scaffold: Technische Universiteit Eindhoven; 2005.
- [96] Pitt CG, Gratzl MM, Kimmel GL, Surles J, Schindler A. Aliphatic polyesters II. The degradation of poly (DL-lactide), poly (epsilon-caprolactone), and their copolymers in vivo. *Biomaterials*. 1981;2:215-20.
- [97] Roohani-Esfahani S-I, Nouri-Khorasani S, Lu Z, Appleyard R, Zreiqat H. The influence hydroxyapatite nanoparticle shape and size on the properties of biphasic calcium phosphate scaffolds coated with hydroxyapatite–PCL composites. *Biomaterials*. 2010;31:5498-509.
- [98] Woodward SC, Brewer PS, Moatamed F, Schindler A, Pitt CG. The intracellular degradation of poly(epsilon-caprolactone). *J Biomed Mater Res*. 1985;19:437-44.
- [99] Más Estellés J, Vidaurre A, Meseguer Dueñas J, Castilla Cortázar I. Physical characterization of polycaprolactone scaffolds. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*. 2008;19:189-95.
- [100] Yadav V, Gupta A, Kumar R, Yadav J, Kumar B. Mucoadhesive Polymers: Means of Improving the Mucoadhesive Properties of Drug Delivery System. *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research*. 2010;2:14.
- [101] Dhawan S, Dhawan K, Varma M, Sinha VR. Applications of Poly(ethylene oxide) in Drug Delivery Systems: Part II. *Pharmaceutical Technology*. 2005;Advanstar Communications, Inc. 2005.
- [102] Bhattarai N, Edmondson D, Veisoh O, Matsen FA, Zhang M. Electrospun chitosan-based nanofibers and their cellular compatibility. *Biomaterials*. 2005;26:6176-84.
- [103] Desai K, Kit K, Li J, Zivanovic S. Morphological and Surface Properties of Electrospun Chitosan Nanofibers. *Biomacromolecules*. 2008;9:1000-6.
- [104] Yilmaz E, Erdenizeci N, Yilmaz O. Miscibility of Chitosan and Poly(Ethylene Oxide) in Dilute Solution. *International Journal of Polymer Analysis and Characterization*. 2003;8:327-38.
- [105] Zhang YZ, Su B, Ramakrishna S, Lim CT. Chitosan Nanofibers from an Easily Electrospinnable UHMWPEO-Doped Chitosan Solution System. *Biomacromolecules*. 2007;9:136-41.
- [106] Reticulação. wikipédia: wikimédia; 2012.
- [107] Eugene K. Methods for the treatment of collagenous tissues for bioprostheses. *Biomaterials*. 1997;18:95-105.
- [108] Migneault I, Dartiguenave C, Bertrand M, Waldron K. Glutaraldehyde: behavior in aqueous solution, reaction with proteins, and application to enzyme crosslinking. *BioTechniques*. 2004;37:12.
- [109] Schiffman JD, Schauer CL. Cross-Linking Chitosan Nanofibers. *Biomacromolecules*. 2006;8:594-601.
- [110] Zhao Z, Zheng J, Wang M, Zhang H, Han CC. High performance ultrafiltration membrane based on modified chitosan coating and electrospun nanofibrous PVDF scaffolds. *Journal of Membrane Science*. 2012;394–395:209-17.
- [111] Azami M, Moztarzadeh F, Tahriri M. Preparation, characterization and mechanical properties of controlled porous gelatin/hydroxyapatite nanocomposite through layer solvent casting combined with freeze-drying and lamination techniques. *Journal of Porous Materials*. 2010;17:313-20.
- [112] Vaandering B. Genipin. http://www.wou.edu/las/physci/ch350/Projects_2006/Vaandering/Genipin.htm2006.
- [113] Touyama R, Takeda Y, Inoue K, Kawamura I, Yatsuzuka M, Ikumoto T, et al. Studies on the Blue Pigments Produced from Genipin and Methylamine. I. Structures of the Brownish-Red Pigments, Intermediates Leading to the Blue Pigments. *CHEMICAL & PHARMACEUTICAL BULLETIN*. 1994;42:668-73.
- [114] Butler MF, Ng Y-F, Pudney PDA. Mechanism and kinetics of the crosslinking reaction between biopolymers containing primary amine groups and genipin. *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry*. 2003;41:3941-53.
- [115] Haugh MG, Jaasma MJ, O'Brien FJ. The effect of dehydrothermal treatment on the mechanical and structural properties of collagen-GAG scaffolds. *J Biomed Mater Res A*. 2009;89:363-9.
- [116] Harrison RG, Greenman MJ, Mall FP, Jackson CM. Observations of the living developing nerve fiber. *The Anatomical Record*. 1907;1:116-28.

- [117] Mather J, Roberts P. Introduction to Cell and Tissue Culture: Theory and Technique: New York : Plenum Press; 1998.
- [118] Freshney RI. General Textbooks and Relevant Journals. Culture of Animal Cells: John Wiley & Sons, Inc.; 2005.
- [119] Handbook Cell culture basics Gibco, Invitrogen.
- [120] Santos A, Rodrigues M. Curso de Introdução à Cultura de Células Animais. Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Nova de Lisboa 2011.
- [121] Hsin IC, Yiwei W. Cell Responses to Surface and Architecture of Tissue Engineering Scaffolds. 2011.
- [122] Lampin M, Warocquier C, Legris C, Degrange M, Sigot-Luizard MF. Correlation between substratum roughness and wettability, cell adhesion, and cell migration. *J Biomed Mater Res.* 1997;36:99-108.
- [123] Pok SW, Wallace KN, Madhally SV. In vitro characterization of polycaprolactone matrices generated in aqueous media. *Acta Biomaterialia.* 2010;6:1061-8.
- [124] Kim MH, Kino-Oka M, Kawase M, Yagi K, Taya M. Response of human epithelial cells to culture surfaces with varied roughnesses prepared by immobilizing dendrimers with/without D-glucose display. *J Biosci Bioeng.* 2007;103:192-9.
- [125] Lo CM, Wang HB, Dembo M, Wang YL. Cell movement is guided by the rigidity of the substrate. *Biophys J.* 2000;79:144-52.
- [126] Thorsteinsdottir S, Deries M, Cachaco AS, Bajanca F. The extracellular matrix dimension of skeletal muscle development. *Dev Biol.* 2011;354:191-207.
- [127] Bakeine G. Design and Microfabrication of a smart 3D scaffold for tissue engineering with vascular and immuno-protection capabilities: Università Degli Studi di Trieste; 2007.
- [128] Citoquímica. Wikipédia. Wikimédia 2012.
- [129] Santos J. Princípios Básicos de Imunocitoquímica. Departamento de Zoologia: Faculdade de Ciências e Tecnologia, Universidade de Coimbra.
- [130] ToPro-3 Iodine (642/661) 1mM solution in DMSO. Molecular Probes. Life technologies.
- [131] Alexa Fluor Dyes Spanning the Visible and Infrared Spectrum—Section 1.3. Molecular Probes. Life technologies.
- [132] Imunocitoquímica. Wikipédia. Wikimédia 2012.
- [133] Santos A, Bonaparte D, Afonso R, Real J, Maia A, Antunes L, et al. Ciências de Animais de Laboratório - Curso Teórico Online. SPCAL - Sociedade Portuguesa de Ciências em Animais de Laboratório 2012.
- [134] KSV. The Modular CAM 200 - Optical Contact Angle and Surface Tension Meter. Product Brochure: KSV Instruments.
- [135] Cidade M. Reologia de Polímeros - Texto de Apoio. Faculdade de Ciências e Tecnologia, Universidade Nova de Lisboa 2005.
- [136] Aldeek F, Mustin C, Balan L, Roques-Carmes T, Fontaine-Aupart M-P, Schneider R. Surface-engineered quantum dots for the labeling of hydrophobic microdomains in bacterial biofilms. *Biomaterials.* 2011;32:5459-70.
- [137] Ketelson H, Perry S, Sawyer W, Jacob J. Exploring the Science and Technology of Contact Lens Comfort. Is there more we can do to improve comfort and reduce dropouts? *Contact Lens Spectrum* 2011.
- [138] Jainchill JL, Aaronson SA, Todaro GJ. Murine Sarcoma and Leukemia Viruses: Assay Using Clonal Lines of Contact-Inhibited Mouse Cells. *Journal of Virology.* 1969;4.
- [139] Calado A, Kutay U, Kühn U, Wahle E, Carmo-Fonseca M. Deciphering the cellular pathway for transport of poly(A)-binding protein II. *RNA.* 2000;6.
- [140] Wong S-C, Baji A, Leng S. Effect of fiber diameter on tensile properties of electrospun poly(ϵ -caprolactone). *Polymer.* 2008;49:4713-22.
- [141] Theron SA, Zussman E, Yarin AL. Experimental investigation of the governing parameters in the electrospinning of polymer solutions. *Polymer.* 2004;45:2017-30.

- [142] Sajeev US, Anoop Anand K, Menon D, Nair S. Control of nanostructures in PVA, PVA/chitosan blends and PCL through electrospinning. *Bulletin of Materials Science*. 2008;31:343-51.
- [143] Prabhakaran MP, Venugopal JR, Chyan TT, Hai LB, Chan CK, Lim AY, et al. Electrospun biocomposite nanofibrous scaffolds for neural tissue engineering. *Tissue Eng Part A*. 2008;14:1787-97.
- [144] Ghasemi-Mobarakeh L, Prabhakaran MP, Morshed M, Nasr-Esfahani M-H, Ramakrishna S. Electrospun poly(ϵ -caprolactone)/gelatin nanofibrous scaffolds for nerve tissue engineering. *Biomaterials*. 2008;29:4532-9.
- [145] Zhang Y, Ouyang H, Lim CT, Ramakrishna S, Huang Z-M. Electrospinning of gelatin fibers and gelatin/PCL composite fibrous scaffolds. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*. 2005;72B:156-65.
- [146] Ohkawa K, Cha D, Kim H, Nishida A, Yamamoto H. Electrospinning of Chitosan. *Macromolecular Rapid Communications*. 2004;25:1600-5.
- [147] Geng X, Kwon O-H, Jang J. Electrospinning of chitosan dissolved in concentrated acetic acid solution. *Biomaterials*. 2005;26:5427-32.
- [148] Vrieze S, Westbroek P, Camp T, Langenhove L. Electrospinning of chitosan nanofibrous structures: feasibility study. *Journal of Materials Science*. 2007;42:8029-34.
- [149] Klossner RR, Queen HA, Coughlin AJ, Krause WE. Correlation of chitosan's rheological properties and its ability to electrospin. *Biomacromolecules*. 2008;9:2947-53.
- [150] Duan B, Dong C, Yuan X, Yao K. Electrospinning of chitosan solutions in acetic acid with poly(ethylene oxide). *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition*. 2004;15:797-811.
- [151] Kriegel C, Kit KM, McClements DJ, Weiss J. Electrospinning of chitosan-poly(ethylene oxide) blend nanofibers in the presence of micellar surfactant solutions. *Polymer*. 2009;50:189-200.
- [152] Zvezdova D. Synthesis and characterization of chitosan from marine sources in Black Sea. *Annual Proceedings, "Angel Kanchev" University of Ruse*. 2010;49:65-9.
- [153] Sisson K, Zhang C, Farach-Carson MC, Chase DBR, John F. Evaluation of Cross-Linking Methods for Electrospun Gelatin on Cell Growth and Viability. *BioMacromolecules*. 2009;10.
- [154] Ko JH, Yin H, An J, Chung DJ, Kim J-H, Lee SB, et al. Characterization of cross-linked gelatin nanofibers through electrospinning. *Macromolecular Research*. 2010;18.
- [155] Panzavolta S, Giofrè M, Focarete ML, Gualandi C, Foroni L, Bigi A. Electrospun gelatin nanofibers: Optimization of genipin cross-linking to preserve fiber morphology after exposure to water. *Acta Biomaterialia*. 2011;7:1702-9.
- [156] Choktaweasap N, Arayanarakul K, Aht-ong D, Meechaisue C, Supaphol P. Electrospun Gelatin Fibers: Effect of Solvent System on Morphology and Fiber Diameters. *Polym J*. 2007;39:622-31.
- [157] Drexler JW, Powell HM. Dehydrothermal Crosslinking of Electrospun Collagen. *Tissue Engineering: Part C*. 2011;17.
- [158] De Wael K, Verstraete A, Van Vlierberghe S, Dejonghe WD, Peter, Adriaens A. The Electrochemistry of a Gelatin Modified Gold Electrode. *International Journal of Electrochemical Science*. 2011;6.
- [159] Chen F, Lee CN, Teoh SH. Nanofibrous modification on ultra-thin poly(ϵ -caprolactone) membrane via electrospinning. *Materials Science and Engineering: C*. 2007;27:325-32.
- [160] Serrano MC, Pagani R, Vallet-Regí M, Peña J, Rámila A, Izquierdo I, et al. In vitro biocompatibility assessment of poly(ϵ -caprolactone) films using L929 mouse fibroblasts. *Biomaterials*. 2004;25:5603-11.
- [161] Sundararaghavan HG, Monteiro GA, Lapin NA, Chabal YJ, Miksan JR, Shreiber DI. Genipin-induced changes in collagen gels: correlation of mechanical properties to fluorescence. *J Biomed Mater Res A*. 2008;87:308-20.
- [162] Wang C, Lau TT, Loh WL, Su K, Wang DA. Cytocompatibility study of a natural biomaterial crosslinker--Genipin with therapeutic model cells. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*. 2011;97:58-65.
- [163] Fang N, Zhu A, Chan-Park MB, Chan V. Adhesion contact dynamics of fibroblasts on biomacromolecular surfaces. *Macromol Biosci*. 2005;5:1022-31.
- [164] Huang Y, Onyeri S, Siewe M, Moshfeghian A, Madihally SV. In vitro characterization of chitosan-gelatin scaffolds for tissue engineering. *Biomaterials*. 2005;26:7616-27.

- [165] Neves SC, Moreira Teixeira LS, Moroni L, Reis RL, Van Blitterswijk CA, Alves NM, et al. Chitosan/Poly(ϵ -caprolactone) blend scaffolds for cartilage repair. *Biomaterials*. 2011;32:1068-79.
- [166] Feng B, Tu H, Yuan H, Peng H, Zhang Y. Acetic-acid-mediated miscibility toward electrospinning homogeneous composite nanofibers of GT/PCL. *Biomacromolecules*. 2012;13:3917-25.
- [167] Lim YZZaYFaZ-MHaSRaCT. Fabrication of porous electrospun nanofibres. *Nanotechnology*. 2006;17:901.
- [168] Wan Y, Lu X, Dalai S, Zhang J. Thermophysical properties of polycaprolactone/chitosan blend membranes. *Thermochimica Acta*. 2009;487:33-8.
- [169] García Cruz DM, Coutinho DF, Mano JF, Gómez Ribelles JL, Salmerón Sánchez M. Physical interactions in macroporous scaffolds based on poly(ϵ -caprolactone)/chitosan semi-interpenetrating polymer networks. *Polymer*. 2009;50:2058-64.
- [170] Shalumon KT, Anulekha KH, Girish CM, Prasanth R, Nair SV, Jayakumar R. Single step electrospinning of chitosan/poly(caprolactone) nanofibers using formic acid/acetone solvent mixture. *Carbohydrate Polymers*. 2010;80:413-9.
- [171] Cooper A, Bhattarai N, Zhang M. Fabrication and cellular compatibility of aligned chitosan–PCL fibers for nerve tissue regeneration. *Carbohydrate Polymers*. 2011;85:149-56.
- [172] Van der Schueren L, Steyaert I, De Schoenmaker B, De Clerck K. Polycaprolactone/chitosan blend nanofibres electrospun from an acetic acid/formic acid solvent system. *Carbohydrate Polymers*. 2012;88:1221-6.
- [173] Van der Schueren L, De Schoenmaker B, Kalaoglu ÖI, De Clerck K. An alternative solvent system for the steady state electrospinning of polycaprolactone. *European Polymer Journal*. 2011;47:1256-63.
- [174] Heydarkhan-Hagvall S, Schenke-Layland K, Dhanasopon AP, Rofail F, Smith H, Wu BM, et al. Three-dimensional electrospun ECM-based hybrid scaffolds for cardiovascular tissue engineering. *Biomaterials*. 2008;29:2907-14.
- [175] Dhandayuthapani B, Krishnan UM, Sethuraman S. Fabrication and characterization of chitosan-gelatin blend nanofibers for skin tissue engineering. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*. 2010;94:264-72.
- [176] Haider S, Al-Masry WA, Bukhari N, Javid M. Preparation of the chitosan containing nanofibers by electrospinning chitosan–gelatin complexes. *Polymer Engineering & Science*. 2010;50:1887-93.
- [177] Mao J, Zhao L, De Yao K, Shang Q, Yang G, Cao Y. Study of novel chitosan-gelatin artificial skin in vitro. *J Biomed Mater Res A*. 2003;64:301-8.
- [178] Qian YF, Zhang KH, Chen F, Ke QF, Mo XM. Cross-linking of gelatin and chitosan complex nanofibers for tissue-engineering scaffolds. *J Biomater Sci Polym Ed*. Netherlands 2011. p. 1099-113.

Anexo I

I.I Curva de Calibração das células 3T3

O número total de células na confluência foi contado com um hemocítmetro tendo-se encontrado um número de 300.000 células/poço (área do poço = 0,95 cm²). O comportamento linear das células 3T3 ocorre dentro da gama 1600-150.000 células/poço.

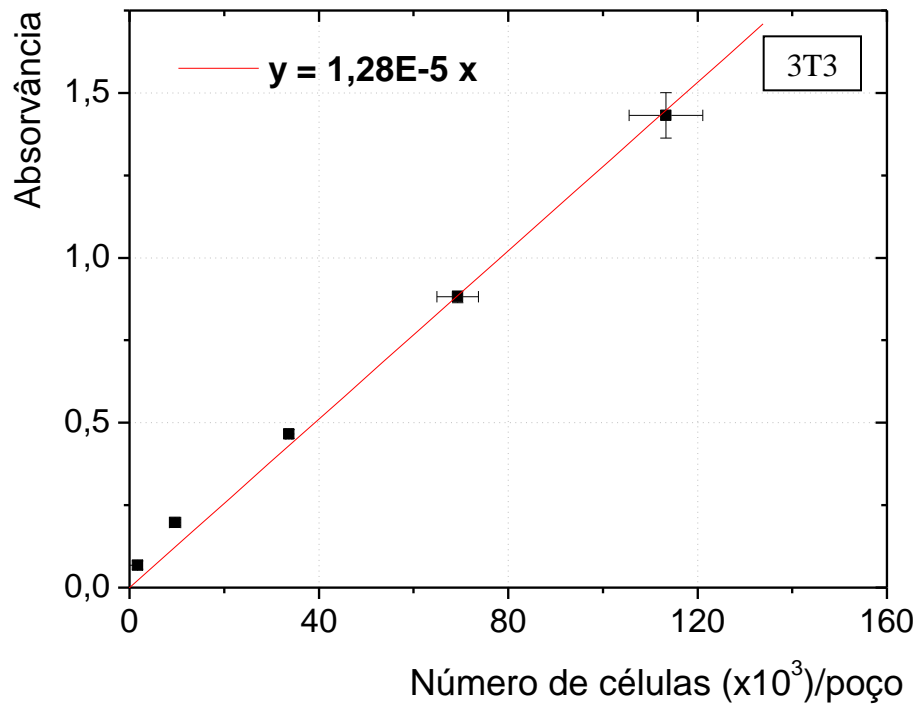


Figura I. I Variação da absorvância em função do número de células 3T3.

I.II Curva de Calibração das células HFFF2

O número total de células na confluência foi contado com um hemocitômetro tendo-se encontrado um número próximo de 150.000 células/poço (área do poço = 0,95 cm²). O comportamento linear das células 3T3 ocorre dentro da gama 1100-70.000 células/poço.

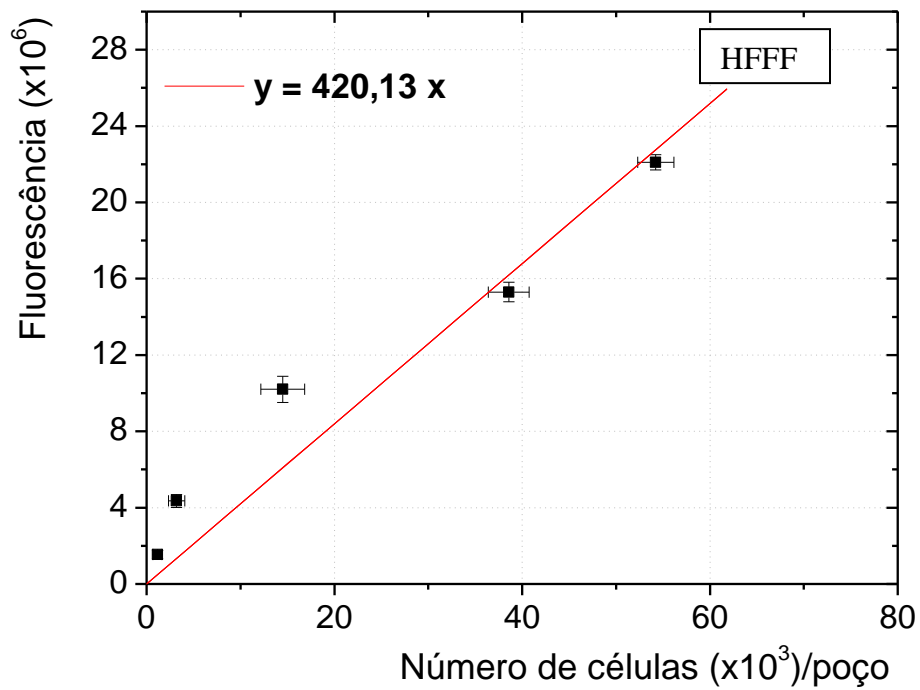


Figura I. II Variação da fluorescência em função do número de células HFFF2.