



Nuno Alexandre Cardoso Figueiredo

Licenciatura em Engenharia Biomédica

Avaliações *in vitro* da utilização da gelatina como material de suporte à regeneração de tecidos

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em
Engenharia Biomédica

Orientador: Célia Maria Reis Henriques, PhD, FCT-UNL

Júri:

Presidente: Prof. Doutora Carla Maria Quintão Pereira

Arguente: Prof. Doutor João Paulo Miranda Ribeiro Borges

Vogal: Prof. Doutora Célia Maria Reis Henriques

Avaliações *in vitro* da utilização da gelatina como material de suporte à regeneração de tecidos

Copyright © Nuno Alexandre Cardoso Figueiredo, Faculdade de Ciências e Tecnologia, Universidade Nova de Lisboa.

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

Agradecimentos

Desejo expressar os mais sinceros agradecimentos a todas as pessoas que considero fundamentais, pelo seu contributo para a realização desta dissertação e sem as quais este trabalho não teria sido possível, nomeadamente:

A Prof. *Doutora Célia Reis Henriques*, que para além de ter proposto um trabalho tão aliciante, me acompanhou sempre em todo o processo, mostrando uma disponibilidade notável e um grande detalhe na explicação dos processos.

O Prof. *Doutor Jorge Carvalho Silva*, que me ajudou ao longo de todo o trabalho na resolução de vários problemas com sugestões assertivas.

A Prof. *Doutora Isabel Catarino* e ao Prof. *Doutor Grégoire Bonfait* por me confiarem a utilização do seu material.

Aos meus colegas de laboratório *Tânia Vieira* e *Maike Gomes*, pela boa integração, pelas dicas e sobretudo pela boa disposição.

Aos meus colegas e amigos que partilharam comigo toda esta experiência com entusiasmo e alegria. Um agradecimento especial para o *Samuel Guerreiro*, *Vasco Silva*, *Filipe Monteiro*, *Inês Ribeiro* e *Ricardo Antunes*.

Aos meus pais, *José Figueiredo* e *Ana Cardoso*, ao meu irmão *João Figueiredo* e a toda a minha família que me ajudou durante todo este processo com imenso apoio sempre que precisei.

Por último, mas não menos importante, um agradecimento especial à *Constança Pires Valadas Pulido Garcia* por estar ao meu lado durante mais de quatro anos e ter sido um elemento fulcral no desenvolvimento deste trabalho, por todo o apoio e incentivo.

Resumo

Neste trabalho foram produzidas matrizes de nanofibras de gelatina de porco e de gelatina de peixe através da técnica de electrofiação. Estas matrizes têm uma estrutura morfológica e química interessantes para o desenvolvimento de *scaffolds* no âmbito da Engenharia de Tecidos mas a sua instabilidade em água compromete essa aplicação. Assim, as matrizes foram reticuladas recorrendo a dois processos diferentes: um físico (tratamento desidrotérmico - DHT) e outro químico (exposição a vapor de glutaraldeído - GTA). Os resultados obtidos permitiram verificar que a gelatina de porco reticulou mais facilmente que a gelatina de peixe, provavelmente devido a uma maior presença de grupos funcionais capazes de reagir com os processos de reticulação. Foram analisados possíveis efeitos citotóxicos das matrizes reticuladas em culturas de células Vero. Os extratos das matrizes não revelaram ser tóxicos mas o tratamento com GTA comprometeu a adesão das células às matrizes indicando acarretar um certo risco de toxicidade. O uso da glicina revelou-se eficaz na redução dessa toxicidade.

Para além das matrizes de fibras sem orientação preferencial (depositadas num coletor plano), foram depositadas fibras paralelamente alinhadas recorrendo a um coletor cilíndrico rotatório. Marcações fluorescentes de células semeadas nos dois tipos de fibras revelaram que o citoesqueleto das células semeadas nas fibras alinhadas se organiza na direção do alinhamento.

Palavras-chave: Engenharia de Tecidos, Gelatina, Electrofiação, Reticulação, GTA, DHT

Abstract

The objective of this work was to produce gelatin based scaffolds, using gelatins from porcine skin and cold water fish skin. The production was assured through an electrospinning technique capable of assembling nanofiber scaffolds. Gelatin has weak mechanical proprieties, therefore the gelatin based scaffolds had to be crosslinked before *in vitro* use. This procedure was done by two different techniques: a physical treatment based on heat and vacuum (DHT- dehydrothermal treatment) and through interaction with the vapor of a chemical agent, glutaraldehyde (GTA). The results showed that crosslinking, both DHT and GTA treatments, were more effective in porcine gelatin based scaffolds rather than in fish gelatins. Further ahead, GTA treatment, despite being more effective than DHT, building crosslinks, carries an increase of toxicity to the cells, as showed in a Vero cells culture. In the same culture was also noticed that the use of a glycine based solution could react with GTA residues, neutralizing them.

Besides randomly orientated fibers (obtained with a plane collector), parallel oriented fibers were obtained with the help of a rotating cylindrical collector. Fluorescent staining of seeded cells in both types of fibers showed that the cytoskeleton organizes itself according to the direction of the alignment in the case of the parallel oriented fibers.

Key-words: Tissue Engineering, Gelatin, Electrospinning, Crosslinking, GTA, DHT

Conteúdo

Agradecimentos.....	iii
Resumo.....	v
Abstract.....	vii
Lista de Figuras.....	xi
Lista de Tabelas.....	xv
Lista de Siglas.....	xvii
Capítulo 1 – Enquadramento.....	1
Capítulo 2 – Introdução.....	2
2.1. Célula-Substrato.....	3
2.1.1. Matriz Extracelular.....	3
2.1.2. Interação Célula-Substrato.....	3
2.2. Gelatina.....	6
2.3. Reticulação.....	7
2.3.1. Glutaraldeído (GTA).....	8
2.3.2. Processo Desidrotérmico (DHT).....	10
2.4. Electrofiação.....	11
2.5. Alinhamento de fibras.....	14
Capítulo 3 - Materiais e Métodos.....	17
3.1. Polímeros.....	17
3.2. Reticulação.....	19
3.3. Caracterização das matrizes.....	20
3.3.1. Morfologia.....	20
3.3.2. Composição Química.....	21
3.3.3. Perda de Massa.....	21
3.4. Culturas Celulares.....	25
3.4.1. HFFF2.....	25
3.4.2. Vero.....	26
3.4.3. Testes de Extrato.....	27

Capítulo 4 - Discussão dos Resultados.....	28
4.1. Caracterização das Matrizes.....	28
4.1.1. Análise SEM.....	31
4.1.2. Tração Mecânica.....	35
4.2. Reticulação.....	36
4.2.1. Análise FTIR.....	36
4.2.2. Perda de Massa.....	40
4.2.3. Grau de inchamento.....	41
4.2.4. Quantificação de aminoácidos/Ensaio Ninidrina.....	43
4.3. Testes <i>in vitro</i>	46
4.3.1. Cultura HFFF2.....	46
4.3.2. Vero.....	49
Capítulo 5 - Conclusões Finais e Perspetivas Futuras.....	60
Bibliografia.....	64
Anexos.....	68
Apêndice A: Esterilização das matrizes e sementeira nos poços das placas.....	68
Apêndice B: Leitura das absorvâncias dos poços de cultura.....	69
Apêndice C: Ensaio com Ninidrina.....	70

Lista de Figuras

Figura 2.1 – Estrutura de subunidades de integrinas activas ligando a matriz extracelular ao citoesqueleto de actina. Adaptado de [7].....	5
Figura 2.2 – Formas químicas do GTA em solução aquosa [19].....	9
Figura 2.3 – Mecanismo de reticulação da gelatina por GTA [22].....	9
Figura 2.4 – Mecanismos de reticulação do quitosano com GTA: a) formação de bases Schiff, b) formação de aductos do tipo Michael com terminais aldeído.....	10
Figura 2.5 – Montagem típica de um sistema de electrofiação composta por uma bomba injetora, um sistema de alta tensão e um coletor. Na figura pode-se ainda observar a formação de um cone de Taylor e o jato polimérico [25].....	12
Figura 2.6 – Imagens SEM de (a) nanofibras de colagénio paralelamente alinhadas, (b) nanofibras de colagénio sem alinhamento preferencial (desalinhadas), (c) nanofibras de colagénio alinhadas e reticuladas com GTA (X-ACL), (d) nanofibras de colagénio desalinhadas e reticuladas com GTA [28].	15
Figura 2.7 – Estudos comparativos da eficácia na adesão (a) e proliferação (b) de fibroblastos em matrizes de colagénio reticuladas com GTA alinhadas (X-ACL) e desalinhadas (X-RCL) [28].....	16
Figura 2.8 – Alongamento de células neuronais estaminais e respetivos axónios segundo a direção de alinhamento das fibras electrofiadas [29].....	16
Figura 3.1 – Sistema de electrofiação utilizado para a produção das matrizes de nanofibras: (a) fonte de alta tensão, (b) bomba ejetora, (c) coletor.	18
Figura 3.2 – Coletor utilizado para suportar as lamelas de 12 mm na deposição de nanofibras por electrofiação.....	19
Figura 3.3 – Reação da ninidrina com um aminoácido primário dando origem a um produto de cor azul-púrpura.....	23
Figura 3.4 – Curvas de tração de matrizes de colagénio e de gelatina electrofiadas (Tensão vs Deformação) [32].	24
Figura 3.5 – Equipamento utilizado para os ensaios de tração (Rheometric Scientific).....	25

Figura 3.6 – Placa de 24 poços com poços e anilhas de teflon no seu interior para cultura de células HFFF2.....	26
Figura 4.1 - Observação ao microscópio ótico (Ampliação ×50) da morfologia das matrizes de gelatina de porco, para duas distâncias diferentes da agulha ao coletor: (a) 15 cm, (b) 25 cm, para uma tensão constante de 15kV e um caudal de 0,2 ml/h (Escala das imagens: 20 μm).	29
Figura 4.2 – Observação ao microscópio ótico (Ampliação ×100) da morfologia das matrizes de gelatina de porco, fiadas aplicando duas tensões diferentes: (a) 12 kV, (b) 16 kV, para uma distância constante agulha-coletor de 20 cm e um caudal de 0,2 ml/h (Escala das imagens: 10 μm).....	30
Figura 4.3 - Observação ao microscópio ótico (Ampliação ×100) da morfologia das matrizes de gelatina de porco, fiadas utilizando dois caudais de ejeção diferentes: (a) 0.1 ml/h, (b) 0.5 ml/h, para uma distância constante agulha-coletor de 20 cm e uma tensão constante de 15 kV (Escala das imagens: 10μm).	31
Figura 4.4 – Imagens SEM das matrizes de fibras de gelatina de peixe e respectivos histogramas relativos à medição dos diâmetros das fibras: não reticuladas (a.1) e (a.2), reticuladas com GTA (b.1) e (b.2) e reticuladas por DHT (c.1) e (c.2).....	33
Figura 4.5 – Imagens SEM das matrizes de fibras de gelatina de porco e respectivos histogramas relativos à medição dos diâmetros das fibras: não reticuladas (a.1) e (a.2), reticuladas com GTA (b.1) e (b.2) e reticuladas por DHT (c.1) e (c.2).....	34
Figura 4.6 – Curva de tração para uma amostra de matriz de gelatina de peixe reticulada por DHT por 96 horas ensopada em água.....	36
Figura 4.7 – Espetros FTIR da gelatina de peixe e da gelatina de porco e algumas das principais estruturas presentes: (a) amida A, (b) amida B, (c) amida I, (d) amida II e (e) amida III.	38
Figura 4.8 – Espectros FTIR da gelatina de peixe (GelF), gelatina de peixe reticulada por DHT durante 96 horas (GelF-DHT) e gelatina de peixe reticulada com GTA durante 8 horas (GelF-GTA).	39
Figura 4.9 - Espectros FTIR da gelatina de porco (GelP), gelatina de porco reticulada por DHT durante 48 horas (GelF-DHT) e gelatina de porco reticulada com GTA durante 4 horas (GelF-GTA).	39

Figura 4.10 – Perda de massa das matrizes de gelatina de peixe (GelF-GTA) e matrizes de gelatina de porco (GelP-GTA) reticuladas com GTA durante vários períodos de tempo.....	40
Figura 4.11 – Perda de massa nas matrizes de gelatina de peixe (GelF-DHT) e matrizes de gelatina de porco (GelP-DHT) reticuladas por DHT durante vários períodos de tempo.....	41
Figura 4.12 – Gráfico do Grau de Inchamento das amostras de gelatina de peixe reticuladas com GTA (GelF-GTA) e por DHT (GelF-DHT) durante 0,5 e 24 horas.....	42
Figura 4.13 - Gráfico do Grau de Inchamento das amostras de gelatina de porco reticuladas com GTA (GelP-GTA) e por DHT (GelP-DHT) durante 0,5 e 24 horas.....	43
Figura 4.14 – Gráfico da absorvância das soluções de ninidrina com várias concentrações de gelatina: 1,5 - 4 mg/ml (barras de incerteza correspondentes ao desvio padrão da média das 3 leituras de absorvância feitas para cada amostra).	44
Figura 4.15 – Gráfico da absorvância das soluções de ninidrina com várias concentrações de gelatina (0 - 5 mg/ml) e da solução onde foi colocada 10 mg de matriz de GelP-GTA representada a laranja (barras de incerteza correspondentes ao desvio padrão da média das 3 leituras de absorvância feitas para cada amostra).	45
Figura 4.16 – Gráfico de absorvância correspondente à adesão das células HFFF2 ao fim de 24 horas nas matrizes com as condições selecionadas e controlo (CC1).	46
Figura 4.17 - Gráfico de absorvância correspondente à adesão e proliferação das células HFFF2 nas matrizes com as condições selecionadas e o controlo (CC1).	47
Figura 4.18 – Observação do controlo de células Vero ao fim de 48 horas de cultura.	49
Figura 4.19 - Representação gráfica da relação entre o tratamento das matrizes com glicina e sem glicina e o crescimento celular ao fim de 24 horas (Adesão). * Valores com variação estatística significativa: $p(\text{GelF-DHT})= 0.042$	50
Figura 4.20 - Observação no microscópio de fluorescência das células por marcação DAPI nas matrizes GelP-DHT (a) e GelP-DHTG (b).	51
Figura 4.21 - Observação no microscópio de fluorescência das células por marcação DAPI nas matrizes GelF-DHT (a) e GelF-DHTG (b).	51

Figura 4.22 – Representação gráfica da relação entre o tratamento das matrizes com glicina e sem glicina e o crescimento celular ao fim de 48 horas. * Valores com variação estatística significante: $p(\text{GelP-GTA})= 0.037$; $p(\text{GelF-GTA})=0.014$	52
Figura 4.23 – Observação no microscópio de fluorescência das células por marcação DAPI nas matrizes GelP-GTA (a) e GelP-GTAG (b).	54
Figura 4.24 - Observação no microscópio de fluorescência das células por marcação DAPI nas matrizes GelF-GTA (a) e GelF-GTAG (b).	54
Figura 4.25 – Gráfico representativo da população de células expostas ao meio condicionado pelas matrizes selecionadas em comparação com o controlo de células (CC).	55
Figura 4.26 - Representação gráfica da relação entre o tratamento das matrizes com glicina e sem glicina e o crescimento celular ao fim de 24 horas (Adesão). * Valores com variação estatística significante: $p(\text{GelF-GTA})=0.0099$	56
Figura 4.27 - Representação gráfica da relação entre o tratamento das matrizes com glicina e sem glicina e o crescimento celular ao fim de 48 horas. * Valores com variação estatística significante: $p(\text{GelF-GTA})= 0.0024$; $p(\text{GelF-DHT})=0.0285$	57
Figura 4.28 - Representação gráfica da relação entre o tratamento das matrizes com glicina e sem glicina e o crescimento celular ao fim de 72 horas. * Valores com variação estatística significante: $p(\text{GelF-GTA})= 0.0120$; $p(\text{GelF-DHT})=0.0239$	58
Figura 4.29 – Marcação por faloidina do citoesqueleto (a) e marcação DAPI dos núcleos das células (b) de uma matriz alinhada de gelatina de porco tratada com DHT por 48 horas.	59
Figura 4.30 - Marcação por faloidina do citoesqueleto (a) e marcação DAPI dos núcleos das células (b) de uma matriz desalinhada de gelatina de porco tratada com DHT por 48 horas.	59

Lista de Tabelas

Tabela 2.1 – Grupos funcionais existentes à superfície dos materiais, propriedades que conferem à superfície e o seu efeito em células [5].	4
Tabela 3.1 – Gelatinas utilizadas para a produção de soluções poliméricas para a electrofiação.	17
Tabela 3.2 - Matrizes analisadas através da microscopia SEM.	21
Tabela 4.1 – Condições de electrofiação escolhidas para a realização do trabalho.	30
Tabela 4.2 – Diâmetros médios e incertezas associadas (desvio-padrão da média) das amostras (n=30) de gelatina de peixe (GelF), gelatina de peixe reticulada com GTA (GelF-GTA) e gelatina de peixe reticulada por DHT (GelF-DHT).	32
Tabela 4.3 - Diâmetros médios e erros associados (desvio-padrão da média) das amostras (n=30) de gelatina de porco (GelP), gelatina de porco reticulada com GTA (GelP-GTA) e gelatina de porco reticulada por DHT (GelP-DHT).	33
Tabela 4.4 – Média dos módulos de Young para as matrizes das diferentes condições e respetivos desvios padrões da média para uma população de quatro amostras por condição.	35
Tabela 4.3 – Modos de vibração da gelatina.	37
Tabela 4.6 – Tabela comparativa das taxas de crescimento celular entre 24h e 72h nas matrizes reticuladas com vapor de GTA e por DHT	48
Tabela 4.7 – Tabela comparativa das taxas de crescimento celular entre 72h e 7 dias nas matrizes reticuladas com vapor de GTA e por DHT	48
Tabela 4.8 – Tabela comparativa entre as taxas de crescimento celular nas matrizes reticuladas com GTA tratadas com e sem glicina: matrizes de gelatina de porco sem tratamento (GelP-GTA), matrizes de gelatina de porco com glicina (GelP-GTAG), matrizes de gelatina de peixe sem tratamento (GelF-GTA) e matrizes de gelatina de peixe com glicina (GelF-GTAG).	53
Tabela 4.9 - Tabela comparativa entre as taxas de crescimento celular nas matrizes reticuladas por DHT tratadas com e sem glicina: matrizes de gelatina de porco sem tratamento (GelP-DHT), matrizes de gelatina de porco com glicina (GelP-DHTG),	

matrizes de gelatina de peixe sem tratamento (GelF-DHT) e matrizes de gelatina de peixe com glicina (GelF-DHTG)..... 53

Lista de Siglas

AcOH	- Ácido acético glacial
DHT	- Processo Desidrotérmico (“DeHydrothermal Treatment”)
ET	- Engenharia de Tecidos
Gel	- Gelatina
GelF	- Gelatina de peixe
GelF-DHT	- Gelatina de peixe reticulada por DHT
GelF-DHTG	- Gelatina de peixe reticulada com DHT e tratada com glicina
GelF-GTA	- Gelatina de peixe reticulada com GTA
GelF-GTAG	- Gelatina de peixe reticulada com GTA e tratada com glicina
GelP	- Gelatina de porco
GelP-DHT	- Gelatina de porco reticulada por DHT
GelP-DHTG	- Gelatina de porco reticulada com DHT e tratada com glicina
GelP-GTA	- Gelatina de porco reticulada com GTA
GelP-GTAG	- Gelatina de porco reticulada com GTA e tratada com glicina
GTA	- Glutaraldeído
FTIR	- Espectroscopia de infravermelho através da transformada de Fourier (“Fourier Transform Infrared Spectroscopy”)
F-DHT-E DHT	- Meio condicionado com matriz de gelatina de peixe reticulada por DHT
F-GTA-E GTA	- Meio condicionado com matriz de gelatina de peixe reticulada por GTA
<i>mi</i>	- Massa inicial
<i>m_{inch}</i>	- Massa correspondente às matrizes inchadas com água
<i>mf</i>	- Massa final
P-DHT-E por DHT	- Meio condicionado com matriz de gelatina de porco reticulada por DHT
P-GTA-E por GTA	- Meio condicionado com matriz de gelatina de porco reticulada por GTA
SEM	- Scanning Electron Microscopy

Capítulo 1 – Enquadramento

A engenharia de tecidos (ET) é a aplicação de várias áreas do conhecimento tecnológico, com vista ao desenvolvimento de produtos com finalidade terapêutica, para a reparação, ou regeneração de células ou tecidos defeituosos, lesados ou com problemas congénitos. Para tal, recorre, em geral, à combinação de matrizes de suporte celular (*scaffolds*), moléculas de sinalização celular e células viáveis. Estes *scaffolds* têm como função mimetizar o comportamento da matriz extracelular. A biocompatibilidade dos materiais que compõe o *scaffold* é crucial e, adicionalmente, a ET recorre a materiais biodegradáveis dos quais não resultem resíduos tóxicos. Estes materiais servem de substrato para a migração das células para as zonas lesadas do tecido, suportando a sua proliferação. A ET é uma das mais promissoras técnicas para a regeneração de tecidos. As potenciais aplicações da ET estendem-se a uma vasta gama de tecidos: pele, cartilagem, ossos, vasos sanguíneos, nervos e tecidos moles entre outros. Diversas técnicas têm sido usadas para a criação de *scaffolds* e estudado o seu desempenho. *Scaffolds* constituídos por nanofibras apresentam uma estrutura fibrilar que mimetiza a dos tecidos nativos e está associada a boas taxas de adesão e proliferação. Este tipo de estrutura também suporta a diferenciação celular podendo vir a ser uma peça fundamental no transplante de células para o tecido lesado [1].

A escolha de um material adequado para a interação das células com o *scaffold* é um passo importantíssimo em ET. Os polímeros de origem natural oferecem a vantagem de possuírem estruturas químicas semelhantes à das macromoléculas presentes na matriz extracelular do organismo humano, sendo preferíveis deste ponto de vista. No entanto, muitas vezes estes polímeros possuem propriedades mecânicas fracas que necessitam ser reforçadas antes de o material ser utilizado.

Capítulo 2 – Introdução

A Engenharia Biomédica é uma área da ciência que se foca em aplicar os princípios, métodos e ferramentas da tecnologia e da engenharia para analisar e resolver obstáculos na área da medicina. Uma das vertentes de estudo emergentes da engenharia biomédica é a ET que se foca na produção de estruturas materiais que sirvam de suporte temporário e promovam a regeneração de tecidos lesados, substituindo os tradicionais implantes e próteses permanentes.

Ao desenvolver um *scaffold* para a regeneração de determinado tecido pretende-se mimetizar a estrutura existente no tecido nativo. Para potenciar a interação entre as células e o *scaffold* recorre-se frequentemente a materiais de origem biológica como o colagénio ou a gelatina [2].

Uma das técnicas de produção de *scaffolds* mais utilizadas hoje em dia é a electrofiação. Esta técnica permite obter estruturas de suporte celular constituídas por fibras submicrométricas (da ordem das centenas de nanómetros), o que permite uma aproximação à arquitetura da matriz extracelular dos tecidos humanos. A elevada superfície de material exposto nas fibras facilita a interação entre as células e o material e a alta porosidade das matrizes de nanofibras facilita a troca de nutrientes e lixo metabólico entre as células e o meio extracelular. [3]. Se por um lado esta elevada porosidade providencia espaço no interior da matriz, por outro lado, o reduzido tamanho dos poros é uma limitação para a acomodação de células nesse espaço.

A gelatina é um polímero de origem natural, derivado do colagénio, que é bastante utilizado como material na fabricação de *scaffolds* pois possui sequências de aminoácidos Arg-Gli-Asp (RGD, do inglês) que promovem a adesão celular.

2.1. Célula-Substrato

2.1.1. Matriz Extracelular

A matriz extracelular representa um ambiente bastante complexo e dinâmico, ao contrário do que se pensava ao considerar que a matriz extracelular era apenas um suporte inerte para as células aderentes. Existe uma comunicação constante entre as células e a matriz extracelular, mediada maioritariamente por recetores específicos da família das integrinas. Esta comunicação constante permite que a matriz extracelular envie sinais específicos às células controlando a sua forma, migração, proliferação, diferenciação e sobrevivência. A matriz extracelular é composta essencialmente por quatro famílias de macromoléculas: colagénios, elastinas, glicosaminoglicanos e glicoproteínas estruturais [4].

2.1.2. Interação Célula-Substrato

A adesão celular é um processo preponderante no sucesso dos materiais desenvolvidos em ET pois é a interação das células aderentes com o substrato que vai determinar a sua sobrevivência e a regeneração do tecido.

A topografia superficial, composição química, microestrutura e propriedades mecânicas de um substrato influenciam significativamente o comportamento celular, nomeadamente a adesão, crescimento e diferenciação. Por exemplo, a natureza hidrofílica da superfície de certos materiais bem como a sua rugosidade podem influenciar o crescimento e a diferenciação celular. [5]. O aumento da adesão celular foi relacionado com um aumento da rugosidade do suporte celular [6][5]. As cargas existentes à superfície dos materiais, devido aos grupos funcionais presentes, podem modificar o comportamento celular através de funcionalidades químicas dos materiais poliméricos (Tabela 2.1). A carga superficial de um material pode, por exemplo, determinar a sua interação com proteínas. Como estas possuem na sua maioria cargas negativas à superfície, é natural que estabeleçam mais ligações com substratos carregados positivamente à superfície, como é caso dos que possuem o grupo funcional – NH₂.

Tabela 2.1 – Grupos funcionais existentes à superfície dos materiais, propriedades que conferem à superfície e o seu efeito em células [5].

Grupo Funcional	Propriedades	Efeito nas Células
-CH₃	Neutro, hidrofóbico	Promove a adesão de leucócitos e a migração de fagócitos
-OH	Neutro, hidrofílico	Aumenta a diferenciação dos osteoblastos
-COOH	Negativo, hidrofílico	Aumenta a adesão dos osteoblastos
-NH₂	Positivo, hidrofílico	Promove a proliferação de mioblastos e células endoteliais e diferenciação de osteoblastos

A interação entre as células com um substrato de um biomaterial segue quatro passos: ligação inicial, aumento da área de contacto, organização do citoesqueleto de actina e a formação de focos de contacto. O contacto inicial das células com o substrato leva à sua imobilização, prevenindo que forças mecânicas envolvidas os separem. Assim que este primeiro contacto é estabelecido as células começam a espalhar-se pela área de superfície disponível, o que leva à formação de filamentos do citoesqueleto de actina. Por fim, devido à força exercida pelo citoesqueleto, as integrinas existentes na zona formam aglomerados, chamados focos de adesão [7].

As integrinas pertencem a uma grande família de recetores transmembranares heterodímeros responsáveis por mediar a ligação entre as células e a matriz extracelular/substrato, através do citoesqueleto da célula (Figura 2.1). Existem cerca de 25 tipos diferentes de integrinas, compostas por combinações diferentes de subunidades α e subunidades β , que conferem diferentes especificidades à ligação. Para além disto as integrinas estão envolvidas na arquitetura de complexos proteicos que reconhecem o citoesqueleto permitindo regular a migração, proliferação, sobrevivência e diferenciação celular [8]. Um exemplo é a sequência de adesão Arg-Gly-Asp (RGD) que reside na cadeia de várias proteínas constituintes da matriz extracelular. No processo de adesão, as integrinas associam-se aos esqueletos de actina, através de ligandos específicos, formando os focos de adesão.

As integrinas são capazes de mediar as interações celulares com a superfície de substratos, de origem natural, interagindo com ligandos extracelulares que podem ser: absorvidos da solução (ex., absorção de proteínas do sangue), projetados na superfície (como cadeias de adesão tais como o complexo RGD) e/ou depositados pelas células (ex., deposições de fibronectina e colagénio) [9].

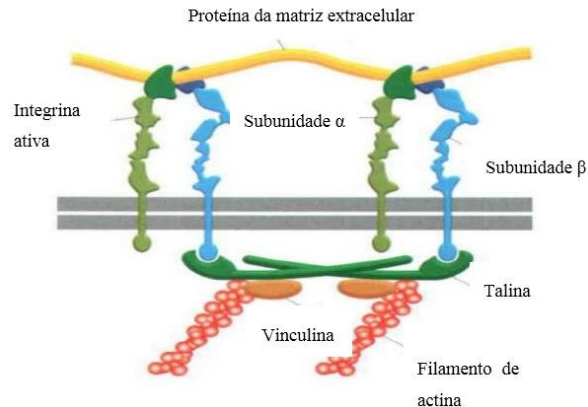


Figura 2.1 – Estrutura de subunidades de integrinas activas ligando a matriz extracelular ao citoesqueleto de actina. Adaptado de [7].

Para além das integrinas, existem outros recetores no processo de adesão célula-substrato, no entanto os mecanismos celulares que coordenam as atividades dos vários recetores ainda não são completamente conhecidos. Várias proteínas membranares estão associadas a ligações ao colagénio, elastina e laminina [10]. Também os proteoglicanos estão referenciados por estarem envolvidos, a par com as integrinas, na formação de focos de adesão. A presença destas proteínas pode afetar o comportamento das células, modificando a matriz extracelular e servindo como reservatórios de fatores de crescimento e citoquinas.

2.2. Gelatina

A gelatina é uma proteína obtida pela desnaturação do colagénio, que é a principal proteína constituinte da matriz extracelular dos animais vertebrados (ossos, cartilagens, tendões, pele e vasos sanguíneos) [11][12]. Foram identificados até à data 28 tipos de colagénio, sendo os de tipo I,II e III os mais abundantes. As moléculas de colagénio são compostas por três cadeias polipeptídicas, que contêm cerca de 20 aminoácidos diferentes, formando uma tripla hélice bastante favorável às ligações de hidrogénio entre as cadeias, o que lhe confere a sua estabilidade. A fonte, o processo de desnaturação e tipo de colagénio têm influência no tipo de gelatina resultante. Para converter o colagénio insolúvel em gelatina é necessário um pré-tratamento para quebrar as ligações não covalentes e desorganizar a sua estrutura proteica, de forma a permitir a quebra das ligações intramoleculares e intermoleculares para solubilizar o colagénio. Posteriormente, o tratamento com calor quebra as ligações de hidrogénio e as ligações covalentes destruindo a tripla hélice, resultando numa transição hélice para espiral e obtendo-se assim a gelatina [13].

A gelatina tem uma composição em termos de aminoácidos semelhante à do colagénio, sendo caracterizada por uma repetição da sequência Glicina-X-Y, onde o X é usualmente a prolina e o Y a hidroxiprolina[12].

Dois tipos de gelatina podem ser obtidos dependendo do tipo de pré-tratamento aplicado ao colagénio (ácido ou alcalino). O pré-tratamento alcalino hidrolisa os grupos amida da aspargina e da glutamina, convertendo-os em grupos carboxilo, nomeadamente em aspartato e glutamato. Por outro lado o pré-tratamento ácido pouco afeta os grupos amida presentes, o que faz com que a gelatina resultante deste processo tenha um comportamento eletricamente diferente. A grande presença de grupos carboxilo na gelatina obtida através do pré-tratamento alcalino confere-lhe a sua carga negativa baixando-lhe o ponto isoelétrico (PI). A gelatina obtida pelo pré-tratamento ácido, pelo contrário, apresenta um PI semelhante ao do colagénio [14].

A procura global de gelatina tem vindo a aumentar nos últimos anos, sendo que a gelatina de mamíferos (bovina e suína) é o tipo de gelatina mais produzido e procurado. No entanto tem havido uma necessidade cada vez maior de encontrar alternativas a estes tipos de gelatina, maioritariamente devido a razões religiosas (tanto o Judaísmo como o Islamismo proíbem o consumo de produtos derivados do porco, enquanto que os Hindus

não consomem produtos provenientes de bovinos) assim como o risco da transmissão de doenças como a BSE, embora vários estudos indiquem que o risco associado a estes tipos de gelatina seja muito próximo de zero[12].

As propriedades físicas da gelatina dependem essencialmente de dois fatores: a composição dos aminoácidos, que é específica para cada espécie e a distribuição do peso molecular que resulta das condições de processamento [13]. Gelatinas obtidas a partir de peixes marinhos têm, regra geral, piores propriedades reológicas que as derivadas de mamíferos, particularmente as gelatinas de peixes de água fria, como o salmão ou o bacalhau. Isto deve-se maioritariamente à baixa quantidade dos aminoácidos prolina e hidroxiprolina. Estes dois aminoácidos estão referenciados por promover a formação da tripla hélice e a estabilização da gelatina a baixas temperaturas devido à capacidade de ligação ao hidrogénio no grupo –OH presente na hidroxiprolina [15]. Na literatura é possível observar que gelatinas obtidas a partir de certos peixes de água quente (bagre, tilápia), podem apresentar níveis de qualidade semelhantes às obtidas a partir de mamíferos, dependendo da espécie e das condições de processamento [13][16][17]. De um ponto de vista comercial a gelatina com uma viscosidade superior é geralmente mais apreciada e mais dispendiosa[18].

2.3. Reticulação

Tendo em vista a produção de *scaffolds*, a gelatina apresenta vantagens em termos de adesão celular quando comparada com outros materiais biológicos, devido à composição da sua cadeia de aminoácidos. No entanto, possui características físicas relativamente fracas como ser solúvel em água a temperaturas da ordem da do corpo humano, ou ter uma taxa de degradação muito elevada, o que limita bastante as suas aplicações em engenharia de tecidos. Desta forma, é necessário reticular a cadeia polimérica da gelatina. Encontram-se descritos na literatura diversos métodos, físicos e químicos, para reticular a gelatina. O processo de reticulação requer que o agente químico utilizado, ou o processo físico escolhido, crie ligações intra e intermoleculares estáveis e

irreversíveis entre as moléculas, preferencialmente entre os grupos funcionais dos aminoácidos. A reticulação através de métodos químicos utiliza tipicamente moléculas bifuncionais, ou seja, moléculas com dois grupos disponíveis para reagir. Estas moléculas reagem com os grupos funcionais livres dos materiais colagenosos formando novas ligações (“*crosslinking*”) entre as moléculas do material. A maior desvantagem associada a este tipo de tratamento é a potencial toxicidade resultante de um dos dois grupos funcionais disponíveis no reticulante não ter reagido, o que pode comprometer o crescimento celular [19] [20]. Os métodos químicos incluem tipicamente o tratamento com glutaraldeído (GTA) ou 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (EDC), enquanto que para os métodos físicos se recorre habitualmente ao processo desidrotérmico (“DHT- dehydrothermal treatment”), tratamento plasma e tratamento ultravioleta (UV) [21]. Os métodos físicos resultam, geralmente, num baixo grau de reticulação pois as reações ocorrem sobretudo à superfície dos materiais.

2.3.1. Glutaraldeído (GTA)

O glutaraldeído é um composto orgânico bastante utilizado em processos de reticulação de materiais colagenosos. A ação do GTA aumenta significativamente a estabilidade do material em ambiente biológico e produz alterações a nível mecânico. Para além disto, o GTA é barato e capaz de alcançar um bom grau de reticulação em relativamente pouco tempo [11].

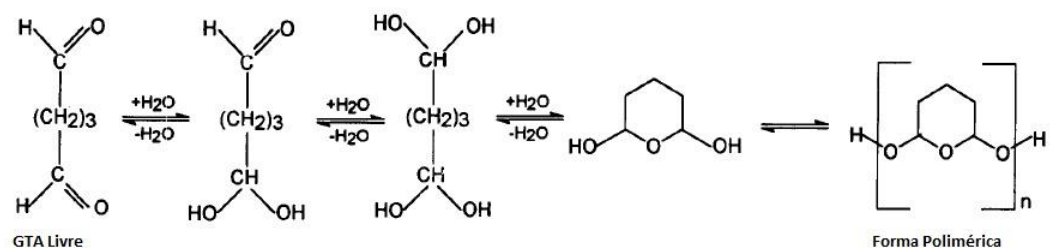


Figura 2.2 – Formas químicas do GTA em solução aquosa [19]

O GTA é uma molécula composta por 3 carbonos dispostos linearmente e com um grupo aldeído (H-C=O) no final de cada molécula (Figura 2.2). Os grupos aldeído são capazes de interagir quimicamente com os grupos amina (-NH₂) da gelatina formando ligações químicas (Figura 2.3), através da sua bifuncionalidade.

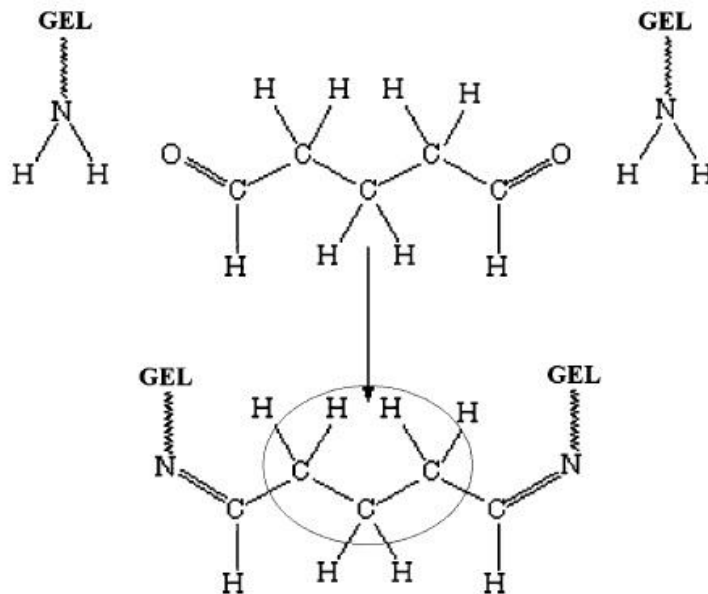


Figura 2.3 – Mecanismo de reticulação da gelatina por GTA [22].

O glutaraldeído reage com os grupos amina da gelatina, nomeadamente os grupos livres da lisina, que hidrolisam dando origem a ligações aldimina HC=N (bases de Schiff), resultando num produto de cor amarelada.

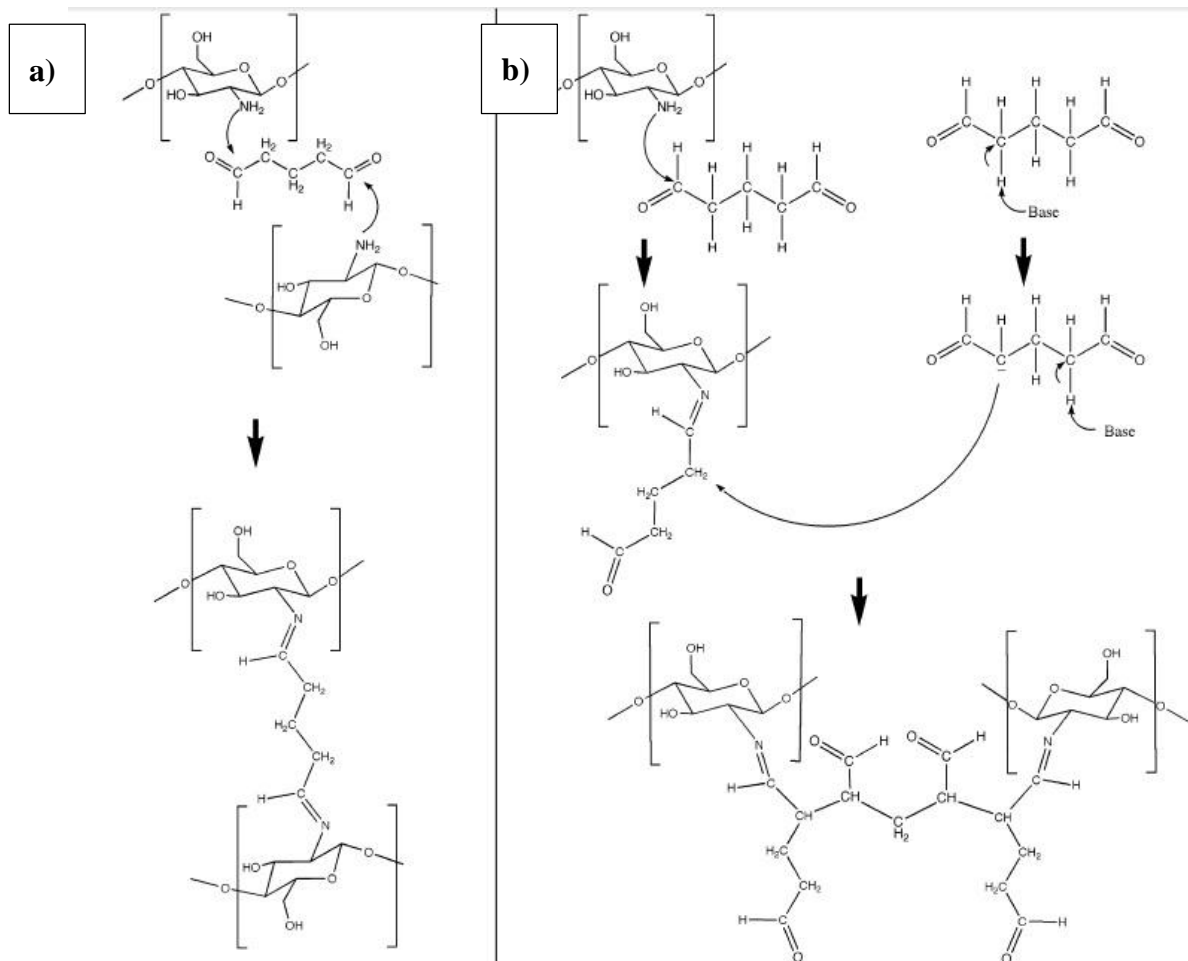


Figura 2.4 – Mecanismos de reticulação do quitosano com GTA: a) formação de bases Schiff , b) formação de aductos do tipo Michael com terminais aldeído.

Outro material que é frequentemente reticulado com GTA é o quitosano que também possui grupos amina expostos. Para além da formação de bases de Schiff (Figura 2.4 - a), a reticulação por GTA pode levar à formação de aductos do tipo Michael com terminais aldeído (Figura 2.4 - b), ou seja, dois grupos aldeído adjacentes podem sofrer uma condensação aldólica [23].

2.3.2. Processo Desidrotérmico (DHT)

O tratamento desidrotérmico é um processo físico de reticulação de um polímero em que são aplicadas altas temperaturas (acima de 90°), em vácuo, durante longos períodos de tempo. Esta técnica extrai água das moléculas do polímero, resultando na formação de ligações intermoleculares através de reações de condensação, ou por esterificação ou por formação de amidas. Uma das vantagens desta técnica é não envolver

agentes citotóxicos e oferecer um elevado grau de esterilização através das altas temperaturas e vácuo utilizado [24].

2.4. Electrofiação

A electrofiação é uma técnica que utiliza forças electroestáticas para produzir fibras submicrométricas, a partir de soluções poliméricas [25]. Uma montagem de electrofiação consiste basicamente em três componentes principais: uma fonte de alta tensão, uma bomba injetora e um coletor ligado à terra (Figura 2.5). Uma seringa com uma agulha na ponta, contendo a solução polimérica que se pretende fiar, é montada na bomba injetora. A bomba injetora permite controlar o caudal de saída da solução polimérica através da ponta da agulha. Ao ser aplicada alta tensão, a gota de solução polimérica que se vai acumulando na ponta da agulha fica carregada eletricamente. A gota fica sujeita a dois tipos de forças electroestáticas: repulsão electroestática entre as várias cargas à superfície da gota e a força Coulombiana exercida pelo campo elétrico externo. Quando a tensão aplicada ultrapassa um valor limite, que varia consoante o polímero, as forças electroestáticas aplicadas na gota sobrepõem-se à tensão superficial da solução polimérica ejetando-a contra o coletor [26]. Neste processo dá-se a evaporação do solvente e o jato polimérico sofre um rápido chicoteamento, ficando bastante alongado ao mesmo tempo que o seu diâmetro diminui consideravelmente.

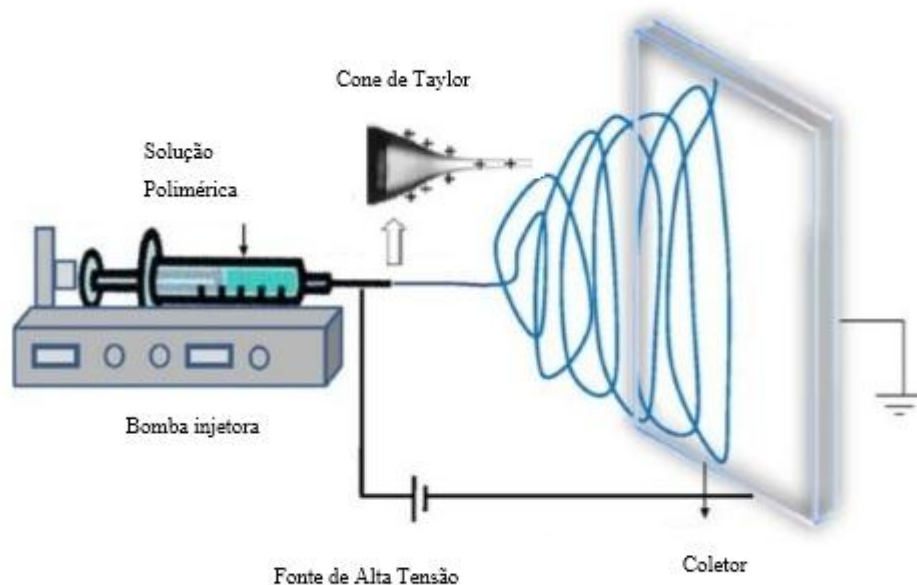


Figura 2.5 – Montagem típica de um sistema de electrofição composta por uma bomba injetora, um sistema de alta tensão e um coletor. Na figura pode-se ainda observar a formação de um cone de Taylor e o jato polimérico [25].

O processo de electrofição é regulado através de diversos parâmetros que se dividem em três grandes grupos: parâmetros da solução, parâmetros do processo e parâmetros ambientais. Os parâmetros da solução incluem viscosidade, condutividade, peso molecular e tensão superficial, os parâmetros do processo incluem a distância agulha-coletor, tensão aplicada e o caudal da solução e os parâmetros ambientais incluem a temperatura e a humidade. Cada um destes parâmetros pode afetar a morfologia e diâmetro das fibras electrofiadas.

Parâmetros da solução:

A viscosidade de uma solução polimérica é importante na determinação do tamanho e morfologia das fibras produzidas por electrofição e está dependente da concentração e do peso molecular do polímero. Na literatura é recorrente observar que uma baixa viscosidade leva a descontinuidades na produção das fibras, enquanto uma viscosidade muito alta dificulta a ejeção a partir da agulha[25]. Quanto maior for a viscosidade ou a concentração do polímero na solução, maiores e mais uniformes serão os diâmetros das fibras obtidos. O controlo da viscosidade é também importante para obter uma fibra

continua. Para soluções com uma viscosidade baixa a tensão superficial é o fator dominante e apenas se formam gotas ou fibras com contas. A tensão superficial depende bastante do solvente utilizado para dissolver o polímero. Diferentes solventes utilizados podem reduzir ou não o aparecimento de contas.

A condutividade de uma solução polimérica influencia a formação do jato e o seu alongamento [27]. A condutividade das soluções é determinada pelo tipo de polímero, o solvente utilizado e a disponibilidade de sais ionizáveis. Jatos de soluções com maiores condutividades transportam mais carga, e ficam por isso sujeitos a um maior estiramento obtendo-se fibras mais finas. Também a interação do jato com o campo elétrico é mais intensa o que aumenta a capacidade de extração da solução. Uma forma de melhorar a morfologia e o diâmetro das fibras é adicionar sais iônicos à solução [25].

Para além dos parâmetros descritos anteriormente, a volatilidade do solvente é algo a ter em conta. O processo de electrofiação envolve uma rápida evaporação do solvente enquanto o jato está a ser alongado [27], devendo a fibra chegar essencialmente seca ao coletor. Caso contrário, para além da deformação que o impacto com o coletor causará na fibra, a estrutura já depositada será localmente dissolvida. Assim, é importante aliar à boa capacidade de dissolução do polímero pelo solvente uma boa volatilidade do mesmo, de forma a manter intactas as nano estruturas depositadas.

Parâmetros do Processo:

Só a partir de uma determinada tensão aplicada é que o processo de fiação ocorre, ou seja, quando as forças electroestáticas se sobrepõem à tensão superficial da solução do polímero. O aumento da tensão induz alterações na forma do jato expelido pela agulha. Existe alguma discussão na literatura sobre os efeitos da variação da tensão aplicada ao processo de electrofiação. Se por um lado o aumento da tensão leva a um maior alongamento das fibras, devido ao acréscimo na carga transportada, por outro lado também faz diminuir o tempo de voo e com ele o tempo de estiramento. Muitas vezes a conjugação destes fatores, aliado à taxa de evaporação do solvente (que também determina o tempo de estiramento), conduz à redução do diâmetro das fibras mas o efeito pode ser contrário. [25]. O caudal permite controlar a quantidade de polímero que é ejetada pela agulha. Um caudal superior àquele que pode ser extraído pelo campo da região da agulha leva à formação de uma gota que pode pingar, induzindo o desperdício de polímero e até à deposição de gotas no coletor. A variação do caudal pode também ser

eficaz no controlo do diâmetro das fibras, no entanto caudais elevados levam à impossibilidade do solvente poder secar durante o tempo de voo [25][27]. Para além disto é necessário que exista uma distância mínima entre a ponta da agulha e o coletor para que a solução seque antes de chegar ao coletor de forma a evitar que as fibras previamente depositadas sejam danificadas. Deve ser assim otimizada a distância entre a ponta da agulha e o coletor para que o processo de electrofiação ocorra e que o tempo de voo das fibras seja suficiente para o solvente secar.

Parâmetros ambientais:

A temperatura e humidade podem influenciar bastante os parâmetros da solução, nomeadamente a viscosidade. Está reportado que um aumento da temperatura faz com que a viscosidade das soluções baixe, resultando numa diminuição do diâmetro das fibras [25]. Já o aumento da humidade está associado ao aparecimento de poros na superfície das fibras [27].

2.5. Alinhamento de fibras

Apesar de as nanofibras produzidas por electrofiação não terem tradicionalmente qualquer orientação preferencial ou um padrão definido, a electrofiação possibilita a adoção de estratégias para o alinhamento das fibras e com elas estratégias interessantes na área da ET. A arquitetura da matriz extracelular é fundamental para o funcionamento do tecido ou do órgão correspondente. Determinadas arquiteturas (Figura 2.6) podem ser fundamentais para orientar o crescimento celular e promover a regeneração de certos tecidos [28].

Na literatura é possível verificar que o alinhamento das nanofibras tem um papel preponderante no desenvolvimento das células. Num estudo em que se utilizaram fibroblastos foi possível observar que *scaffolds* de fibras alinhados de colagénio possuíam menor capacidade de adesão (Figura 2.7), no entanto foram mais eficazes na proliferação (Figura 2.7). A diferença na adesão foi relacionada com a rugosidade superficial do scaffold que contribui para oferecer uma maior área de contacto. A maior taxa de proliferação celular, segundo os autores, explica-se pela capacidade dos scaffolds

alinhados conseguem compactar mais facilmente as células guiando-as segundo a orientação do seu alinhamento [28]. A orientação através do contacto, (“contact guidance”), traduz a maior probabilidade de crescimento e migração das células segundo direções que estejam associadas a propriedades químicas, estruturais e mecânicas do substrato. Isto leva a crer que scaffolds de nanofibras alinhadas representam uma solução eficaz no controlo da orientação e migração celular [2].

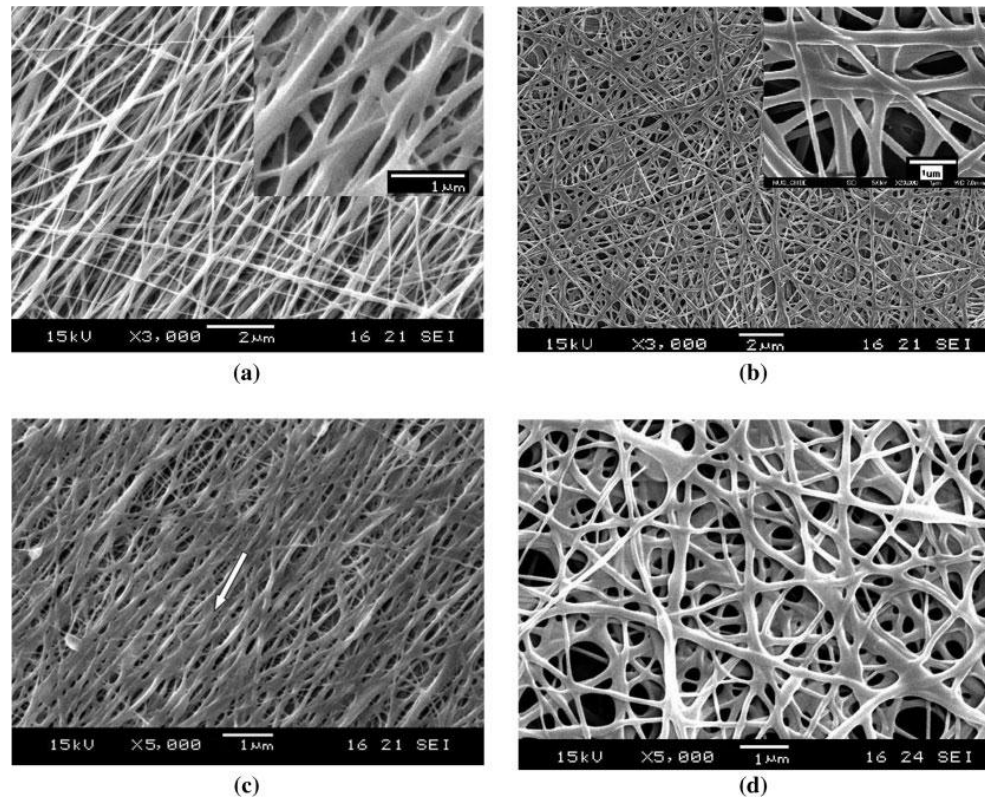


Figura 2.6 – Imagens SEM de (a) nanofibras de colagénio paralelamente alinhadas, (b) nanofibras de colagénio sem alinhamento preferencial (desalinhadas), (c) nanofibras de colagénio alinhadas e reticuladas com GTA (X-ACL), (d) nanofibras de colagénio desalinhadas e reticuladas com GTA [28].

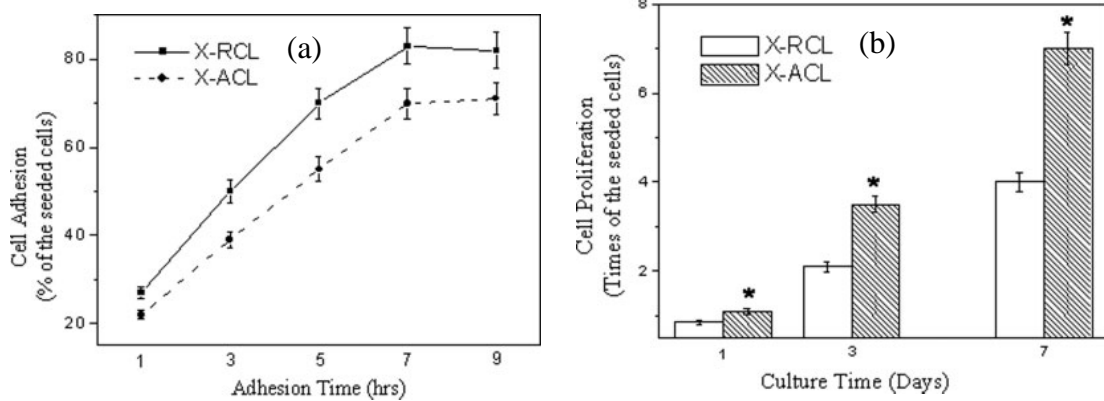


Figura 2.7 – Estudos comparativos da eficácia na adesão (a) e proliferação (b) de fibroblastos em matrizes de colagénio reticuladas com GTA alinhadas (X-ACL) e desalinhas (X-RCL) [28].

No caso das células neuronais é interessante verificar a orientação e o alinhamento das nanofibras influencia tremendamente o seu comportamento. Na literatura é possível observar que as matrizes de fibras alinhadas fazem com que as células fiquem alongadas segundo a direção das fibras assim como o crescimento das neurites seguem essa mesma direção como se pode ver na Figura 2.8.

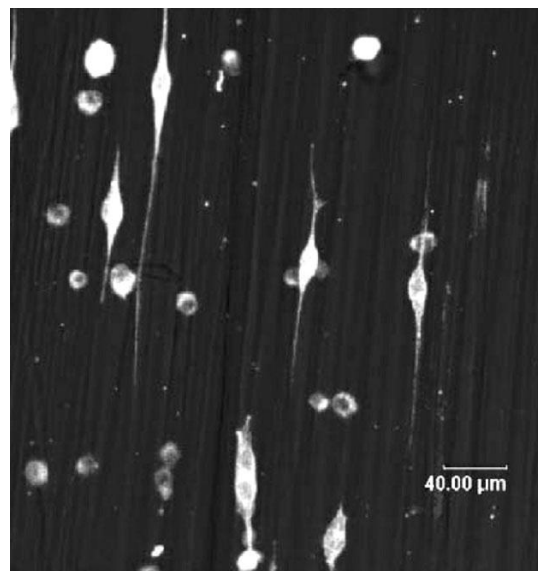


Figura 2.8 – Alongamento de células neuronais estaminais e respetivos axónios segundo a direção de alinhamento das fibras electrofiadas [29].

Capítulo 3 - Materiais e Métodos

3.1. Polímeros

Foram utilizados dois tipos de gelatina para a realização deste trabalho, gelatina de pele de porco e gelatina de pele de peixe de água fria (Tabela 3.1).

Tabela 3.1 – Gelatinas utilizadas para a produção de soluções poliméricas para a electrofiação.

Polímero	Fabricante	Ref	Massa Molecular (kDa)
Gelatina de pele de porco	Sigma-Aldrich	48724-500G-f	50-100
Gelatina de pele de peixe de água fria	Sigma-Aldrich	G7041-500G	60

3.1.1. Produção de Soluções para Electrofiação

O solvente utilizado foi uma mistura de 90% ácido acético glacial (AcOH) (Scharlau) e 10% água destilada. Prepararam-se várias soluções a fim de escolher para cada tipo de gelatina uma composição da solução e um conjunto de parâmetros de fiação adequados.

A concentração de gelatina dos dois tipos de soluções, porco e peixe, variou num intervalo de 10% a 30%. Após a produção das soluções, recorreu-se a um agitador magnético para dissolver o polímero. As soluções foram sempre utilizadas no período máximo de 48 h pós produção de forma a não comprometer a sua performance devido à eventual degradação proteica.

Para otimizar o processo de electrofiação foram testados vários parâmetros: distância agulha-coletor, tensão e caudal. Os parâmetros adotados para os restantes processos foram escolhidos com base nas melhores condições gerais de fiação, como ausência de gota e formação de um fio contínuo

3.1.2. Sistema de Electrofiação

O sistema de electrofiação utilizado para produzir as matrizes (Figura 3.1), é um sistema montado horizontalmente e é composto por uma fonte de alta tensão, uma bomba injetora (Chemyx, Fusion 100), uma seringa de 5 ml (Braun, Injekt) com uma agulha montada de calibre 23 (diâmetro interno = 0,33 mm) e um coletor metálico, ligado à terra, capaz de realizar movimentos rotacionais e deslocar-se na horizontal perpendicularmente à ponta da agulha, por forma a melhorar a homogeneidade das deposições.

Foram utilizados dois tipos de suporte para as membranas:

- Para os estudos de perda de massa utilizou-se folha de alumínio. O uso deste suporte permitiu uma manipulação mais fácil das matrizes, não alterando consideravelmente a sua estrutura quando submergidas em água.
- Para a cultura de células HFFF2 efetuaram-se deposições em lamelas de vidro de 12mm de diâmetro, utilizando um coletor específico. Este coletor possui saliências metálicas do tamanho das lamelas para sua fixação e tem a restante superfície coberta por um acetato não condutor (Figura 3.2). Nele as fibras depositam-se preferencialmente sobre as lamelas que são fixas nas suas posições pela tensão superficial de uma pequena gota de água.
- Para os estudos de tração mecânica, inchamento e cultura de Células *Vero* foram utilizados suportes de cartolina pois as matrizes de fibras de gelatina destacam-se bem deste suporte;

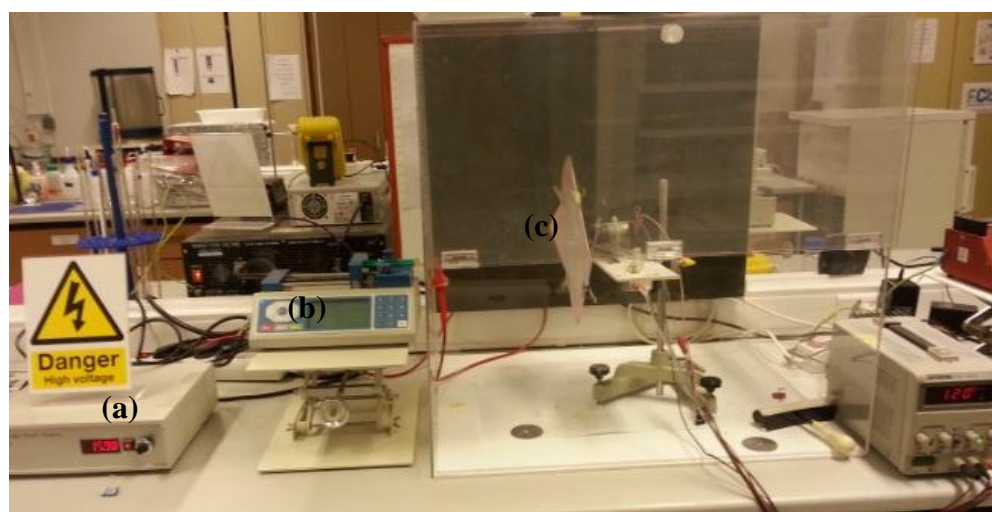


Figura 3.1 – Sistema de electrofiação utilizado para a produção das matrizes de nanofibras: (a) fonte de alta tensão, (b) bomba ejetora, (c) coletor.



Figura 3.2 – Coletor utilizado para suportar as lamelas de 12 mm na deposição de nanofibras por electrofiação.

3.2. Reticulação

Procurou-se estabilizar a gelatina efetuando a reticulação das matrizes de nanofibras produzidas.

As matrizes de gelatina de peixe e porco foram reticuladas através de dois processos diferentes, um químico e outro físico. No primeiro as matrizes foram expostas a vapor de GTA e no segundo foram colocadas num forno a 140° em vácuo durante vários períodos de tempo.

3.2.1. Vapor de Glutaraldeído

Para o processo de reticulação com GTA as matrizes foram colocadas numa caixa hermética contendo um recipiente aberto com cerca de 10 ml de GTA 50% (Merck KGaA) em água. O objetivo desse recipiente é criar uma atmosfera saturada em vapor de GTA no interior da caixa. Depois de devidamente selada, a caixa foi colocada numa estufa a uma temperatura constante de 37° durante vários períodos de tempo: 1, 2, 4, 6 e 8 horas para cada tipo de gelatina (peixe e porco). Depois de finalizado o tempo de reticulação, as matrizes foram colocadas 24 horas a secar numa hote com extração e no mínimo 24 horas num exsicador em vácuo de forma a eliminar ao máximo possíveis resíduos de GTA não reagido.

3.2.2. Processo Desidrotérmico

Neste processo as matrizes foram colocadas em caixas de Petri de pyrex, capazes de suportar altas temperaturas. Colocaram-se as caixas com as amostras de cada tipo de gelatina (peixe e porco) numa estufa sob vácuo durante diferentes períodos de tempo: 12, 24, 48, 72 e 96 horas. O tempo só começou a ser contado quando o forno atingiu a temperatura de 140°. Posteriormente as matrizes foram mantidas no exsiccador até voltarem a ser manipuladas.

3.3. Caracterização das matrizes

Para estudar as matrizes produzidas analisou-se a sua composição química por FTIR, efetuaram-se teste de quantificação de grupos NH₂ livres (que se correlaciona com a presença de certos aminoácidos e com o grau de reticulação), observou-se a morfologia das deposições, o inchamento que sofrem quando colocadas em água, a resposta à tração mecânica e efetuaram-se estudos de perda de massa.

3.3.1. Morfologia

A morfologia das matrizes foi estudada inicialmente num microscópio ótico (Nikon Eclipse LV100) com ampliações de 10×, 50× e 100×. Nesta fase o objetivo foi avaliar a produção de nanofibras segundo os vários parâmetros utilizados. Teve-se em conta a aparência geral das fibras: uniformidade e existência ou não de contos. A seleção das matrizes a produzir para a execução do trabalho baseou-se nestas imagens e na observação da estabilidade do processo de fiação.

Utilizou-se depois um microscópio eletrónico de varrimento (Zeiss DSM 962) para efetuar uma caracterização morfológica mais pormenorizada de matrizes selecionadas (Tabela 3.2).

Tabela 3.2 - Matrizes analisadas através da microscopia SEM.

Matriz	Gelatina de Porco	Não reticulada
		Reticulada por GTA
		Reticulada por DHT
	Gelatina de Peixe	Não Reticulada
		Reticulada por GTA
		Reticulada por DHT

O diâmetro das fibras foi medido recorrendo ao software ImageJ. Os resultados obtidos para cada amostra foram tratados estatisticamente com uma população $n=30$.

3.3.2. Composição Química

A composição química das amostras foi obtida num aparelho (Thermo Nicolet 6700 Spectrometer) de espectroscopia de infravermelho baseado na transformada de Fourier (FTIR), no modo de reflexão total atenuada (ATR). O espectro foi adquirido com um raio de incidência de 45° na gama de $4000-650\text{ cm}^{-1}$ com uma resolução de 4 cm^{-1} . Esta técnica baseia-se nas diferentes vibrações específicas das ligações químicas que constituem as moléculas.

3.3.3. Perda de Massa

Uma forma de avaliar o grau de reticulação de uma amostra é através da determinação da perda de massa da mesma: quanto maior for a perda de massa menor o grau de reticulação da amostra. A perda de massa foi obtida, em percentagem, através da divisão da diferença entre a massa inicial da amostra (m_i) e a massa após esta ter sido imersa em água durante um certo período de tempo (m_f):

$$pm = \frac{m_i - m_f}{m_i} \times 100\%$$

Procedimento:

- Cinco réplicas de matriz foram retiradas do exsiccador, pesadas e colocadas, durante 24 horas, em recipientes diferentes com água destilada.
- Depois de retiradas da água foram colocadas a secar ao ar livre durante 24 horas;
- Antes de efetuar nova pesagem, as amostras foram colocadas 24 horas no exsiccador para remover a restante humidade e ficarem em equilíbrio com as mesmas condições ambientais a que estiveram sujeitas antes da primeira pesagem;

As pesagens foram efetuadas imediatamente após a remoção das matrizes do exsiccador.

3.3.4. Grau de Inchamento

As matrizes foram caracterizadas quanto à capacidade de inchamento quando imersas em água (*GI*). Neste procedimento cinco réplicas de cada matriz foram mergulhadas em água durante dois períodos de tempo: 30 minutos e 24 horas. As matrizes foram pesadas antes de colocar dentro de água (m_i) de acordo com o procedimento descrito no ponto anterior. Quando retiradas de dentro de água, foi cuidadosamente removido o excesso de água da superfície das matrizes inchadas com papel absorvente, sendo pesadas de seguida (m_{inch}). O grau de inchamento (*GI*,) foi calculado pela relação entre a massa da amostra inchada e a massa inicial:

$$GI = \frac{m_{inch}}{m_i}$$

3.3.5. Quantificação de Aminoácidos/Ensaio Ninidrina

O teste que recorre à utilização da ninidrina para a quantificação de aminoácidos (daqui para a frente designado por Ensaio Ninidrina, EN) foi introduzido no final dos anos 40. Embora métodos instrumentais sejam frequentemente utilizados para quantificar a presença de grupos amina, o método que envolve a utilização da ninidrina apresenta algumas vantagens, pois não requer nenhum tipo de equipamento dispendioso e é adequado para a análise diária de um vasto número de amostras [30].

A reação da ninidrina com um grupo primário amino forma um produto de reação colorido, solúvel, designado por púrpura de Ruhemann (Figura 3.3). A quantidade formada desta substância é pois proporcional ao número de grupos amina reagidos e pode ser determinada espectrofotometricamente.

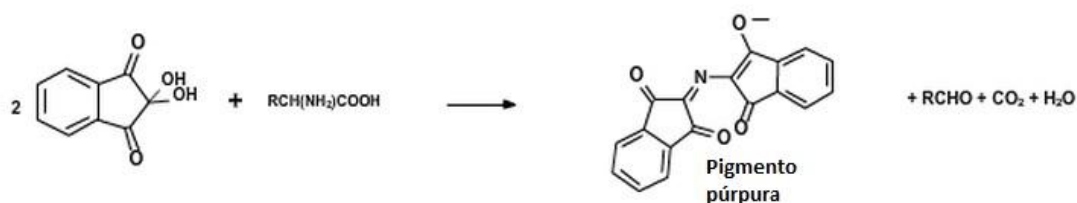


Figura 3.3 – Reação da ninidrina com um aminoácido primário dando origem a um produto de cor azul-púrpura.

Para tornar este método mais seguro e conveniente várias alterações foram sendo introduzidas ao longo das últimas décadas. Um dos protocolos estabelecidos para o EN usa o dimetilsulfóxido (DMSO) como solvente da ninidrina [31], embora outros solventes, tais como a acetona, possam ser usados. A estabilidade do complexo azul que se forma na reação e a reprodutibilidade são aspetos a ter em consideração nestes ensaios. São parâmetros importantes do EN: a temperatura a que se processa a reação (tipicamente entre 85 e 100°C), o tempo de reação (5 a 45 min) e o pH do meio (5-8). São usadas soluções tampão (acetato de sódio, acetato de lítio, acetato de potássio, citrato de sódio) para efetuar o controle do pH.

Para avaliar o grau de reticulação das matrizes de gelatina foram efetuados ensaios como o objetivo de determinar o rácio entre os grupos amino reagidos nas amostras reticuladas e o número de aminas livres nas amostras não reticuladas correspondentes (Apêndice C). Para perceber a sensibilidade do método e a correlação entre valores de absorvância número de aminas reagidas foi traçada uma curva para várias concentrações de gelatina não reticulada dissolvida em água. A iguais quantidades destas soluções adicionou-se uma mesma quantidade de solução de ninidrina. As matrizes reticuladas foram colocadas em contacto com o mesmo volume de água das soluções de gelatina ao qual se adicionou também a mesma quantidade de solução de ninidrina. Os resultados foram comparados.

3.3.6. Tração Mecânica

Na Figura 3.4 pode-se observar curvas de tração para matrizes electrofiadas de gelatina e de colagénio. Regra geral, estes gráficos apresentam duas regiões distintas. Uma traduz-se por uma deformação elástica (reversível) e outra por uma deformação plástica (irreversível). A tensão aplicada ao material é dada por: $\sigma = \frac{F}{S}$ (N/m^2 ou Pa), e traduz-se na aplicação de forças com determinada direção (F) perpendicularmente a uma secção do material (S). A deformação (ε) é definida como a razão entre o alongamento do material ΔL e o seu comprimento inicial L_0 . Na zona linear da Figura 3.4 a resposta do material à tração é descrita pela Lei de Hooke: $\sigma = E \times \varepsilon$. Este declive E define o módulo elástico do material.

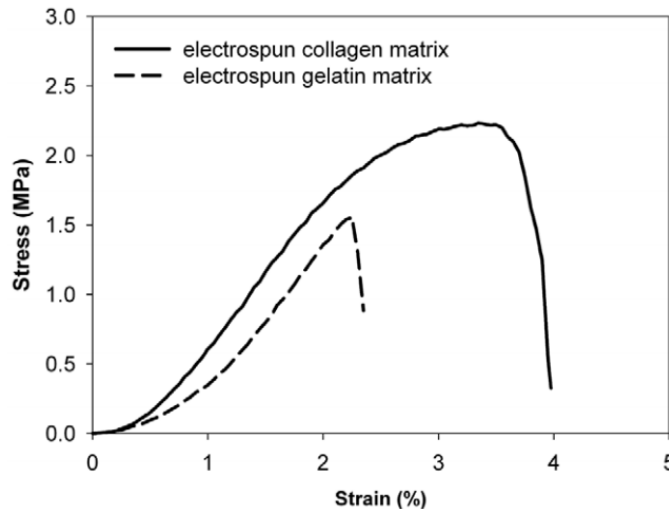


Figura 3.4 – Curvas de tração de matrizes de colagénio e de gelatina electrofiadas (Tensão vs Deformação) [32].

Para o teste de tração mecânica foram utilizadas 4 réplicas de cada matriz de gelatina de peixe e porco, reticuladas por DHT e vapor de GTA. As amostras foram cortadas em retângulos de 10 mm de largura e 30mm de comprimento. Para medir a espessura das amostras foi utilizada uma craveira digital (Mitutoyo, Digimatic Digital Capiler, 0-150mm). As amostras foram colocadas entre duas folhas de carolina e duas lamelas para garantir que a pequena pressão exercida pela craveira na amostra seja distribuída por uma maior superfície e assim não perturbe significativamente a leitura.

Apenas 10 mm do material foram tracionados sendo o restante utilizado como suporte à fixação. Imediatamente antes do início da tração foram colocadas 4 gotas de água sobre a amostra já que as propriedades mecânicas das amostras secas e húmidas são significativamente diferentes e numa aplicação como *scaffold* o material estará num ambiente húmido. Os testes de tração foram efetuados numa máquina de ensaios de tração da Rheometric Scientific que utiliza o software Minimat-Firmware 3.1 (Figura 3.5).

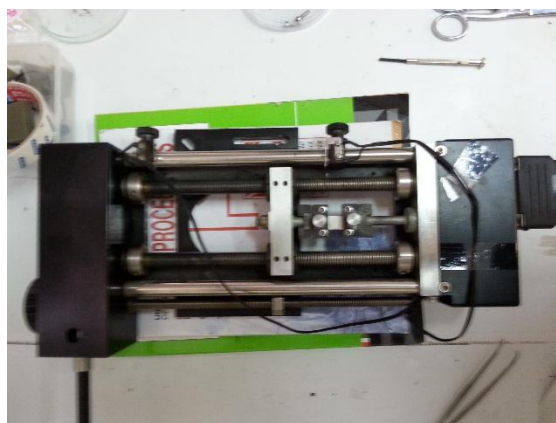


Figura 3.5 – Equipamento utilizado para os ensaios de tração (Rheometric Scientific).

3.4. Culturas Celulares

Nas culturas células foram utilizados dois tipos de células:

- HFFF2 (Human Caucasian foetal foreskin fibroblast)
- VERO: (linhagem de células renais provenientes macaco verde africano)

A viabilidade das células semeadas foi avaliada através de testes colorimétricos com recurso a resazurina (ver Apêndice B) efetuando as leituras de absorvância num leitor de placas (ELx800, BioTek).

3.4.1. HFFF2

Para a cultura de HFFF2 as matrizes foram depositadas em lamelas de 12 mm de diâmetro num coletor de alumínio preparado para acondicionar as lamelas. As lamelas foram fixas ao coletor colocando uma gota de água entre estas e a superfície do coletor.

Em seguida as matrizes foram reticuladas (como explicado na secção 3.2), esterilizadas e foram colocadas em *inserts* de teflon (cada *insert* consiste num poço e numa anilha que determina a área da matriz disponível para a sementeira das células) no interior de placas de 24 poços (Figura 3.6). Foram utilizadas duas placas e cinco réplicas por condição: matrizes de gelatina de peixe reticuladas com GTA (GelF-GTA), matrizes de gelatina de peixe reticuladas por DHT (GelF-DHT), matrizes de gelatina de porco reticuladas com GTA (GelP-GTA) e matrizes de gelatina de porco reticuladas por DHT (GelP-DHT). Para além disto, foram feitas duas réplicas de controlo com matrizes de cada condição, três poços apenas com células em meio e um poço apenas com meio de cultura.

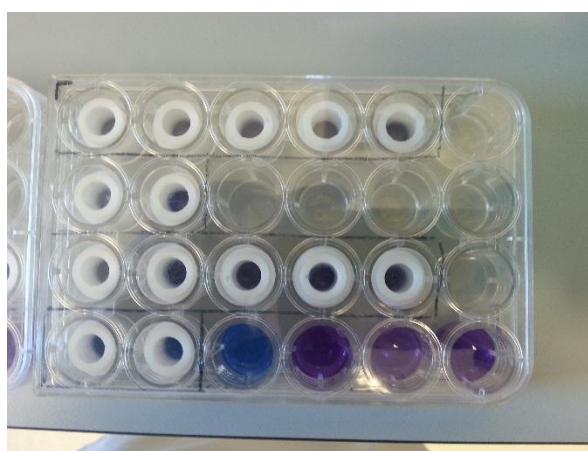


Figura 3.6 – Placa de 24 poços com poços e anilhas de teflon no seu interior para cultura de células HFFF2.

3.4.2. Vero

Para a cultura de células Vero e testes de citotoxicidade pelo método de extrato as matrizes foram depositadas em cartolina.

Depois de esterilizadas (ver Apêndice A), as matrizes foram colocadas nos *inserts* de teflon. A cultura destas células foi efetuada em duas caixas de 24 poços.

Grupos aldeído não reagidos, presentes nas matrizes, podem representar toxicidade para as células semeadas nessas matrizes. Um tratamento com glicina pode neutralizar essa toxicidade. Tal como acontece na gelatina, quando a glicina entra em contacto com os grupos aldeído do GTA formam-se bases de Schiff e as matrizes adquirem uma cor amarelada, devido à formação da ligação aldimina, como foi referido anteriormente.

Na cultura celular com as células Vero foram consideradas matrizes não tratadas e tratadas com glicina. O tratamento consistiu em colocar as matrizes em caixas de Petri durante um período de 24 horas com uma solução de Glicina em água ultra pura. Para tentar garantir um tratamento eficaz utilizou-se uma concentração de 80 mg/ml.

Utilizaram-se quatro réplicas por condição: matrizes de gelatina de peixe reticuladas com GTA (GelF-GTA), matrizes de gelatina de peixe reticuladas por DHT (GelF-DHT), matrizes de gelatina de porco reticuladas com GTA (GelP-GTA), matrizes de gelatina de porco reticuladas por DHT (GelP-DHT) e ainda as mesmas matrizes tratadas com glicina: GelF-GTAG, GelF-DHTG, GelP-GTAG e GelP-DHTG. Um segundo ensaio foi realizado, repetindo as condições anteriores. Para além destas foram ainda colocadas nos *inserts* 4 réplicas de matriz alinhada de gelatina de porco reticulada por DHT e 4 réplicas de matriz alinhada de gelatina de porco reticulada por GTA.

3.4.3. Testes de Extrato

Os testes de extrato permitem identificar toxicidade associada a substâncias que se libertem de um material. Consistem em substituir o meio de uma cultura estabelecida em sub-confluência por extratos dos materiais que se pretendem testar. Neste trabalho foram levados a cabo testes de extrato numa caixa de 24 poços com 3 réplicas para cada condição considerada: matrizes de gelatina de porco tratadas com DHT e GTA e matrizes de gelatina de peixe tratadas com DHT e GTA. O meio condicionado (extrato) foi preparado a partir do meio de cultura usual (DMEM) onde foi imersa a matriz em teste. As matrizes ficaram a condicionar o meio durante 24 horas. Em seguida substituiu-se o meio de cultura pelo extrato e a cultura prosseguiu por mais 24h. Ao fim de 24h em contacto com o extrato foi avaliada a viabilidade das células.

Capítulo 4 - Discussão dos Resultados

Nesta apresentação de resultados as concentrações dos constituintes das soluções serão expressas em percentagem mássica, m/m, considerando a massa de um constituinte particular para a massa total da solução, exceto indicação em contrário.

4.1. Caracterização das Matrizes

O primeiro tipo de gelatina a ser estudado neste trabalho foi a gelatina de pele de peixe de água fria pois já haviam sido feitos alguns estudos e já existia algum suporte literário [12][33] [34]. O solvente utilizado para estas soluções foi uma solução de ácido acético a 90% em água destilada [33].

As matrizes produzidas neste trabalho foram submetidas a diversos testes, como testes de perda de massa, testes de inchamento, quantificação de aminoácidos entre outros.

Antes de produzir as matrizes foi necessário otimizar os parâmetros de electrofiação. Como foi descrito anteriormente, vários parâmetros podem influenciar a morfologia das deposições de fibras obtidas. Numa fase preliminar do estudo foram variados os seguintes parâmetros: concentração do polímero, tensão aplicada, distancia agulha-coletor e o caudal da solução ejetada. Fez-se variar cada um destes parâmetros, mantendo os restantes inalterados e observou-se as consequências na formação das fibras.

Para uma concentração baixa de gelatina de peixe - 10% - não se recolheram fibras no coletor. Só a partir de concentrações na ordem dos 16% é que se pôde observar a deposição de pequenos troços de fibras, descontínuos e escassos. Para uma concentração de 20% de gelatina, as fibras foram continuamente electrofiadas, no entanto a solução não era suficientemente viscosa para impedir a formação de uma gota de polímero na ponta da agulha, independentemente da tensão aplicada. Esta gota que se ia acumulando acabava por cair, resultando num desperdício de solução e consequentemente uma menor deposição. A concentração escolhida para prosseguir foi 25% de gelatina de peixe que coincide com o que vem relatado em estudos anteriores [33].

Para a mesma concentração, as soluções de gelatina de porco eram consideravelmente mais viscosas que as de gelatina de peixe. No caso da gelatina de porco, começando na concentração de 10%, foram já observadas várias fibras depositadas no coletor e para concentrações a partir de 14% já era possível obter uma fiação de fibras contínua, ainda que com alguma formação de gota na ponta da agulha. Para evitar que esta gota se formasse, optou-se por utilizar uma concentração de gelatina de porco de 16%.

Em seguida foram avaliados os parâmetros do processo de fiação e verificou-se que em alguns casos a sua variação não era muito significativa. Para a distância agulha coletor chegou-se à conclusão que a sua variação pouco afetou a morfologia das fibras. A comparação entre a Figura 4.1 (a) e a Figura 4.1 (b) permite verificar que o aumento da distância parece diminuir o diâmetro das fibras. Optou-se por utilizar uma distância fixa intermédia, de 20cm, tanto no caso das matrizes de gelatina de peixe como no caso da gelatina de porco (Figura 4.1),

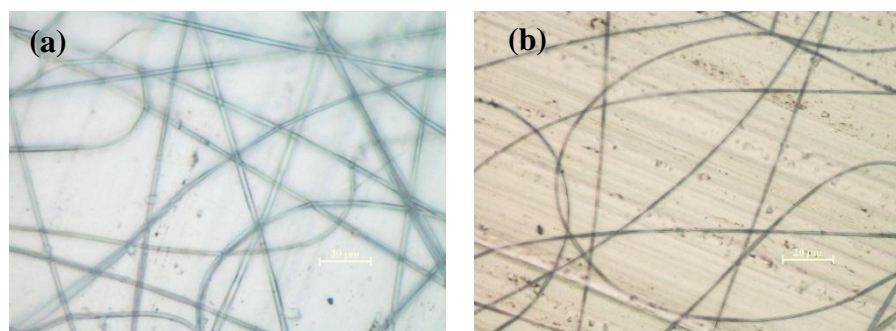


Figura 4.1 - Observação ao microscópio ótico (Ampliação $\times 50$) da morfologia das matrizes de gelatina de porco, para duas distâncias diferentes da agulha ao coletor: (a) 15 cm, (b) 25 cm, para uma tensão constante de 15kV e um caudal de 0,2 ml/h (Escala das imagens: 20 μm).

Relativamente ao efeito da tensão aplicada, tanto para a gelatina de peixe como para a gelatina de porco, verificou-se que esta tinha uma grande influência no processo de produção de fibras. Tensões mais baixas (<12 kV) levavam à formação de gota na ponta da agulha, apesar de se manter uma fiação constante. Já para tensões elevadas (>17 kV) deixava de se verificar um fio bem definido surgindo uma cadeia ramificada de fios. Acima dos 20kV a tensão era de tal forma elevada que apenas existiam pulsos de fibras

“disparadas” contra o coletor. Como fatores exteriores, como a temperatura e a humidade, são determinantes no processo de electrofiação, é por vezes necessário ajustar os valores de tensão. Assim, nas deposições feitas ao longo do trabalho foi utilizada uma gama de tensões entre os 13 e os 16kV.

Tabela 4.1 – Condições de electrofiação escolhidas para a realização do trabalho.

	Tensão aplicada (kV)	Caudal (ml/h)	Distancia Agulha- Coletor (cm)
Gelatina de Peixe	14-16	0,3	20
Gelatina de Porco	13-14	0,2	20

Não foi também perceptível nas observações de microscópio ótico que a variação da tensão tivesse uma influência significativa sobre o diâmetro das fibras (Figura 4.2), apesar de parecer que as fibras fiadas com uma tensão inferior apresentem um maior diâmetro.

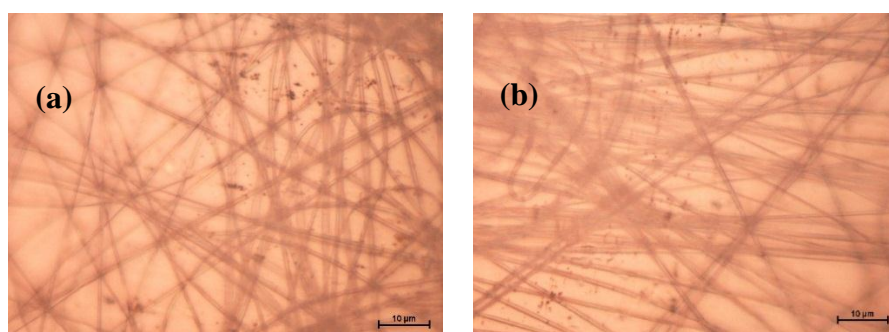


Figura 4.2 – Observação ao microscópio ótico (Ampliação $\times 100$) da morfologia das matrizes de gelatina de porco, fiadas aplicando duas tensões diferentes: (a) 12 kV, (b) 16 kV, para uma distância constante agulha-coletor de 20 cm e um caudal de 0,2 ml/h (Escala das imagens: 10 μm).

Por fim, o último parâmetro a ser manipulado no processo de electrofiação foi o caudal ejetado da agulha, controlado pela bomba infusora. Um caudal muito elevado pode induzir a formação de gota na extremidade da agulha, mas um caudal demasiado baixo torna o processo bastante mais demorado. Tendo como critérios a ausência de formação de gota e os bons resultados da fiação escolheu-se, no caso da gelatina de peixe, um caudal de 0,3 ml/h e, no caso da gelatina de porco, um caudal de 0,2 ml/h (Tabela 4.1). O aumento do caudal parece ter algum efeito no aumento do diâmetro das fibras (Figura

4.3), no entanto este aumento leva à formação de uma gota cada vez maior na ponta da agulha e conseqüentemente ao desperdício de solução polimérica.

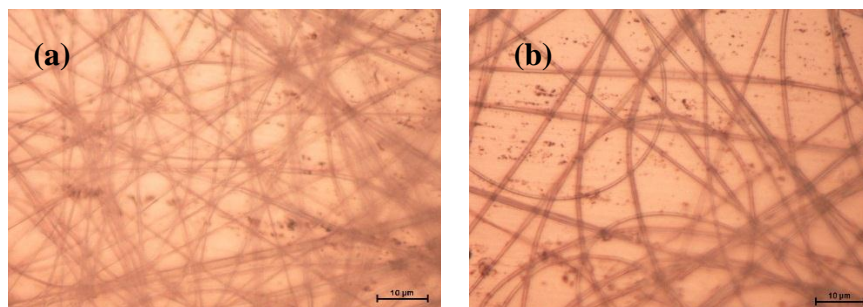


Figura 4.3 - Observação ao microscópio ótico (Ampliação $\times 100$) da morfologia das matrizes de gelatina de porco, fiadas utilizando dois caudais de ejeção diferentes: (a) 0.1 ml/h, (b) 0.5 ml/h, para uma distância constante agulha-coletor de 20 cm e uma tensão constante de 15 kV (Escala das imagens: 10 μ m).

4.1.1. Análise SEM

Após a electrofiação, as matrizes de fibras de gelatina de peixe e porco obtidas foram submetidas a dois processos diferentes de reticulação: exposição a vapor de GTA e tratadas por DHT. A reticulação foi necessária para ultrapassar a solubilidade da gelatina em água, que condiciona a sua utilização.

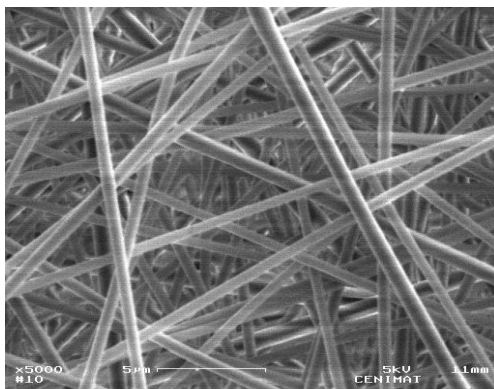
Para avaliar a morfologia das pré e pós reticulação recorreu-se a uma técnica de microscopia eletrónica de varrimento, o SEM (Scanning Electron Microscopy). A observação das imagens obtidas, permitiu não só avaliar o diâmetro médio das fibras de cada tipo de matriz mas também verificar que nenhuma das fibras continha contos na sua estrutura (Figura 4.4 e Figura 4.5). O arranjo das fibras nestas matrizes (os vários segmentos de fibra possuem orientações aleatórias) tem o aspeto da matriz extracelular de muitos tecidos.

Na Tabela 4.2 encontra-se a análise estatística do diâmetro das fibras para uma população $n=30$ fibras medidas por condição e para as matrizes de gelatina de peixe, e na Tabela 4.3 para as matrizes de gelatina de porco.

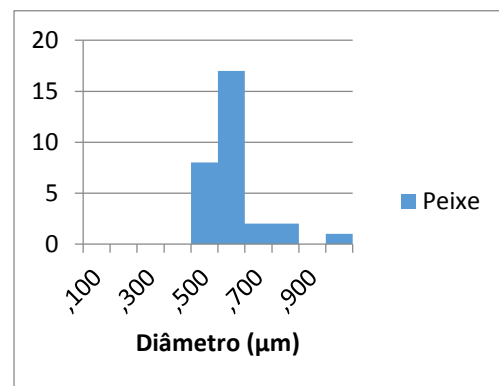
Os valores da Tabela 4.2 permitem concluir que não existe diferença significativa no diâmetro das fibras entre a matriz não reticulada e a matriz reticulada com DHT. Por outro lado a matriz reticulada com GTA apresenta fibras com um diâmetro ligeiramente superior.

Tabela 4.2 – Diâmetros médios e incertezas associadas (desvio-padrão da média) das amostras (n=30) de gelatina de peixe (GelF), gelatina de peixe reticulada com GTA (GelF-GTA) e gelatina de peixe reticulada por DHT (GelF-DHT).

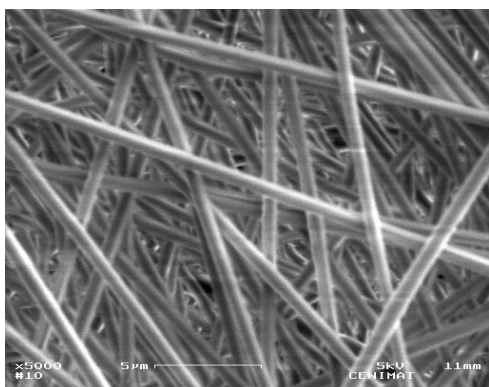
Matriz	d (μm)
GelF	$0,553 \pm 0,10$
GelF-GTA	$0,716 \pm 0,10$
GelF-DHT	$0,518 \pm 0,11$



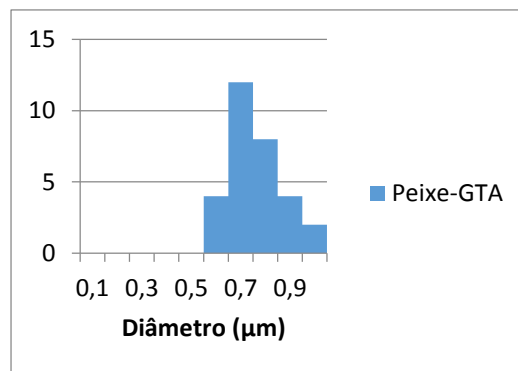
(a.1)



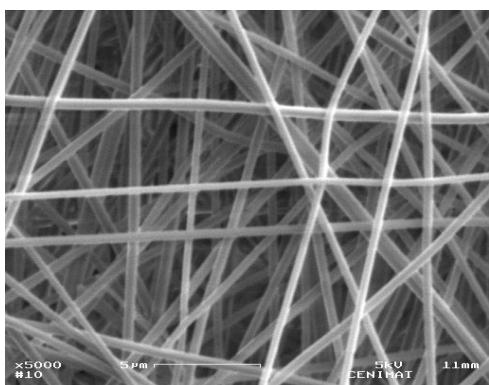
(a.2)



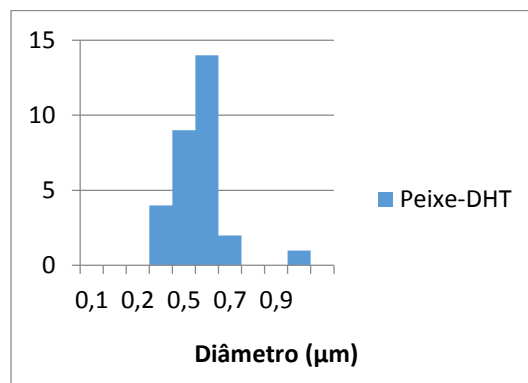
(b.1)



(b.2)



(c.1)



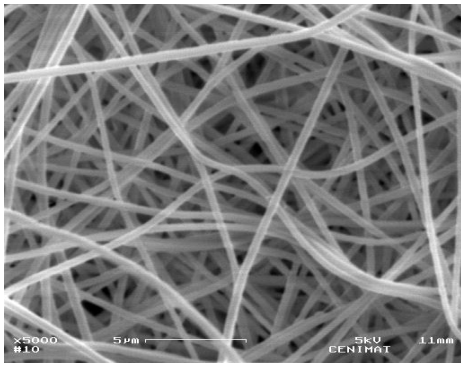
(c.2)

Figura 4.4 – Imagens SEM das matrizes de fibras de gelatina de peixe e respectivos histogramas relativos à medição dos diâmetros das fibras: não reticuladas (a.1) e (a.2), reticuladas com GTA (b.1) e (b.2) e reticuladas por DHT (c.1) e (c.2).

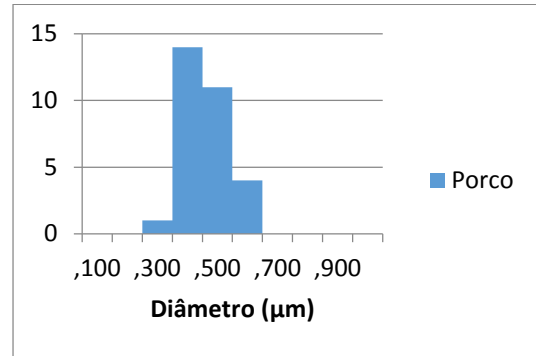
As matrizes de gelatina de porco (Tabela 4.3) apresentam diâmetros bastante semelhantes entre elas.

Tabela 4.3 - Diâmetros médios e erros associados (desvio-padrão da média) das amostras (n=30) de gelatina de porco (GelP), gelatina de porco reticulada com GTA (GelP-GTA) e gelatina de porco reticulada por DHT (GelP-DHT).

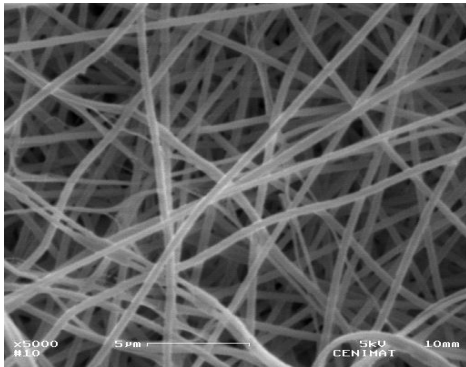
Matriz	d (μm)
GelP	0,41 ± 0,07
GelP-GTA	0,44 ± 0,09
GelP-DHT	0,39 ± 0,06



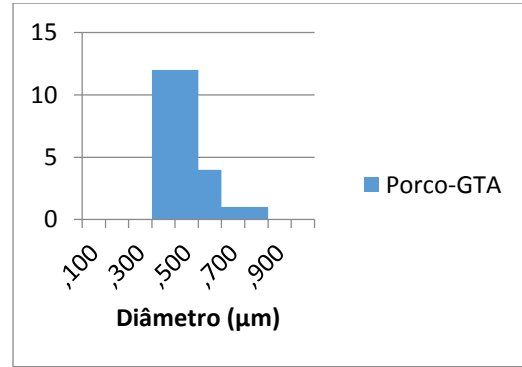
(a.1)



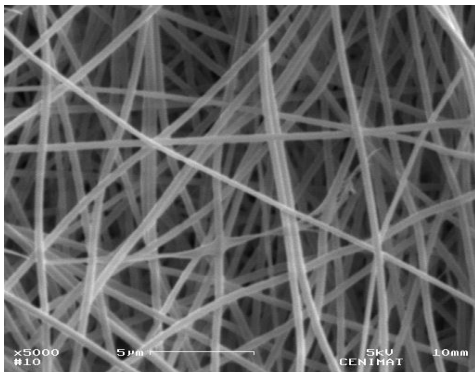
(a.2)



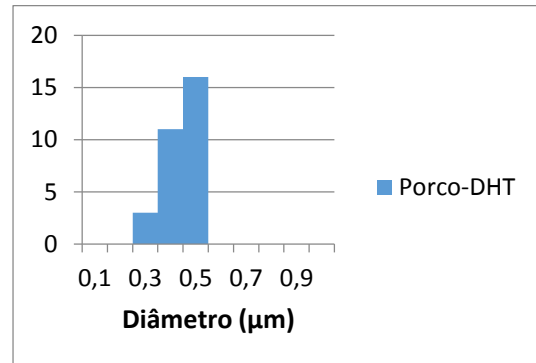
(b.1)



(b.2)



(c.1)



(c.2)

Figura 4.5 – Imagens SEM das matrizes de fibras de gelatina de porco e respectivos histogramas relativos à medição dos diâmetros das fibras: não reticuladas (a.1) e (a.2), reticuladas com GTA (b.1) e (b.2) e reticuladas por DHT (c.1) e (c.2).

Apesar das concentrações das soluções usadas para a obtenção das matrizes dos dois tipos de gelatina terem sido diferentes, as fibras obtidas possuem diâmetros comparáveis. A gelatina de porco apresenta uma massa molecular superior à gelatina de peixe utilizada, razão pela qual a concentração de gelatina de porco utilizada nas soluções para fiar tenha sido mais baixa. A análise das imagens de SEM permite inferir que tanto nas matrizes de gelatina de peixe, como nas matrizes de gelatina de porco a utilização de vapor de GTA tende a produzir um aumento na dimensão no diâmetro das fibras.

4.1.2. Tração Mecânica

Os módulos de Young das matrizes estudadas, consoante as diferentes condições, variaram entre 250 e 660 kPa aproximadamente (Tabela 4.4). Na Figura 4.6 é possível observar uma curva obtida a partir de uma amostra de gelatina de peixe reticulada por DHT por 96 horas.

Tabela 4.4 – Média dos módulos de Young para as matrizes das diferentes condições e respetivos desvios padrões da média para uma população de quatro amostras por condição.

	GelP-DHT	GelP-GTA	GelF-DHT	GelF-GTA
<i>E</i> (kPa)	656±257	257±14	346±86	478±90

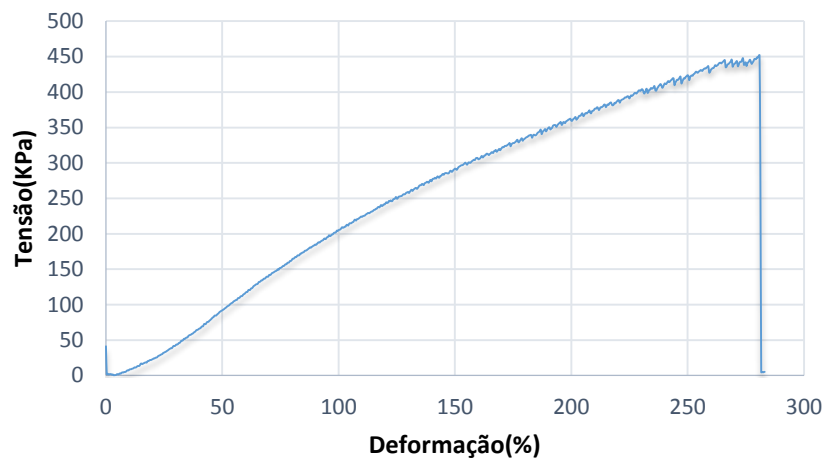


Figura 4.6 – Curva de tração para uma amostra de matriz de gelatina de peixe reticulada por DHT por 96 horas ensopada em água.

4.2. Reticulação

O estudo da reticulação foi efetuado de diversas formas. Através de estudos de perda de massa que permitem ter uma noção do grau de reticulação das matrizes e através de testes colorimétricos (ensaio Ninidrina). Para avaliar as diferenças na estrutura química, entre amostras de matrizes não reticuladas e matrizes reticuladas, recorreu-se ao FTIR das amostras.

4.2.1. Análise FTIR

A análise das amostras recorrendo à técnica de FTIR teve como objetivo identificar os grupos funcionais da gelatina e determinar as alterações químicas que ocorreram devido aos diferentes processos de reticulação. Na Tabela 4.5 encontram-se os números de onda associados aos picos das bandas dos diferentes modos de vibração das principais ligações dos grupos funcionais que compõem a gelatina, encontrados na literatura.

Tabela 4.5 – Modos de vibração da gelatina.

Ligação	Número de Onda (cm⁻¹)	Descrição	Referência
Amida A	3300	Estiramento N-H	[23]
Amida B	≈3100	Estiramento N-H	[35]
Amida I	1636-1640	Estiramento C=O	[23][36]
Amida II	1542-1544	Estiramento C-N, Flexão N-H	[23] [36]
Amida III	1240	Estiramento C-N, Flexão N-H em fase	[23] [36]
Amida IV	625-767	Flexão OCN	[35]
Amida V	640-800	Flexão NH fora do plano	[35]
Amida VI	537-606	Flexão C=O fora do plano	[35]

Em qualquer um dos espectros obtidos, tanto da gelatina de peixe como na de porco é possível identificar os picos correspondentes aos descritos na Tabela 4.5.

Na Figura 4.7 é possível observar que os picos/bandas referentes à vibração de alguns grupos funcionais da gelatina de porco estão acima dos correspondentes aos da gelatina de peixe. A maior intensidade destes picos/bandas indica uma maior presença desses grupos na gelatina de porco. Este facto pode ajudar a explicar a maior “facilidade” que a gelatina de porco tem ao ser reticulada, quando comparada com a gelatina de peixe.

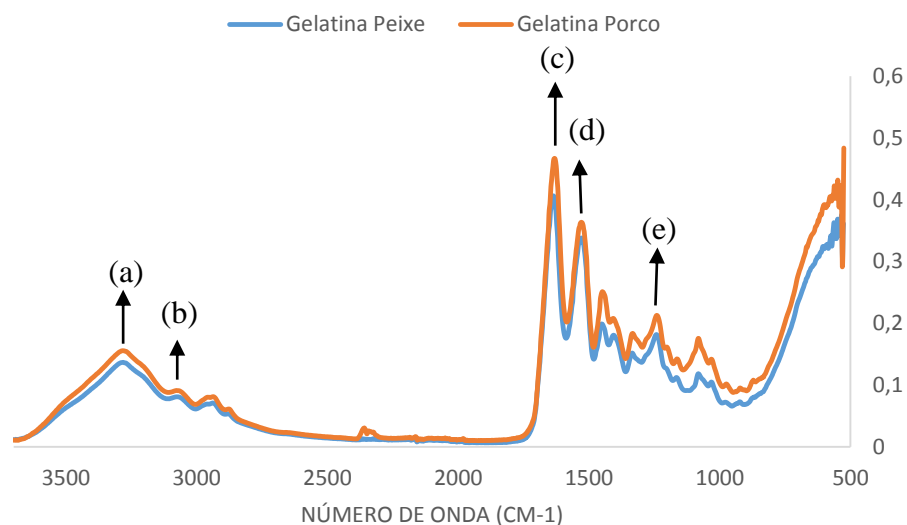


Figura 4.7 – Espectros FTIR da gelatina de peixe e da gelatina de porco e algumas das principais estruturas presentes: (a) amida A, (b) amida B, (c) amida I, (d) amida II e (e) amida III.

A Figura 4.8 e Figura 4.9 que se referem, respetivamente, aos espectros da gelatina de porco e peixe, mostram os resultados obtidos para amostras não reticuladas e reticuladas com vapor de GTA (gelatina de porco durante 4 horas e gelatina de peixe durante 8 horas) e pelo processo DHT (gelatina de porco durante 48 horas e gelatina de peixe durante 96 horas). Os espectros não mostram o aparecimento de qualquer pico novo. Isto significa que a estrutura química não foi significativamente alterada por nenhum dos processos de reticulação. Na literatura vem referido que a reticulação com GTA dá origem a um aumento relativo do pico referente aos 1450 cm^{-1} , que se deve à vibração da ligação aldimina ($\text{CH}=\text{N}$) [36]. Esta alteração é a responsável pela cor amarelada que as matrizes tratadas com GTA adquirem. Nos espectros das matrizes de gelatina de peixe é possível ter essa perceção, ao contrário das matrizes de gelatina de porco. As matrizes de peixe reticuladas com GTA apresentam uma cor amarelada contrastando com a cor branca das matrizes pré reticuladas.

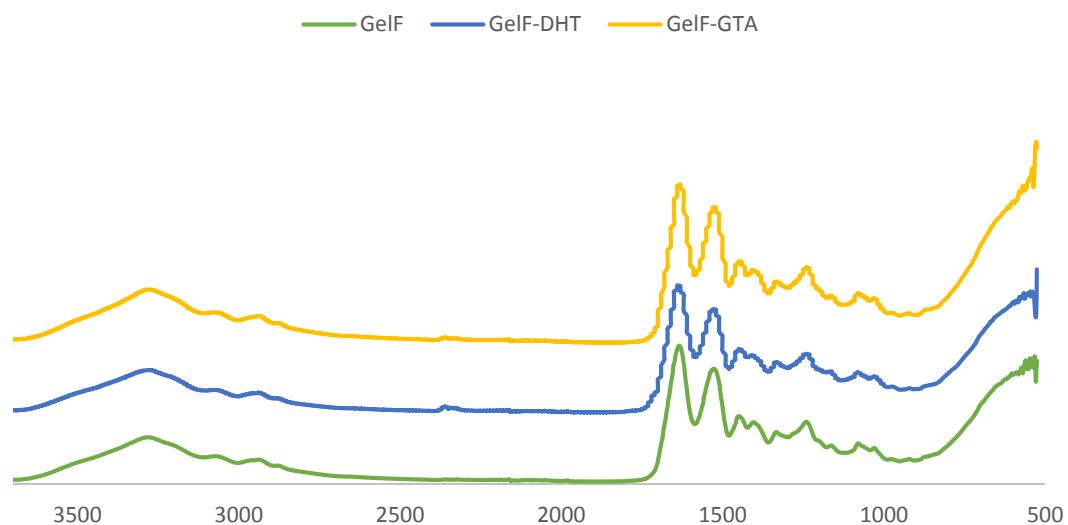


Figura 4.8 – Espectros FTIR da gelatina de peixe (GelF), gelatina de peixe reticulada por DHT durante 96 horas (GelF-DHT) e gelatina de peixe reticulada com GTA durante 8 horas (GelF-GTA).

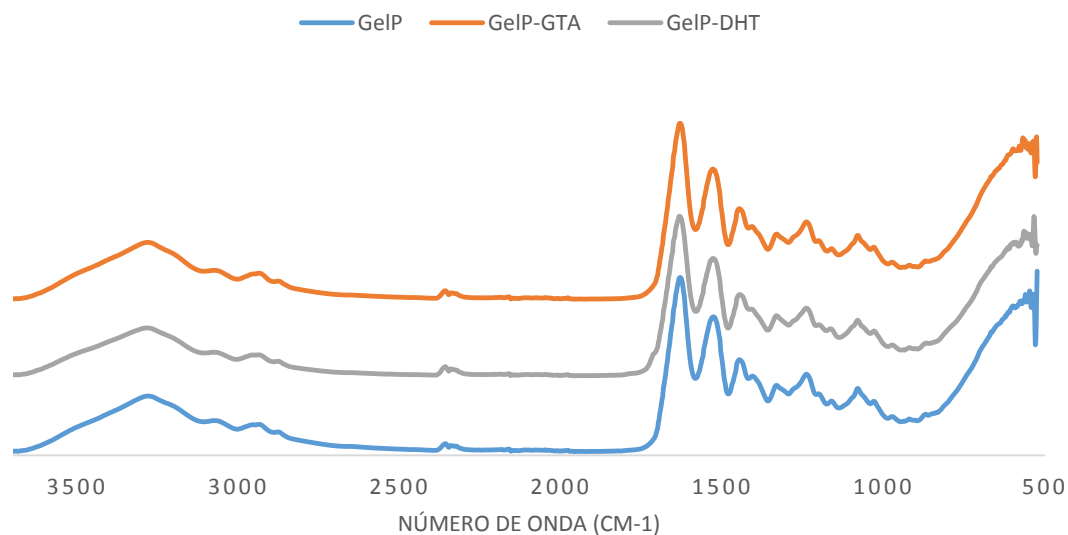


Figura 4.9 - Espectros FTIR da gelatina de porco (GelP), gelatina de porco reticulada por DHT durante 48 horas (GelF-DHT) e gelatina de porco reticulada com GTA durante 4 horas (GelF-GTA).

4.2.2. Perda de Massa

O estudo da perda de massa de um material é um indicativo importante da eficácia do processo de reticulação. Se a reticulação for eficaz a perda de massa será mínima. A eficácia de cada um dos processos de reticulação estudados está dependente do tempo a que a matriz ficou exposta a processo.

A reticulação utilizando vapor de GTA é um processo bastante eficaz e são precisas apenas algumas horas para se obter resultados satisfatórios em termos de perda de massa (Figura 4.10). É possível observar na Figura 4.10 que a gelatina de porco reticula melhor (perdas de massa menores para o mesmo tempo de tratamento) do que a gelatina de peixe. Com base nos dados recolhidos, optou-se por utilizar nos estudos de cultura celular matrizes de gelatina de porco reticuladas com GTA por 4 horas e matrizes de gelatina de peixe reticuladas com GTA por 8 horas. Desta forma tentou-se obter um compromisso entre uma boa reticulação e um menor risco de toxicidade para as células (que poderá aumentar com o tempo de exposição ao GTA). Para além disto, tempos superiores a 8 horas, no caso da gelatina de peixe, e 4 horas, no caso da gelatina de porco, podem comprometer significativamente a estrutura da matriz visto que esta fica enfraquecida muito amarelada.

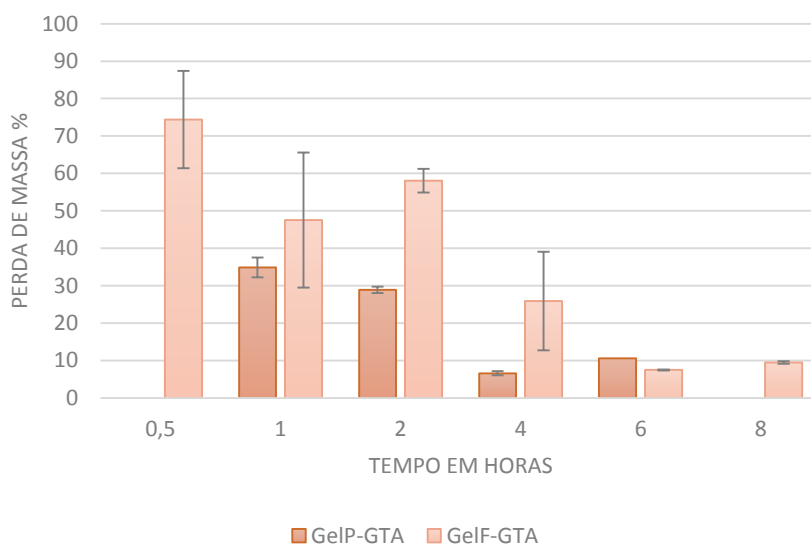


Figura 4.10 – Perda de massa das matrizes de gelatina de peixe (GelF-GTA) e matrizes de gelatina de porco (GelP-GTA) reticuladas com GTA durante vários períodos de tempo.

O processo desidrotérmico (DHT) é um processo cuja reticulação não é tão eficaz num espaço de tempo tão curto como no caso do GTA. Desta forma, para obter perdas de massa da ordem das que foram obtidas com o vapor de GTA, foi preciso reticular as matrizes durante vários dias (Figura 4.11). Com base nos dados obtidos optou-se por utilizar matrizes de gelatina de porco reticuladas através de DHT por 48 horas e matrizes de gelatina de peixe reticuladas através de DHT por 96 horas. Tal como acontece com as matrizes reticuladas com GTA, as matrizes de gelatina de porco tendem a estabilizar melhor quando sujeitas a DHT (menores perdas de massa para o mesmo tempo de DHT).

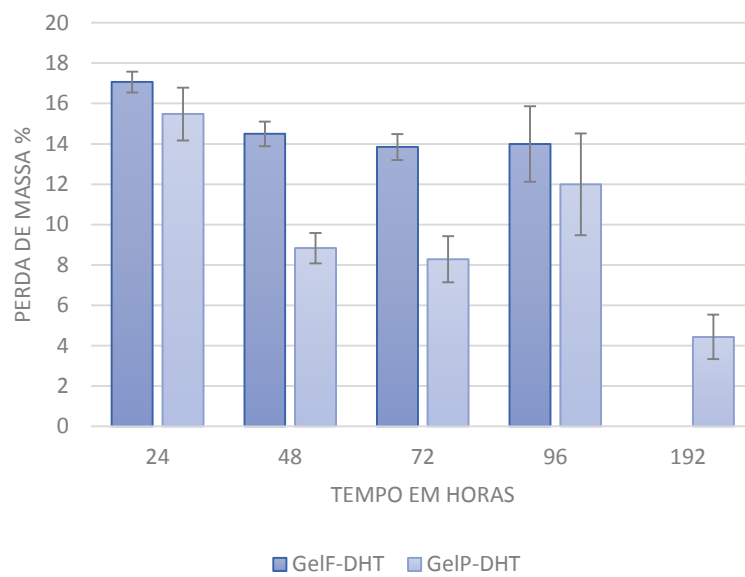


Figura 4.11 – Perda de massa nas matrizes de gelatina de peixe (GelF-DHT) e matrizes de gelatina de porco (GelP-DHT) reticuladas por DHT durante vários períodos de tempo.

Para as condições escolhidas para produzir as matrizes, a perda de massa é da ordem dos 10% para todas as amostras exceto para GelF-DHT em que é um pouco maior ($\approx 14\%$).

4.2.3. Grau de inchamento

O grau de inchamento, como foi referido anteriormente, permite avaliar a quantidade de água que uma matriz é capaz de reter no seu interior. Isto é um fator importante para certas aplicações das matrizes *in vivo*. Para avaliar esta capacidade, as

matrizes foram submersas em água por dois períodos de tempo diferentes: meia hora e 24 horas (Figura 4.12 e Figura 4.13).

Apesar de terem sido utilizados dois períodos de tempo bastante diferentes é de notar que a capacidade de absorver água não variou significativamente entre eles, o que indica que estas matrizes são bastante hidrofílicas absorvendo a água num período curto. A gelatina de peixe apresenta graus de inchamento ligeiramente menores do que a gelatina de porco. O facto de a matriz de gelatina de peixe tratada com DHT, apresentar um grau de inchamento menor, quando a medição é feita ao fim de 24 horas, pode estar relacionado com a perda de massa desta matriz (a que mostrou maior valor de perda de massa $\approx 14\%$). No caso da gelatina de porco nota-se uma tendência para as matrizes reticuladas por GTA, terem uma maior capacidade de armazenar água no seu interior quando comparadas com as reticuladas por DHT, embora as diferenças sejam estatisticamente pouco relevantes.

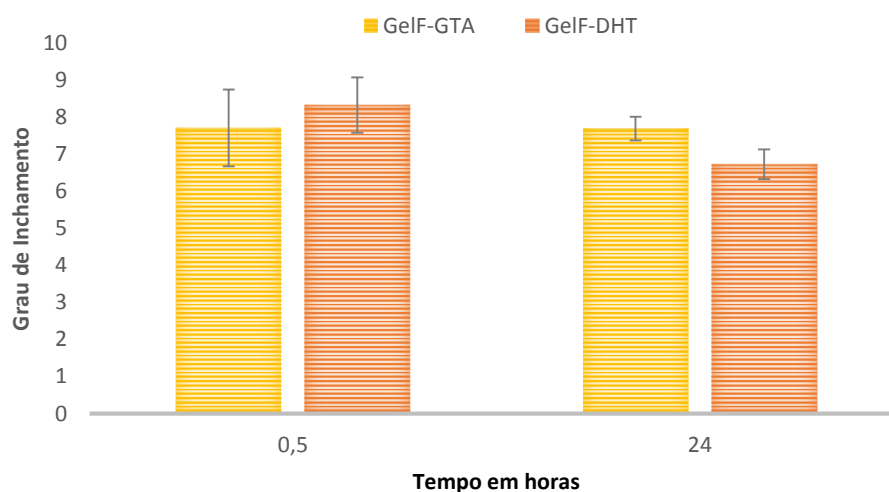


Figura 4.12 – Gráfico do Grau de Inchamento das amostras de gelatina de peixe reticuladas com GTA (GelF-GTA) e por DHT (GelF-DHT) durante 0,5 e 24 horas.

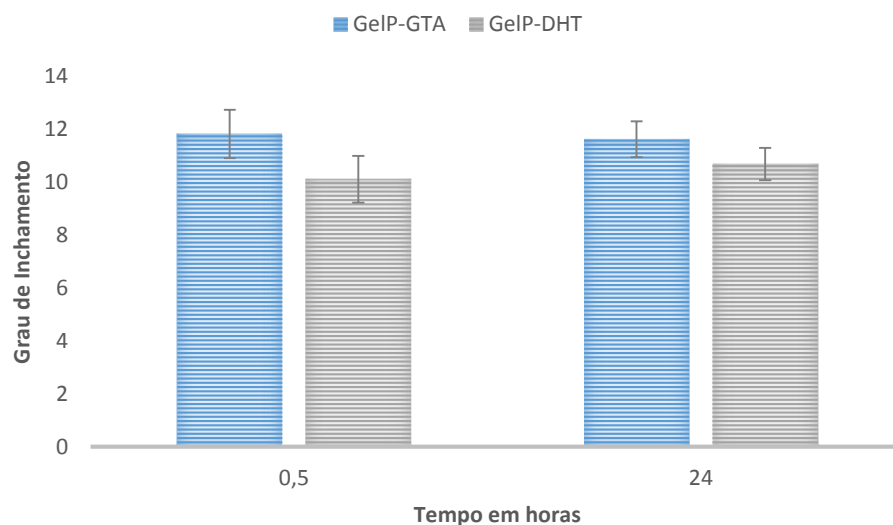


Figura 4.13 - Gráfico do Grau de Inchamento das amostras de gelatina de porco reticuladas com GTA (GelP-GTA) e por DHT (GelP-DHT) durante 0,5 e 24 horas.

4.2.4. Quantificação de aminoácidos/Ensaio Ninidrina

A ninidrina é utilizada como um meio de quantificação de aminoácidos. Esta substância reage com os grupos amina primários ($-NH_2$) existentes na gelatina, resultando num produto de reação colorido designado por púrpura de Ruhemann.

Em primeiro lugar foi efetuado um ensaio promovendo a reação da ninidrina com determinada quantidade de soluções de gelatina de peixe e porco com diferentes concentrações. A absorvância das amostras após o tempo de reação é apresentada na Figura 4.14.

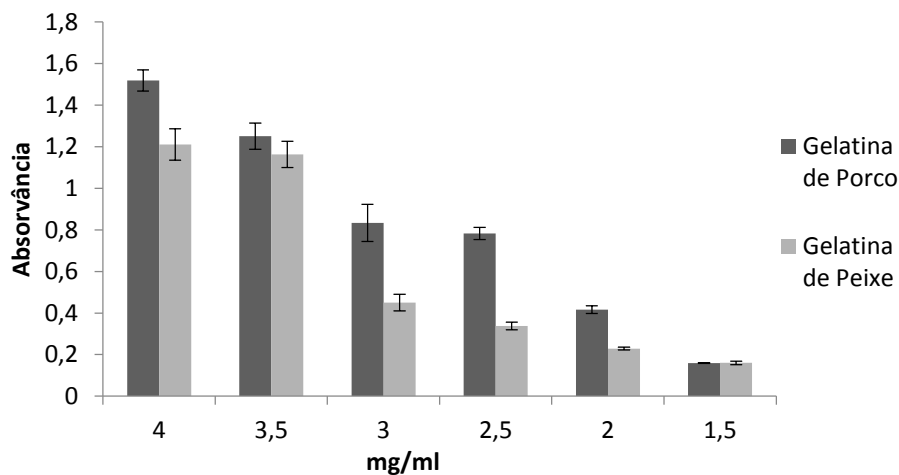


Figura 4.14 – Gráfico da absorvância das soluções de ninidrina com várias concentrações de gelatina: 1,5 - 4 mg/ml (barras de incerteza correspondentes ao desvio padrão da média das 3 leituras de absorvância feitas para cada amostra).

Para uma mesma concentração, as soluções de gelatina de porco apresentaram em geral uma cor púrpura mais intensa o que estará relacionado com o facto deste tipo de gelatina ter mais grupos disponíveis para reagir. De facto, de acordo com a literatura, a gelatina de mamífero tem níveis de aminoácidos superiores aos da gelatina de peixe de água fria o que contribui para esta maior reatividade [15].

Este resultado sustenta ainda o que os testes de perda de massa permitiram concluir: devido ao maior número de grupos NH_2 disponíveis, a gelatina de porco precisou de menos tempo de reticulação do que a gelatina de peixe para obter resultados satisfatórios (pequenos valores de perda de massa).

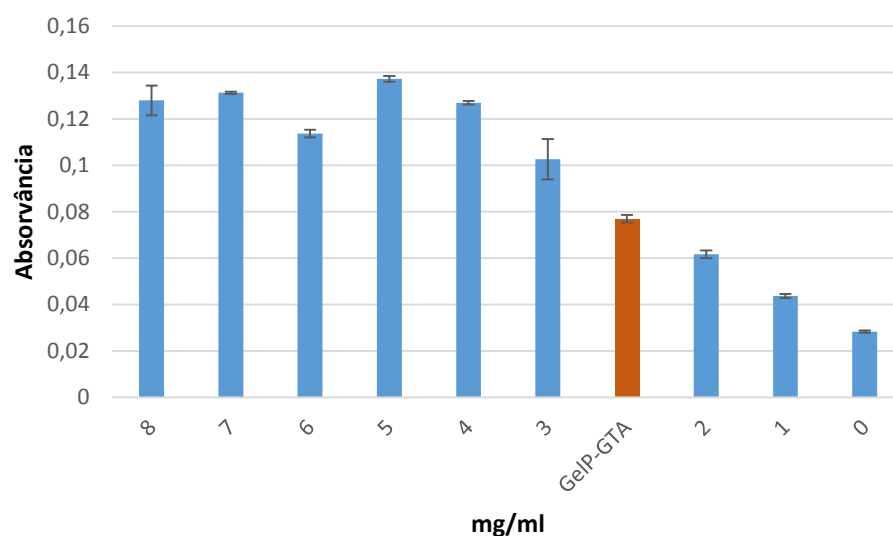


Figura 4.15 – Gráfico da absorvância das soluções de ninidrina com várias concentrações de gelatina (0 - 5 mg/ml) e da solução onde foi colocada 10 mg de matriz de GelP-GTA representada a laranja (barras de incerteza correspondentes ao desvio padrão da média das 3 leituras de absorvância feitas para cada amostra).

Os resultados dos ensaios com a ninidrina mostraram-se bastante difíceis de reproduzir devido à necessidade de manter uma temperatura elevada constante, para todas as amostras, para a reação ocorrer aliado ao facto da solução de ninidrina ser bastante instável. No caso da gelatina de porco, para soluções de gelatina com concentrações superiores a 5mg/ml verifica-se uma saturação dos valores de absorvância. Isto pode querer indicar que a ninidrina presente na solução reagiu por completo (Figura 4.15).

Para avaliar o grau de reticulação da gelatina de porco reticulada com GTA colocou-se uma amostra com 10 mg desta matriz em solução com ninidrina nas mesmas condições em que foram realizados os ensaios para soluções de gelatina de porco com diferentes concentrações. Após o tempo de reação, a absorvância da solução com a amostra encontrava-se entre valores de absorvância das soluções testadas. Realizando uma regressão linear para as concentrações entre 0 e 4mg/ml de gelatina de porco apurou-se que as 10 mg de matriz apresentam resultados correspondentes a cerca de 2,1 mg de gelatina de porco. Estes 2,1mg correspondem a uma fração de gelatina não reticulada, estimando-se assim um grau de reticulação de aproximadamente 79%. No entanto, a

presença da matriz pode trazer algumas variantes a este processo, como a sua capacidade de absorção de líquido, fazendo variar a concentração da solução.

4.3. Testes *in vitro*

4.3.1. Cultura HFFF2

As células utilizadas na primeira cultura deste trabalho foram HFFF2 (human caucasian foetal foreskin fibroblasts). As células foram semeadas em duas placas de 24 poços com anilhas de teflon no seu interior de forma a fixar as lamelas com as matrizes ao fundo dos poços. Foram efetuadas 5 réplicas para cada uma das quatro condições: matrizes de gelatina de porco e peixe reticuladas com GTA e por DHT. Para além disto foram ainda colocados em cada placa dois controlos de meio com matriz para cada condição, um controlo de meio e três controlos de células.

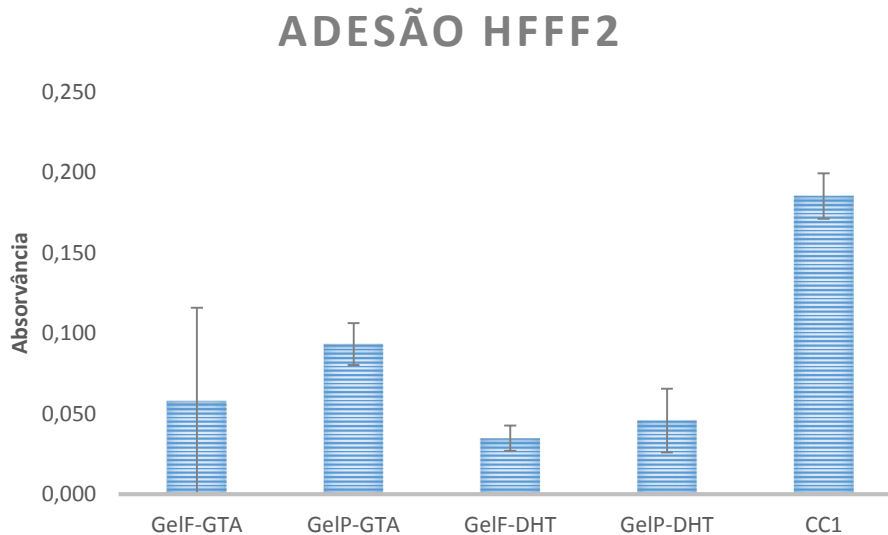


Figura 4.16 – Gráfico de absorvância correspondente à adesão das células HFFF2 ao fim de 24 horas nas matrizes com as condições selecionadas e controlo (CC1).

Ao fim de 24 horas de cultura, foram efetuadas as leituras da absorvância e avaliada a adesão das células às matrizes (Figura 4.16). A variabilidade de leituras entre as réplicas

de GelF-GTA não permite tirar conclusões para estas matrizes. Analisando as restantes matrizes, salienta-se que a matriz GelP-GTA apresenta os maiores níveis de adesão (aprox. 50% do CC¹).

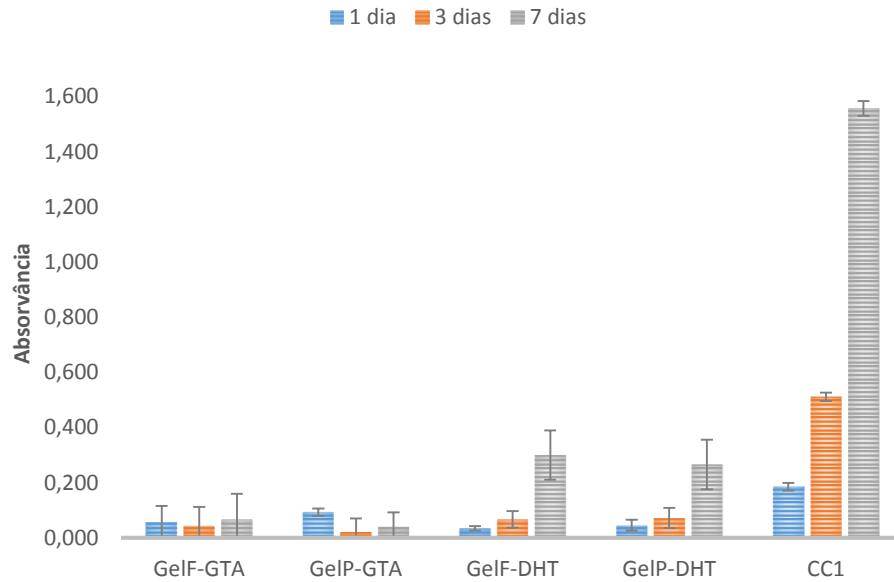


Figura 4.17 - Gráfico de absorvância correspondente à adesão e proliferação das células HFFF2 nas matrizes com as condições selecionadas e o controlo (CC1).

No caso das matrizes, tanto de gelatina de peixe como de porco, tratadas com GTA as leituras da absorvância diminuíram bastante no terceiro dia (Figura 4.17). Isto indica um elevado grau de morte celular possivelmente por apoptose devido à toxicidade existente nestas matrizes devido aos resíduos de GTA (Tabela 4.6). No entanto, no sétimo dia de cultura é possível observar uma certa recuperação nos níveis celulares destas matrizes (Tabela 4.7). No caso das matrizes reticuladas por DHT (GelF-DHT e GelP-

¹ A comparação com o controle de células não é "linear" porque, devido ao meio que as matrizes absorvem, a rezasurina que é colocada nos poços com as matrizes fica mais diluída. Assim as comparações efetuadas com o CC revelam uma situação menos favorável para as matrizes do que realmente é. Esta discussão foi muito recentemente tida dentro do grupo e estão a ser estabelecidos procedimentos que permitam tornar "linear" esta comparação.

DHT) isto não sucede e parece sempre existir um crescimento exponencial como se pode observar pelas taxas de crescimento das matrizes GelF-DHT e Gel F-DHT na Tabela 4.6 e na Tabela 4.7. No sétimo dia de cultura o controlo de células já teria atingido a confluência pelas observações feitas no microscópio ótico.

Tabela 4.6 – Tabela comparativa das taxas de crescimento celular entre 24h e 72h nas matrizes reticuladas com vapor de GTA e por DHT

Condições	GelF-GTA	GelP-GTA	GelF-DHT	GelP-DHT	CC
Taxa de crescimento (%)	-23,2	-76,5	92,8	57,4	175,9

Tabela 4.7 – Tabela comparativa das taxas de crescimento celular entre 72h e 7 dias nas matrizes reticuladas com vapor de GTA e por DHT

Condições	GelF-GTA	GelP-GTA	GelF-DHT	GelP-DHT	CC
Taxa de crescimento (%)	51,3	89,0	347,2	269,5	204,6

4.3.2. Vero

Para a sementeira de células Vero foram utilizadas duas placas de 24 poços e foi testado o efeito na toxicidade das matrizes de um tratamento prévio com uma solução de glicina. Na primeira placa foram colocadas as matrizes reticuladas com vapor de GTA e na segunda as matrizes reticuladas por DHT. Cada placa foi constituída por quatro réplicas de cada condição, ou seja, matrizes de gelatina de porco tratadas com glicina (GelPCG), matrizes de gelatina de peixe tratadas com glicina (GelPCG) e matrizes de porco (GelPSG) e peixe (GelFSG) sem esse mesmo tratamento. Para além disto, para cada condição efetuaram-se dois controlos de meio com matrizes da condição correspondente. As matrizes foram depositadas em poços de teflon no interior dos poços da caixa e fixas com anilhas de teflon.

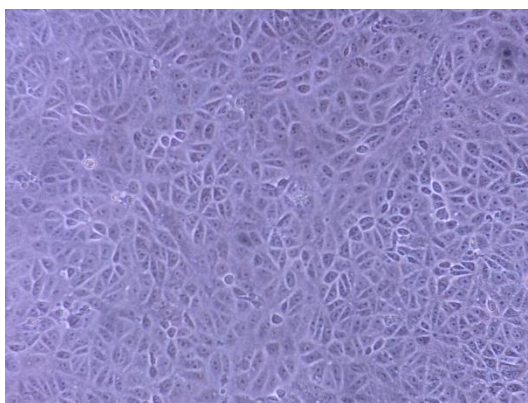


Figura 4.18 – Observação do controlo de células Vero ao fim de 48 horas de cultura.

Cada poço de teflon com a anilha colocada tem capacidade para 250 μL e sem anilha 500 μL . Foram semeados 32 poços de 250 μL e 19 poços de 500 μL . Para semear 8 mil células por poço de 250 μL e 16 mil por poço de 500 μL foram necessárias 592 mil células. A contagem de células efetuada, indicou que cada ml continha aproximadamente 254 mil células.

As células respondem rapidamente à toxicidade envolvente alterando, por exemplo, as suas taxas metabólicas, o seu crescimento ou a transcrição de genes que controlam as suas funções básicas. Um dos efeitos das substâncias químicas reativas encontradas em concentrações consideradas tóxicas no ambiente envolvente às células é a interação direta

com o DNA o que pode resultar em vários tipos de danos podendo levar á morte celular [37]. Apesar dos processos de reticulação melhorarem as propriedades físicas e mecânicas da gelatina, acarretam um certo nível de toxicidade para as células, mais concretamente o processo envolvendo o GTA, que é um agente químico. Vem reportado na literatura que este risco de toxicidade está relacionado com os resíduos de GTA não reagidos presentes nos substratos e com os produtos da degradação hidrolítica das matrizes [11][23].

Os controlos de células foram observados regularmente no microscópio ótico na sala de cultura para garantir que estavam em boas condições. O meio foi mudado ao fim de 24 horas, altura em que se fez a primeira leitura de resazurina (Apêndice B) para avaliar a adesão das células às matrizes (Figura 4.19).

Analisando o gráfico de absorvância da resazurina da Figura 4.19 é notório que as matrizes tratadas com glicina foram mais eficazes na adesão celular, até nas matrizes reticuladas por DHT, embora as diferenças sejam estatisticamente pouco relevantes devido à grande incerteza associada a estes resultados. Para além disto verificou-se que nenhuma das matrizes teve uma taxa de adesão superior a 50% comparativamente com o controlo celular.

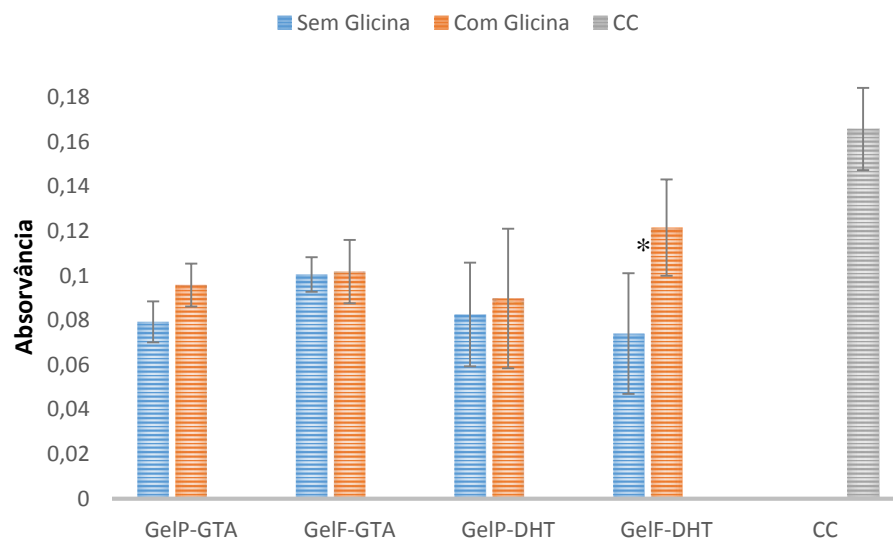
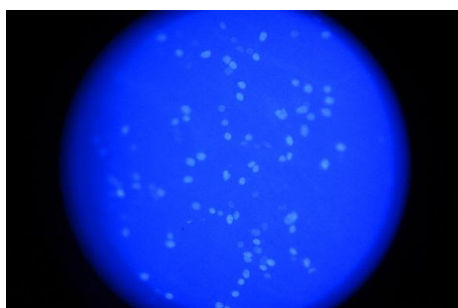
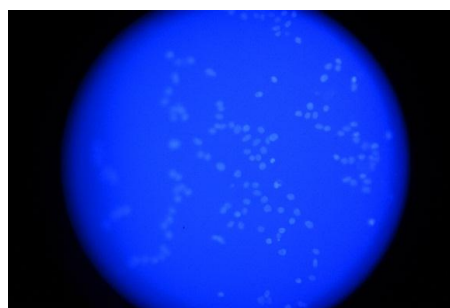


Figura 4.19 - Representação gráfica da relação entre o tratamento das matrizes com glicina e sem glicina e o crescimento celular ao fim de 24 horas (Adesão). * Valores com variação estatística significativa: $p(\text{GelF-DHT})= 0.042$.

Ao fim de 48 horas a análise do controlo de células no microscópio ótico já indicava uma grande quantidade de células (Figura 4.18). No gráfico da Figura 4.22 pode-se observar que as matrizes reticuladas com vapor de GTA tratadas com glicina tiveram um êxito bastante superior quando comparadas com as matrizes sem o mesmo tratamento. No caso das matrizes, tanto de gelatina de porco como de gelatina de peixe, tratadas por DHT as diferenças no crescimento celular, com e sem tratamento com glicina, não foram muito acentuadas (Figura 4.20 e Figura 4.21 respetivamente).

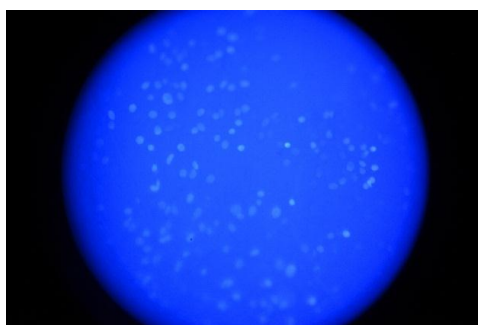


(a) GelP-DHT

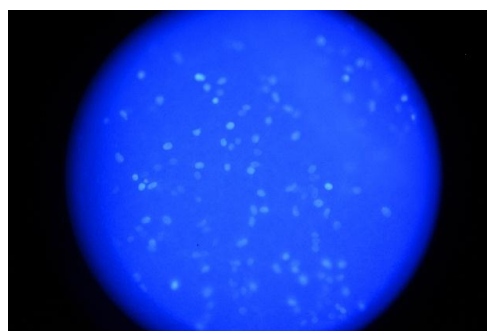


(b) GelP-DHTG

Figura 4.20 - Observação no microscópio de fluorescência das células por marcação DAPI nas matrizes GelP-DHT (a) e GelP-DHTG (b).



(a) GelF-DHT



(b) GelF-DHTG

Figura 4.21 - Observação no microscópio de fluorescência das células por marcação DAPI nas matrizes GelF-DHT (a) e GelF-DHTG (b).

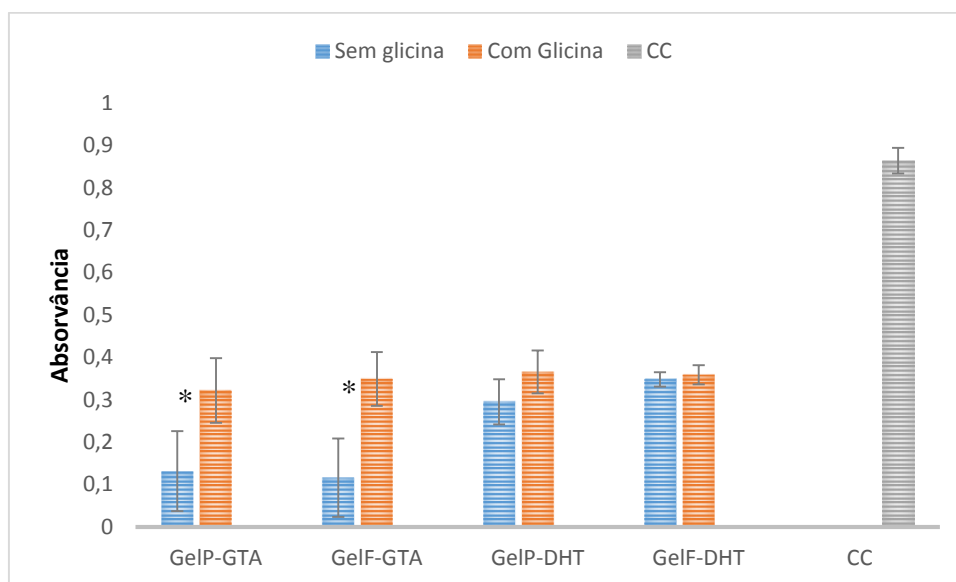


Figura 4.22 – Representação gráfica da relação entre o tratamento das matrizes com glicina e sem glicina e o crescimento celular ao fim de 48 horas. * Valores com variação estatística significativa: $p(\text{GeIP-GTA})= 0.037$; $p(\text{GeIF-GTA})=0.014$.

Uma análise mais detalhada dos crescimentos celulares está retratada na Tabela 4.8 e na Tabela 4.9. Ao analisar as taxas de crescimento celular é possível verificar que as matrizes reticuladas com GTA sem qualquer tratamento (GeIF-GTA e GeIP-GTA) apresentam um crescimento celular relativamente baixo quando comparadas às restantes condições. Como já tinha sido visto na cultura de células HFFF2 o crescimento celular em matrizes reticuladas por DHT foi bastante satisfatório. No caso GeIF-DHT o crescimento celular é até bastante superior ao verificado no controlo de células.

Tabela 4.8 – Tabela comparativa entre as taxas de crescimento celular nas matrizes reticuladas com GTA tratadas com e sem glicina: matrizes de gelatina de porco sem tratamento (GelP-GTA), matrizes de gelatina de porco com glicina (GelP-GTAG), matrizes de gelatina de peixe sem tratamento (GelF-GTA) e matrizes de gelatina de peixe com glicina (GelF-GTAG)

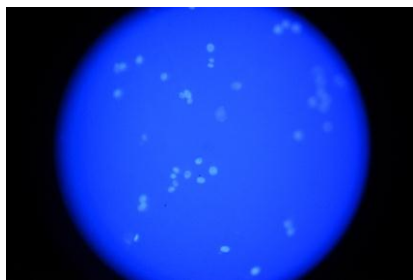
Condições	GelP-GTA	GelP-GTAG	GelF-GTA	GelF-GTAG	CC
Taxa de crescimento (%)	66,6	236,6	15,7	243,0	421,5

No caso das matrizes reticuladas com DHT não existe uma diferença estatística significativa que permita tirar conclusões absolutas acerca da toxicidade destas matrizes, visto que a diferença é reduzida. Isto é confirmado pelos resultados obtidos com a marcação DAPI (Figura 4.20 e Figura 4.21 respetivamente). No entanto é de salvaguardar que as matrizes tratadas com glicina tiveram sempre maiores absorvâncias na leitura da resazurina. Isto pode estar relacionado com a existência de resíduos tóxicos que não tenham sido completamente removidos na lavagem.

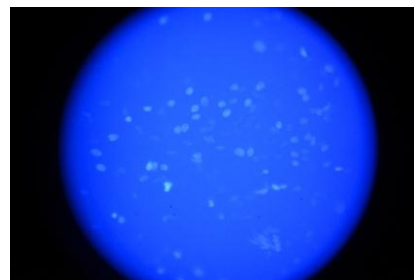
Observando os dados referentes à Tabela 4.8 salienta-se a enorme diferença na taxa de crescimento celular nas matrizes reticuladas com vapor de GTA tratadas com glicina. Isto está de acordo com o que seria de esperar, ou seja, os grupos $-NH_2$ reagem com grupos $-CHO$ do GTA neutralizando o seu efeito citotóxico.

Tabela 4.9 - Tabela comparativa entre as taxas de crescimento celular nas matrizes reticuladas por DHT tratadas com e sem glicina: matrizes de gelatina de porco sem tratamento (GelP-DHT), matrizes de gelatina de porco com glicina (GelP-DHTG), matrizes de gelatina de peixe sem tratamento (GelF-DHT) e matrizes de gelatina de peixe com glicina (GelF-DHTG)

Condições	GelP-DHT	GelP-DHTG	GelF-DHT	GelF-DHTG	CC
Taxa de crescimento (%)	257,9	307,5	370,3	195,5	421,5



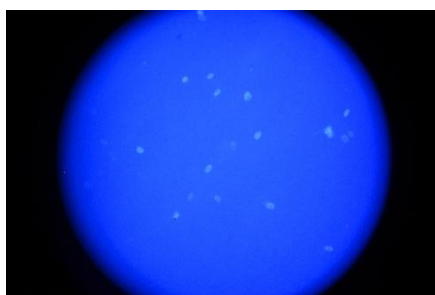
(a) GelP-GTA



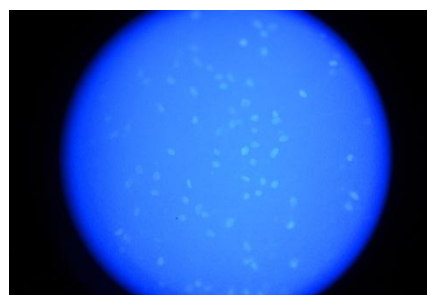
(b) GelP-GTAG

Figura 4.23 – Observação no microscópio de fluorescência das células por marcação DAPI nas matrizes GelP-GTA (a) e GelP-GTAG (b).

É possível ter uma melhor perspectiva visual do crescimento celular analisando as imagens obtidas por marcação DAPI das matrizes sem tratamento e das matrizes tratadas com glicina. Os dados das tabelas anteriores são mais facilmente tidos em conta analisando a Figura 4.23 e a Figura 4.24. A densidade de células nas Figura 4.23 - (a) e Figura 4.24 - (a), correspondentes às matrizes sem tratamento com glicina, é muito reduzida. Isto significa que muitas das células morreram e as que sobreviveram tiveram dificuldade em proliferar. A Figura 4.23 - (b) e Figura 4.24 - (b) dão conta de uma densidade populacional de células bastante superior. A marcação DAPI é um meio útil para averiguar a adesão das células à superfície do material. No entanto, torna-se complicado com esta técnica inferir sobre a quantidade de células que migrou para o interior da matriz. Neste caso pode apenas ser feita uma estimativa entre as absorvâncias lidas e a quantidade de células observadas à superfície do material.



(a) GelF-GTA



(b) GelF-GTAG

Figura 4.24 - Observação no microscópio de fluorescência das células por marcação DAPI nas matrizes GelF-GTA (a) e GelF-GTAG (b).

Os testes de extrato foram realizados com o objetivo de analisar se o meio condicionado com matrizes de cada condição teria alguma influência no crescimento celular, através da libertação de moléculas da sua estrutura devido à perda de massa. Foram utilizadas para este efeito as seguintes matrizes: GelP-GTA, GelP-DHT, GelF-GTA, GelF-DHT. Para este efeito as matrizes selecionadas foram colocadas durante 24 horas a condicionar o tradicional meio de cultura. Em seguida o meio colocado inicialmente nos poços foi substituído pelo meio condicionado pelas matrizes.

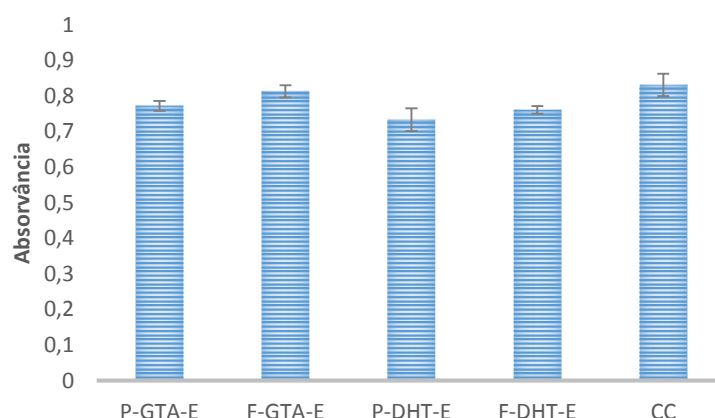


Figura 4.25 – Gráfico representativo da população de células expostas ao meio condicionado pelas matrizes selecionadas em comparação com o controlo de células (CC).

A análise da Figura 4.25 permite perceber que os meios condicionados tiveram pouco efeito no crescimento das células quando comparado com o controlo. Nenhuma das condições apresentou uma absorvância superior à obtida no controlo de células, o que significa que a libertação de moléculas das matrizes inibiu, muito subtilmente o crescimento celular.

Foi realizada uma segunda cultura utilizando células Vero, mediante as mesmas condições utilizadas anteriormente com o objetivo de confirmar e talvez melhorar os dados obtidos na primeira cultura. Esperar-se-ia obter um crescimento exponencial de células nos poços com matrizes das diferentes condições.

Ao comparar estes resultados com os resultados obtidos na cultura Vero efetuada anteriormente é possível verificar que a adesão foi significativamente mais baixa (Figura 4.26).

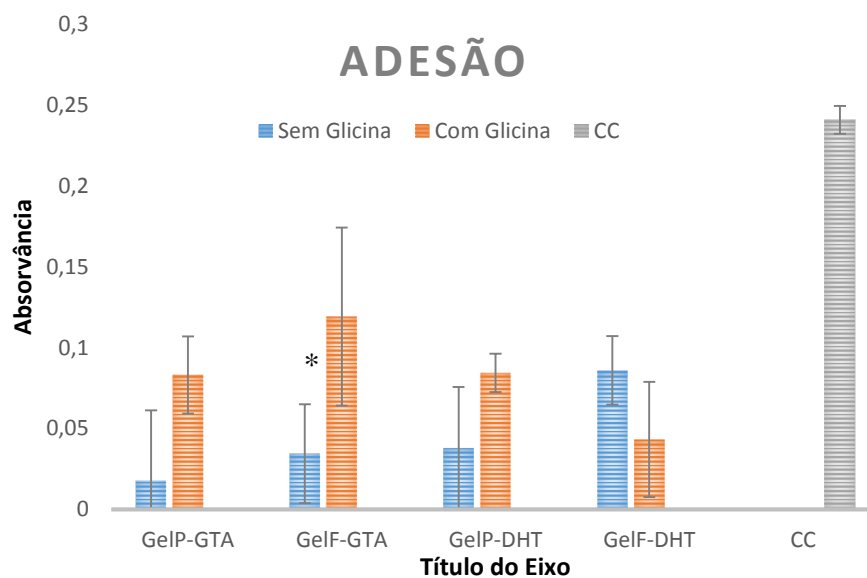


Figura 4.26 - Representação gráfica da relação entre o tratamento das matrizes com glicina e sem glicina e o crescimento celular ao fim de 24 horas (Adesão). * Valores com variação estatística significante: $p(\text{GelF-GTA})=0.0099$.

Comparando com a leitura efetuada após a adesão, a leitura efetuada no 2º dia (Figura 4.27) permitiu observar que houve um crescimento moderado das células.

As células semeadas nos poços de GelF-DHTG tiveram uma taxa de mortalidade superior ao crescimento do 1º para o 2º dia. Para além disto os poços com GelF-GTA e GelF-GTAG apresentaram uma significativa variação estatística.

2º DIA

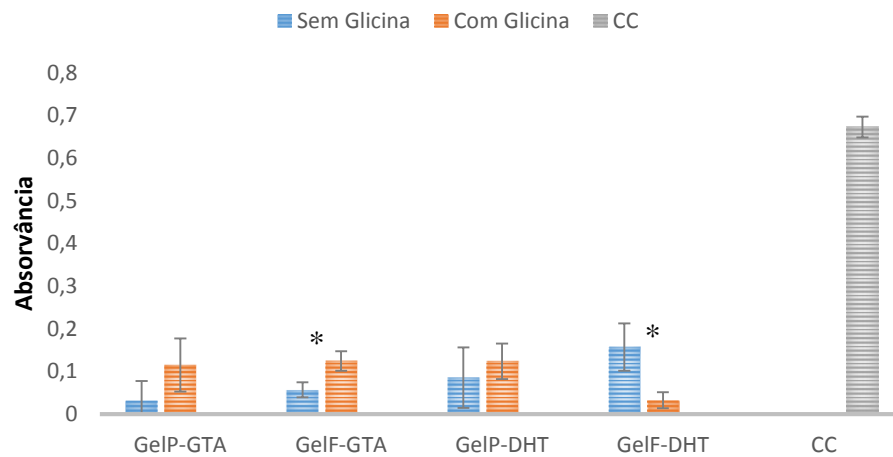


Figura 4.27 - Representação gráfica da relação entre o tratamento das matrizes com glicina e sem glicina e o crescimento celular ao fim de 48 horas. * Valores com variação estatística significativa: $p(\text{GeIF-GTA})= 0.0024$; $p(\text{GeIF-DHT})=0.0285$.

Nas restantes leituras de absorvância efetuadas pode-se observar que existiram diferenças estatísticas significativas entre as matrizes tratadas com e sem glicina, nomeadamente do caso das GeIF-GTA e GeIF-GTAG, e GeIF-DHT e GeIF-DHTG. Nestes casos foi aplicado o teste t-Student e verificou-se de facto que as diferenças possuíam significância estatística. Isto pode ter ocorrido por várias razões. O processo de prender as matrizes à anilha de teflon é importante pois se as matrizes não ficarem bem fixas podem ser aspiradas no processo de lavagem dos poços. Em alguns dos poços as matrizes deixaram de estar esticadas o que pode explicar tanto a taxa de crescimento mais baixa, do 2º para o 3º dia, como as diferenças nas leituras das absorvâncias entre as réplicas encontradas. Para além de poder alterar a morfologia da matriz, o processo de aspiração pode ter “sugado” células dos poços. Embora a aspiração tenha sido sempre feita na mesma área de todos os poços, os diferentes poços poderiam ter as populações celulares concentradas em zonas diferentes. Depois do processo de aspiração de meio ou PBS as células ficam expostas. É importante ser célere neste passo para não deixar secar as células evitando que elas morram.

3º DIA

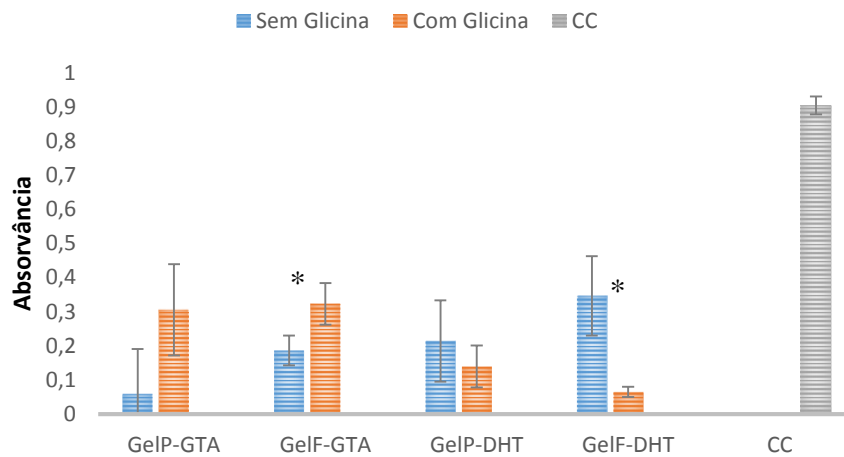


Figura 4.28 - Representação gráfica da relação entre o tratamento das matrizes com glicina e sem glicina e o crescimento celular ao fim de 72 horas. * Valores com variação estatística significativa: $p(\text{GelF-GTA})= 0.0120$; $p(\text{GelF-DHT})=0.0239$.

As células semeadas nas matrizes de GelP-DHT sofreram uma queda significativa no crescimento entre o 2º e o 3 dia de cultura Figura 4.28. Isto pode ser explicado por um controlo não eficiente de um dos passos referidos anteriormente, nomeadamente, o tempo que as células podem ter ficado “secas” pode ter sido determinante para esta quebra de crescimento.

Para além de repetir as condições anteriores adicionaram-se duas novas condições: matrizes de porco alinhadas e tratadas por DHT e com GTA. Na Figura 4.29 e Figura 4.30 é possível observar tanto o citoesqueleto como os núcleos das células nas matrizes de gelatina de porco alinhadas e desalinhas respetivamente.

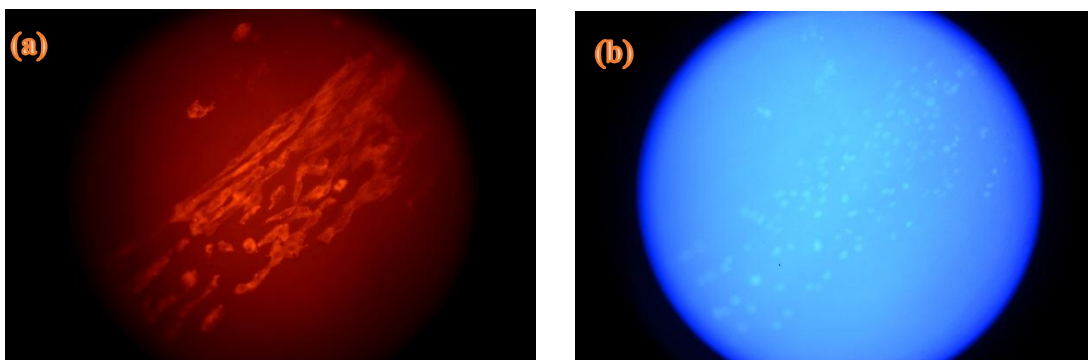


Figura 4.29 – Marcação por faloidina do citoesqueleto (a) e marcação DAPI dos núcleos das células (b) de uma matriz alinhada de gelatina de porco tratada com DHT por 48 horas.

É possível observar que de uma forma geral o citoesqueleto, no caso da matriz alinhada (Figura 4.29 (a)), forma-se segundo a orientação das fibras da matriz. Na Figura 4.29 (b) pode-se observar que as células, de facto, proliferaram segundo a orientação das fibras e alguns dos núcleos adquirem mesmo uma forma oval segundo a direção das fibras. O efeito do alinhamento torna-se mais evidente quando se comparam estas imagens à Figura 4.30 (a) e Figura 4.30 (b). Neste caso a proliferação celular deu-se de forma completamente aleatória.

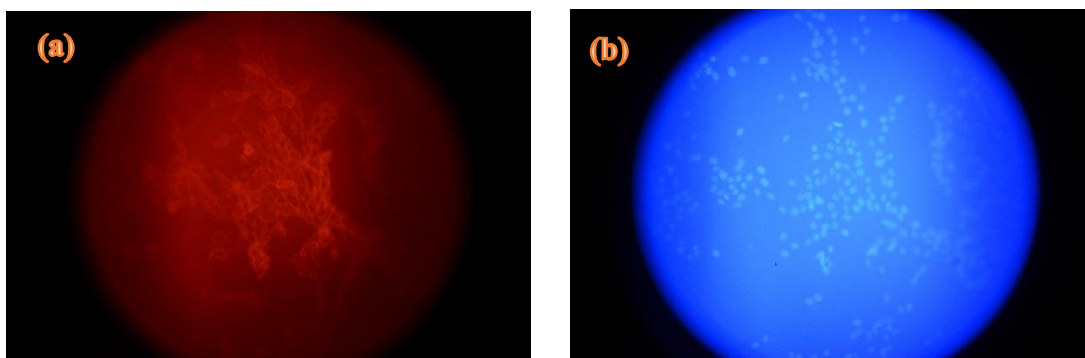


Figura 4.30 - Marcação por faloidina do citoesqueleto (a) e marcação DAPI dos núcleos das células (b) de uma matriz desalinhada de gelatina de porco tratada com DHT por 48 horas.

Capítulo 5 - Conclusões Finais e Perspetivas Futuras

A gelatina é um material a ter em conta em engenharia de tecidos devido às suas características em termos de composição de aminoácidos. A presença de sequências RGD na sua estrutura deverá favorecer o processo de adesão celular. Contudo a sua dissolução em meios aquosos é um obstáculo quando se pondera a sua utilização como matriz de suporte à regeneração de tecidos. Tendo em vista este objetivo, neste trabalho foram utilizados dois tipos de gelatina: gelatina de pele de porco e gelatina de pele de peixe de água fria. Procedeu-se a tratamentos, para tornar matrizes (*scaffolds*) destes materiais estáveis em meios aquosos e averiguou-se a interação de células com as matrizes estabilizadas.

A técnica utilizada para a produção dos *scaffolds* foi a electrofiação de soluções de gelatina dissolvidas numa solução de 90 % AcOH em água. Para uma mesma concentração das soluções poliméricas é perceptível que a gelatina de porco tem uma viscosidade superior.

Utilizando soluções com concentrações de 16% (m/m) e 25% (m/m) de gelatina de porco e gelatina de peixe, respetivamente, conseguiu-se com sucesso obter matrizes de fibras submicrométricas através do processo de electrofiação. Na literatura é possível encontrar trabalhos onde foram electrofiados vários tipos de gelatina por vezes misturada com outros polímeros, tal como o PCL [11].

A reticulação das matrizes, com o objetivo de as estabilizar, foi levada a cabo utilizando o processo físico DHT e o processo químico promovido pela exposição a vapor de GTA. Verificou-se que as matrizes de gelatina de porco reticulavam com uma maior facilidade independentemente do processo. Isto pode estar relacionado com uma maior presença de grupos reativos, como o grupo NH₂, o que foi confirmado pela quantificação de aminoácidos por ensaios com ninidrina. Este teste permitiu identificar um grau de reticulação de cerca de 80% para a gelatina de porco exposta a vapor de GTA por 4h (80% de grupos NH₂ expostos envolvidos na reticulação).

Estudos de perda de massa mostraram que a reticulação por GTA é mais eficaz num curto espaço de tempo do que a reticulação por DHT. Foram selecionadas condições de reticulação para ambos os processos que reduzem as perdas de massa a cerca de 10%.

Um estudo do grau de inchamento das matrizes mostrou a elevada capacidade de absorção de água num curto espaço de tempo destas matrizes de natureza hidrofílica. No entanto, é preciso ressaltar que ocorre alguma perda de massa da matriz durante o processo de absorção de água.

Os estudos de tração mecânica conduzidos nas matrizes hidratadas permitiram encontrar algumas diferenças mecânicas entre as várias matrizes estudadas. No entanto, deve ser efetuado um estudo mais exaustivo de forma a colmatar algumas dificuldades encontradas como a manutenção da matriz com uma mesma hidratação. É no entanto de salientar que as matrizes reticuladas hidratadas possuem melhores propriedades mecânicas (módulo elástico e tração à rutura) do que as matrizes secas.

Neste trabalho, foram efetuadas culturas de dois tipos de células: HFFF2 (fibroblastos de pele humana) e células Vero (epiteliais de rim de macaco). Em ambos os casos, as matrizes reticuladas com vapor de GTA e por DHT apresentaram adesões relativamente ao controle baixas. Isto pode estar a ser sobrevalorizado pela diluição do teste colorimétrico usado pelo meio retido pelas matrizes. Para além da fraca adesão, na cultura de células HFFF2 houve uma queda do número de células do primeiro para o terceiro dia de cultura o que pode ter estado relacionado com a aspiração das mesmas durante as mudanças de meio. Na cultura de células Vero avaliou-se a citotoxicidade dos extratos das matrizes. Não foram encontrados efeitos tóxicos dos extratos.

É sabido que matrizes reticuladas com GTA podem apresentar citotoxicidade associada a este agente reticulante. Os baixos valores de população celular podem estar associados a este efeito. Assim, considerou-se o tratamento das matrizes com uma solução de glicina por forma a eliminar a presença de grupos aldeído não reagidos. As células Vero apresentaram um crescimento inicial muito lento nas matrizes não tratadas quando comparado com o crescimento nas matrizes semelhantes tratadas com glicina, ou mesmo das matrizes reticuladas com DHT. Para além disto foi também possível observar que as matrizes que sofreram tratamento apresentaram taxas de crescimento tendencialmente mais elevadas.

Com este trabalho concluiu-se que é possível efetuar com sucesso culturas de células HFFF2 e células Vero, em matrizes de gelatina de porco e peixe reticuladas tanto por DHT como por vapor de GTA, mas uma melhor avaliação comparativa da repercussão do tipo de processo de reticulação e do tipo de gelatina utilizada na adesão e proliferação celulares carece de um estudo mais aprofundado.

Para além de matrizes de fibras desalinhadas foram produzidas matrizes de fibras alinhadas devido ao movimento de rotação rápida de um coletor cilíndrico. Verificou-se que o alinhamento das matrizes pode influenciar a morfologia das células. Numa análise futura seria interessante observar o comportamento de outros tipos de células nestas matrizes com fibras paralelamente alinhadas. Por exemplo, observar os efeitos da composição em células neuronais, nomeadamente na sua migração e no desenvolvimento e orientação de extensões dendríticas.

Bibliografía

- [1] Z.-M. Huang, Y. Zhang, S. Ramakrishna, and C. Lim, “Electrospinning and mechanical characterization of gelatin nanofibers,” *Polymer (Guildf)*, vol. 45, no. 15, pp. 5361–5368, Jul. 2004.
- [2] J. Venugopal, S. Low, A. T. Choon, and S. Ramakrishna, “Interaction of Cells and Nanofiber Scaffolds in Tissue Engineering,” pp. 34–48, 2007.
- [3] J. Choi, “Biodegradable Polymer Scaffolds with Well-Defined Interconnected Spherical Pore Network,” vol. 7, no. 1, 2001.
- [4] “Cell – Matrix interactions , the role of fibronectin and integrins . A survey ^le de la fibronectine et des inte,” *Pathol. Biol.*, vol. 60, no. 1, pp. 15–19, 2012.
- [5] H. Chang and Y. Wang, “Cell Responses to Surface and Architecture of Tissue Engineering Scaffolds,” 2006.
- [6] M. Lampin, Warocquier-Clérout, C. Legris, M. Degrange, and M. F. Sigot-Luizard, “Correlation between substratum roughness and wettability, cell adhesion, and cell migration.,” *J. Biomed. Mater. Res.*, vol. 36, no. 1, pp. 99–108, Jul. 1997.
- [7] B. Alberts, D. Bray, J. Lewis, and M. Raff, “Molecular biology of the cell, 1994,” in *Garland, New York, Fifth.*, Garland Science, 2008, p. 1601.
- [8] M. F. Brizzi, G. Tarone, and P. Defilippi, “Extracellular matrix, integrins, and growth factors as tailors of the stem cell niche,” *Curr. Opin. Cell Biol.*, vol. 24, no. 5, pp. 645–651, Oct. 2012.
- [9] A. J. García, “Get a grip: integrins in cell-biomaterial interactions.,” *Biomaterials*, vol. 26, no. 36, pp. 7525–7529, Dec. 2005.
- [10] S. M. Albelda and C. a Buck, “Integrins and other cell adhesion molecules.,” *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, vol. 4, no. 11, pp. 2868–80, Aug-1990.
- [11] Y. Z. Zhang, J. Venugopal, Z.-M. Huang, C. T. Lim, and S. Ramakrishna, “Crosslinking of the electrospun gelatin nanofibers,” *Polymer (Guildf)*, vol. 47, no. 8, pp. 2911–2917, Apr. 2006.
- [12] a. a. Karim and R. Bhat, “Fish gelatin: properties, challenges, and prospects as an alternative to mammalian gelatins,” *Food Hydrocoll.*, vol. 23, no. 3, pp. 563–576, May 2009.
- [13] M. C. Gómez-Guillén, M. Pérez-Mateos, J. Gómez-Estaca, E. López-Caballero, B. Giménez, and P. Montero, “Fish gelatin: a renewable material for developing

- active biodegradable films,” *Trends Food Sci. Technol.*, vol. 20, no. 1, pp. 3–16, Jan. 2009.
- [14] S. Young, M. Wong, Y. Tabata, and A. G. Mikos, “Gelatin as a delivery vehicle for the controlled release of bioactive molecules,” *J. Control. Release*, vol. 109, no. 1–3, pp. 256–74, Dec. 2005.
- [15] P. Montero, “Physico-chemical and film-forming properties of bovine-hide and tuna-skin gelatin : A comparative study,” *J. Food Eng.*, vol. 90, no. 4, pp. 480–486, 2009.
- [16] P. M. Gilsean, “Rheological characterisation of gelatins from mammalian and marine sources,” vol. 14, pp. 191–195, 2000.
- [17] B. Giménez and M. P. Montero, “Food Hydrocolloids Functional and bioactive properties of collagen and gelatin from alternative sources : A review,” *Food Hydrocoll.*, vol. 25, no. 8, pp. 1813–1827, 2011.
- [18] F. Badii and N. K. Howell, “Fish gelatin : Structure , gelling properties and interaction with egg albumen proteins,” vol. 20, pp. 630–640, 2006.
- [19] E. Khor, “Methods for the treatment of collagenous tissues for bioprostheses.,” *Biomaterials*, vol. 18, no. 2, pp. 95–105, 1997.
- [20] a Bigi, G. Cojazzi, S. Panzavolta, K. Rubini, and N. Roveri, “Mechanical and thermal properties of gelatin films at different degrees of glutaraldehyde crosslinking,” *Biomaterials*, vol. 22, no. 8, pp. 763–8, Apr. 2001.
- [21] J. Ratanavaraporn, R. Rangkupan, H. Jeeratawatchai, S. Kanokpanont, and S. Damrongsakkul, “Influences of physical and chemical crosslinking techniques on electrospun type A and B gelatin fiber mats,” *Int. J. Biol. Macromol.*, vol. 47, no. 4, pp. 431–438, Nov. 2010.
- [22] M. Azami, F. Moztafzadeh, and M. Tahriri, “Preparation, characterization and mechanical properties of controlled porous gelatin/hydroxyapatite nanocomposite through layer solvent casting combined with freeze-drying and lamination techniques,” *J. Porous Mater.*, vol. 17, no. 3, pp. 313–320, May 2009.
- [23] K. Sisson, C. Zhang, M. C. Farach-Carson, D. B. Chase, and J. F. Rabolt, “Evaluation of cross-linking methods for electrospun gelatin on cell growth and viability,” *Biomacromolecules*, vol. 10, no. 7, pp. 1675–1680, 2009.
- [24] M. G. Haugh, M. J. Jaasma, and F. J. O’Brien, “The effect of dehydrothermal treatment on the mechanical and structural properties of collagen-GAG scaffolds,” *J. Biomed. Mater. Res. A*, vol. 89, no. 2, pp. 363–9, May 2009.
- [25] N. Bhardwaj and S. C. Kundu, “Electrospinning: a fascinating fiber fabrication technique,” *Biotechnol. Adv.*, vol. 28, no. 3, pp. 325–47, 2010.

- [26] B. D. Li and Y. Xia, "Electrospinning of Nanofibers : Reinventing the Wheel ?**," no. 14, pp. 1151–1170, 2004.
- [27] T. Subbiah, G. S. Bhat, R. W. Tock, S. Parameswaran, and S. S. Ramkumar, "Electrospinning of Nanofibers," 2004.
- [28] S. Zhong, W. E. Teo, X. Zhu, R. W. Beuerman, S. Ramakrishna, and L. Y. L. Yung, "An aligned nanofibrous collagen scaffold by electrospinning and its effects on in vitro fibroblast culture.," *J. Biomed. Mater. Res. A*, vol. 79, no. 3, pp. 456–63, Dec. 2006.
- [29] W.-E. Teo, W. He, and S. Ramakrishna, "Electrospun scaffold tailored for tissue-specific extracellular matrix.," *Biotechnol. J.*, vol. 1, no. 9, pp. 918–29, Sep. 2006.
- [30] S. Sun, Y. Lin, Y. Weng, and M. Chen, "ARTICLE IN PRESS Efficiency improvements on ninhydrin method for amino acid quantification," vol. 19, pp. 112–117, 2006.
- [31] S. Moore, "SUBSTANCES OF LOW MOLECULAR WEIGHT : Amino Acid Analysis : Aqueous Dimethyl Sulfoxide As Solvent for the Ninhydrin Reaction Amino Acid Analysis : Aqueous Dimethyl Sulfoxide As Solvent for the Ninhydrin Reaction," 1968.
- [32] S. Tsai, H. Liou, C. Lin, K. Kuo, Y. Hung, R. Weng, and F. Hsu, "MG63 Osteoblast-Like Cells Exhibit Different Behavior when Grown on Electrospun Collagen Matrix versus Electrospun Gelatin Matrix," vol. 7, no. 2, pp. 1–11, 2012.
- [33] S. R. Gomes, G. Rodrigues, G. G. Martins, C. M. R. Henriques, and J. C. Silva, "In vitro evaluation of crosslinked electrospun fish gelatin scaffolds.," *Mater. Sci. Eng. C. Mater. Biol. Appl.*, vol. 33, no. 3, pp. 1219–27, 2013.
- [34] B.-S. Chiou, R. J. Avena-Bustillos, P. J. Bechtel, H. Jafri, R. Narayan, S. H. Imam, G. M. Glenn, and W. J. Orts, "Cold water fish gelatin films: Effects of cross-linking on thermal, mechanical, barrier, and biodegradation properties," *Eur. Polym. J.*, vol. 44, no. 11, pp. 3748–3753, Nov. 2008.
- [35] J. Kong and S. Yu, "Fourier Transform Infrared Spectroscopic Analysis of Protein Secondary Structures Protein FTIR Data Analysis and Band Assignment," vol. 39, no. 8, pp. 549–559, 2007.
- [36] T.-H. Nguyen, "Fabrication and characterization of cross-linked gelatin electrospun nano-fibers," *J. Biomed. Sci. Eng.*, vol. 03, no. 12, pp. 1117–1124, 2010.
- [37] G. Eisenbrand, B. Pool-Zobel, V. Baker, M. Balls, B. J. Blaauboer, a Boobis, a Carere, S. Kevekordes, J.-C. Lhuguenot, R. Pieters, and J. Kleiner, "Methods of in vitro toxicology.," *Food Chem. Toxicol.*, vol. 40, no. 2–3, pp. 193–236, 2002.

Anexos

Apêndice A: Esterilização das matrizes e sementeira nos poços das placas

Esterilização:

1. Imersão das matrizes em etanol 70%, nos poços ou em caixas de Petri, durante 30 min;
2. Três lavagens consecutivas com PBS
3. Ter o cuidado de não deixar secar as matrizes.

Nota 1: Em cada lavagem realizada na esterilização foram adicionados cerca de 250 μ L de solução e cerca de 2 ml no caso das caixas de Petri. Passados alguns minutos aspirar cuidadosamente.

Sementeira das células nos poços:

1. Observar as células no microscópio ótico;
2. Lavar com 5 ml de PBS;
3. Adição de 500 μ L de Tripsina;
4. Estufa incubadora durante 5 minutos a 37°;
5. Contagem de células;
6. Diluir a suspensão celular de forma a obter a quantidade pretendida de células para semear os poços.
7. Colocar a quantidade de células pretendida nos poços.

Nota: No processo de pipetagem é crucial não tocar com a ponta das pipetas no chão da caixa visto que é onde as células estão aderidas. Após soltar as células com a Tripsina todos os passos seguintes foram levados a cabo com ressuspensões na ponta da pipeta para garantir uma pipetagem uniforme.

Apêndice B: Leitura das absorvâncias dos poços de cultura

Antes de ler as absorvâncias nos poços de cultura resultante do processamento da resazurina por parte das células é preciso criar a diluição de resazurina no meio de cultura. Primeiro estima-se a quantidade de meio necessária para colocar em todos os poços. Em seguida coloca-se 10% dessa quantidade de resazurina no meio e obtém-se a diluição pretendida.

Para proceder à leitura da absorvância nos poços é necessário recorrer aos seguintes passos:

1. Retirar o meio cuidadosamente dos poços de cultura, sem tocar com a ponta da pipeta no fundo;
2. Colocar 250 μ l de solução diluída de resazurina, em meio de cultura, em cada poço de teflon e 500 μ l nos poços da placa;
3. Colocar a placa na incubadora, a 37°, durante duas horas;
4. Retirar 180 μ l de solução de resazurina processada pelas células e colocar nos poços das placas de 96 poços;
5. Ler a absorvância a 570 e 600 nm no leitor de placas;
6. Lavar os poços da placa de cultura com PBS e colocar 250 μ l de meio de cultura em cada poço de teflon e 500 μ l nos poços da placa.

Apêndice C: Ensaio com Ninidrina

Em primeiro lugar é necessário preparar as diluições que se pretende utilizar a partir de uma solução de gelatina de concentração conhecida.

Preparação da solução tampão (4M):

- Adicionar 12,06 g Ac-Na a 30 ml de água ultra pura;
- Ajustar o pH da solução para 5.2 com Acido acético (aprox. 3 ml);
- Ajustar o volume da solução para 50 ml com água ultra pura.

Preparação da Solução de ninidrina (preparar apenas no dia da utilização e trabalhar sempre na hote):

- Dissolver 0.4g de ninidrina em 15 ml de DMSO;
- Completar a solução com 5 ml de solução tampão;
- Fechar a solução num frasco escuro.

Ensaio:

- Adicionar 1ml de solução de gelatina a 0,75ml de solução de ninidrina;
- Aquecer as soluções a uma temperatura entre 80-100° durante 30 min;
- Arrefecer as soluções;
- Adicionar 1ml de solução estabilizadora (50% etanol em água ultra pura).