

FIBERS

STENTS

PCL

Electrospinning

Photopolymerization

HYDROGELS  
COMPOSITES

GELATINE

Rita Isabel Lopes Vaz

PREPARAÇÃO DE *SCAFFOLDS* POR COMBINAÇÃO DAS  
TÉCNICAS DE FOTOPOLIMERIZAÇÃO E *ELECTROSPINNING*  
PARA ENGENHARIA DE TECIDOS

Dissertação de Mestrado Integrado em Engenharia Química, especialização em Biosistemas, orientada pela Professora Doutora Maria Margarida Lopes Figueiredo e co-orientada pela Doutora Paula Cristina Nunes Ferreira Calvino, e apresentada ao Departamento de Engenharia Química da Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade de Coimbra.

Coimbra 2016



UNIVERSIDADE DE COIMBRA



Rita Isabel Lopes Vaz

PREPARAÇÃO DE *SCAFFOLDS* POR COMBINAÇÃO DAS TÉCNICAS DE FOTOPOLIMERIZAÇÃO  
E *ELECTROSPINNING* PARA ENGENHARIA DE TECIDOS

Dissertação de Mestrado Integrado em Engenharia Química, especialização em Biosistemas, apresentada ao  
Departamento de Engenharia Química da Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade de Coimbra.

**Supervisores:**

Professora Doutora Maria Margarida Lopes Figueiredo

Doutora Paula Cristina Nunes Ferreira Calvino

**Instituições:**

Departamento de Engenharia Química

Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade de Coimbra

Coimbra, 2016



UNIVERSIDADE DE COIMBRA



## Agradecimentos

A todos aqueles que contribuíram para a realização deste trabalho, diretamente ou indiretamente os meus mais sinceros agradecimentos.

Quero começar por agradecer à Professora Doutora Maria Margarida Figueiredo, minha orientadora, por toda a compreensão demonstrada com a escrita e apresentação da tese, e por toda a ajuda que me deu na orientação.

Quero fazer um agradecimento especial à Doutora Patrícia Coimbra, por toda a formação que me deu em laboratório, pela ajuda incansável e inteira disponibilidade, pelos seus conhecimentos que me transmitiu, onde graças ao seu contributo me guiou para todo este trabalho. Obrigada ainda pela sua simpatia e simplicidade que sempre me foi transmitida.

Quero agradecer à Doutora Paula Ferreira, por toda a ajuda, formação e disponibilidade que me acompanhou ao longo do trabalho de dissertação, pelas ajudas bastante relevantes que me deu, pela amizade que me foi transmitida, simpatia, boa disposição, força e otimismo que sempre me demonstrou. Quero também agradecer à Doutora Patrícia Alves, pela sua simpatia, por toda a ajuda na realização dos testes de hemocompatibilidade, pela partilha dos protocolos e por todos os conselhos que me prestou. Agradeço também à Engenheira Maria João por todo o esforço e trabalho realizado nas análises de TGA. Quero ainda deixar uma palavra de apreço à equipa de investigação de polímeros pelo companheirismo que me foi transmitido ao longo de todo o trabalho laboratorial.

Quero agradecer ao Doutor Ilídio Correia, que orientou os testes de biocompatibilidade na Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade da Beira, assim como ao Tiago Correia, e ao Engenheiro António Fonseca pelas imagens SEM que foram obtidas no IPN.

Quero ainda agradecer a todos os colegas que partilharam comigo o laboratório, pelo espírito de equipa e pela boa disposição ao longo de toda a minha atividade laboratorial. Um agradecimento em especial à Stacy Morgado, Cristiana Sousa, Tânia Morgado pela amizade e companheirismo. Agradeço também ao Sr. Manuel, Sr. José e D. Dulce por todo o apoio que sempre me disponibilizaram em laboratório, pela paciência e ajuda incansável. À Sandra por todo o apoio, amizade e paciência.

Quero agradecer a todos os meus amigos que me acompanharam ao longo do curso e me incentivaram ao longo deste projeto. Em especial quero agradecer à Raquel Marques, Marta Batista, Sílvia Pinão, Pedro Miguel pela enorme amizade demonstrada ao longo destes últimos anos, pelo enorme apoio, paciência, incentivo e por acreditarem em mim, a vocês o meu muito obrigado. Quero agradecer em particular ao João Miguel por toda a ajuda, paciência, dedicação, sempre com palavras de incentivo e encorajamento, sempre acreditando em mim, obrigada pelo teu apoio que foi fundamental.

Finalmente, quero agradecer aos meus pais, que me permitiram chegar onde cheguei, por toda a ajuda e compreensão, pelo apoio fundamental e incansável. Quero agradecer à minha irmã, pelo apoio e boa disposição que me dá, mesmo à distância. Quero agradecer em especial aos meus avós que são os meus pilares, que sempre me apoiaram e educaram com palavras de incentivo e com um carinho especial que sempre me foi transmitido.

A todos, o meu sincero obrigado,

Rita Isabel Vaz

## RESUMO

*Stents* vasculares são dispositivos biomédicos de valor incontestável no tratamento e regeneração de artérias ou veias que ficaram obstruídas ou enfraquecidas. Ao longo dos últimos anos, muito se tem vindo a desenvolver procurando um equilíbrio entre a estabilidade mecânica, biocompatibilidade e o recurso à ação farmacológica de modo a que se combatam as trombozes/embolias vasculares e a ocorrência de complicações como a reestenose após implantes. Atualmente existe no mercado uma elevada variedade de *stents* vasculares de diversos materiais, desde metálicos a polímeros biodegradáveis com incorporação, ou não, de um fármaco. Os *stents* metálicos foram os primeiros a serem comercializados, contudo têm problemas inerentes de inflamação ou mesmo incompatibilidade com o organismo dada a durabilidade de aplicação. Por outro lado, os *stents* vasculares biodegradáveis estão cada vez mais em ascensão, apesar das propriedades mecânicas e sua durabilidade serem ainda um desafio. Polímeros biodegradáveis, sintéticos ou naturais, com grupos terminais fotoreticuláveis têm-se demonstrado promissores e úteis em aplicações *in situ*. Dois dos polímeros mais usados na área biomédica, concretamente na preparação de hidrogéis e *scaffolds*, são a gelatina e a policaprolactona, respetivamente. A sua mistura pode ser explorada na construção de *stents* versáteis, com melhores propriedades biológicas para tecidos vasculares ao mesmo tempo que exibem boas propriedades mecânicas.

Com esta dissertação pretendeu-se produzir *scaffolds* por combinação de estratégias de fotoreticulação e *electrospinning* usando duas abordagens de síntese diferentes, com vista à utilização dos materiais finais como *stents* vasculares. Em ambas as abordagens de síntese usou-se a gelatina (polímero natural) e a PCL (polímero sintético). A gelatina foi inicialmente funcionalizada com anidrido metacrílico para a formação do hidrogel Gel-MA. Na primeira abordagem, as fibras de PCL foram produzidas por *electrospinning* sendo de seguida revestidas por hidrogéis de diferentes composições (tendo por base a Gel-MA). Na segunda abordagem, fibras foram preparadas a partir de soluções distintas de PCL e Gel-MA, que foram misturadas e induzidas no *electrospinning*. Desta forma obteve-se um compósito fibroso. Em ambos os processos, sujeitaram-se os materiais a irradiação UV para garantir a adequada reticulação da gelatina, usando o Irgacure® 2959

como fotoiniciador. Para os *scaffolds* produzidos foram avaliadas propriedades químicas, físicas, térmicas e biológicas.

A análise de ATR-FTIR permitiu observar as ligações características de cada polímero em ambos os *scaffolds*. Na técnica SEM verificou-se que a disposição das fibras nos *scaffolds* era aleatória e no caso dos *scaffolds* revestidos com hidrogel era notório o efeito desse revestimento. A análise TGA mostrou que os *scaffolds* eram termicamente estáveis. Quando incubados em uma solução tampão fosfato (PBS) durante 28 dias, os *scaffolds* revestidos com Gel-MA 10% foram os que apresentaram maior diferença de perda de hidrogel. Nos ensaios de hemólise, por contacto direto, só os *scaffolds* compósitos mostraram valores bastante satisfatórios, revelando-se não hemolíticos. Relativamente aos *scaffolds* revestidos estes só exibiram esse carácter após uma lavagem prévia do material com PBS. Todavia, os *scaffolds* apresentaram um carácter trombogénico, o que não é favorável para a aplicação pretendida. Os valores de viabilidade celular, após contacto dos materiais com células endoteliais circulantes foram bastante satisfatórios para os *scaffolds* compósitos, porém, os *scaffolds* revestidos de hidrogel com macrómeros apresentaram baixa viabilidade celular. Recomenda-se, neste caso, novos estudos de biocompatibilidade mas também um esforço de síntese para perceber o que pode ser modificado nas formulações. No estudo preliminar de libertação de fármaco para os *scaffolds* revestidos, obtiveram-se perfis de libertação interessantes tendo em conta a aplicação.

Face aos resultados alcançados, pode-se concluir que os *scaffolds* das duas abordagens apresentam características promissoras para utilização como *stents* vasculares, podendo ser importantes ferramentas em Engenharia de Tecidos.

**PALAVRAS-CHAVE:** *Stents* vasculares, gelatina, policaprolactona, fotoreticulação, *electrospinning*, hidrogel, fibras, biodegradabilidade, biocompatibilidade.

## ABSTRACT

Vascular stents are biomedical devices of an unquestionable value in the treatment and regeneration of injured and weakened arteries or veins. Over the years, the development of these materials with promising performances requires a thorough understanding and a stringent balance between mechanical stability, biocompatibility and pharmacological activity, fighting against thrombosis, vascular embolism episodes or the possibility of several complications after implant, such as restenosis. Nowadays in the market there are several options of vascular stents, produced from different metals or biodegradable polymers, with or without entrapped drugs. The metallic stents were the first commercially available, nevertheless with inherent issues like inflammations during application or even incompatibility in the body after long usage. On the other hand, biodegradable vascular stents are increasingly in the field, but their mechanical properties and durability remains a challenge. Biodegradable polymers, either synthetic or natural, with photocurable end-groups have proved to be promising and useful for in situ applications. Two of the most commonly used polymers in the biomedical field, particularly in hydrogels and scaffolds development, are gelatine and polycaprolactone (PCL), respectively. Their mixtures may be used and tuned to produce flexible and robust stents with improved biological properties for vascular tissues while exhibiting good mechanical properties.

This work aimed at exploring the production of several scaffolds by combination of electrospinning and photocrosslinking strategies. Two different approaches in material synthesis were tested to obtain new materials to be used and characterized as vascular stents. In both synthesis approaches, gelatine (natural polymer) and PCL (synthetic polymer) were used. The gelatine was firstly functionalized with carbon-carbon double bonds by methacrylic anhydride, leading to a Gel-MA hydrogel. In the first approach, PCL fibers were produced by electrospinning and then coated with several hydrogels of different compositions based on Gel-MA. In the second approach, fibers were prepared from diverse PCL and Gel-MA solutions and finally mixed and induced in electrospinning apparatus. In this case, fibrous composites were obtained. In both strategies, the final materials were subjected to UV irradiation, using Irgacure<sup>®</sup> 2959 as

the radical photoinitiator. In order to evaluate materials feasibility for the intended application, chemical, physical, thermal and biological properties were assessed.

The ATR-FTIR analysis allowed a follow up of each polymer bonds in both scaffolds. The SEM technique confirmed a random arrangement of the fibers in the scaffolds, and in the case of the coated materials, the effect of hydrogels coating was noticeably detected. TGA analysis showed that all materials were thermally stable. When the samples were incubated in phosphate buffer solution for 28 days, the scaffolds coated with Gel-MA 10% presented the highest mass loss. In the haemolysis assays, by direct contact, just composite scaffolds exhibited good values of haemolysis percentage, revealing a non-haemolytic nature. The coated scaffolds only presented a non-haemolytic character after washing their by-products with phosphate buffer solution. However, all scaffolds presented a thrombogenic nature, which is not favourable for the purposed application. The results of cell viability studies, after direct contact of the materials with circulating endothelial cells, were quite acceptable for the composite samples. Nonetheless, the coated scaffolds with hydrogels showed poor cell viability. In this case, further biocompatibility studies are recommended in the future but also a research effort must be accomplished to obtain improved formulations.

In the preliminary assessment of drug release profiles, the overall performance of the coated scaffolds showed potential in the field, according to therapeutic needs.

Altogether, characterization results showed that the produced materials presented a set of properties suitable for Biomedical and Tissue Engineering applications, particularly as vascular stents.

**KEYWORDS:** Vascular stents; Gelatine; Polycaprolactone; Photocrosslinking; Electrospinning; Hydrogel; Fibers; Biodegradability; Biocompatibility.

# ÍNDICE

	<b>Pág.</b>
<b>OBJETIVOS E ESTRUTURA DA TESE</b>	1
<b>1. INTRODUÇÃO</b>	3
1.1. Biomateriais e Engenharia de Tecidos	3
1.2. <i>Scaffolds</i>	5
1.3. Polímeros Biodegradáveis de base natural/sintética	7
1.3.1. Polímeros naturais	7
1.3.2. Polímeros sintéticos	8
1.4. Hidrogéis	11
1.4.1. Hidrogéis fotopolimerizáveis	19
1.5. <i>Electrospinning</i>	20
1.5.1. Parâmetros do processo, características das fibras e sua aplicação	22
1.6. Aplicações biomédicas de <i>scaffolds</i> PCL/gelatina	27
1.6.1. Substitutos dérmicos	28
1.6.2. Sistemas para regeneração de tecidos nervosos	28
1.7. Doenças Vasculares – <i>Stents</i> e sistemas vasculares	29
1.7.1. Motivações	29
1.7.2. Estudos realizados	31
1.7.3. Tratamentos e terapêuticas – Incorporação de dexametasona em <i>stents</i>	32

<b>2. OBJETIVOS EXPERIMENTAIS</b>	33
2.1. Abordagem experimental I	34
2.2. Abordagem experimental II	35
<b>3. MATERIAIS E MÉTODOS</b>	37
3.1. Materiais	37
3.2. Preparação das soluções	38
3.2.1. Modificação de Gelatina com Anidrido Metacrílico	38
3.2.2. Preparação dos <i>scaffolds</i> revestidos com hidrogel (Abordagem I)	39
3.2.2.1. Preparação das membranas nanofibras de PCL por <i>electrospinning</i>	39
3.2.2.2. Preparação das soluções precursoras dos hidrogéis	39
3.2.2.3. Construção do <i>scaffold</i> de fibras de PCL revestido com hidrogel fotoreticulável	41
3.2.3. Preparação dos <i>scaffolds</i> compósitos PCL/Gel-MA (Abordagem II)	42
3.2.3.1. Preparação das fibras compósitas de PCL/Gel-MA	42
3.2.3.2. Preparação dos <i>scaffolds</i> compósitos PCL/Gel-MA fotoreticuláveis	43
3.3. Caracterização	43
3.3.1. Espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier com reflexão total atenuada (ATR-FTIR)	44
3.3.2. Morfologia das fibras por microscopia eletrónica de varrimento (SEM)	46
3.3.3. Determinação de ângulos de contacto dinâmicos	45
3.3.4. Propriedades térmicas – Análise Termogravimétrica (TGA)	45

3.3.5. Degradação hidrolítica	45
3.3.5.1. Microscopia eletrônica de varrimento (SEM)	46
3.3.5.2. Determinação da perda de massa (%) por degradação hidrolítica	46
3.3.6. Hemocompatibilidade	46
3.3.6.1. Avaliação da trombogenicidade	47
3.3.6.2. Determinação do índice hemolítico	48
3.3.7. Biocompatibilidade	49
3.3.7.1. Cultura celular das células endoteliais circulantes (CEC) na presença dos <i>scaffolds</i>	49
3.3.7.2. Estudo da viabilidade celular na presença dos <i>scaffolds</i>	50
3.3.8. Liberação Controlada de Fármaco	50
<b>4. RESULTADOS E DISCUSSÃO</b>	<b>53</b>
4.1. Preparação dos <i>Scaffolds</i>	53
4.1.1. Produção dos <i>scaffolds</i> revestidos (I) e dos <i>scaffolds</i> compósitos (II)	53
4.2. Caracterização química por ATR-FTIR	56
4.2.1. ATR-FTIR – <i>Scaffolds</i> revestidos (I)	56
4.2.2. ATR-FTIR – <i>Scaffolds</i> compósitos (II)	60
4.3. Morfologia das fibras por microscopia eletrônica de varrimento (SEM)	63
4.3.1. <i>Scaffolds</i> revestidos (I)	63
4.3.2. <i>Scaffolds</i> compósitos (II)	67

4.4. Determinação dos ângulos de contacto dinâmico	69
4.4.1. <i>Scaffolds</i> revestidos (I)	69
4.4.2. <i>Scaffolds</i> compósitos (II)	71
4.5. Propriedades térmicas – Análise Termogravimétrica (TGA)	73
4.5.1. <i>Scaffolds</i> revestidos (I)	73
4.5.2. <i>Scaffolds</i> compósitos (II)	77
4.6. Degradação hidrolítica	79
4.6.1. Microscopia eletrónica varrimento (SEM) – <i>Scaffolds</i> revestidos (I)	79
4.6.2. Determinação da perda de massa (%) por degradação hidrolítica – <i>Scaffolds</i> compósitos (II)	83
4.7. Hemocompatibilidade	85
4.7.1. Avaliação da Trombogenicidade	85
4.7.1.1. <i>Scaffolds</i> revestidos (I)	85
4.7.1.2. <i>Scaffolds</i> compósitos (II)	86
4.7.2. Determinação do índice hemolítico	87
4.7.2.1. <i>Scaffolds</i> revestidos (I)	87
4.7.2.2. <i>Scaffolds</i> compósitos (II)	88
4.8. Biocompatibilidade	89
4.8.1. Viabilidade celular – <i>Scaffolds</i> revestidos (I)	89
4.8.2. Viabilidade celular – <i>Scaffolds</i> compósitos (II)	91
4.9. Estudo de libertação da dexametasona	92

<b>5. Conclusões</b>	95
5.1. Conclusões gerais	95
5.2. Perspetivas Futuras	98
<b>Referências Bibliográficas</b>	101
<b>ANEXOS</b>	111
ANEXO A – Tipos de <i>Stents</i> Comerciais	113
ANEXO B – Estrutura Química e algumas considerações dos reagentes utilizados na síntese dos <i>scaffolds</i>	117
ANEXO C – Protocolos dos Ensaios de Hemocompatibilidade	120
ANEXO D – Protocolo da Curva de Calibração da Dexametasona	126

## ÍNDICE DE FIGURAS

	Pág.
<b>Figura 1.1</b> Esquema da montagem experimental do processo convencional de <i>electrospinning</i> , culminando com a formação de uma matriz polimérica fibrosa (polímero em solução).	22
<b>Figura 1.2</b> Sistematização dos parâmetros requeridos para o processo de <i>electrospinning</i> e dos requisitos das fibras obtidas. Relação com aplicações e referência a estudos relevantes (Figuras das fibras retiradas de [61]). Baseado em [57,61,62].	24
<b>Figura 1.3</b> Esquema de montagem experimental de <i>electrospinning</i> combinado com <i>electrospraying</i> de um hidrogel comercial (Heprasil™). Baseado no estudo de Ekaputra et al. [82].	31
<b>Figura 1.4</b> Estrutura química da dexametasona (retirada de <i>Sigma-Aldrich</i> )	32
<b>Figura 2.1</b> Esquema do processo experimental para a produção de <i>scaffolds</i> por combinação de técnicas de <i>electrospinning</i> e fotoreticulação	33
<b>Figura 3.1</b> Representação esquemática da reação de funcionalização da gelatina com MAA (baseado em [34]).	38
<b>Figura 3.2</b> Ilustração do processo de revestimento das fibras de PCL com os hidrogéis de base gelatina preparados. Esta parte do processo antecede a irradiação UV das amostras para reticulação das ligações duplas presentes nos hidrogéis	41
<b>Figura 4.1</b> Metodologias experimentais de síntese dos <i>scaffolds</i> PCL/gelatina por combinação de técnicas de <i>electrospinning</i> e fotoreticulação. Fotografias e aparência visual dos materiais sintetizados.	55
<b>Figura 4.2</b> Espectro de ATR-FTIR da Gel-MA vs Gel-MA fotoreticulada	57
<b>Figura 4.3</b> Espectro de ATR-FTIR das fibras PCL.	58

- Figura 4.4** Espectro ATR-FTIR dos *scaffolds* PCL-Gel-MA de concentração 1 % com as matérias-primas (PCL e Gel-MA). **59**
- Figura 4.5** Espectro ATR-FTIR dos *scaffolds* PCL-Gel-MA de concentração 10 % com as matérias-primas (PCL e Gel-MA). **59**
- Figura 4.6** Espectro ATR-FTIR dos *scaffolds* compósitos PCL/Gel-MA 10% e suas matérias-primas. **61**
- Figura 4.7** Espectro ATR-FTIR dos *scaffolds* compósitos PCL/Gel-MA 15% e suas matérias-primas. **61**
- Figura 4.8** A) B) C) Fotografias de SEM da superfície das fibras de PCL com uma ampliação de 750x, 3500x e 10000x, respetivamente; D) Histograma dos diâmetros das fibras de PCL. **63**
- Figura 4.9** A) B) C) Fotografias de SEM da superfície das fibras de PCL+Gel-MA 1% com uma ampliação de 750x, 3500x e 10000x, respetivamente; D) Histograma dos diâmetros das fibras do scaffold PCL+Gel-MA 1%. **64**
- Figura 4.10** A) B) C) Fotografias de SEM da superfície das fibras de PCL+Gel-MA/PEGMA 1% com uma ampliação de 750x, 3500x e 10000x, respetivamente; D) Histograma dos diâmetros das fibras do scaffold PCL+Gel-MA/PEGMA 1%. **66**
- Figura 4.11** A) B) C) Fotografias de SEM da superfície das fibras de PCL+Gel-MA/PEGMDA 1% com uma ampliação de 750x, 3500x e 10000x, respetivamente; D) Histograma dos diâmetros das fibras do scaffold PCL+Gel-MA /PEGMDA 1%. **65**
- Figura 4.12** Fotografias de SEM da superfície do *scaffold* PCL+Gel-MA 10% a uma ampliação de 750 x. **65**
- Figura 4.13** A) B) C) Fotografias de SEM da superfície do *scaffold* PCL+Gel-MA/PEGMA 10% uma ampliação de 750x, 3500x e 10000x respetivamente; D) Histograma dos diâmetros das fibras do *scaffold* PCL-Gel-MA/PEGMA 10%. **66**

- Figura 4.14** A) B) C) Fotografias de SEM da superfície do *scaffold* PCL+Gel-MA/PEGMA 10% uma ampliação de 750x, 3500x e 10000x respectivamente; D) Histograma dos diâmetros das fibras do *scaffold* PCL-Gel-MA/PEGDMA 10%. **66**
- Figura 4.15** A) B) C) Fotografias de SEM da superfície do *scaffold* compósito PCL/Gel-MA 15% com uma ampliação de 1000x, 3500x e 10000x respectivamente; D) Histograma dos diâmetros das fibras do *scaffold* compósito PCL/Gel-MA 10%. **67**
- Figura 4.16** A) B) C) Fotografias de SEM da superfície do *scaffold* compósito PCL/Gel-MA 15% com uma ampliação de 1000x, 3500x e 10000x respectivamente; D) Histograma dos diâmetros das fibras do *scaffold* compósito PCL/Gel-MA 15%. **68**
- Figura 4.17** Ângulo de contacto dinâmico das fibras de PCL. **69**
- Figura 4.18** Ângulos de contacto dinâmicos para *scaffolds* com hidrogéis de 1% de concentração em soluto. **70**
- Figura 4.19** Ângulos de contacto dinâmicos para *scaffolds* com hidrogéis de 10% de concentração em soluto. **70**
- Figura 4.20** Ângulos de contacto dinâmicos dos *scaffolds* compósitos PCL/Gel-MA. **72**
- Figura 4.21** Curvas termogravimétricas de PCL e de fibras de PCL, obtidas com uma rampa de aquecimento de 10°C/min. **74**
- Figura 4.22** Curvas termogravimétricas da Gelatina e Gel-MA, obtidas com uma rampa de aquecimento de 10°C/min. **74**
- Figura 4.23** Curva Termogravimétrica dos *scaffolds* com 1% de concentração, obtida a uma rampa de aquecimento de 10°C/min. **76**
- Figura 4.24** Curva Termogravimétrica dos *scaffolds* com 10% de concentração, obtida a uma rampa de aquecimento de 10°C/min. **76**
- Figura 4.25** Curvas termogravimétricas dos *scaffolds* compósitos e matérias-primas, obtidas a 10°C/min. **77**

- 
- Figura 4.26** Curvas da derivada de TGA (DTG) dos *scaffolds* compósitos e matérias-primas. 77
- Figura 4.27** Imagens SEM das fibras de PCL em diferentes tempos de degradação: a) Início do ensaio (0 dias); C) 28 dias. Ampliação: 750x 79
- Figura 4.28** Imagens SEM dos *scaffolds* PCL-Gel-MA 1% em diferentes tempos de degradação: a) Início do ensaio (0 dias); B) 2 dias; C) 28 dias. Ampliação: 10000x. 80
- Figura 4.29** Imagens SEM dos *scaffolds* PCL-Gel-MA/PEGMA 1% em diferentes tempos de degradação: a) Início do ensaio (0 dias); B) 2 dias; C) 28 dias. Ampliação: 10000 x. 80
- Figura 4.30** Imagens SEM dos *scaffolds* PCL-Gel-MA/PEGMDA 1% em diferentes tempos de degradação: a) Início do ensaio (0 dias); B) 2 dias; C) 28 dias. Ampliação: 10000 x. 80
- Figura 4.31** 30 Imagens SEM dos *scaffolds* PCL-Gel-MA 10% em diferentes tempos de degradação: a) Início do ensaio (0 dias); C) 28 dias. Ampliação: 750x. 81
- Figura 4.32** Imagens SEM dos *scaffolds* PCL-Gel-MA/PEGMA 10% em diferentes tempos de degradação: a) Início do ensaio (0 dias); B) 2 dias; C) 28 dias. Ampliação: 10000 x. 81
- Figura 4.33** Imagens SEM dos *scaffolds* PCL-Gel-MA/PEGMDA 10% em diferentes tempos de degradação: a) Início do ensaio (0 dias); B) 2 dias; C) 28 dias. Ampliação: 10000 x. 81
- Figura 4.34** Valores de massa (%) dos trombos formados na superfície dos *scaffolds*, após 40 minutos de contacto com o sangue. Valores obtidos representam a média de três amostras. 85
- Figura 4.35** Valores de massa (%) dos trombos formados na superfície dos *scaffolds*, após 40 minutos de contacto com o sangue. Valores obtidos representam a média de três amostras; k+, controlo positivo =100% 86
- Figura 4.36** Valores de índice hemolítico obtidos para os *scaffolds* revestidos por contacto direto e indireto. 87
-

<b>Figura 4.37</b>	Valores de índice hemolítico obtidos para os <i>scaffolds</i> compósitos por contacto direto e indireto	<b>89</b>
<b>Figura 4.38</b>	Avaliação da atividade celular após 24, 48 e 72 horas de contacto com os <i>scaffolds</i> de fibras de PCL revestidas com hidrogel.	<b>90</b>
<b>Figura 4.39</b>	Avaliação da atividade celular após 24, 48 e 72 horas de contato com os <i>scaffolds</i> compósitos PCL/Gel-MA.	<b>92</b>
<b>Figura 4.40</b>	Libertação de dexametasona nos <i>scaffolds</i> revestidos, em PBS (37°C). Estudo preliminar para aferir a capacidade de libertação de um ativo de interesse, face à aplicação.	<b>93</b>
<b>Figura C.1</b>	Curva de calibração obtida, a partir da qual foi possível determinar os valores da concentração de Hb no sangue e plasma, após leitura das absorvâncias no espectrofotómetro.	<b>123</b>
<b>Figura D.1</b>	Curva de calibração da dexametasona em metanol:água (1:2), Ambiente.	<b>127</b>

## ÍNDICE DE TABELAS

	<b>Pág.</b>
<b>Tabela 1.1</b> Revisão de estudos e patentes de produção de hidrogéis para aplicações em Engenharia de Tecidos	12
<b>Tabela 1.2</b> Estudos de desenvolvimento de membranas e hidrogéis a partir de gelatina para produção de <i>scaffolds</i> e/ou outros dispositivos com aplicação em Engenharia de Tecidos (referências consultadas a partir de [34]).	15
<b>Tabela 3.1</b> Composições detalhadas das soluções precursoras de gelatina preparadas para revestimento das fibras.	40
<b>Tabela 3.2</b> Nomenclatura dos <i>scaffolds</i> produzidos a partir de diferentes composições.	41
<b>Tabela 3.3</b> Composição química dos <i>scaffolds</i> de PCL/Gel-MA e suas designações.	42
<b>Tabela 4.1</b> Bandas características do espectro infravermelho da gelatina associadas à ligação Amida.	56
<b>Tabela 4.2</b> Bandas correspondentes à Gel-MA antes e depois do processo de fotoreticulação.	57
<b>Tabela 4.3</b> Bandas e grupos funcionais característicos da PCL, Gel-MA e <i>scaffolds</i> compósitos.	61
<b>Tabela 4.4</b> Valor obtido para o diâmetro médio das fibras de PCL e das fibras de PCL revestidas com hidrogel a 1 e 10% e respetivo desvio padrão.	66
<b>Tabela 4.5</b> Valores obtidos para o diâmetro médio dos <i>scaffolds</i> PCL/Gel-MA e respetivo desvio padrão.	68
<b>Tabela 4.6</b> Valor obtido para o ângulo médio das fibras de PCL e respetivo desvio padrão.	69

<b>Tabela 4.7</b>	Temperatura de degradação inicial e final, perda de massa e temperatura de degradação da derivada de TGA para: PCL, fibras de PCL, Gelatina e Gel-MA.	74
<b>Tabela 4.8</b>	Temperatura de degradação inicial e final, perda de massa e temperatura de degradação da derivada de TGA para os <i>scaffolds</i> de fibras de PCL revestidos com hidrogel.	76
<b>Tabela 4.9</b>	Temperatura de degradação inicial e final, perda de massa e temperatura de degradação da derivada de TGA para: PCL, Gel-MA e compósitos PCL/Gel-MA.	78
<b>Tabela 4.10</b>	Percentagem de degradação dos <i>scaffolds</i> após 0, 2 e 28 dias de incubação em PBS à temperatura fisiológica.	83
<b>Tabela B.1</b>	Estrutura Química e algumas considerações dos reagentes utilizados na síntese dos <i>scaffolds</i>	117
<b>Tabela C.1</b>	Preparação de soluções para os ensaios de hemocompatibilidade e sua utilização.	121
<b>Tabela D.1</b>	Concentração de soluções de dexametasona e respetiva absorvância.	123

## LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

<b>Símbolos/Abreviaturas</b>	<b>Definição</b>
<b>ATR-FTIR</b>	Espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier com reflexão total atenuada
<b>CEC</b>	Células endoteliais circulantes
<b>DES</b>	<i>Drug-eluting-stents</i>
<b>DMF</b>	Dimetilformamida
<b>ECM</b>	Matriz extracelular
<b>EDC</b>	<i>carbodiimide 1-ethyl-3-(3-dimethyl aminopropyl) carbodiimide hydrochloride</i>
<b>Gel-MA</b>	Gelatina Metacrílamida
<b>Irg2959</b>	Irgacure 2959
<b>MAA</b>	Anidrido Metacrílico
<b>MTT</b>	Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio
<b>OMS</b>	Organização Mundial Saúde
<b>PBS</b>	<i>Phosphate Buffer Solution</i>
<b>PCL</b>	Poli( $\epsilon$ -caprolactona)
<b>PEG</b>	Poli (etileno glicol)
<b>PEGA</b>	Polietileno glicol acrílato
<b>PEGDA</b>	Polietileno glicol diacrilato
<b>PET</b>	Polietileno tereftalato
<b>PGA</b>	Poli (ácido glicólico)

---

<b>pI</b>	Ponto isoelétrico
<b>PLA</b>	Poli (ácido láctico)
<b>PLGA</b>	Poli (ácido-co-glicólico)
<b>PolyHEMA</b>	Poli (2-hidroxietilmetacrilato)
<b>PVA</b>	Poli (álcool vinílico)
<b>RMN</b>	Ressonância Magnética Nuclear
<b>SEM</b>	Microscopia Electrónica de Varrimento
<b>TFE</b>	2,2,2-trifluoroetanol
<b>TGA</b>	Análise Termogravimétrica
<b>UV</b>	Radiação ultravioleta

---

## OBJETIVOS E ESTRUTURA DA TESE

Ao longo dos últimos anos muitos esforços se têm vindo a desenvolver na área biomédica para a produção e regeneração de tecidos/órgãos que, de alguma forma, ficaram lesados. O desenvolvimento de *stents* vasculares é um exemplo do desenvolvimento da área médica, em cooperação com a Engenharia de Tecidos, para minimizar a ocorrência de trombozes/embolias vasculares que, em muitos casos, podiam ser fatais para o doente.

Para este tipo de implantes, e uma vez que interagem diretamente no interior do organismo, mais concretamente numa artéria, a escolha da técnica e dos biomateriais a serem utilizados na produção de um *stent* vascular é fulcral para que haja um equilíbrio entre a estabilidade mecânica e a biocompatibilidade. Assim, uma abordagem que promove este equilíbrio no *stent* vascular prende-se com a preparação de *scaffolds* a partir de polímeros biodegradáveis de origem sintética e natural. Os polímeros sintéticos, como a PCL, apresentam boas propriedades mecânicas, enquanto os de origem natural exibem excelentes propriedades de biocompatibilidade. É o caso da gelatina, produzida a partir da desnaturação do colagénio.

A utilização de hidrogéis fotoreticuláveis, por sua vez, tem tido cada vez mais destaque em Engenharia de Tecidos. Esta preferência decorre das vantagens da fotoreticulação face aos métodos convencionais. Esta técnica permite a obtenção de matrizes versáteis, com estabilidade mecânica e com propriedades que podem ser facilmente trabalhadas. Além disso, a possibilidade de reticular o material *in situ*, torna-a uma técnica minimamente invasiva. Outra das técnicas bastante exploradas em Engenharia de Tecidos é o *electrospinning* dada a sua simplicidade para a construção de matrizes nanofibras, extremamente potenciais na construção de *scaffolds* robustos.

Assim, neste trabalho pretende-se produzir *scaffolds*, a partir de polímeros biodegradáveis (gelatina e PCL) combinando as técnicas de fotoreticulação e *electrospinning*, com o intuito de serem utilizados como *stents* vasculares.

A dissertação encontra-se organizada em cinco capítulos principais. No **Capítulo 1** pretende-se fazer um enquadramento teórico sobre o tema, no qual se dá ênfase aos biomateriais e à sua aplicação em Engenharia de Tecidos, mais concretamente à aplicação

de *scaffolds* e a sua importância na área médica, clarificando conceitos a estes inerentes. Discute-se ainda a importância da utilização de polímeros biodegradáveis de fonte natural, gelatina, e de fonte sintética, PCL, abordando diversas questões: fonte de matéria-prima, propriedades e aplicações. Foca-se a importância dos hidrogéis na área médica, mais concretamente os hidrogéis fotoreticuláveis e a utilização da técnica de *electrospinning* na produção de matrizes nanofibrosas. Finalmente aborda-se as doenças vasculares e as motivações por detrás da produção de novos *stents* vasculares.

No **Capítulo 2** é feito um enquadramento prático do trabalho, com os objetivos experimentais, apresentando-se a descrição detalhada do processo de produção dos *scaffolds*, dividindo-se o mesmo em duas abordagens de síntese. Na primeira abordagem, os *scaffolds* são sintetizados combinando matrizes nanofibrosas de PCL (produzidas por *electrospinning*) e hidrogéis fotoreticuláveis à base de gelatina modificada. Na segunda abordagem combina-se a PCL à gelatina modificada, sintetizando fibras compósitas por *electrospinning*, sujeitando posteriormente o *scaffold* compósito final à fotoreticulação.

No **Capítulo 3** listam-se os materiais utilizados nos ensaios laboratoriais para a produção dos *scaffolds*, seguindo-se uma descrição detalhada da preparação dos *scaffolds* nas duas vias descritas, começando-se por descrever a modificação da gelatina com anidrido metacrílico. De seguida apresentam-se os procedimentos experimentais para a preparação dos *scaffolds* pelas duas vias de síntese, *scaffolds* revestidos com hidrogel e *scaffolds* compósitos. Finalmente são apresentados todos os procedimentos experimentais de caracterização e as motivações para a sua realização. No **Capítulo 4** apresentam-se todos os resultados obtidos e a sua discussão de acordo com a aplicação.

No **Capítulo 5** chega-se às conclusões gerais de todo o trabalho experimental. Refletindo-se sobre os resultados obtidos e limitações encontradas procuram-se alternativas e soluções. Finalmente, face às conclusões gerais apresentam-se algumas recomendações do trabalho a desenvolver no futuro.

# I. INTRODUÇÃO

## I.1. Biomateriais e Engenharia de Tecidos

Um biomaterial pode ser definido, segundo a *European Society of Biomaterials (ESB)*, como um “material sintetizado destinado a fazer a interface com os sistemas biológicos, com o intuito de avaliar, tratar, aumentar ou substituir um órgão, tecido ou função do organismo”.

A utilização de biomateriais remonta às civilizações antigas tendo sido encontrados olhos, orelhas e narizes artificiais em múmias egípcias, contudo a sua grande investigação ocorreu nos séculos XIX e XX. Apesar dos esforços neste campo, o seu uso como implantes não foi bem-sucedido numa fase inicial, resultando na ocorrência de infeções e inflamações. A partir da segunda metade do século XX até à atualidade houve um grande avanço tecnológico no desenvolvimento de materiais capazes de interagir de forma adequada e específica com os sistemas biológicos, com o principal objetivo de substituir e/ou regenerar tecidos/órgãos danificados (com a produção de implantes ósseos e dentários, cartilagens artificiais, *scaffolds* para regeneração de tecidos, dispositivos de fixação interna como pacemakers, biossensores, entre outros). Também inúmeros materiais têm sido explorados para aplicações descartáveis, em contexto médico, ou para produtos de suporte em técnicas cirúrgicas [1-3].

Inúmeras propriedades, tanto físicas como biológicas, devem ser consideradas antes que um biomaterial possa ser utilizado como implante, uma vez que o mesmo estará em contacto com o organismo. Um dos requisitos imprescindíveis é a biocompatibilidade, que se traduz na capacidade do implante não apresentar reações imunológicas, como inflamações, toxicidade ou infeções no organismo [1,2]. Outro requisito importante que um biomaterial deverá apresentar é a sua biofuncionalidade que é definida como a capacidade de funcionamento, tanto física como química do implante face a uma aplicação específica, além de ser esterilizável [1].

A escolha dos materiais a utilizar numa aplicação biomédica específica deverá ter em conta os seguintes aspetos: os materiais não deverão induzir toxicidade nem causar

respostas inflamatórias; deverá existir um equilíbrio entre eficácia/desempenho e durabilidade do material; as propriedades mecânicas e físicas deverão ser adequadas à aplicação (devendo por isso ser facilmente processáveis do ponto de vista da Engenharia); deverão não causar alergias ou ser carcinogénicos; a sua degradação em ambiente biológico deverá estar ajustada ao tempo de tratamento que é necessário e os subprodutos de eventual degradação não deverão causar inflamações nem interferir no tratamento, para que possam ser facilmente metabolizados pelo organismo [1,2].

Os biomateriais podem ser organizados em quatro grupos: poliméricos, cerâmicos, metálicos ou materiais compósitos, e consoante sua aplicação/função podem ser classificados como temporários, funcionando como suporte na região lesada até que haja a regeneração do tecido nativo, ou permanentes, com o objetivo de substituir um tecido/órgão.

A Engenharia de Tecidos visa a substituição ou facilitação do novo crescimento de tecidos danificados por aplicação e combinação de biomateriais, células ou moléculas bioativas. Trata-se de um campo interdisciplinar que, com a aplicação de princípios de Engenharia e das ciências da vida para o desenvolvimento de substitutos biológicos, promove a restauração, manutenção ou melhoramento das funções de um determinado tecido e/ou órgão [5].

Existem então três aplicações principais em que a Engenharia de Tecidos se debruça:

- 1) A utilização de células segregadas e isoladas, que contém a grande vantagem de substituir apenas as células que são realmente necessárias e, eventualmente manipulá-las geneticamente antes da infusão e substituição de células mais antigas. A vantagem desta técnica é que a mesma permite o recurso a cirurgias menos invasivas, havendo porém uma possibilidade de rejeição imunológica ou falha na manutenção das novas funções;
- 2) A utilização de substâncias que promovam a formação do novo tecido nas zonas alvo, através do recurso a um sistema de libertação de moléculas bioativas nos locais alvo;
- 3) A utilização de células que são colocadas em, ou dentro, de matrizes ou *scaffolds*. Neste caso os sistemas podem ser abertos ou fechados. Nos sistemas

fechados, as células são aprisionadas/encapsuladas num biomaterial, que por degradação vai-se libertando gradualmente, obtendo-se assim os resultados pretendidos; por outro lado, em sistemas abertos, as células são semeadas à superfície externa de um biomaterial com a forma/função apropriada para esse fim.

É neste último ponto que a investigação em Engenharia de Tecidos mais se tem debruçado, com o intuito de fabricar um *scaffold* de forma a atuar como uma matriz extracelular artificial e temporária. A matriz extracelular é o componente não-celular presente em todos os tecidos e órgãos que fornece um suporte físico para constituintes celulares assim como sinais bioquímicos e biomecânicos essenciais à morfogénese do tecido, diferenciação e hemóstase [6,7].

Os *scaffolds* representam então o componente principal da maior parte das estratégias ou técnicas da Engenharia de Tecidos por forma a providenciar um ambiente biológico e mecânico adequado à regeneração de tecidos de forma organizada, combinando uma boa arquitetura com as interações célula-célula e fatores de crescimento de modo a providenciar a regeneração e reparação do tecido/órgão [8,9].

## 1.2. *Scaffolds*

O termo *Scaffold* é a designação científica para os biomateriais sólidos porosos tridimensionais que servem de suporte estrutural para a fixação e regeneração de tecidos. De modo a garantir a máxima eficácia, um *scaffold* deve apresentar uma configuração adequada, tanto química como física, de forma a promover uma excelente regeneração do tecido/órgão lesado. Face a isto, um *scaffold* deve exibir certas propriedades que serão apresentadas de seguida [10-14]:

- O *scaffold* deve apresentar uma boa estrutura arquitetónica porosa tridimensional com uma boa resistência mecânica, de modo a promover uma boa vascularização, permitindo o transporte de gases e nutrientes, e assim garantir a sobrevivência, proliferação e diferenciação celular, sem nunca comprometer a estabilidade mecânica;

- Estes materiais têm de ser biocompatíveis com os tecidos onde serão implementados, apresentando um grau mínimo de inflamação ou toxicidade *in vivo*, e os produtos de degradação devem ser metabolizados;
- Devem ser biodegradáveis e exibir uma velocidade de degradação específica que corresponda à taxa de regeneração do novo tecido, ou seja, o tempo correspondente da produção da nova matriz extracelular do tecido em desenvolvimento;
- Devem mimetizar a matriz extracelular nativa;

A microestrutura de um *scaffold* é uma característica fundamental para proporcionar a implementação e regeneração celular. É então essencial que este apresente uma elevada área superficial de forma a auxiliar a fixação e o crescimento celular; para além de que, se o rácio entre a área de superfície e o volume for elevado, originará a formação de poros de dimensões adequadas ao aprisionamento das células, acomodando-as de forma apropriada e garantindo a substituição ou restauração das funções dos tecidos ou órgãos [9,15]. As propriedades da superfície do biomaterial podem ainda ser modificadas, através de tratamentos químicos e/ou físicos ou pela imobilização de biomoléculas (proteínas adesivas tais como colagénio, péptidos, fatores de crescimento) de forma a melhorar as propriedades do biomaterial (como por exemplo a biocompatibilidade) [10,15]. Uma porosidade elevada no *scaffold* permite a infiltração celular entre os seus espaços vazios; porém também pode comprometer a estabilidade e integridade mecânica do mesmo, devendo por isso existir em equilíbrio entre a porosidade e resistência mecânica, para que haja um bom desempenho do material aquando da sua aplicação [15].

Os *scaffolds* podem ser formados com uma enorme variedade de macroestruturas, desde fibras, hidrogéis a espumas. Fibras poliméricas são formadas de forma a proporcionar uma matriz tridimensional, o que é bastante atrativo em Engenharia de Tecidos uma vez que proporcionam uma grande área de superfície para a fixação celular, além de mimetizar a matriz extracelular permitindo a difusão de nutrientes para as células e a passagem dos produtos residuais das mesmas [15]. Os hidrogéis, por outro lado, apresentam uma grande propriedade intrínseca, que é a capacidade de absorver água, chegando mesmo a absorver até mil vezes o seu peso seco. Desta forma, são materiais

com enorme potencial para encapsulamento de células e fármacos, o que tem incentivado cada vez mais a investigação para o desenvolvimento, construção e utilização destes materiais em aplicações biomédicas. Dada a facilidade em serem injetados ou moldados, são muitas vezes incorporados em estratégias que envolvam técnicas cirúrgicas menos invasivas [15]. Já as espumas proporcionam um modelo de *scaffolds* macroestrutural para as células, formando-se uma estrutura tridimensional. Para este tipo, existem várias técnicas diferentes de processamento para a construção de *scaffolds* porosos [15].

### 1.3. Polímeros Biodegradáveis de base natural/sintética

Polímeros são macromoléculas constituídas pelo menos por uma unidade de repetição ao longo da cadeia da molécula, ligadas por ligação covalente [16].

Uma classe de polímeros largamente estudada e utilizada em Engenharia de Tecidos é a dos polímeros biodegradáveis. Estes materiais degradam-se por ação enzimática e por degradação química, dando origem a produtos mais simples como dióxido de carbono, água e biomassa, que são componentes facilmente metabolizados pelo organismo [16,17]. Os polímeros biodegradáveis podem ser divididos em dois grupos consoante a sua natureza/origem: polímeros naturais e sintéticos.

#### 1.3.1. Polímeros naturais

Polímeros de origem natural são polímeros obtidos a partir de fontes renováveis (e de grande diversidade na natureza), sendo compostos maioritariamente por derivados de origem proteica ou hidratos de carbono. Estão presentes nos organismos dos vertebrados, como o colagénio, fibrina ou ácido hialurónico, que são as macromoléculas principais da ECM, ou noutros organismos derivados da natureza, como o alginato ou quitosano. Os polímeros naturais são largamente explorados na construção e produção de *scaffolds* para aplicações em Engenharia de Tecidos dado ao facto de possuírem boas propriedades bioativas, o que melhora o seu desempenho biológico e conseqüentemente favorece o crescimento de uma variedade de tecidos, desde a regeneração à substituição por completo dos mesmos. Outra vantagem da sua aplicação é o facto de, na maioria dos casos, a sua biodegradabilidade não induzir a formação de substâncias tóxicas para o

organismo que causem respostas inflamatórias, além de serem materiais de custo reduzido, de fácil obtenção e terem capacidade de se agregar a outras moléculas [10,18,19].

Estes polímeros são classificados em dois principais grupos: polipeptídeos e polissacarídeos. Os polipeptídeos são macromoléculas biológicas biodegradáveis, constituídas por uma ou mais cadeias de aminoácidos [16]. O colagénio, a gelatina e a seda são os polipeptídeos mais utilizados em Engenharia de Tecidos, a seda como material de sutura dada a sua elevada resistência à hidrólise devido à estabilidade da ligação amina, e o colagénio e a gelatina como materiais de regeneração de tecido mole e libertação de fármacos [15,16]. Os polissacarídeos são macromoléculas maciças de hidratos de carbono. Para sua utilização, muitos têm que ser modificados ou misturados com outros polímeros de forma a melhorar suas propriedades, como por exemplo a sua taxa de degradação. Em contexto biomédico, muitos são modificados e usados como hidrogéis no sentido de desenvolver sistemas de absorção/libertação de fármacos económicos e biocompatíveis [16].

Apesar da sua grande utilização, os polímeros naturais ainda apresentam limitações. A destacar a fraca resistência mecânica, que leva à necessidade de se misturarem com outros polímeros sintéticos ou então, recorrendo a processos químicos como a reticulação, podem-se obter materiais de base natural com maior resistência, manipulando facilmente outras propriedades e tendo um controlo preciso das mesmas [11,16]. No entanto, outras limitações são alvo de preocupação, como a possibilidade de contaminação por agentes patogénicos bem como o risco de ocorrer reações de imunogenicidade. Apresentam ainda desvantagens face ao seu processamento pois as suas propriedades químicas e biológicas são difíceis de reproduzir em lote, assim como há a necessidade de um amplo controlo de purificação [20,21].

### Gelatina

A gelatina é um polipéptido solúvel em água, obtido pela hidrólise parcial e desnaturação do colagénio proveniente de pele suína e ossos bovinos. Esta tem sido vastamente utilizada em aplicações biomédicas e farmacêuticas devido à sua biodegradabilidade e

biocompatibilidade em ambientes fisiológicos além de ser um composto antigénico (devido à desnaturação do colagénio) e apresentar propriedades hemostáticas [22,23].

Dois tipos de gelatina podem ser obtidos devido à desnaturação do colagénio: gelatina tipo-A e gelatina tipo-B, respetivamente resultantes de um pré-tratamento ácido e de um pré-tratamento alcalino [22-25]. A diferença destes pré-tratamentos afeta a natureza elétrica do colagénio e conseqüentemente da gelatina, produzindo gelatina com diferentes pontos isoelétricos. A Gelatina do tipo-A, derivada do colagénio de pele suína, apresenta um ponto isoelétrico (pI) entre 7-9; já a Gelatina tipo-B, derivada do colagénio extraído da pele ou ossos de carne bovina, apresenta um ponto isoelétrico entre 4,6-5,4 [24-26]. A Gelatina do tipo-A é preferencialmente escolhida para a área médica pois o seu ponto isoelétrico é o mais próximo do pH do organismo, principalmente do sangue.

### 1.3.2. Polímeros sintéticos

Os polímeros sintéticos, e ao contrário dos materiais de base natural, são de fácil processamento, produzidos sob condições controladas e em grandes quantidades [10]. Uma vez que são produzidos sinteticamente há a capacidade de adaptar as propriedades dos mesmos face às funções e especificações desejadas, como é o caso da taxa de degradação [10,11,15]. Apresentam ainda boas propriedades mecânicas e uma maior estabilidade face aos materiais naturais, além de alguns polímeros serem mais baratos [10,11,15]. A maior parte dos polímeros sintéticos degradam-se por hidrólise química e são insensíveis a alguns processos enzimáticos, desta forma a sua degradação não varia muito de paciente para paciente.

Os polímeros sintéticos mais usados em Engenharia de Tecidos são os poliésteres. Os poliésteres são polímeros que contêm na sua cadeia principal o grupo funcional éster. Estes dividem-se em 3 subgrupos: alifáticos, não-aromáticos e aromáticos, sendo os alifáticos os mais usados na área biomédica, pois os seus grupos são facilmente hidrolisáveis. O grupo funcional éster em polímeros como o poli (ácido láctico) (PLA), poli (ácido glicólico) (PGA) e poli (láctico-co-glicólico) (PLGA) é facilmente hidrolisado em meio aquoso conferindo-lhe assim uma grande biodegradabilidade nos fluidos corporais, o que é ideal para suturas absorvíveis. Para casos em que a taxa de degradação

é mais lenta, são amplamente usados e explorados como materiais de substituição óssea, adesivos, filmes ou revestimentos, assim como para *scaffolds* em tecidos moles [11,16,27].

A grande desvantagem destes polímeros centra-se na formação de ácidos quando estes se degradam e por isso, em concentrações elevadas, podem causar uma resposta inflamatória nos tecidos envolventes [10,11].

### Poli (caprolactona) (PCL)

A poli( $\epsilon$ -caprolactona), ou simplesmente policaprolactona, é um poliéster obtido através da polimerização do monómero  $\epsilon$ -caprolactona por abertura do seu anel cíclico, e foi inicialmente sintetizada em 1930 pelo grupo Carathers [28,29]. É um polímero hidrofóbico e semi-cristalino, no qual a sua cristalinidade tende a diminuir com o aumento do seu peso molecular [29]. É um polímero biodegradável por hidrólise, não-tóxico e biocompatível, além de apresentar propriedades mecânicas flexíveis que o tornam bastante atrativo no mercado dos polímeros biodegradáveis e dos biomateriais [17].

A PCL apresenta ainda uma boa compatibilidade com outros polímeros, o que permite a construção de diversos tipos de sistemas, simples ou complexos, para inúmeras aplicações terapêuticas. Também pode ser facilmente combinada com outros polímeros, de forma a obter-se materiais com propriedades físicas, químicas e biológicas superiores. Como exemplo, a sua hidrofiliabilidade poderá ser francamente melhorada, possibilitando uma maior receptividade para a adesão e proliferação celular, tornando-se mais biocompatível com o organismo [17].

Exibe ainda boas propriedades reológicas e viscoelásticas, possibilitando deste modo a sua utilização em várias técnicas no fabrico de *scaffolds*, incluindo a técnica de *electrospinning*, o método escolhido para a construção dos *scaffolds* propostos. Esta técnica será abordada mais à frente neste trabalho [28].

## 1.4. Hidrogéis

Um hidrogel é uma rede tridimensional de polímeros e copolímeros hidrofílicos, insolúvel em água, mas capaz de absorver ou reter grandes quantidades de água ou qualquer fluido biológico, podendo ser de origem natural ou sintética [30,31]. Os hidrogéis apresentam uma elevada permeabilidade ao oxigénio, nutrientes e outros metabolitos solúveis em água, além de apresentarem uma excelente biocompatibilidade, provocando uma resposta inflamatória mínima. Esse requisito é fundamental para que não haja danificação dos tecidos envolventes e respostas desfavoráveis por parte do organismo [32]. Por isso mesmo, têm sido cada vez mais explorados em aplicações biomédicas, como referido anteriormente [33]. Sistemas de libertação de fármacos e de transporte de fatores de crescimento e células, diferentes tipos de *scaffolds* para preenchimento de espaços vazios, sistemas para cicatrização de feridas, reparação de cartilagens e substituição do núcleo pulposo dentro de discos intervertebrais, são apenas alguns exemplos de aplicações que têm sido estudadas, desde que os hidrogéis se tornaram materiais tão atrativos em Engenharia de Tecidos [34,35]. O principal objetivo neste campo passa por construir um hidrogel eficaz, biocompatível, que se adequa ao local de aplicação e proporcione uma arquitetura 3D aos tecidos para promover a regeneração e o crescimento celular do novo tecido/órgão de forma adequada [36].

Consoante o seu método de formação e as interações que formam a rede tridimensional, estes podem ser classificados em duas classes: hidrogéis físicos/reversíveis ou hidrogéis químicos/permanentes. Nos hidrogéis físicos, as cadeias poliméricas encontram-se unidas por interações físicas, como ligações por pontes de hidrogénio, ligações electrostáticas ou interações hidrofóbicas, que facilmente são quebradas por variações de pH ou temperatura (por exemplo). Esta variabilidade com as condições fisiológicas interfere na capacidade de gelificação dos materiais e nas suas propriedades físicas [37]. Em contrapartida, nos hidrogéis químicos, os polímeros estão ligados por ligações covalentes, através de reações químicas com agentes reticulantes, radiação de alta energia ou por polimerização radicalar [30,38].

Vários são os materiais, de origem sintética ou natural, que podem ser usados na produção e desenvolvimento de formulações de base hidrogel para a construção de *scaffolds*

porosos. De origem sintética destaca-se, por exemplo, o poli (etileno glicol), o poli (ácido acrílico) ou poli (álcool vinílico). Derivados naturais como a agarose, quitosano, alginato, fibrina ou gelatina são também fortes candidatos. A incorporação de gelatina para a produção de hidrogéis está reportada como sendo vantajosa para a adesão celular, assim como para o melhoramento das suas propriedades de degradação, aumentando a suscetibilidade enzimática após implantação no organismo [32,39]. Na Tabela 1.1 apresenta-se alguns estudos e patentes com produção de hidrogéis no âmbito de Engenharia de Tecidos.

**Tabela 1.1** Revisão de estudos e patentes de produção de hidrogéis para aplicações em Engenharia de Tecidos.

<b>PATENTES</b>		
<b>Material base</b>	<b>Descrição/Aplicação</b>	<b>Referências</b>
	<b><u>Patente US 6 379 690 B2</u></b>	
	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Produção de hidrogéis reticulados de base queratina para desenvolvimento de <i>scaffolds</i> para Engenharia de Tecidos.</li> </ul>	
<b>Queratina</b>	<p>A vantagem da biocompatibilidade, associada ao carácter não imunogénico da queratina, promove o processo de epitelialização.</p> <p>Material demonstrou potencial para ser um suporte de nutrientes, promovendo a regeneração celular.</p>	<b>Blanchard et al. [40]</b>
	<b><u>Patente EP 1 664 168 B1</u></b>	
	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Composição de base hidrogel para a produção de <i>scaffolds</i> porosos contendo:</li> </ul> <p style="text-align: center;">↓</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Polímero “auto-reticulável”</li> <li>- Micropartículas de gelatina e colagénio reticuladas</li> <li>- Iniciador radicalar livre para promover reticulação</li> </ul> <p style="text-align: center;">Tratamento de defeitos esqueléticos sem lixiviação do hidrogel porogénico</p>	
<b>Poli (fumarato de propileno)</b>		<b>Jabbari et al. [41]</b>

Tabela 1.1 (cont.)

<b>Patente US 2013/0236971 A1</b>		
<b>Poli (álcool vinílico) (PVA)</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Produção de hidrogéis biodegradáveis complexados com polímeros contendo fenilboronato (para encorajar o crescimento celular e tecidual).</li> </ul>	<b>Kummar et al. [42]</b>
<b>ESTUDOS RELEVANTES</b>		
<b>Material base</b>	<b>Descrição/Aplicação</b>	<b>Referências</b>
<b>Poli (vinil pirrolidona) (PVP)</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Obtenção de hidrogéis de PVP por irradiação UV, usando diversos aditivos: PEG (600 e 6000) (que contribuíram para o aumento da elasticidade dos materiais finais dado o seu efeito plastificante) e PEO (400000) (para reduzir a densidade de reticulação).</li> <li>Sistemas não apresentaram sinais de citotoxicidade.</li> </ul>	<b>Lugao et al. [43]</b>
<b>PVA</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Desenvolvimento de hidrogéis de PVA para utilização como <i>scaffolds</i> para regeneração de diversos tecidos, sendo também avaliado o potencial como matriz para libertação de ativos.</li> <li>Misturas de PVA com componentes como a gelatina, colagénio, dextrano ou quitosano.</li> </ul>	<b>Cascone et al. [44]</b>
<b>Poli (etileno glicol) (PEG)</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Formação de hidrogéis de base PEG por tecnologia de “click chemistry”. Mecanismo é distinguido pela sua rapidez através de reações específicas, além da versatilidade de bioconjugação.</li> </ul> <p>Grupos funcionais azida e alcino podem reagir entre si, na presença de catalisadores, formando-se ligações covalentes estáveis com um franco aumento das propriedades mecânicas dos hidrogéis finais.</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>Controlo das propriedades físicas e químicas pode ↓ também ser melhorado</li> </ul> <p>Explorados na construção de <i>scaffolds</i> para recombinação de proteínas e regeneração tecidual. Também potenciais na libertação de ativos, proteínas e fatores de crescimento.</p>	<b>Liu and Anseth [45]</b>

Tabela 1.1 (cont.)

<b>Poli (2-hidroxietil metacrilato) (polyHEMA)</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Filmes de hidrogéis obtidos usando o polyHEMA como monómero base e o polietileno glicol dimetacrilato e 1,1,1-trimetilolpropano trimetacrilato como agentes reticulantes, fazendo uso de um fotoiniciador para posterior irradiação UV. O segundo agente reticulante garante materiais com estruturas suaves e elevada permeabilidade ao oxigénio.</li> </ul> <p>Além do seu uso como sistemas de libertação de fármaco em lentes de contacto, podem ser explorados na produção de pele artificial, curativos para queimaduras, <i>scaffolds</i> para regeneração tecidual e cartilagens.</p> <p><b>Observações:</b> Propriedades mecânicas destes sistemas podem ser melhoradas com a introdução de componentes hidrofóbicos (ex. caprolactona) na rede polimérica [50].</p>	<b>[46,47] adaptado de [39]</b>
<b>Péptidos (ex. comercial: PURAMATRIX)</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Hidrogéis nanofibrosos e nanoporosos a partir de péptidos obtidos por <i>self-assembly</i>.</li> </ul> <p>Apresentam propriedades imunológicas, são biodegradáveis (e capazes de interagir de forma adequada com as células)</p> <p style="text-align: center;">↓</p> <p>Usados para estimular o crescimento de tecidos internos, contribuindo para a vascularização dos mesmos; difusão lenta de fármaco; aplicações cirúrgicas.</p>	<b>Harris et al. [48]</b>
<b>Beta-glucano</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Desenvolvimento de <i>scaffolds</i> por tecnologia de <i>radication fusion</i>.</li> </ul> <p>Material base (considerado seguro e biocompatível) promove a regeneração celular e a biossíntese de colagénio.</p> <p>A tecnologia consiste na dissolução dos componentes base em água destilada, sendo as soluções aquosas irradiadas com luz UV ou Gama de forma a obter-se um gel.</p> <p style="text-align: center;">↓</p> <p>Células estaminais conseguiram aderir, crescer e diferenciar-se no <i>scaffold</i> formado.</p>	<b>Song et al. [49]</b>

Apesar da diversidade de materiais apresentados na Tabela 1.1, um dos polímeros bastante investigado para a produção de hidrogéis, e conseqüentemente para a construção de *scaffolds* porogénicos, é a gelatina. Como referido anteriormente, o interesse pela introdução da gelatina neste tipo de sistemas é sobretudo devido à biocompatibilidade e biodegradabilidade que são conferidas ao produto final, mas também por ser um dos polímeros mais baratos usados na produção de biomateriais (cerca de 50 mil toneladas métricas de gelatina são produzidas anualmente para diferentes dispositivos médicos) [51]. Além disso, de acordo com Poursamar et al. [51] a gelatina (a partir do colagénio) mantém a sequência de péptidos (ex. RGDs) conhecidos como potenciadores da adesão e migração celular.

Os géis físicos de gelatina são facilmente obtidos por indução térmica, mas facilmente se dissolvem à temperatura fisiológica, e por isso, na maioria das vezes, são submetidos a um tratamento irreversível por reticulação, aumentando francamente as suas propriedades térmicas e mecânicas [34]. O grau de reticulação deste tipo de matrizes pode ser facilmente trabalhado, manipulando assim a taxa de degradação *in vivo*, de acordo com os objetivos terapêuticos do material e o tempo da regeneração do tecido alvo.

Sendo a gelatina o polímero escolhido neste trabalho para a síntese dos hidrogéis, apresenta-se de seguida uma pequena revisão dos estudos que têm vindo a ser desenvolvidos de hidrogéis a partir de gelatina (Tabela 1.2).

**Tabela 1.2** Estudos de desenvolvimento de membranas e hidrogéis a partir de gelatina para produção de *scaffolds* e/ou outros dispositivos com aplicação em Engenharia de Tecidos (referências consultadas a partir de [34]).

Referências	Estudo
Yung et al. [52]	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Construção de hidrogéis a partir de gelatina reticulada com transgluminase microbiana;</li> <li>- Células HEK 293 foram encapsuladas nos materiais. Após degradação proteolítica, as células foram capazes de recolonização, sugerindo a possibilidade de libertação <i>in vivo</i> de células através destes materiais, para diferentes terapêuticas;</li> <li>- Estabilidade química e térmica dos materiais, dependente das proporções de gelatina usadas.</li> </ul>

**Tabela 1.2 (cont.)**


---

- Produção de filmes de gelatina reticulada com *2-chloro-1-methylpyridinium iodide* para regeneração de tecido dérmico;

**Yeh et al. [53]**

- Materiais demonstraram ser biodegradáveis, além de exibirem elevada capacidade de inchaço e excelente biocompatibilidade na presença de fibroblastos.

---

**DESTAQUE**

- Desenvolvimento de hidrogéis de gelatina previamente funcionalizada com Anidrido Metacrílico (MAA): Diferentes graus de funcionalização foram atingidos; percentagens da introdução de grupos interativos determinadas por medição do grau de substituição do grupo amina livre (por análise química de RMN);

- Obtidas soluções de gelatina (tipo A) após diluição em soluções tampão fosfato (condições de temperatura mantidas a 60°C); MAA adicionado a 50°C, em condições de agitação, sendo a reação prolongada por um período de 3h;

**Chen et al.****[54]**

- Após diluições, as soluções finais foram purificadas por diálise para remover subprodutos das reações de funcionalização, assim como monómero funcional que ficou por reagir (evitando citotoxicidade derivada da acumulação de ácidos); Os materiais finais foram sujeitos a reticulação por irradiação UV;

- Sistemas caracterizados para avaliar o potencial de suporte de células progenitoras à formação de redes vasculares;
  - Usando os sistemas criados como *scaffolds*, foi demonstrada a formação de estruturas contendo células humanas endoteliais derivadas do sangue e células de osso estaminais derivadas da medula, obtendo-se extensivas redes capilares *in vitro*;
  - O trabalho provou que os hidrogéis criados podiam facilmente ser explorados para um conjunto de aplicações biomédicas que requerem a formação de redes microvasculares.
- 

- Síntese de hidrogéis de ácido hialurónico com diferentes concentrações de gelatina para a regeneração do núcleo pulposo, no tratamento da degeneração de discos intervertebrais;

**Chen et al.****[55]**

- Sistemas possuíram viscosidade adequada, permitindo injeção e aplicação *in situ*; capacidade de esterilização e fácil manipulação/uso;

- As células do núcleo pulposo sobreviveram e proliferaram junto dos *scaffolds*, mantendo a sua morfologia.

---

Tabela 1.2 (cont.)

**DESTAQUE****Coimbra et al. [34]**

- Testados dois métodos de reticulação de gelatina (tipo A): 1) Reticulação usando *carbodiimide 1-ethyl-3-(3-dimethyl aminopropyl) carbodiimide hydrochloride* (EDC) em condições heterogéneas; 2) Reticulação por fotopolimerização, após pré-funcionalização da gelatina com grupos metacrilamida interativos (usando o MAA como agente funcional);
- Matrizes de gelatina reticuladas por fotopolimerização apresentaram maiores capacidades de absorção em meio salino, no entanto exibiram menor resistência à degradação hidrolítica e enzimática (em meios salinos suplementados com a enzima *colagenase* a partir de *Clostridium histolyticum*);
- Propriedades mecânicas demonstraram ser dependentes dos graus de reticulação das membranas e do método de reticulação usado.
  - O trabalho demonstrou que é possível trabalhar/manipular as propriedades químicas e mecânicas das membranas de gelatina para uma determinada aplicação, escolhendo o método mais adequado de reticulação para o efeito, assim como as condições ambientais em que é realizado. Diferentes densidades de reticulação dão também origem a comportamentos bastante distintos.

**Poursamar et al. [51]**

- Produção de *scaffolds* porosos de base gelatina por um método de *gas foaming*;
- A tecnologia usada permitiu facilmente trabalhar a dimensão do *scaffold* com uma estrutura de poros interconectada;
- Ensaios de citotoxicidade para os materiais (obtidos a partir de diferentes concentrações de reticulante) revelaram a potencialidade do método para a construção de *scaffolds* viáveis à regeneração celular de diferentes tecidos (e para diversas aplicações).

Com a revisão destes estudos, é possível perceber o enorme esforço da investigação na construção de hidrogéis que pretendem ser úteis tanto no preenchimento de espaços vazios em locais a tratar, como na libertação de moléculas bioativas e na regeneração/reparação de tecidos lesados.

Todavia, Caló et al. [32] chamam a atenção para uma das principais necessidades em Engenharia de Tecidos. De acordo com os trabalhos que têm sido efetuados, um dos maiores desafios passa por explorar e construir sistemas poliméricos que possam estimular a formação da rede de vasos sanguíneos em um tecido alvo [32]. E, de acordo com os autores, os hidrogéis representam opções válidas e consistentes para controlar de forma eficaz os processos de vascularização dos tecidos, com a libertação de fatores de crescimento e células endoteliais nas áreas pretendidas. Contudo, tecidos duros (como os ossos) ou tecidos moles (como o caso dos músculos ou vasos sanguíneos), são localizados em áreas que exigem a implantação de materiais com excelentes propriedades mecânicas, e aí se encontra o grande desafio.

A maioria das soluções de base hidrogel existentes no mercado não apresentam propriedades mecânicas desejadas. Por isso mesmo, novas abordagens podem e devem ser investigadas. Neste âmbito, dá-se destaque ao trabalho realizado por Chen et al. [54] (destacado na Tabela 1.2). De acordo com a estratégia reportada, a funcionalização da gelatina com agentes metacrilados (como o anidrido metacrílico) e o subsequente processo de fotopolimerização, permitem manipular e trabalhar propriedades físicas, químicas e mecânicas dos hidrogéis, a fim de obter desempenhos pretendidos. Acredita-se que a porosidade e a taxa de degradação, se trabalhadas, permitem controlar a robusteza mecânica do material, sem que haja comprometimento da biocompatibilidade final do mesmo [54]. Neste caso, a capacidade e habilidade de criação de microestruturas, adequadas à adesão e proliferação celular, permitiu a formação de *scaffolds* finais adequados à formação de redes vasculares. O grau de funcionalização da gelatina foi considerado como a principal variável a manipular para controlar a extensão da formação das redes. O uso destes hidrogéis demonstrou ser promissor para inúmeras aplicações regenerativas, como já referido anteriormente, embora as propriedades mecânicas propriamente ditas não tenham sido alvo de atenção.

Coimbra et al. [34] no entanto avaliaram diretamente a influência que o método de reticulação por fotopolimerização pode ter na performance mecânica de membranas de gelatina modificada por anidrido metacrílico. Dada a grande capacidade de inchaço e às densidades de reticulação, a resistência mecânica pode desde logo ser comprometida, e daí resulta a motivação para a criação de sistemas simples, onde os hidrogéis de base

gelatina sirvam como revestimento de matrizes fibrosas que podem ser produzidas por técnicas como o *electrospinning* (a partir de polímeros sintéticos como a PCL) e contribuir para o aumento da resistência mecânica. Desta forma, define-se objetivamente que tipos de materiais se pretende criar com a realização deste trabalho. A gelatina e derivados do colagénio são os mais usados na criação de estruturas e redes vasculares por proporcionarem um ambiente favorável à morfogénese vascular, de acordo com os estudos considerados [23,54]. Por outro lado, a incorporação de PCL em sistemas de gelatina está reportada como sendo vantajosa para se obter um ambiente excelente de proliferação celular, como será visto mais à frente.

#### 1.4.1. Hidrogéis fotopolimerizáveis

Relativamente a métodos de reticulação, o método químico que mais se tem destacado em aplicações biomédicas (e concretamente na produção de hidrogéis para regeneração tecidual) tem sido a polimerização radicalar-livre por fotopolimerização. Ao longo da polimerização há um controlo espacial e temporal da taxa de reticulação (conseguido através da conjugação de diversos fatores, como precursores base, fonte de luz, temperatura e concentração de iniciador), além das taxas de conversão de ligações duplas serem muito mais rápidas comparativamente a outros métodos convencionais (de alguns segundos até alguns minutos) havendo uma produção de calor mínima. A grande vantagem desta técnica face às convencionais prende-se com a possibilidade de formação de hidrogéis e outras matrizes poliméricas *in situ*, tornando a técnica minimamente invasiva [33,56].

De forma a realizar cirurgias minimamente invasivas, um grande número de hidrogéis é então formado por este processo de reticulação [33]. O método é aplicado *in situ* quando a luz visível, ou ultravioleta, incide em compostos sensíveis à luz, denominados fotoiniciadores, havendo a formação de radicais livres que atacam as ligações de carbono duplas presentes nos materiais base. A sua conversão dá origem a matrizes tridimensionais reticuladas, com propriedades bastante distintas das formulações iniciais [33]. O processo depende do fotoiniciador que é usado, da sua concentração, da fonte de luz e do comprimento de onda. Os materiais obtidos apresentam grande estabilidade

depois de armazenados, e as suas propriedades mecânicas podem ser facilmente trabalhadas, de acordo com os objetivos pretendidos.

Esta técnica é mais usual em odontologia para restaurações dentárias *in situ*, mas tem vindo a ganhar interesse em diversas áreas terapêuticas e biomédicas, com: 1) a criação de sistemas de libertação de fármacos, pois consegue-se um controlo do inchaço do hidrogel, assim como da sua taxa de degradação, além da sua compatibilidade com macromoléculas hidrofílicas do fármaco, tais como proteínas, exibindo uma regulação facilitada da libertação dos ativos; 2) o encapsulamento celular, uma vez que fornece imunoisolamento às células mas ao mesmo tempo permite a difusão de oxigénio, nutrientes e metabolitos necessários; 3) e finalmente a produção de *scaffolds* em tecidos moles dada a similaridade das propriedades mecânicas que os hidrogéis podem ter com estes, como por exemplo *scaffolds* para a regeneração da cartilagem ou para o crescimento celular vascular [33].

Dado o leque de aplicações, as vantagens apresentadas e os objetivos terapêuticos a atingir, a fotopolimerização foi o método escolhido para a produção dos hidrogéis que serão usados na construção dos *scaffolds* finais. Das possibilidades existentes de fotoiniciadores, o Irgacure® 2959 (reportado na literatura como o mais bem tolerado por diversas linhas celulares) foi o utilizado neste trabalho dada a sua biocompatibilidade [56].

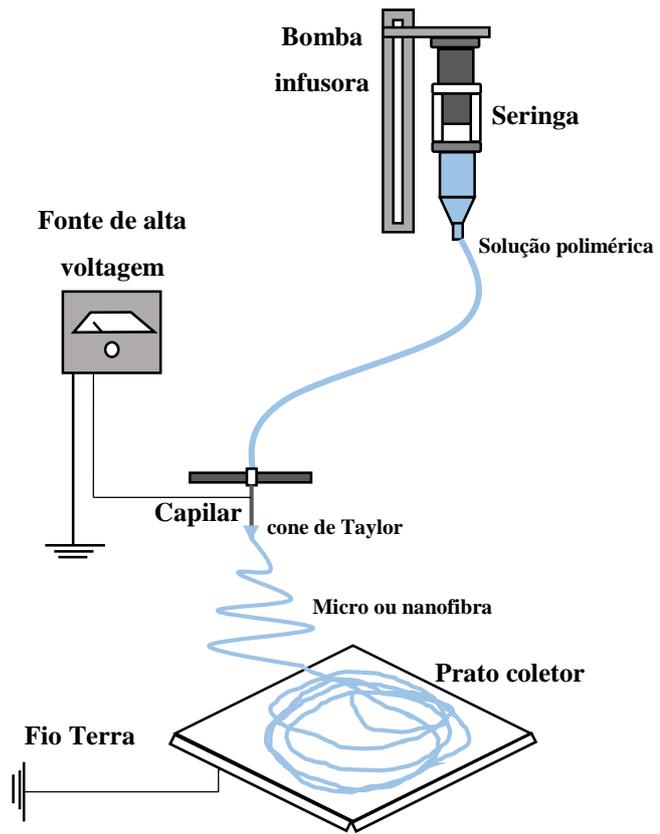
## 1.5. *Electrospinning*

Diversos autores referem a importância e as vantagens claras da técnica de *electrospinning* na construção de estruturas fibrosas para aplicações elétricas e óticas, assim como para a produção de sensores, compósitos reforçados com nanofibras, entre outros. Ainda assim, é na área biomédica que a técnica de *electrospinning* encontra maior aplicabilidade, com destaque em Engenharia de Tecidos, mas também em sistemas de libertação controlada de fármaco, cirurgia e cicatrização de feridas, ou em sistemas para imobilização de enzimas [37]. Trata-se de uma técnica de simples utilização e bastante eficaz para a produção de matrizes poliméricas. Não requer equipamento sofisticado e permite o controlo do diâmetro das fibras produzidas (da ordem dos nanómetros até

alguns micrómetros), uma vez que o alongamento das mesmas é conseguido pela aplicação de um campo elétrico externo. Por sua vez, a sua simplicidade, versatilidade e flexibilidade possibilitam a produção e implementação da técnica a larga escala [16,58,59].

Vários têm sido os polímeros (sintéticos, naturais ou uma mistura de ambos) na preparação de estruturas nanofibrosas produzidas por *electrospinning*, com o objetivo de satisfazer diversas necessidades clínicas. Salientam-se os poliésteres comercialmente disponíveis como o PLA, o PGA e a PCL. Apesar da suscetibilidade da PCL à hidrólise química, esta demora mais tempo a degradar-se comparativamente aos materiais de base ácido láctico e glicólico. Deste ponto de vista, os materiais à base de PCL são mais estáveis e duradouros, sendo por isso ideais para aplicações mais prolongadas, assim como não há um risco tão grande de uma resposta inflamatória adversa devido à acumulação dos componentes acídicos provenientes da sua degradação. Estas características, associadas a todas as propriedades anteriormente mencionadas, fazem da PCL um dos polímeros mais importantes a usar na produção de fibras por *electrospinning* para obter produtos finais de elevado valor acrescentado em contexto biomédico [60]. Podem-se referir diversos modos de execução da técnica de *electrospinning*, nomeadamente: 1) em solução ou 2) por fusão [61]. Em solução, o polímero é previamente dissolvido em um solvente adequado, enquanto por fusão o polímero é fundido antecipadamente. A grande vantagem do segundo modo é não necessitar de usar solventes orgânicos tóxicos para solubilizar o polímero, sendo ideal para aplicação a larga escala. Todavia, são necessárias elevadas temperaturas, o que conduz a maiores gastos energéticos. Em solução, o processo pode ser realizado à temperatura ambiente [61]. Também o solvente poderá ser adequado, para que seja o menos tóxico possível, dadas as aplicações de interesse. Neste trabalho, e de acordo com a disponibilidade de equipamento em laboratório, foi adotada a forma mais simples e convencional de *electrospinning*, com solubilização prévia do polímero. Um esquema simples da montagem é apresentado na Figura 1.1.

Para a execução da técnica coloca-se, em primeiro lugar, uma solução polimérica numa seringa com uma agulha na sua extremidade. A bomba infusora permite controlar o fluxo contínuo de solução à saída da agulha; esta, ao empurrar o êmbolo da seringa força a saída da solução da seringa e forma-se uma gota na ponta da agulha. Aplicando uma tensão nesta, eleva-se o potencial electrostático da gota e as cargas induzidas distribuem-se uniformemente à superfície. A gota sofre então o efeito das forças electrostáticas de repulsão (entre as cargas superficiais) e da força de Coulomb do campo elétrico externo (gerado entre a ponta da agulha e o



**Figura 1.1** Esquema da montagem experimental do processo convencional de *electrospinning*, culminando com a formação de uma matriz polimérica fibrosa (polímero em solução).

coletor de potencial zero que se encontra a uma dada distância da mesma), formando-se e alongando-se o cone de Taylor (a gota na ponta da agulha adquire uma forma cônica).

A partir de um determinado valor de campo elétrico, as forças electrostáticas repulsivas induzidas na gota superam a tensão superficial da solução polimérica e um jato é então projetado da ponta do cone de Taylor em direção ao coletor. O jato é continuamente alongado devido à repulsão entre as cargas elétricas transportadas. À medida que há a evaporação do solvente, a solução vai solidificando. Finalmente dá-se a sua deposição no coletor, obtendo-se uma matriz de nanofibras dispostas aleatoriamente [16,58,59].

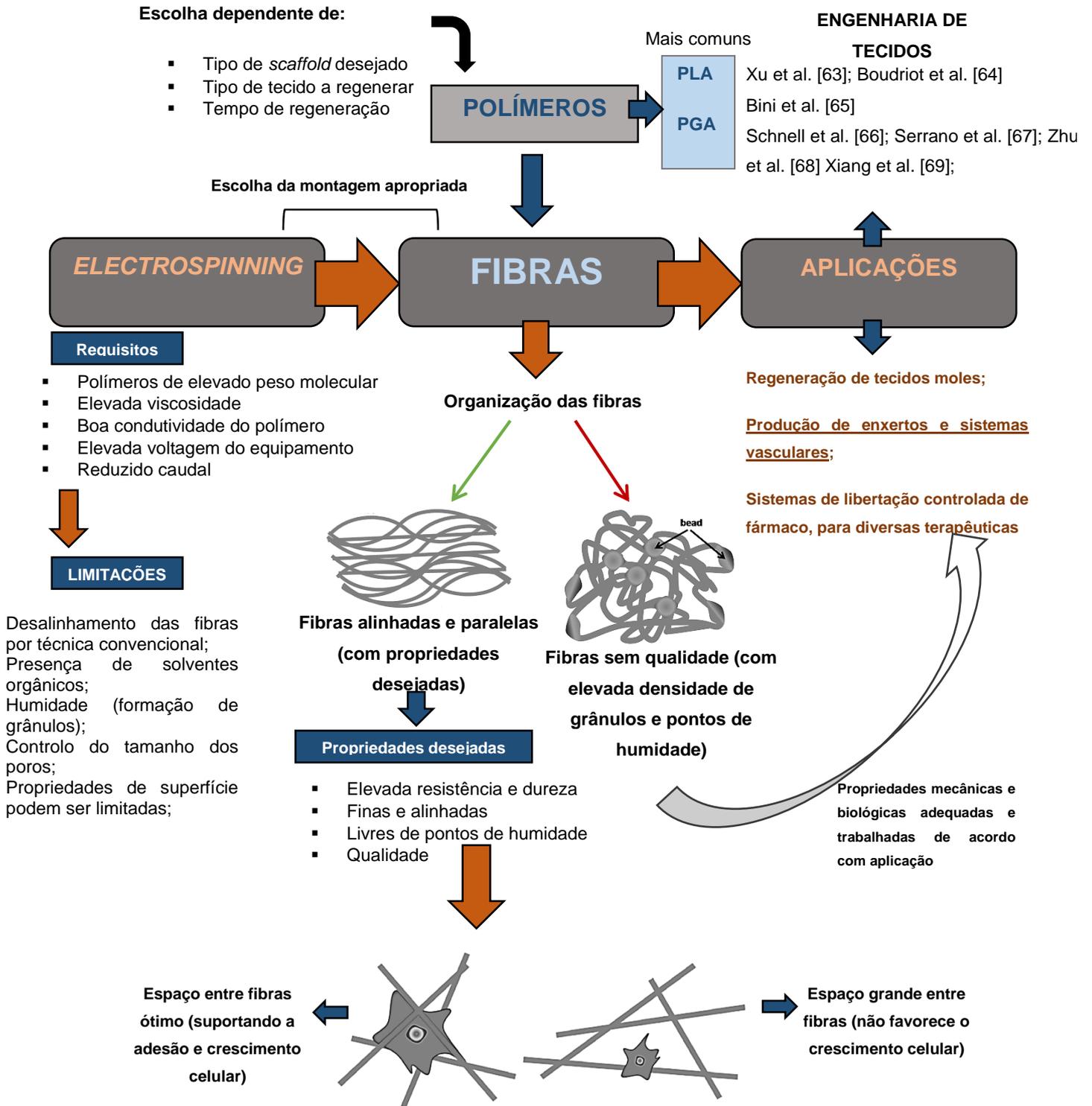
### 1.5.1. Parâmetros do processo, características das fibras e sua aplicação

A morfologia das fibras produzidas por *electrospinning* depende de diversos fatores, nomeadamente do material/polímero escolhido e das suas características (como o

peso molecular), da solução polimérica obtida (tipo de solvente, viscosidade, densidade, tensão superficial, condutividade elétrica), assim como de parâmetros intrínsecos à própria técnica (voltagem aplicada, caudal, distância da agulha da seringa ao coletor, etc.) e finalmente das condições ambientais em que é executada (temperatura e humidade) [61,62].

De um modo geral, as fibras são produzidas com mais qualidade partindo de polímeros com pesos moleculares superiores. No entanto, se partirmos de soluções poliméricas mais viscosas, o diâmetro das fibras tende a ser superior, o que contribui para um aumento do tamanho dos poros do *scaffold* final. Por outro lado, se partirmos de soluções com maior condutividade (ou se aumentarmos a voltagem aplicada), o diâmetro das fibras tende a ser menor. Neste caso, o que interessa é ter *scaffolds* com um espaço entre fibras e poros de tamanho adequados à acomodação das células e ao seu crescimento [61,62].

Para se obter um alinhamento das fibras em uma dada direção específica, pode-se aumentar a velocidade-alvo no sistema, todavia o caudal é geralmente reduzido para que haja evaporação do solvente das fibras. Independentemente da aplicação pretendida, as fibras não só devem exibir uma resistência adequada, como devem estar alinhadas e ser paralelas. As fibras devem ainda ser o mais homogêneas possíveis e apresentando o mínimo de *beads*. É fundamental que o procedimento experimental seja realizado em condições ambientais adequadas, sem humidade. A densidade de possíveis grânulos ou a formação de pequenos enlacs pode ser prevenida ou evitada com o aumento da concentração das soluções poliméricas utilizadas, contribuindo para uma maior uniformidade das fibras. A Figura 1.2 pretende sistematizar todos os aspetos referidos, salientando algumas referências de estudos relevantes neste âmbito.



**Figura 1.2** Sistematização dos parâmetros requeridos para o processo de *electrospinning* e dos requisitos das fibras obtidas. Relação com aplicações e referência a estudos relevantes (Figuras das fibras retiradas de [61]). Baseado em [57,61,62].

Dada a diversidade de aplicações possíveis para as fibras produzidas por *electrospinning* (cirurgia e cicatrização, libertação controlada, sistemas vasculares, ossos e cartilagens, tecidos de músculos e nervos, etc.), são cada vez mais os estudos por parte da investigação desenvolvendo *scaffolds* com todo o tipo de polímeros sintéticos e naturais e testando todos os tipos de células (endoteliais, fibroblastos e osteoblastos humanos, entre outras) para avaliarem o seu desempenho biológico.

Para um melhor conhecimento do tema, destacam-se, a título de exemplo, as revisões de Agarwal et al. [57] e Kanani et al. [70] que fazem uma importante compilação de estudos sobre o uso de fibras produzidas por *electrospinning* em aplicações particulares. Além destas, o trabalho de Malafaya et al. [71] expõe todas as investigações relevantes feitas com polímeros naturais para as áreas de Engenharia de Tecidos.

De forma resumida, o recurso ao *electrospinning* para fabricar matrizes para Engenharia de Tecidos oferece então as seguintes vantagens [16,58,59]:

- A facilidade na alteração de parâmetros como o fluxo de saída da solução, o campo elétrico e a distância ao coletor, permitem a produção de fibras extremamente finas e produzir matrizes com propriedades geométricas e estruturais capazes de replicar a dimensão estrutural da ECM nativa de uma vasta variedade de tecidos e órgãos;
- As matrizes que são produzidas providenciam microestruturas altamente porosas onde os poros estão interconectados com um rácio entre área de superfície/volume extremamente grande, o que é favorável ao crescimento celular;
- A facilidade de funcionalização das fibras para diferentes objetivos e conjugação química com moléculas específicas;
- Propriedades mecânicas superiores, resultado das ligações moleculares mais fortes deste tipo de fibras;
- Facilidade de manipular e trabalhar propriedades como o diâmetro das fibras, morfologia de superfície, porosidade e distribuição de poros;
- Propriedades biológicas e mecânicas podem ser alteradas variando a composição das misturas base, o que não é fácil em outros métodos de produção de *scaffolds*.

Com isto, a produção de fibras por *electrospinning* revela-se extremamente interessante para atingir materiais com desempenhos superiores na criação de condições favoráveis para a formação de tecidos nativos. Recorrendo a um método de fácil execução, de simples montagem e baixo custo, podem ser construídos materiais interessantes partindo da PCL, combinando depois com as formulações de base hidrogel (a partir de gelatina), como mencionado anteriormente.

A combinação de técnicas por *electrospinning* e fotopolimerização traz assim como vantagens teóricas maior uniformidade para a distribuição celular através dos *scaffolds*, melhor capacidade de adesão e proliferação celular e, à partida, superiores propriedades mecânicas devido à ação das fibras [62].

De polímeros sintéticos, há uma tendência para ver a PCL misturada com componentes naturais, talvez pelas questões já referidas de aumento da sua hidrofiliabilidade, implementação de locais de reconhecimento celular e manipulação de taxas de degradação. De todas as aplicações que pode ter, há uma clara associação das fibras de PCL à produção de enxertos vasculares que pretendem substituir e mimetizar vasos sanguíneos danificados [72].

O conceito de misturar gelatina à PCL para produção de *scaffolds* é uma aproximação que pode não só reduzir o potencial problema de citotoxinas (resultado de usar reagentes químicos de reticulação para uma aplicação biomédica de longo prazo), como também oferecer novas soluções que ultrapassem as desvantagens de ambos os polímeros, produzindo novos materiais com boa biocompatibilidade, boas propriedades mecânicas e características físico-químicas melhoradas [22,73]. Da PCL tira-se partido da sua maior resistência em ambiente biológico e condições fisiológicas, outrora características que podem ser trabalhadas em Engenharia dada a sua facilidade de modificação. Da gelatina, tira-se partido da sua biofuncionalidade, capaz de interagir melhor com as células que se pretendem regenerar. De notar, no entanto, que estruturas deste género devem ser pelo menos reticuladas uma vez, não só para melhorar a resistência à água da gelatina, mas também para não comprometer a sua performance mecânica quando associada à PCL.

Nos próximos capítulos pretende-se destacar a produção de *scaffolds* sintetizados a partir de misturas PCL/gelatina, com relevância em diversas áreas clínicas, nomeadamente:

implantes e substitutos dérmicos, sistemas para regeneração neurológica e ainda doenças vasculares (tópico de maior interesse nesta dissertação). É de notar que os principais estudos aqui reportados referem-se à produção de matrizes fibrosas compósitas. A combinação de técnicas de fotoreticulação e *electrospinning* é já algo visto para sistemas vasculares, com a construção de hidrogéis de base PEG e sua conjugação com fibras poliméricas de poli (éster de uretano) (PEU) [62]. Também é possível ver sistemas de PCL/gelatina a serem explorados. Todavia é uma área que carece de inovação, principalmente pelas duas abordagens experimentais que serão testadas neste trabalho.

## 1.6. Aplicações biomédicas de *scaffolds* PCL/gelatina

Relativamente a matrizes compósitas, Zhang et al. [74] testaram a produção de um material de base PCL/gelatina (com concentrações iguais de ambos os polímeros) produzido por *electrospinning*, com o objetivo de potenciar e expandir as aplicações da gelatina em matrizes para Engenharia de Tecidos. No seu estudo verificaram, através de estudos de bioatividade e biocompatibilidade, que os *scaffolds* compósitos exibiam não só uma ótima capacidade como matrizes para migração celular, como também permitiam a penetração ou infiltração celular dentro das estruturas fibrosas de gelatina/PCL. Os investigadores referiram que esse facto se devia essencialmente a dois aspetos [73-75]:

- A dissolução da componente gelatina das matrizes durante a cultura celular, criando assim mais espaço para a migração celular, em vez de as células aderirem somente à superfície da matriz de PCL.
- O facto da matriz estudada revelar boas propriedades de alongação e deformação, sendo que estas propriedades mecânicas providenciavam a facilidade de abertura de espaços para penetração celular a níveis mais profundos da matriz.

As vantagens de matrizes deste género, destacadas por estes investigadores, passam ainda pelo facto de que a introdução do polímero natural na PCL permite uma melhoria na hidrofiliabilidade e afinidade celular devido à constante libertação de moléculas de gelatina, criando assim um ambiente favorável à adesão e proliferação celular. Estas conclusões corroboram os factos anteriormente mencionados sobre estes sistemas [22,73,74,75].

### 1.6.1. Substitutos dérmicos

Chong et al. [76] realizaram um estudo partindo de um dos requisitos da Engenharia de Tecidos: a criação de substitutos de pele deve assentar numa matriz biocompatível e bioassimilável, através da qual os fibroblastos possam migrar e consequentemente povoar. Nesse estudo, associou-se a um dispositivo médico de base poliuretano (presente no mercado para revestimento e proteção de feridas), de nome comercial Tegaderm, uma matriz compósita de PCL/gelatina, em proporções iguais, ficando a matriz diretamente em cima do dispositivo através da técnica de *electrospinning*. Esta associação foi feita com vista a melhorar o potencial deste dispositivo, tornando-o num auxiliar à regeneração dérmica, ao mesmo tempo que protegia a lesão durante a sua regeneração. Este estudo refere ainda a vantagem da técnica de produção permitir a obtenção de matrizes que se assemelham à ECM natural da pele, sendo que a análise morfológica da matriz revelou porosidade adequada para um substituto dérmico e, tal como no estudo de Zhang et al. [74], Chong et al. [76] concluíram que esta matriz se revelava um bom suporte para a proliferação celular (neste caso, de fibroblastos humanos de origem dérmica).

Estas propriedades únicas das matrizes obtidas a partir da combinação de nanofibras de PCL e de gelatina requerem então especial atenção devido ao seu potencial para a criação de análogos dérmicos na assistência à regeneração da pele.

### 1.6.2. Sistemas para regeneração de tecidos nervosos

A área da reparação de tecidos nervosos em Engenharia de Tecidos é considerada uma das mais importantes para a qualidade de vida humana. *Scaffolds* exibem um papel fulcral neste campo científico. Zan and Lan [77] mencionam que, nos últimos anos, tem-se demonstrado o potencial de utilização de fibras produzidas por *electrospinning* utilizando polímeros biodegradáveis como o PLA e as polidioxanonas, com interações bastante favoráveis com as células de tecidos nervosos. Também materiais de base caprolactona têm sido explorados, com particular atenção para a morfologia das células e seu comportamento de proliferação em *scaffolds* nanofibrosos. Todavia, é na mistura de polímeros que se tem conseguido superar desafios e alcançar novos materiais com propriedades promissoras.

Mobarakeh et al. [78] produziram biocompósitos de gelatina/PCL a partir de diferentes concentrações de ambos os polímeros. Dos ensaios biológicos realizados com células nervosas estaminais, os autores constataram que o compósito gelatina/PCL (numa dada proporção) apresentou valores de viabilidade celular superiores comparativamente a matrizes fibrosas apenas de PCL, o que prova que a introdução da gelatina favoreceu o reconhecimento e proliferação celular. Ainda assim, percebeu-se que a biocompatibilidade dos materiais não era linear com o aumento da proporção de gelatina no *scaffold*. Os melhores resultados de biocompatibilidade não foram para as matrizes compostas por mais gelatina, mas sim para uma composição de 70:30 (PCL/gelatina). A direção de alongação das células nervosas revelou-se também paralela à direção das fibras. Da caracterização efetuada, concluiu-se a potencialidade dos materiais para acomodação, adesão, crescimento e diferenciação deste tipo de células.

## 1.7. Doenças Vasculares — *Stents* e sistemas vasculares

### 1.7.1. Motivações

As doenças cardiovasculares são a causa de morte número 1 a nível mundial. Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), no ano 2012, cerca de 31% das mortes foram causadas por doenças cardiovasculares, correspondendo à morte de 17,5 milhões de pessoas, estimando-se a sua ascensão para 25 milhões em 2030 [79,80]. Para se ter uma noção de uma dimensão mais reduzida, só nos EUA 1,4 milhões de doentes precisam de próteses arteriais. Contudo, de acordo com Hasan et al. [62] as opções que estão atualmente disponíveis têm limitado o sucesso clínico da substituição de sistemas vasculares.

Muitas das doenças cardiovasculares estão relacionadas com um processo denominado por aterosclerose. A aterosclerose é uma doença inflamatória na qual há a acumulação de lípidos e macrófagos dentro dos vasos sanguíneos podendo levar à obstrução total ou rutura do vaso sanguíneo, originando deste modo a trombose arterial [80]. Esta obstrução origina uma clara redução da área disponível para a normal circulação do fluxo de sangue, resultando numa má (ou inexistente) irrigação dos tecidos e órgãos. Sempre que isto

acontece, podem ser necessárias operações para substituição e reparação de vasos sanguíneos danificados.

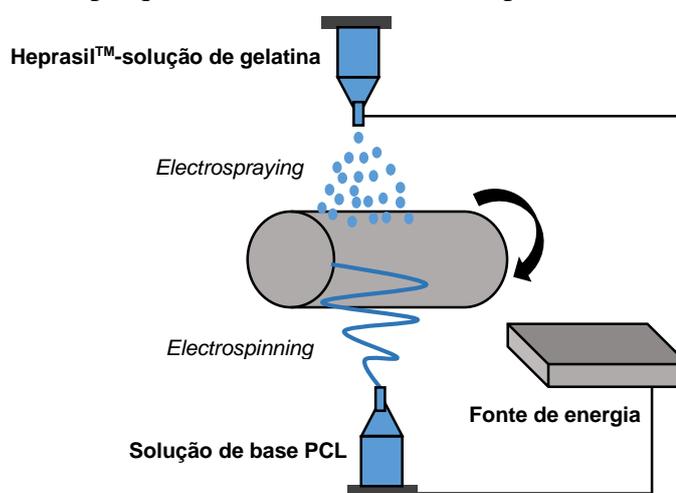
São várias as opções disponíveis nesse sentido, entre elas: enxertos autólogos (para revascularização do miocárdio com artérias mamárias autólogos), enxertos de cadáveres, xenotransplantes, e ainda próteses vasculares sintéticas produzidas a partir de polímeros como o politetrafluoretileno expandido ou o polietileno tereftalato (PET) [62]. Todavia, existem diversas limitações. O uso de enxertos é muitas vezes dificultado pela falta de dadores de tecido. Por outro lado, enxertos de origem animal apresentam tempos de duração de 15 anos, o que exigiria a sua substituição ao fim desse tempo. Além disso, não há um controlo adequado sobre as propriedades mecânicas e físicas, assim como há o risco de calcificação e ocorrência de inflamações/irritações dos tecidos envolventes.

Neste sentido, uma intervenção alternativa que pode ser bastante eficaz na resolução destes problemas é o uso de *stents* vasculares. Um *stent* vascular é um pequeno tubo expansível que é inserido nas veias e artérias, e posteriormente expandido no local desejado, a fim de desobstruir e tratar as que estão enfraquecidas, agindo deste modo como um *scaffold* na estabilização das mesmas [80,81]. No Anexo A encontram-se os vários tipos de *stents* já existentes no mercado.

A motivação nesta área, da visão do engenheiro, é fabricar *scaffolds* adequados ao encapsulamento ou crescimento de células estaminais dos vasos sanguíneos, caracterizando-os em termos biológicos e percebendo que propriedades se devem manipular para a produção de novos *stents* que possam ter melhores desempenhos aos já existentes. De todas as técnicas possíveis, as mais promissoras são a fotopolimerização (para obtenção de hidrogéis versáteis) e o *electrospinning* (para a produção de fibras que mimetizam o ambiente natural da ECM), dadas as vantagens processuais já mencionadas nos capítulos 1.4 e 1.5. Comercialmente, já existem empresas a fabricar sistemas vasculares por *electrospinning* para o transplante de traqueias e/ou outros tipos de tubos/passagens. O primeiro transplante com este tipo de sistemas já foi demonstrado com sucesso em Junho de 2011, na Suécia [62].

### 1.7.2. Estudos realizados

De combinação de técnicas, salientam-se os estudos reportados por Hasan et al. [62] de materiais feitos por multicamadas e o trabalho de Ekaputra et al. [82] de produção de *scaffolds* híbridos. No primeiro caso, matrizes fibrosas são produzidas por *electrospinning* e depois sujeitas a um revestimento em camadas de hidrogel de base PEG, sendo o sistema final sujeito a irradiação UV para reticulação final da matriz polimérica externa. No segundo caso, os investigadores combinaram PCL/colagénio com um hidrogel comercial de base ácido hialurónico-gelatina (Heprasil™). O hidrogel foi aplicado por *electrospraying* ao mesmo tempo que as fibras de PCL eram produzidas no molde por *electrospinning*, formando-se assim um *scaffold* com dupla camada (Figura 1.3). Este híbrido apresentou melhores propriedades mecânicas e biológicas (em contacto com células humanas de osteoblastos), em comparação ao sistema só composto por fibras. Dos estudos, conclui-se a importância de combinação de materiais e técnicas na obtenção de produtos finais com propriedades muito melhores e que facilmente se controlam de acordo com as aplicações alvo.



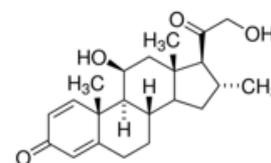
**Figura 1.3** Esquema de montagem experimental de *electrospinning* combinado com *electrospraying* de um hidrogel comercial (Heprasil™). Baseado no estudo de Ekaputra et al. [82].

Em sistemas PCL/gelatina pode-se ainda destacar a investigação de Wei Fu et al. [83] na preparação de *scaffolds* compósitos por *electrospinning* para tecidos vasculares. Para esta aplicação, os materiais finais exibiram boas propriedades mecânicas, com a capacidade de adesão e proliferação celular. Em ensaios *in vivo* em ratos foi mostrado que esta combinação apresentava uma boa biocompatibilidade com o meio envolvente, contudo a sua taxa de degradação era muito lenta, o que dificultava a regeneração do tecido vascular [83].

### 1.7.3. Tratamentos e terapêuticas – Incorporação de dexametasona em *stents*

Em doenças vasculares, os tratamentos mais comuns e menos invasivos são as angioplastias e a implantação de próteses endovasculares (*stents*). A angioplastia coronária, por exemplo, consiste na desobstrução das artérias coronárias por introdução de um cateter balão, a fim de melhorar e aumentar o fluxo de sangue para o coração. Neste procedimento, é geralmente introduzido um *stent* vascular para manter a artéria aberta (Hamalainen et al. [84]). Todavia, em 10 a 20% dos casos de implantação de *stents*, após 3 a 6 meses do procedimento, ocorre um fenómeno designado por reestenose (que consiste no reestreitamento dos vasos sanguíneos devido à migração e proliferação de células musculares lisas vasculares no local). Em casos de reestenose, os pacientes poderão necessitar de uma nova angioplastia, da implantação de um novo *stent* ou então de uma cirurgia de revascularização. Em *stents* de metal puro, por exemplo, a reestenose ocorre em 15 a 30% dos casos [85]. Além disso, em todos os *stents* implantados pode ainda ocorrer a formação de coágulos, simplesmente pelo facto dos materiais base poderem ser trombogénicos. A formação de trombos no biomaterial pode originar uma nova obstrução dos vasos, com o conseqüente bloqueamento do fluxo sanguíneo. Para contornar e prevenir estes problemas começou-se a desenvolver *stents* com ação farmacológica. A introdução clínica deste tipo de sistemas reduziu a reestenose em 40 a 70% dos casos em que acontecia, segundo Hamalainen et al. [84]. Além do material em si, nestes sistemas incorpora-se um fármaco que se liberta de forma prolongada, reduzindo os processos de coagulação e tratando possíveis inflamações. Da diversidade

de agentes e fármacos existentes, os glucocorticoides (em especial a dexametasona) têm sido sugeridos pelos investigadores por prevenirem a formação de reestenose. A dexametasona (Figura 1.4) é um anti-inflamatório esteroide e é, segundo estudos, capaz de inibir a proliferação de células musculares lisas vasculares (Zilberman et al. [86]). Deste



**Figura 1.4** Estrutura química da dexametasona (retirada de Sigma-Aldrich)

modo, tem sido bastante explorada como componente ativo dos *stents* vasculares. De notar que o trabalho de Hamalainen et al. [84] faz uma importante revisão sobre a sua incorporação, tanto em *stents* metálicos, como em *stents* produzidos a partir de polímeros biodegradáveis, reportando os resultados mais relevantes.

## 2. OBJETIVOS EXPERIMENTAIS

O trabalho experimental realizado nesta dissertação centra-se na produção de *scaffolds* de PCL/gelatina por combinação de estratégias de fotoreticulação e *electrospinning* usando duas abordagens de síntese diferentes. A Figura 2.1 pretende esquematizar o processo experimental que foi realizado neste trabalho.

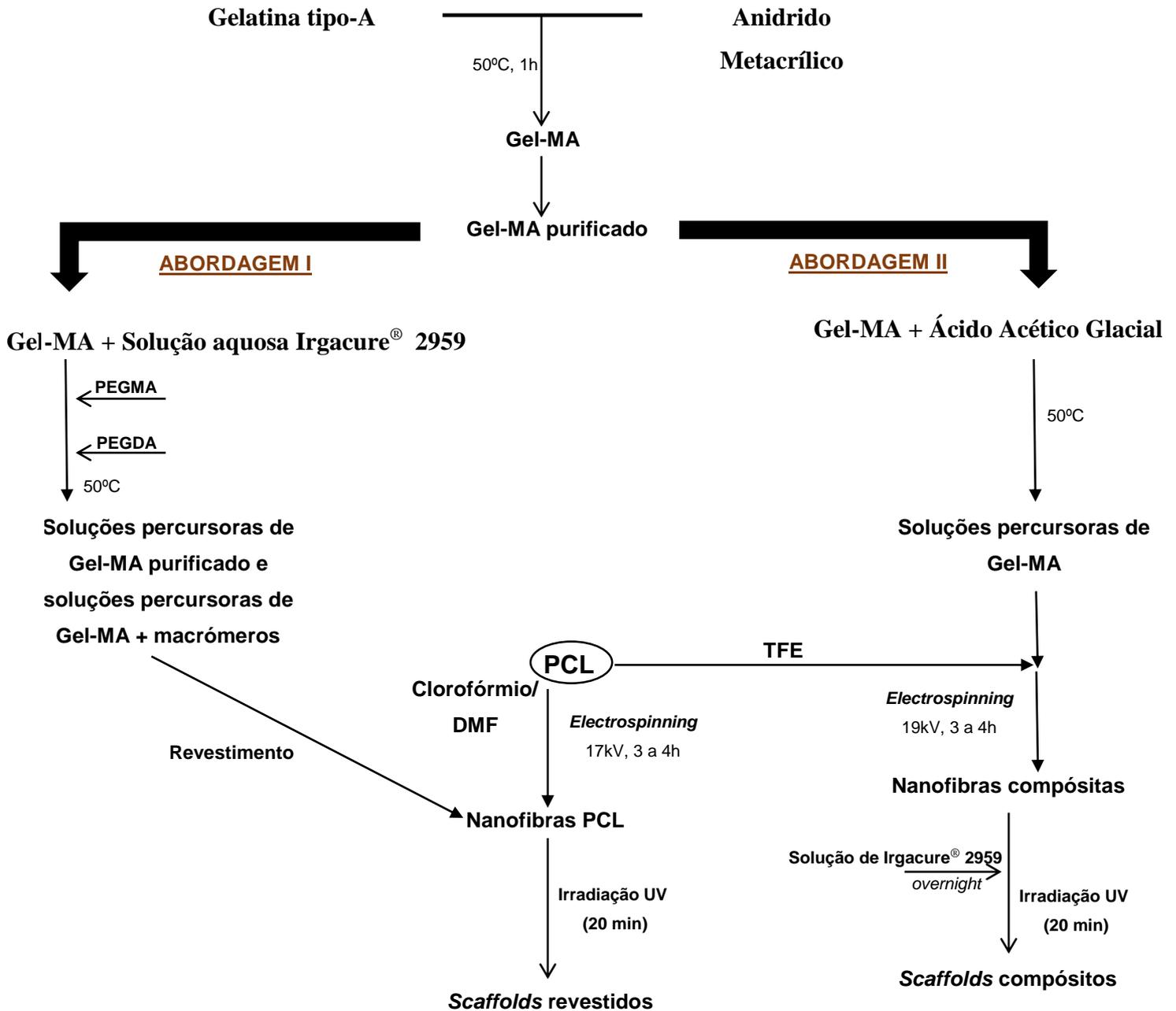


Figura 2.1 Esquema do processo experimental para a produção de *scaffolds* por combinação de técnicas de *electrospinning* e fotoreticulação.

O foco principal do trabalho está na obtenção de matrizes versáteis, partindo de formulações otimizadas, e na caracterização de todos os materiais sintetizados (para aferir a potencialidade destes de atuarem como *stents* vasculares ou sistemas de regeneração vascular). Pretende-se deste modo avaliar propriedades físico-químicas e térmicas, assim como perceber a interação dos materiais com componentes biológicos como o sangue e células endoteliais humanas. Além disso, pretende-se também incorporar dexametasona em alguns *scaffolds*, avaliando de forma preliminar os perfis de libertação alcançados.

## 2.1. Abordagem experimental I

Na primeira parte do trabalho pretende-se desenvolver *scaffolds* onde se combinam matrizes fibrosas de PCL produzidas por *electrospinning* com hidrogéis fotoreticuláveis à base de gelatina modificada. A PCL será previamente dissolvida em solventes orgânicos apropriados, obtendo-se deste modo uma solução com a viscosidade adequada para ser sujeita a *electrospinning*. As fibras obtidas serão revestidas com diferentes hidrogéis fotoreticuláveis, construídos a partir de gelatina funcionalizada com grupos metacrílicos. Para modificar a gelatina, utilizar-se-á um agente funcional largamente explorado em contexto biomédico: o anidrido metacrílico. Na construção dos hidrogéis, utilizam-se diferentes proporções de gelatina modificada. Serão também usados diferentes macrómeros à base de PEG, que originarão hidrogéis finais com propriedades distintas. Na produção dos hidrogéis pretende-se recorrer à fotoreticulação por ser uma técnica bastante eficaz, de utilização rápida e de baixo custo energético. Para isso, será usado o fotoiniciador Irgacure<sup>®</sup> 2959, da BASF.

O objetivo em revestir as fibras com os hidrogéis é motivado, em primeiro lugar, pela possibilidade de combinação de dois polímeros versáteis (como a PCL e gelatina), sendo tão comuns na área médico-farmacêutica. Em segundo lugar, pretende-se obter sistemas finais com boa resistência mecânica (garantida pelas fibras) e de elevada biocompatibilidade (promovida pela interação dos hidrogéis de gelatina com os tecidos alvo). Com a obtenção de diferentes composições, pretende-se perceber quais os melhores produtos a explorar para a aplicação pretendida. Aos produtos desenvolvidos por esta via irá ainda incorporar-se o fármaco de interesse, avaliando o seu potencial como sistemas de libertação controlada.

## 2.2. Abordagem experimental II

Nesta abordagem, pretende-se combinar na mesma a PCL com a gelatina modificada, sintetizando fibras compósitas com ambos os polímeros por *electrospinning*, para posteriormente sujeitar os *scaffolds* compósitos finais ao processo de fotoreticulação. Esta abordagem pretende ser mais simplista do ponto de vista processual, sendo no entanto inovadora, visto ainda ter sido pouco investigada. Numa primeira fase, a gelatina modificada e a PCL são dissolvidas numa mistura de solventes, até garantir homogeneidade. A solução obtida é sujeita a *electrospinning*, para formar as fibras compósitas. Estas fibras serão de seguida mergulhadas numa solução de Irgacure<sup>®</sup> 2959 (previamente preparada) e exposta a luz UV, de forma a reticular a gelatina modificada presente nas mesmas. Deste modo, a resistência mecânica da gelatina será melhorada, estando esta em conjunto com a PCL. Mais uma vez, serão definidas as melhores proporções mássicas de ambos os polímeros, assim como dos restantes componentes das formulações.

Com isto, o objetivo é obter dois grandes grupos de *scaffolds*: 1) Fibras sintéticas revestidas por hidrogéis fotoreticuláveis; 2) e fibras compósitas contendo gelatina fotoreticulada. Todos os materiais obtidos serão largamente caracterizados, sendo os resultados obtidos estudados e discutidos de acordo com a aplicação. No próximo capítulo são apresentados todos os materiais utilizados nos ensaios laboratoriais, assim como os métodos de síntese (para ambas as abordagens experimentais) e os métodos de caracterização realizados.



## 3. MATERIAIS E MÉTODOS

### 3.1. Materiais

A gelatina tipo A (de pele suína), o anidrido metacrílico (MAA) (94%), os macrómeros polietileno glicol acrílato (PEGMA) e polietileno glicol diacrilato (PEGDA), a policaprolactona (PCL) 70-90KDa e as pastilhas PBS foram adquiridos à *Sigma-Aldrich* (Sintra, Portugal). Os solventes clorofórmio (99,8%), dimetilformamida (99,8%), ácido acético glacial (99,7%) e 2,2,2-trifluoroetanol (TFE) (99%) foram adquiridos à *Fisher Scientific* (Estados Unidos da América). O fotoiniciador 2-hidroxi-1[4-(2-hidroxietoxi)fenil]-2-metil-1-propanona, com o nome comercial de Irgacure<sup>®</sup> 2959 (97-99%) foi gentilmente fornecido pela BASF (Alemanha).

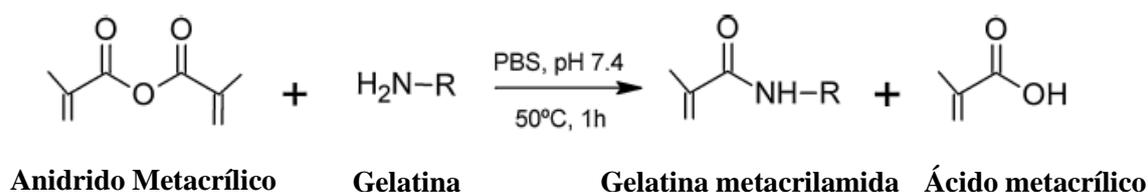
Nos ensaios da hemocompatibilidade, o sangue ACD-A de coelho foi fornecido pela PROBIOLÓGICA (Empresa de Produtos Biológicos, Lda.) (Lisboa, Portugal) e utilizado no mesmo dia em que foi recebido. Também se utilizaram os reagentes di-hidrogenofosfato de potássio (99,5%) e cloreto de cálcio (99,5%), da CHEM-LAB, cianeto de potássio (97%), da *ACROS Organics*, ferrocianeto de potássio (99%) e formol (37%, estabilizado com metanol), da *Sigma-Aldrich*, e o tensoativo não iónico Triton X<sup>®</sup>-100, também ele da *Sigma-Aldrich*.

Finalmente para os materiais utilizados nos ensaios da biocompatibilidade, o meio *Eagle* modificado por *Dulbecco* (DMEM-F12), ácido etilenodiaminotetracético (EDTA), caldo LB (*LB Broth*), canamicina (*Kanamycin*), pastilhas PBS, estreptomomicina (*Streptomycin*) e tripsina (*Trypsin*) foram adquiridos à *Sigma-Aldrich* (Sintra, Portugal). Células endoteliais circulantes (CEC) foram obtidas pela *PromoCell (Labclinics, S.A.; Barcelona, Espanha)* e utilizadas nos ensaios de citotoxicidade. Finalmente, brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5- difeniltetrazólio (MTT) foi adquirido à *Promega (Madison, Wisconsin, E.U.A.)*.

## 3.2. Preparações dos *scaffolds*

### 3.2.1. Modificação de Gelatina com Anidrido Metacrílico

A primeira etapa do trabalho passou pela modificação química da gelatina de forma a introduzir na sua estrutura ligações de carbono duplas possíveis de serem fotoreticuladas. Para isto, fez-se reagir gelatina com o composto anidrido metacrílico (MAA) em meio aquoso [22,87]. O esquema reacional da funcionalização da gelatina com o MAA é apresentado na Figura 3.1.



**Figura 3.1** Representação esquemática da reação de funcionalização da gelatina com MAA (retirado de [34]).

Assim, na preparação da gelatina funcionalizada, designada aqui por Gel-MA, dissolveu-se 10 g de gelatina do tipo-A em 100 mL de uma solução PBS (pH=7,4), sob agitação a 700 rpm, e a uma temperatura de 50 °C. Foi depois acrescentado a essa solução 1 mL de MAA para promover a reação de funcionalização. O tempo da reação de modificação foi de 1h [22].

Posteriormente, o produto funcionalizado foi inserido em membranas de diálise (pesos moleculares entre 12-14kDa), para purificar o gel obtido. O processo de diálise decorreu por 4 dias havendo uma renovação constante de água destilada 3 vezes ao dia, sob constante agitação, de modo a promover a libertação de subprodutos da reação de modificação da gelatina ou até mesmo monómero livre MAA não reagido. Esta purificação foi efetuada logo na fase inicial do processo para garantir a remoção de substâncias acídicas (que poderiam desde logo comprometer a biocompatibilidade dos materiais finais). Terminada a purificação, as amostras foram congeladas e colocadas a liofilizar para remover todo o teor de água existente nas mesmas. O processo de liofilização decorreu por um período de 3 dias, garantindo o adequado congelamento das amostras durante esse período.

### 3.2.2. Preparação dos *scaffolds* revestidos com hidrogel (Abordagem I)

Como referido anteriormente, numa primeira fase deste trabalho foram produzidas fibras de PCL que serão revestidas com um hidrogel à base de gelatina fotoreticulável. Assim, o desenvolvimento deste tipo de *scaffold* é dividido em três etapas. Numa primeira etapa, são preparadas membranas nanofibrosas de PCL (produzidas pela técnica de *electrospinning*). Na segunda etapa, são preparadas as soluções precursoras dos hidrogéis (partindo de diferentes formulações) e na terceira fase faz-se o revestimento das fibras de PCL com o hidrogel, mergulhando as membranas de PCL na solução precursora procedendo posteriormente à sua irradiação com luz UV.

#### 3.2.2.1. Preparação das membranas nanofibrosas de PCL por *electrospinning*

Na produção das fibras, 1,5 g de PCL foi dissolvida numa mistura de 10 mL clorofórmio/DMF (70:30) (v/v) sob agitação magnética. O clorofórmio foi usado devido à elevada solubilidade da PCL neste composto. Já o DMF foi utilizado para promover um aumento da condutividade elétrica da solução polimérica final, facilitando assim o processo de *electrospinning* (maiores condutividades dão origem a fibras mais finas) [88].

Seguidamente iniciou-se o processo de *electrospinning* inserindo a solução de PCL na seringa. Esta foi introduzida numa bomba infusora, modelo *NE-1000 Multiphaser* da *New Era Pump Systems*, sendo aplicada uma dispersão de caudal de 2,5 mL/h para que a solução fosse libertada da seringa. Para terminar o processo, e de forma a produzir as fibras, foi aplicada uma voltagem de 17 kV proveniente de uma fonte de alta tensão que se encontra ligada à agulha metálica através de um cabo crocodilo. Daqui resulta a formação de fibras, que caem de forma aleatória e dispersa num coletor quadrado (ligado à terra), devidamente revestido com papel de alumínio.

#### 3.2.2.2. Preparação das soluções precursoras dos hidrogéis

Para preparar os hidrogéis finais, usados no revestimento das fibras de PCL, prepararam-se várias soluções em duas concentrações – 1 e 10 % (m/v), ou seja, 0,1g de sólidos (Gelatina-MA+macrómeros) / 10 mL de H<sub>2</sub>O com Irgacure<sup>®</sup> 2959 ou 1g sólidos / 10 mL de H<sub>2</sub>O com Irgacure.

Em algumas formulações adicionaram-se dois macrómeros sintéticos, o PEGMA e o PEGDA, que são dois componentes sintéticos fotoreticuláveis, de baixo peso molecular, que irão promover a reticulação dos materiais, mas também vão conferir plasticidade aos mesmos. Ao serem adicionados à Gel-MA, que é de base natural, obtêm-se redes poliméricas mais ajustáveis, melhorando as propriedades mecânicas e a cinética de degradação dos hidrogéis [89].

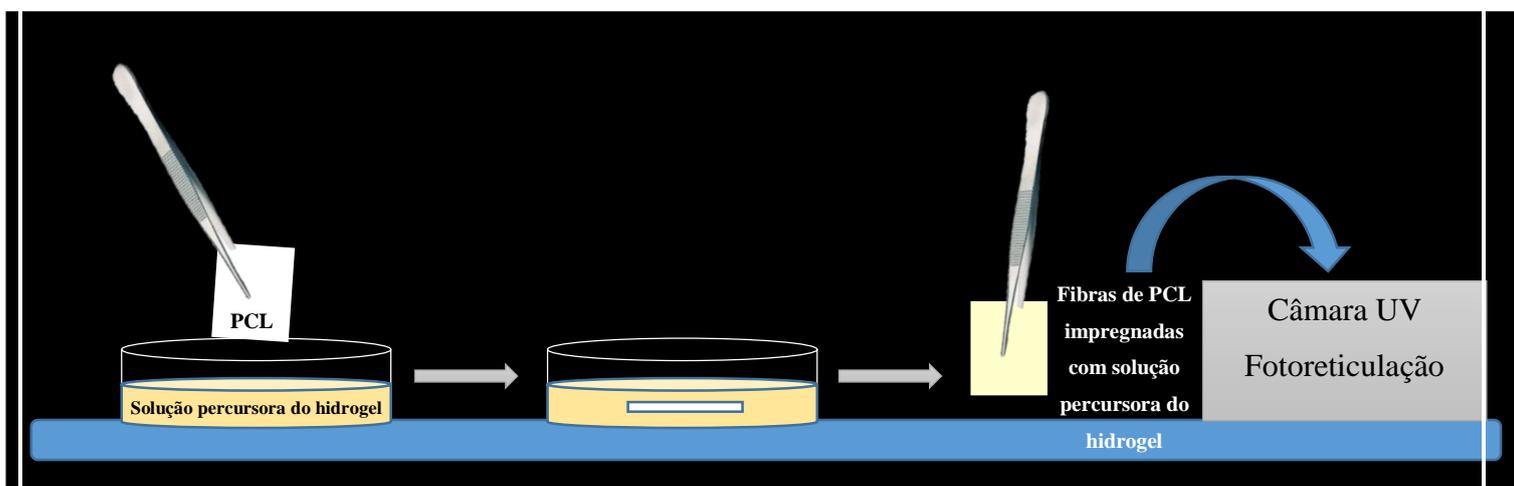
Na preparação dos materiais, os compostos usados foram adicionados a 10 mL de uma solução que continha o fotoiniciador, procedendo-se à sua solubilização em condições de agitação controlada e a uma temperatura de 50°C. A solução de fotoiniciador foi previamente obtida dissolvendo 0,015% (m/v) de Irgacure® 2959 em 100 mL de água destilada, sob agitação magnética. Produziram-se no total seis soluções precursoras de diferentes composições variando a percentagem de Gel-MA na formulação e a proporção dos macrómeros PEGMA e PEGDA. Na Tabela 3.1 apresentam-se todas as composições detalhadas dos hidrogéis preparados. No Anexo B encontram-se as estruturas químicas dos macrómeros PEGMA e PEGDA.

**Tabela 3.1** Composições detalhadas dos hidrogéis de gelatina preparados para revestimento das fibras.

Concentração % (m/v)	Composto	Massa usada (g)	Solvente	Designação Hidrogel
1	Gel-MA (100%)	0,100	10 mL H <sub>2</sub> O(Irg2959)	Gel-MA 1%
1	Gel-MA (50%) PEGMA (50%)	0,050 0,050	10 mL H <sub>2</sub> O(Irg2959)	Gel-MA/PEGMA 1%
1	Gel-MA (50%) PEGDA (50%)	0,050 0,050	10 mL H <sub>2</sub> O(Irg2959)	Gel-MA/PEGDA 1%
10	Gel-MA (100%)	1,000	10 mL H <sub>2</sub> O(Irg2959)	Gel-MA 10%
10	Gel-MA (50%) PEGMA (50%)	0,500 0,500	10 mL H <sub>2</sub> O(Irg2959)	Gel-MA/PEGMA 10%
10	Gel-MA (50%) PEGDA (50%)	0,500 0,500	10 mL H <sub>2</sub> O(Irg2959)	Gel-MA/PEGDA 10%

### 3.2.2.3. Construção do *scaffold* de fibras de PCL revestido com hidrogel fotoreticulável

Para revestir com o hidrogel as fibras de PCL anteriormente preparadas por *electrospinning*, recortaram-se pequenos quadrados das fibras produzidas (de dimensões conhecidas) e mergulharam-se individualmente em cada uma das soluções precursoras (que se encontram a 50 °C), até as fibras estarem bem impregnadas. A Figura 3.2 pretende ilustrar esse procedimento. Em seguida, as fibras impregnadas foram finalmente colocadas numa câmara UV (modelo UVGL-48, *Multiband UV*, da *Mineral light® Lamp*) durante 20 min (10 min para cada lado das membranas) de forma a ocorrer a formação do hidrogel, devido à reticulação.



**Figura 3.2** Ilustração do processo de revestimento das fibras de PCL com os hidrogéis fotoreticuláveis de base gelatina.

Terminado este processo, as amostras foram devidamente acondicionadas em local fresco para, numa fase posterior, serem completamente secas numa estufa de vácuo, à temperatura ambiente. Todos os *scaffolds* produzidos foram então armazenados em local seco, para prevenir a formação de pontos de humidade, até serem finalmente caracterizados. Na Tabela 3.2 apresenta-se a designação/nomenclatura dos *scaffolds* de PCL com o revestimento de hidrogel.

**Tabela 3.2** Nomenclatura dos *scaffolds* produzidos a partir de diferentes composições.

	<b>Hidrogel</b>	<b><i>Scaffold</i></b>
<b>Fibras de PCL</b>	Gel-MA 1%	PCL-Gel-MA 1%
	Gel-MA/PEGMA 1%	PCL-Gel-MA/PEGMA 1%
	Gel-MA/PEGDA 1%	PCL-Gel-MA/PEGDA 1%

Tabela 3.2 (cont.)

	<b>Hidrogel</b>	<b>Scaffold</b>
<b>Fibras de PCL</b>	Gel-MA 10%	PCL-Gel-MA 10%
	Gel-MA/PEGMA 10%	PCL-Gel-MA/PEGMA 10%
	Gel-MA/PEGDA 10%	PCL-Gel-MA/PEGDA 10%

### 3.2.3. Preparação dos scaffolds compósitos PCL/Gel-MA (Abordagem II)

Na segunda parte do trabalho preparou-se *scaffolds* compósitos de PCL/Gel-MA utilizando a técnica de *electrospinning*. O processo de produção deste tipo de *scaffolds* divide-se em duas partes: a preparação das soluções poliméricas com a subsequente realização das fibras por técnica de *electrospinning*, seguindo-se a fotoreticulação dos *scaffolds*.

#### 3.2.3.1. Preparação das fibras compósitas de PCL/Gel-MA

Neste caso, foram elaboradas duas soluções de fibras compósitas PCL/Gel-MA fixando a proporção PCL/Gel-MA de 70:30 (pois no decorrer do trabalho foram os materiais que apresentaram melhores resultados aquando a realização do *electrospinning*), alterando a percentagem em massa na solução final de 10% e 15 % (m/v). Na preparação destas fibras, a PCL foi dissolvida à temperatura ambiente em TFE e sob agitação magnética controlada. Por sua vez, a gelatina foi dissolvida em ácido acético, também sob agitação, e a uma temperatura de 50°C. Depois de solubilizados os polímeros, as duas soluções foram combinadas obtendo-se uma solução final homogénea. Na Tabela 3.3 estão apresentadas as composições e as designações dadas a cada *scaffold* preparado.

Tabela 3.3 Composição química dos *scaffolds* de PCL/Gel-MA e suas designações.

<b>Concentração</b>	<b>Soluto (30%)</b>		<b>Solvente (70%)</b>		<b>Designação Scaffold</b>
	PCL (g)	Gel-MA (g)	TFE (mL)	Ácido Acético Glacial (mL)	
<b>10 %</b>	0,7	0,3	7	3	PCL/Gel-MA 10 %
<b>15 %</b>	1,05	0,45	7	3	PCL/Gel-MA 15%

Preparadas as soluções, procedeu-se à formação das fibras PCL/Gel-MA por *electrospinning*, de acordo com o procedimento anteriormente descrito. No entanto, neste caso, foi necessário aumentar a voltagem do equipamento para 19 kV, uma vez estarmos perante uma solução polimérica diferente e, conseqüentemente, com características distintas. Formaram-se assim as fibras em cima de um coletor quadrado (ligado à terra) devidamente revestido com papel de alumínio.

### 3.2.3.2. Preparação dos *scaffolds* compósitos PCL/Gel-MA fotoreticuláveis

Para o processo de fotoreticulação destas fibras, e tal como aconteceu na produção dos *scaffolds* de PCL revestidos, preparou-se uma solução de 100 mL de 0,015 % (m/v) de Irgacure® 2959. Depois de dissolvido o fotoiniciador, as fibras PCL/Gel-MA foram incubadas durante a noite na solução de Irgacure® 2959. Terminada essa fase, procedeu-se à fotoreticulação das amostras em uma câmara UV (modelo UVGL-48, *Multiband UV*, da *Mineral light® Lamp*) durante 20 min (10 min para cada lado das membranas fibrosas, tal e qual o procedimento da primeira abordagem). Estas amostras foram secas à temperatura ambiente e posteriormente em condições de vácuo, para garantir a evaporação dos solventes usados nas formulações. Depois de secas, as amostras ficaram prontas para caracterização.

## 3.3. Caracterização

Produzidos os vários tipos de *scaffolds*, foram avaliadas as suas propriedades recorrendo a diversas técnicas de caracterização, cujos fundamentos teóricos e procedimentos serão apresentados de seguida.

### 3.3.1. Espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier com reflexão total atenuada (ATR-FTIR)

A análise por ATR-FTIR é uma técnica de espectroscopia (de imagem química livre e não destrutiva) muito importante para a caracterização de compostos químicos, pois permite identificar a presença de grupos funcionais presentes nos materiais [2,90]. É uma técnica altamente versátil, simples e eficaz na qual um feixe de radiação infravermelho (IV) é

incidido numa dada amostra e, para cada comprimento de onda, há a correspondência de um grupo funcional característico [2]. Este tipo de caracterização é então importante para identificar se há ou não a presença de grupos funcionais num material modificado.

Neste trabalho de dissertação as análises de ATR-FTIR foram realizadas num espectrofotómetro *Jasco FT/IR-4200* equipado com um *Golden Gate Single Reflection Diamond ATR*. Os espectros foram obtidos a 128 *scans* com uma resolução de  $4\text{ cm}^{-1}$ .

### 3.3.2. Morfologia das fibras por microscopia eletrónica de varrimento (SEM)

A microscopia eletrónica de varrimento (SEM) é bastante utilizada para visualizar a morfologia e composição da superfície de uma amostra. Para isso, um feixe de eletrões incide nesta e, dessa interação, resulta a emissão de eletrões e de raios-x que são detetados pelo aparelho, obtendo-se as imagens pretendidas [2,28].

É de referir que para este tipo de técnica é necessário haver condutividade entre as amostras e o “coletor”. Se as amostras não tiverem na sua constituição nenhum material condutor, estas são previamente revestidas com uma camada fina de ouro de modo a tornarem-se condutoras (após terem sido colocadas num suporte apropriado sobre fita de carbono). Todos os *scaffolds* produzidos foram submetidos a SEM, a fim de identificar as diferenças na morfologia das fibras e perceber que interações/variações se podiam identificar com o revestimento das mesmas pelos hidrogéis.

O aparelho utilizado, para os *scaffolds* da primeira abordagem foi, o *Scanning Microscope JSM-5310* da *Jeol*. As imagens foram obtidas a ampliações de 1000x, 3500x e 10000x. Os resultados obtidos permitiram ainda avaliar a distribuição de diâmetros das fibras das diversas amostras. O aparelho utilizado nos *scaffolds* da segunda abordagem foi o *Zeiss Gemini Compact/VP Compact, Field Emission Scanning Electron Microscope* da *Fesem*. As imagens foram processadas a ampliações de 1000x, 3500x e 10000x respetivamente.

### 3.3.3. Determinação de ângulos de contacto dinâmicos

A determinação dos ângulos de contacto dinâmicos permitiu aferir sobre a capacidade de molhabilidade dos materiais sintetizados. Recorrendo ao equipamento OCA 20, da *Dataphysics*, efetuaram-se as medições dos ângulos de contacto utilizando água destilada como líquido. Para cada amostra, deixou-se cair uma gota do líquido sobre a sua superfície, ao mesmo tempo que era gravado todo o percurso da gota, desde a sua queda até ao seu espalhamento. Com isto foi possível averiguar quais os *scaffolds* que apresentavam uma maior hidrofiliabilidade, percebendo a influência da incorporação dos hidrogéis de gelatina nas fibras de PCL.

### 3.3.4. Propriedades térmicas – Análise Termogravimétrica (TGA)

Todos os *scaffolds* produzidos, assim como os reagentes base utilizados, foram submetidos a caracterização térmica por análise termogravimétrica (TGA). Esta análise pretendeu avaliar a estabilidade térmica dos materiais, observando a perda de massa em função da temperatura. Com este tipo de caracterização, os materiais são sujeitos a um aumento controlado da temperatura até começarem a sofrer degradação. É possível assim obter todos os perfis de degradação e comparar estabilidades térmicas entre materiais.

A técnica pode ser executada até temperaturas bastante elevadas, utilizando quantidades muito pequenas dos materiais (entre 5-10 mg). Na execução desta análise, todas as amostras foram aquecidas até aos 600°C com uma velocidade de aquecimento de 10°C/min em atmosfera de azoto a um fluxo de 100 mL/min, num equipamento SDT Q500 da *Thermal Analysis (TA) Instruments*. O processamento dos dados foi realizado no *Universal analysis 2000, software* da *TA Instruments*.

### 3.3.5. Degradação hidrolítica

Tendo como objetivo a utilização dos *scaffolds* para a produção de *stents* vasculares, é fundamental avaliar a sua capacidade de degradação em ambiente fisiológico. *Stents* vasculares pretendem ter uma aplicação mais duradoura no organismo. Assim, é necessário avaliar a perda de massa ao longo do tempo, de forma a garantir a estabilidade do material até completa regeneração do tecido alvo.

Os *scaffolds* foram incubados em 10 mL de uma solução tampão fosfato (PBS) e mantidos numa estufa a 37°C, durante períodos de 0 dias (no qual as amostras não foram submetidas ao teste), 2 dias e 28 dias (4 semanas) a fim de avaliar a degradabilidade dos materiais. Ao fim de cada período, os materiais foram devidamente secos à temperatura ambiente. Para documentar o estudo de degradação, e tendo em conta que foram produzidos materiais por diferentes abordagens de síntese, foram utilizadas duas formas distintas de análise. Para materiais da Abordagem I, recorreu-se à técnica SEM para averiguar diferenças na morfologia das superfícies após degradação. Para materiais da Abordagem II (compósitos), foi determinada a percentagem de perda de massa (%) para cada amostra.

#### 3.3.5.1. Microscopia eletrónica de Varrimento (SEM)

Para observar a degradação à superfície dos *scaffolds* de PCL revestidos com hidrogel, utilizou-se a técnica de SEM, averiguando a perda de hidrogel e qual a influência dessa mesma degradação nas fibras de PCL. Utilizou-se o equipamento *Scanning Microscope JSM-5310* da *Jeol*, obtendo fotografias com ampliações de 1000x, 3500x e 10000x.

#### 3.3.5.2 Determinação da perda de massa (%) por degradação hidrolítica

O perfil de degradação dos *scaffolds* compósitos PCL/Gelatina foi obtido através da determinação da variação de perda de massa ao longo dos vários períodos do teste, tendo em conta a Equação 3.1.

$$(\%) \text{ Perda de massa} = \frac{W_0 - W_t}{W_0} \times 100 \quad (3.1)$$

Em que  $W_0$  é o peso inicial da amostra e  $W_t$  é o peso final depois de esta ter sido incubada e seca.

#### 3.3.6. Hemocompatibilidade

Como se pretende aferir a potencialidade dos *scaffolds* para *stents* vasculares é essencial realizar um estudo *in vitro* quanto à interação destes com o sangue. Desta forma, foram realizados dois ensaios distintos: avaliação da trombogenicidade (que corresponde à capacidade do material em induzir a formação de trombos (coágulos)) e determinação do

índice hemolítico (correspondente à capacidade que cada material tem em provocar hemólise nos glóbulos vermelhos constituintes do sangue).

Os ensaios foram realizados com sangue de coelho anti-coagulado (sangue ACD-A) fornecido pela PROBIOLÓGICA, tendo-se procedido à realização dos testes assim que o mesmo foi recebido, para garantir a qualidade e fiabilidade dos resultados obtidos. Estes ensaios foram realizados de acordo com a norma da *International Organization for Standardization* (ISO) – “10993-4 Biological Evaluation of Medical Devices” [91]. O protocolo detalhado destes ensaios encontra-se no Anexo C.

### 3.3.6.1. Avaliação da trombogenicidade

Para avaliar o potencial de trombogenicidade dos *scaffolds* produzidos, prepararam-se amostras com as mesmas dimensões, com replicação de três vezes para cada *scaffold*. Todas as amostras foram inseridas individualmente em caixas de Petri de vidro. A cada uma foram adicionados 250  $\mu\text{L}$  de sangue ACD-A de coelho. A mesma quantidade de sangue foi inserida em caixas de Petri vazias (a fim de procederem como controlo positivo, uma vez que o vidro é um material trombogénico). O ensaio de trombogenicidade começou quando foi adicionado em cada amostra 25  $\mu\text{L}$  de uma solução previamente preparada de cloreto de cálcio ( $\text{CaCl}_2$ ) a 0,1M. As amostras foram posteriormente colocadas numa estufa, a 37°C, durante 40 min. Terminado o tempo de contacto, as mesmas foram removidas da estufa, adicionando-se a cada uma 5 mL de água destilada a fim de interromper o processo de coagulação. Após 5 min, as soluções foram filtradas sob vácuo, sendo finalmente adicionado a cada uma 1 mL de uma solução de formaldeído a 37%, de forma a fixar os trombos formados. De referir que três papéis de filtro vazios (sem coágulos) foram usados como controlo negativo. As amostras foram novamente colocadas em estufa a 37°C durante 24 horas. Após secagem, as amostras foram retiradas da estufa para determinar a massa de coágulo formada.

Para calcular a percentagem da massa de coágulo formada recorreu-se ao método gravimétrico de *Imai and Nose* [92], tendo em conta a Equação 3.2.

$$\% \text{ massa de coágulo formada} = \frac{m_{\text{coágulo\_amostra}} - m_{\text{média\_negativo}}}{m_{\text{média\_positivo}} - m_{\text{média\_negativo}}} \times 100 \quad (3.2)$$

Onde  $m_{\text{coágulo\_amostra}}$  é a massa de coágulo formada em cada amostra, que é obtida através da subtração da massa inicial de cada papel de filtro à massa final dos filtros com os coágulos ( $m_{\text{filtro+coágulo}}$ ),  $m_{\text{médio\_negativo}}$  corresponde à massa média formada de coágulos nos brancos (controlo negativo) e  $m_{\text{médio\_positivo}}$  é a média dos coágulos formados nos controlos positivos.

### 3.3.6.2. Determinação do índice hemolítico

Com a realização do teste de hemólise pretendeu-se determinar a reação hemolítica que os *scaffolds* provocam quando entram em contacto com o sangue. Ou seja, se a interação destes com o sangue leva à rutura da membrana plasmática dos eritrócitos, ocorrendo a libertação de hemoglobina para o plasma.

Os testes de hemólise foram realizados de acordo com a norma ASTM F 756-00 – *Standard Practice for Assessment of Properties of Materials* que estabelece limites de percentagens de hemólise provocadas no sangue e divide os materiais de acordo com o seu índice hemolítico em três grupos: hemolíticos (> 5%), ligeiramente hemolíticos (2 a 5%) e não hemolíticos (< 2%).

Para a realização dos ensaios, os materiais foram preparados em duplicado, com uma área superficial de 21 cm<sup>2</sup> cada, sendo individualmente cortados e colocados em tubos de Falcon para que se procedesse ao contacto dos materiais com o sangue de coelho ACD-A. Esse contacto ocorreu de duas formas: 1) direta, na qual os materiais foram diretamente incubados com o sangue; e 2) indireta, na qual os materiais foram incubados inicialmente em PBS durante um período 24 horas e introduzidos numa estufa a 37°C, para depois então serem colocados em contacto com o sangue.

Os materiais foram finalmente incubados em 7 mL de sangue ACD-A previamente diluído e foram então preparados os controlos deste teste. Na preparação do controlo negativo adicionou-se 1 mL de sangue ACD-A para 6 mL de PBS, enquanto no controlo positivo 1 mL de sangue ACD-A foi adicionado a 6 mL de água destilada. Todas as amostras foram inseridas na estufa a 37 °C durante 3 horas. Em intervalos de tempo pré-estabelecidos de 30 min, todos os tubos incubados foram cuidadosamente invertidos (duas

vezes cada) de modo a garantir o contacto entre os materiais e o sangue sem que houvesse a ocorrência de hemólise pelo manuseamento dos tubos.

Após incubação, todas as amostras foram centrifugadas a 2100 rpm durante 15 min, obtendo-se duas fases: a componente celular e o sobrenadante (plasma), sendo que a hemoglobina libertada pela hemólise se encontraria neste último. Desta forma, para todos os sobrenadantes, foi determinada a quantidade de hemoglobina presente através da medição das densidades óticas (DO), a um comprimento de onda de 540 nm, utilizando para isso um espectrofotómetro *UV-Vis Jasco V-550*.

A percentagem de hemólise (% Hemólise) em cada amostra foi calculada de acordo com a Equação 3.3.

$$\% \text{ Hemólise} = \left( \frac{DO_{\text{amostra\_teste}} - DO_{\text{controlo negativo}}}{DO_{\text{controlo positivo}} - DO_{\text{controlo negativo}}} \right) \times 100 \quad (3.3.)$$

### 3.3.7. Biocompatibilidade

A biocompatibilidade é definida como a capacidade com que um material desempenha a sua função no organismo sem causar respostas adversas que danifiquem os tecidos e/ou órgãos envolventes, e sem que os produtos da degradação prejudiquem o sistema biológico [93].

Para avaliar a biocompatibilidade dos materiais sintetizados, foram realizados ensaios de viabilidade celular e citotoxicidade *in vitro*. A percentagem de células viáveis foi determinada recorrendo ao método do MTT (*3-4,5-dimethylthiazol 2,5-diphenyltetrazolium bromide*). Este método apresenta várias vantagens: é de fácil execução, é um método reprodutível e diminui o uso de animais para a realização dos testes, além de estar descrito na norma ISO 10993-5 [94].

#### 3.3.7.1. Cultura celular das células endoteliais circulantes (CEC) na presença dos *scaffolds*

Antes de realizar o ensaio *in situ*, é necessário cultivar as células na presença dos *scaffolds*. Assim, e tendo em conta que os materiais produzidos têm como finalidade a aplicação

como *stents* vasculares, foram cultivadas células endoteliais circulantes (CEC) (células presentes em uma superfície vascular anti-agregante) [95].

As células CEC foram subcultivadas numa densidade de 65000 células por poço ao longo das diferentes placas de 96 poços que continham os *scaffolds*. Estas foram incubadas a 37°C durante 24 horas com 5% de CO<sub>2</sub> numa atmosfera húmida. O estudo da biocompatibilidade foi então baseado na adesão e proliferação das células CEC nos *scaffolds*.

### 3.3.7.2. Estudo da viabilidade celular na presença dos *scaffolds*

Os ensaios foram realizados nos laboratórios da UBI (Universidade da Beira Interior). De forma sucinta, após os materiais serem incubados durante 24 h numa placa de 96 poços a 37°C, a viabilidade celular foi avaliada determinando a quantidade de reagente MTT que foi reduzido a formazano. Desta forma, removeu-se o meio de cultura das placas e em cada amostra foi adicionado 50 µL de MTT (5 mg/mL em PBS).

As placas foram então incubadas a 37°C durante 4 horas em atmosfera húmida de CO<sub>2</sub>. Seguidamente, o MTT foi removido e as culturas de células foram tratadas com 50 µL de isopropanol/HCl (0,04M) por poço, durante 90 minutos no escuro de forma a dissolver os cristais roxos formados. Foram medidas as absorvâncias de cada poço a 570 nm usando a *Biorad Microplate Benchmark*. É ainda de referir que neste ensaio foram efetuados dois tipos de controlo: um controlo negativo, no qual o poço que lhe era característico continha células vivas, sem estarem na presença dos *scaffolds*; e um controlo positivo, em que foi adicionado etanol a 96% à cultura de células provocando a morte celular. Este procedimento foi realizado em ambiente estéril, no interior de uma câmara de fluxo laminar.

### 3.3.8. Incorporação e Libertação Controlada de Fármaco

Um dos tipos mais usados de *stents* são os DES (*Drug-eluting stents*), revestidos por um medicamento que é lentamente libertado para a artéria de forma a prevenir possíveis inflamações e com o intuito de garantir um bom fluxo sanguíneo. Deste modo, incorporou-se nas matrizes produzidas (abordagem I) o fármaco Dexametasona,

avaliando-se o perfil da sua libertação ao longo do tempo (para um período de 8 dias). O fármaco foi incorporado diretamente na PCL dissolvida em clorofórmio/DMF (70:30) (antes do processo de *electrospinning*), numa proporção de 5% (m/m) em relação ao peso inicial de polímero. Todos os materiais com fármaco (e respetivos brancos para controlo) foram incubados a 37°C em 10 mL de solução PBS (pH 7,4). Para diversos tempos pré-determinados (1/2h, 1h, 2h, 4h, 8h, 24h, 48h, 72h, 96h, 168h e 192h) foram retiradas amostras (de 1,5 mL cada) dos meios de incubação.

Para todas as amostras recolhidas, foram medidas as absorvâncias a 254 nm, para conseguir quantificar a dexametasona libertada em cada caso, ao longo do tempo. Para isso, utilizou-se um espectrofotómetro *UV-Vis Jasco V-550*. Medidas as absorvâncias, estas foram convertidas para concentração ( $\mu\text{g/mL}$ ), recorrendo à curva de calibração da dexametasona que foi realizada para o estudo em causa. No Anexo D, apresenta-se o protocolo para a realização da curva, assim como a curva obtida. É importante mencionar que este fármaco já não foi incorporado nem testado nos materiais compósitos sintetizados na abordagem experimental II, por falta de disponibilidade do mesmo em laboratório.



## 4. Resultados e Discussão

### 4.1. Preparação dos *Scaffolds*

Os ensaios que foram realizados conduziram à produção de diferentes *scaffolds* partindo de PCL de elevado peso molecular e de gelatina tipo-A (através da combinação das técnicas de *electrospinning* e fotoreticulação). Os materiais foram caracterizados tendo em vista a possível exploração como *stents* vasculares ou sistemas de regeneração vascular com libertação local e controlada de um anti-inflamatório. Neste capítulo começa-se por resumir os aspetos base inerentes a cada etapa do processo de produção dos materiais, para cada abordagem que foi delineada.

#### 4.1.1. Produção dos *scaffolds* revestidos (I) e dos *scaffolds* compósitos (II)

Antes de definir cada abordagem de síntese, a primeira fase do trabalho consistiu em modificar a gelatina tipo-A com grupos metacrilamida, tendo em conta a estratégia reportada por Coimbra et al. [34] (trabalho desenvolvido no grupo de investigação do CIEPQPF). Recorreu-se deste modo ao anidrido metacrílico (MAA) para a funcionalização da gelatina com ligações de carbono duplas fotoreticuláveis, dissolvendo ambos os compostos em PBS e sujeitando-os a uma temperatura moderada. Não se recorreu a catalisadores. Da reação, formou-se ácido metacrílico (subproduto da dissociação do MAA) e por isso foi necessário purificar a gelatina modificada por diálise, com uma membrana apropriada, removendo depois por liofilização a água residual do produto purificado. Foi assim possível remover todas as impurezas que poderiam comprometer a biocompatibilidade dos hidrogéis finais.

Esta gelatina modificada (Gel-MA) não só foi usada para a síntese de diversos tipos de hidrogéis fotoreticuláveis (que serviram de revestimento para fibras de PCL previamente preparadas por *electrospinning* – Abordagem I), mas também para fazer uma solução com ácido acético que foi de seguida misturada com uma solução de PCL com o intuito de fazer fibras compósitas para posterior irradiação UV (Abordagem II).

Na primeira abordagem do trabalho, para duas concentrações de sólidos (1 e 10%), fizeram-se soluções precursoras dos hidrogéis apenas com Gel-MA ou com Gel-MA e PEGMA ou PEGDA na presença do fotoiniciador biocompatível Irgacure® 2959. Tal como referido anteriormente, este fotoiniciador é, segundo a literatura, o mais usado na produção de hidrogéis dada a sua baixa toxicidade, além de ser solúvel em água, o que o torna ainda mais candidato para aplicações biomédicas [34,56]. A quantidade de fotoiniciador para fazer a solução usada foi sempre igual para todos os materiais e foi fixa de acordo com o trabalho previamente referido [34]. Todos os compostos nas formulações foram adicionados, numa dada percentagem volumétrica, tendo em conta um volume fixo de solvente. Obtiveram-se assim seis hidrogéis, de aspeto uniforme, transparente e homogéneo que revestiram as fibras de PCL (preparadas a partir de uma solução num sistema clorofórmio/DMF). O tempo de irradiação UV para todos os hidrogéis foi também fixo em 10 minutos, para cada lado da membrana de fibras, assegurando desta forma bons graus de reticulação da gelatina. De referir que as matrizes fibrosas revestidas apresentaram uma estrutura macroscópica uniforme, sem presença de grânulos e com bastante flexibilidade. Na construção das fibras, a quantidade de PCL adicionada ao sistema clorofórmio/DMF foi definida para se obter uma adequada viscosidade. A PCL usada no processo foi também escolhida essencialmente pelo seu elevado peso molecular.

Apesar de se terem obtido materiais bastante versáteis, delineou-se ainda a abordagem experimental II, que consistiu em dissolver ambos os polímeros (PCL e Gel-MA) em sistemas apropriados, misturando de seguida as soluções finais para produção de fibras por *electrospinning*. Nestas formulações não foram usados macrómeros. Por sua vez, as fibras compósitas obtidas foram mergulhadas na mesma solução de fotoiniciador e de seguida sujeitas a radiação UV. A fotoreticulação serviu para reticular a gelatina que fazia parte da composição das fibras, aumentando a sua resistência à degradação hidrolítica e à ação térmica. Este tipo de fibras apresentou também bastante flexibilidade, com aparência uniforme e estrutura lisa. A grande motivação desta abordagem foi construir *scaffolds* que combinassem ambos os polímeros de interesse recorrendo a um processo mais simples e resultando à partida em materiais mais resistentes para a aplicação em causa (isto porque se acredita que fibras de gelatina reticulada misturadas com fibras de PCL apresentem um maior desempenho mecânico, quando comparadas com hidrogéis de



Como se pode observar na Figura 4.1, aos materiais obtidos na Abordagem I foi ainda incorporado um anti-inflamatório bastante usado em *stents* vasculares: a dexametasona. A incorporação do mesmo foi feita logo na solução de PCL, antes do processo de *electrospinning*. Deste modo, o fármaco ficou aprisionado na rede de fibras de PCL, que foram depois revestidas com os diferentes hidrogéis. Em termos de aparência visual, não se verificaram quaisquer diferenças em termos de superfície/estrutura.

Os materiais produzidos pelas duas estratégias foram devidamente caracterizados de acordo com a aplicação alvo. Os resultados serão apresentados nos próximos subcapítulos de forma sequencial, ou seja, para cada técnica serão exibidos, em primeiro lugar, os resultados da Abordagem I e só depois os da Abordagem II.

## 4.2. Caracterização química por ATR-FTIR

### 4.2.1. ATR-FTIR – *Scaffolds* revestidos (I)

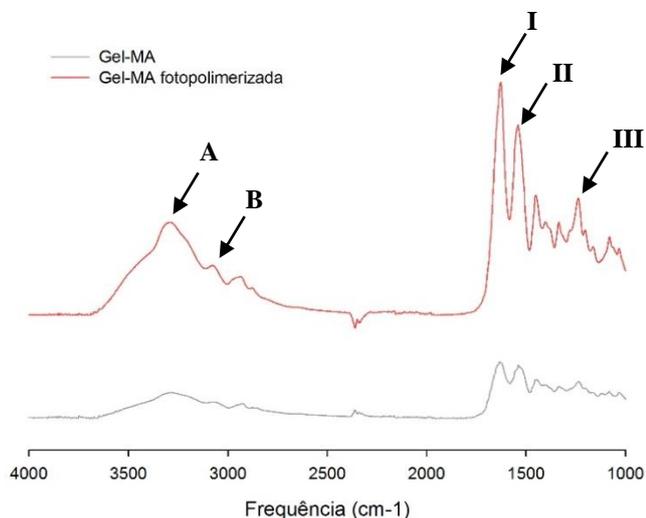
Tal como descrito no capítulo 3, recorreu-se à técnica ATR-FTIR para identificar os grupos químicos presentes em cada amostra. Em primeiro lugar, pretendeu-se identificar os grupos presentes na Gel-MA e avaliar o sucesso da reação de reticulação da Gel-MA após irradiação UV. Assim, na Figura 4.2, apresenta-se o espectro resultante da análise ATR-FTIR para a Gel-MA, antes e depois de ser fotoreticulada.

A gelatina, sendo um polímero de origem proteica, é composta por aminoácidos ligados entre si por ligações amida. Este tipo de ligação apresenta bandas de absorção muito características (Tabela 4.1), que podem ser divididas por duas regiões: 1) Amida A e B; 2) Amida tipo I, II e III [96,97].

**Tabela 4.1** Bandas características do espectro infravermelho da gelatina associadas à ligação amida.

Amida	Atribuição	Frequência (cm <sup>-1</sup> )
<b>A</b>	Elongação dos grupos N-H	3300
<b>B</b>	Elongação dos grupos N-H	3080
<b>I</b>	Elongação C=O	1630
<b>II</b>	Deformação N-H/ Elongação C-N	1530
<b>III</b>	Deformação N-H/ Elongação C-N	1230

Tendo em conta a informação da Tabela 4.1 (referente às bandas atribuídas à ligação amida), analisou-se a Figura 4.2 relativa aos espectros obtidos por ATR-FTIR da Gel-MA, antes e após irradiação.



**Figura 4.2** Espectro de ATR-FTIR da Gel-MA vs. Gel-MA fotoreticulada.

**Tabela 4.2** Bandas correspondentes à Gel-MA antes e depois do processo de fotoreticulação.

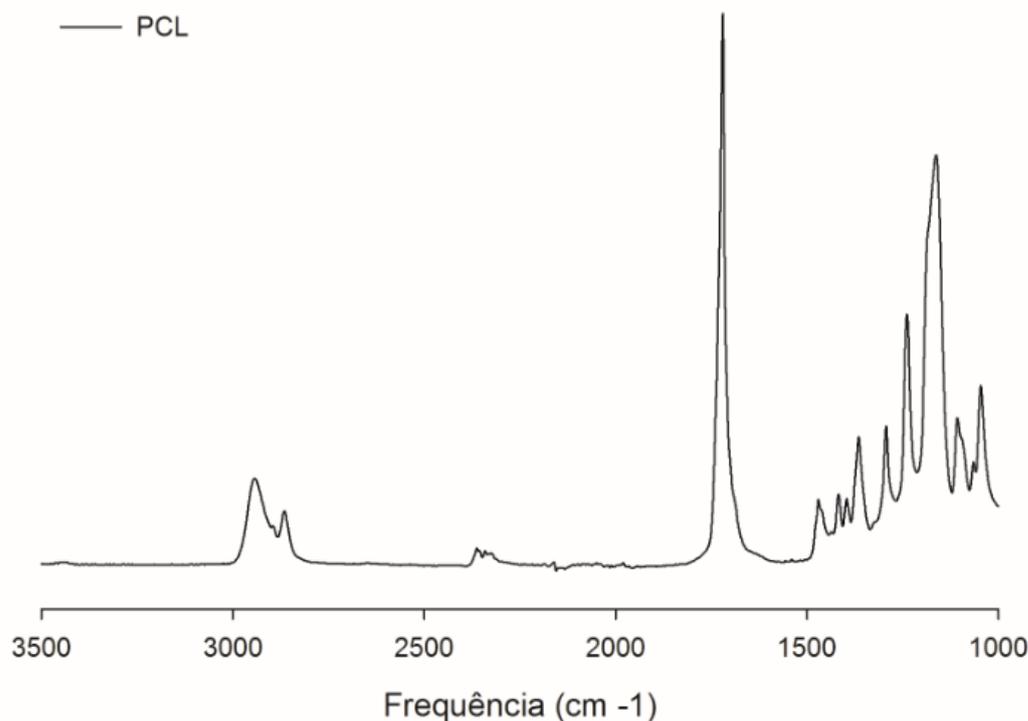
Amida	Gel-MA [Frequência (cm <sup>-1</sup> )]	Gel-MA fotoreticulada [Frequência (cm <sup>-1</sup> )]
A	3292	3303
B	3055	3061
I	1629	1629
II	1549	1543
III	1237	1231

Através da Figura 4.2 e da Tabela 4.2 pode-se confirmar a presença das ligações da gelatina na Gel-MA e Gel-MA fotoreticulada, confirmando deste modo que o processo de funcionalização e posterior reticulação da gelatina não alterou a sua constituição base. É possível verificar na Gel-MA fotoreticulada as três regiões distintas das Amidas. Entre os 3303 e 3061 cm<sup>-1</sup> o alongamento N-H da Amida A e B, respetivamente. Nos 1629 cm<sup>-1</sup>, observa-se ainda a banda de absorvância do grupo carbonilo (C=O) característica da Amida I. A 1543 e 1231cm<sup>-1</sup>, por sua vez, as bandas correspondentes da Amida Tipo II e III, respetivamente.

Um dos objetivos principais desta caracterização era averiguar se o hidrogel Gel-MA estava ou não reticulado. No espectro da Gel-MA era expectável a presença de ligações C=C, introduzidas na gelatina após a sua funcionalização com MAA. Após irradiação UV, o que seria de esperar no espectro da Gel-MA fotoreticulada seria o desaparecimento dessa banda típica. Contudo, não foi possível averiguar a presença/ausência das ligações de carbono duplas com esta caracterização pois a banda correspondente à elongação C=C

situa-se entre  $1600-1640\text{ cm}^{-1}$ , sobrepondo-se às ligações da amida tipo I, não sendo assim visível a sua presença na Gel-MA e a sua ausência após irradiação UV.

Analisadas as ligações existentes na Gel-MA, observou-se o espectro característico das fibras de PCL produzidas por *electrospinning* (Figura 4.3).

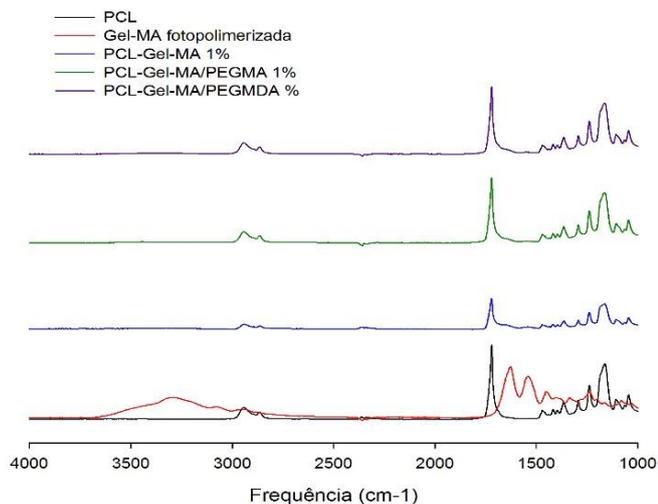


**Figura 4.3** Espectro de ATR-FTIR das fibras PCL.

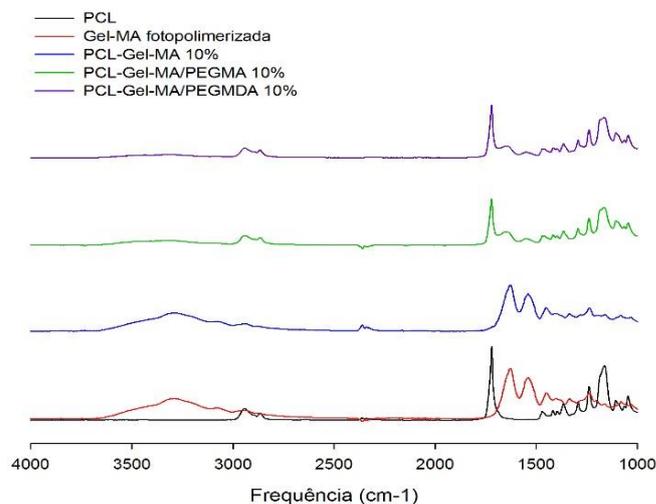
Observando o espectro da Figura 4.3 é possível confirmar a presença das bandas características deste polímero. A banda na zona dos  $2920-2850\text{ cm}^{-1}$  corresponde à elongação característica da ligação C-H e a banda dos  $1721\text{ cm}^{-1}$  corresponde à elongação C=O, confirmando assim a presença dos grupos carbonilo existentes na PCL, associados às ligações éster. Os grupos éster são de especial importância, uma vez que a taxa de degradação deste material depende da suscetibilidade à hidrólise destes mesmos grupos [98].

Analisados os grupos característicos existentes no hidrogel base de Gel-MA, assim como nas fibras da PCL, procede-se à análise dos espectros dos *scaffolds* de PCL revestidos com os hidrogéis de base gelatina modificada. Nas Figuras 4.4 e 4.5 são então apresentados os espectros de ATR-FTIR para os *scaffolds* revestidos com hidrogéis

produzidos a partir de soluções precursoras com 1% de polímero (Figura 4.4) e 10% de polímero (Figura 4.5).



**Figura 4.4** Espectro ATR-FTIR dos *scaffolds* PCL-Gel-MA de concentração 1% com as matérias-primas (PCL e Gel-MA).



**Figura 4.5** Espectro ATR-FTIR dos *scaffolds* PCL-Gel-MA de concentração 10% com as matérias-primas (PCL e Gel-MA).

Pela observação da Figura 4.4 constata-se que os espectros dos hidrogéis obtidos com uma solução precursora de 1% evidenciam uma forte presença dos grupos característicos da PCL, com um ligeiro aparecimento das ligações características da gelatina, nomeadamente as bandas da Amida tipo I (que é a ligação mais forte e principal dos polipeptídeos) e tipo II. Isto era de esperar pois as fibras estão revestidas somente com 1% da concentração de Gel-MA. É possível ainda verificar que no espectro correspondente ao revestimento composto somente de Gel-MA os picos das Amidas I e II são mais evidentes comparativamente ao observado nos espectros dos hidrogéis que incorporam os macrómeros PEGMA e PEGDA. Isto resulta de (para a mesma concentração de hidrogel (1%)) se ter repartido a formulação em 50% de Gel-MA e 50% de macrómeros, havendo desta forma menos teor de Gel-MA nesses hidrogéis. Adicionalmente, e por ter menos gelatina, estas soluções eram muito menos viscosas, o que originou revestimentos mais finos em comparação ao revestimento só com Gel-MA.

Analisando a Figura 4.5, que corresponde aos *scaffolds* de PCL revestidos com Gel-MA 10%, é possível verificar que há uma presença mais notória e evidente das ligações da Gel-MA. Analisando os espectros dos *scaffolds* PCL-Gel-MA/PEGMA 10% e PCL-Gel-MA/PEGDA 10% observam-se as bandas atribuídas à PCL, mas também claramente a

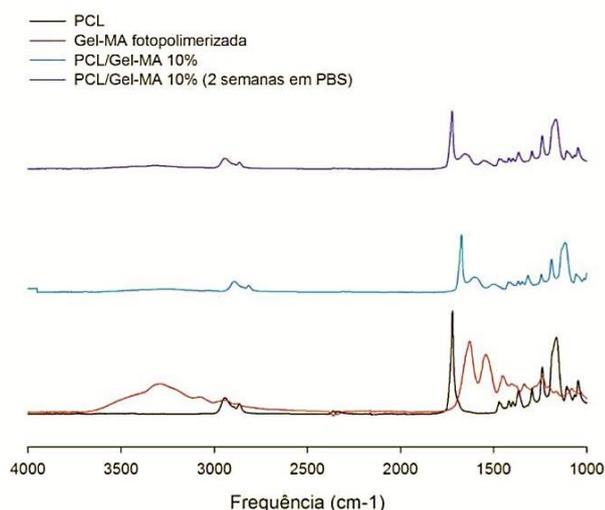
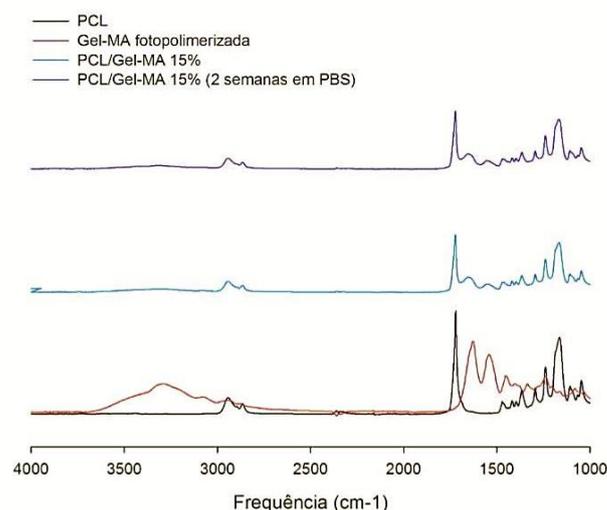
banda Amida I da Gel-MA, o que evidencia um bom revestimento. Relativamente ao *scaffold* PCL-Gel-MA 10% verifica-se que o espectro característico apresenta somente as ligações características à Gel-MA, o que leva a crer que o hidrogel revestiu/cobriu por completo as fibras de PCL, não sendo visível qualquer ligação característica deste último polímero.

#### 4.2.2. ATR-FTIR – *Scaffolds* compósitos (II)

Neste caso, recorreu-se à técnica de ATR-FTIR para averiguar a presença dos grupos químicos característicos da Gel-MA e da PCL nas fibras compósitas produzidas por *electrospinning*. Além disso, quis-se perceber se a gelatina constituinte das fibras estava realmente reticulada após o processo de fotoreticulação a que os *scaffolds* tinham sido sujeitos. Como tal, além de se obter os espectros para as fibras PCL/Gel-MA fotoreticuladas, também se analisou por ATR-FTIR amostras dos mesmos após a sua incubação durante duas semanas (a 37°C) em uma solução salina (PBS, pH 7.4). Se os espectros correspondentes às amostras incubadas foram idênticos aos iniciais, pode-se aferir que a gelatina presente nas fibras não se dissolve na solução de PBS durante 2 semanas e que portanto se encontra de facto reticulada. Do ponto de vista da aplicação, tal facto seria excelente, uma vez que se conseguiria obter uma mistura de fibras por *electrospinning* com elevada estabilidade, onde a resistência da gelatina não seria comprometida com facilidade. Nas Figuras 4.6 e 4.7 são apresentados os espectros das matérias-primas (PCL e Gel-MA fotoreticulada) e dos *scaffolds* compósitos assim que sintetizados e após duas semanas de incubação em PBS. Na Tabela 4.3 encontram-se todas as bandas e grupos funcionais de interesse para estes materiais.

**Tabela 4.3** Bandas e grupos funcionais característicos da PCL, Gel-MA e *scaffolds* compósitos.

				PCL/Gel-MA 10%	PCL/Gel-MA 15%
		Grupos Funcionais	Frequência (cm <sup>-1</sup> )	Frequência (cm <sup>-1</sup> )	Frequência (cm <sup>-1</sup> )
PCL		Elongação assimétrica CH <sub>2</sub>	2945-2863	<b>2941-2868</b>	<b>2941-2863</b>
		Elongação C=O	1723	<b>1723</b>	<b>1723</b>
	Tipo A	Elongação N-H	3294	<b>3330</b>	<b>3318</b>
Amida (Gel-MA)	Tipo B		3077		
	Tipo I	Elongação C=O	1629	<b>1647</b>	<b>1650</b>
	Tipo II	Torção N-H / Elongação C-N	1540	<b>1556</b>	<b>1550</b>
	Tipo III	Elongação C-N / Torção N-H	1451	<b>1472</b>	<b>1476</b>

**Figura 4.6** Espectro ATR-FTIR dos *scaffolds* compósitos PCL/Gel-MA 10% e suas matérias-primas.**Figura 4.7** Espectro ATR-FTIR dos *scaffolds* compósitos PCL/Gel-MA 15% e suas matérias-primas.

Analisando o espectro ATR-FTIR da PCL nas Figuras 4.6 e 4.7 (em simultâneo com a Tabela 4.3) verifica-se novamente a existência das suas bandas características, como seria de esperar. Entre os 2945 e 2863 cm<sup>-1</sup> encontram-se as bandas de absorção correspondentes às vibrações de alongamento assimétrico da ligação C-H nos grupos CH<sub>2</sub> e C-H. Já a 1723 cm<sup>-1</sup> encontra-se a banda mais acentuada deste polímero correspondente à elongação da ligação C=O dos grupos éster.

Comparativamente, observando os espectros da Gel-MA, é possível denotar a existência das três regiões com as bandas do grupo amida características, consequentemente, da

gelatina. A primeira região, onde aparecem as bandas Amida A e Amida B, sensivelmente a 3594 e 3077  $\text{cm}^{-1}$ , correspondem à elongação da ligação N-H. Situada nos 1629  $\text{cm}^{-1}$  encontra-se a segunda região (Amida I), a principal dos polipéptidos, que corresponde às vibrações de alongamento do grupo carbonilo (C=O). Por último, a terceira região, correspondente à Amida II e III, situada nos 1543 e nos 1243  $\text{cm}^{-1}$ , respetivamente, que são as bandas resultantes do acoplamento das vibrações de deformação da ligação N-H com as vibrações de elongação da ligação C-N.

Analisando agora os espectros resultantes das fibras compósitas PCL/Gel-MA produzidos por *electrospinning*, é possível observar que as bandas mais importantes e características de cada polímero estão presentes em ambas as fibras. Aos 1723  $\text{cm}^{-1}$  (em ambos os materiais) encontra-se a ligação C=O característica dos grupos éster (logo, referentes à PCL), e nos 1647 e 1650  $\text{cm}^{-1}$  as ligações C=O características da Amida I, para a PCL/Gel-MA 10 e 15%, respetivamente. É ainda possível verificar a existência das bandas de PCL correspondentes às vibrações do alongamento assimétrico  $\text{CH}_2$  nos 2941-2868  $\text{cm}^{-1}$  na PCL/Gel-MA 10% e a 2941-2863  $\text{cm}^{-1}$  para a PCL/Gel-MA 15%. Relativamente à incorporação das restantes ligações químicas da Gel-MA na PCL observa-se ainda a existência das Amidas II a 1556  $\text{cm}^{-1}$  para o compósito PCL/Gel-MA 10 % e a 1550  $\text{cm}^{-1}$  para o compósito PCL/Gel-MA 15%. Possivelmente estará presente a Amida tipo III nos *scaffolds*, contudo poderá estar suprimida com um pico da PCL a 1240  $\text{cm}^{-1}$  e a 1244  $\text{cm}^{-1}$  para os compósitos 10 e 15% respetivamente. A região das Amidas A e B é que se encontra parcialmente desaparecida. Observando agora nas Figuras 4.6 e 4.7 os espetros de ambos os compósitos sujeitos a incubação em PBS, constata-se que não existem diferenças significativas entre estes e os espetros dos produtos assim que sintetizados, sendo na verdade praticamente coincidentes. Deste modo, pode-se concluir que a gelatina incorporada nas fibras compósitas se encontra à partida reticulada em ambos os *scaffolds*. Assim sendo, poderão ser desenvolvidos *scaffolds* por combinação de técnicas, sintetizando primeiro as fibras a partir de uma mistura dos polímeros e recorrendo depois à fotoreticulação para garantir a reticulação da gelatina e aumentar desta forma a sua resistência mecânica e biológica.

Com a análise ATR-FTIR demonstra-se ainda que há uma boa homogeneidade das ligações químicas de ambos os polímeros, mostrando-se também que a técnica de

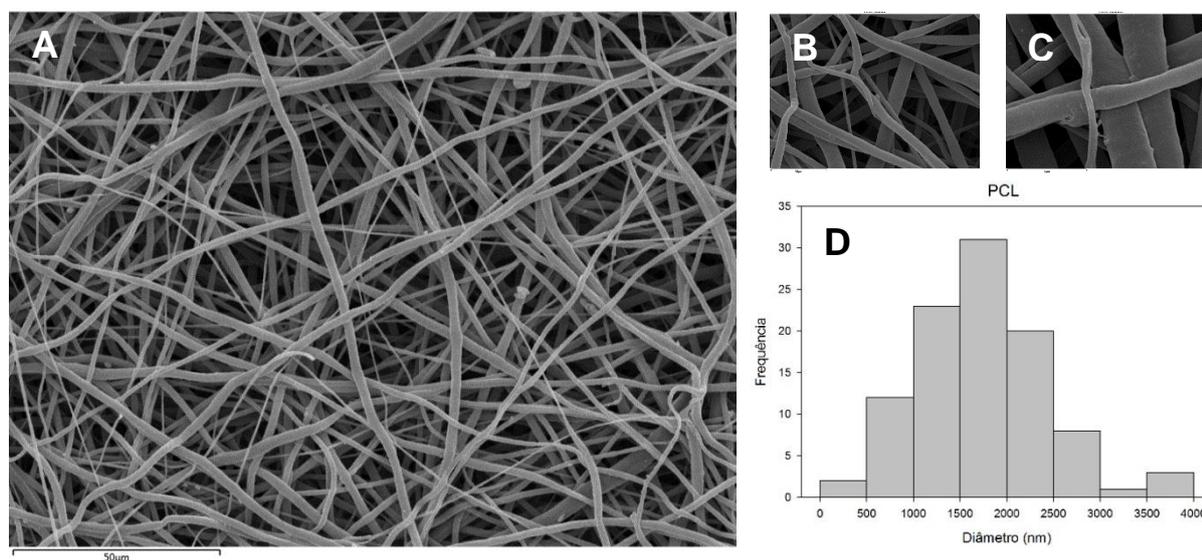
*electrospinning* é uma forma viável para a síntese de fibras e para a interação de dois grupos poliméricos distintos.

### 4.3. Morfologia das fibras por microscopia eletrónica de varrimento (SEM)

#### 4.3.1. *Scaffolds* revestidos (I)

Todos os *scaffolds* produzidos neste trabalho foram analisados pela técnica SEM, permitindo visualizar em detalhe as diferenças morfológicas decorrentes das diversas formulações testadas. Para os *scaffolds* revestidos, pretendeu-se perceber que variações morfológicas ocorreram após o revestimento das fibras de PCL pelos diferentes hidrogéis. Teve-se ainda o objetivo de, para cada *scaffold*, observar a distribuição do diâmetro das fibras.

Todas as membranas de fibras preparadas (de PCL e PCL+hidrogéis) foram observadas na sua superfície, a diferentes ampliações. Na Figura 4.8 começa-se por apresentar as fotografias de SEM obtidas para a superfície da membrana de fibras de PCL, a ampliações de 750x, 3500x e 10000x. Apresenta-se ainda um histograma com os diâmetros das fibras. Por sua vez, na Tabela 4.4, encontra-se registado o diâmetro médio das mesmas.

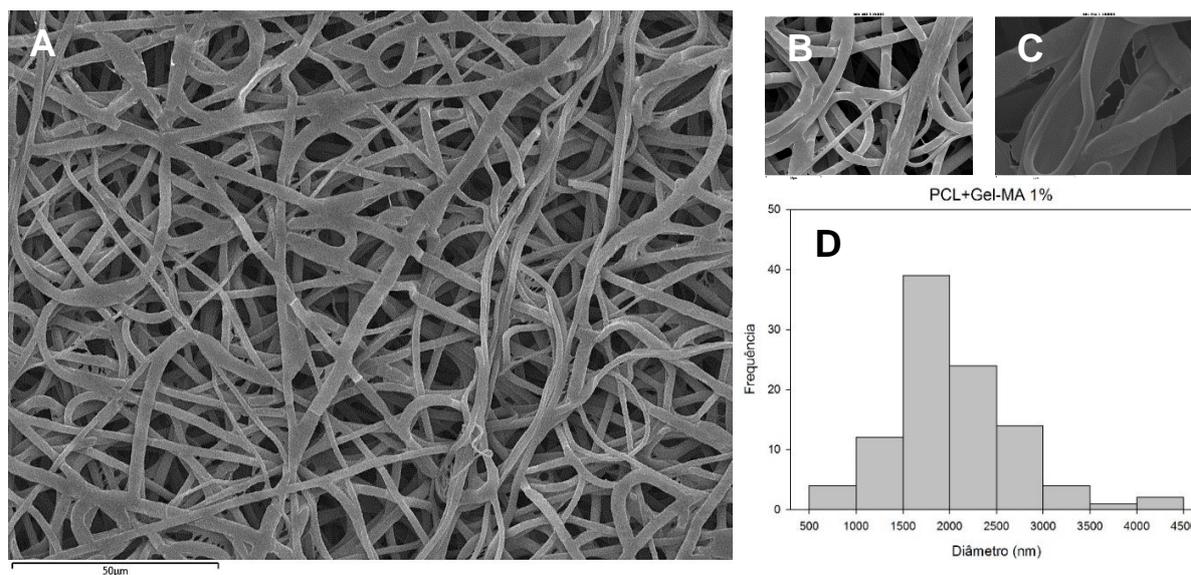


**Figura 4.8** A) B) C) Fotografias de SEM da superfície das fibras de PCL com uma ampliação de 750x, 3500x e 10000x, respetivamente; D) Histograma dos diâmetros das fibras de PCL.

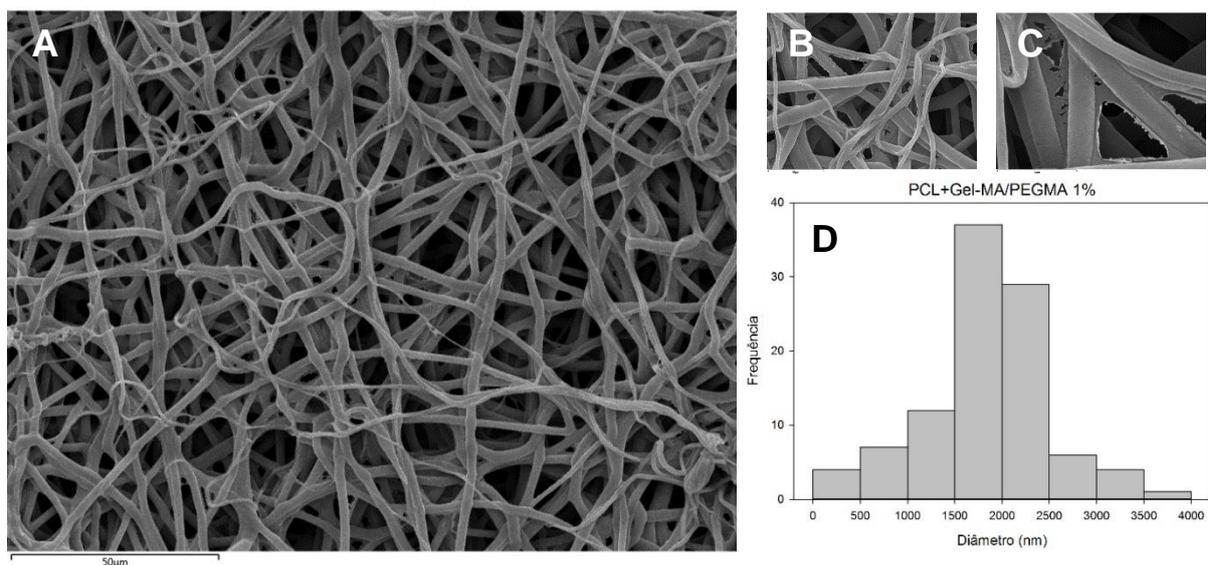
Observando a Figura 4.8 é desde logo possível constatar que as fibras de PCL se encontram desorganizadas. Esta desorganização advém do processo de produção

considerado, uma vez que na técnica de *electrospinning* convencional as fibras poliméricas depositam-se aleatoriamente no coletor, sem qualquer controlo da sua disposição (facto mencionado no Capítulo 1). Todavia, pelo histograma apresentado é possível observar que a distribuição dos diâmetros das fibras é bastante larga, resultando deste modo num desvio padrão bastante elevado.

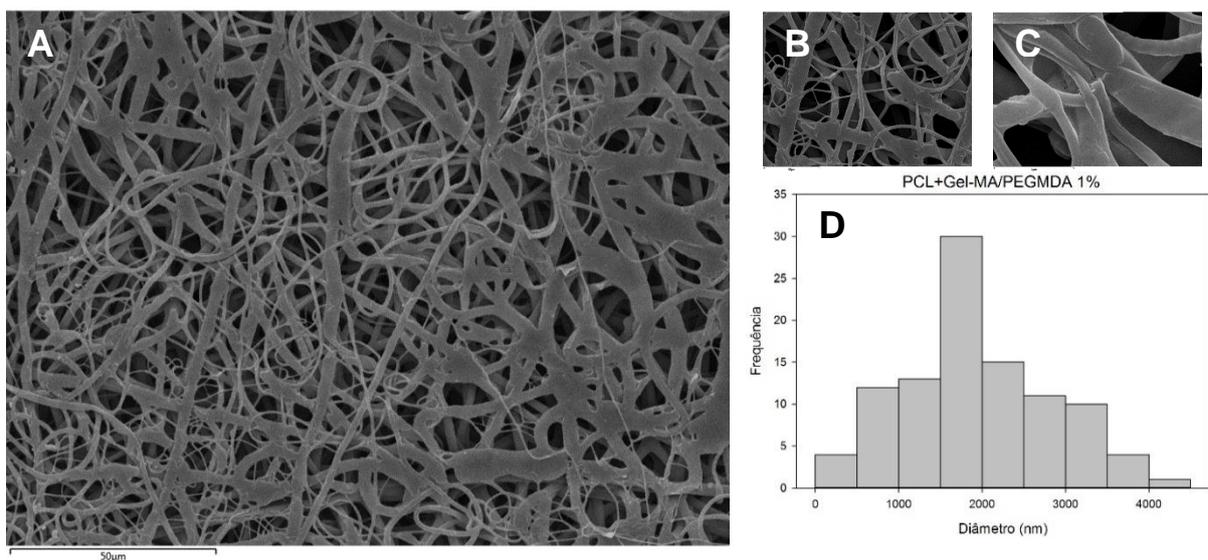
Observadas as fotografias das fibras de PCL, seguem-se as imagens obtidas para os diferentes *scaffolds* revestidos. Nas Figuras 4.9, 4.10 e 4.11 apresenta-se a análise efetuada para os materiais PCL+Gel-MA 1%, PCL+Gel-MA/PEGMA 1% e PCL+Gel-MA/PEGDA 1%, respetivamente. Nas Figuras 4.12, 4.13 e 4.14 encontram-se as imagens obtidas pela análise SEM para os *scaffolds* com uma concentração de Gel-MA de 10% (PCL+Gel-MA 10%, PCL+Gel-MA/PEGMA 10% e PCL+Gel-MA/PEGDA, respetivamente). A Tabela 4.4 pretende ser um sumário dos diâmetros médios das fibras dos vários *scaffolds*.



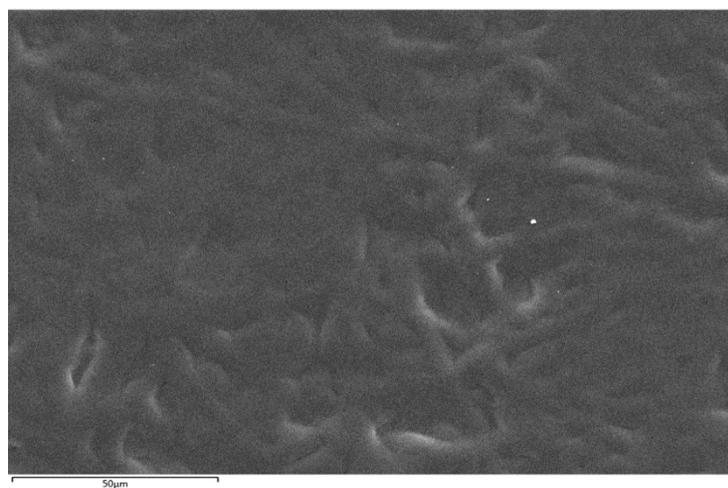
**Figura 4.9** A) B) C) Fotografias de SEM da superfície do *scaffold* PCL+Gel-MA 1% com uma ampliação de 750x, 3500x e 10000x respetivamente; D) Histograma dos diâmetros das fibras do *scaffold* PCL+Gel-MA 1%.



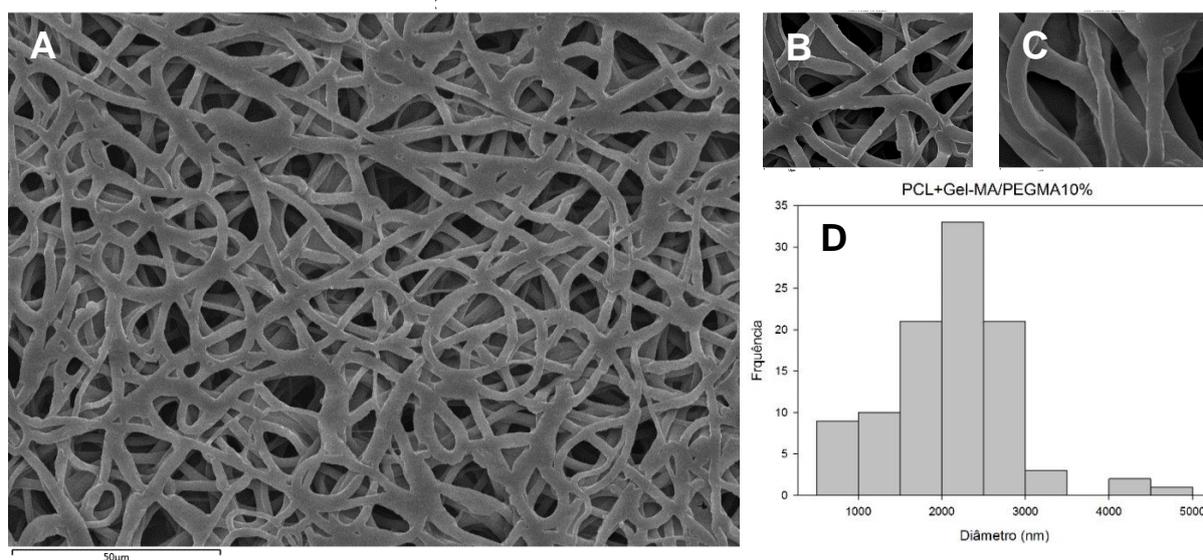
**Figura 4.10** A) B) C) Fotografias de SEM da superfície do *scaffold* PCL+Gel-MA/PEGMA 1% a uma ampliação de 750x, 3500x e 10000x respetivamente; D) Histograma dos diâmetros das fibras do *scaffold* PCL+ Gel-MA/PEGMA 1%.



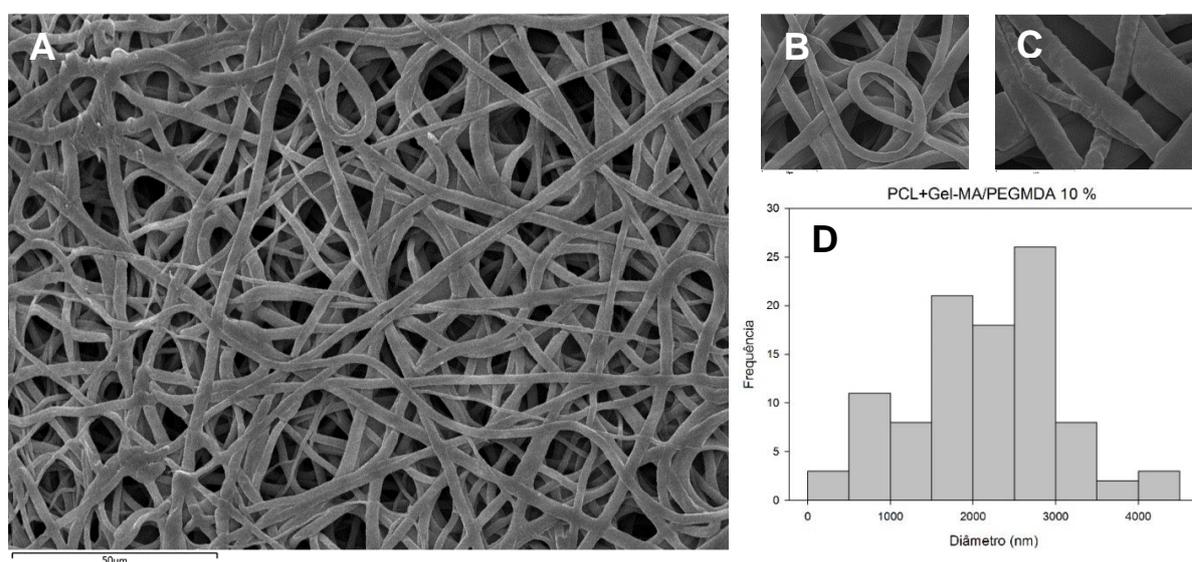
**Figura 4.11** A) B) C) Fotografias de SEM da superfície do *scaffold* PCL+Gel-MA/PEGDA 1% a uma ampliação de 750x, 3500x e 10000x respetivamente; D) Histograma dos diâmetros do *scaffold* PCL+ Gel-MA/PEGDA 1%



**Figura 4.12** Fotografia de SEM da superfície do *scaffold* PCL+Gel-MA 10% a uma ampliação de 750x.



**Figura 4.13** A) B) C) Fotografias de SEM da superfície do *scaffold* PCL+Gel-MA/PEGMA 10% uma ampliação de 750x, 3500x e 10000x respetivamente; D) Histograma dos diâmetros das fibras do *scaffold* PCL-Gel-MA/PEGMA 10%.



**Figura 4.14** A) B) C) Fotografias de SEM da superfície do *scaffold* PCL+Gel-MA/PEGDA 10% uma ampliação de 750x, 3500x e 10000x respetivamente; D) Histograma dos diâmetros das fibras do *scaffold* PCL-Gel-MA/PEGDA 10%.

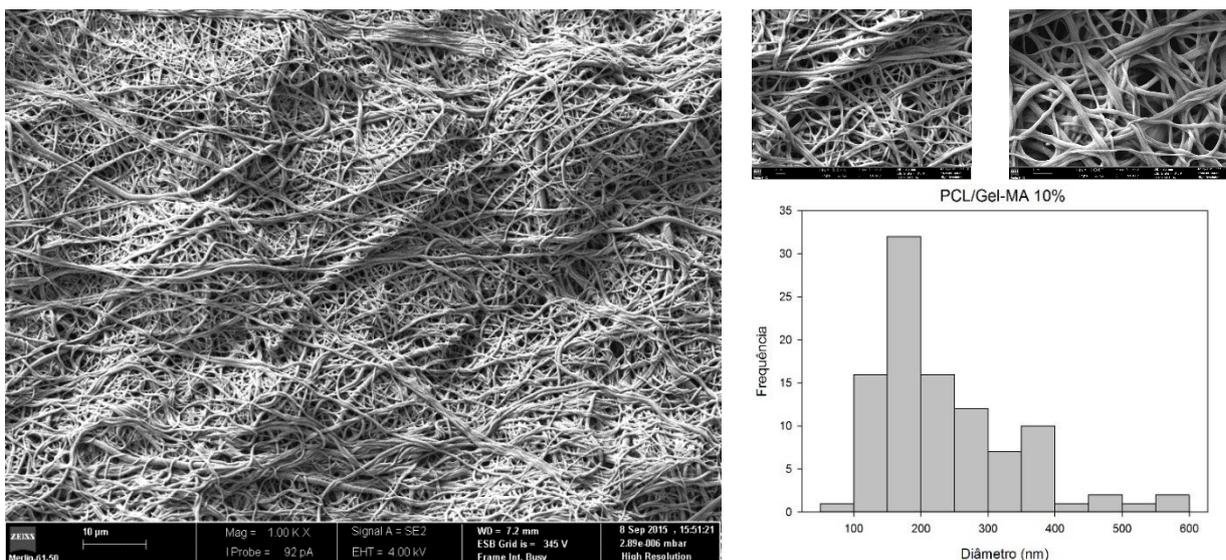
**Tabela 4.4** Valores obtidos para o diâmetro médio das fibras de PCL revestidas com hidrogel a 1 e 10 % e respetivo desvio padrão.

Matriz	Diâmetro (nm)
PCL	1761±735
PCL+Gel-MA 1%	2052±629
PCL+Gel-MA/PEGMA 1%	1844±652
PCL+Gel-MA/PEGDA 1 %	1925±901
PCL+Gel-MA/PEGMA 10%	2121±724
PCL+Gel-MA/PEGDA 10 %	2145±880

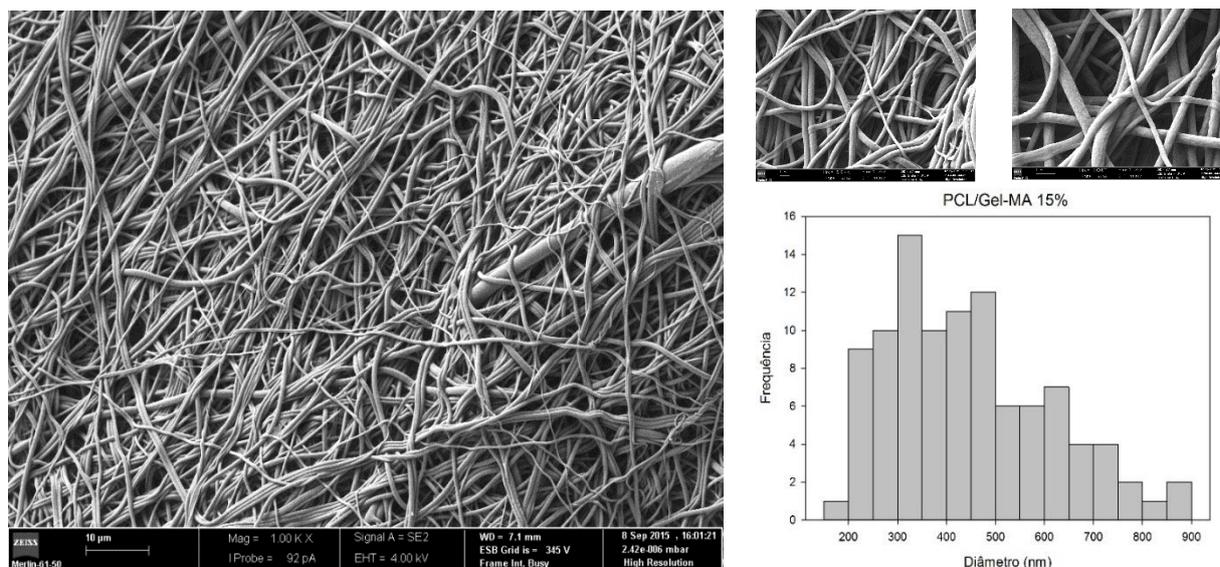
Analisando atentamente as fotografias de SEM das Figuras 4.9 a 4.14, consegue-se observar o revestimento dos hidrogéis de gelatina em torno das fibras havendo, como seria de esperar, um aumento do diâmetro médio das mesmas comparativamente às fibras de PCL não revestidas (Tabela 4.4). Verifica-se ainda que com um aumento da concentração de gelatina há um aumento do diâmetro das fibras. Isto poderá ser resultado do aumento da concentração de Gel-MA nesses hidrogéis, pois para maiores concentrações em soluto, maior é a viscosidade das formulações finais e, após o processo de fotoreticulação, formam-se hidrogéis mais densos que funcionam melhor como revestimento e não se incorporam tanto dentro das fibras. Para os primeiros materiais, partindo de uma concentração em soluto menor, menos viscosidade das formulações e consequentemente há uma maior penetração do hidrogel nas fibras de PCL. Verifica-se ainda que no *scaffold* revestido pelo hidrogel de Gel-MA 10% (Figura 4.12), este cobriu completamente as fibras, formando-se uma estrutura opaca (o que impediu a visualização das mesmas).

#### 4.3.2. *Scaffolds* compósitos (II)

Para analisar a morfologia das fibras compósitas PCL/Gel-MA, as amostras sintetizadas foram também caracterizadas por análise SEM. Posteriormente, e com recurso às imagens obtidas, os resultados foram analisados, determinando-se os diâmetros das fibras em cada caso. Nas Figuras 4.15 e 4.16 apresenta-se assim a análise efetuada para cada *scaffold* compósito. Na Tabela 4.5 encontram-se os diâmetros médios de cada tipo de fibras.



**Figura 4.15** A) B) C) Fotografias de SEM da superfície do *scaffold* compósito PCL/Gel-MA 10% com uma ampliação de 1000x, 3500x e 10000x respetivamente; D) Histograma dos diâmetros das fibras do *scaffold* compósito PCL/Gel-MA 10%.



**Figura 4.16** A) B) C) Fotografias de SEM da superfície do *scaffold* compósito PCL/Gel-MA 15% com uma ampliação de 1000x, 3500x e 10000x respetivamente; D) Histograma dos diâmetros das fibras do *scaffold* compósito PCL/Gel-MA 15%.

**Tabela 4.5** Valores obtidos para o diâmetro médio dos *scaffolds* PCL/Gel-MA e respetivo desvio padrão.

Matriz	Diâmetro (nm)
PCL/Gel-MA 10%	236±104
PCL/Gel-MA 15%	445±167

Pela visualização das Figuras 4.15 e 4.16 mais uma vez se constata que as fibras produzidas se encontram desorganizadas, devido à montagem experimental utilizada. Contudo, uma vez que se partiu de um sistema com dois polímeros, e por isso de uma solução mais viscosa, as fibras obtidas apresentaram maior densidade e irregularidade, comparativamente às fibras produzidas somente com PCL. Comparando os compósitos, constata-se que quanto maior foi a concentração em soluto, menor foi a densidade da estrutura e, por sua vez, maior o diâmetro das fibras (Tabela 4.5). Um aumento de 5% de concentração de Gel-MA conduziu à formação de fibras com praticamente o dobro do diâmetro médio. Isso poderá resultar da influência da viscosidade na realização do *electrospinning*, sendo um importante parâmetro que influencia diretamente o diâmetro das fibras (neste caso, quanto maior for a viscosidade da solução polimérica, maior será o diâmetro das mesmas após o processo). Com a informação dos histogramas das Figuras 4.15 D) e 4.16 D) verifica-se ainda que a distribuição do diâmetro das mesmas é bastante larga, facto que explica o elevado valor dos respetivos desvios padrões (como já referido no subcapítulo anterior).

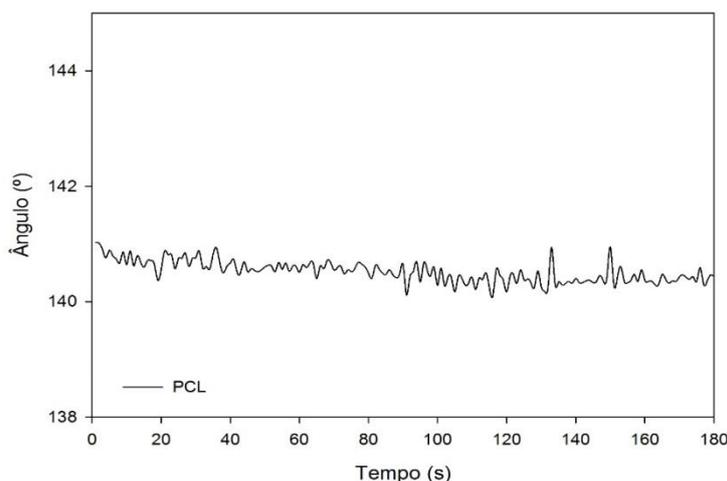
De entre todos os sistemas, seria importante perceber no futuro qual a rede e disposição de fibras mais adequada para a adesão, crescimento e regeneração de tecidos vasculares, aferindo a aplicabilidade destes em *stents* vasculares.

#### 4.4. Determinação dos ângulos de contacto dinâmicos

##### 4.4.1. *Scaffolds* revestidos (I)

Foram feitas medições de ângulos de contato dinâmicos a todas as amostras produzidas, a fim de aferir sobre a capacidade de molhabilidade nos *scaffolds* ao longo de um determinado tempo. A cada material foi-lhe adicionada uma gota de água destilada, avaliando a interação desta e o seu espalhamento ao longo do tempo, sendo essa interação traduzida por ângulo de contacto dinâmico. Em cada caso, o percurso dinâmico da gota foi gravado, registando-se todos os valores obtidos ao longo do tempo.

Para uma melhor análise da incorporação dos hidrogéis nas fibras de PCL, analisou-se primeiramente a capacidade de molhabilidade das fibras não revestidas. O resultado dessa análise encontra-se na Figura 4.17. Na Tabela 4.6 é apresentado o valor médio do ângulo de contacto obtido.



**Figura 4.17** Ângulo de contacto dinâmico das fibras de PCL.

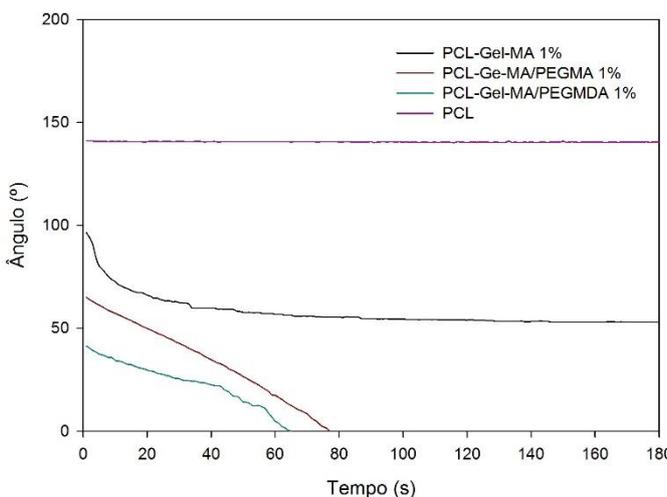
**Tabela 4.6** Valor obtido para o ângulo médio das fibras de PCL e respetivo desvio padrão.

Matriz	$\theta$ Médio
PCL	140.50±0.68

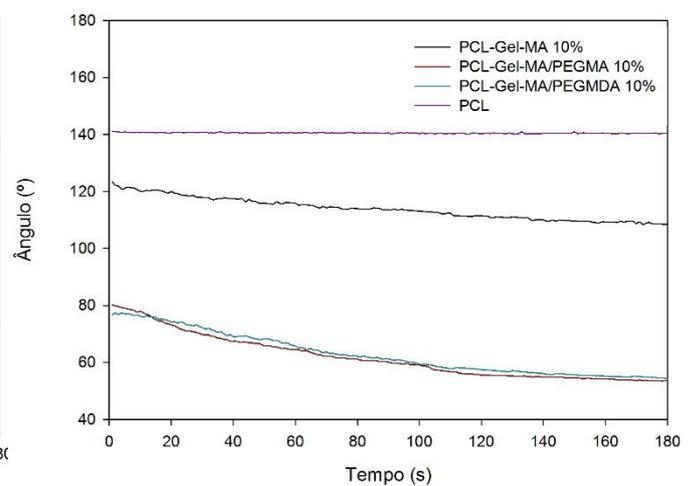
Uma das propriedades intrínsecas da PCL é o seu carácter hidrófobo, resultando em menores capacidades de inchaço e numa menor suscetibilidade à degradação hidrolítica quando comparada a outros polímeros biodegradáveis [99]. Essa degradação lenta torna a PCL um forte candidato para a produção de *scaffolds* fibrosos com o intuito de serem aplicados como *stents* vasculares. Todavia, a hidrofobicidade que lhe é característica pode ser prejudicial na viabilidade celular dos tecidos alvo.

Analisando a Figura 4.16 constata-se que o *scaffold* de fibras de PCL apresenta de facto uma superfície bastante hidrofóbica. Ao longo dos 180 s do teste, em que houve um contacto entre a gota de água destilada e a superfície de fibras, não existiu qualquer espalhamento a considerar que levasse à molhabilidade da sua superfície. A confirmar tal facto está o valor médio do ângulo de contacto ser de  $140.50^\circ$ , com um desvio padrão muito reduzido (somente de  $0.68^\circ$ ). Dado este carácter hidrofóbico, a grande motivação da incorporação dos hidrogéis de gelatina foi poder aumentar a sua hidrofiliidade. Assim sendo, há que analisar quais as diferenças em termos de molhabilidade e hidrofiliidade após os diversos revestimentos. Apresenta-se por isso nas Figuras 4.18 e 4.19 os perfis dos ângulos de contacto dinâmicos para os *scaffolds* com hidrogéis de 1 e 10% em soluto, respetivamente.

Analisando os perfis obtidos constata-se que a incorporação do hidrogel melhorou francamente a hidrofiliidade da superfície dos *scaffolds*, como seria de esperar. Isto advém do hidrogel ter por base a gelatina, que é um polímero natural hidrofílico. Contudo,



**Figura 4.18** Ângulos de contacto dinâmicos para *scaffolds* com hidrogéis de 1% de concentração em soluto.



**Figura 4.19** Ângulos de contacto dinâmicos para *scaffolds* com hidrogéis de 10% de concentração em soluto.

e analisando somente o *scaffold* PCL-Gel-MA 10%, observa-se que esse aumento de hidrofiliçidade não é muito significativo, e isso poderá resultar da concentração que existe de gelatina modificada no material. A modificação da gelatina com MAA altera a sua estrutura química com a introdução de grupos que a tornam mais hidrofóbica. Além disso, não se pode esquecer que a gelatina está reticulada, e por isso a sua hidrofiliçidade será ainda menor, aumentando a resistência à hidrólise e a durabilidade de aplicação.

Observando a influência dos macrómeros, verifica-se que tanto o PEGMA como o PEGDA conferem um aumento na hidrofiliçidade dos *scaffolds*, e isso resulta não só do carácter hidrofílico intrínseco a estes compostos, como de um aumento da cadeia do polímero final constituinte dos hidrogéis [100].

Analisando e comparando a influência da concentração dos hidrogéis, verifica-se que as fibras revestidas com menor concentração de Gel-MA apresentaram-se bastante hidrofílicas. Isto poderá dever-se ao facto de uma menor concentração de Gel-MA no hidrogel resultar numa maior facilidade de penetração do mesmo nas fibras (pois o hidrogel é menos viscoso), contribuindo para um aumento da porosidade das mesmas. Por sua vez, verificar-se-á um aumento de molhabilidade da água destilada nestes *scaffolds*. Já com uma maior concentração de hidrogel, as fibras ficam “revestidas” dada a maior viscosidade, não havendo tanta impregnação do hidrogel no interior das mesmas.

Esta caracterização foi bastante importante para o estudo da hidrofiliçidade dos materiais produzidos, pois comprova-se que o revestimento das fibras de PCL com os hidrogéis de gelatina dá origem a matrizes tendencialmente mais hidrofílicas, proporcionando à partida uma melhor proliferação, migração e viabilidade celular face a uma matriz hidrofóbica (só constituída por PCL) [7]. Assim, constatou-se que estes *scaffolds* poderão ser bastantes promissores para facilitar a infiltração celular e regeneração de tecidos, que na aplicação desejada, *stent* vascular, é algo bastante útil para combater problemas como a reestenose.

#### 4.4.2. *Scaffolds* compósitos (II)

O ângulo de contacto entre uma gota de água e uma matriz resulta, como se sabe, do carácter hidrofóbico/hidrofílico que a matriz apresenta. Pretendeu-se deste modo avaliar

essa interação através da molhabilidade das matrizes compósitas com uma gota de água destilada. O procedimento experimental executado foi exatamente igual ao que foi realizado para os outros materiais. Neste caso, quis-se perceber se a produção por *electrospinning* da mistura de fibras de PCL e gelatina, seguida ainda da fotoreticulação das mesmas, conduziria a uma diferença significativa em termos de hidrofiliicidade dos *scaffolds* finais, comparando com os materiais que foram revestidos pelos hidrogéis. Na Figura 4.20, apresenta-se os resultados obtidos para ambos os compósitos sintetizados.

Através da Figura 4.20 observa-se que ambos os compósitos são bastante hidrofílicos havendo uma molhabilidade por completo em menos de 180 s em ambos os materiais. Verifica-se ainda que com uma maior concentração de gelatina os valores de ângulo de contacto ao longo do tempo são ainda menores, resultando numa maior hidrofiliicidade. Supõe-se deste modo que haja uma maior porosidade entre fibras, provocando uma maior infiltração da água destilada nestes *scaffolds*.

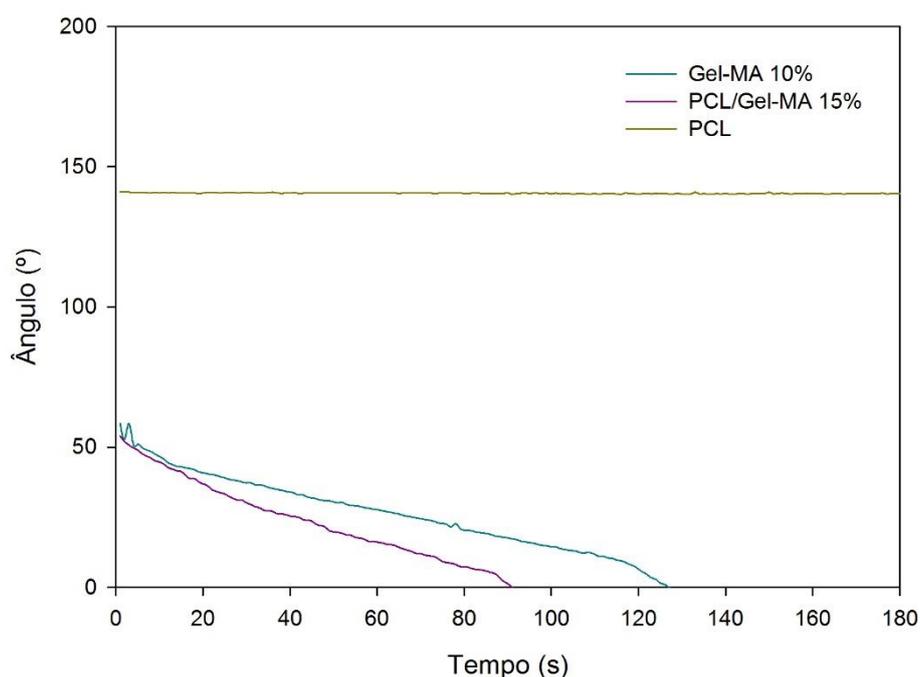


Figura 4.20 Ângulos de contacto dinâmicos dos *scaffolds* compósitos PCL/Gel-MA.

Esta elevada hidrofiliicidade acaba por ser bastante vantajosa para a aplicação pretendida, *stent* vascular, pois originará uma rápida infiltração celular e, conseqüentemente uma regeneração celular mais rápida. Ao mesmo tempo, a componente de fibras de gelatina

que se degrade é suportada pela rede de fibras de PCL, bastante conectadas, que apresentam maior resistência, e por isso mesmo não se comprometerá a duração de aplicação de um material deste tipo no organismo.

Comparando os materiais de ambas as abordagens de síntese, o comportamento dos ângulos dinâmicos dos compósitos foi semelhante aos *scaffolds* revestidos pelos hidrogéis com 1% de concentração em soluto e macrómeros. Daqui se conclui que, pela Abordagem II, foi também possível obter membranas versáteis e hidrofílicas, suprimindo a necessidade de macrómeros nas formulações e incorporando a gelatina logo na fase do *electrospinning*. Além disso, e de acordo com o que foi referido anteriormente, as características morfológicas e de afinidade com a água foram alcançadas numa situação que parece ótima ao crescimento e regeneração vascular, garantindo ao mesmo tempo um desempenho mecânico adequado.

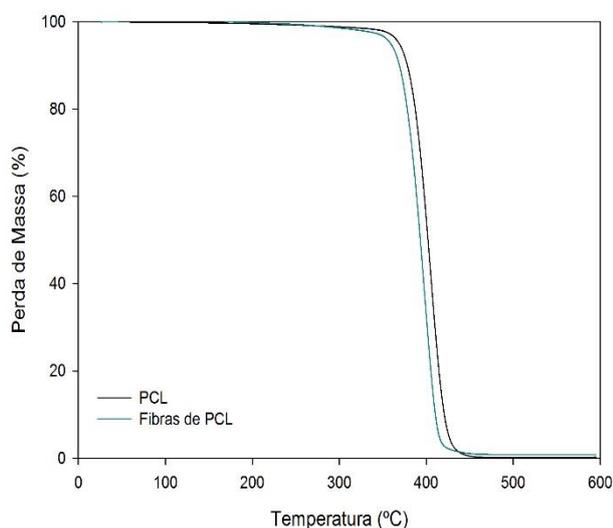
## 4.5. Propriedades térmicas — Análise Termogravimétrica (TGA)

### 4.5.1. *Scaffolds* revestidos (I)

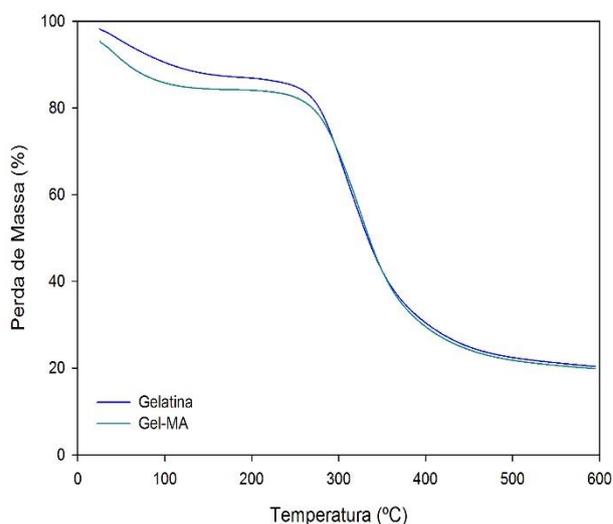
Como referido no Capítulo 3, pretendeu-se com esta caracterização analisar a estabilidade térmica dos materiais produzidos, quando sujeitos a um aumento controlado de temperatura até aos 600 °C. Mais do que comparar a estabilidade térmica entre materiais (nas várias etapas de produção) e a sua aplicabilidade à temperatura fisiológica, o objetivo foi perceber se os produtos finais exibiam comportamentos estáveis a altas temperaturas, aferindo a possibilidade de serem sujeitos a técnicas de processamento (em condições exigentes de temperatura) ou a processos térmicos de esterilização (requisito fundamental para aplicação interna no organismo).

Assim, foram determinadas as temperaturas de degradação ( $T_d$ ) de cada *scaffold* produzido. Analisou-se, de forma geral, os perfis de degradação exibidos para as matérias-primas (PCL e gelatina), gelatina modificada com MAA (Gel-MA), fibras de PCL produzidas por *electrospinning* e *scaffolds* finais. Na Figura 4.21 encontram-se representadas as curvas termogravimétricas da PCL e das fibras de PCL realizadas por *electrospinning*. Nesta parte pretendeu-se analisar as diferenças na estabilidade térmica das fibras, comparativamente à PCL original. Com a análise, quis-se também constatar se

existiriam ainda possíveis resíduos de solvente nas fibras. Na Figura 4.22 exibem-se os perfis de degradação da gelatina e da Gel-MA. Neste caso, o objetivo foi perceber que influência a funcionalização com MAA e subsequente fotoreticulação tiveram na estabilidade térmica da gelatina. Na Tabela 4.7 encontram-se registados os valores de temperatura de degradação para as matérias-primas, fibras e Gel-MA: 1) Valores de  $T_{d, inicial}$  correspondem aos valores de temperatura imediatamente antes da descida abrupta da curva (considerados o primeiro valor de temperatura de degradação); 2) Valores de  $T_{d, final}$  são os valores de temperatura para os quais o perfil tende a estagnar com quantidades residuais de amostra; 3) e por fim os valores de DTG são as temperaturas de degradação obtidas pelos picos das derivadas da curva de TGA.



**Figura 4.21** Curvas termogravimétricas de PCL e de fibras de PCL, obtidas com uma rampa de aquecimento de 10°C/min.



**Figura 4.22** Curvas termogravimétricas da Gelatina e Gel-MA, obtidas com uma rampa de aquecimento de 10°C/min.

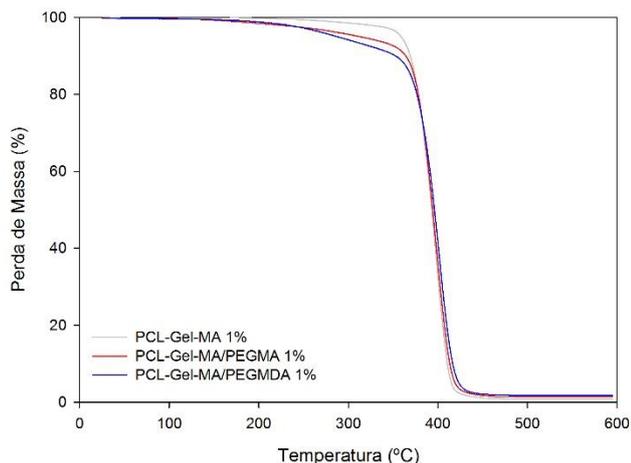
**Tabela 4.7** Temperatura de degradação inicial e final, perda de massa e temperatura de degradação da derivada de TGA para: PCL, fibras de PCL, Gelatina e Gel-MA.

<b>Material</b>	<b><math>T_{d, inicial}</math> (°C)</b>	<b><math>T_{d, final}</math> (°C)</b>	<b>Perda de Massa (%)</b>	<b>DTG (°C)</b>
<b>PCL</b>	382.43	421.97	99.80	404.92
<b>Fibras PCL</b>	353.51	412.84	96.36	397.20
<b>Gelatina</b>	301.16	376.31	77.84	309.26
<b>Gel-MA</b>	330.69	379.31	75.06	326.85

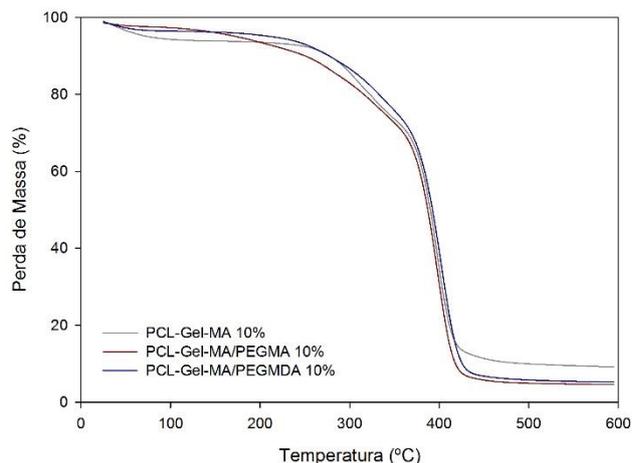
Analisando o gráfico da Figura 4.21 constata-se que as curvas termogravimétricas da PCL e suas fibras são muito semelhantes. Em ambas, a perda de massa ocorreu numa única

fase. O polímero PCL inicia a sua degradação aos 382.43 °C e termina a 421.84 °C com uma taxa de degradação de 99.80 %. As fibras de PCL, por sua vez, começam o seu processo de degradação antecipadamente aos 353.51 °C e terminam aos 412.84 °C, o que resulta em 96.36% de degradação. Esta ligeira diferença no início de degradação entre o polímero e as fibras de PCL indicam que as fibras são termicamente menos estáveis que o polímero [100]. Esta diferença nos valores poderá resultar da PCL sofrer uma alteração física, aquando a realização das fibras. Contudo não perdeu a sua química base, sendo a diferença de estabilidade praticamente insignificante. Não se observa qualquer indício de solvente presente nas fibras, o que confirma a sua total evaporação durante o processo de produção por *electrospinning* [16]. Desta forma poder-se-á aferir, à partida, que não existe solvente aprisionado nas fibras capaz de induzir toxicidade quando em contacto com os tecidos humanos.

Analisando a Figura 4.22 (correspondente à gelatina antes e pós funcionalização), é possível averiguar que as curvas termogravimétricas são bastante semelhantes, sendo praticamente coincidentes para temperaturas mais elevadas. Ambos os materiais perderam mais de 10% da sua massa até aos 100°C, todavia a Gelatina começou realmente a degradar-se aos 301.16 °C (tendo o perfil estagnado aos 376.31 °C, o que origina 77.84% de perda de massa), enquanto a Gel-MA exibiu uma  $T_d$  de 330.69 °C, estagnando o perfil aos 379.41 °C (75.06% de degradação). Pode-se então induzir que a modificação da Gelatina com MAA provocou um ligeiro aumento na sua estabilidade térmica, uma vez que exibiu um maior valor de  $T_d$ . No entanto, é preciso observar com mais atenção o traço termogravimétrico da Gel-MA. Analisadas as curvas termogravimétricas dos polímeros base, segue-se o estudo da influência do revestimento dos diversos hidrogéis de Gel-MA na temperatura de degradação das fibras de PCL. As Figuras 4.23 e 4.24 exibem os perfis de degradação para os *scaffolds* revestidos com hidrogéis de diferentes concentrações em soluto, 1 e 10% respetivamente. Na Tabela 4.8 estão registados todos os valores de interesse.



**Figura 4.23** Curva Termogravimétrica dos *scaffolds* com 1% de concentração, obtida a uma rampa de aquecimento de 10°C/min.



**Figura 4.24** Curva Termogravimétrica dos *scaffolds* com 10% de concentração, obtida a uma rampa de aquecimento de 10°C/min.

**Tabela 4.8** Temperatura de degradação inicial e final, perda de massa e temperatura de degradação da derivada de TGA para os *scaffolds* de fibras de PCL revestidos com hidrogel.

Material	T <sub>d,inicial</sub> (°C)	T <sub>d,final</sub> (°C)	Perda de Massa (%)	DTG (°C)
<b>PCL-Gel-MA 1%</b>	372.13	412.70	99.13	397.65
<b>PCL-Gel-MA/PEGMA 1%</b>	374.72	415.71	89.41	397.80
<b>PCL-Gel-MA/PEGDA 1%</b>	373.64	414.54	98.64	398.05
<b>PCL-Gel-MA 10%</b>	360.43	416.49	93.81	398.18
<b>PCL-Gel-MA/PEGMA 10%</b>	374.90	417.48	98.05	401.68
<b>PCL-Gel-MA/PEGDA 10%</b>	368.61	422.05	93.13	402.49

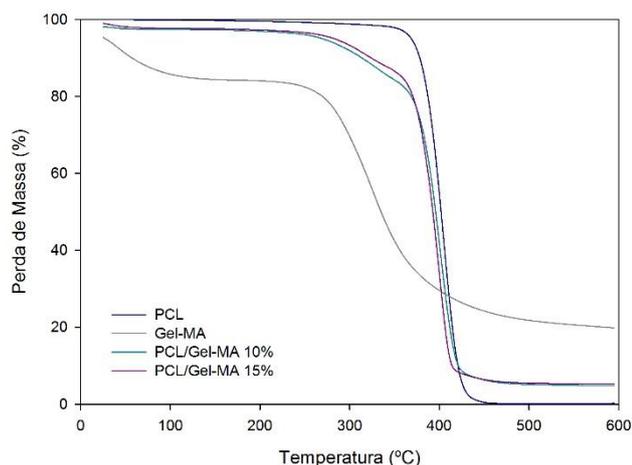
Analisando as Figuras 4.23 e 4.24, paralelamente com a Tabela 4.8, constata-se que os *scaffolds* com maior concentração de hidrogel tendem a ser mais instáveis termicamente, iniciando a sua degradação a uma temperatura inferior relativamente aos *scaffolds* com menos concentração de hidrogel. Este aspeto era previsível pois sendo o hidrogel de base gelatina, um polipeptídeo, é termicamente menos resistente que a PCL, um éster sintético [101]. Assim sendo, quanto maior for a componente de gelatina no hidrogel, mais instável termicamente poderá ser o *scaffold*.

Relativamente à composição dos hidrogéis, denota-se que a incorporação dos macrómeros PEGMA e PEGDA conferem um ligeiro aumento da temperatura de degradação, apesar de não ser significativo.

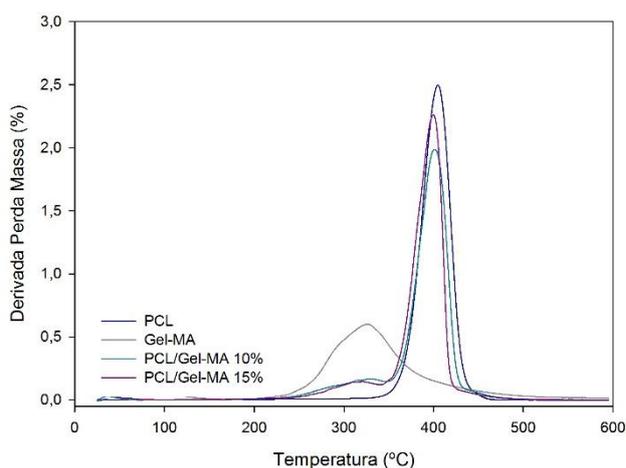
Os resultados permitiram concluir que, apesar das várias etapas de produção e das diferentes formulações, os *scaffolds* revestidos apresentaram elevada estabilidade térmica, sendo necessárias temperaturas muito elevadas para comprometer as suas propriedades mecânicas. Para a aplicação pretendida (*stent* vascular) não existe qualquer contra-indicação, como era esperado. Para eventuais processamentos em que sejam sujeitos a temperaturas elevadas, ou em casos de esterilização por ação do calor, também não são previstos problemas, uma vez que os materiais exibem comportamentos térmicos bastante estáveis. De referir que a capacidade de esterilização é de grande importância, uma vez que um dos requisitos fundamentais para que qualquer biomaterial seja implementado no interior do organismo é o estar e ser asséptico [103].

#### 4.5.2. *Scaffolds* compósitos (II)

De forma análoga aos *scaffolds* revestidos, recorreu-se também à técnica TGA para avaliar a estabilidade térmica dos *scaffolds* compósitos. Na Figura 4.24 apresentam-se os traços termogravimétricos para as matérias-primas PCL e Gel-MA, assim como para os compósitos sintetizados por *electrospinning*. Para este caso, apresentam-se ainda as curvas DTG, das quais se retiraram os valores de temperatura de degradação correspondentes a 50% de perda de massa. Na Tabela 4.9 encontram-se listadas as temperaturas de degradação obtidas.



**Figura 4.25** Curvas termogravimétricas dos *scaffolds* compósitos e matérias-primas, obtidas a 10°C/min.



**Figura 4.26** Curvas da derivada de TGA (DTG) dos *scaffolds* compósitos e matérias-primas.

**Tabela 4.9** Temperatura de degradação inicial e final, perda de massa e temperatura de degradação da derivada de TGA para: PCL, Gel-MA e compósitos PCL/Gel-MA.

<b>Material</b>	<b>T<sub>d,inicial</sub> (°C)</b>	<b>DTG (°C)</b>	<b>T<sub>d,final</sub> (°C)</b>	<b>Perda de Massa (%)</b>
<b>PCL</b>	382.43	404.92	421.97	99.80
<b>Gel-MA</b>	330.69	326.85	379.31	75.06
<b>PCL/Gel-MA 10%</b>	373.39	401.27	418.52	93.07
<b>PCL/Gel-MA 15%</b>	378.40	403.12	419.90	92.90

Analisando a Figura 4.25, constata-se pelas curvas termogravimétricas que há uma homogeneização entre os dois polímeros, observando a degradação das fibras compósitas. A degradação das mesmas, e tal como se sucede com a Gel-MA, ocorre essencialmente em dois estágios. O primeiro estágio, que corresponde à perda de água residual, inicia-se a 25.32°C, estagnando depois até aos 354.45°C, no caso da PCL/Gel-MA 10%. Para a PCL/Gel-MA 15%, inicia-se a 25.43°C e estabiliza até aos 352.70°C. O segundo estágio, que corresponde à principal degradação do polímero, constata-se que inicia mais tarde para o *scaffold* com maior teor de concentração de soluto (PCL/Gel-MA 15%), algo que não é significativo avaliando de forma geral a estabilidade térmica dos produtos [100].

Observando a Figura 4.26 e Tabela 4.9 é possível verificar que a temperatura de degradação em ambos os *scaffolds* é mais próxima da temperatura de degradação da PCL do que da Gel-MA, algo que era expectável dada a percentagem de PCL (70%) no *scaffold* comparativamente à gelatina funcionalizada (30%), induzindo-lhes assim uma temperatura de degradação superior [104].

Com esta análise termogravimétrica constata-se que os *scaffolds* compósitos apresentam grande estabilidade térmica, podendo estes materiais ser sujeitos a altas temperaturas sem alterações significativas das suas propriedades. Comparando todos os resultados obtidos conclui-se que a estabilidade térmica dos materiais finais não é comprometida independentemente da abordagem de síntese. Todavia, as fibras de Gel-MA misturadas com fibras de PCL apresentam valores de T<sub>d</sub> superiores quando comparadas com as fibras de PCL que são revestidas com os hidrogéis (com e sem macrómeros). Os processos de *electrospinning* e fotoreticulação são também uma mais-valia na obtenção de materiais termicamente estáveis, com grande potencial de aplicação além da área médica [105].

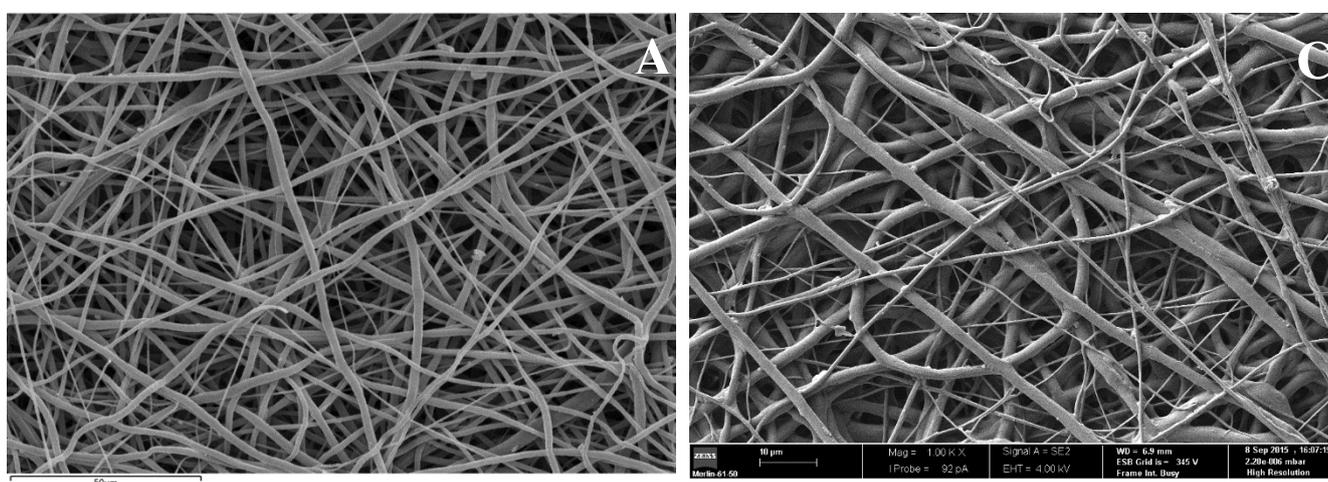
O potencial de esterilização a elevada temperatura poderá ser assegurado antes de os *scaffolds* serem implementados nas artérias como *stents* vasculares, evitando deste modo que microrganismos oportunistas entrem na corrente sanguínea ou provoquem infeções no momento de implantação.

## 4.6. Degradação hidrolítica

### 4.6.1 Microscopia eletrónica de Varrimento (SEM) – *Scaffolds* revestidos (I)

O tempo desejado de permanência dos materiais no organismo é um dos fatores chave para o sucesso do implante onde a sua durabilidade vai depender da biodegradabilidade dos materiais usados [2]. Sendo estes *scaffolds* revestidos com hidrogéis, estes são os que mais rapidamente sofrem um processo de degradação. Assim, a melhor forma de avaliar a sua degradabilidade é através de uma análise morfológica recorrendo à técnica de SEM. O teste realizado decorreu em 3 estágios de tempo: 0 dias, 2 dias e 28 dias.

Foi feito um teste inicial às fibras de PCL para confirmar se de facto estas apresentavam ou não degradabilidade ao longo de 28 dias, apurando posteriormente a sua influência no processo de degradação do hidrogel.

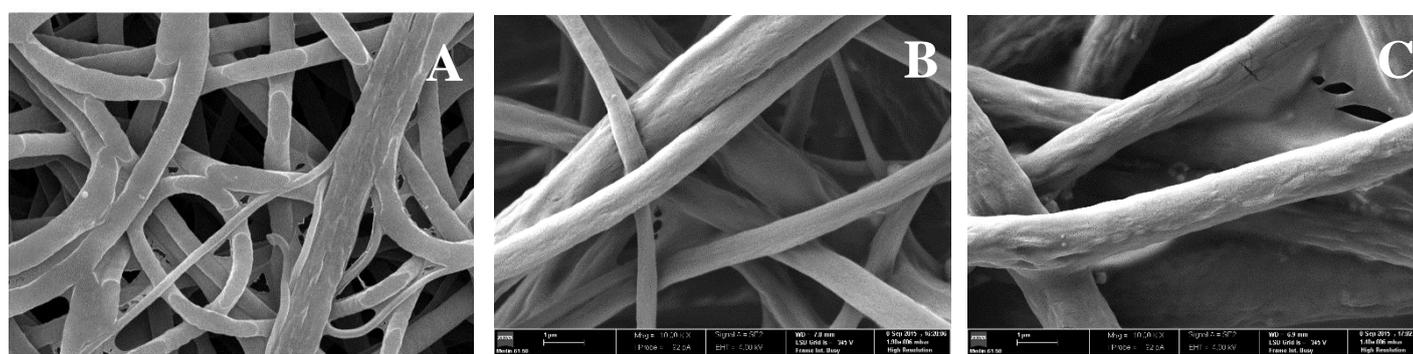


**Figura 4.27** Imagens SEM das fibras de PCL em diferentes tempos de degradação: a) Início do ensaio (0 dias); C) 28 dias. Ampliação: 750x.

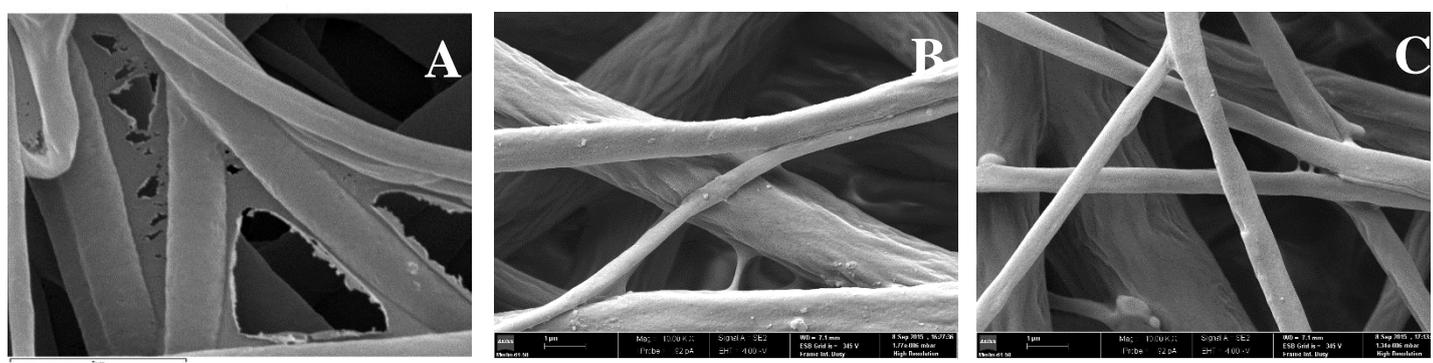
Analisando a Figura 4.27, constata-se que após uma incubação a 37 °C em PBS (pH=7.4) durante 28 dias, as fibras de PCL não sofreram alterações de morfologia à sua superfície, facto que era esperado pois têm por base um polímero que, segundo a literatura, exhibe

tempos de degradação em ambiente biológico até dois anos [106]. Deste modo, o processo de degradação da PCL não irá influenciar o estudo de morfologia do hidrogel nas fibras.

Todos os *scaffolds* revestidos com os hidrogéis foram submetidos aos diferentes estágios de degradação em PBS. Quis-se perceber qual a suscetibilidade à hidrólise dos diferentes revestimentos, tendo por base uma gelatina reticulada. Quis-se perceber ainda, e mais uma vez, a influência que os macrómeros teriam nessa degradação. As Figuras 4.28, 4.29 e 4.30 mostram as fotografias SEM obtidas para os *scaffolds* com 1% de Gel-MA, para os dias 0, 2 e 28 de degradação. Por sua vez, nas Figuras 4.31, 4.32 e 4.33 exibem-se as imagens dos *scaffolds* com 10% de Gel-MA.



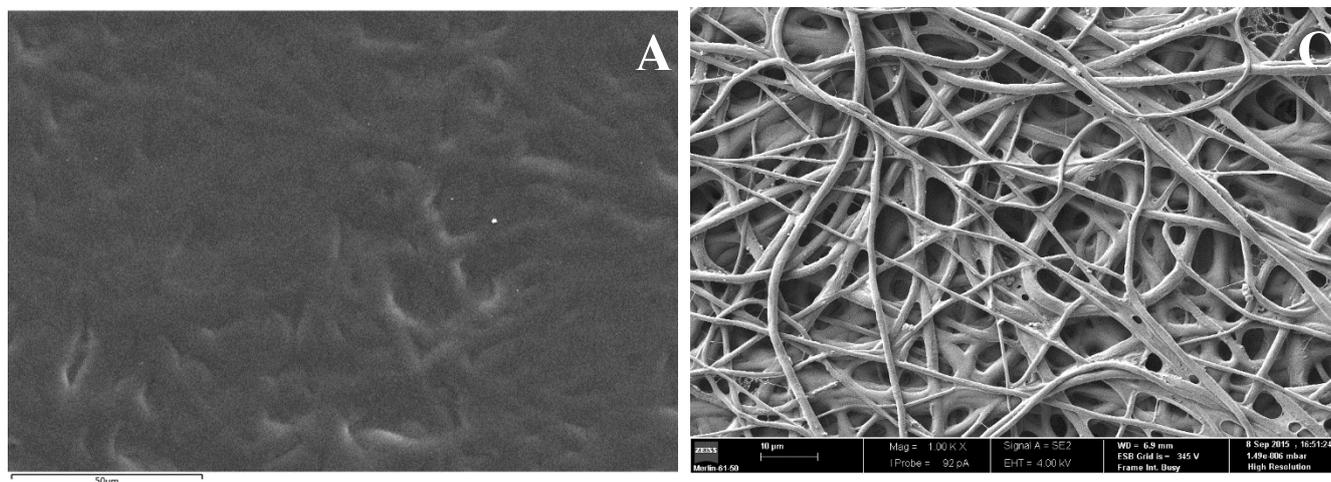
**Figura 4.28** Imagens SEM dos *scaffolds* PCL-Gel-MA 1% em diferentes tempos de degradação: a) Início do ensaio (0 dias); B) 2 dias; C) 28 dias. Ampliação: 10000x.



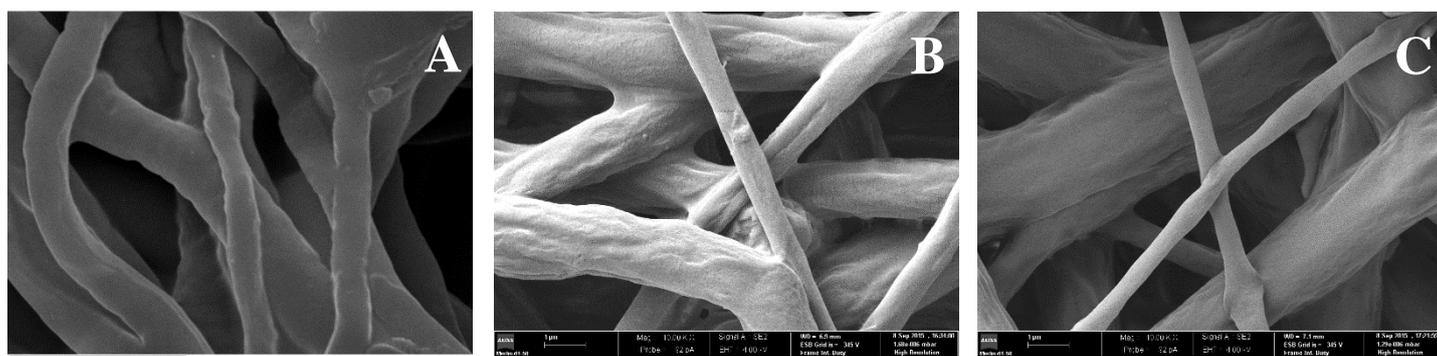
**Figura 4.29** Imagens SEM dos *scaffolds* PCL-Gel-MA/PEGMA 1% em diferentes tempos de degradação: a) Início do ensaio (0 dias); B) 2 dias; C) 28 dias. Ampliação: 10000 x.



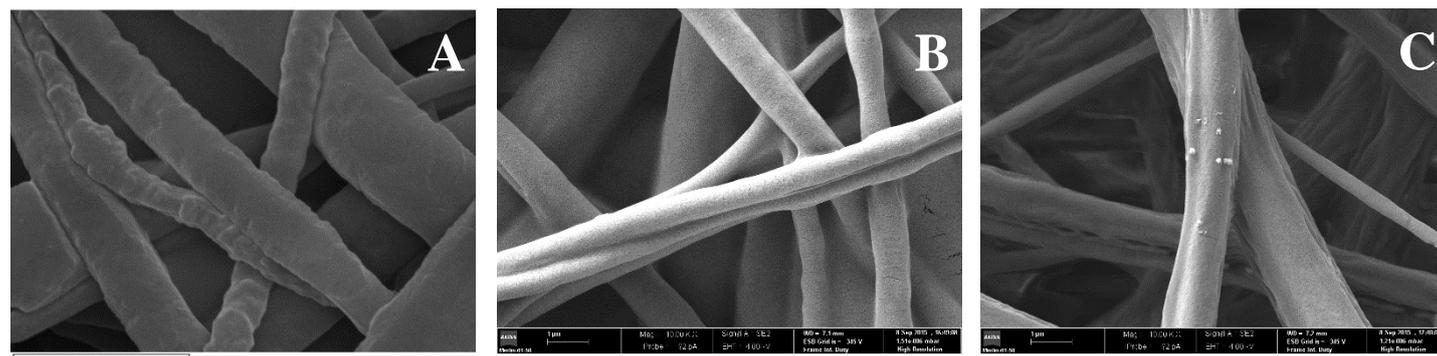
**Figura 4.30** Imagens SEM dos *scaffolds* PCL-Gel-MA/PEGDA 1% em diferentes tempos de degradação: a) Início do ensaio (0 dias); B) 2 dias; C) 28 dias. Ampliação: 10000 x.



**Figura 4.31** Imagens SEM dos *scaffolds* PCL-Gel-MA 10% em diferentes tempos de degradação: a) Início do ensaio (0 dias); C) 28 dias. Ampliação: 750x.



**Figura 4.32** Imagens SEM dos *scaffolds* PCL-Gel-MA/PEGMA 10% em diferentes tempos de degradação: a) Início do ensaio (0 dias); B) 2 dias; C) 28 dias. Ampliação: 10000 x.



**Figura 4.33** Imagens SEM dos *scaffolds* PCL-Gel-MA/PEGDA 10% em diferentes tempos de degradação: a) Início do ensaio (0 dias); B) 2 dias; C) 28 dias. Ampliação: 10000 x.

Observando as Figuras 4.28-4.33 A) e B), que dizem respeito às amostras que sofreram degradação durante 2 dias, é possível constatar que não há diferenças visíveis na constituição das fibras e nos seus revestimentos. Esta constatação era esperada, pois a gelatina estando funcionalizada com MAA e fotoreticulada exibe uma maior resistência à hidrólise pois apresenta um carácter menos hidrofílico. Desta forma, a sua degradação em ambiente aquoso não se esperava instantânea [102]. Do ponto de vista da aplicação em estudo, é algo bastante positivo, uma vez que se garante o revestimento das fibras por mais tempo, adequado à adesão e regeneração do tecido nativo.

Ocorridos os 28 dias de incubação dos *scaffolds* a 37°C em PBS (pH= 7.4) (Figuras 4.28-4.33 C)), constata-se que há uma perda acentuada de hidrogel contendo somente Gel-MA (para as duas concentrações em soluto), mas não se evidencia qualquer alteração morfológica nos hidrogéis com macrómeros.

Desta breve análise, pode-se aferir que os *scaffolds*, apesar de exibirem revestimentos de gelatina, vão apresentar taxas de degradação de revestimento favoráveis ao crescimento celular e taxas de degradação superior das fibras de PCL o que, tendo em conta a aplicabilidade como *stents* vasculares, é extremamente vantajoso, pois a sua permanência numa artéria enfraquecida melhora a sua estabilidade.

Mesmo os *scaffolds* que contêm somente Gel-MA poderão ser viáveis para a aplicação desejada, uma vez que a gelatina, sendo um polímero de origem natural, é muito usada em aplicações biomédicas devido às suas propriedades de adesão e proliferação celular (facilitando a regeneração do tecido/órgão), como mencionado anteriormente. Assim, à medida que o hidrogel se degrada haverá a adesão e proliferação celular, ocorrendo a regeneração do tecido, que é posteriormente suportada pelas fibras de PCL para garantir estabilidade mecânica. Consegue-se deste modo um equilíbrio entre a degradação e a regeneração/estabilidade, sem nunca comprometer a artéria. Com isto, estão as condições criadas para prevenir a ocorrência de complicações típicas em doenças vasculares como o caso da reestenose.

#### 4.6.2 Determinação da perda de massa (%) por degradação hidrolítica – *Scaffolds* compósitos (II)

De forma a analisar a degradação *in vitro* dos compósitos PCL/Gel-MA, estes foram incubados em PBS (pH=7,4) a 37°C durante 3 estágios: 0 dias, 2 dias e 28 dias e as perdas da massa quantificadas. A Tabela 4.10 mostra os resultados desse teste.

**Tabela 4.10** Percentagem de degradação dos *scaffolds* após 0, 2 e 28 dias de incubação em PBS à temperatura fisiológica.

Estágios (dias)	Percentagem de degradação (%)		
	0	2	28
PCL/Gel-MA 10%	-	0.61	4.07
PCL/Gel-MA 15%	-	0.55	2.58

Observando a Tabela 4.10, é possível perceber que os *scaffolds* compósitos se vão degradando, contudo os valores de perda de massa (%) são bastante reduzidos, o que comprova a estabilidade das fibras em ambiente biológico. Isto indica que as fibras de gelatina funcionalizada com MAA presente nas fibras compósitas está devidamente reticulada, o que retarda o processo de degradação da mesma. Além disso, o facto de a gelatina ser incorporada por *electrospinning* à PCL, que é um polímero de degradação lenta, favorece ainda mais o retardar desse processo [106]. Constata-se ainda que uma maior concentração em soluto resulta numa diminuição da degradação. Com maior concentração, há um aumento da viscosidade da solução, e consequentemente produzem-se fibras de maior diâmetro, logo com uma superfície específica menor, o que implica uma degradação hidrolítica mais lenta [16].

Na aplicação desejada, *stent* vascular, este retardamento na degradação dos compósitos traz vantagens, pois quer-se que este permaneça na artéria o máximo de tempo possível criando condições adequadas a uma boa passagem do fluxo sanguíneo, sem problemas de entupimentos ou outras complicações terapêuticas.

## 4.7. Hemocompatibilidade

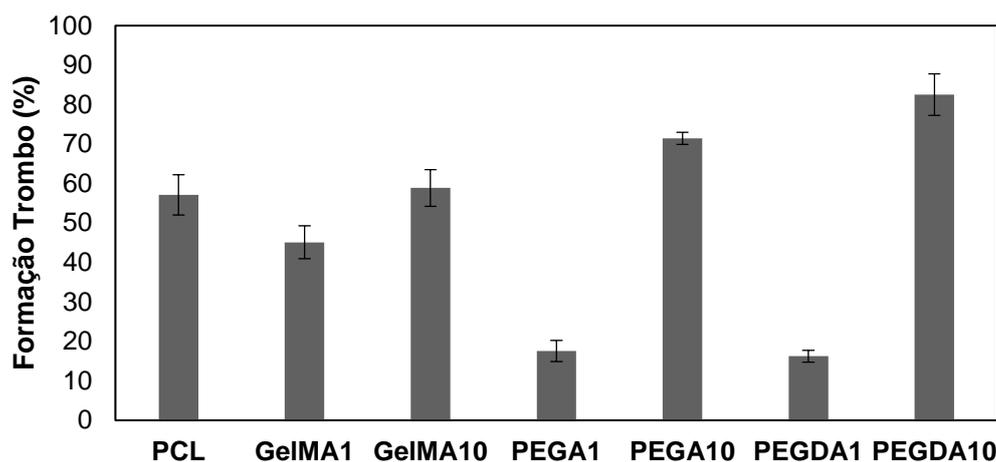
Tal como referido no Capítulo 1, um *stent* vascular pretende desobstruir as veias e artérias enfraquecidas, sendo usado na prevenção e/ou tratamento de doenças inflamatórias vasculares e agindo como um *scaffold* de suporte e regeneração de tecido. Uma vez que se trata de um implante que irá estar em contacto com a corrente sanguínea, foi essencial avaliar a hemocompatibilidade dos *scaffolds* produzidos (pelas duas abordagens experimentais), de acordo com as regras estabelecidas pela norma internacional “ISO-10993-4” [91]. Foram realizados dois testes: avaliação da capacidade trombogénica dos *scaffolds* e determinação da percentagem de hemólise que cada material foi capaz de provocar nos constituintes do sangue.

### 4.7.1. Avaliação da Trombogenicidade

#### 4.7.1.1. *Scaffolds* revestidos (I)

Quando um *stent* é implementado na artéria, uma das preocupações a ter em conta é que o material aplicado não origine ou induza a formação de trombos/coágulos de sangue capazes de originar uma embolia arterial.

Deste modo, a realização de um teste direcionado a analisar o comportamento dos materiais quando em contacto direto com o sangue tornou-se indispensável. Quis-se perceber, neste primeiro teste, se os materiais iriam ou não ter superfícies que induzissem a formação de trombos. De referir que a trombogenicidade é um dos principais problemas dos biomateriais quando implantados em contacto direto e permanente com o fluxo sanguíneo [107-109]. Para que os materiais sintetizados sejam hemocompatíveis, a formação de trombos e coágulos não deve existir ou ser a mínima possível. O estudo da trombose foi realizado de acordo com o método gravimétrico de *Imai and Nose* [92], tal como descrito no Capítulo 3. Na Figura 4.34 apresentam-se as percentagens de massa de coágulos, após um contacto entre materiais e sangue de 40 minutos.



**Figura 4.34** Valores de massa (%) dos trombos formados na superfície dos *scaffolds*, após 40 minutos de contacto com o sangue. Valores obtidos representam a média de três amostras.

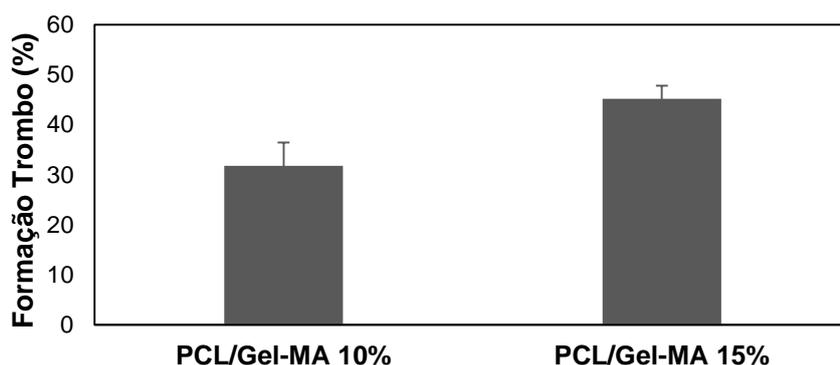
Analisando a Figura 4.34 e sabendo que o controlo positivo do teste, K+, representa a formação de trombos na superfície do vidro (correspondendo a 100% de trombose) verificou-se, de uma forma geral, que todos os *scaffolds* têm tendência para induzir a formação de trombos quando em contacto direto com o sangue. Para a aplicação desejada, *stents* vasculares, tal situação não é favorável, pois por mais pequena que seja a tendência de um biomaterial em formar coágulos, este processo pode levar ao entupimento da artéria e a complicações vasculares bastante graves. Sabe-se, da literatura [108], que superfícies mais hidrofóbicas tendem a apresentar uma maior afinidade proteica, ou seja, há uma maior adesão de proteínas ao biomaterial, ocorrendo a coagulação na sua superfície. Sendo a PCL um polímero hidrofóbico, era expectável que fosse induzir a formação de coágulos. A gelatina, sendo hidrofílica, era previsível que exibisse valores de trombogenicidade menores. Todavia, o facto de estar funcionalizada com MAA e estar reticulada faz com que apresente uma superfície mais propícia à produção de trombos, sendo a trombogenicidade mais evidente quanto maior foi a concentração em soluto do hidrogel (cerca de 40% de massa de coágulo a ser formada para Gel-MA 1% e perto de 60% para Gel-MA 10%). Comparando os *scaffolds* com diferentes percentagens de soluto e macrómeros, constata-se que os que apresentam menores valores de trombogenicidade (abaixo de 20%) são os de menor teor em Gel-MA (1%), com PEGMA e PEGDA. Estes resultados estão concordantes com os valores de ângulos de contacto médio registados nos ensaios de ângulos de contacto dinâmicos. Nesse teste, estes mesmos materiais foram os mais hidrofílicos, com valores de ângulo de contacto muito baixos. Todavia, os

resultados obtidos sugerem um esforço na síntese, de forma a conseguir alcançar formulações que evitem qualquer formação de coágulos no sangue. Uma solução que poderá ser desenvolvida no futuro para contornar o problema passa por incorporar fármacos anti-plaquetários nos *scaffolds*.

#### 4.7.1.2. *Scaffolds* compósitos (II)

Um dos problemas que ocorre nas veias e artérias é o seu entupimento provocando a ocorrência de trombozes ou embolias, como já referido. Para prevenir a ocorrência desta situação são realizadas cirurgias onde lhes são colocados *stents* vasculares.

Foram também realizados ensaios de hemocompatibilidade aos *scaffolds* compósitos, avaliando a indução da formação de coágulos nas suas superfícies, estabelecendo-se o contacto direto com o sangue por 40 minutos. O estudo foi feito em triplicado. Os resultados dessa análise encontram-se na Figura 4.35.



**Figura 4.35** Valores de massa (%) dos trombos formados na superfície dos *scaffolds*, após 40 minutos de contacto com o sangue. Valores obtidos representam a média de três amostras; k+, controlo positivo =100%

Tal como se sucedeu com os *scaffolds* revestidos com hidrogel, estes também originaram coágulos nas suas superfícies, o que não é de todo ideal para a aplicação pretendida onde se quer a nulidade de formação de trombos. O facto de ocorrer trombos, ou seja coágulos sanguíneos, pode levar ao entupimento da artéria, que é algo que se quer colmatar. Contudo, estes *scaffolds* podem ainda ser viáveis para a aplicação desejada inserindo-lhe um fármaco anti-plaquetário, que é um estudo que se pretende futuramente para ambas as abordagens de síntese.

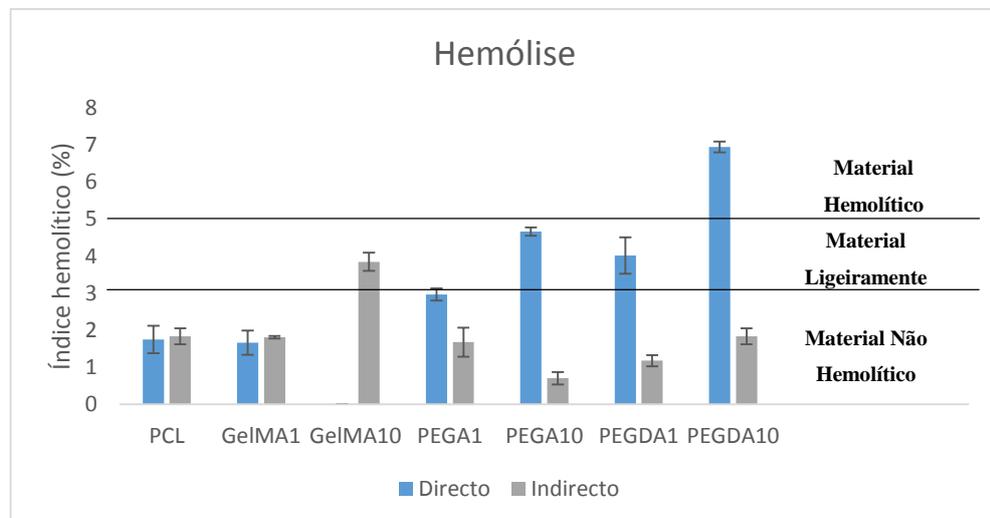
## 4.7.2 Determinação do índice hemolítico

### 4.7.2.1. *Scaffolds* revestidos (I)

Com o objetivo de desenvolver um *scaffold* que sirva como *stent* vascular, torna-se indispensável averiguar a sua integridade como biomaterial quando o mesmo entrar em contacto com a corrente sanguínea.

Na realização do teste para determinação do índice hemolítico de cada amostra de *scaffold* foram realizados dois contactos. Em um dos testes os materiais foram incubados em contacto direto com o sangue ACD-A de coelho, no outro foram previamente incubados por 24 horas numa solução PBS (de forma a remover todos os subprodutos ou produtos não convertidos dos materiais) e seguidamente incubados em sangue ACD-A de coelho. É de referir que este estudo teve por base a norma ASTM F 756-00 [110], que divide em três grupos os materiais quanto ao seu índice hemolítico: 1) hemolítico - > 5%, 2) ligeiramente hemolítico - 2-5 % e 3) não hemolítico - < 2% (como já havia sido mencionado no Capítulo 3). Foram realizados os testes em materiais sintetizados de forma distinta: *scaffold* de fibras de PCL revestidas com hidrogel (Gel-MA 1%, Gel-MA 10%, PEGMA 1%, PEGMA 10 %, PEGDA 1% e PEGDA 10%), *scaffold* compósito de PCL/Gel-MA (PCL/Gel-MA 10%, PCL/Gel-MA 15%), e ainda as fibras de PCL que foram a base de comparação.

Na Figura 4.36 apresentam-se os resultados obtidos do contacto direto e indireto para os *scaffolds* revestidos.



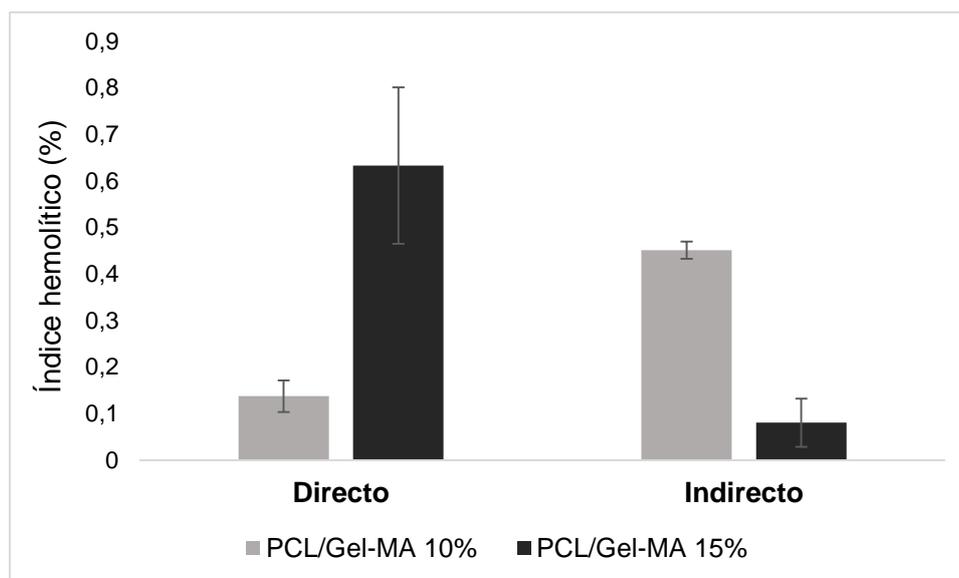
**Figura 4.36** Valores de índice hemolítico obtidos para os *scaffolds* revestidos por contacto direto e indireto.

Antes de avaliar e discutir os resultados do *scaffold* PCL revestido com hidrogel é preciso referir antes de mais que não foi possível determinar o índice hemolítico por contacto direto do *scaffold* PCL revestido com Gel-MA 10% uma vez que durante o tempo de incubação no sangue este foi completamente absorvido dada a hidrofiliabilidade da gelatina (este foi completamente absorvido provocando um inchamento nos poros e não na sua dimensão). Analisando então os resultados da Figura 4.36 verifica-se que em contacto direto com o sangue somente a PCL revestida com hidrogel Gel-MA 1% mostra-se como material não-hemolítico, enquanto os materiais de base PCL revestida com Gel-MA/PEGMA 1%, Gel-MA/PEGMA 10 % e Gel-MA/PEGDA 1 % se mostram como ligeiramente hemolíticos; em contrapartida o *scaffold* PCL revestido com hidrogel Gel-MA/PEGDA 10% apresentou ser um material hemolítico. Todavia, estes mesmos materiais apresentaram excelentes resultados de índice hemolítico quando foram sujeitos a uma incubação prévia em PBS. Houve uma mudança drástica nos resultados dos hidrogéis com macrómero, tornando-se todos neste caso não hemolíticos. Isto permite concluir que neste tipo de *scaffolds*, mais concretamente na composição do hidrogel, existem produtos que podem ser prejudiciais em contacto com os eritrócitos do sangue, levando à sua destruição e conseqüentemente causando a hemólise.

Pode-se concluir no entanto que, de uma forma geral, os materiais sintetizados exibiram um contacto com os eritrócitos bastante promissor. Neste caso, tendo em vista a aplicação como *stents* vasculares, os resultados *in vitro* foram satisfatórios, permitindo-nos prever que os *scaffolds* não causarão respostas adversas significativas nos glóbulos vermelhos.

#### 4.7.2.2. *Scaffolds* compósitos (II)

Duas amostras de cada *scaffold* compósito foram também incubadas em sangue de coelho ACD-A, estabelecendo-se também os dois contactos: direto e indireto. Os resultados dessa análise encontram-se na Figura 4.37.



**Figura 4.37** Valores de índice hemolítico obtidos para os *scaffolds* compostos por contacto directo e indirecto.

Tendo em conta que um material é considerado não-hemolítico caso o seu índice seja inferior a 2%, observa-se pela Figura 4.37 que os *scaffolds* compostos, tanto em contacto directo como em contacto indirecto, são não-hemolíticos. Estes resultados eram esperados pois a técnica de *electrospinning* permite a evaporação de todos os solventes orgânicos usados no processo, além de que na produção da Gel-MA todos os subprodutos ou produtos não convertidos na funcionalização da gelatina com MAA foram removidos através da realização de uma diálise, eliminando ou reduzindo significativamente compostos residuais que pudessem causar resposta adversa nos constituintes do sangue.

Comparativamente, este tipo de *scaffold* com as fibras de PCL e gelatina exhibe melhores resultados que as fibras revestidas com os hidrogéis. Daqui poder-se-á definir a abordagem experimental que mais interesse aprofundar no futuro de investigação a este nível.

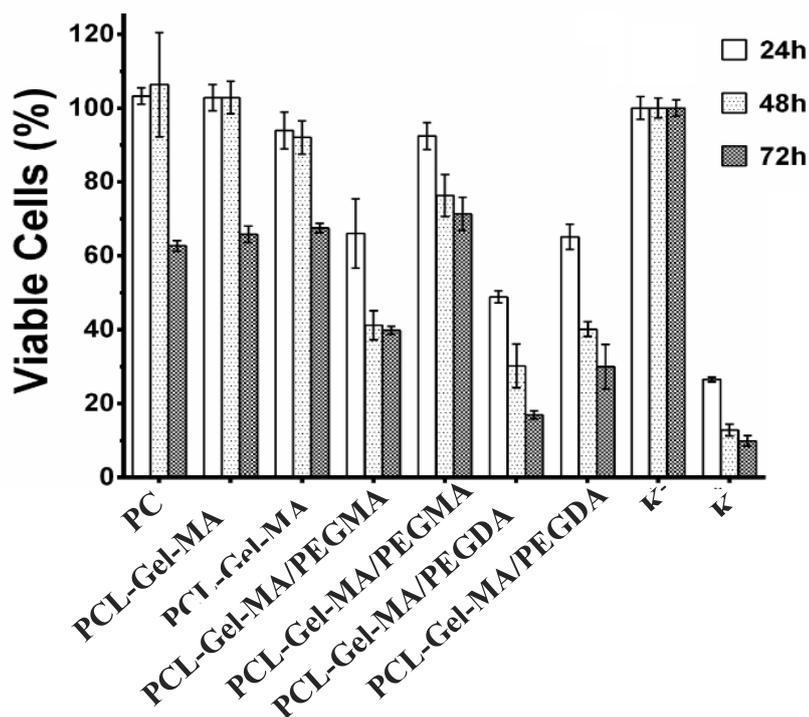
## 4.8. Biocompatibilidade

### 4.8.1 Viabilidade celular — *Scaffolds* revestidos (I)

Tendo como foco o desenvolvimento de *scaffolds* com aplicabilidade em doenças vasculares, realizou-se ainda na UBI o estudo *in vitro* da viabilidade celular com o recurso

a células endoteliais circulantes (CEC). Estas células foram cultivadas diretamente nos *scaffolds* a fim de promover a adesão e proliferação celular, avaliando-se consequentemente a citotoxicidade dos materiais produzidos.

A Figura 4.38 exibe a resposta fisiológica das células na presença dos *scaffolds* revestidos (em termos de percentagem de células viáveis), após um contacto directo com os materiais de 72 h.



**Figura 4.38** Avaliação da atividade celular após 24, 48 e 72 horas de contacto com os *scaffolds* de fibras de PCL revestidas com hidrogel.

Na Figura 4.38 é desde logo possível averiguar que os materiais apresentaram resultados de viabilidade celular distintos. Tendo por base de comparação o estudo da viabilidade celular da PCL com o controlo negativo (K<sup>-</sup>) (que representa a totalidade das células viáveis (100%)), verifica-se que a PCL é um polímero biocompatível promovendo a adesão e proliferação celular. Analisando os resultados dos *scaffolds* formados somente com Gel-MA, verifica-se que há uma boa adesão celular, após 72 horas (sendo que a percentagem de células viáveis ascende os 50%). Este resultado era de esperar pois a gelatina, sendo um polímero de origem natural e um dos constituintes do organismo, é um composto que favorece a adesão e proliferação celular. Todavia, o decréscimo na viabilidade observado das 48h para as 72h pode dever-se à libertação de alguns

componentes acídicos ou de anidrido metacrílico residual presente na Gel-MA, uma vez que a gelatina, em solução aquosa, começa-se a degradar por hidrólise (mesmo que reticulada). Nessa degradação inicial, alguns grupos metacrilatos poderão contribuir para alguma toxicidade. Observando os resultados para os *scaffolds* que apresentam na sua constituição os macrómeros PEGMA e PEGDA, os valores de viabilidade celular não são muito favoráveis. Isto não era esperado, pois sendo estes materiais bastante hidrofílicos previa-se que apresentassem valores de adesão celular satisfatórios. Isto poderá ser explicado, tal como referido anteriormente, pela existência de moléculas residuais nas formulações capazes de induzir toxicidade, levando à morte celular. Uma possível solução para este problema seria uma lavagem inicial dos *scaffolds* (por exemplo com PBS) de modo a que lhe fossem removidos esses subprodutos.

De salientar que os problemas de toxicidade observados poderão não ser só devidos a componentes das formulações. Santos et al. [55] salientam que são muitos os fatores que podem influenciar a biocompatibilidade de um material, como a energia de superfície, rugosidade, polaridade, interações eletrostáticas, porosidade, espessura, entre outros. Com isto, o grande desafio será sempre tentar perceber todos os fatores inerentes às interações material/célula, no sentido de conceber formulações de sucesso, biocompatíveis e continuamente otimizadas.

#### 4.8.2 Viabilidade celular – *Scaffolds* compósitos (II)

De forma análoga aos *scaffolds* revestidos com hidrogel, os ensaios de viabilidade celular foram realizados na UBI também para as fibras compósitas. Para o estudo de citotoxicidade dos *scaffolds*, estes foram incubados diretamente com CEC a fim de promover a adesão e proliferação celular na sua superfície.

Observando a Figura 4.39, verifica-se que comparativamente ao controlo negativo ambos os *scaffolds* apresentaram um comportamento favorável ao crescimento celular, sendo a percentagem de células viáveis superior a 70% ao fim de 72 horas. A síntese de fibras compósitas por *electrospinning*, onde todos os solventes são eliminados por evaporação durante a deposição das fibras no coletor, resultou em materiais mais biocompatíveis para com as células CEC, sem indução de grande toxicidade [16].

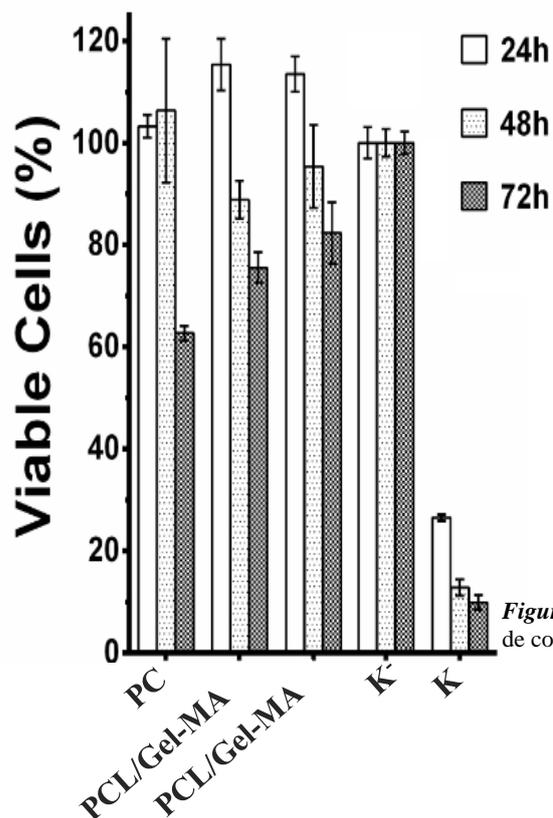


Figura 4.39 Avaliação da atividade celular após 24, 48 e 72 horas de contacto com os *scaffolds* compósitos PCL/Gel-MA.

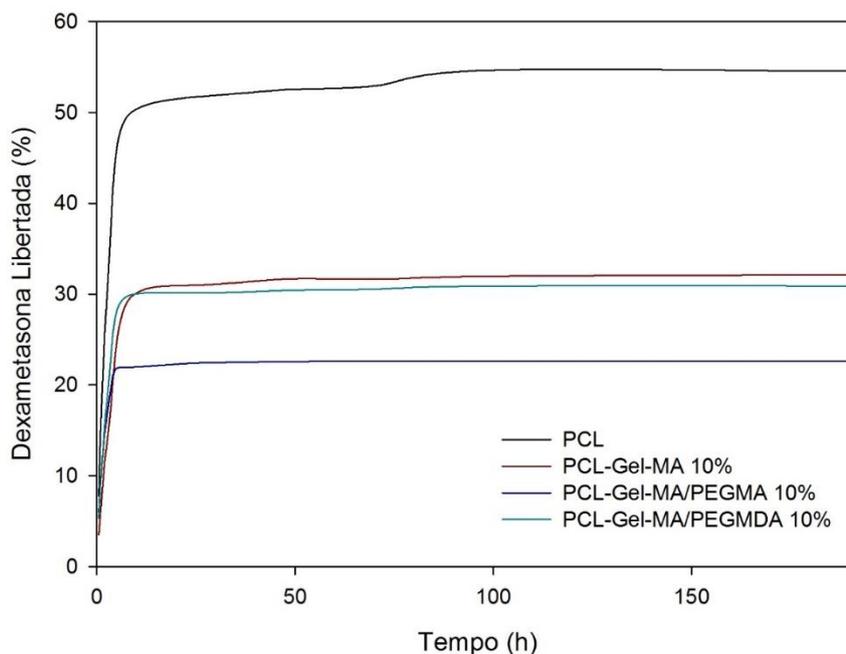
Neste caso, o conjunto de fibras compósitas apresenta melhores resultados que a PCL individualmente. Por esta via de produção, consegue-se provar a eficácia do sistema PCL/gelatina na síntese de biomateriais com condições ótimas à adesão, proliferação e regeneração de tecidos vasculares.

Analisando ainda a Figura 4.39 observa-se um aumento de viabilidade celular em ambas as fibras face ao controlo positivo. Este fenómeno poderá ser explicado pela interação entre a sonda do MTT com os próprios materiais, tal como reportado por Marques et al 2016 no seu estudo de investigação.

#### 4.9. Estudo de libertação da dexametasona

De modo avaliar a capacidade dos *scaffolds* (neste caso dos revestidos) para serem usados como DES, foi-lhes incorporado um anti-inflamatório e avaliada a sua libertação ao longo de 192 horas.

Analisando os perfis de libertação demonstrados pela Figura 4.40, constata-se que ocorre uma libertação acentuada nas primeiras horas em todos os *scaffolds*, até existir uma inevitável estagnação dos perfis. Os resultados, porém, acabam por ser satisfatórios pois admite-se que o ativo esteja presente no organismo com a sua máxima libertação nas primeiras 8 horas de administração [111].



**Figura 4.40** Libertação de dexametasona nos *scaffolds* revestidos, em PBS (37°C). Estudo preliminar para aferir a capacidade de libertação de um ativo de interesse, face à aplicação.

Observando a libertação nas matrizes individualmente verifica-se que a PCL é a que apresenta maior percentagem de libertação de dexametasona. Isso ocorre porque o fármaco foi introduzido na solução deste polímero antes da realização de *electrospinning*, tendo sido feito posteriormente o revestimento com os respetivos hidrogéis. Além do mais, a massa de dexametasona que se vai libertar para o meio de incubação é a que está na verdade na superfície das nanofibras, pois a restante está “encapsulada” no interior das mesmas. A sua libertação para meio, neste caso, dependerá da degradação da PCL que, como se sabe, apresenta uma degradação muito mais lenta (cerca de 2 anos). Relativamente à libertação a partir das fibras de PCL impregnadas com os hidrogéis averigua-se que a percentagem de dexametasona libertada é inferior comparativamente à libertação da membrana de PCL. Isto advém do facto de, quando a membrana nanofibrosa de PCL carregada com dexametasona foi mergulhada nas soluções precursoras de

hidrogel, parte da dexametasona que estava na superfície difundiu-se para essas mesmas soluções. Assim, quando a membrana de fibras de PCL impregnada com os respectivos hidrogéis foi incubada em PBS, parte do fármaco existente na superfície das fibras já se tinha libertado durante o processo de revestimento. Deste modo se explica a redução na percentagem de dexametasona libertada.

Deste estudo consegue-se logo perceber a influência que diferentes proporções nas formulações causam no comportamento dos materiais como matrizes de libertação controlada. No futuro, qualquer *scaffold* poderá ser otimizado (em termos de componentes e suas proporções mássicas) para se atingir o perfil desejado de libertação da dexametasona (ou de outro fármaco de interesse), de acordo com os objetivos terapêuticos. A dexametasona, neste caso, poderá ser uma aliança promissora para combater inflamações aquando da implementação de um *stent* vascular, como já tinha sido constatado anteriormente.

## 5. Conclusões

### 5.1. Conclusões gerais

Estratégias de produção de *scaffolds* a partir de PCL e Gel-MA foram concebidas começando na funcionalização de gelatina com anidrido metacrílico (MAA). As ligações amida da gelatina foram funcionalizadas com ligações de carbono duplas pela reação com o composto MAA, para se proceder à síntese de hidrogéis por fotoreticulação. Na síntese das fibras de PCL por *electrospinning*, o polímero de elevado peso molecular foi dissolvido em Clorofórmio/DMF obtendo-se uma solução polimérica de viscosidade adequada.

O trabalho realizado consistiu em duas partes experimentais: 1) produção de *scaffolds* revestidos, onde as fibras de PCL foram revestidas com o hidrogel Gel-MA e 2) produção de *scaffolds* compósitos onde a solução de PCL se misturou com a solução do Gel-MA. Na primeira via testou-se ainda qual a influência dos macrómeros PEGMA e PEGDA, resultando num total de seis *scaffolds* de diferentes composições. Na segunda via, analisou-se o desempenho dos *scaffolds* com duas concentrações de soluto, 10 e 15%. Ambos foram fotoreticulados após adição do fotoiniciador Irgacure® 2959.

Apesar de serem inúmeras as aplicações na área biomédica para estes *scaffolds*, o estudo foi realizado para avaliar o seu potencial como *stents* vasculares. A técnica ATR-FTIR permitiu avaliar a presença das ligações que cada polímero apresentava nos *scaffolds*.

A técnica de microscopia eletrónica de varrimento (SEM) permitiu avaliar a morfologia dos *scaffolds*. Para a primeira via de produção constatou-se que as fibras de PCL tinham uma disposição aleatória. Quando lhes foi incorporado os diferentes hidrogéis percebeu-se que quanto maior a concentração de hidrogel, mais revestimento apresentavam. Denotou-se também a influência dos macrómeros, onde houve a nítida diminuição do diâmetro das fibras por terem conferido maior elasticidade aos *scaffolds*. Relativamente à segunda via, os *scaffolds* compósitos apresentavam um diâmetro de fibras bastante inferior face aos *scaffolds* da primeira via. Esse resultado prende-se ao facto da viscosidade da mistura ser menor, pois a adição da Gel-MA à solução de PCL diminui a

viscosidade da solução de PCL, e quanto menor a viscosidade da solução, menor será o diâmetro das fibras finais. Constatou-se ainda que estas fibras compósitas, tal como as revestidas, apresentavam disposição aleatória, e com o aumento da concentração houve o aumento do diâmetro médio das fibras.

A análise termogravimétrica permitiu o estudo da estabilidade dos materiais, quando sujeitos a elevadas temperaturas. Relativamente à primeira via, todos se apresentaram termicamente estáveis. Notou-se ainda que os *scaffolds* com maior concentração de Gel-MA apresentavam ser termicamente menos resistentes. Esse facto prende-se à Gel-MA ser termicamente menos resistente que a PCL. Reparou-se ainda que a incorporação de macrómeros nos hidrogéis aumentou-lhe a sua estabilidade, conduzindo o PEGMA a melhores resultados dada a sua ligação monofuncional na funcionalização com a Gel-MA. Relativamente aos *scaffolds* compósitos verificou-se que uma concentração superior de soluto promove um aumento da estabilidade térmica no *scaffold*. Com esta análise concluiu-se que ambos os materiais apresentam estabilidade térmica, à temperatura fisiológica e a elevadas temperaturas, com valores de Td muito semelhantes, sendo ainda resistentes a processos de esterilização.

A biodegradabilidade dos materiais foi avaliada em solução PBS em três estágios de degradação (0, 2 e 28 dias). Os *scaffolds* revestidos foram analisados por microscopia electrónica de varrimento (SEM) onde se observou uma maior degradação dos *scaffolds* revestidos somente por Gel-MA, não havendo a clara perceção da degradação dos hidrogéis com ambos os macrómeros (PEGMA e PEGDA). Esta degradação resulta do hidrogel Gel-MA ser menos reticulado, estando mais suscetível à degradação hidrolítica. Quanto aos *scaffolds* compósitos conclui-se que o aumento da concentração do soluto diminui a degradabilidade dos *scaffolds*, havendo neste caso a influência da viscosidade e do diâmetro das fibras para esses resultados.

Estudos de hemocompatibilidade foram conduzidos para determinar o potencial trombogénico e a capacidade de indução de hemólise dos *scaffolds*. Todos os materiais (revestidos e compósitos) apresentaram potencial trombogénico, o que não é satisfatório, pois tendo como finalidade a sua implementação em artérias como *stents* não poderão induzir a formação de qualquer coágulo. Algo que se reverte, em princípio, com a adição de um fármaco de ação anti-plaquetária. Relativamente aos ensaios para a determinação

do índice hemolítico, aos *scaffolds* revestidos, estabeleceu-se o contacto direto e indireto entre os materiais e o sangue. Constatou-se que em contacto direto somente o *scaffold* PCL-Gel-MA 1% apresentava carácter não-hemolítico, enquanto os *scaffolds* com macrómeros na sua constituição apresentavam-se ligeiramente hemolíticos. O *scaffold* PCL-Gel-MA/PEGDA 10% demonstrou ter um carácter hemolítico. Os resultados das amostras que foram previamente incubadas em PBS para o contacto indireto, foram completamente distintos pois todos os produtos mostraram ser não-hemolíticos. Conclui-se então que os hidrogéis com macrómeros podem ter na sua constituição subprodutos ou produtos não reagidos dos processos de funcionalização/fotoreticulação, que leva à toxicidade e destruição das hemácias, sendo necessário haver uma pré-lavagem dos materiais a fim de removerem essas impurezas. Quanto aos *scaffolds* compósitos em ambos os testes, direto e indireto, os resultados foram concordantes, sendo os materiais classificados como não-hemolíticos. Comparando ainda as duas formas de síntese dos *scaffolds*, os compósitos apresentam quase nulidade de indução hemolítica face aos revestidos, e em ambas as vias (contato direto e indireto) mostram ser mais promissores, sem previsão de quaisquer contraindicações de utilização no organismo.

O estudo da biocompatibilidade *in vitro* foi realizado com células endoteliais circulantes (CEC). Constatou-se que os *scaffolds* revestidos com macrómeros apresentavam baixa adesão celular. A toxicidade por estes manifestada poderá também ser resultado de subprodutos da funcionalização destes com a Gel-MA, dificultando a existência de um ambiente favorável à viabilidade celular. Relativamente aos *scaffolds* compósitos, estes apresentaram excelentes valores de viabilidade celular, sendo por isso os que, de uma maneira geral, exibiram as propriedades mais vantajosas.

Finalmente o estudo da libertação de fármaco dexametasona nos *scaffolds* revestidos, comprovou que as matrizes tiveram tendência de libertar a maior quantidade de fármaco nas primeiras horas. Face ao revestimento, o *scaffold* PCL-Gel-MA 10 % foi o que apresentou maior libertação, enquanto o *scaffold* PCL-Gel-MA/PEGMA 10% foi o que induziu menos a libertação do ativo.

Face a todos estes resultados, conclui-se que todos os *scaffolds* produzidos poderão ser uma mais-valia no mercado dos *stents* vasculares. Além disso, os *scaffolds* compósitos foram os que apresentaram melhores resultados, tendo ainda como vantagem a estratégia

de produção ser mais simplista. Com todos estes resultados percebe-se que os *scaffolds* produzidos neste trabalho podem ser extremamente promissores nas áreas da medicina e da Engenharia de Tecidos.

## 5.2. Perspetivas Futuras

Em seguimento dos resultados neste estudo, recomendam-se um conjunto de linhas e estratégias de investigação a desenvolver no futuro. Destaque para:

- 1. Repetição dos testes de degradação hidrolítica em solução PBS** (no estudo da degradabilidade dos *scaffolds* compósitos só se realizou um único ensaio, dada a escassez do material sintetizado e do solvente, sendo necessário desta forma realizar estudos em triplicado de modo a permitir e assegurar a viabilidade da degradação hidrolítica nos compósitos);
- 2. Repetição dos testes de hemocompatibilidade e biocompatibilidade *in vitro* dos materiais** (só realizando uma série de testes é que se comprova a reprodutibilidade dos resultados de modo a permitir e assegurar a sua utilização como *stents* vasculares. Outro aspeto importante a considerar na biocompatibilidade é a lavagem em PBS dos *scaffolds* revestidos para averiguar se de facto é a existência de subprodutos e produtos não convertidos que provocam a baixa adesão celular);
- 3. Realização de testes de biocompatibilidade *in vivo*** (só desta forma ter-se-à a noção real da interação dos *scaffolds* com a corrente sanguínea, avaliando a possível ocorrência de trombozes/embolias, inflamações ou mesmo possíveis reações alérgicas).
- 4. Adicionar um fármaco anti-plaquetário nos *scaffolds*** (para impedir a formação de trombos, sendo necessário avaliar posteriormente a trombogenicidade do material);
- 5. Realização de ensaios mecânicos** (testar a elongação dos materiais);
- 6. Produção de copolímeros de PCL e PLA** (testando diferentes modificações de forma a produzir novas fibras por *electrospinning*).

- 7. Proceder a estudos de libertação (de dexametasona ou de outro fármaco de interesse) de forma mais rigorosa** (testar diferentes cargas de ativo e definir/otimizar proporções das formulações, de acordo com uma terapêutica).



## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] Patel, R. N., Gohil, P. P., A Review on Biomaterials: Scope, Applications & Human Anatomy Significance, *International Journal of Emerging Technology and Advanced Engineering*, Vol.2, Issue 4, 2012.
- [2] Santos, J. M. C., Preparação de Bioadesivos a partir de Ácido Lático, Tese de Mestrado, Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade de Coimbra, 2014.
- [3] Martins, L., Produção e caracterização de uma matriz dérmica à base de nanofibras de gelatina e policaprolactona, Tese de Mestrado, Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade Nova de Lisboa, 2012.
- [4] Jr., A. R. S., Wada, M. L. F., Polímeros Biorreabsorvíveis como Substrato para Cultura de Células e Engenharia Tecidual, *Polímeros: Ciência e Tecnologia*, Vol. 17, 4, 308-317, 2007
- [5] Thomsen, P., Lindahl, A., Hubbell, J., et al. *Tissue Engineering*, First edition, Elsevier Inc., 2008, ISBN 978-0-12-370869-4
- [6] Ikada, Y., Tsuji, H, Biodegradable polyesters for medical and ecological applications, *Macromol. Rapid Commun*, 21, 117–132, 2000.
- [7] Fu, W., *et al*, Electrospun/PCL and collagen/PLCL scaffolds for vascular tissue engineering, *International Journal of Nanomedicine*, Vol.9, 2335-2344.
- [8] Karp, J. M., Dalton , P. D., Shoichet, M. S., Scaffolds for Tissue Engineering, *MRS BULLETIN*, 2003.
- [9] Chiu, Y. C., Cheng M . H., Engel, H., Kao, S. W., Larson, J. C., Gupta, S., Brey, E.M. The role of size on vascularization and tissue remodeling in PEG hydrogels. *Biomaterials*, 32, 6045-6051.
- [10] Sousa, P., Impacto de Novos Sistemas Terapêuticos na Regeneração Tecidual, Tese de Mestrado, Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade Fernando Pessoa, Porto, 2011.
- [11] Dhadayuthapani, B., Yoshida, Y., Maekawa T., Kumar S., Polymeric Scaffolds in Tissue Engineering Application: A review, *Internacional Journal of Polymer Science*, Vol. 2011.

- [12] Chan, B. P., Leong, K. W., *Scaffolding in tissue engineering: general approaches and tissue-specific considerations*, Springer-Verlag, 2008.
- [13] Haidar, Z., Ramakrishna, S., Kobayashi, R., et al., *Integrated Biomaterials in Tissue Engineering*, Scrivener Publishing LLC, Canada, 2012, ISBN 978-1-118-31198-1
- [14] O'Brien F., Review Biomaterials & Scaffolds for tissue engineering, *Materialstoday*, Vol. 14, 2011.
- [15] Bronzino, J., *The Biomedical Engineering Handbook: Tissue Engineering and Artificial Organs*, Third Edition, Taylor & Francis Group, LLC, 2006, ISBN 78-0-8493-2123-8
- [16] Downes, L., *Electrospinning for tissue regeneration*, First edition, Woodhead Publishing Limited, 2011, ISBN 978-0-85709-291-5
- [17] Franchetti, S., Marconato J., Polímeros Biodegradáveis – Uma solução parcial para diminuir a quantidade dos resíduos plásticos, *Química Nova*, Vol. 29, No. 4, 811-816, 2006.
- [18] Pignatello, R., *Biomaterials Science and Engineering*, 2011, ISBN 978-953-307-609-6
- [19] Meyer, U., Meyer, T., Handschel, J., et al., *Fundamentals of Tissue Engineering and Regenerative Medicine*, Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 2009, ISBN 978-3-540-77754-0
- [20] Hench, L., Jones J., *Biomaterials, artificial organs and tissue engineering*, First edition, Woodhead Publishing Limited, Abington Hall, Abington, England, 2005, ISBN 978-1-85573-737-2
- [21] Barbanti, S., Zavaglia, C., Polímeros Bioreabsorvíveis na Engenharia de Tecidos, *Polímeros: Ciência e Tecnologia*, Vol. 15, 13-21, 2005
- [22] Coimbra P., Gil M. H., Figueiredo M., Tailoring the properties of gelatina films for drug delivery application: Influence of chemical cross-linking method, *Internacional Journal of Biological Macromolecules*, Vol. 70, 10-19, 2014.
- [23] Malafaya, P. B., Silva, G. A., Reis, R. L., Natural-origen polymers as carriers and scaffolds for biomolecules and cell delivery in tissue engineering application, *Advanced Drug Delivery Reviews*, Vol. 59, 207-233, 2007.

- [24] Bosworth, L. A., Turner, L-A., Cartmell, S. H., State of the art composites comprising electrospun fibres coupled with hydrogels: a review, *Nanomedicine, Nanotechnology, Biology, and Medicine*, Vol. 9, 322-335, 2013.
- [25] Gómez-Guillén, M. C., Giménez, B., López-Caballero M. E., Montero, M. P., Functional and bioactive properties of collagen and gelatina from alternative sources: A review, *Food Hydrocolloids*, Vol. 25, 1813-1827, 2011.
- [26] Rose, J., Pacelli, S., Haj A., et al., Gelatin-Based Materials in Ocular Tissue Engineering, *Materials*, Vol.7, 3106-3135, 2014
- [27] Behera, A. K., Dr. Barik, B. B., Joshi, S., Poly- $\epsilon$ -caprolactone based microspheres and nanospheres: a review, *Publication House*, Vol. 1, 2278-2818, 2012.
- [28] Ribeiro, A., Engenharia de Tecidos para regeneração óssea: retrospectiva e perspetivas futuras, Tese de Mestrado, Faculdade Ciências de Saúde, Universidade Fernando Pessoa, Porto, 2012.
- [29] Behera, A. K., Dr. Barik, B. B., Joshi, S., Poly- $\epsilon$ -caprolactone based microspheres and nanospheres: a review, *Publication House*, Vol. 1, 2278-2818, 2012.
- [30] Mendes, J., Síntese de hidrogéis de base acrílica recorrendo a técnicas de polimerização radicalar viva. Potencial aplicação como fármacos poliméricos, Tese de Mestrado, Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade de Coimbra, 2011
- [31] Gibas, I., Janik, H., Review: Synthetic Polymer hydrogels for biomedical applications, *Chemistry & Chemical Technology*, Vol. 4, 297-304, 2010.
- [32] Caló, E., Khutoryanskiy, V. V., Biomedical applications of hydrogels: A review of patents and commercial products, *European Polymer Journal*, Vol. 65, 525-267, 2015.
- [33] Nguyen, K. T., West, J. L., Photopolymerizable hydrogels for tissue engineering applications, *Biomaterials*, Vol. 23, 4307-4314, 2002.
- [34] Coimbra P., Gil M. H., Figueiredo M., Tailoring the properties of gelatina films for drug delivery application: Influence of chemical cross-linking method, *Internacional Journal of Biological Macromolecules*, Vol. 70, 10-19, 2014.
- [35] Hennink, W. E., Nostrum, C. F., Novel crosslinking methods to design hydrogels, *Advanced Drug Delivery Reviews*, Vol.54, 13-36, 2002..

- [36] El-Sherbiny, I. M., Yacoub, M. H., Hydrogels for tissue engineering: Process and challenges, *Global Cardiology Science & Practice*, 2013:38.
- [37] Zachary, R. L., et al, B<sub>12</sub>-Mediated, Long Wavelength Photopolymerization of Hydrogels, *Journal of the American Chemical Society*, Vol. 137, 3372-3378.
- [38] Almeida, J., Preparação e Caracterização de Hidrogéis para Aplicações Biomédicas, Tese de Doutoramento, Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade de Coimbra, 2010 .
- [39] Das, N., Preparation Methods and Properties of Hydrogel: A Review, *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, Vol. 5, Issue 3, 0975-1491, 2013.
- [40] Blanchard, C. R., Timmons, S. F., Smith, R. A., Keratin-based hydrogel for biomedical applications and method of production, US Pat. 6379690 B2, 30 April 2002.
- [41] Jabbari, E., Yaszemski M. J., Currier, B. L., Hydrogel porogens for fabricating biodegradable scaffolds, EP 1664168 B1, 27 Aug. 2004.
- [42] Kumar, A., Hydrogel scaffold for tissue engineering, US 20130236971 A1, 12 Set. 2013.
- [43] Lugao, A.B., Noda, L., Cardoso, E.C.L., Hustzler, B., Tokumoto, S., Mendes, A.N.F., Temperature rising elution fractionation, infra red and rheology study on gamma irradiated HMSPP. *Radiation Physics and Chemistry* 63,3-6, 509–512, 2002 .
- [44] Cascone, MG, Lazzari, e., Scatena, M., Serino, LP., Danti, S., Morphology evaluation of hydrogels as potencial tissue engineering scaffolds, *US National Library of Medicine National Institutes of Health*, Vol. 15, 1309-13.
- [45] Lin, C. C., Anseth, K. S., PEG hydrogels for the controlled release of biomolecules in regenerative medicine. *Pharm Res*, Vol. 26, 631-643, 2009.
- [46] Kubinova, S., Horak, D., Kozubenko, N., Vanecek, V., Proks, V., Price J et al. The use of superporous Ac-CGGASIKVAVS-OH-modified PHEMA scaffolds to promote cell adhesion and the differentiation of human fetal neural precursors. *Biomaterials* Vol. 31, 5966-5975, 2010 .

- [47] Bavaresco, V. P. Zavaglia, C. A. C., Reis, M., C., Gomes, J., R., Study on the tribological properties of pHEMA hydrogels for use in artificial articular cartilage. *Wear*, Vol. 265, 269-277, 2008.
- [48] Harris, I. R, Harmon, A.M., Brown, L.J., Gosiewska A. US Patent 8039258 B2, 2011.
- [49] Song, S. K., Jang, Y. M., Jeon, I. H., Ko, S. J., Jeon, J. R., Chun, G. T., et al. US Patent 8592574 B2, 2013.
- [50] Cretu, A., Gattin, R., Brachais, L., Barbier-Baudry, D., Synthesis and degradation of poly (2-hydroxyethyl methacrylate)-*graft*-poly ( $\epsilon$ -caprolactone) copolymers, *Polym Degrad Stab.* Vol.83, 399-403 2004.
- [51] Poursamar, S., Hatami, J., Lehner, A., Ferreira, Frederico, Antunes, A., Gelatin porous scaffolds fabricated using a modified gas foaming technique: Characterization and cytotoxicity, Elsevier, Vol. 48, 63-70, 2015.
- [52] Yung, C.W., Wu L.Q., J.A., Tullman, Payne, G.F., Bentley W.E., Barbari, T.A., *J. Biomed.Mater. Res.* Vol.83 1039–1046, 2007.
- [53] Yeh, M.-k., Liang, Y.-m., Cheng, K.-m., Dai, N.-T., Liu, C.-c., Young, J.-j., *Polymer* Vol. 52, 996–1003, 2011.
- [54] Chen, Y.-C., Lin, R.-Z., Qi, H., Yang, Y., Bae, H., Melero-Martin, J.M., Khademhosseini, A., *Adv. Funct. Mater.* Vol. 22, 2027–2039, 2012.
- [55] Marques, D.S., Santos, J.M.C., Ferreira, P., et al., Photocurable Bioadhesive Based on Lactic Acid, *Materials Science & Engineering* Vol.58, 601–609, 2016
- [56] Agarwal, S., Wendorff, J., H., Grainer, A., Use of electrospinning technique for biomedical applications, *Polymer*, Vol. 49, Issue 28 5603-5621, 2008.
- [57] Pham, Q. P.P., Sharma, U., Mikos, A.G., Electrospinning of Polymeric Nanofibers for Tissue Engineering Applications: A Review, *Tissue Engineering*, Vol. 12, 1194-1211, 2006.
- [58] Martins, A., Araújo, J.V., Reis, R.L., Neves, N.M., Electrospun nanostructured scaffolds for tissue engineering applications, *Technology Report*, Vol, 2(6), 929-942, 2007.

- [59] Cui, W., Zhou, Y., Chang, J., Electrospun nanofibrous materials for tissue engineering and drug delivery, *Sci. Technol. Adv. Mater.* 11, 2010
- [60] Abedalwafa, M., Wang, F., Wang, L., Li, C., Biodegradable poly-epsilon-caprolactone (PCL) for tissue engineering applications: a review, *Rev. Adv. Mater. Sci*, Vol. 34, 123-140, 2013.
- [61] Pramanik, A., Mitra, A., Arumugam, M., Bhattacharyya, A., Sadhukhan, S., Ray, A., Haldar, S., Mukhopadhyay, U.K., Mukherjee, J., Utilization of vinasse for the production of polyhydroxybutyrate by *Haloarcula marismortui*, *Folia Microbiol* ;Vol. 57, 71–79, 2012.
- [62] Hasan, A., et. al, Electrospun scaffolds for tissue engineering of vascular grafts, *Acta Biomaterialia*, Vol. 10, 11-25, 2014.
- [63] Xu, C., Inai, R., Kotaki, M., and Ramakrishna, S. Electrospun nanofiber fabrication as synthetic extracellular matrix and its potential for vascular tissue engineering, *Tissue Eng.*, Vol.10, 1160, 2004.
- [64] Boudriot, U., Dersch, R., Greiner, A., Wendorff, J.H., Electrospinning approaches toward scaffold engineering – a brief overview, *Artif Organs* Vol. 30, 785-792, 2006.
- [65] Bini, T.B., Gao, S.J., Xu, Y.Y., et al, Peripheral nerve regeneration by microbraided poly(L-Lactide-co-glycolide) biodegradable polymer fibers, *J. Biomed. Mater. Res. Part A*, Vol.68(2), 286-295, 2004.
- [66] Schnell, E., Klinkhammer, K., et al., Guidance of glial cell migration and axonal growth on electrospun nanofibers of poly-[epsilon]-caprolactone and a collagen/poly-[epsilon]-caprolactone blend, *Biomaterials*, Vol.28, 3012–25, 2007.
- [67] Serrano, M.-C., Pagani, R., Vallet-Regi, R., et al., “Nitric oxide production by endothelial cells derived from blood progenitors cultured on NaOH-treated polycaprolactone films: a biofunctionality study,” *Acta Biomaterialia*, Vol. 5, No. 6, 2045–2053, 2009
- [68] Zhu, Y.B., Cao, Y., Pan, J., et al., Macro-alignment of electrospun fibers for vascular tissue engineering, *J Biomed Mater Res Part B Appl Biomater.*, Vol. 92B, 508-516, 2010.

- [69] Sundaray, B., Subramanian, V., Natarajan, T.S., et. al., Electrospinning of continuous aligned polymer fibers. *Appl. Phys. Lett.* Vol.84, 1222, 2004.
- [70] Kanani, A. G., Bahrami, S. H., Review on Electrospun Nanofibers Scaffolds and Biomedical Applications, , Vol. 24(2), 99-115, 2010.
- [71] Malafaya, P. B., Silva, G. A., Reis, R. L., Natural-origen polymers as carriers and scaffolds for biomolecules and cell delivery in tissue engineering application, *Advanced Drug Delivery Reviews*, Vol. 59, 207-233, 2007.
- [72] Ciardelli, G., Chiono, V., Vozzi, G., Pracella, M., et al. Blends of Poly-( $\epsilon$ -caprolactone) and Polysaccharides in Tissue Engineering Applications, , Vol.6, 1961-1976, 2005.
- [73] Gautam, S., Dinda, A.M., Mishra, N.C., Fabrication and characterization of PCL/gelatin composite nanofibrous scaffold for tissur engineering applications by electrospinning method, , Vol. 33, 1228-1235, 2013.
- [74] Ghasami-Mobarakeh, L., Prabhakaran, M.P., Morshed M., Nasr-Esfahani, M.-H., Ramakrishna, S., Electrospun poly( $\epsilon$ -caprolactone)/gelatin nanofibrous scaffolds for nerve tissue engineering, *Biomaterials*, Vol. 29, 4532-4539, 2008.
- [75] Trey, S. M., Sidenvall, P., Alavi, K., Ståhlberg, D., Johansson, M., Dual cure (UV/thermal) primers for composite substrates – Effect of surface treatment and primer composition on adhesion, *Progress in Organic Coatings*, 64, 489-496, 2009.
- [76] Sravanthi, S., Preparation and characterization of poly( $\epsilon$ -caprolactone) PCL scaffolds for tissue engineering applications, Master Thesis, Department of Biotechmology and Medical Engineering National Institute of Rourkela, 2009 .
- [77] Zhan, J., Lan, P., The Review on Eletrospun Gelatin Fiber Scaffold, *Journal of Research in Polymer Science*, Vol.1, 59-71, 2012.
- [78] Ghamasi-Mobarakeh, L., Prablakaran M.P., Morshed, M., Nars-Esfahani, M-H., Ramakrishna, S., Electrospun poly( $\epsilon$ -caprolactone)/gelatin nanofibrous scaffolds for nerve tissue engineering, Vol.29, 4532-4539, 2008.
- [79] <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs317/en/> .

- [80] PengKai, O., Ying, Y., Manfred, M., Nan, H., Current status of research and application in vascular stents, *Chinese Science Bulletin*, Vol. 58, 4362-4370, 2013.
- [81] Fortier, A., Gullapalli, V., Mirshams, R.A., Review of biomechanical studies of arteries and their effect on stent performance, *IJC Heart & Vessels*, Vol.4, 12-18, 2014.
- [82] Ekaputra, A.K., Prestwich, G.P., Cool, S.M., Hutmacher, D.W., The three-dimensional vascularization of growth factor-releasing hybrid scaffold of poly( $\epsilon$ -caprolactone)/collagen fibers and hyaluronic acid hydrogel, *Biomaterials*, Vol.32, Issue 32, 8108-8117, 2011.
- [83] Fu, W., Liu Z., Feng, B., et al. Electrospun gelatin/PCL and collagen/PLCL scaffolds for vascular tissue engineering, *International Journal of Nanomedicine*, Vol.9, 2335-2344, 2014 .
- [84] Hamalainen, M., Nieminen R., Uurto, I., et al, Dexamethasone-eluting Vascular Stents, *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology*, Vol.112, 296-301, 2013.
- [85] Virmani, R., Guagliumi, G., Farb, A., et al., Localized hypersensitivity and late coronary thrombosis secondary to a sirolimus-eluting stent: should we be cautious? *Circulation*, Vol.109, 701-705, 2009.
- [86] Zilberman, M., Eberhart, R.C., Schwade, N.D., *In vitro* study of drug-loaded bioresorbable films and support structures, *J. Biomater. Sci. Polymer Edn*, Vol.13, 1221-1240, 2002.
- [87] Nichol, J., Koshy, S.T., Bae, H., Hwang, C.M., Yamanlar, S., Khademhosseini, A., Cell-laden microengineered gelatin methacrylate hydrogels, Vol. 31, 5536-5544, 2010.
- [88] Zargarian, S.S., Haddadi-Asl, V., A Nanofibrous Composite Scaffold of PCL/Hydroxyapatite-chitosan/PVA Prepared by Electrospinning, Vol.19(6), 457-468, 2010.
- [89] Pierce, B.F., Tronci, G., Roble, M., Neffe, A.T., Jung, F., Lendlein, A., Photocrosslinked Co-Networks from Glycidylmethacrylated Gelatin and Poly(ethylene glycol) Methacrylates, *Macromolecular Bioscience*, Vol.12, 484-493, 2012 .
- [90] Lim, Y.C., Johnson, J., Fei, Z., Wu, et al., Micropatterning and Characterization of Electrospun Poly( $\epsilon$ -Caprolactone)/Gelatin Nanofibers Tissue Scaffolds by

- Femtosecond Laser Ablation for Tissue Engineering Applications, *Biotechnology and Bioengineering*, Vol. 108, 116-126, 2011.
- [91] ISO 10993-4 Biological Evaluation of Medical Devices – Part 4: Selection of Tests for Intreaction with Blood, 1999.
- [92] Ratner, B. D., The catastrophe revisited: blood compatibility in the 21<sup>st</sup> century, *Biomaterials*, 28, 5144-5147, 2007.
- [93] American Standard for Testing Materials, (ASTM) F 756-00: Standard Practice for Assessments of Hemolytic Properties of Materials, 2000.
- [94] Anticoagulant Citrate Dextrose Solution, *U.S. Pharmacopeia*, 23, 119, 1995.
- [95] ICSH, Recommendations for Reference Method for Haemoglobin in Human Blood (ICSH standard 1995) and Specifications for International Haemoglobincyanide Standar (4<sup>th</sup> edition), *J. Clin. Pathol.*, 49, 271-274, 1996.
- [96] Hanani, Z.A., Roos, Y.H., Kerry, J.P., Fourier Transform Infrared (FTIR) Spectroscopic Analysis of Biodegradable Gelatin Films Immersed in Water.
- [97] Wael, K., Vestraete, A., Vlierberghe, S., et al., The Electrochemistry of a Gelatin Modified Gold Electrode, *International Journal of Electrochemical Science*, Vol.6, 1810-1819, 2011.
- [98] Zhu, Y., Gao, C., Shen, J., Surface modification of polycaprolactone with poly(methacrylic acid) and gelatin covalent immobilization for promoting its cytocompatibility, *Biomaterials*, Vol.23, 4889-4895, 2002.
- [99] Xiang, P., Li, M., Zhang, C-y., Chen, D-l., Zhou, Z-h., Cytocompatibility of electrospun nanofiber tubular scaffolds for small diameter tissue engineering blood vessels, *International Journal of Biological Macromolecules*, Vol.49, 281-288, 2011.
- [100] Coimbra, P., Preparação e Caracterização de Sistemas de Libertação Controlada de Fármacos com base em Polímeros de Origem Natural, Tese de Doutoramento, Faculdade Ciências e Tecnologia da Universidade de Coimbra, 2010.
- [101] Zhao, P., Jiang, H., Pan H., Zhu, K., Chen, W., Biodegradable fibrous scaffolds composed of gelatin coated poly( $\epsilon$ -caprolactone) prepared by coaxial electrospinning, *InterScience*, 2007.

- [102] Kasko, A., Degradable Poly(ethylene glycol) Hydrogels for 2D and 3D Cell Culture, *Aldrich Materials Science*.
- [103] [http://www.accessdata.fda.gov/cdrh\\_docs/pdf12/p120002c.pdf](http://www.accessdata.fda.gov/cdrh_docs/pdf12/p120002c.pdf)
- [104] Prabu, P., Dharmaraj, N., Aryal, S., et al. Preparation and drug release activity of scaffolds containing collagen and poly(caprolactone), *InterScience*, 153-158, 2006.
- [105] Ciardelli, G., Chiono, V., Vozzi, G., et al. Blends of Poly-( $\epsilon$ -caprolactone) and Polysaccharides in Tissue Engineering Applications, , Vol.6, 1961-1976, 2005.
- [106] Wang, Y., Zhang, X., Vascular restoration therapy and bioresorbable vascular scaffold, *Regenerative Biomaterials*, 49-55, 2014.
- [107] Rihova, B., Biocompatibility of biomaterials: hemocompatibility, immunocompatibility and biocompatibility of solid polymeric materials and soluble targetable polymeric carries, *Advanced Drug Delivery Reviews*, Vol.21, 157-176, 1996).
- [108] Williams, L., On the mechanisms of biocompatibility, , Vol.29, 2941-2953, 2008.
- [109] Seyfert, U.T., Biehl, V., Schenk, J., In vitro hemocompatibility testing of biomaterials according to the ISO 10993-4, *Biomolecular Engineering*, Vol.29, 91-96, 2002.
- [110] Padalhin, A.R., Linh, N.T.B., Min, Y.K.M., Lee, M-T, Evaluation of the cytocompatibility hemocompatibility in vivo bone tissue regenerating capability of different PCL blends, *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition*, Vol. 25, 487-503, 2013.
- [111] Santos, R., Síntese de materiais poliméricos para regeneração de tecido muscular, Tese de Mestrado, Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade Coimbra, 2010.
- [112] [infarmed.pt/infomed/download\\_ficheiro.php?med\\_id=6456&tipo\\_doc=rcm](http://infarmed.pt/infomed/download_ficheiro.php?med_id=6456&tipo_doc=rcm)
- [113] Greenwald, S.E., Berry, C.L, Improving vascular grafts: the importance of mechanical and haemodynamic properties, *Journal of Pathology*, Vol.190, 292-299, 2000.
- [114] Mani, G., Feldman, M., Patel, D., Coronary stents: A materials perspective, *Biomaterials*, Vol. 28, 1689–1710, 2007.

- [115] Garg, M.B., Serruys, P., Coronary Stents, *Journal of the American College of Cardiology*, Vol. 56, 0735-1097, 2010.
- [116] [www.sigmaaldrich.com/catalog/product/aldrich/469823?lang=pt&region=PT](http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/aldrich/469823?lang=pt&region=PT)
- [117] [www.sigmaaldrich.com/catalog/product/aldrich/437441?lang=pt&region=PT](http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/aldrich/437441?lang=pt&region=PT)
- [118] Friedrich, R.B., Ravello, A., Cichota, L.C., Validation of a simple and rapid UV spectrophotometric method for dexamethasone assay in tablets, *Química Nova*, Vol. 32, 1678-7064, 2009





# ANEXOS

ANEXO A – Tipos de *Stents* Comerciais

<b>Bare Metal Stents (BMS)[80,81 e 113]</b>				
 <p>VeriFLEX™</p>	<p><b>Considerações</b></p> <p>BMS apresentam uma estrutura em rede tubular e, idealmente deverão apresentar flexibilidade (como uma mola) inerente com a parede da artéria. São feitos de uma variedade de materiais, e a escolha dos mesmos depende do grau de resistência e flexibilidade que deverá consistir o <i>stent</i>.</p>	<p><b>Vantagens</b></p> <p>Boas propriedades mecânicas.</p> <p>Permite uma contenção do lúmen vascular com a diminuição do risco de oclusão aguda.</p>	<p><b>Limitações</b></p> <p>Apesar da diminuição da ocorrência de reestenose a sua incidência ainda é alta, como por exemplo através de uma possível fratura do <i>stent</i>.</p>	<p><b>Stents vasculares comerciais*</b></p> <p><b>Nome</b> <i>BeStent™ 2</i>  <b>Material</b> 316L SS  <b>Fabricante</b> Medtronic, Inc, Minnesota</p>
<p><b>Materiais</b></p> <p>Aço inoxidável 316 L (316L SS)  Liga Cobalto-Crômio (liga Co-Cr)  Liga de Titânio (p.e. com Nitinol)  Liga de Platina-Irídio (liga Pt-Ir)  Tântalo (Ta)  Ferro puro (Fe)  Ligas Magnésio (Mg)</p>	<p>A fim de minimizar ou idealmente evitar a ocorrência de trombose, estes poderão ser revestidos com carbono, platina e heparina.</p>	<p>Redução da necessidade de cirurgia de revascularização emergência.</p> <p>Diminuição da ocorrência de reestenose.</p>	<p>Estrutura não fisiológica que pode provocar trauma e resposta inflamatória nas paredes vasculares, podendo originar angioplastia, disfunção endotelial, vasoconstrição, proliferação celular e produção da matriz extracelular o que origina a incidência de reestenose.</p> <p>Mesmo a incidência de trombos ser reduzida (16- 24% ainda há a probabilidade de ocorrência.</p> <p>Libertação de iões tóxicos a longo prazo (p.e. Cr, Ni e Co).</p>	<p><b>Nome</b> <i>MULTI-LINK VISION™</i>  <b>Material</b> Liga Co-Cr L-605  <b>Fabricante</b> Guidant Corporation, CA</p> <p><b>Nome</b> <i>NIRflex™</i>  <b>Material</b> 316L SS  <b>Fabricante</b> Liberté™ Monorail™</p> <p><b>Nome</b> <i>VeriFLEX™</i>  <b>Material</b> 316L SS  <b>Fabricante</b> Boston Scientific Corporation, MN</p>
<b>Biodegradable Stents (BDS)[60,114,115]</b>				

 <p style="text-align: center;"><i>REVA™</i></p>	<p><b>Considerações</b></p> <p>Têm as mesmas características que os <i>stents</i> metálicos mas apresentam como base materiais degradáveis e absorvíveis permitindo a restauração da fisiologia do vaso sanguíneo.</p> <p>Tal como sucede com os BMS, os BDS podem ter ação farmacológica com a adição de agentes antiproliferativos prevenindo a incidência de reestenose. Contudo, nestes <i>stents</i> não é necessária a ação de um agente antiagregante plaquetário dado que estes se degradam em tempo pré-definido diminuindo deste modo o risco de complicações hemorrágicas.</p>	<p><b>Vantagens</b></p> <p>Uma vez que há a absorção completa do material, há a prevenção do risco de trombose.</p> <p>Diminui a agressão do endotélio.</p> <p>O facto de não apresentar materiais metálicos facilita a vasomotricidade, tensão de cisalhamento retarda o alargamento luminal e a remodelação expansiva.</p> <p>Melhoria no tratamento futuro como na intervenção coronária percutânea (PCI – Percutaneous Coronary Intervention) ou na revascularização cirúrgica, uma vez que podem ser realizadas em áreas onde já estiveram <i>stents</i> sem qualquer restrição.</p> <p>Uso de técnicas não invasivas para a monotorização de <i>stents</i></p>	<p><b>Limitações</b></p> <p>Ocorrência de trombose após a sua total degradação.</p>	<p><b>Stents vasculares comerciais*</b></p> <p><b>Nome</b> <i>Igaki-Tamai™</i>  <b>Material</b> PLLA  <b>Fabricante</b> Igaki Medical Planning Company, Kyoto, Japan</p> <p><b>Nome</b> <i>REVA™</i>  <b>Material</b> Policarbonato de tirosina  <b>Fabricante</b> REVA Medical, San Diego, California, USA</p> <p><b>Nome</b> <i>AMS™</i>  <b>Material</b> Liga magnésio (97%)-metais raros (3%)  <b>Fabricante</b> MAS-1, BIOTRONIK, Berlin, Germany</p>
<p style="text-align: center;"><b>Materiais</b></p> <p>Materiais poliméricos (ex. PLA)  Ligas de magnésio  Ferro</p>				

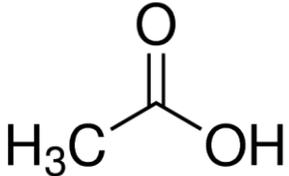
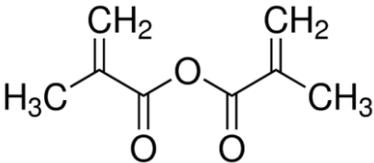
		vasculares como a angiografia tonográfica computadorizada.		
<b><i>Endothelial Progenitor Cell (ECP) capture stents</i>[60,61]</b>				
 <i>Genous R-Stent™</i>	<b>Considerações</b> <p>Baseiam-se em stents carregadas com células circulantes mononucleares CD34<sup>+</sup> que migram para as áreas onde ocorre a lesão vascular e ajudam na regeneração do endotélio danificado e disfuncional.</p>	<b>Vantagens</b> <p>Rápida endotelização.</p>	<b>Limitações</b> <p>Necessários a realização de mais testes <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i></p> <p>Requer a introdução de ação farmacológica antiplaquetaria</p>	<b>Stents vasculares comerciais*</b> <p><b>Nome</b> <i>Genous R-Stent™</i>  <b>Material</b> Matriz polimérica biodegradável/CD34<sup>+</sup>  <b>Fabricante</b> OrbusNeich, Fourt Lauderdale, Florida, USA</p>
<b>Materiais</b> <p>Matriz polimérica biodegradável</p>				
<b><i>Drug Eluting Stents (DES)</i>[60,61,114,115]</b>				
 <i>BioMATR</i>	<b>Considerações</b> <p>Surgem como resposta às limitações dos stents metálicos, podendo ser de base metálica ou polimérica.</p> <p>Tem como função o suporte arterial acoplado à adição farmacológica de antiproliferativos ou antiplaquetários que permitem a diminuição da</p>	<b>Vantagens</b> <p>Reduzida incidência de trombos e nulidade de incidência de reestenose</p>	<b>Limitações</b>	<b>Stents vasculares comerciais*</b> <p><b>Nome</b> Cypher™  <b>Material</b> 316L SS  <b>Revestimento</b> PEVA, PBMA  <b>Fármaco</b> Sirolimus  <b>Fabricante</b> Cordis, Warren, New Jersey, EUA</p>

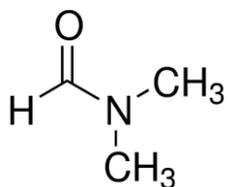
	<p>hiperplasia da neointima ou a formação de trombos respetivamente.</p> <p><b>Uso de fármacos</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• <u>Antiproliferativos</u>: Previnem a hiperplasia da neointima inibindo a migração e proliferação das células do músculo liso.</li> </ul> <p><b>Redução/anulação drástica da reestenose.</b></p> <p><i>Exemplo de fármaco: Sirolimus</i></p>			<p><b>Nome</b> <i>BioMatrix™</i>  <b>Material</b> 316L SS  <b>Revestimento</b> PLA  <b>Fármaco</b> <i>Biolimus A9</i>  <b>Fabricante</b> Biosensors, Morges, Switzerland</p>
	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <u>Anti-plaquetários</u>: Têm como função a inibição de trombos. De forma a dar continuidade ao tratamento, este não deve ser interrompido. Desta forma é necessária uma dupla ação farmacológica, no qual um fármaco de tienopiridina é usado durante um período pré-definido (normalmente 12 meses), enquanto outro fármaco (ácido acetilsalicílico) permanece com a sua terapêutica no ativo por tempo indefinido.</li> </ul> <p><b>Redução da incidência de trombos</b></p> <p><i>Exemplo de fármaco: Clopidogrel+Ácido Acetilsalicílico</i></p>			<p><b>Nome</b> <i>Yukon™</i>  <b>Material</b> 316L SS  <b>Revestimento</b> Estrutura com reservatório  <b>Fármaco</b> Tacrolimus  <b>Fabricante</b> CID (Carbostent &amp; Implantable Devices), Italy</p> <p><b>Nome</b> <i>Combo Stent™</i>  <b>Material</b> Polímero absorvível  <b>Revestimento</b> Matriz polimérica biodegradável/CD34  <b>Fármaco</b> Sirolimus  <b>Fabricante</b> OrbusNeich</p> <p><b>Nome</b> <i>BVS™</i>  <b>Material</b> PLLA  <b>Revestimento</b> PLLA  <b>Fármaco</b> Everolimus  <b>Fabricante</b> Abbott Vascular, Santa Clara, Calif, USA</p>

\* Aprovados pela FDA e CE

## ANEXO B – Estrutura Química e algumas considerações dos reagentes utilizados na síntese dos *scaffolds*

Tabela B.1 – Estrutura Química e algumas considerações dos reagentes utilizados na síntese dos *scaffolds*

Reagente	Considerações	Símbolos
 <p>Ácido Acético Glacial [116]</p>	Densidade Vaporização: 2,07 (vs air) Pressão de Vapor: 11,4 mmHg (20°C) Pureza: ≥ 99,7% Temperatura ignição: 800°F	GHS02, GHS05 H226-H314 P280-P303 + P361 + P353-P304 + P340 + P310-P305 + P351 + P338-P403 + P235
 <p>Anidrido Metacrílico (MAA) [117]</p>	Densidade: 1.049 g/mL at 25°C (lit) Pureza: 94% Temperatura ebulição: 87°C/13mmHg (lit.) Densidade: 1.035 g/mL at 25°C (lit)	GHS05, GHS06 H315-H318-H331-H335 P261-P280-P305 + P351 + P338-P311
<p>CHCl<sub>3</sub></p> <p>Clorofórmio [118]</p>	Densidade Vaporização: 4,1 (vs air) Pressão de Vapor: 160 mmHg (20°C) Temperatura ebulição: 87°C/13mmHg (lit.) Temperatura Fusão: -63(lit.) Pureza: ≥ 99% Densidade: 1,492 g/mL at 25°C (lit)	GHS06, GHS08 H302-H315-H319-H331-H336-H351-H361d-H372 P261-P281-P305 + P351 + P338-P311

**Dimethylformamide (DMF) [119]**

Densidade Vaporização: 2,5 (vs air)

GHS02, GHS07, GHS08

Pressão de Vapor: 2,7 mmHg (20°C)

H226-H312 + H332-H319-H360D

Temperatura de autoignição: 833 °F

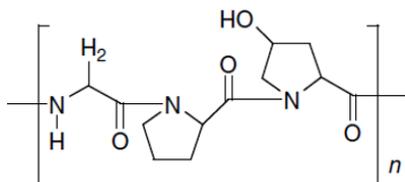
P201-P280-P305 + P351 + P338-P308 + P313

Temperatura ebulição: 153°C/13mmHg (lit.)

Temperatura Fusão: -61(lit.)

Pureza: ≥ 99,8%

Densidade: 0,944 g/mL at 25°C (lit)

**Gelatina Tipo-A [120]**

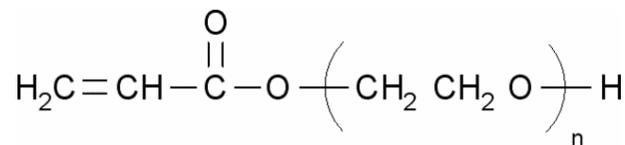
Solubilidade: 50mg/mL

**Phosphate Buffer Solution (PBS) [121]**

Concentração: 0.1M

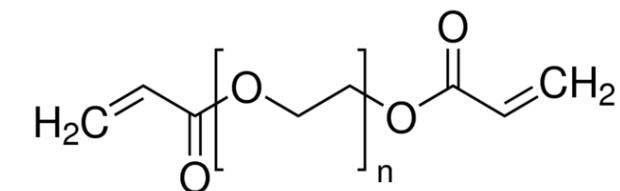
pH = 7,5 (25°C)

Peso Molecular: ~250 mol/wt



Densidade: 1.11 g/mL at 25°C (lit)

**Poly(ethylene glycol) acrylate (PEGMA)**



**Poly(ethylene glycol) diacrylate  
(PEGDA) [123]**

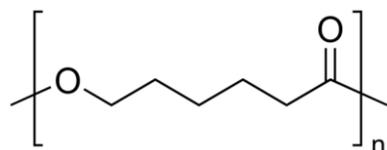
**Peso Molecular:** ~375 mol/wt

GHS05, GHS07

H315-H317-H318

**Densidade:** 1.12 g/mL at 25°C (lit)

P280-P305 + P351 + P338



**Policaprolactona (PCL)  
[127]**

**Peso molecular:** 70 000-90 000 Mn

**Temperatura de fusão:** 60°C

**Densidade:** 1,145 g/mL at 25°C (lit)

**Densidade Vaporização:** 3,5 (vs air)

**Pressão de Vapor:** 70 mmHg (20°C)

**Temperatura de autoignição:** ~896 °F

GHS02, GHS05, GHS06

H226-H301-H312-H315-H318-H331-H335



**2,2,2-Trifluoroethanol (DMF) [125]**

**Temperatura ebulição:** 70-80°C (lit.)

**Temperatura Fusão:** -44(lit.)

**Pureza:** ≥ 99,9%

P261-P280-P301 + P310-P305 + P351 + P338-P311

**Densidade:** 1,373 g/mL at 25°C (lit)

## ANEXO C – Protocolos dos Ensaios de Hemocompatibilidade

### Teste da hemólise

Os testes de hemólise compreenderam as seguintes etapas:

1. Amostragem de sangue
2. Quantificação da hemoglobina
  - 2.1 Método da Cianometahemoglobina
    - Preparação das soluções
    - Preparação dos padrões para elaboração da curva de calibração
    - Determinação da concentração de hemoglobina no sangue e no plasma
    - Diluição do sangue
3. Contato do material com o sangue
4. Cálculo da percentagem de hemólise provocada por cada material
  - **Protocolo experimental**

#### **1. Amostragem de sangue**

Para a realização dos testes experimentais o sangue de coelho foi fornecido pela PROBIOLÓGICA, o qual já vinha anti-coagulado e acondicionado num recipiente de vidro e devidamente revestido termicamente. Assim que recebido, este foi armazenado até à sua utilização no frigorífico. Apesar de a validade permitir o seu armazenamento durante aproximadamente um mês, o mesmo foi utilizado logo assim que fornecido.

#### **2. Quantificação da hemoglobina**

##### **2.1. Método da Cianometahemoglobina – Fundamentos**

De forma a quantificar a hemoglobina (Hb) presente na totalidade dos glóbulos vermelhos e plasma, podem-se recorrer a diferentes métodos analíticos, nomeadamente: 1) espectrofotometria; 2) doseamento de ferro; 3) absorção de gases. Dos métodos mencionados, a espectrofotometria é preferível, dada a sua precisão, rapidez e relativa

facilidade de execução. O método da cianometahemoglobina é o mais utilizado, por referência do Conselho Internacional de Padronização em Hematologia.

## 2.2. Procedimentos Realizados

### – Preparação das soluções

De acordo com a norma ASTM F 756-00, que utiliza como método de referência o método da cianometahemoglobina, o sangue utilizado nos testes de hemólise deve apresentar as seguintes características:

- 1) [Hb] no sangue = 10 mg/mL  $\pm$  1 mg/mL
- 2) [Hb] no plasma do sangue < 2 mg/mL

Tabela C.1 – (cont.)

Assim, para a aplicação do método referido foi necessário a preparação de diversas soluções, que se apresentam na Tabela C.1, assim como a sua aplicação e utilização.

Tabela C.1 Preparação de soluções para os ensaios de hemocompatibilidade e sua utilização.

Soluções	Materiais e Preparação	Aplicação/Utilização
<i>Solução de PBS</i>	<p><b>Reagentes</b>                      - Di-hidrogenofosfato de Potássio (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>); Fosfato dissódio di-hidratado (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>.2H<sub>2</sub>O); Cloreto de Potássio (KCl) e Cloreto de sódio (NaCl).</p> <p><b>Preparação</b>                      Para a preparação de 1 L de PBS, adicionar 0.381 g de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1.273 g de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>.2H<sub>2</sub>O, 0.2 g de KCl e 8.066g de NaCl a 1 L de água miliQ. Depois de preparada armazenar no frigorífico.</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Dispersão dos eritrócitos liofilizados para preparar a solução de Hb;</li> <li>- Diluição do sangue, até se obter o valor pretendido de concentração de Hb no sangue e no plasma sanguíneo;</li> <li>- Incubação dos materiais, para posterior contacto com o sangue ACD diluído.</li> </ul>
<i>Solução de Drabkin Modificada</i>	<p><b>Reagentes</b>                      - Cianeto de Potássio (KCN), ferrocianeto de potássio (K<sub>3</sub>Fe(CN)<sub>6</sub>), di-hidrogenofosfato de potássio (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) e tensoativo não iónico Triton X-100</p> <p><b>Preparação</b>                      Para a preparação de 1L de solução de Drabkin modificada, dissolver 50 mg de KCN, 200 mg de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 140 mg de K<sub>3</sub>Fe(CN)<sub>6</sub> e 1 mL de Triton X-100 em 1 L de água destilada. A solução obtida é depois filtrada e armazenada em local fresco e desprovido de luz.</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Adição à solução de Hb para preparação dos padrões para elaboração da curva de calibração</li> </ul>
<i>Solução de Hb</i>	<p><b>Materiais</b>                      Eritrócitos liofilizados e solução PBS</p> <p><b>Preparação</b>                      Para a preparação da solução de Hb, adicionou-se entre 0.25 a 0.30 g de eritrócitos liofilizados a 75 mL de solução PBS. A solução foi preparada no dia em que foi utilizada.</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Elaboração da curva de calibração</li> </ul>

– Preparação dos padrões na elaboração da curva de calibração

A fim de determinar a concentração de Hb presente no sangue, delineou-se uma curva de calibração com diferentes concentrações de hemoglobina previamente preparadas através de diferentes diluições da solução de Hb preparada, a partir da adição de eritrócitos liofilizados a um determinado volume de solução PBS.

Após dispersão dos eritrócitos na solução PBS e consequentemente solubilização da hemoglobina, a solução de Hb foi filtrada. Obteve-se desta forma um sobrenadante onde ficou solubilizada a totalidade da Hb presente nos eritrócitos. Retirou-se 1 mL de sobrenadante e adicionou-se a 5 mL da solução de Drabkin, aguardando-se 5 minutos. A solução de Drabkin permite converter todas as formas de hemoglobina em cianometahemoglobina, possibilitando a sua total quantificação no comprimento de onda de 540 nm.

Após 5 minutos, determinou-se a concentração de Hb no sobrenadante por espectroscopia de UV-Vis no comprimento de onda de absorção do composto. Fez-se um varrimento no espectrofotómetro numa gama de comprimento de onda entre 400-800 nm. Utilizou-se ainda a solução de Drabkin como branco, fazendo pelo menos três réplicas do ensaio. A concentração de Hb foi então calculada a partir da equação C.1.

$$[Hb] = \frac{A_{540\text{ nm}} \times M \times f_d}{\epsilon_{HiCN}^{540\text{ nm}} \times 1 \times 1000} \text{ (g/l)} \quad (\text{C.1})$$

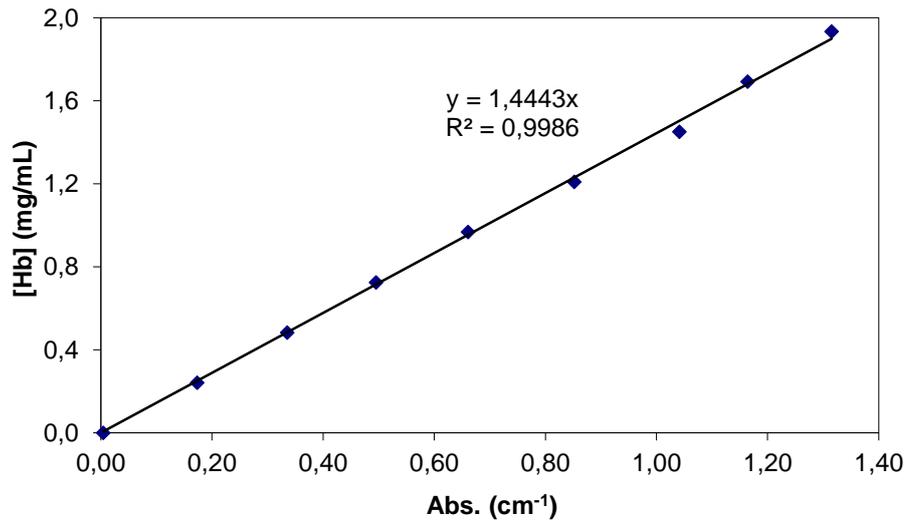
Onde  $A_{540\text{ nm}}$  corresponde à absorvância a 540 nm,  $\epsilon_{HiCN}^{540\text{ nm}}$  é o coeficiente milimolar da cianometahemoglobina (HiCN), 11 nM/cm, M está relacionada com a massa molecular da hemoglobina (16114.5 g) e  $f_d$  é o fator de diluição. Substituindo os valores na Equação C.1, obteve-se a Equação C.2 para o cálculo da concentração de Hb.

$$[Hb] = 1.465 \times A_{540\text{ nm}} \times f_d \text{ (g/l)} \quad (\text{C.2})$$

Prepararam-se diferentes diluições (a partir de diferentes volumes de solução Hb e de Drabkin). Para continuar com o processo, as soluções padrão obtidas teriam que compreender os seguintes requisitos:

- 1)  $1.59 < \frac{A_{540nm}}{A_{504nm}} < 1.63$
- 2)  $A_{750nm} \leq 0.003$

A curva de calibração obtida permitiu relacionar os valores de concentração de Hb livre com a respetiva absorvência. Com a realização desta curva foi possível determinar a concentração inicial de Hb no sangue e no plasma sanguíneo (Figura C.1).



**Figura C.1** Curva de calibração obtida, a partir da qual foi possível determinar os valores da concentração de Hb no sangue e plasma, após leitura das absorvências no espectrofotómetro.

- Determinação da concentração de hemoglobina ([Hb]) no sangue e no plasma

#### **Concentração de Hb no plasma**

De forma a determinar a concentração de Hb livre no plasma, começou-se por centrifugar 5 mL de sangue, a uma velocidade de 2100 rpm, pelo período de 5 a 15 minutos. Assim permitiu a sedimentação de todas as partículas em suspensão, obtendo-se desta forma um sobrenadante límpido (plasma). Posteriormente, diluiu-se 1 mL do plasma em 1 mL de solução de Drabkin modificada, e procedeu-se à leitura da absorvência a 540 nm. A concentração de Hb foi posteriormente calculada mediante a curva de calibração. Este procedimento é repetido por 3 vezes de forma a validar os valores obtidos.

### **Concentração de Hb no sangue**

Para determinar a concentração de Hb total no sangue, diluiu-se 20  $\mu\text{L}$  de sangue em 5 mL de solução de Drabkin modificada, e mais uma vez se procedeu à leitura da absorvância, no mesmo comprimento de onda. O cálculo efetuado foi mais uma vez com recurso à curva de calibração, multiplicando pelo fator de diluição. Este mesmo procedimento foi executado três vezes.

#### – Diluição do sangue

Determinada a concentração de Hb inicial, foi necessário diluir o sangue de modo a obter a concentração Hb pretendida ( $10 \text{ mg/mL} \pm 1 \text{ mg/mL}$ ). Para tal, preparou-se uma solução de sangue por adição de 600  $\mu\text{L}$  do mesmo a 5 mL de PBS. De seguida, da solução de sangue diluída retirou-se 400  $\mu\text{L}$  e diluiu-se em 5 mL de solução de Drabkin. Leu-se então a absorvância da solução a 540 nm e calculou-se a respetiva concentração de Hb a partir da curva de calibração. Mais uma vez realizaram-se três réplicas de forma a validar os resultados obtidos.

Finalizando este processo, faz-se então o contacto do sangue diluído com os materiais sintetizados.

### **3. Contacto do material com o sangue**

O contacto dos materiais pode ser realizado de forma direta ou indiretamente. Desta forma, a ocorrência de hemólise que os materiais provocam no sangue pode dever-se a um contacto direto com o sangue ou a partir de uma interação de substâncias que são libertadas pelo mesmo. Em ambos os casos há dois fatores que são predominantes: 1) concentração de Hb na solução sanguínea; 2) e quantidade de material em contacto.

Determinou-se assim o volume de solução sanguínea necessária para estabelecer o contacto com o material. A norma ASTM F 756-00, a partir da qual se estabeleceu todo o procedimento experimental executado, refere o uso de pelo menos 7 mL, equivalente a ter um material com 21  $\text{cm}^2$  de área superficial.

Para o contacto indireto dos materiais com o sangue, os materiais sintetizados (com a área pré-definida anteriormente) eram recortados em pedaços de pequenas dimensões e colocados em tubos de falcon incubados em solução PBS a 37°C, durante pelo menos 12h. Após esse período de tempo, o PBS era removido e era adicionado aos materiais o sangue diluído. Para o contacto direto, os materiais eram colocados diretamente com o sangue diluído em tubos de falcon (tal como se procedeu no contato indireto). Seguidamente, tanto os materiais que estavam em contacto indireto como em contato direto eram colocados numa incubadora a 37°C por 3 h para que o sangue interagisse com os materiais sintetizados. É importante ainda referir que se realizaram três réplicas de cada material.

## ANEXO D – Protocolo Curva de Calibração de Dexametasona

Neste anexo encontra-se descrito o procedimento experimental para a elaboração da curva de calibração utilizada no estudo de libertação de fármaco. Com a curva obtida foi possível converter as absorvâncias medidas em concentrações de ativo para cada amostra. Tendo os valores de concentração para cada ponto de amostragem, foi possível traçar os perfis de libertação cumulativa de cada material ao longo do tempo.

- **Materiais**

Metanol (99%), Dexametasona, Água destilada.

- **Métodos**

Preparou-se uma solução padrão de concentração 0.5 mg/ml dissolvendo 25 mg de dexametasona numa mistura de 50 mL metanol:água (1:2). Para a dissolução ser eficaz, dissolveu-se inicialmente a dexametasona em metanol e só depois se procedeu à adição lenta de água destilada ao sistema. Isto advém do fármaco ser hidrofóbico e, como tal, apresentar baixa solubilidade em água.

Para elaborar a curva de calibração, diluiu-se até 5 vezes a solução padrão de dexametasona em 10 mL de água destilada. Para diferentes concentrações conhecidas, determinou-se as absorvâncias respetivas em um espectrofotómetro UV/VIS (Jasco-V550). Na Tabela D.1 apresentam-se as concentrações das soluções diluídas de dexametasona com as respetivas absorvâncias obtidas, sabendo que o pico de absorção do ativo para o sistema metanol:água se situa na ordem dos 241 nm.

**Tabela D.1** Concentração de soluções de dexametasona e respetiva absorvância.

Nomenclatura	Concentração (µg/ml)	Comprimento de Onda (nm)
C5	5,12	0,1865
C4	10,24	0,3157
C3	15,36	0,4752
C2	20,48	0,633
C1	25,6	0,7537

Face aos valores da Tabela D.1, traçou-se a curva de calibração, que se apresenta na Figura D.1.

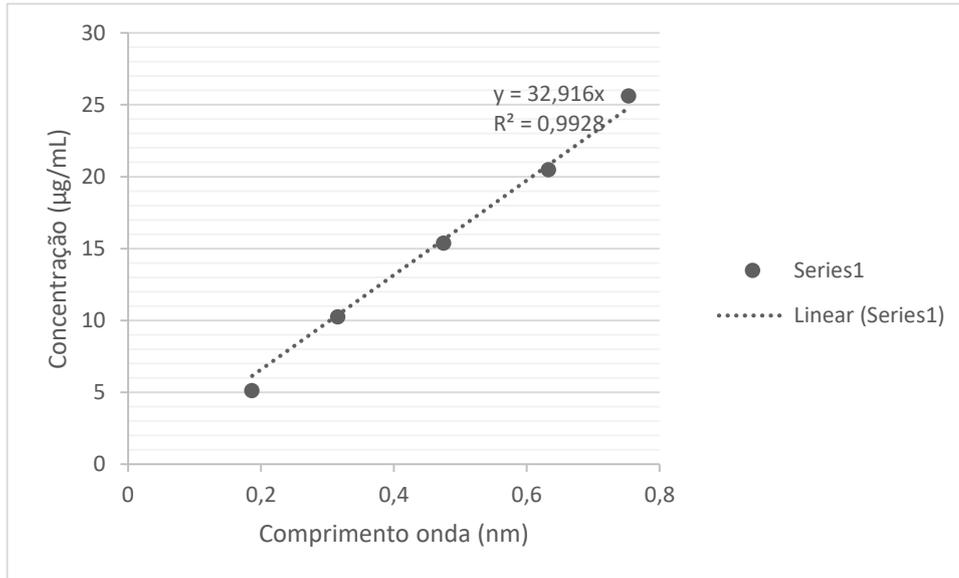


Figura D.1 Curva de calibração da dexametasona em metanol:água (1:2), Ambiente.

Posto isto, todos os materiais com fármaco incorporado foram incubados em 10 mL de solução PBS (pH=7.4) e introduzidos em uma estufa a 37°C. É importante ainda referir que foram introduzidos de igual modo (e de diâmetro semelhante) os mesmos materiais sintetizados mas sem que lhe fosse incorporado fármaco (brancos), para ser possível obter a quantidade real de dexametasona libertada. Com o recurso à curva de calibração da Figura D.1, calculou-se a percentagem de dexametasona libertada (Equação D.1).

$$\%massaDex = \frac{m_{Dex,acumulada}}{m_{Dex,teórica}} \times 100 \quad (D.1)$$

Em que  $m_{Dex,acumulada}$  corresponde à massa de dexametasona acumulada ao longo de cada tempo e  $m_{Dex,teórica}$  a massa teórica de dexametasona presente no material. Para determinar a massa de dexametasona acumulada, teve-se em conta a Equação D.2.

$$m_{Dex,acumulada} = m_{Dex,libertada} + m_{Dex,acumulada \text{ anteriormente}} \quad (D.2)$$

Em que  $m_{Dex,libertada}$  corresponde à massa de dexametasona que é libertada para o meio, e  $m_{Dex,acumulada anteriormente}$  é a dexametasona que já está acumulada do tempo anterior.

Para o cálculo de  $m_{Dex,libertada}$  recorre-se à Equação D.3.

$$m_{Dex,libertada} = C_i \times f_d \times V_{libertado} \quad (D.3)$$

Em que  $C_i$  é a concentração de dexametasona presente num determinado tempo,  $f_d$  o fator de diluição e  $V_{libertado}$  o volume do meio coletor para o qual a dexametasona se libertava, que neste caso correspondia a 10 mL de solução PBS.

Para o cálculo de  $C_i$  utilizou-se a Equação D.4.

$$C_i = A_a - R \times A_b \quad (D.4)$$

Em que  $A_a$  correspondia à absorvância para o mesmo comprimento de onda e tempo de libertação dos materiais com dexametasona e  $A_b$  para os materiais sem incorporação de fármaco (designados de brancos) de dexametasona. Já  $R$ , corresponde à razão entre a massa da amostra e a massa do branco.

Voltando à equação D.1, e finalizando, a  $m_{Dex,teórica}$  é dada pela Equação D.5.

$$m_{Dex,teórica} = \frac{m_{membrana}}{\text{Carregamento teórico}} \quad (D.5)$$

Em que  $m_{membrana}$  corresponde à massa da membrana com dexametasona e o carregamento teórico corresponde à razão entre o carregamento de dexametasona nas fibras de PCL e a massa final entre a massa de PCL e a massa de dexametasona.