

Ana Cristina Moura Alves

# Preparação de membranas com base em fibras coaxiais eletrofiadas

Dissertação de Mestrado Integrado em Engenharia Química, especialização em Biosistemas, 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

setembro de 2017



UNIVERSIDADE DE COIMBRA



Ana Cristina Moura Alves

# Preparação de membranas com base em fibras coaxiais eletrofiadas

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:**

Doutora Paula Cristina Nunes Ferreira Calvinho

Doutora Patrícia De Jesus Pinto Alves

## **Instituições:**

Departamento de Engenharia Química

Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade de Coimbra

Coimbra 2017



UNIVERSIDADE DE COIMBRA



*“O meu segredo és tu...”*

Nádia Marques



# AGRADECIMENTOS

A realização deste trabalho não teria sido possível sem o apoio de algumas pessoas, direta ou indiretamente, a quem quero agradecer por contribuírem, de certa forma, para o fim de uma etapa muito importante da minha vida.

Em primeiro lugar agradeço às minhas orientadoras, a Doutora Paula Cristina Nunes Ferreira Calvinho e a Doutora Patrícia de Jesus Pinto Alves, pelo apoio, disponibilidade e colaboração, assim como por todos os conhecimentos transmitidos.

Agradeço à Doutora Patrícia Coimbra, por todo o apoio, simpatia, disponibilidade e paciência que demonstrou ao longo do desenvolvimento do trabalho.

No desenvolvimento deste trabalho, tive a oportunidade de trabalhar no Laboratório B09 do Departamento de Engenharia Química da Faculdade de Ciências e Tecnologias da Universidade de Coimbra, onde conheci pessoas que contribuíram para um ambiente de trabalho bastante motivador às quais agradeço por toda a simpatia e hospitalidade. Muito obrigada às ‘Princesas do Lab’ (Belle, Rapunzel, Jasmine, Aurora e Ariel). Em especial à Marta Santos, pela paciência e ajuda ao longo de toda a elaboração do trabalho, e à Teresa Cernadas pelo companheirismo e conselhos dados ao longo destes últimos anos

Aproveito para agradecer a todos os meus amigos que sempre me acompanharam, e que contribuíram para os melhores momentos do meu percurso académico.

Por fim, mas sem dúvida não menos importante, quero agradecer à minha família que esteve sempre presente, pelo apoio incondicional, e um especial obrigada ao meu pai, à minha mãe e ao meu irmão, pelos sacrifícios suportados, pelo incentivo e presença, especialmente nos momentos mais difíceis. Deve-se a vocês a pessoa que sou hoje!

A todos reitero a minha profunda gratidão!





## RESUMO

As membranas de regeneração óssea guiada são membranas usadas não só como barreira, para que as células do tecido epitelial não invadam as do tecido ósseo, enquanto este regenera, mas também para melhorar a regeneração criando suporte às células para que se fixem e desenvolvam. Estas são usadas em procedimentos de regeneração periodontal com o objetivo de restaurar as estruturas de suporte, que muitas vezes são danificadas devido a infecções ou traumas, sendo usadas como modelos temporários. São vários os materiais usados para produzir este tipo de membranas a fim de combinar as melhores propriedades, tendo em conta a aplicação em causa. São usados polímeros biodegradáveis, com ou sem incorporação de fármaco, uma vez que se pretende que a membrana se degrade aquando da regeneração do tecido. O fármaco incorporado tem o objetivo de atuar como anti-inflamatório, antibiótico, entre outros, dependendo do que se pretende.

O objetivo deste trabalho está em produzir membranas por combinação de métodos de *electrospinning* e fotoreticulação usando duas abordagens diferentes, para aplicação como membranas de regeneração óssea guiada. Para as duas abordagens os biomateriais usados foram a gelatina, que é um polímero natural, e a policaprolactona (PCL), polímero sintético. Numa fase inicial a gelatina foi funcionalizada com anidrido metacrílico, com o objetivo de incorporar ligações duplas de carbono, para obter a GelMA, de forma a serem posteriormente usadas para reticular as membranas. Na primeira abordagem, foram preparadas as soluções poliméricas de PCL e GelMA, assim como na segunda abordagem, com a diferença que na solução de GelMA foi incorporado o fotoiniciador Irgacure® 2959. De seguida são produzidas as fibras por *electrospinning* coaxial, sendo o núcleo constituído pela PCL e o revestimento por GelMA. Ambas as membranas foram sujeitas ao processo de fotoreticulação. Na primeira abordagem, este método foi realizado mergulhando a membrana, já produzida, numa solução de Irgacure® 2959 e depois sujeita a irradiação UV. Na segunda abordagem, uma vez que o fotoiniciador já se encontrava incorporado nas fibras, a membrana foi colocada numa atmosfera húmida saturada e só depois foi exposta a irradiação UV. Por fim, foram avaliadas as propriedades químicas, físicas, térmicas e biológicas das membranas.

A composição química foi avaliada por espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier com reflexão total atenuada (ATR-FTIR) e espectroscopia de ressonância magnética nuclear de protão (<sup>1</sup>H RMN), as quais permitiram confirmar as ligações características de cada polímero em ambas as membranas. Pela análise termogravimétrica (TGA) avaliou-se a estabilidade térmica das mesmas.

Através da técnica de microscopia eletrónica de varrimento (**SEM**) observou-se a disposição das fibras nas membranas, sendo estas apresentadas de uma forma aleatória, tendo uma distribuição de diâmetros na ordem dos micrómetros.

A **perda de massa** foi avaliada durante 3 dias de incubação em água MilliQ. As membranas de PCL/GelMA foram as que exibiram maior diferença de perda de massa e quando comparadas as membranas fotoreticuladas, a de PCL/GelMA UV é a que demonstra ter um maior tempo de degradação.

Os testes de **viabilidade celular** mostraram resultados satisfatórios na medida em que as células de fibroblastos humanos, quando em contacto com as membranas de PCL/GelMA fotoreticuladas e de PCL/GelMA+Irgacure fotoreticuladas, têm a capacidade de aderir e proliferar.

O estudo da **libertação de fármaco** não foi conclusivo, uma vez que o Irgacure<sup>®</sup> 2959, que se encontra no revestimento das fibras, absorve o mesmo comprimento de onda que o Flurbiprofeno, que se encontra na membrana apenas a 1% junto com a PCL na fibra do núcleo.

Perante os resultados exibidos, conclui-se que as membranas produzidas, principalmente as de PCL/GelMA fotoreticuladas, possuem características com potencial para serem aplicadas como membranas de regeneração óssea guiada.

**PALAVRAS-CHAVE:** Membranas de regeneração óssea guiada, gelatina, policaprolactona, *electrospinning*, fotoreticulação, fibras, biocompatibilidade.

# ABSTRACT

Guided bone regeneration membranes are used, not only as a barrier during the bone tissue regeneration, against the invasion of epithelial tissue cells but, to improve the bone tissue regeneration by creating support for the bone cells fixing and development. In periodontal regeneration procedures, these membranes are used to repair support structures, many times damaged by infections or traumas, and as temporary models. This type of membranes are produced using several materials in order to combine its greatest properties considering its application. Biodegradable polymers are used since the membrane is intended to degrade upon tissue regeneration, drugs can be incorporated in the polymers with (e.g.) anti-inflammatory or antibiotic properties.

The present study aims to synthesize membranes combining electrospinning and photoreticulation procedures using two different approaches, to use as membranes for the guided bone regeneration. For the two approaches were used two biomaterials: gelatin, as natural polymer, and a polycaprolactone (PCL), as synthetic polymer. First, in order to incorporate the carbon double bonds, the gelatin was functionalized with methacrylic anhydride. The polymer solutions of PCL and GelMA were prepared for both approaches, with the difference in GelMA for the second approach, where it was incorporated the photoinitiator Irgacure® 2959. Then, fibers with a PCL core and GelMA sheath were produced by coaxial electrospinning and subjected to photoreticulation. In the first approach, the synthesized membranes were dipped in an aqueous solution of Irgacure® 2959 and then irradiated with UV radiation. In the second approach the photoinitiator was already incorporated in the fibers therefore, the membrane was placed in a humid and saturated atmosphere and after exposed to UV radiation. Lastly, were evaluated the chemical, physical, thermic and biological properties of the membranes.

Chemical composition of the membranes was evaluated by Attenuated Total Reflection Fourier Transform Infrared Spectroscopy (**ATR-FTIR**) and proton nuclear magnetic resonance spectroscopy (**<sup>1</sup>H RMN**), confirming the characteristic bonds of each polymer in both membranes. Thermogravimetric analysis (**TGA**) evaluated the thermic stability of membranes.

The fibers in the membranes were randomly disposed with diameters in the micrometer scale observed through scanning electron microscopy (**SEM**).

Membranes **weight loss** was evaluated throughout 3 incubation days in MilliQ water, PCL/GelMA membranes exhibited the highest weight loss compared to photoreticulated membranes and PCL/GelMA UV membranes showed higher degradation time.

Fibroblast cells, when in contact with PCL/GelMA photoreticulated membranes and PCL/GelMA+Irgacure photoreticulated membranes in **cell viability tests** showed suitable results showing the capacity to adhere and proliferate.

Once the Irgacure<sup>®</sup> 2959 is in the sheath of the fibers, it absorbs the same wavelength that Flurbiprofen that is found in the membrane at 1% along with the PCL in the core fiber therefore, the analysis of the **drug release** was inconclusive.

The present results suggest that the produced membranes, particularly the PCL/GelMA photoreticulated membranes, own characteristics with potential to be used as membranes for the guided bone regeneration.

**KEYWORDS:** Guided bone regeneration membranes, gelatin, polycaprolactone, *electrospinning*, photoreticulation, fibers, biocompatibility.

# ÍNDICE

OBJETIVOS E ESTRUTURA DA TESE.....	1
1. INTRODUÇÃO .....	3
1.1. Biomateriais e engenharia de tecidos .....	3
1.2. Membranas para regeneração óssea guiada .....	4
1.3. Flurbiprofeno .....	8
1.4. Polímeros biodegradáveis .....	9
1.5. <i>Electrospinning</i> .....	11
1.6. Caracterização das membranas .....	14
2. OBJETIVOS EXPERIMENTAIS .....	17
2.1. Abordagem I .....	18
2.2. Abordagem II .....	18
3. MATERIAIS E MÉTODOS .....	21
3.1. Materiais .....	21
3.2. Preparação das membranas .....	21
3.3. Caracterização das membranas .....	23
3.4. Liberação controlada de fármaco .....	24
3.5. Biocompatibilidade .....	25
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	27
4.1. Produção das membranas PCL/GelMA .....	27
4.2. Caracterização química por ATR-FTIR .....	28
4.3. Espectroscopia de ressonância magnética nuclear de próton ( <sup>1</sup> H RMN) .....	31

4.4. Determinação dos ângulos de contacto dinâmicos .....	32
4.5. Determinação da perda de massa (%) .....	33
4.6. Análise termogravimétrica (TGA) – Propriedades térmicas .....	35
4.7. Microscopia eletrónica de varrimento (SEM) – Morfologia das fibras .....	38
4.8. Libertação de Flurbiprofeno .....	41
4.9. Biocompatibilidade .....	41
5. CONCLUSÕES .....	45
5.1. Conclusões gerais .....	45
5.2. Perspetivas futuras .....	47
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	49

# ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.1</b> – Fatores a considerar no design de um biomaterial (Adaptado de Seal et al., 2001). .....	3
<b>Figura 1.2</b> – Aplicação de uma membrana para regeneração óssea guiada (Adaptado de Oral Surgery & Dental Implant Center of Louisiana). ....	5
<b>Figura 1.3</b> – Estrutura molecular do Flurbiprofeno (Maroof et al., 2015). ....	8
<b>Figura 1.4</b> – Poli ( $\epsilon$ -caprolactona) (Kariduraganavar et al., 2014). ....	10
<b>Figura 1.5</b> – Apresentação esquemática da montagem experimental. ....	12
<b>Figura 1.6</b> – a) Fotografia do spinneret usado e b) apresentação esquemática do funcionamento do mesmo. ....	13
<b>Figura 2.1</b> – Esquema do processo experimental da produção de membranas de PCL/GelMA a partir da técnica de electrospinning coaxial e diferentes formas de reticulação. ....	17
<b>Figura 3.1</b> – Reação da funcionalização da Gelatina (Adaptado de Correia et al., 2016). ....	21
<b>Figura 4.1</b> – Aparência das membranas a) PCL/GelMA sem fotoreticulação; b) PCL/GelMA com fotoreticulação; c) PCL/GelMA+Irgacure sem fotoreticulação e d) PCL/GelMA+Irgacure com fotoreticulação. ....	27
<b>Figura 4.2</b> – Espectro de ATR-FTIR da gelatina, antes e depois de ser modificada com anidrido metacrílico. ....	28
<b>Figura 4.3</b> – Espectro de ATR-FTIR dos polímeros PCL e GelMA, e das fibras de PCL/GelMA. ....	30
<b>Figura 4.4</b> – Espectro de ATR-FTIR das fibras de PCL/GelMA e PCL/GelMA+Irgacure. ...	30
<b>Figura 4.5</b> – Espectro de $^1\text{H}$ RMN da gelatina sem estar modificada e gelatina modificada (GelMA). ....	31
<b>Figura 4.6</b> – Ângulos de contacto dinâmicos das diferentes membranas. ....	32
<b>Figura 4.7</b> – Percentagem de perda de massa das membranas de PCL/GelMA, PCL/GelMA+Irgacure e respetivos controlos. ....	34
<b>Figura 4.8</b> – Curvas termogravimétricas de PCL, Gelatina e GelMA, obtidas com uma rampa de aquecimento de $10\text{ }^\circ\text{C}/\text{min}$ . ....	35
<b>Figura 4.9</b> – Curvas termogravimétricas das membranas PCL/GelMA e PCL/GelMA+Irgacure, obtidas com uma rampa de aquecimento de $10\text{ }^\circ\text{C}/\text{min}$ . ....	37
<b>Figura 4.10</b> – Curvas termogravimétricas das membranas PCL/GelMA UV e PCL/GelMA+Irgacure UV, obtidas com uma rampa de aquecimento de $10\text{ }^\circ\text{C}/\text{min}$ . ....	37

<b>Figura 4.11</b> – Imagens de SEM: A) aspeto geral da malha das fibras, a 500x; B) para analisar os seus diâmetros, a 2000x; C) morfologia da superfície das fibras individuais, 5000x; D) Histograma dos diâmetros das fibras da matriz PCL/GelMA UV.....	39
<b>Figura 4.12</b> – Imagens de SEM: A) aspeto geral da malha das fibras, a 500x; B) para analisar os seus diâmetros, a 2000x; C) morfologia da superfície das fibras individuais, 5000x; D) Histograma dos diâmetros das fibras da matriz PCL/GelMA+Irgacure UV. ....	40
<b>Figura 4.13</b> – Avaliação da atividade celular após contacto com as membranas produzidas por electrospinning coaxial, durante 1, 3 e 7 dias. ....	42
<b>Figura 4.14</b> – Imagens microscópicas das células de fibroblastos quando em contacto com as membranas, durante um período de incubação de 1, 3 e 7 dias. ....	43



## ÍNDICE DE TABELAS

<b>Tabela 3.1</b> – Composição das soluções para o electrospinning coaxial. ....	22
<b>Tabela 3.2</b> – Composição das soluções para o electrospinning coaxial, com o fármaco. ....	24
<b>Tabela 4.1</b> – Bandas de absorvância características do espectro infravermelho das ligações peptídicas (Adaptada de Fabian & Mäntele, 2002). ....	28
<b>Tabela 4.2</b> – Bandas de absorvância correspondentes à gelatina, antes e depois de ser modificada com anidrido metacrílico. ....	29
<b>Tabela 4.3</b> – Percentagem de perda de massa das membranas de PCL/GelMA, PCL/GelMA+Irgacure fotoreticuladas e não fotoreticuladas. ....	34
<b>Tabela 4.4</b> – Temperatura de degradação inicial e final, perda de massa e temperatura de degradação da derivada de TGA para: Gelatina e GelMA. ....	36
<b>Tabela 4.5</b> – Temperatura de degradação inicial e final, perda de massa e temperatura de degradação da derivada de TGA para: PCL/GelMA, PCL/GelMA+Irgacure, PCL/GelMA UV e PCL/GelMA+Irgacure UV. ....	37
<b>Tabela 4.6</b> – Valores conseguidos para o diâmetro médio das fibras, e respetivo desvio padrão, respeitantes às matrizes de PCL/GelMA UV e PCL/GelMA+Irgacure UV. ....	40



# NOMENCLATURA

<b>AA</b>	Ácido acético
<b>AINE</b>	Anti-inflamatório não esteroide
<b>ECM</b>	Matriz extracelular
<b>FDA</b>	<i>Food and Drug Administration</i>
<b>FR-DTGS</b>	<i>Fast Recovery Deuterated Triglycine Sulfate</i>
<b>ATR-FTIR</b>	Espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier com reflexão total atenuada
<b>GBR</b>	Regeneração óssea guiada
<b>GeIMA</b>	Gelatina metacrilamida
<b>GTR</b>	Regeneração tecidual guiada
<b>IPN</b>	Instituto Pedro Nunes
<b>MAA</b>	Anidrido metacrílico
<b>MTS</b>	<i>3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium</i>
<b><sup>1</sup>H RMN</b>	Ressonância magnética nuclear de próton
<b>PBS</b>	<i>Phosphate Buffer Solution</i>
<b>PCL</b>	Poli (ε-caprolactona)
<b>SEM</b>	Microscopia eletrônica de varrimento
<b>TA</b>	<i>Thermal Analysis</i>
<b>T<sub>d</sub></b>	Temperatura de degradação
<b>TFE</b>	2,2,2-Trifluoroetanol
<b>TGA</b>	Análise termogravimétrica
<b>UBI</b>	Universidade da Beira Interior
<b>UV</b>	Radiação ultravioleta



## OBJETIVOS E ESTRUTURA DA TESE

A terapia de implantes dentários para recuperação da dentição é muito popular na medicina dentária moderna. Para que a aplicação do implante seja bem sucedida tem que se garantir que existe tecido ósseo suficiente para o suportar. Surge assim a necessidade de criar uma estratégia para que ocorra a regeneração do tecido ósseo, sem que as células do tecido mole invadam o processo.

Para isto são usadas membranas de regeneração óssea guiada cuja função principal é a de ser capaz de criar uma barreira entre as células ósseas e as células epiteliais. Uma vez que estas interagem diretamente com o organismo, para a produção das mesmas, há que escolher a técnica e os biomateriais apropriados garantindo que as membranas possuam boa estabilidade mecânica e que seja biocompatível. De modo a atingir estas propriedades, os materiais a usar são os polímeros biodegradáveis de origem natural e sintética. Os polímeros de origem natural, como a gelatina, têm muito boas propriedades de biocompatibilidade, o que evita a toxicidade e reações imunológicas. Os polímeros sintéticos, como a policaprolactona (PCL), confere à membrana boas propriedades estruturais e mecânicas.

As membranas de regeneração óssea guiada são produzidas a partir de uma técnica designada por *electrospinning*. Este é um método que tem como objetivo criar matrizes fibrosas a partir de soluções poliméricas. O processo de fotoreticulação é um procedimento que traz vantagens quando comparado com outros métodos. Este é aplicado nas membranas de modo a que tenham melhor estabilidade mecânica, e outras propriedades.

Deste modo, o trabalho desenvolvido tem como objetivo produzir membranas a partir de polímeros de origem natural e sintética (gelatina e PCL, respetivamente) utilizando a técnica de *electrospinning* seguido de fotoreticulação, para serem aplicadas como membranas de regeneração óssea guiada.

O trabalho desenvolvido está organizado em cinco capítulos, divididos por subcapítulos. No **Capítulo 1**, encontra-se o enquadramento teórico do tema, onde são abordados o conceito de biomateriais e engenharia de tecidos, mais concretamente para aplicação de membranas de regeneração óssea guiada e também trata um pouco das características do fármaco que se incorporou nas mesmas. Neste capítulo são também mencionados os polímeros biodegradáveis dando ênfase aos materiais usados no desenvolvimento deste trabalho, a gelatina (polímero natural) e a PCL (polímero sintético). É também descrita a técnica que foi usada para produzir

as fibras, o *electrospinning*, e os seus respetivos parâmetros. E por fim, uma breve descrição de cada método usado para caracterizar as membranas produzidas.

No **Capítulo 2** é feita uma descrição detalhada do trabalho experimental desenvolvido, explicando todo o processo para a produção das membranas usando duas metodologias, fotoreticulação mergulhando as membranas numa solução aquosa de Irgacure e incorporar o Irgacure na solução de GelMA antes de produzir as matrizes fibrosas.

No **Capítulo 3** são apresentados os materiais, usados ao longo do trabalho, e respetivos fornecedores. Segue-se a descrição da modificação da gelatina com anidrido metacrílico, o procedimento adotado para preparar as soluções para a produção das membranas e como foi realizada a fotoreticulação de cada uma delas. De seguida são mencionados todos os equipamentos usados na caracterização das matrizes. A libertação controlada de fármaco é descrita, posteriormente, assim como a biocompatibilidade.

No **Capítulo 4** são apresentados e discutidos todos os resultados obtidos no desenvolvimento deste trabalho.

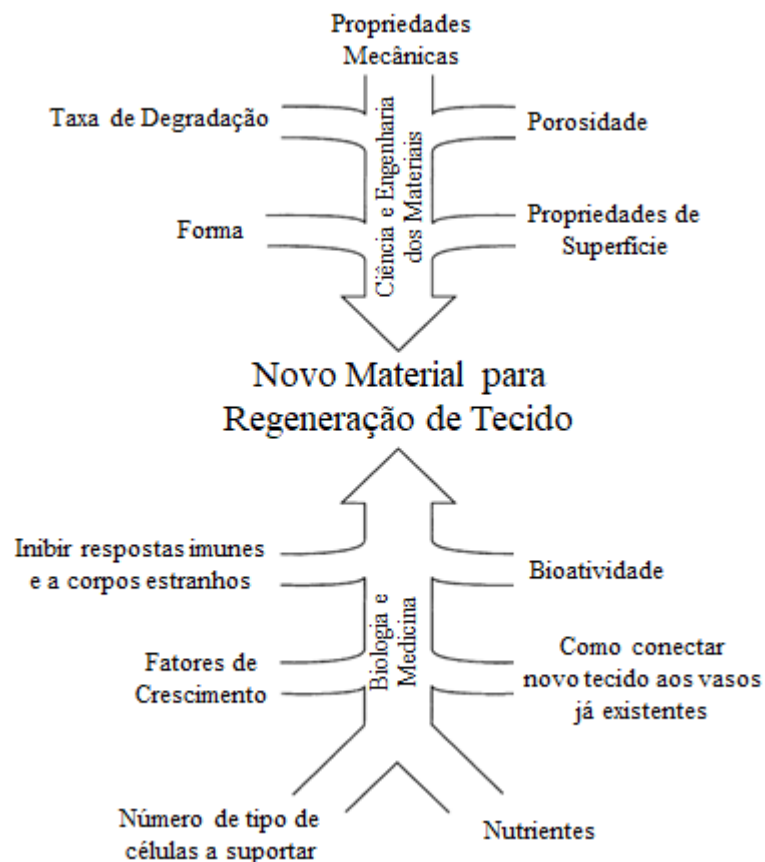
No **Capítulo 5** apresentam-se as conclusões gerais, tendo em conta todo o trabalho experimental realizado. E por fim uma perspetiva de trabalho a realizar no futuro.

# I. INTRODUÇÃO

## I.1. Biomateriais e engenharia de tecidos

Não existe uma definição específica para o biomaterial, mas pode dizer-se que é um material usado em dispositivos médicos, com o intuito de interagir com sistemas biológicos. Pode também ser definido como um qualquer material que tenha a capacidade de substituir uma parte ou função do corpo de forma segura (Tian et al., 2011).

O âmbito dos biomateriais resulta da combinação das áreas das ciências da vida, medicina, ciências dos materiais e engenharia. As investigações realizadas entre as diversas áreas, garante que o material seja o mais adequado possível, conforme a aplicação que se pretende. Existem materiais com características semelhantes que se comportam de maneiras diferentes em diversas situações, daí a escolha do material ser crucial. A **Figura 1.1** ilustra alguns dos fatores que devem ser considerados no *design* de um novo biomaterial (Seal et al., 2001).



**Figura 1.1** – Fatores a considerar no *design* de um biomaterial (Adaptado de Seal et al., 2001).

Um biomaterial deve possuir algumas propriedades, como o facto de não ser tóxico, a não ser que seja especificamente desenhado para esse fim; ser biocompatível, o que difere de aplicação para aplicação; não ser carcinogénico nem alergénico; ter propriedades mecânicas de performance, que se referem à força e flexibilidade do material; ter propriedades de durabilidade, duração que este irá ter; e ter propriedades físicas adequadas à aplicação que se deseja (Ratner et al., 2004).

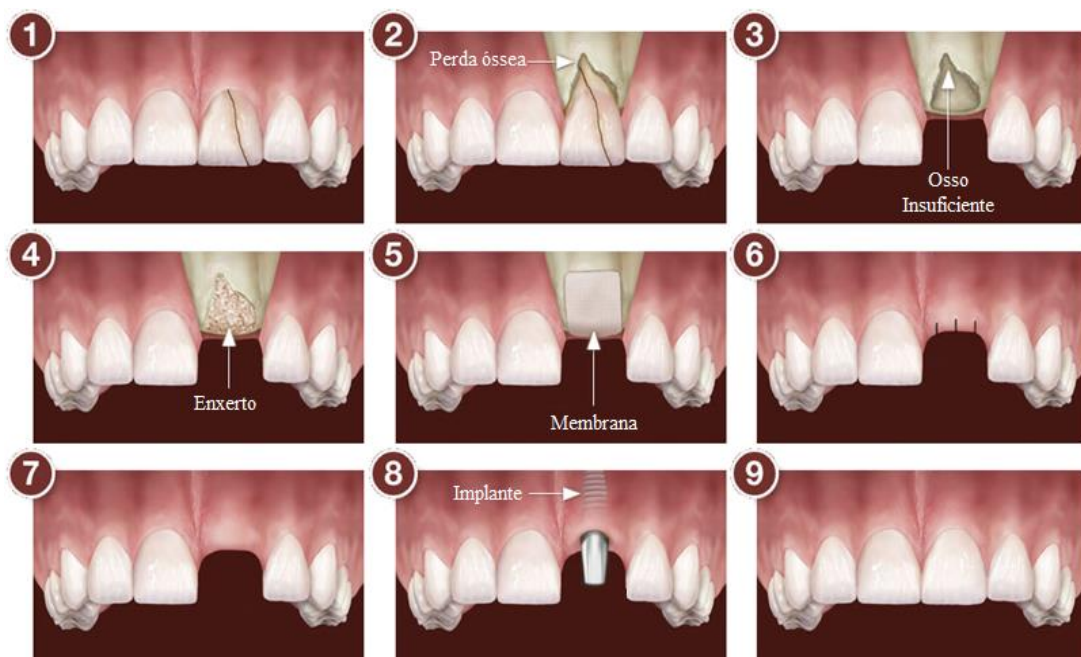
Os biomateriais classificam-se em 4 categorias diferentes: poliméricos, metálicos, cerâmicos e compósitos. Os biomateriais poliméricos podem ser constituídos por polímeros naturais ou sintéticos. Estes têm a vantagem de serem fáceis de produzir e têm baixa densidade, mas por outro lado têm baixa força mecânica e podem degradar-se com o tempo. Os cerâmicos têm boa compatibilidade e são resistentes à corrosão, no entanto são difíceis de produzir e têm elevada densidade. Os biomateriais metálicos têm elevada força de tensão e são resistentes, mas têm baixa biocompatibilidade e, em meio fisiológico, estão suscetíveis à corrosão. Os biomateriais compósitos são constituídos por dois ou mais materiais, a fim de combinar as melhores características para a aplicação alvo. Estes são difíceis de produzir, mas têm a vantagem de serem biocompatíveis e resistentes à corrosão (Parida et al., 2012).

A Engenharia de Tecidos é uma ciência que aplica os princípios da engenharia e da biologia e desenvolve alternativas funcionais para regeneração, manutenção ou substituição da perda ou dano de tecidos como a pele, músculo, ossos, cartilagem, vasos sanguíneos, entre outros. O desenvolvimento de biomateriais capazes de suportar a adesão, proliferação e diferenciação celular constitui uma vertente fundamental da engenharia de tecidos.

## 1.2. Membranas para regeneração óssea guiada

A regeneração tecidual guiada (GTR) foi introduzida na regeneração de tecido periodontal, para evitar que o tecido gengival e epitelial invadisse o defeito ósseo periodontal. Este tratamento consiste em detetar o defeito ósseo, de seguida extrai-se o dente e introduz-se o enxerto do osso, coloca-se a membrana por cima do sítio lesado e sutura-se a região. Quando o tecido ósseo regenera o implante é aplicado para depois se encaixar a coroa do dente (**Figura 1.2**).





**Figura 1.2** – Aplicação de uma membrana para regeneração óssea guiada (Adaptado de Oral Surgery & Dental Implant Center of Louisiana).

Esta técnica foi designada como regeneração óssea guiada (GBR), que serve tanto para reparar o osso defeituoso devido a lesões patogênicas, como para aumentar o osso para implantes. As membranas produzidas para este fim funcionam como barreiras, para prevenir que o tecido epitelial, ou outros, migrem para a área óssea defeituosa e permite, também, que haja tempo suficiente para regenerar o osso e o ligamento periodontal (Wang et al., 2016).

Para aplicação destas membranas deve-se ter em conta qual o tipo de materiais a usar para GBR, sendo que, para a escolha dos mesmos, é necessário ter em atenção o tipo de osso ou mistura de osso, o tipo de membrana e o uso de fatores de crescimento. Ainda deverá exibir outras propriedades, como fácil manuseamento, capacidade de criação de espaço e biocompatibilidade, de forma a prevenir a possível migração das células do epitélio. Para além disso, as reações teciduais, resultantes da reabsorção da membrana, devem ser mínimas, reversíveis e não devem prejudicar a regeneração dos tecidos desejados (Ghaly et al., 2013; Wang et al., 2016).

Estas membranas apresentam variadas aplicações na área da medicina dentária, como é o caso da cirurgia para aumento do osso, para extração do terceiro molar incluso, em cirurgia periodontal, no tratamento para perda óssea peri-implantar, entre outras. No entanto, no âmbito de uso clínico, estas membranas apresentam um elevado custo (Lee & Kim, 2014).

Recorre-se a procedimentos de regeneração periodontal para restaurar estruturas de suporte periodontal danificadas, por doenças ou trauma, e para que estes danos possam ser evitados e minimizados.

As membranas para regeneração de tecidos guiada são componentes básicos da engenharia de tecidos e têm como objetivo principal a criação de uma barreira, para evitar a migração das células gengivais e epiteliais para a área afetada que se pretende regenerar. Estes são usadas como modelos temporários para regeneração de tecido ósseo, sendo que devem possibilitar a difusão de nutrientes e oxigénio às células, fornecendo assim um ambiente mecânico e biológico apropriado para a regeneração adequada do tecido (Villar & Cochran., 2010).

No *design* de uma membrana, devem ter-se em conta as seguintes considerações (O'Brien, 2011):

- Serem biocompatíveis, não deve apresentar uma resposta inflamatória, pois podendo o corpo rejeitar a membrana poderá diminuir o processo de regeneração;
- Biodegradáveis, como não são permanentes, devem permitir que as células regenerem o tecido, ao longo do tempo. Os subprodutos, da degradação desta não devem apresentar toxicidade e têm que ser capazes de sair do corpo sem interferir com outros órgãos;
- A membrana deve apresentar propriedades mecânicas específicas. A sua força e espessura devem ser suficientes para resistir às tensões e manuseamento, durante a implantação. Deve também apresentar acabamento superficial adequado, de forma a garantir um bom acoplamento biomecânico, entre a membrana e o tecido;
- A arquitetura deste tipo de membrana é também importante, pois a sua estrutura porosa deve garantir a fixação das células epiteliais, de forma a que não invadam o tecido a ser regenerado e difusão dos nutrientes às mesmas.

As membranas devem apresentar uma macro e microestrutura apropriadas, como também ter uma estrutura de poros altamente interligada e elevada área superficial, para permitir que as células se consigam fixar, evitando assim que o tecido, a ser regenerado, seja invadido por células indesejáveis (O'Brien, 2011).

Para além das considerações a ter em conta no *design* de uma membrana, é também necessário que a escolha do biomaterial e técnica de produção do mesmo, seja adequada à aplicação que se pretende. O biomaterial a usar na síntese de membranas deve cumprir todos os requisitos mencionados acima. Os polímeros naturais são usados com muita frequência, bem como os sintéticos, mas, uma vez que sozinhos não reúnem todas as características requeridas, tem-se vindo a usar, cada vez mais, membranas com materiais compósitos. Estes apresentam vantagens, pois combinam as melhores propriedades dos dois polímeros, de modo a permitir a produção de materiais com maior força mecânica e interação biológica. A técnica é também importante, pois para se conseguir criar tecidos funcionais, as membranas têm de ser bem projetadas para facilitar a distribuição celular e regeneração de tecidos (Correia et al., 2016; Ma, 2004).

A fim de produzir este tipo de membranas recorreu-se, neste trabalho, a uma tecnologia que se designa como *electrospinning* (explicado mais à frente com maior detalhe). Esta técnica permite produzir membranas de base polimérica com determinadas propriedades, tais como, terem uma estrutura tridimensional reticulada, elevada área superficial e porosidade, e o facto de mimetizar a matriz extracelular. As membranas assim produzidas têm inúmeras aplicações biomédicas, como é o caso dos sistemas de libertação de fármaco, a regeneração guiada, entre outras (Ke et al., 2017).

Xue et al. (2014), desenvolveram e estudaram membranas para regeneração óssea guiada com libertação de fármaco, a fim de prevenir o desenvolvimento de infeções aquando da aplicação das mesmas. As membranas foram preparadas misturando PCL, gelatina e metronidazol aplicando de seguida a técnica de *electrospinning*. Os resultados obtidos indicaram que estas membranas mostravam potencial para serem aplicadas em regeneração óssea guiada uma vez que demonstraram boas propriedades mecânicas, e uma taxa de biodegradação e função de barreira apropriadas. Foi também realizado um controlo da libertação do metronidazol onde se verificou que este prevenia a colonização de bactérias anaeróbias.

Também He e colaboradores (He et al., 2015), estudaram membranas de regeneração óssea guiada com os mesmos materiais que os autores anteriores, mas aqui a técnica usada foi a de *electrospinning* coaxial. A PCL foi preparada numa solução com o metronidazol, sendo esta a solução do núcleo, e a gelatina como revestimento. Estes compararam os seus resultados com trabalhos anteriormente desenvolvidos, onde utilizaram *electrospinning* por *blending*,

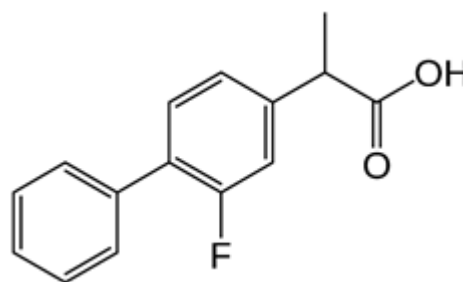
concluindo que com as fibras coaxiais houve uma melhoria na hidrofiliabilidade das membranas, o que resulta numa melhor adesão e proliferação das células sem que estas exibam toxicidade.

A vantagem que advém da incorporação de fármacos nas membranas de regeneração óssea guiada é que estas, quando aplicadas no paciente, apresentam alguns problemas, como é o caso da inflamação, uma das patologias que surge após este tipo de intervenção. A incorporação de fármacos nas fibras tem sido uma proposta, de modo a combater as infeções e inflamações que se desenvolvem durante o período de regeneração do tecido ósseo (Caramella et al., 2015; Xue et al., 2015).

### 1.3. Flurbiprofeno

Nesta aplicação o tipo de fármacos mais usados são os anti-inflamatórios e os antibióticos e são vários os estudos desenvolvidos para a incorporação dos mesmos. Huang e colaboradores (Huang et al., 2016) incorporaram nas suas membranas ácido hialurónico, um biopolímero com efeitos antibacterianos e anti-inflamatórios, para o tratamento da periodontite, que se trata de uma doença infecciosa. Outros autores (Park et al., 2000; e Xue et al., 2015) usaram tetraciclina e metronidazol, respetivamente, como antibiótico para o mesmo fim, e Kanungo et al. (2015) e Chung et al. (1997) aplicaram nas membranas, para regeneração óssea guiada, anti-inflamatórios como a quercetina e flurbiprofeno, respetivamente. Este último, foi o fármaco usado para o desenvolvimento deste trabalho tendo o objetivo de amenizar as inflamações que advêm da regeneração óssea.

Neste caso, o fármaco usado foi o Flurbiprofeno (**Figura 1.3**) que é um anti-inflamatório não esteroide (AINE), derivado do ácido propiónico. Como tal, apresenta propriedades analgésicas, antipiréticas e anti-inflamatórias. Este fármaco atua por inibição da enzima ciclo-oxigenase na cascata do ácido araquidónico. A sua inibição conduz à redução da síntese de compostos pró-inflamatórios, como as prostaglandinas (mediadores químicos de inflamação). Desta forma, ocorre uma diminuição da resposta inflamatória do organismo e, conseqüentemente, redução da dor (Maroof et al., 2015).



**Figura 1.3** – Estrutura molecular do Flurbiprofeno (Maroof et al., 2015).

## 1.4. Polímeros biodegradáveis

### 1.4.1. Polímeros naturais

Os polímeros naturais foram os primeiros a ser usados em diversas aplicações, como as áreas farmacêutica e a biomédica. Estes materiais têm propriedades bioativas que lhes conferem melhores interações com as células, ajudando na integração e cicatrização do tecido. Para além de serem de baixo custo e fáceis de processar, existem outras motivações associadas à sua utilização, como o facto de interagirem melhor com as células, quando comparado com os polímeros sintéticos, devido às suas propriedades serem semelhantes com os componentes da matriz extracelular (ECM), serem biocompatíveis e conseguem evitar a toxicidade e reações imunológicas, que são, normalmente, detetadas pelos polímeros sintéticos. No entanto, por vezes podem desencadear respostas imunes, degradar-se a temperaturas inferiores ao seu ponto de fusão, o que limita a sua utilização na produção de implantes (Dias, 2014; Kim et al., 2017).

Devido às suas propriedades, estes polímeros são normalmente combinados com os polímeros sintéticos de forma a criar materiais compósitos conjugando as melhores propriedades de cada material para diferentes tipos de aplicação.

#### 1.4.1.1 Gelatina

A gelatina é um polímero natural obtida a partir de hidrólises parciais do colagénio. É um material translúcido, quebradiço (quando seco), não tóxico e é normalmente obtido a partir da pele ou ossos, de origem bovina ou suína. Para produzir a gelatina é necessário passar por 3 etapas básicas principais (Kim et al., 2017; Kosmala et al., 2016):

- Pré-tratamento para remoção de impurezas, que podem afetar as propriedades físico-químicas do produto final;
- Extração, para hidrolisar o colagénio;
- E por fim, para recuperar o produto final seco e homogeneizado, é necessário que este passe por vários processos de separação como: a filtração, clarificação, evaporação, esterilização, secagem, moagem e peneiração.

A gelatina tem sido muito usada nas áreas farmacêutica e medicina devido à sua origem biológica, semelhante ao colagénio, que promove a adesão, diferenciação e proliferação celular. É um material que, quando combinado com polímeros sintéticos, aumenta o crescimento celular. Para além disso, a razão para a qual a gelatina é tão usada deve-se à sua

biocompatibilidade, biodegradabilidade, à presença de grupos funcionais (grupos carboxílicos) e não exibe antigenicidade (formação de anticorpos como defesa a um organismo estranho). É também um hemostático, sendo aplicado em feridas para parar o sangramento, ativando a coagulação do sangue. No entanto, dissolve a temperaturas acima dos 37 °C (Kosmala et al., 2016).

Para superar algumas das suas limitações, a solução é produzir um novo biomaterial, em que se combina a gelatina com outros polímeros sintéticos, de modo a manter a sua estrutura e melhorar as suas propriedades, mecânicas, físicas, químicas e biológicas (Aravamudhan et al., 2014; Chong et al., 2007).

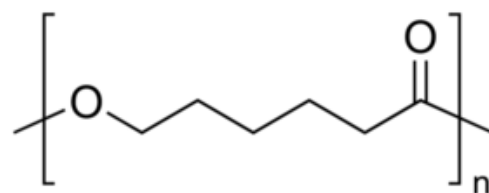
## 1.4.2. Polímeros sintéticos

Os polímeros sintéticos são aplicados em várias áreas como a medicina e a biomédica, como em sistemas de libertação de fármacos, *stents* vasculares, terapia ortodôntica, entre outros, devido às suas propriedades químicas e físicas. Estes podem ser manipulados de forma a conseguir combinar as melhores propriedades para uma determinada aplicação, através de reações de polimerização e formação de copolímeros, com vários componentes a diferentes concentrações. Os polímeros sintéticos são usados, principalmente, para conferir à membrana boas propriedades estruturais e mecânicas. (Maitz, 2015).

Os polímeros sintéticos surgiram também, como forma de combater alguns problemas que advêm dos polímeros de origem biológica. Embora a maioria dos polímeros de origem natural apresentem boa biocompatibilidade, alguns podem desencadear respostas imunes, o que pode ser colmatado usando polímeros de origem sintética. Sintetizando adequadamente um polímero, consegue-se obter uma variedade de propriedades desejáveis (Mikos et al., 2004; Tian et al., 2011).

### 1.4.2.1 Poli ( $\epsilon$ -caprolactona) (PCL)

A PCL (**Figura 1.4**) é um poliéster sintético hidrofóbico e semi-cristalino, sendo que a sua cristalinidade diminui com o aumento do seu peso molecular. Este polímero é muito usado devido às suas distintas propriedades físicas, térmicas e mecânicas. Estas propriedades dependem do peso molecular e grau de cristalinidade da PCL (Baker et al., 2015).



**Figura 1.4** – Poli ( $\epsilon$ -caprolactona) (Kariduraganavar et al., 2014).

É um polímero com características interessantes por se conseguir controlar a sua degradação, por ser miscível com outros polímeros e poder ser sintetizado a partir de monómeros derivados de fontes renováveis. Quando em meio fisiológico, a PCL degrada-se devido às hidrólises que ocorrem nas ligações éster, resultando numa perda de massa. Este polímero foi aprovado pela *Food and Drug Administration* (FDA) em aplicações biomédicas em meados dos anos 70, em áreas como a engenharia de tecidos, em membranas de regeneração óssea guiada, e em sistemas de libertação de fármacos. A sua vasta aplicação deve-se ao facto de este ser um polímero bastante versátil, com propriedades que podem ser ajustadas consoante a aplicação que se pretende (Kariduraganavar et al., 2014; Labet & Thielemans, 2009).

## 1.5. *Electrospinning*

O *electrospinning* é uma tecnologia que tem como objetivo produzir fibras a partir de soluções poliméricas, de origem natural ou sintética, usando forças electroestáticas, com capacidade de criar novas estruturas porosas. Esta técnica apresenta diversas vantagens, como a produção de membranas com elevada área de superfície, a capacidade de controlo do diâmetro das fibras (que podem ter diâmetros desde algumas centenas de nanómetros até alguns micrómetros) e, ainda, a facilidade de as funcionalizar e diferenciar e as suas propriedades mecânicas (Bhardwaj & Kundu, 2010).

As fibras assim produzidas podem ser aplicadas em diversas áreas, como em biotecnologia, farmacêutica, na biomédica, membranas em engenharia de tecidos, entre outras (Agarwal et al., 2008). A aplicação destas fibras em engenharia de tecidos envolve algumas considerações, como o conhecimento de qual a sua aplicação (tecido vascular, ósseo, ligamentos, etc.) e, por conseguinte, a escolha do material mais adequado para este fim, podendo combinar as melhores propriedades mecânicas e biomiméticas de cada material (Sill & von Recum, 2008).

Para tirar a maior vantagem dos materiais existentes, são usados polímeros naturais que, na sua maioria, são capazes de mimetizar a ECM, devido à presença de proteínas e polissacarídeos dos componentes nela presentes. No entanto, demonstram fracas propriedades mecânicas, ao contrário dos polímeros sintéticos que exibem boas propriedades mecânicas, porém fraca adesão celular (Hamlekhan et al., 2011).

O *electrospinning* pode ter duas configurações possíveis, a horizontal e a vertical. Neste trabalho foi usada a configuração horizontal em que a montagem experimental consiste, basicamente, em 3 componentes: uma fonte de energia de alta voltagem, um *spinneret* e um

prato coletor ligado à terra (Figura 1.5). É necessário também que haja uma bomba, com controlo de caudal, para injetar a solução da seringa (Hu et al., 2014).

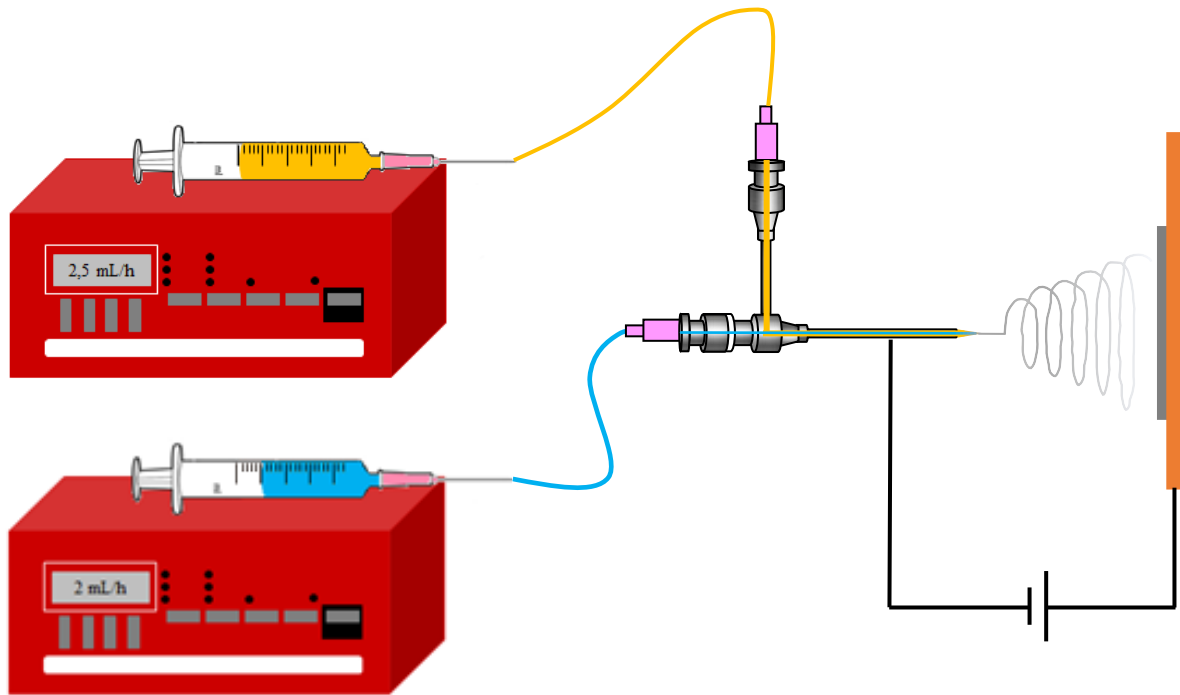


Figura 1.5 – Apresentação esquemática da montagem experimental.

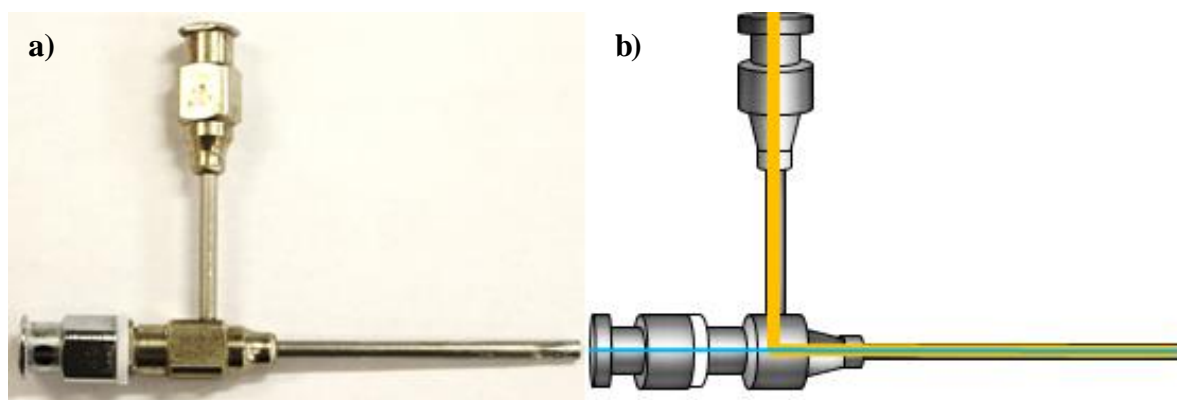
Antes de se dar início ao *electrospinning*, o polímero é dissolvido no solvente formando-se a solução polimérica desejada, que vai ser colocada na seringa. De seguida, a bomba impulsiona a solução até à extremidade de um tubo capilar, ligado a uma agulha, onde a superfície do líquido vai ser sujeita a um campo elétrico (entre a ponta da agulha e o coletor). Quando este atinge o valor crítico, as forças elétricas repulsivas vencem as forças de tensão superficial e a gota toma a forma de um cone, o chamado cone de Taylor. Por fim, este é alongado adquirindo a forma de um ‘fio’ instável até ao coletor onde o solvente evapora deixando apenas as fibras do polímero (Bhardwaj & Kundu, 2010).

### 1.5.1. Parâmetros do *electrospinning*

Como já referido anteriormente, o *electrospinning* é um método usado para produzir nanofibras a partir de soluções poliméricas, aplicando um campo elétrico. No *electrospinning* coaxial, são usados dois *spinnerets* concêntricos, com diâmetros diferentes, ligados a duas seringas distintas, cada uma ligada a uma bomba. Os *spinnerets*, de dentro e de fora, são alimentados por duas soluções poliméricas. Este método é idêntico ao *electrospinning* simples com apenas um *spinneret*, uma vez que também lhe é aplicado um campo elétrico. Com o *electrospinning* coaxial formam-se fibras com uma estrutura do tipo núcleo-revestimento (*core-*



*sheath*), sendo que a solução polimérica que alimenta o *spinneret* interior dá origem ao núcleo da fibra e a solução que alimenta o *spinneret* exterior origina o revestimento da mesma, como apresentada na **Figura 1.6**.



**Figura 1.6** – a) Fotografia do *spinneret* usado e b) apresentação esquemática do funcionamento do mesmo.

Na realização desta técnica é necessário ter em conta alguns parâmetros como os ambientais, da solução e de operação (Hu et al., 2014).

A viscosidade, o solvente usado e a condutividade são os três parâmetros mais importantes a ter em conta aquando da preparação da solução dos materiais.

A **viscosidade**, que pode ser controlada diminuindo a temperatura de operação, usando um polímero de maior peso molecular ou aumentando a concentração do polímero na solução. Isto é importante pois a viscosidade, para a solução do revestimento, tem que ser suficientemente elevada para poder superar a tensão interfacial da solução do núcleo para assim a primeira solução conseguir ‘arrastar’ a segunda, formando um cone de Taylor estável. É também necessário que a solução do núcleo tenha uma viscosidade mínima para que o jato do fluido possa estabilizar e não quebre (Lu et al., 2016). Zhang (Zhang et al., 2004) investigou a influência da concentração do polímero, onde conclui que, com uma elevada concentração, tanto no núcleo como no revestimento, se produzem nanofibras coaxiais de maior diâmetro.

Para este ponto é necessário também ter atenção a escolha do **solvente**. Segundo Yu (Yu et al., 2004), para desenvolver fibras coaxiais uniformes, pode usar-se o mesmo solvente para as duas soluções, o que vai fazer com que a tensão interfacial, entre os fluidos, diminua. Para a libertação controlada de fármacos, normalmente, usa-se um solvente mais volátil para que se produzam nanofibras porosas.

A **condutividade** das soluções é também um parâmetro importante. No que toca à solução de revestimento, devido à sua instabilidade de flexão e força eletrostática, esta deverá ser condutiva. Em relação à solução do núcleo, esta tem de ser não condutora, pois caso a sua condutividade seja maior, que a do revestimento, pode haver quebra do jato devido à força de tração entre as soluções.

Dentro dos parâmetros de operação existem 3 parâmetros importantes: a distância entre a agulha e o coletor; o caudal da solução do núcleo e da solução do revestimento; e a voltagem aplicada.

A **distância entre a ponta da agulha e o coletor** está diretamente relacionada com o tempo que o jato das soluções demora a chegar ao coletor e da força do campo elétrico. Se esta distância for muito curta, o solvente não vai ter tempo para evaporar. É então necessário aumentá-la, para que as fibras sejam alongadas e que o solvente tenha tempo de evaporar. Se a distância for muito elevada as fibras formadas podem conter gotas, o que não é desejável.

Outro parâmetro é o **caudal** que determina a quantidade de solução que se vai injetar. Se o caudal for demasiado pequeno pode haver quebra das fibras, se for elevado pode ocorrer formação de gotas na ponta da agulha. Por isto, deve estimar-se um caudal ideal para que as fibras se possam formar de forma homogénea, sem que se formem coágulos.

A **voltagem** que se aplica é também importante, uma vez que se for demasiado baixa, a gravidade vai ser favorecida, sendo que vão formar-se gotas e, conseqüentemente, estas irão cair da ponta da agulha. Tal acontece quando não existe um campo elétrico suficientemente forte para que as fibras se consigam formar. A fim de resolver este problema, aumenta-se a voltagem para que o cone de Taylor se consiga manter estável para que se formem fibras de forma contínua. Uma voltagem mais elevada vai levar a que o fluido seja ‘puxado’ com demasiada força de dentro do capilar podendo formar coágulos neste (Lu et al., 2016).

## 1.6. Caracterização das membranas

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

A espectroscopia ATR-FTIR é um método de análise, não destrutivo, onde se faz incidir um feixe de radiação infravermelho numa amostra, que o vai absorver. Esta técnica tem como objetivo a identificação dos grupos funcionais presentes no material, que são reconhecidos

através dos diferentes comprimentos de onda que lhes correspondem, obtendo-se assim o espectro do composto químico (Lim et al., 2010).

### 1.6.2. Espectroscopia de ressonância magnética nuclear de próton ( $^1\text{H}$ RMN)

A espectroscopia de ressonância magnética nuclear de próton ( $^1\text{H}$  RMN) é uma técnica usada para determinar a estrutura química de substâncias que contêm hidrogénio. É aplicado um campo magnético sob a amostra fazendo com que os *spins* nucleares se alinhem a favor ou contra o campo. Quando os *spins* nucleares se orientam a favor do campo magnético, estão no estado de *spin  $\alpha$*  de menor energia, quando estão contra significa que estão no estado de *spin  $\beta$*  de maior energia. Quanto maior é a força do campo magnético aplicado, maior a diferença de energia entre os *spins  $\alpha$*  e  *$\beta$* . O espectrómetro deteta essas diferenças e regista-as como forma de um gráfico de frequência do sinal vs intensidade. Neste trabalho esta técnica foi utilizada para detetar a modificação química a que a gelatina foi sujeita (Bruice, 2007).

### 1.6.3. Ângulos de contacto dinâmicos

Para medir os ângulos de contacto dinâmicos, a amostra é colocada num prato e usando uma seringa, com o solvente (neste caso, a água destilada). Deixa-se cair uma gota sobre a superfície desta gravando-se todo o processo, desde a queda da gota ao seu espalhamento (Konduru, 2010). Esta técnica é usada para analisar a capacidade de molhabilidade de cada membrana para que se possam comparar as várias amostras, de modo a perceber quais apresentam maior hidrofiliabilidade.

### 1.6.4. Estudo da perda de massa

O estudo da perda de massa das membranas tem como objetivo avaliar, de forma indireta, a eficácia do processo de reticulação. Teoricamente quanto menos massa a membrana perder, mais eficaz é a reticulação. Estes testes foram feitos em membranas fotoreticuladas e não fotoreticuladas, servindo estas de controlo.

### 1.6.5. Análise termogravimétrica (TGA)

A Análise Termogravimétrica (TGA), é uma técnica que mede a perda de massa da amostra, sujeita a uma variação de temperatura até que o material se degrade. O resultado desta variação é um gráfico da massa vs temperatura, designado por termograma. Este dá a

informação em relação à estabilidade térmica e composição do material em estudo (Vyazovkin,2012).

### **I.6.6. Microscopia eletrónica de varrimento (SEM)**

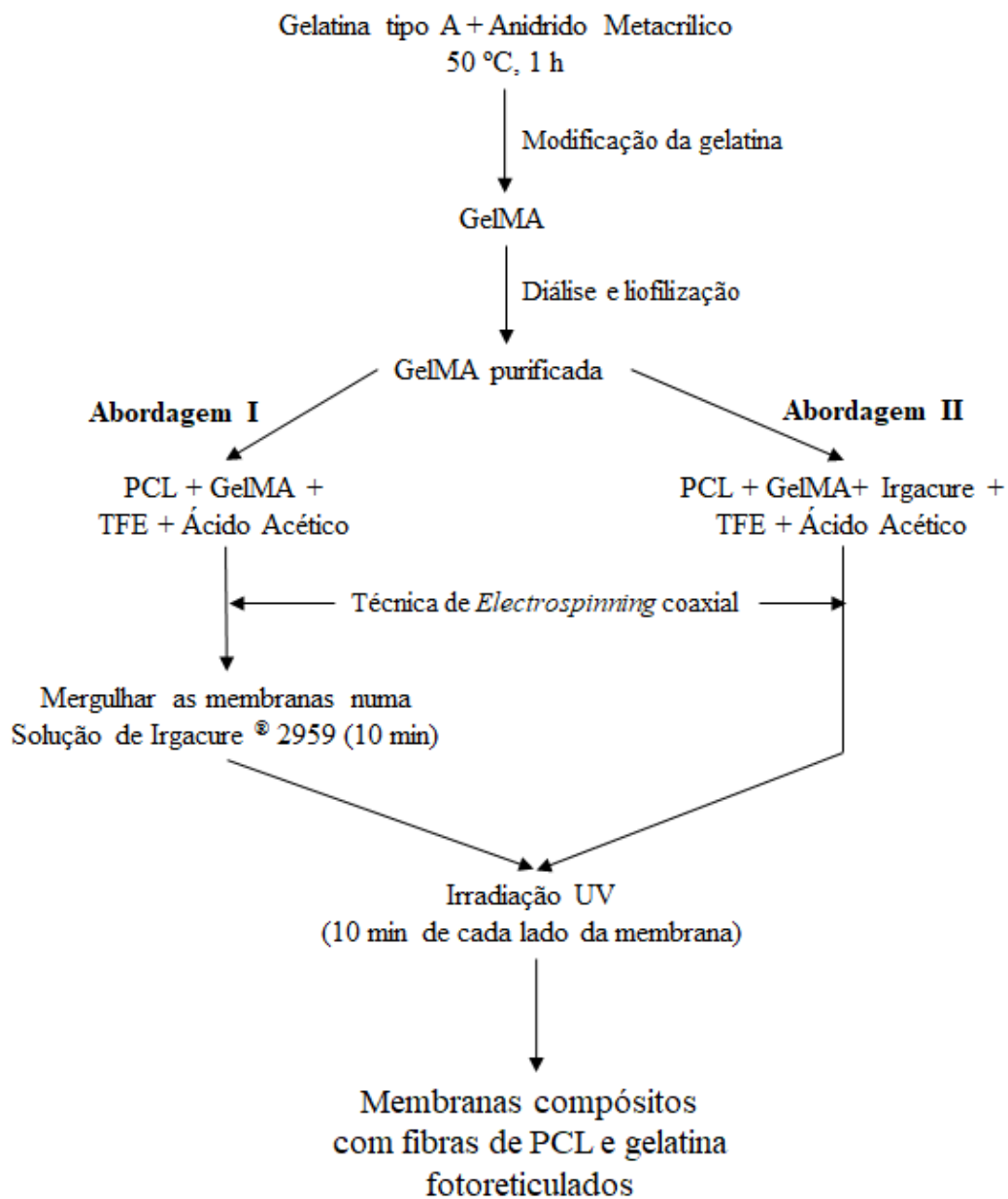
A técnica de microscopia eletrónica de varrimento possibilita observar a morfologia microscópica das amostras. Utiliza um feixe de eletrões, movido para a frente e para trás, que vai “varrer” a superfície da amostra, fazendo com que a superfície emita eletrões (eletrões secundários). Para que a amostra consiga emitir os eletrões, é necessário fazer um revestimento por vaporização de um metal pesado (por exemplo ouro), criando uma camada fina. À medida que a amostra é varrida, os eletrões secundários são atraídos e recolhidos pelo detetor, que vão ser traduzidos em sinais, originando assim uma imagem topográfica. É necessário também que a coluna seja mantida em vácuo, uma vez que os eletrões são facilmente defletidos pelas moléculas de gás (Figueiredo, 2013).

### **I.6.7. Biocompatibilidade**

Uma das diferenças entre um biomaterial e outro material prende-se com a sua capacidade de poder ser aplicado em tecidos do corpo humano, sem que este cause quaisquer danos. Para tal, o biomaterial deverá ser biocompatível, ou seja, o material deve ter capacidade para executar, numa situação específica, uma resposta adequada no hospedeiro (Williams, 2008).

## 2. OBJETIVOS EXPERIMENTAIS

Este trabalho tem como principal objetivo produzir membranas de PCL/Gelatina a partir da técnica de *electrospinning* coaxial e estudar abordagens diferentes de reticulação. Após a produção das membranas, foi feita a reticulação onde, na primeira abordagem, a membrana é mergulhada numa solução de Irgacure<sup>®</sup> 2959 e só depois irradiada com luz UV. Na segunda abordagem, o Irgacure<sup>®</sup> 2959 é colocado na solução de gelatina, antes do *electrospinning*, e, só depois da matriz produzida, se irradia com luz UV. O esquema do processo experimental efetuado encontra-se na **Figura 2.1**.



**Figura 2.1** – Esquema do processo experimental da produção de membranas de PCL/GelMA a partir da técnica de *electrospinning* coaxial e diferentes formas de reticulação.

Depois de produzidas as fibras, são caracterizadas de acordo com várias técnicas de caracterização, de modo a avaliar a sua capacidade como sistemas de regeneração tecidual. As técnicas usadas, já referidas acima no capítulo 1, são a espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier com reflexão total atenuada (ATR-FTIR), espectroscopia de ressonância magnética nuclear de próton ( $^1\text{H}$  RMN), determinação de ângulos de contacto dinâmicos, testes de perda de massa, análise termogravimétrica (TGA), microscopia eletrónica de varrimento (SEM), avaliação da sua libertação do fármaco e a sua biocompatibilidade.

## 2.1. Abordagem I

Nesta primeira abordagem, o objetivo é produzir fibras compósitas de PCL/GelMA a partir da técnica de *electrospinning* coaxial, onde as fibras têm uma estrutura do tipo *core-sheath*, com um núcleo de PCL e um revestimento de GelMA, que, no final, serão sujeitas ao processo de fotoreticulação.

Antes da preparação das soluções, foi feita a modificação da gelatina com MAA, com o propósito de incorporar, na sua estrutura, ligações duplas de carbono para ser possível a fotoreticulação do polímero. De seguida preparou-se cada uma das soluções, a fim de, posteriormente, se produzirem as membranas. Uma de PCL, que foi dissolvida em 2,2,2-Trifluoroetanol (TFE), e outra de GelMA, dissolvida também em TFE e Ácido Acético. Cada uma destas soluções foi sujeita a *electrospinning* coaxial, onde se obtiveram as fibras compósitas. Depois de produzidas as matrizes, estas foram mergulhadas, por um período de 10 minutos, numa solução de Irgacure<sup>®</sup> 2959 e, de seguida, foram irradiadas com luz UV durante 10 min de cada um dos lados da membrana. Este processo tem como intuito reticular a gelatina, através da polimerização radicalar, atacando as ligações duplas de carbono que se encontram na gelatina modificada.

## 2.2. Abordagem II

Esta abordagem é semelhante à anterior, sendo que a diferença incide no passo em que é adicionado o fotoiniciador, uma vez que este é incorporado na preparação da solução de GelMA, sendo posteriormente sujeita, em conjunto com a solução de PCL, ao *electrospinning* coaxial.

Quando as membranas estão prontas, em vez de serem mergulhadas numa solução de Irgacure<sup>®</sup> 2959, são colocadas num exsiccador com uma atmosfera húmida e, só depois, realizada a fotoreticulação com luz UV.

Nestas duas abordagens, ambas as matrizes foram fotoreticuladas. No entanto, tal foi concretizado por métodos distintos, a fim de compreender qual a forma mais vantajosa para as matrizes. Por fim, será incorporado o fármaco, flurbiprofeno, na solução de PCL numa proporção de 1% (m/m) em relação à massa inicial do polímero, e avaliar-se-á a sua possível aplicação como sistema de libertação de fármaco.





### 3. MATERIAIS E MÉTODOS

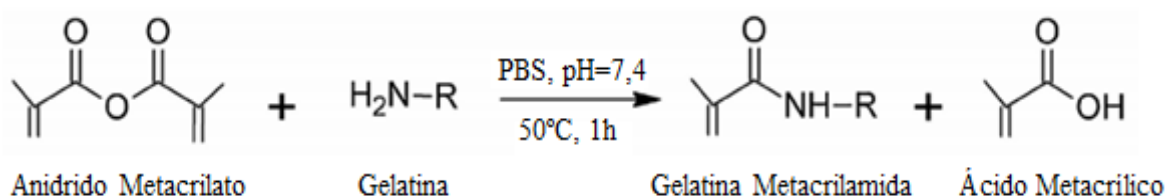
#### 3.1. Materiais

Na preparação das membranas foi usada gelatina de pele suína tipo A e policaprolactona (PCL), adquiridas pela *Sigma-Aldrich*. Para modificar a gelatina foi usado Anidrido Metacrílico (MAA) a 94% da *Alfa Aesar* e, como solvente, utilizou-se 2,2,2-Trifluoroetanol (TFE) da *Merck* e Ácido Acético Glacial (AA) da *VWR Chemicals*. Na solução de PBS, foram usados os sais dihidrogeno fosfato de potássio ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) da *Panreac*, hidrogeno fosfato disódico (dihidratado) ( $\text{Na}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ) da *Fluka*. O fotoiniciador, 2-hidroxi-1[4-(2-hidroxietoxi)fenil]-2-metil-1-propanona (Irgacure<sup>®</sup> 2959), foi fornecido pela *Ciba Specialty Chemicals Inc*. O fármaco, Flurbiprofeno, foi obtido da *Sigma-Aldrich*.

#### 3.2. Preparação das membranas

##### 3.2.1. Modificação da gelatina com anidrido metacrílico

Nesta fase, foi feita a modificação da gelatina, com o fim de introduzir ligações de duplas carbono para que o polímero possa ser reticulado. Para este efeito, foi usado anidrido metacrílico (MAA), em meio aquoso, que reage com a gelatina, como se mostra a reação da **Figura 3.1**.



**Figura 3.1** – Reação da funcionalização da Gelatina (Adaptado de Correia et al., 2016).

Para a funcionalização da gelatina tipo A, dissolveu-se 10 g de gelatina em 100 mL de uma solução tampão de PBS, colocada num banho de água termostaticado, a 50 °C, sob agitação, durante cerca de 20 min. Logo após, colocou-se 1 mL de MAA para a reação de funcionalização ocorrer, mantendo sob agitação durante 1h.

De seguida, a solução de GelMA, designação atribuída à gelatina depois de modificada, foi colocada em membranas de diálise (com um *cut-off* de, aproximadamente, 50 000 g/mol), para ser purificada. As membranas foram mantidas em água destilada, sob agitação, durante 4 dias, renovando a água 2 vezes por dia. Este processo remove as moléculas de menor peso

molecular, subprodutos da reação ou mesmo MAA não reagido. No último dia, retirou-se o produto das membranas e congelou-se para, posteriormente, ser liofilizado. O processo de liofilização decorreu durante 3 dias e foi usado para remover toda a água presente no produto.

### 3.2.2. Produção das membranas de PCL/GelMA por *electrospinning*

As matrizes foram preparadas com duas soluções de PCL/TFE (10% w/v) e GelMA/TFE (12% w/v), que foram usadas como soluções de núcleo (*core*) e de revestimento (*sheath*), respetivamente. As membranas foram produzidas com uma proporção fixa de 40:60 PCL/GelMA (w/w), com a mesma técnica de *electrospinning* coaxial diferenciando apenas na forma de reticulação de cada abordagem, como referido anteriormente.

Depois de efetuados tanto os cálculos das quantidades necessárias de cada polímero, solvente e caudal, bem como após realização de alguns ensaios, a fim de se saber qual a voltagem ótima para se fazer o *electrospinning*, procedeu-se à construção da **Tabela 3.1**. De seguida, prepararam-se as soluções de PCL e GelMA, pesando todos os materiais e solventes presentes nessa mesma tabela.

**Tabela 3.1** – Composição das soluções para o *electrospinning* coaxial.

Membrana	Core		Sheath		Caudal (mL/h)		Voltagem (kV)
	m (g)	V (mL)	m (g)	V (mL)	Core	Sheath	
PCL/GelMA	0,8 (PCL)	8 (TFE)	1,2 (GelMA)	8 (TFE)+ 2 (AA)	2	2,5	20
PCL/GelMA+ Irgacure	0,8 (PCL)	8 (TFE)	1,2 (GelMA) + 0,01 (Irgacure)	8 (TFE)+ 2 (AA)			

Na primeira abordagem, a PCL foi dissolvida em TFE, à temperatura ambiente e sob agitação controlada, bem como a gelatina. No entanto, esta última, para além de ser dissolvida em TFE, tem que ser adicionado também ácido acético. O mesmo acontece na segunda abordagem com a diferença de que, na solução de GelMA, se acrescenta o Irgacure® 2959. Depois de as soluções solubilizadas, procede-se ao *electrospinning* coaxial, como já descrito anteriormente, onde as fibras se vão formar criando, por conseguinte, a membrana.

### 3.2.3. Fotoreticulação das membranas de PCL/GelMA

Nesta etapa, o objetivo é reticular as membranas já produzidas. Na primeira abordagem, as matrizes são mergulhadas numa solução de 100 mL com 1%, de Irgacure® 2959 (em relação à massa de PCL), durante 10 min. Seguidamente, são expostas a uma luz UV, durante 20 min

(10 min de cada lado da membrana) e secas à temperatura ambiente sob vácuo, para garantir que todos os solventes evaporam.

Em relação à segunda abordagem, uma vez que as fibras de GelMA já contêm o Irgacure® 2959, não é necessário mergulhar as membranas na solução. Em vez disso, estas vão para um exsiccador com uma atmosfera húmida, durante 2 ou 3 dias, e, de seguida, é incidida a luz UV, também durante 20 min (10 min de cada lado da membrana, como na abordagem anterior). Posteriormente, são secas a vácuo e à temperatura ambiente, prontas para começar a caracterização.

### 3.3. Caracterização das membranas

Neste ponto são referidos apenas os equipamentos, modelos e outras especificações que foram utilizadas para a caracterização de cada membrana.

Na análise de **ATR-FTIR** foi usado um espectrofotómetro *Frontier* da *PerkinElmer* equipado com um ATR (*Diamond crystal 45°*) e detetor FR-DTGS (*Temperature-stabilized fast recovery deuterated triglycine sulfate*), a 64 scans e com resolução de 4 cm<sup>-1</sup>, para assim se conseguir obter os espectros.

Para o <sup>1</sup>HMRN o aparelho utilizado foi um espectrómetro de 9.4 Tesla, com uma sonda TXI de 5 mm.

Para os **ângulos de contacto dinâmicos** recorreu-se ao equipamento OCA 20, da *Dataphysics*, onde as medições foram efetuadas utilizando água destilada como líquido.

No **estudo da perda de massa**, as amostras foram pesadas antes de serem colocadas em água MiliQ a 37 °C (uma vez que esta é a temperatura aproximada do corpo humano) durante 3 dias. Passados os 3 dias, as membranas foram lavadas com água destilada e secas a vácuo à temperatura ambiente. Posteriormente, com as amostras já secas e com massa constante, foram pesadas novamente, de forma a avaliar a percentagem de perda de massa, calculada pela seguinte equação:

$$\% \text{Perda de massa} = \frac{m_i - m_f}{m_i} \times 100$$

onde  $m_i$  corresponde à massa inicial da amostra (antes de ser imersa em água MiliQ) e  $m_f$  a massa final da amostra, depois de incubada (durante 3 dias) e seca.

O TGA foi realizado num equipamento TGA Q500 da *Thermal Analysis (TA) Instruments*. Para esta análise, as amostras foram aquecidas da temperatura ambiente até 600 °C, com uma velocidade de aquecimento de 10 °C/min, numa atmosfera de azoto. Os termogramas obtidos foram analisados no *software Universal Analysis 2000* da *TA Instruments*.

Os testes de SEM foram realizados no Instituto Pedro Nunes (IPN). As amostras foram, previamente, revestidas com ouro através de um processo de deposição física de vapor. O aparelho usado, para analisar as membranas, foi um FE-SEM Zeiss Merlin Gemini 2 (Carl Zeiss, EUA) e para as imagens foram feitas ampliações de 500x, 2000x e 5000x.

### 3.4. Libertação controlada de fármaco

No tratamento periodontal reconstrutivo é, muitas vezes, usada uma membrana de regeneração óssea guiada, como referido anteriormente. Esta membrana, por vezes, tem a ela associada problemas de inflamações causadas por seres patogénicos. Para resolver esta questão é introduzido, na membrana, um fármaco que, neste caso foi o Flurbiprofeno, de modo a amenizar essas inflamações e ajudar no processo de regeneração e cicatrização.

O Flurbiprofeno foi incorporado na solução de PCL, antes de serem produzidas as fibras por *electrospinning*, numa proporção de 1% (m/m) em relação à massa inicial do polímero, como se pode verificar na **Tabela 3.2**. O perfil da libertação do fármaco ao longo do tempo foi avaliado, durante 14 dias. As membranas, que continham o fármaco e respetivos brancos (para controlo) foram incubados a 37 °C em 10 mL de uma solução de PBS, com pH de 7,4. De seguida, foram retiradas as amostras do meio, repondo-o com 3 mL PBS fresco, em tempos específicos (0,5 h, 1h, 1,5 h, 2 h, 3 h, 4 h, 6 h, 8 h, 24 h, 48 h, 120 h, 144 h, 168 h, 216 h, 288 h, 336 h), medindo assim as suas absorvâncias a 247 nm. Estes resultados correspondem à quantidade de flurbiprofeno libertado em cada membrana.

**Tabela 3.2** – Composição das soluções para o *electrospinning* coaxial, com o fármaco.

Membrana	Core (PCL)		Sheath (GelMA)	
	m (g)	V (mL)	m (g)	V (mL)
PCL+Fármaco/GelMA	0,8 (PCL)+ 0,008 (Fármaco)	8 (TFE)	1,2 (GelMA)	8 (TFE) + 2 (AA)
PCL+Fármaco/ GelMA+Irgacure	0,8 (PCL)+ 0,008 (Fármaco)	8 (TFE)	1,2 (GelMA)+ 0,01 (Irgacure)	8 (TFE) + 2 (AA)

Os testes foram realizados num espectrofotómetro UV-Vis Jasco V-550. Depois de obtida a curva de calibração, do flurbiprofeno, as absorvâncias medidas foram convertidas em concentração ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), recorrendo a essa mesma curva, que se encontra no Anexo.

### 3.5. Biocompatibilidade

Como referido anteriormente, para que um biomaterial seja biocompatível, quando aplicado em tecidos do corpo humano, deve ter a capacidade não causar quaisquer danos. É, então, necessário avaliar a sua viabilidade celular *in vitro* (ISO 10993-5) de forma a aferir se o material usado para produzir as membranas, apresenta efeitos biológicos adversos. Esta caracterização foi realizada recorrendo a testes *3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium* (MTS), na Universidade da Beira Interior, Covilhã.

#### 3.5.1. Estudo da viabilidade celular

Para realizar a avaliação do perfil citotóxico dos materiais sintetizados, efetuou-se o teste MTS segundo as diretrizes padrão ISO 10993-5. Começou por se colocar esses mesmos materiais numa placa de 96 poços ( $n=5$ ) e depois irradiados, durante 1h, com luz UV. De seguida, adicionaram-se as células, a uma densidade de  $1 \times 10^4$  células por poço, incubando-as na presença dos materiais sintetizados, por períodos de 1, 3 e 7 dias. Posteriormente, removeu-se o meio e substituiu-se por 100  $\mu\text{L}$  de um novo e 20  $\mu\text{L}$  de MTS/PMS. As células foram, então, incubadas, durante 4 h, a 37 °C, numa atmosfera húmida com 5% de  $\text{CO}_2$ . Por fim, foi medida a absorvância da solução, com um espectrofotómetro de microplacas, da *Biorad xMark*, a 492 nm de absorvância. Foram ainda preparados dois tipos de controlo em ambiente estéril no interior de uma câmara de fluxo. O controlo positivo ( $\text{K}^+$ ), onde se adicionou, à cultura celular, etanol a 96%, e o controlo negativo ( $\text{K}^-$ ) que se refere ao poço com as células vivas, sem que as membranas estivessem presentes.



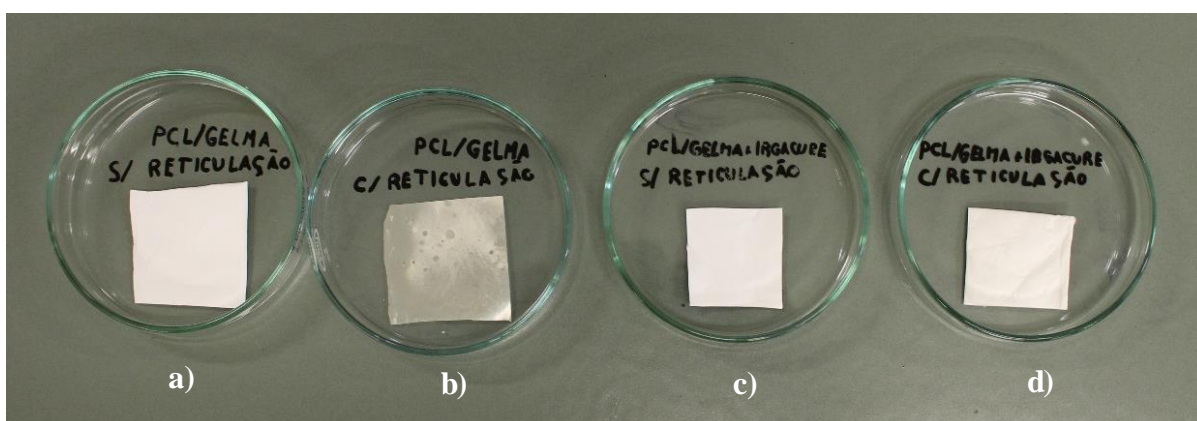
## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1. Produção das membranas PCL/GelMA

Neste trabalho foram produzidas membranas para se aplicarem, posteriormente, em regeneração óssea guiada. Estas foram preparadas com soluções de gelatina modificada tipo A e PCL, realizando de seguida *electrospinning* coaxial.

Começou-se por modificar a gelatina tipo A com anidrido metacrílico, como referido anteriormente. Assim, obteve-se a gelatina metacrilamida (GelMA) para que a membrana possa ser reticulada, o que é possível devido às ligações de carbono duplas presentes neste composto. De seguida procedeu-se à produção das membranas de PCL/GelMA e PCL/GelMA+Irgacure, onde a primeira foi mergulhada numa solução de Irgacure<sup>®</sup> 2959 e irradiada com luz UV, e a segunda foi colocada num exsiccador com atmosfera húmida para depois se proceder à exposição da luz UV. Este processo tem como objetivo reticular a gelatina modificada, para que esta, quando em meio fisiológico, não solubilize. As membranas de PCL/GelMA depois de produzidas apresentam cor branca, mas, depois de fotoreticuladas ficam com um aspeto amarelado. Já as membranas de PCL/GelMA+Irgacure, a sua aparência não é alterada, possuindo o mesmo aspeto antes e depois de fotoreticuladas, mantendo-se de cor branca, como se pode verificar pela **Figura 4.1**.

Todas as amostras sintetizadas foram caracterizadas, sendo que os resultados se encontram discutidos nos pontos abaixo.



**Figura 4.1** – Aparência das membranas a) PCL/GelMA sem fotoreticulação; b) PCL/GelMA com fotoreticulação; c) PCL/GelMA+Irgacure sem fotoreticulação e d) PCL/GelMA+Irgacure com fotoreticulação.

## 4.2. Caracterização química por ATR-FTIR

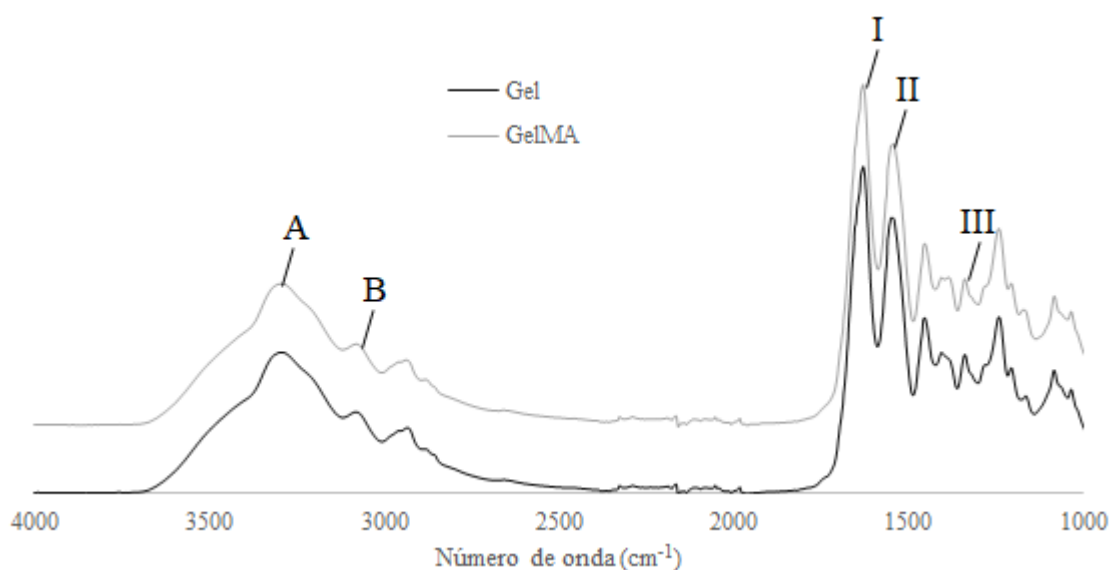
Como referido anteriormente, a técnica de ATR-FTIR tem como objetivo identificar os grupos químicos que se encontram em cada amostra produzida. Estas amostras são constituídas por 40% de PCL e 60% de GelMA.

A gelatina é um polímero de origem proteica, que deriva da desnaturação do colagénio, e por isso é composta por ligações amida, que une os aminoácidos. Estas ligações exibem bandas de absorção características do espectro infravermelho, que se dividem em amida: A, B, I, II e III (**Tabela 4.1**) (Fabian & Mäntele, 2002).

**Tabela 4.1** – Bandas de absorvância características do espectro infravermelho das ligações peptídicas (Adaptada de Fabian & Mäntele, 2002).

Nomenclatura (amida)	Número de onda ( $\text{cm}^{-1}$ )	Modos vibracionais
A	3300	NH <i>stretching</i>
B	3100	NH <i>stretching</i>
I	1610 – 1695	CO <i>stretching</i>
II	1480 – 1575	NH <i>stretching</i> e CN <i>stretching</i>
III	1220 – 1320	NH <i>stretching</i> e CN <i>stretching</i>

Tendo como referência os valores das bandas de absorção para cada ligação amida, apresentada na **Tabela 4.1**, foram analisados os espectros da gelatina, antes e depois de modificada com anidrido metacrílico, obtidos por ATR-FTIR (**Figura 4.2**). Os valores das suas absorvâncias são apresentados na **Tabela 4.2**.



**Figura 4.2** – Espectro de ATR-FTIR da gelatina, antes e depois de ser modificada com anidrido metacrílico.



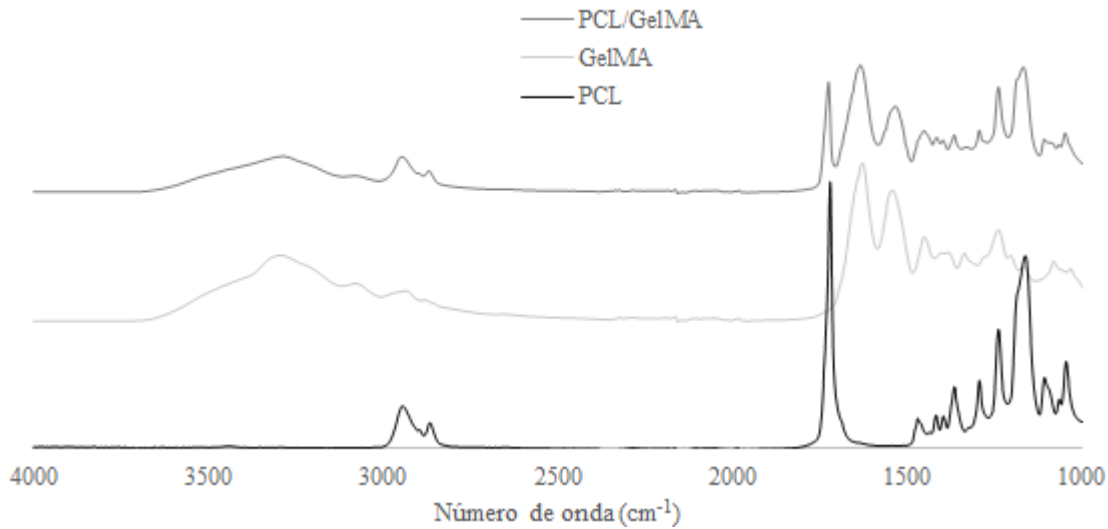
**Tabela 4.2** – Bandas de absorvância correspondentes à gelatina, antes e depois de ser modificada com anidrido metacrílico.

Amida	Número de onda ( $\text{cm}^{-1}$ )	
	Gelatina	GelMA
<b>A</b>	3289	3290
<b>B</b>	3083	3083
<b>I</b>	1627	1628
<b>II</b>	1544	1540
<b>III</b>	1239	1239

Observando a **Figura 4.2** e a **Tabela 4.2** pode notar-se que tanto a gelatina não modificada (Gelatina) como a gelatina modificada (GelMA) exibem espectros muito idênticos, nomeadamente, as cinco bandas relacionadas com a ligação amida aparecem a números de onda idênticos (**Tabela 4.2**), ou seja, pode confirmar-se a presença das ligações da gelatina na GelMA. Pode-se constatar que na GelMA se verificam as diferentes regiões das ligações amida. O alongamento NH da amida A e B de  $3290 \text{ cm}^{-1}$  e  $3083 \text{ cm}^{-1}$ , respetivamente. A banda de absorvância do grupo carbonilo (CO), característica da amida I, de  $1628 \text{ cm}^{-1}$ . E por fim, as bandas de absorvância correspondentes às ligações amida II e III são  $1540 \text{ cm}^{-1}$  e  $1239 \text{ cm}^{-1}$ , respetivamente.

Neste tipo de caracterização, um dos objetivos está em averiguar se a reação de modificação foi efetiva, verificando o aparecimento de uma banda característica das ligações C=C, introduzida através da funcionalização da gelatina com MAA. Mas, uma vez que as bandas características deste tipo de ligações, se encontram entre  $1600 \text{ cm}^{-1}$  e  $1640 \text{ cm}^{-1}$ , não foi possível confirmar essa questão, pois as bandas de absorvância das ligações amida do tipo I estão entre  $1610 \text{ cm}^{-1}$  e  $1695 \text{ cm}^{-1}$  – sobrepostas às das ligações C=C.

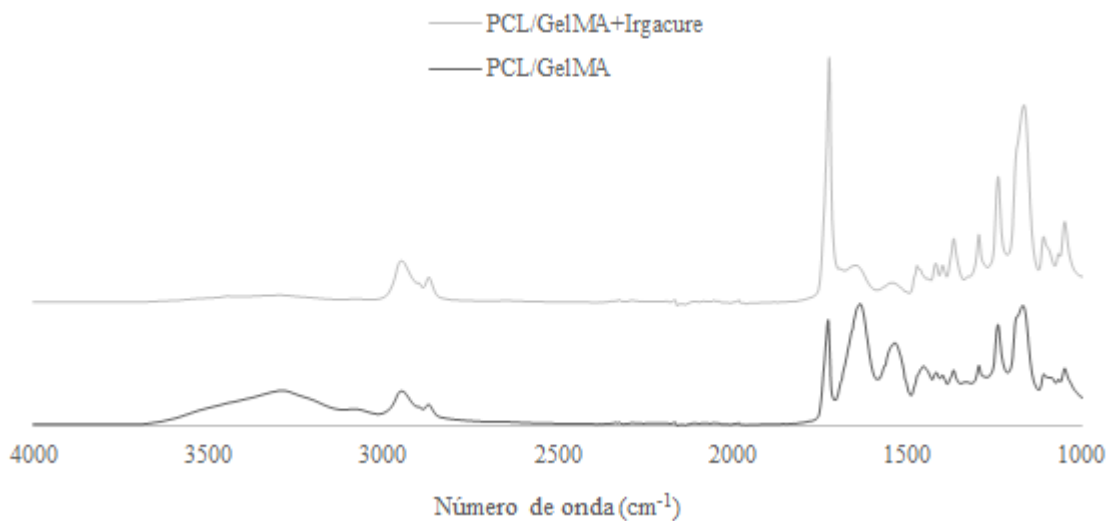
Depois de interpretados os valores das bandas das ligações existentes na GelMA, analisou-se o espectro (**Figura 4.3**) dos polímeros PCL e gelatina, e as fibras de PCL/GelMA produzidas através da técnica de *electrospinning* coaxial.



**Figura 4.3** – Espectro de ATR-FTIR dos polímeros PCL e GelMA, e das fibras de PCL/GelMA.

Através da **Figura 4.3** pode verificar-se que as bandas características da PCL para o alongamento da ligação CH, se encontram entre  $2949\text{ cm}^{-1}$  e  $2865\text{ cm}^{-1}$ , e para o alongamento CO a banda é de  $1721\text{ cm}^{-1}$ , sendo este valor próximo de  $1727\text{ cm}^{-1}$  como apresentado na literatura (Elzein et al., 2004). Neste caso, é possível averiguar que a PCL exhibe grupos carbonilo na sua composição, que estão associados às ligações éster. No espectro das fibras de PCL/GelMA é possível observar a presença dos grupos característicos da PCL e também da gelatina, que confirma a presença destes dois polímeros nas membranas assim produzidas.

Depois de analisados e comparados os espectros de PCL, GelMA e as fibras de PCL/GelMA, segue-se o estudo das membranas de PCL/GelMA e de PCL/GelMA+Irgacure, apresentados na **Figura 4.4**.

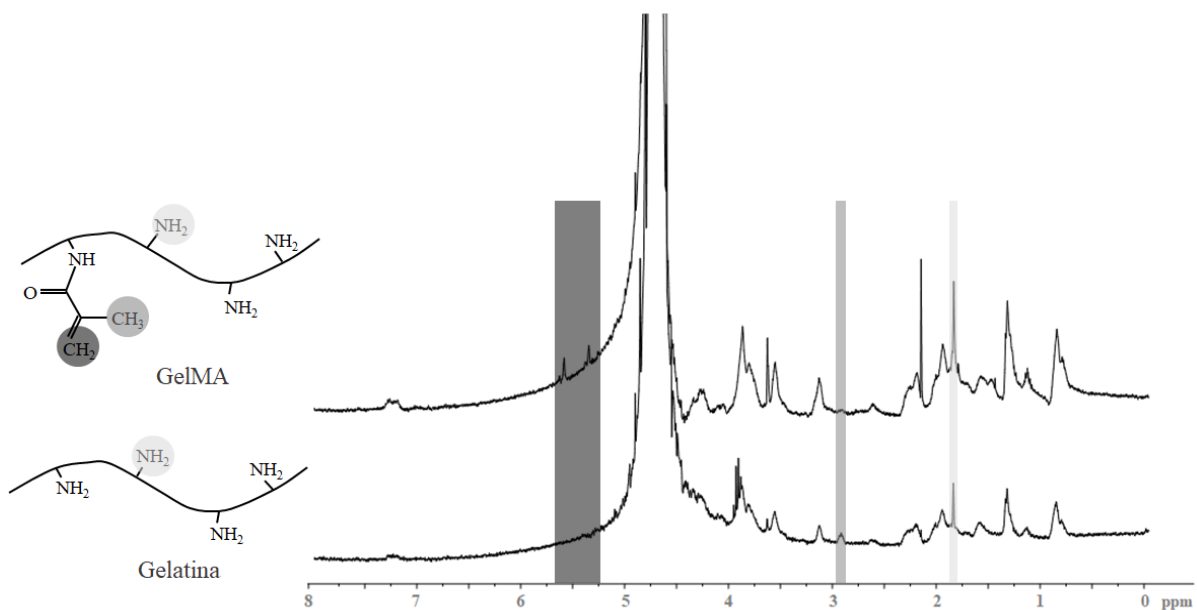


**Figura 4.4** – Espectro de ATR-FTIR das fibras de PCL/GelMA e PCL/GelMA+Irgacure.

Pela observação da **Figura 4.4**, verifica-se que, na membrana de PCL/GelMA, as bandas características da gelatina são mais perceptíveis, sendo que a que mais se evidencia é a Amida do tipo I e II a  $1634\text{ cm}^{-1}$  e  $1534\text{ cm}^{-1}$ . Os grupos característicos da PCL são os que mais se revelam na membrana constituída por PCL/GelMA+Irgacure.

### 4.3. Espectroscopia de ressonância magnética nuclear de próton ( $^1\text{H}$ RMN)

Para que se possa reticular as membranas é necessário funcionalizar a gelatina (neste caso com anidrido metacrílico) de forma a incorporar, na sua estrutura, ligações duplas de carbono. Uma vez que por ATR-FTIR não foi possível confirmar a presença das ligações duplas, recorreu-se à técnica de  $^1\text{H}$  RMN. Para isto, as amostras, de gelatina e GelMA, foram preparadas, independentemente, com 2 mg de amostra e 300 mL de água deuterada ( $\text{D}_2\text{O}$ ), sob agitação, a  $\sim 35\text{ }^\circ\text{C}$ , e de seguida analisadas (aus Kerman, 2008). A **Figura 4.5** apresenta os espectros da gelatina e da gelatina modificada (GelMA).



**Figura 4.5** – Espectro de  $^1\text{H}$  RMN da gelatina sem estar modificada e gelatina modificada (GelMA).

Analisando a **Figura 4.5**, pode observar-se os picos característicos da gelatina nas duas amostras, como é o caso da fenilalanina a  $7,1 - 7,3\text{ ppm}$ . Comparando os dois espectros, são apresentados novos picos, na GelMA, a  $5,3 - 5,6\text{ ppm}$  e  $2,9\text{ ppm}$  que correspondem aos grupos metil, do anidrido metacrílico introduzido. Isto indica que ocorreu a ligação dos grupos metacrílicos à gelatina. A diminuição do pico a  $1,8\text{ ppm}$ , depois da reação, confirma que a maior parte dos grupos lisina reagiu.

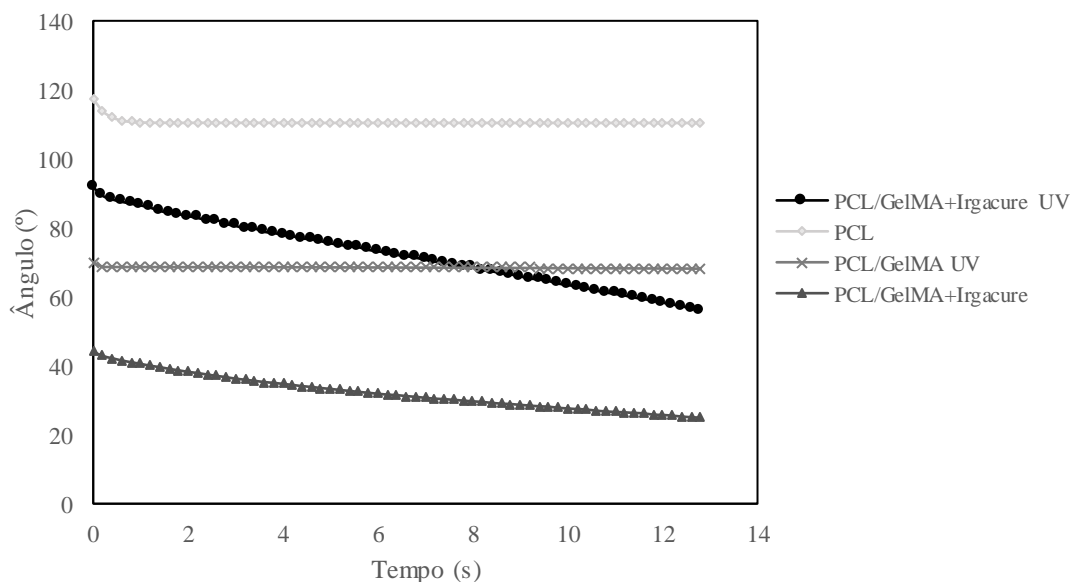
#### 4.4. Determinação dos ângulos de contacto dinâmicos

De forma a avaliar a capacidade de molhabilidade e hidrofobicidade das membranas, num período específico de tempo, foram medidos os ângulos de contacto dinâmicos. Para isso, foi colocado um pedaço de membrana no aparelho e de seguida adicionou-se uma gota de água destilada, para aferir o espalhamento desta ao longo do tempo, na membrana. Que se traduz em ângulos de contacto dinâmicos.

Esta técnica, como já referido anteriormente, é usada para aferir se a membrana está apta para ser aplicada como membrana de regeneração óssea guiada, a fim de criar uma barreira permitindo que as células do tecido ósseo se consigam regenerar sem que as células epiteliais interfiram neste processo. É, então, necessário que a membrana seja hidrofílica para que as células epiteliais, consigam aderir à superfície da membrana sem que entrem em contacto com a regeneração do tecido ósseo

A determinação dos ângulos de contacto dinâmicos foi feita apenas para as membranas sem fármaco, fotoreticuladas e não fotoreticuladas, uma vez que este, em princípio, não vai afetar significativamente o seu grau de hidrofiliicidade ou hidrofobicidade, pois encontra-se presente em pequena quantidade (1%) e supostamente no interior da matriz polimérica.

Na **Figura 4.6**, estão apresentadas as curvas de cada uma das amostras analisadas.



**Figura 4.6** – Ângulos de contacto dinâmicos das diferentes membranas.

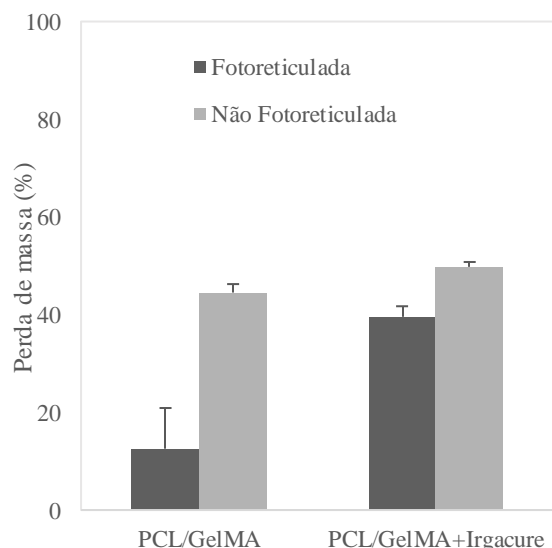
Observando a **Figura 4.6** pode constatar-se que as membranas de PCL apresentam um comportamento bastante hidrofóbico e que a sua molhabilidade é muito reduzida, ou seja, o espalhamento da gota de água na superfície da membrana é baixo. Isto é comprovado através do valor o ângulo de contacto inicial, que é de cerca de 117°, diminuindo para 110°, mantendo-se constante até ao final do ensaio.

Em relação às fibras coaxiais de PCL/GelMA+Irgacure, estas apresentam maior hidroflicidade e maior molhabilidade, quando comparadas com as membranas de PCL/GelMA fotoreticuladas (PCL/GelMA UV). Por outro lado, quando as membranas de PCL/GelMA+Irgacure são reticuladas, a sua hidrofobicidade aumenta, contudo, a sua molhabilidade também aumenta. Isto demonstra que tanto a aplicação das fibras de PCL/GelMA UV como das de PCL/GelMA+Irgacure UV apresentam bons resultados, uma vez que são hidroflicas. Assim, permite que haja fixação das células, ajudando na regeneração do tecido ósseo, como se pode verificar mais à frente pelos testes de biocompatibilidade.

É essencial ter em conta não só a composição química da matriz como também é importante considerar a sua porosidade. Quanto mais porosa a superfície das membranas, mais a gota se infiltra, ou seja, a membrana apresenta maior molhabilidade. Pelas imagens de SEM obtidas, e analisadas posteriormente, pode verificar-se que as membranas de PCL/GelMA+Irgacure UV são mais porosas que as de PCL/GelMA UV, comprovando assim maior molhabilidade que a membrana de PCL/GelMA+Irgacure UV apresenta quando comparada com a de PCL/GelMA UV.

#### 4.5. Determinação da perda de massa (%)

O estudo de perda de massa tem como objetivo averiguar, de forma indireta, a eficácia do processo de fotoreticulação, ou seja, se a perda de massa for mínima, significa que a reticulação foi eficaz. Os resultados obtidos encontram-se na **Figura 4.7** e **Tabela 4.3** de forma a poder comparar as membranas com reticulação que, após a sua produção, são mergulhadas numa solução de Irgacure e depois fotoreticuladas, com as membranas contendo o Irgacure na solução de GelMA e só depois são produzidas. Para controlo foram usadas as mesmas membranas, mas sem reticulação.



**Figura 4.7** – Percentagem de perda de massa das membranas de PCL/GelMA, PCL/GelMA+Irgacure e respetivos controlos.

**Tabela 4.3** – Percentagem de perda de massa das membranas de PCL/GelMA, PCL/GelMA+Irgacure fotoreticuladas e não fotoreticuladas.

	Perda de massa (%)	
	PCL/GelMA	PCL/GelMA+Irgacure
<b>Fotoreticulada</b>	12,55±8,33	39,55±2,17
<b>Não Fotoreticulada</b>	44,52±1,73	49,78±1,00

Observando a **Figura 4.7** e a **Tabela 4.3** constata-se que as membranas de PCL/GelMA fotoreticuladas apresentam menor perda de massa que a mesma membrana sem estar reticulada, o que demonstra que o processo de fotoreticulação foi eficiente e comprova também a estabilidade das fibras fotoreticuladas em ambiente biológico. As membranas de PCL/GelMA+Irgacure, também perdem mais massa antes de serem fotoreticuladas. No entanto, a diferença é apenas de ~10%. Isto pode dever-se ao facto de o processo de fotoreticulação não ter sido tão eficaz como nas membranas de PCL/GelMA.

O tempo de degradação das membranas é também um fator importante, o que, quanto menor for a perda de massa, menor será o seu tempo de degradação. Comparando os dois tipos de membranas fotoreticuladas, a diferença entre as perdas de massa é de cerca de 27%, concluindo que a membrana de PCL/GelMA+Irgacure UV se vai degradar mais rapidamente.

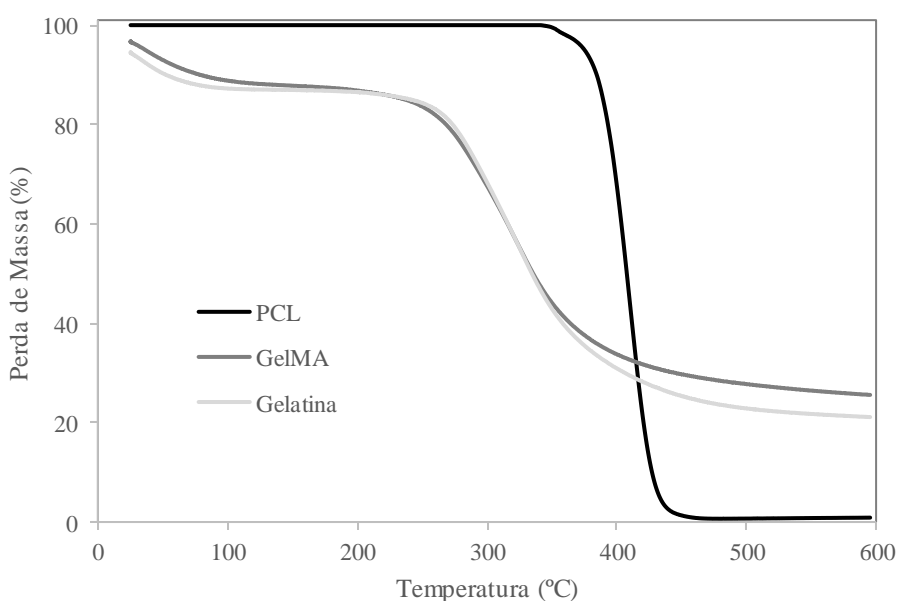
No desenvolvimento de um novo tecido a velocidade de degradação da membrana deve corresponder à velocidade de formação do tecido em causa. Este é um fator crucial para que a membrana de regeneração óssea guiada seja eficaz. Se a velocidade de degradação desta for

muito rápida poderá reduzir o tempo de função de barreira e também a capacidade da membrana de criar espaço para que o tecido se possa desenvolver. (Liu & Kerns, 2014).

#### 4.6. Análise termogravimétrica (TGA) – Propriedades térmicas

Como descrito anteriormente, esta técnica tem como objetivo analisar a estabilidade térmica dos materiais, a aplicabilidade à temperatura interna do corpo humano (meio fisiológico) e aferir que comportamento se verifica nestes, quando expostos a elevadas temperaturas. Isto é importante, uma vez que os materiais podem ser sujeitos a técnicas de processamento ou processos térmicos de esterilização, requisito para que a membrana se possa aplicar no organismo. As amostras foram sujeitas a aumentos de temperatura até 600 °C de modo a se verificar esse comportamento.

Para este fim, foi analisada cada membrana, e respetivas matérias primas, determinando as suas temperaturas de degradação ( $T_d$ ). Na **Figura 4.8** encontram-se os perfis de degradação da PCL, Gelatina e gelatina modificada com MAA (GelMA). Na **Tabela 4.4** são apresentados os valores das temperaturas de degradação da PCL, da Gelatina e GelMA, onde  $T_{d, inicial}$  corresponde à temperatura inicial de degradação, antes da descida da curva;  $T_{d, final}$  representa os valores da temperatura final de degradação, onde esta estagna com quantidades residuais de amostra; e DTG são os valores das temperaturas de degradação onde o declive da curva de perda de massa é maior, ou seja, corresponde aos picos das derivadas de TGA.



**Figura 4.8** – Curvas termogravimétricas de PCL, Gelatina e GelMA, obtidas com uma rampa de aquecimento de 10 °C/min.

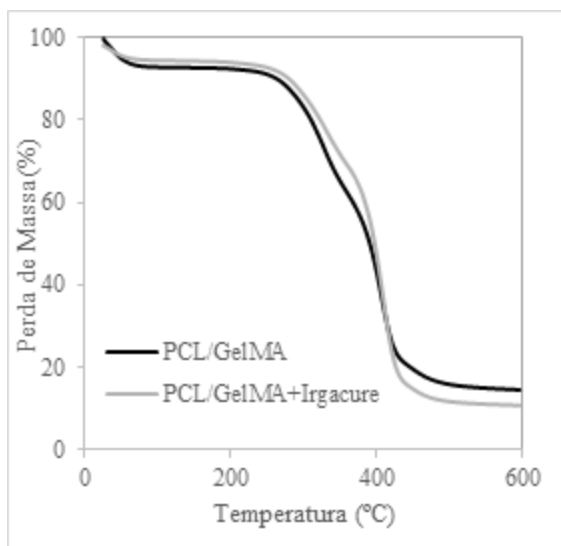
**Tabela 4.4** – Temperatura de degradação inicial e final, perda de massa e temperatura de degradação da derivada de TGA para Gelatina e GelMA.

<b>Material</b>	<b>T<sub>d,inicial</sub> (°C)</b>	<b>T<sub>d,final</sub> (°C)</b>	<b>Perda de massa (%)</b>	<b>DTG (°C)</b>
<b>PCL</b>	372	443	99	407
<b>Gelatina</b>	271	378	79	324
<b>GelMA</b>	268	369	74	322

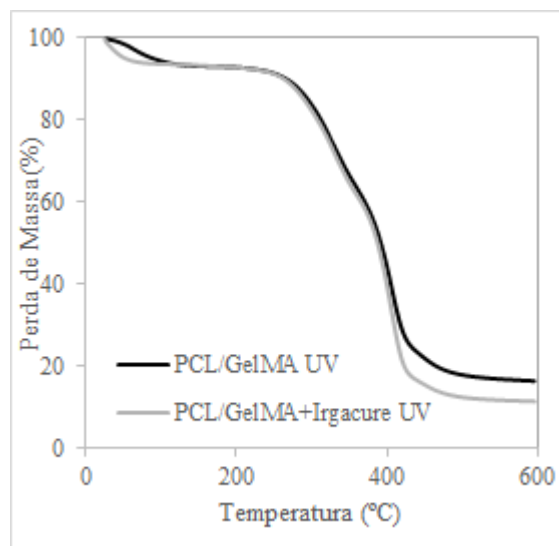
Comparando as temperaturas de degradação dos diferentes materiais (**Figura 4.8**), é de notar que a temperatura de degradação mais elevada é a de PCL, sendo este o polímero mais estável. Observando esse mesmo o gráfico pode constatar-se que os perfis das curvas termogravimétricas de Gelatina e GelMA são muito semelhantes, principalmente a temperaturas entre os 200 °C e 350 °C. Até aos 100 °C, ambos os materiais perdem cerca de 10% de massa sendo esta, correspondente à água que é absorvida pela gelatina, por ser um polímero bastante hidrofílico. Enquanto que a Gelatina se começa a degradar aos 271 °C e a sua temperatura final de degradação é de 378 °C, tendo uma perda de massa de 79%, a T<sub>d,inicial</sub> da GelMA é de 268 °C e a sua T<sub>d,final</sub> de 369 °C perdendo 74% de massa. A partir destes resultados, pode verificar-se que a diferença entre as DTG, da gelatina e da GelMA, é apenas de 2 °C, podendo concluir que a estabilidade térmica entre as duas membranas é semelhante.

De seguida, sucede a análise e comparação dos resultados do perfil das curvas termogravimétricas das membranas de PCL/GelMA e PCL/GelMA+Irgacure, apresentadas na **Figura 4.9**, e das matrizes de PCL/GelMA e PCL/GelMA+Irgacure, ambas fotoreticuladas (**Figura 4.10**). Na **Tabela 4.5** são expostos os valores das temperaturas de degradação inicial e final (T<sub>d,inicial</sub> e T<sub>d,final</sub>, respetivamente), a percentagem da perda de massa e os valores das temperaturas de degradação para o pico da derivada da curva de TGA (DTG).





**Figura 4.9** – Curvas termogravimétricas das membranas PCL/GelMA e PCL/GelMA+Irgacure, obtidas com uma rampa de aquecimento de 10 °C/min.



**Figura 4.10** – Curvas termogravimétricas das membranas PCL/GelMA UV e PCL/GelMA+Irgacure UV, obtidas com uma rampa de aquecimento de 10 °C/min.

**Tabela 4.5** – Temperatura de degradação inicial e final, perda de massa e temperatura de degradação da derivada de TGA para PCL/GelMA, PCL/GelMA+Irgacure, PCL/GelMA UV e PCL/GelMA+Irgacure UV.

Material	$T_{d, inicial}$ (°C)	$T_{d, final}$ (°C)	Perda de massa (%)	DTG (°C)
PCL/GelMA	287	339	85	328
PCL/GelMA+Irgacure	286	341	84	330
PCL/GelMA UV	283	340	89	327
PCL/GelMA+Irgacure UV	281	342	89	330

Pela **Figura 4.9** e **Tabela 4.5** podem-se observar três regiões de perda de massa para ambas as membranas, PCL/GelMA e PCL/GelMA+Irgacure. A primeira, tem início à temperatura ambiente e termina pouco depois dos 100 °C, que corresponde à evaporação da água residual presente nas amostras, a segunda, entre os 280 °C e os 340 °C, representa a perda de gelatina, e a terceira dos 340 °C aos 420 °C diz respeito à perda de massa da PCL. Quanto menor for a temperatura de degradação, menor será a estabilidade térmica das fibras. Pode notar-se, que na **Figura 4.9**, para as matrizes de PCL/GelMA+Irgacure e PCL/GelMA+Irgacure UV, não houve diferença entre as suas temperaturas de degradação. E, mesmo nas membranas de PCL/GelMA e PCL/GelMA UV a diferença é de apenas 1 °C, concluindo assim que a sua estabilidade térmica é também semelhante.

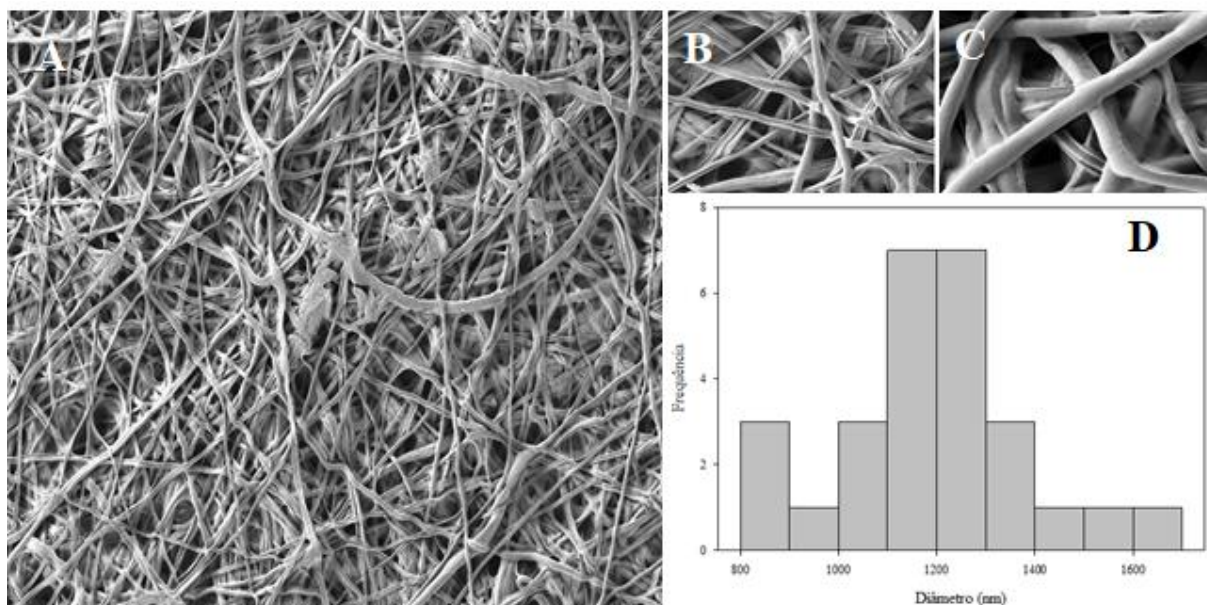
Na **Figura 4.10** são mostradas as curvas de TGA das membranas após a sua fotoreticulação. Nesta verifica-se, que a temperatura de degradação da PCL/GelMA+Irgacure fotoreticulada é ligeiramente maior que a anterior, sem fotoreticulação. No entanto, a sua perda de massa é mais significativa.

Estes resultados permitiram concluir que as membranas apresentam estabilidades térmicas muito próximas, não podendo tirar conclusões sobre qual a membrana mais termicamente estável. No entanto, de uma forma geral, pode dizer-se que todas as membranas estão aptas a serem sujeitas a condições de esterilização ou outros processamentos que requeiram temperaturas mais elevadas. Esta característica é bastante relevante, pois quando um biomaterial é aplicado no organismo deve exibir condições assépticas, para que não desenvolvam respostas imunes.

#### 4.7. Microscopia eletrónica de varrimento (SEM) – Morfologia das fibras

Para visualizar as fibras das membranas e verificar quais as diferentes morfologias da sua superfície e a distribuição dos diâmetros das mesmas, recorreu-se à técnica de SEM. Apenas as membranas de PCL/GelMA fotoreticuladas (UV) e as de PCL/GelMA+Irgacure fotoreticuladas (UV), foram sujeitas a esta análise, uma vez que serão as membranas reticuladas as que se irão aplicar na regeneração.

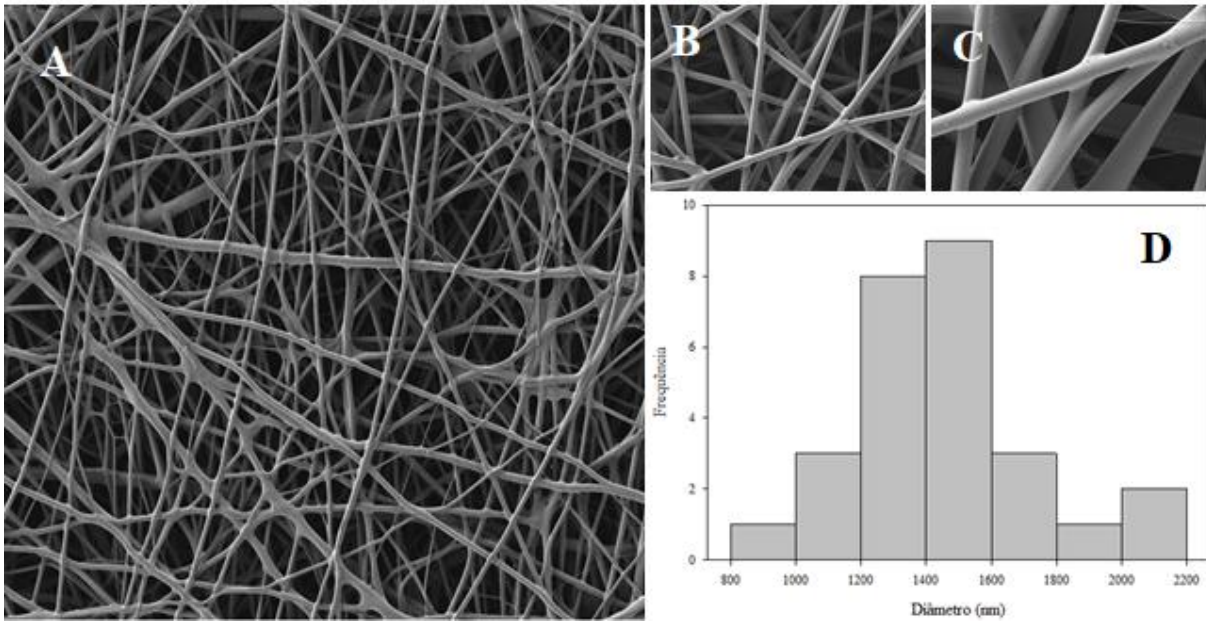
As matrizes (PCL/GelMA UV e PCL/GelMA+Irgacure UV) foram observadas a várias ampliações. Na **Figura 4.11** são apresentadas as imagens de SEM que se obtiveram para a superfície da membrana produzida por *electrospinning* coaxial, a ampliações de 500x, 2000x e 5000x. Estas foram as ampliações definidas para verificar o aspeto geral da malha das fibras (500 x), analisar os seus diâmetros (2000x) e observar a morfologia da superfície das fibras individuais (5000x). Na figura é também exibido um histograma com a distribuição dos diâmetros das fibras. Na Tabela 4.6 são exibidos os valores do diâmetro médio das fibras de PCL/GelMA UV.



**Figura 4.11** – Imagens de SEM: A) aspeto geral da malha das fibras, a 500x; B) para analisar os seus diâmetros, a 2000x; C) morfologia da superfície das fibras individuais, 5000x; D) Histograma dos diâmetros das fibras da matriz PCL/GelMA UV.

Através da **Figura 4.11** verifica-se que as fibras coaxiais são bastante desorganizadas, uma vez que foram produzidas por *electrospinning*. Como já mencionado, o *electrospinning* é uma técnica cujas fibras produzidas se depositam no coletor aleatoriamente, dando-lhes um aspeto desorganizado. Neste caso, as fibras parecem estar colapsadas. Isto pode dever-se ao facto de que pode ocorrer perda de massa, quando a membrana é mergulhada na solução aquosa de Irgacure® 2959. Uma vez que a GelMA se encontra no revestimento da fibra, esta acaba por se degradar ficando apenas a PCL. Através do histograma pode verificar-se que a distribuição dos diâmetros das fibras de PCL/GelMA UV é semelhante e que, em média, o diâmetro é de 1196 nm, apresentando um desvio padrão de 192.

Depois de observadas as imagens das membranas de PCL/GelMA UV, são apresentadas as imagens das membranas de PCL/GelMA+Irgacure UV, que se encontram na **Figura 4.12**. Para esta matriz fixaram-se as mesmas ampliações (500x, 2000x e 5000x), de forma a poder compará-las mais facilmente. A **Tabela 4.6** exhibe os valores do diâmetro médio das fibras de PCL/GelMA+Irgacure UV.



**Figura 4.12** – Imagens de SEM: A) aspeto geral da malha das fibras, a 500x; B) para analisar os seus diâmetros, a 2000x; C) morfologia da superfície das fibras individuais, 5000x; D) Histograma dos diâmetros das fibras da matriz PCL/GelMA+Irgacure UV.

**Tabela 4.6** – Valores conseguidos para o diâmetro médio das fibras, e respetivo desvio padrão, respeitantes às matrizes de PCL/GelMA UV e PCL/GelMA+Irgacure UV.

Membrana	Diâmetro (nm)
PCL/GelMA UV	1196±192
PCL/GelMA+Irgacure UV	1444±264

Observando a **Figura 4.12**, as membranas de PCL/GelMA+Irgacure UV terão mantido a sua estrutura inicial (antes da fotoreticulação), pois o processo de reticulação não é tão agressivo como o das membranas de PCL/GelMA. Nas matrizes de PCL/GelMA+Irgacure, a reticulação é realizada colocando a membrana numa atmosfera húmida saturada e de seguida incidida a luz UV, tornando o processo menos agressivo para as fibras. A malha de fibras é desorganizada, também devido à técnica usada para as produzir, o *electrospinning*. Em média, os seus diâmetros são de 1444 nm, apresentando um desvio padrão de 264.

De uma forma geral, a diferença da estrutura entre as membranas, de PCL/GelMA UV e das PCL/GelMA+Irgacure UV, é que o processo de reticulação de mergulhar numa solução aquosa de Irgacure® 2959 afeta a estrutura das fibras. Embora, teoricamente, as fibras de gelatina, não se dissolvam em água à temperatura ambiente, vai sempre haver alguma perda de massa deste polímero.

## 4.8. Libertação de Flurbiprofeno

As membranas produzidas neste trabalho para além de terem o fim de serem aplicadas em regeneração óssea guiada, tem também como objetivo a libertação do fármaco. Para um estudo preliminar, foi selecionado o Flurbiprofeno (devido às suas propriedades anti-inflamatórias) e estudada a sua libertação durante 336 h. Contudo, o Irgacure<sup>®</sup> 2959, usado para a fotoreticulação, e que ainda se encontrava retido no revestimento das fibras, absorve no mesmo comprimento de onda do Flurbiprofeno, que se encontra na membrana apenas a 1% junto com a PCL no núcleo da fibra. Por este motivo, não foi possível tirar conclusões em relação à libertação do fármaco, uma vez que o Irgacure<sup>®</sup> 2959 influenciou os resultados medidos.

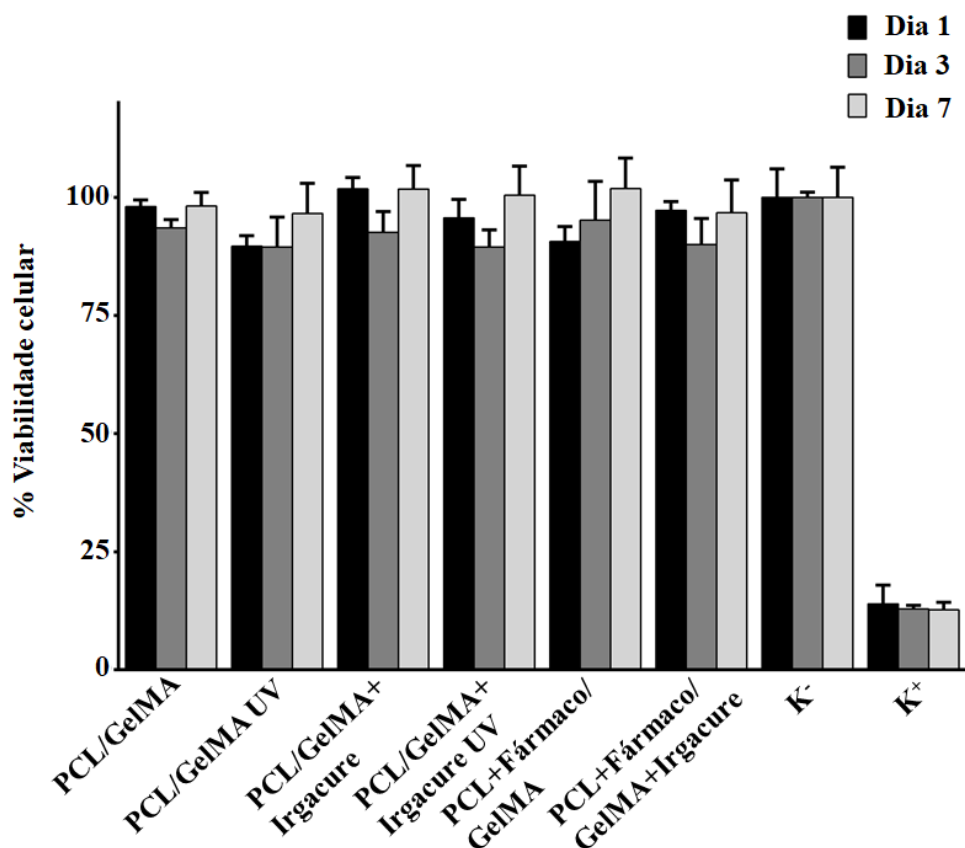
## 4.9. Biocompatibilidade

### 4.9.1. Estudo da viabilidade celular

A PCL, por ser um polímero bastante hidrofóbico, é muito usada na produção de membranas para regeneração guiada devido à sua lenta degradação. No entanto, esta característica reduz a sua capacidade de as células se fixarem na matriz e por sua vez auxiliar no processo de regeneração. Para colmatar esta desvantagem tornou-se necessário combinar a PCL com um polímero que aumentasse a hidrofobicidade dos materiais, neste caso o polímero utilizado para esse efeito foi a gelatina.

Uma vez que as fibras produzidas serão usadas como membranas de regeneração óssea guiada aplicadas no organismo, foi realizado, na UBI, o estudo *in vitro* da viabilidade celular. Este estudo permite avaliar a adesão e proliferação de células de fibroblastos humanos, quando em contacto direto com a superfície dos materiais, avaliando-se assim o perfil citotóxico das membranas fotoreticuladas.

Na **Figura 4.13** está representada a resposta fisiológica das células na presença das membranas, em termos de percentagem de células vivas, depois de colocadas em contacto com os materiais durante 1, 3 e 7 dias. Bem como o controlo positivo ( $K^+$ ), onde se adiciona etanol a 96% à cultura celular provocando assim a morte celular, e o controlo negativo ( $K^-$ ), que diz respeito à totalidade das células viáveis, 100%.

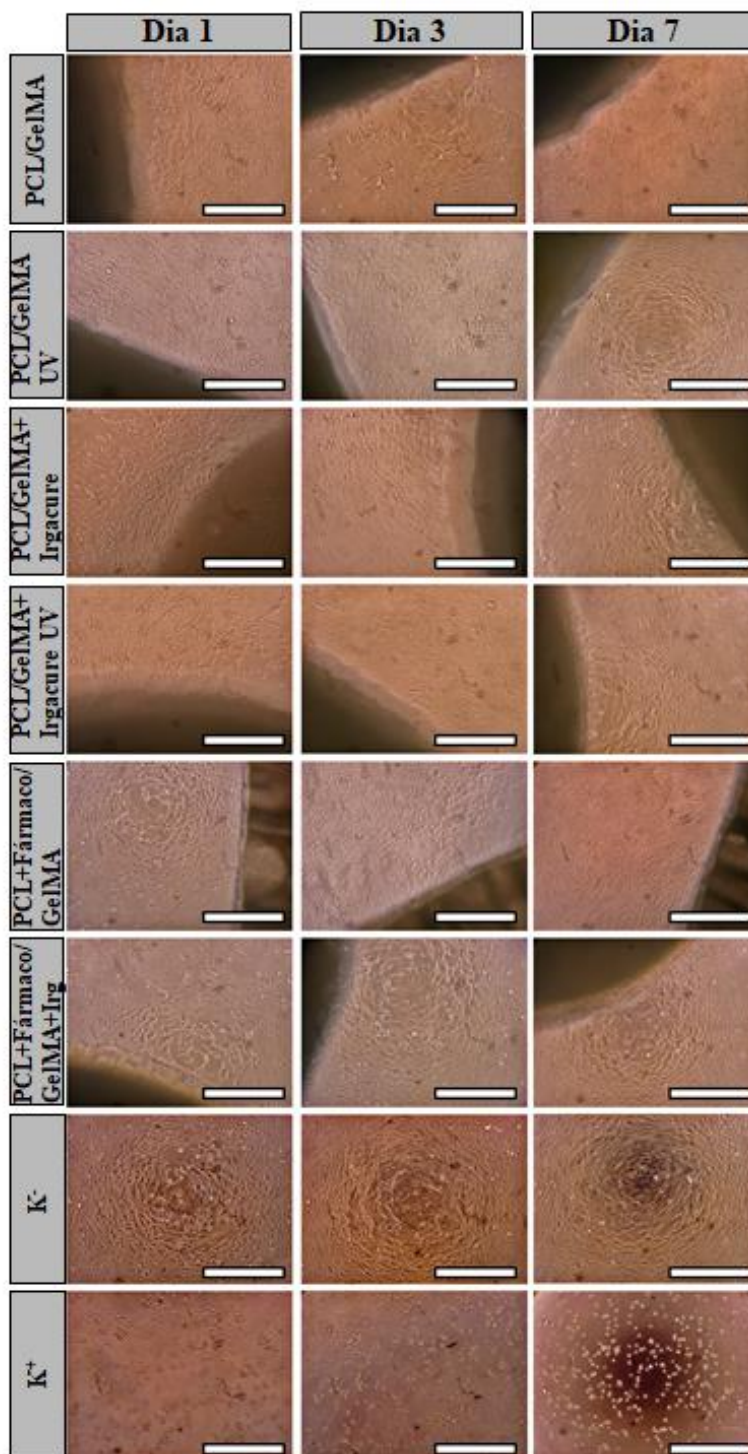


**Figura 4.13** – Avaliação da atividade celular após contacto com as membranas produzidas por *electrospinning* coaxial, durante 1, 3 e 7 dias.

Analisando a **Figura 4.13** observa-se que todas as membranas não apresentam toxicidade e que são capazes de promover a adesão e a proliferação celular. De uma forma geral, as células dos fibroblastos têm um comportamento idêntico, quando em contacto com as membranas. Com isto, pode dizer-se que a biocompatibilidade não é influenciada tanto pelos materiais, como pela técnica de produção das fibras. Após os 7 dias, verifica-se que as membranas demonstram boa adesão celular, apresentando percentagens de células vivas superiores a 75%. Comparando o controlo negativo (K<sup>-</sup>) com os valores obtidos para a viabilidade celular das membranas, conclui-se que as membranas são biocompatíveis por não existirem quantidades consideráveis de compostos tóxicos.

Para comprovar que os materiais usados, para produzir as membranas, são de facto biocompatíveis, são apresentadas na **Figura 4.14** imagens tiradas por um microscópio ótico às diferentes membranas e para os controlos positivo e negativo.





**Figura 4.14** – Imagens microscópicas das células de fibroblastos quando em contacto com as membranas, durante um período de incubação de 1, 3 e 7 dias.

Observando as imagens da **Figura 4.14**, e apresentando os fibroblastos a forma de fuso, pode verificar-se um aumento de células, ao longo dos 7 dias. As células aderem a todas as membranas no primeiro dia, mas ao fim dos 7 dias, as que mais se identificam, com o controlo negativo, que tem as células viáveis, são as membranas fotoreticuladas. Isto é, as células que estão em contacto com as membranas têm a capacidade de se multiplicar, mantendo-se viáveis. O contrário acontece com o controlo positivo ( $K^+$ ) onde as células se encontram mortas.





## 5. CONCLUSÕES

### 5.1. Conclusões gerais

O trabalho desenvolvido, teve como objetivo produzir membranas constituídas por fibras de policaprolactona (PCL) e gelatina metacrilamida (GelMA) a fim de serem aplicadas como membranas de regeneração óssea guiada.

As matrizes fibrosas foram produzidas pela técnica de *electrospinning* coaxial, onde a fibra do núcleo é a PCL e a do revestimento a GelMA. O trabalho consistiu em estudar duas abordagens diferentes: **1)** Após a produção da membrana, esta foi mergulhada numa solução aquosa de Irgacure<sup>®</sup> 2959 (fotoiniciador) e depois submetida a um processo de fotoreticulação, onde se faz incidir uma luz UV; **2)** Antes de a membrana ser produzida, o fotoiniciador foi incorporado na solução de GelMA. Só depois as soluções de PCL e GelMA foram submetidas a *electrospinning* coaxial, e de seguida colocadas num exsiccador com atmosfera húmida e submetidas à fotoreticulação.

Nas diferentes abordagens as membranas foram produzidas com as mesmas proporções de PCL/GelMA (40:60), diferenciando apenas na forma como foi introduzido o Irgacure<sup>®</sup> 2959.

Após as membranas serem produzidas com a técnica de *electrospinning* coaxial, concluiu-se que esta técnica foi adequada ao objetivo pretendido tendo a capacidade de produzir as membranas de PCL/GelMA.

De seguida, cada membrana foi fotoreticulada, e observando o aspeto geral das matrizes verifica-se uma diferença de coloração, apenas nas membranas de PCL/GelMA e PCL/GelMA UV. A primeira exibe a cor branca enquanto que a segunda apresenta uma cor amarelada. As membranas de PCL/GelMA+Irgacure e PCL/GelMA+Irgacure UV apresentam o mesmo aspeto, não tendo mudado de cor depois do processo de fotoreticulação.

Para comprovar a presença da PCL e da GelMA, nas matrizes fibrosas produzidas, recorreu-se à análise de espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier com reflexão total atenuada (**ATR-FTIR**).

Por sua vez, para poder ser fotoreticulada, a gelatina foi funcionalizada com anidrido metacrílico. Essa modificação foi comprovada através da técnica de espectroscopia de ressonância magnética nuclear de protão (**<sup>1</sup>H RMN**).

Na determinação dos **ângulos de contacto dinâmicos** verificou-se que as membranas de PCL/GelMA+Irgacure apresentam maior hidrofiliçidade. No entanto, as de PCL/GelMA+Irgacure fotoreticuladas para além de apresentarem alguma hidrofiliçidade são as membranas que apresentam maior molhabilidade.

O estudo da **perda de massa** permitiu concluir que as membranas não fotoreticuladas apresentam maior perda de massa quando comparadas com as membranas fotoreticuladas. Em relação ao tempo de degradação, as membranas de PCL/GelMA UV como a perda de massa é menor apresentam um maior tempo de degradação.

A análise termogravimétrica (**TGA**) permitiu constatar que as membranas apresentam estabilidades térmicas muito próximas, não podendo tirar conclusões sobre qual a membrana mais termicamente estável. De uma forma geral, pode dizer-se que estas podem ser sujeitas a condições de esterilização ou outros processamentos que requeiram temperaturas mais elevadas.

A microscopia de varrimento eletrónica (**SEM**) foi usada para observar a morfologia das membranas. Nesta caracterização, verificou-se que a superfície das fibras de PCL/GelMA fotoreticuladas apresentam uma matriz mais compacta do que as de PCL/GelMA+Irgacure fotoreticuladas, que mostram as fibras muito mais definidas. Isto pode dever-se ao facto de as primeiras serem colocadas numa solução aquosa, fazendo com que a gelatina comece a “dissolver” e passe para a matriz das fibras. Enquanto que o processo de fotoreticulação das membranas de PCL/GelMA+Irgacure não se torna tão agressivo para a integridade das fibras. Pelas imagens de SEM, foi também possível determinar o diâmetro médio das fibras, observando que ambas apresentam diâmetros muito próximos.

O estudo da **libertação de fármaco** não foi conclusivo, uma vez que o Irgacure<sup>®</sup> 2959, que se encontra no revestimento das fibras, absorve o mesmo comprimento de onda que o Flurbiprofeno, que se encontra na membrana apenas a 1% junto com a PCL na fibra do núcleo, tendo influenciado a quantificação do fármaco.

Os estudos da viabilidade celular, com fibroblastos humanos, confirmaram a **biocompatibilidade** das membranas, constatando-se que todas as membranas produzidas não são citotóxicas e exibem uma boa adesão celular.

Face aos resultados obtidos, as membranas que melhores resultados apresentaram foram as de PCL/GelMA, não havendo vantagem em introduzir o fotoiniciador (Irgacure<sup>®</sup> 2959) antes de se produzirem as fibras.

## 5.2. Perspetivas futuras

Embora a medicina regenerativa tenha sido testada em vários campos, existem muitos estudos ainda por fazer. Este trabalho permitiu tirar várias conclusões em relação à produção de membranas de PCL/GelMA para regeneração óssea guiada, mas existem questões onde se pode aprofundar o conhecimento. De seguida são apresentados alguns tópicos de perspetivas futuras como:

- Testar uma nova concentração de fármaco ou outro fármaco, que tenha o mesmo efeito, mas que absorva noutra comprimento de onda, de forma obter resultados mais fidedignos;
- Tentar eliminar o Irgacure<sup>®</sup> 2959 que está na membrana;
- Avaliar a biocompatibilidade *in vivo*, de maneira a perceber como o material se comporta, quando em contacto com um organismo vivo, e se a sua aplicação é eficaz;
- Realização de testes de hemocompatibilidade analisando a trombogenicidade e índice hemolítico. Estas análises são importantes, pois avaliam o desempenho da matriz polimérica quando em contacto com o sangue, ou seja, se o material promove a formação de trombos e qual a quantidade de hemoglobina libertada para o plasma;
- Testar a tração, alongamento e resistência das membranas, para que se possa verificar se possuem as propriedades mecânicas essenciais, garantindo a sua estabilidade durante o seu manuseamento quando aplicadas.



## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Agarwal, S., Wendorff, J. H., Greiner, A. (2008). Use of electrospinning technique for biomedical applications. *Polymer*, 49(26), 5603-5621. doi: 10.1016/j.polymer.2008.09.014.
- Baker, S. R., Banerjee, S., Bonin, K., Guthold, M. (2016). Determining the mechanical properties of electrospun poly- $\epsilon$ -caprolactone (PCL) nanofibers using AFM and a novel fiber anchoring technique. *Materials Science and Engineering: C*, 59, 203-212. doi: 10.1016/j.msec.2015.09.102.
- Bártolo, P. J., Almeida, H. A., Rezende, R. A., Laoui, T., Bidanda, B. (2008). Chapter 8 Advanced Processes to Fabricate Scaffolds for Tissue Engineering. In Bidanda, B., Bártolo, P. (Eds.), *Virtual Prototyping & Bio Manufacturing in Medical Applications* (149-170). United States: Springer.
- Bhardwaj, N., & Kundu, S. C. (2010). Electrospinning: A fascinating fiber fabrication technique. *Biotechnology Advances*, 28(3), 325-347. doi: 10.1016/j.biotechadv.2010.01.004.
- Bruice, P. Y. (2007). NMR Spectroscopy. *Organic Chemistry* (526-528). Santa Barbara: Pearson Higher Education.
- Cantley, M. D., Zannettino, A. C. W., Bartold, P. M., Fairlie, D. P., Haynes, D. R. (2017). Histone deacetylases (HDAC) in physiological and pathological bone remodelling. *Bone*, 95, 162-174. doi: 10.1016/j.bone.2016.11.028.
- Caramella, C., Conti, B., Modena, T., Ferrari, F., Bonferoni, M. C., Genta, I., Rossi, S., Torre, M. L., Sandri, G., Sorrenti, M., Catenacci, L., Dorati, R., Tripodo, G. (2015). Controlled delivery systems for tissue repair and regeneration. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, 32(Part B), 206-228. doi: 10.1016/j.jddst.2015.05.015.
- Chong, E. J., Phan, T. T., Lim, I. J., Zhang, Y. Z., Bay, B. H., Ramakrishna, S., Lim, C. T. (2007). Evaluation of electrospun PCL/gelatin nanofibrous scaffold for wound healing and layered dermal reconstitution. *Acta Biomaterialia*, 3(3), 321-330. doi: 10.1016/j.actbio.2007.01.002.
- Chung, C. P., Kim, D. K., Park, Y. J., Nam, K. H., Lee, S. J. (1997). Biological effects of drug-loaded biodegradable membranes for guided bone regeneration. *Journal of Periodontal Research*, 32(1 Pt2), 172-175. ISSN: 0022-3484.

Correia, T. R., Ferreira, P., Vaz, R., Alves, P., Figueiredo, M. M., Correia, I. J. (2016). Development of UV cross-linked gelatin coated electrospun poly(caprolactone) fibrous scaffolds for tissue engineering. *International Journal of Biological Macromolecules*, 93 (Pt B), 1539-1548. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2016.05.045.

Dias, J. R. (2014). Hierarchical electrospun nanostructures for skin regeneration, PhD Thesis, Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar da Universidade do Porto.

Elzein, T., Nasser-Eddine, M., Delaite, C., Bistac, S., Dumas, P. (2004). FTIR study of polycaprolactone chain organization at interfaces. *Journal of Colloid and Interface Science*, 273, 381-387. doi: 10.1016/j.jcis.2004.02.001.

Fabian, H. & Mäntele, W. (2002). Infrared Spectroscopy of Proteins. *Handbook of Vibrational Spectroscopy*.

Figueiredo, M. (2013). Sizing Nanoparticles in Liquids: An Overview of Methods. In Coelho, J. (Eds.), *Drug Delivery Systems: Advanced Technologies Potentially Applicable in Personalised Treatment* (87-107). Netherlands: Springer.

Ghaly, M., Kerns, D. G., Hallmon, W. W., Solomon, E. S., Nagy, W. W., Al-Hashimi, I., Rossmann, J. A. (2013). Comparison of Guided Bone Regeneration using a Bovine Collagen Membrane vs a Calcium Sulfate Barrier. *Journal of Contemporary Dentistry*, 3(3), 138-143. doi: 10.5005/jp-journals-10031-1053.

Hamlekhan, A., Moztarzadeh, F., Mozafari, M., Azami, M., Nezafati, N. (2011). Preparation of laminated poly( $\epsilon$ -caprolactone)-gelatin-hydroxyapatite nanocomposite scaffold bioengineered via compound techniques for bone substitution. *Biomatter*, 1(1), 91-101. doi: 10.4161/biom.1.1.17445.

He, M., Xue, J., Geng, H., Gu, H., Chen, D., Shi, R., Zhang, L. (2015). Fibrous guided tissue regeneration membrane loaded with anti-inflammatory agent prepared by coaxial electrospinning for the purpose of controlled release. *Applied Surface Science*, 335, 121-129. doi: 10.1016/j.apsusc.2015.02.037.

Hubicka, U., Źuromska-Witek, B., Krzek, J., Walczak, M., Źylewski, M. (2012). Kinetic and Thermodynamic Studies of Moxifloxacin Hydrolysis in the Presence and Absence of Metal Ions in Acidic Solutions. *Acta Poloniae Pharmaceutica – Drug Research*, 69(5), 821-831. ISSN 0001-6837.

Hu, X., Liu, S., Zhou, G., Huang, Y., Xie, Z., Jing, X. (2014) Electrospinning of polymeric nanofibers for drug delivery applications. *Journal of Controlled Release*, 185, 12-21. doi: 10.1016/j.jconrel.2014.04.018.

Huang, Y., Huang, K., Yang, B., Ko, C., Huang, H. (2016). Fabrication of Novel Hydrogel with Berberine-Enriched Carboxymethylcellulose and Hyaluronic Acid as an Anti-Inflammatory Barrier Membrane. *BioMed Research International*, 2016, 3640182. doi: 10.1155/2016/3640182.

Kanungo, I., Chellapa, N., Fathima, N. N. (2015). Microfabrication of gelatin–polycaprolactone composites for customized drug delivery. *Materials Science and Engineering C*, 49, 597-603. doi: 10.1016/j.msec.2015.01.058.

Ke, R., Yi, W., Tao, S., Wen, Y., Hongyu, Z. (2017). Electrospun PCL/gelatin composite nanofiber structures for effective guided bone regeneration membranes. *Materials Science and Engineering C*, 78, 324-332. doi: 10.1016/j.msec.2017.04.084.

Kim, E., Han, G., Noh, S., Lee, J., Ito, Y., Son, T. (2017). Photo-reactive natural polymer derivatives for medical application. *Journal of Industrial and Engineering Chemistry*. doi: 10.1016/j.jiec.2017.05.029.

Konduru, V. (2010). Static and Dynamic Contact Angle Measurement on Rough Surfaces Using Sessile Drop Profile Analysis with Application to Water Management in Low Temperature Fuel Cells, Master Thesis, Department of Mechanical Engineering of Michigan Technology University.

Kosmala, A., Fitzgerald, M., Moore, E., Stam, F. (2016). Evaluation of Gelatin Modified Poly( $\epsilon$ -Caprolactone) Film as a Scaffold for Lung Disease. *Analytical Letters*, 50(1), 219-232. doi: 10.1080/00032719.2016.1163363.

Kumbar, S. G., Laurencin, C. T., Deng, M. (2014). Chapter 1: Polymer Synthesis and Processing. In Kariduraganavar, M. Y., Kittur, A. A., Kamble, R. R. (Eds.), *Natural and Synthetic Biomedical Polymers*. (1-31). USA: Elsevier.

Kumbar, S. G., Laurencin, C. T., Deng, M. (2014). Chapter 4: Natural Polymers: Polysaccharides and Their Derivatives for Biomedical Applications. In Aravamudhan, A., Ramos, D. M., Nada, A. A., Kumbar, S. G. (Eds.), *Natural and Synthetic Biomedical Polymers*. (67-89). USA: Elsevier.

Labet, M. & Thielemans, W. (2009). Synthesis of polycaprolactone: a review. *Chemical Society Reviews*, 38(12), 3484-3504. doi: 10.1039/b820162p.

Lee, S. & Kim, S. (2014). Membranes for the Guided Bone Regeneration. *Maxillofacial Plastic and Reconstructive Surgeons*, 36(6), 239-246. doi: 10.14402/jkamprs.2014.36.6.239.

Lim, Y. C., Johnson, J., Fei, Z., Wu, Y., Farson, D. F., Lannutti, J. J., Choi, H. W., Lee, L. J. (2010). Micropatterning and Characterization of Electrospun Poly( $\epsilon$ -Caprolactone)/Gelatin Nanofiber Tissue Scaffolds by Femtosecond Laser Ablation for Tissue Engineering Applications. *Biotechnology and Bioengineering*, 108(1), 116-126. doi: 10.1002/bit.22914.

Liu, J. & Kerns, D. G. (2014). Mechanisms of Guided Bone Regeneration: A Review. *The Open Dentistry Journal*, 8(Suppl 1-M3), 56-65. doi: 10.2174/1874210601408010056.

Lu, Y., Huang, J., Yu, G., Cardenas, R., Wei, S., Wujcik, E. K., Guo, Z. (2016). Coaxial electrospun fibers: applications in drug delivery and tissue engineering. *WIREs Nanomedicine and Nanobiotechnology*, 8(5), 654-677. doi: 10.1002/wnan.1391.

Ma, P. X. (2004). Scaffolds for tissue fabrication. *Materials Today*, 7(5), 30-40. doi: 10.1016/s1369-7021(04)00233-0.

Maitz, M. F. (2015). Applications of synthetic polymers in clinical medicine. *Biosurface and Biotribology*, 1(3), 161-176. doi: 10.1016/j.ejpb.2015.05.016.

Maroof, K., Zafar, F., Ali, H., Naveed, S. (2015). Flurbiprofen: A Potent Pain Reliever. *Bioequivalence & Bioavailability*, 7(1), 56-58. doi: 10.4172/jbb.1000214.

Morand, D.N., Davideau, J.L., Clauss, F., Jessel, N., Tenenbaum, H., Huck, O. (2017). Cytokines during periodontal wound healing: potential application for new therapeutic approach. *Oral Diseases*, 23(3), 300-311. doi:10.1111/odi.12469.

O'Brien, F. J. (2011). Biomaterials & scaffolds for tissue engineering. *Materials Today*, 14(3), 88-95. doi: 10.1016/s1369-7021(11)70058-x.

Oral Surgery & Dental Implant Center of Louisiana, Bone Grafting for Dental Implants. <http://www.louisianaoralsurgery.com/implant-dentistry/bone-grafting-for-dental-implants>.

Acedido a julho de 2017.



- Parida, P., Behera, A., Mishra, S. C. (2012). Classification of Biomaterials used in Medicine. *International Journal of Advances in Applied Sciences*, 1(3), 125-129. ISSN: 2252-8814.
- Park, Y. J., Lee, Y. M., Park, S. N., Lee, J. Y., Ku, Y., Chung, C. P., Lee, S. J. (2000). Enhanced guided bone regeneration by controlled tetracycline release from poly(L-lactide) barrier membranes. *Journal of Biomedical Materials Research*, 51(3), 391-397.
- Ratner, B. D., Hoffman, A. S., Schoen, F. J., Lemons, J. E. (2004). A Multidisciplinary Endeavor. In Ratner, B. D., Hoffman, A. S., Schoen, F. J., Lemons, J. E (Eds.), *Biomaterials Science* (1-9). United Kingdom: Elsevier Academic Press.
- Ratner, B. D., Hoffman, A. S., Schoen, F. J., Lemons, J. E. (2004). 8.4 Synthetic Bioresorbable Polymer Scaffolds. In Mikos, A. G., Lu, L., Temenoff, J. S., Tessmar, J. K. (Eds.), *Biomaterials Science* (735-749). United Kingdom: Elsevier Academic Press.
- Santos, J. M. C. (2014). Preparação de Bioadesivos a partir de Ácido Lático, Tese de Mestrado, Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade de Coimbra.
- Seal, B. L., Otero, T. C., Panitch, A. (2001). Polymeric biomaterials for tissue and organ regeneration. *Materials Science and Engineering*, 34(4-5), 147-230. doi: 10.1016/s0927-796x(01)00035-3.
- Sill, T. J., & von Recum, H. A. (2008). Electrospinning: Applications in drug delivery and tissue engineering. *Biomaterials*, 29(13), 1989-2006. doi: 10.1016/j.biomaterials.2008.01.011.
- Tian, H., Tang, Z., Zhuang, X., Chen, X., Jing, X. (2011). Biodegradable synthetic polymers: Preparation, functionalization and biomedical application. *Progress in Polymer Science*, 37(2), 237-280. doi: 10.1016/j.progpolymsci.2011.06.004.
- Vaz, R. I. L. (2016). Preparação de *scaffolds* por combinação das técnicas de fotoreticulação e *electrospinning* para engenharia de tecidos, Tese de Mestrado, Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade de Coimbra.
- Villar, C. C. & Cochran, D. L. (2010). Regeneration of Periodontal Tissues: Guided Tissue Regeneration. *Dental Clinics of North America*, 54(1), 73-92. doi: 10.1016/j.cden.2009.08.011.
- Vyazovkin, S. (2012). Thermogravimetric Analysis. *Characterization of Materials*, 1-12. doi: 10.1002/0471266965.com029.pub2.

Wang, J., Wang, L., Zhou, Z., Lai, H., Xu, P., Liao, L., Wei, J. (2016). Biodegradable Polymer Membranes Applied in Guided Bone/Tissue Regeneration: A Review. *Polymers*, 8(4), 115. doi: 10.3390/polym8040115.

Williams, D. (2004). Benefit and risk in tissue engineering. *Materials today*, 7(5), 24-29. doi: 10.1016/S1369-7021(04)00232-9.

Williams, D. F. (2008). On the mechanisms of biocompatibility. *Biomaterials*, 29, 2941-2953. doi: 10.1016/j.biomaterials.2008.04.023.

Xue, J., He, M., Liu, H., Niu, Y., Crawford, A., Coates, P. D., Chen, D., Shi, R., Zhang, L. (2014). Drug loaded homogeneous electrospun PCL/gelatin hybrid nanofiber structures for anti-infective tissue regeneration membranes. *Biomaterials*, 35, 9395-9405. doi: 10.1016/j.biomaterials.2014.07.060.

Xue, J., Shi, R., Niu, Y., Gong, M., Coates, P., Crawford, A., Chen, D., Tian, W., Zhang, L. (2015). Fabrication of drug-loaded anti-infective guided tissue regeneration membrane with adjustable biodegradation property. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 135, 846-854. doi: 10.1016/j.colsurfb.2015.03.031.

Yu, J. H., Fridrikh, S. V., Rutledge, G. C. (2004). Production of Submicrometer Diameter Fibers by Two-Fluid Electrospinning. *Advanced Materials*, 16(17), 1562-1566. doi:10.1002/adma.200306644.

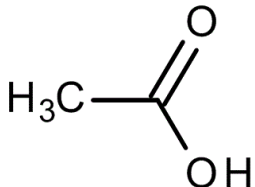
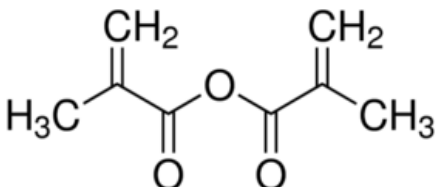
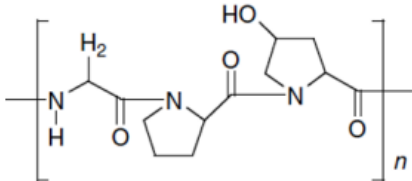
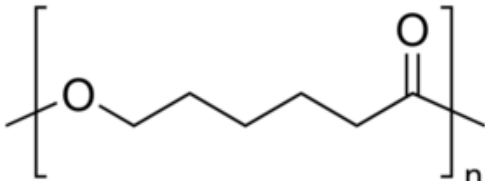
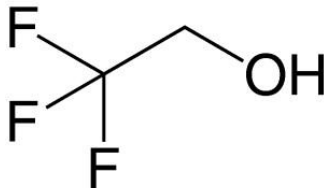
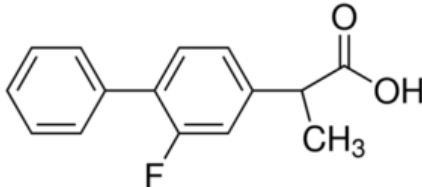
Zafar, M. S., Khurshid, Z., Almas, K. (2015). Oral Tissue Engineering Progress and Challenges. *Tissue Engineering and Regenerative Medicine*, 12(6), 387-397. doi: 10.1007/s13770-015-0030-6.

Zhang, Y., Huang Z., Xu, X., Lim, C. T., Ramakrishna, S. (2004). Preparation of Core-Shell Structured PCL-r-Gelatin Bi-Component Nanofibers by Coaxial Electrospinning. *Chemistry of Materials*, 16(18), 3406-3409. doi: 10.1021/cm049580f.

Zhu, T., Chen, S., Li, W., Lou, J., Wang, J. (2015) Flurbiprofen axetil loaded coaxial electrospun poly(vinyl pyrrolidone)-nanopoly(lactic- co-glycolic acid) core-shell composite nanofibers: Preparation, characterization, and anti-adhesion activity. *Journal of Applied Polymer Science*, 132(22), 41982. doi: 10.1002/app.41982.

## ANEXO A – Estrutura Química e outras informações dos compostos utilizados neste trabalho.

Tabela A.1 – Estrutura Química e outras informações dos compostos utilizados neste trabalho

Reagente	Considerações
 <p>Ácido Acético Glacial*</p>	<p>Fórmula molecular: C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>O<sub>2</sub></p> <p>Massa molecular: 60,06 g/mol</p> <p>Ponto de fusão: 16,2 °C</p> <p>Ponto de ebulição: 117-118 °C</p> <p>Densidade relativa: 1,05 g/mL</p>
 <p>Anidrido Metacrílico*</p>	<p>Fórmula molecular: C<sub>8</sub>H<sub>10</sub>O<sub>3</sub></p> <p>Massa molecular: 154,17 g/mol</p> <p>Ponto de ebulição: 87 °C</p> <p>Densidade relativa: 1,04 g/mL</p>
 <p>Gelatina Tipo A*</p>	<p>Origem: Pele suína</p> <p>Solubilidade (H<sub>2</sub>O): 50 mg/mL</p>
 <p>Policaprolactona*</p>	<p>Fórmula molecular: (C<sub>6</sub>H<sub>10</sub>O<sub>2</sub>)<sub>n</sub></p> <p>Massa molecular: 50 000 g/mol</p> <p>Ponto de fusão: 56-64 °C</p>
 <p>2,2,2-Trifluoroethanol*</p>	<p>Fórmula molecular: C<sub>2</sub>H<sub>3</sub>F<sub>3</sub>O</p> <p>Massa molecular: 100,04 g/mol</p> <p>Ponto de fusão: -44 °C</p> <p>Ponto de ebulição: 77-80 °C</p> <p>Densidade relativa: 1,37 g/mL</p>
 <p>Flurbiprofeno*</p>	<p>Fórmula molecular: C<sub>15</sub>H<sub>13</sub>FO<sub>2</sub></p> <p>Massa molecular: 244,26 g/mol</p> <p>Ponto de fusão: 110-112 °C</p>

\*Informação retirada de: <http://www.sigmaaldrich.com>

## ANEXO B – Solução tampão fosfato-salino (PBS)

Para preparar a solução tampão fosfato-salino (PBS), foram usados os seguintes materiais: dihidrogeno fosfato de potássio ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ); hidrogenofosfato disódico (dihidratado) ( $\text{Na}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ); cloreto de potássio (KCl); e cloreto de sódio (NaCl).

Na preparação de 1000 mL de PBS, adiciona-se 0,38 g de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 1,26 g de  $\text{Na}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , 0,2 de KCl e 8,1 g de NaCl a 1 L de água MiliQ.

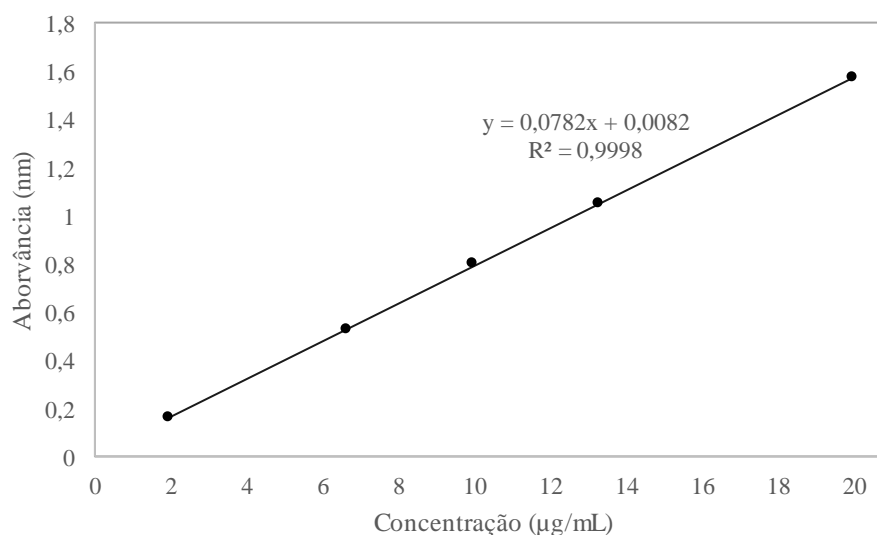
**ANEXO C – Protocolo da Curva de Calibração de Flurbiprofeno**

A curva de calibração de Flurbiprofeno é aplicada no estudo de libertação de fármaco, de modo a converter as absorvâncias medidas em concentrações de agente ativo, para cada amostra. Os materiais usados foram: PBS e Flurbiprofeno

Para fazer a curva de calibração iniciou-se com uma concentração de 20 µg/mL de Flurbiprofeno, diluindo-o 5 vezes. Sabendo que o pico de absorção ativo para o Flurbiprofeno é de 247 nm, determinou-se as absorvâncias para as diferentes concentrações através de um espectrofotómetro UV/VIS (Jasco-V550), apresentados na **Tabela C.1** e **Figura C.1**.

**Tabela C.1** – Concentração de soluções de Flurbiprofeno e respetivas absorvâncias.

Concentração (µg/mL)	Comprimento de Onda (nm)
20,00	1,57
13,33	1,05
10,00	0,80
6,67	0,52
2,00	0,16



**Figura C.1** – Curva de calibração de Flurbiprofeno.

Pela **Figura C.1** verifica-se que o coeficiente de correlação é próximo de 1, o que demonstra a linearidade do fármaco nesta gama.