

Marta Patrícia Carvalho dos Santos

# PREPARAÇÃO DE MEMBRANAS ELECTROFIADAS ASSIMÉTRICAS PARA REGENERAÇÃO DE PELE

Projeto de Tese na área científica de Engenharia Química, orientada pela Doutora Paula Cristina Nunes Ferreira Calvino e pela Doutora Patrícia de Jesus Pinto Alves e apresentada ao Departamento de Engenharia Química da Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade de Coimbra

Setembro, 2017



UNIVERSIDADE DE COIMBRA



Marta Patrícia Carvalho dos Santos

# PREPARAÇÃO DE MEMBRANAS ELECTROFIADAS ASSIMÉTRICAS PARA REGENERAÇÃO DE PELE

Projeto de Tese na área científica de Engenharia Química, orientada pela Doutora Paula Cristina Nunes Ferreira Calvino e pela Doutora Patrícia de Jesus Pinto Alves e apresentada ao Departamento de Engenharia Química da Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade de Coimbra

Setembro, 2017



“I have no special talent, I am only passionately curious”

Albert Einstein

## Agradecimentos

A todas as pessoas que contribuíram de forma direta ou indireta para a concretização deste trabalho, o meu sincero agradecimento.

Em primeiro lugar, obrigada à Dr.<sup>a</sup> Paula Ferreira e à Dr.<sup>a</sup> Patrícia Alves pelo conhecimento transmitido, orientação e otimismo ao longo de todo o processo.

Um agradecimento especial à Dr.<sup>a</sup> Patrícia Coimbra pelo incansável apoio e disponibilidade, pela simpatia, pela simplicidade e por toda a ajuda prestada. Gostaria de agradecer também à investigadora Filipa Martins Dias pela amabilidade com que sempre esclareceu as minhas dúvidas pontuais.

Queria ainda agradecer aos amigos e colegas que ao longo de todo o percurso académico me acompanharam. Um agradecimento especial à Catarina Peralta por ter sido a minha grande companheira de curso. Obrigada pela amizade, cumplicidade e por todos os bons momentos. Obrigada ainda às colegas de laboratório, pelos incentivos, companheirismo, bom ambiente e boa disposição que proporcionaram ao longo dos últimos meses e que foram fundamentais nesta etapa.

Um especial obrigada à Clara Allegro por todo o apoio desde o primeiro dia no DEQ, pela amizade e por todos os conselhos valiosos.

Gostaria ainda de agradecer aos meus grandes amigos António Albuquerque, António Allegro, Carlos Rodrigues, Inês Lucas e Joana Marta pelos anos de amizade, por todos os momentos partilhados e pelo apoio incondicional.

Um enorme agradecimento ao Ricardo, pelo amor, paciência, compreensão e dedicação. Obrigada por todas as palavras de incentivo.

Por fim gostaria de agradecer à minha família, em especial aos meus Pais, irmã, avós e tio. Obrigada pelo apoio, compreensão, carinho, por acreditarem nas minhas capacidades e por proporcionarem a realização deste meu percurso. Sem vocês não seria possível.

A todos o meu sincero agradecimento,

Marta Santos









## Resumo

Zonas danificadas na pele resultantes de traumatismos, queimaduras ou feridas diabéticas são usualmente reparadas recorrendo à utilização de enxertos de pele. Os problemas associados à abordagem tradicional criaram a necessidade da pesquisa por novas alternativas. Apesar de existirem diferentes materiais a ser desenvolvidos para esta finalidade, há um especial destaque para as matrizes fibrosas tridimensionais (*scaffolds*) biodegradáveis produzidas por *electrospinning*. Estas possuem características únicas como a porosidade e microestrutura necessárias para o crescimento de um novo tecido.

O objetivo da presente dissertação é a produção de membranas fibrosas assimétricas com uma camada externa composta por polímero sintético (policaprolactona) e uma camada interna composta por polímeros naturais (gelatina e quitosano) e antibiótico moxifloxacina, recorrendo à técnica *electrospinning* por *blending*. O *scaffold* resultante combina as propriedades mecânicas e hidrofóbicas da PCL, necessárias para a proteção da ferida, as propriedades favoráveis à adesão celular da gelatina e as propriedades antimicrobianas do quitosano. A camada composta por polímeros naturais apresentam ainda elevada biocompatibilidade e carácter hidrofílico. A adição do antibiótico moxifloxacina auxilia na proteção da zona danificada de infeções bacterianas.

De modo a aumentar a resistência mecânica dos polímeros naturais e retardar dissolução da camada interna começou-se pela realização da reação de modificação da gelatina e do quitosano, utilizando anidrido metacrílico. Desta reação resultam os polímeros modificados (GelMA e QSMA), contendo o grupo metacrilamida na sua estrutura. É a introdução deste grupo que permite a reticulação da camada composta por GelMA e QSMA quando mergulhada numa solução de Irgacure® 2959 e sujeita à radiação UV.

Após a obtenção da GelMA e QSMA foram preparadas as soluções a introduzir no *electrospinning*. Foram produzidas membranas apenas com PCL, apenas com GelMA e QSMA, membranas assimétricas contendo as duas camadas (com e sem fotoreticulação), e membranas assimétricas com moxifloxacina fotoreticuladas. Por fim foram realizados testes de modo a estudar as propriedades físico-químicas, morfológicas, térmicas e biológicas das matrizes desenvolvidas.

A análise de RMN permitiu verificar que ocorreu a reação de modificação tanto da gelatina como do quitosano. Os espetros de FTIR-ATR comprovaram a presença dos diferentes polímeros usados na produção das membranas. Nas membranas assimétricas reticuladas a identificação dos polímeros naturais não foi possível devido à menor quantidade

presente após o processo de reticulação, que é responsável pela dissolução de parte desta camada. As imagens de SEM permitiram observar a presença de *beads* (“grânulos”), principalmente nas fibras de PCL, e concluir que o diâmetro médio das fibras de PCL é superior ao das fibras de GelMA e QSMA. Relativamente ao ângulo de contacto dinâmico, confirmou a hidrofobicidade da membrana de PCL e a hidrofiliicidade da membrana de GelMA e QSMA. Os ensaios de perda de massa mostraram que a PCL não sofre dissolução em meio aquoso e que as membranas com GelMA e QSMA reticulados apresentam menor percentagem de perda de massa que as mesmas membranas não reticuladas, indicando que ocorreu a reação de reticulação. Quanto à análise termogravimétrica, concluiu-se que as membranas finais são termicamente estáveis, podendo ser sujeitas a elevadas temperaturas sem comprometer as propriedades dos materiais. Os testes de biocompatibilidade mostraram que os fibroblastos dermais proliferam quando em contacto com os materiais, mostrando que estes são biocompatíveis. Por fim, os ensaios de libertação da moxifloxacina indicaram uma maior libertação nas primeiras 8h de contacto com o meio, sendo que a partir desse momento a libertação se dá a uma taxa menor até ao décimo quarto dia.

Apesar de serem necessários vários ajustes e a otimização de todos os parâmetros envolvidos no processo, os resultados alcançados indicam que as membranas assimétricas de PCL, GelMA, QSMA e moxifloxacina têm potencial para a aplicação em feridas cutâneas.

**PALAVRAS-CHAVE:** Regeneração da pele, electrofiação, *scaffolds*, fibras, policaprolactona, gelatina, quitosano, moxifloxacina, fotoreticulação, biodegradabilidade, biocompatibilidade.

## Abstract

Skin damaged areas, caused by traumatism, skin burns or diabetic wounds are currently treated using the graft technique. The problems associated to this traditional approach have created the need of research for new alternatives. Despite the different materials that had been developed to this application, there is a especial emphasis on biodegradable three-dimensional fibrous matrices (scaffolds) produced by the electrospinning technique. These have unique characteristics such as its porosity and microstructure required to the new tissue growing.

The aim of this work is the production of fibrous asymmetric membranes with an outer layer composed by the synthetic polymer polycaprolactone and an inner layer composed by natural polymers (gelatin and chitosan) and antibiotic moxifloxacin, using the blending electrospinning technique. The resulting scaffold combines the mechanical and hydrophobic properties of PCL, needed to the wound protection, gelatin cell adhesion properties and chitosan antimicrobial properties. The layer composed by natural polymers also has excellent biocompatibility and hydrophilic characteristics. The addition of moxifloxacin protects the damaged area from bacterial infections.

In order to increase the mechanic resistance of the natural polymers and delay the dissolution of que inner layer, was carried out the reaction of modification of gelatin and chitosan using methacrylic anhydride. From this reaction resulted the modified polymers (GelMA and QSMA), containing the methacrylic groups. The introduction of this group allows the crosslinking reaction of the GelMA and QSMA layer, when immersed in an Irgacure® 2959 solution and subjected to UV radiation.

After obtaining the GelMA and QSMA, the solutions were ready to be introduced in electrospinning. There were produced PCL membranes, GelMA and Chitosan membranes, asymmetric membranes containing the two layers (with and without photocrosslinking), and photocrosslinked asymmetric membranes with moxifloxacin. Tests were carried out for all membranes, in order to study their physical, chemical, morphological, thermal and biological properties.

The NMR analysis showed that the reaction of modification of both gelatin and chitosan occurred. The FTIR-ATR spectra confirmed the presence of the different polymers used to produce the membranes. In crosslinked asymmetric membranes the identification of the natural polymers was not possible due to the smaller amount present after the crosslinking process, which is responsible for the dissolution of part of this layer. The SEM images allowed to observe the presence of beads, mainly in the PCL fibers, and to conclude that the average

diameter of the PCL fibers is superior in the GelMA and QSMA fibers. The dynamic water contact angle measurements confirmed the hydrophobicity of the PCL membrane and a hydrophilicity of the GelMA and QSMA membrane. The weight loss study showed that PCL does not dissolve in the aqueous medium and that the membranes with crosslinked GelMA and QSMA presented lower percentage of weight loss than their non-crosslinked counterparts, proving that the crosslinking reaction occurred. The thermogravimetric analysis showed that final membranes are thermally stable, allowing be subjected to high temperatures without compromising the properties of the materials. The biocompatibility tests showed that dermal fibroblasts proliferate when in contact with the materials, proving their biocompatibility. Finally, the drug release study indicated a higher release in the first 8 hours of contact with the medium, and a lower rate until the fourteenth day.

Although several adjustments and optimization of all parameters involved in the process are required, the results indicate that asymmetric membranes of PCL, GelMA, QSMA and moxifloxacin are suitable for application in skin wounds.

**PALAVRAS-CHAVE:** Skin regeneration, electrospinning, scaffolds, fibers, polycaprolactone, gelatin, chitosan, moxifloxacin, photocrosslinking, biodegradability, biocompatibility.





# Índice

Motivação, objetivos e estrutura da dissertação .....	1
Capítulo 1. Introdução .....	3
1.1. Engenharia de tecidos.....	3
1.2. Biomateriais .....	3
1.2.1. Polímeros biodegradáveis.....	5
1.2.1.1. Naturais .....	5
Gelatina .....	6
Quitina e quitosano.....	6
1.2.1.2. Sintéticos.....	7
Poli ( $\epsilon$ -caprolactona) .....	8
1.3. Estrutura da Pele.....	9
1.4. <i>Scaffolds</i> .....	10
1.4.1. Requisitos dos <i>scaffolds</i> .....	10
1.4.2. Requisitos dos <i>scaffolds</i> para regeneração da pele .....	11
1.4.2.1. Membranas assimétricas como <i>scaffolds</i> para a regeneração da pele .....	12
1.4.2.2. <i>Scaffolds</i> para regeneração da pele produzidos por <i>electrospinning</i> com incorporação de fármacos .....	12
1.5. <i>Electrospinning</i> .....	13
1.5.1. Tipos de <i>electrospinning</i> .....	15
1.5.2. Efeito dos parâmetros no <i>electrospinning</i> .....	15
1.5.2.1. Efeito da voltagem aplicada.....	16
1.5.2.2. Efeito do caudal de solução .....	16
1.5.2.3. Efeito da distância entre agulha e coletor .....	16
1.5.2.4. Efeito da concentração de polímero e da viscosidade da solução .....	17

1.5.2.5. Efeito da condutividade da solução .....	17
1.5.2.6. Papel do solvente no <i>electrospinning</i> .....	18
1.5.2.7. Efeito da humidade e da temperatura.....	18
1.6. Libertação controlada de fármacos .....	19
1.6.1. Técnicas para a incorporação de fármacos .....	20
1.6.1.1. Mistura ( <i>Blend</i> ) .....	20
1.6.1.2. Modificação da superfície.....	21
1.6.1.3. Outras abordagens em <i>electrospinning</i> .....	21
1.6.2. Mecanismos de libertação controlada de fármacos .....	21
1.6.3. Moxifloxacina.....	23
Capítulo 2. Objetivos experimentais.....	24
Capítulo 3. Materiais e métodos .....	26
3.1. Materiais.....	26
3.2. Procedimento.....	28
3.2.1. Modificação da gelatina.....	28
3.2.2. Modificação do quitosano .....	29
3.2.3. Preparação soluções para o <i>electrospinning</i> .....	30
3.2.4. Preparação das membranas por <i>electrospinning</i> .....	31
3.2.5. Fotoreticulação dos <i>scaffolds</i> .....	31
3.3. Caracterização .....	32
3.3.1. Ressonância Magnética Nuclear (RMN) .....	33
3.3.2. Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier com Reflexão Total Atenuada (FTIR-ATR).....	33
3.3.3. Microscopia eletrónica de varrimento (SEM) .....	33
3.3.4. Determinação de ângulos de contacto dinâmicos.....	34



3.3.5. Estudos de perda de massa .....	34
3.3.6. Termogravimetria (TGA) .....	35
3.3.7. Biocompatibilidade.....	35
3.3.7.1. Cultura celular de fibroblastos .....	36
3.3.7.2. Estudo da viabilidade celular .....	36
3.3.8. Estudo da libertação do fármaco moxifloxacina .....	37
Capítulo 4. Resultados e discussão .....	38
4.1. Análise RMN dos polímeros naturais antes e após modificação .....	38
4.2. Síntese dos <i>scaffolds</i> .....	39
4.3. Caracterização físico-química e morfológica dos <i>scaffolds</i> .....	40
4.3.1. FTIR-ATR .....	40
4.3.2. SEM.....	44
4.4. Ângulos de contacto dinâmicos.....	48
4.5. Estudo de perda de massa.....	49
4.6. Análise Termogravimétrica.....	50
4.7. Biocompatibilidade .....	55
4.7.1. Estudo da viabilidade celular.....	55
4.7. Estudo da libertação do fármaco moxifloxacina.....	57
Capítulo 5. Conclusões e trabalho futuro.....	58
5.1. Conclusões gerais.....	58
5.2 Trabalho futuro.....	59
Referências Bibliográficas .....	61
Anexo A - Preparação de PBS .....	a
Anexo B - Curva de calibração da Moxifloxacina.....	b

## Índice de figuras

Figura 1-Formação da gelatina por hidrólise do colagénio. ....	6
Figura 2-Estrutura da quitina. ....	7
Figura 3-Estrutura do quitosano. ....	7
Figura 4-Estrutura da policaprolactona. ....	8
Figura 5-Esquema de um corte ao longo das várias camadas da pele (Adaptado de [24]). ....	9
Figura 6-Formação do cone de Taylor (adaptado de [28]). ....	14
Figura 7-Representação do esquema de montagem do equipamento de electrospinning. ....	14
Figura 8-Esquema de fibras obtidas por electrospinning coaxial e blending. ....	15
Figura 9-Perfil da concentração de fármaco no sangue para diferentes tipos de dosagem. ...	19
Figura 10-Ilustração dos mecanismos de biodegradação superficial e na massa. ....	22
Figura 11-Estrutura da moxifloxacina. ....	23
Figura 12-Representação esquemática da membrana assimétrica e sua aplicação. ....	24
Figura 13-Esquema do procedimento seguido para a obtenção da membrana assimétrica final .....	25
Figura 14-Mecanismo de síntese de gelatina metacrilada (adaptado de [15]). ....	28
Figura 15-Esquema de montagem da liofilização. ....	29
Figura 16-Mecanismo de síntese de quitosano modificado. ....	29
Figura 17-Esquema de montagem do sistema de electrospinning. ....	31
Figura 18-Reação de reticulação com Irgacure® 2959 e radiação UV (adaptado de [15]). ...	32
Figura 19-Estruturas e espetros RMN da gelatina e gelatina modificada. ....	38
Figura 20-Estruturas e espetros RMN do quitosano e quitosano modificado. ....	38
Figura 21- Membranas produzidas por electrospinning: membrana de PCL (A) e membrana assimétrica de PCL, GelMA, QSMA e Moxifloxacina (B). ....	40
Figura 22-Espetros FTIR-ATR da gelatina, GelMA, quitosano e QSMA. ....	40

Figura 23-Espetros FTIR-ATR da GelMA, QSMA e da membrana de GelMA e QSMA. .....	42
Figura 24-Espetros FTIR-ATR da membrana de PCL, membrana de GelMA e QSMA e membrana de PCL, GelMA e QSMA. ....	42
Figura 25-Espetros FTIR-ATR da membrana de PCL, GelMA e QSMA antes e após a reticulação e da membrana de PCL, GelMA, QSMA e Moxifloxacina reticulada.....	44
Figura 26- Imagens da superfície da membrana de PCL obtidas por SEM a ampliações de 2 000x, 5 000x, 20 000x e 50 000 (A, B, C e D respetivamente) e histograma dos diâmetros das fibras (E). ....	45
Figura 27-Imagens da superfície da membrana de polímeros naturais (não reticulada) obtidas por SEM a ampliações de 2 000x, 5 000x, 20 000x e 50 000x (A, B, C e D respetivamente) e histograma dos diâmetros das fibras (E).....	45
Figura 28-Imagens da superfície da membrana de polímeros naturais (reticulada) obtidas por SEM a ampliações de 2 000x, 5 000x, 20 000x e 50 000x (A, B, C e D respetivamente) e histograma dos diâmetros das fibras (E).....	46
Figura 29-Ângulos de contacto dinâmicos das membranas produzidas por electrospinning. .....	48
Figura 30-Curvas termogravimétricas e DTG para o quitosano e QSMA.....	51
Figura 31-Curvas termogravimétricas e DTG para a gelatina e GelMA. ....	51
Figura 32-Curvas termogravimétricas e DTG para a membrana de PCL, membrana de GelMA e QSMA e membrana de PCL, GelMA, QSMA. ....	52
Figura 33-Curva termogravimétricas e DTG para a membrana de PCL, GelMA e QSMA reticulada e não reticulada e membrana de PCL, GelMA, QSMA e moxifloxacina reticulada.....	53
Figura 34-Percentagem de viabilidade celular dos fibroblastos após 1, 3 e 7 dias de contacto com as membranas assimétricas reticuladas com e sem fármaco. Controlo negativo com células vivas (K-) e controlo positivo com células mortas (K+).....	55
Figura 35-Imagens obtidas por microscópio ótico das culturas celulares de fibroblastos para as diferentes membranas estudadas e para o controlo negativo (K <sup>-</sup> ) e positivo (K <sup>+</sup> ) ao fim de 1, 3 e 7 dias. ....	56
Figura 36-Perfil de libertação da moxifloxacina contida na membrana assimétrica em água miliQ.....	57

## Índice de tabelas

Tabela 1-Resumo das membranas produzidas por electrospinning. ....	25
Tabela 2- Lista de materiais, respetivas informações e aplicação a que se destinaram. ....	26
Tabela 3- Polímeros, solventes e condições de operação utilizados em cada tipo de solução polimérica. ....	30
Tabela 4-Bandas características da ligação amida num espetro obtido por FTIR-ATR [49]. ....	41
Tabela 5-Diâmetros médios das fibras que compõem as membranas obtidas por electrospinning. ....	46
Tabela 6-Valores de percentagem de perda de massa obtidos para cada membrana. ....	49
Tabela 7-Valores de temperatura de degradação inicial e final, percentagem de perda de massa e DTG. ....	54

## Lista de abreviaturas

**AA-** Ácido acético

**ADN-** Ácido desoxirribonucleico

**DMEM-F12-** Meio Eagle modificado por Dulbecco

**DTG-** Temperatura de degradação derivada

**ECM-** Matriz extracelular

**ET-** Engenharia de tecidos

**FBS-** Soro fetal bovino

**FDA-** *Food and drug administration*

**FTIR-ATR-** Infravermelho por Transformada de Fourier com Reflexão Total Atenuada

**GAG-** Glicosaminoglicanos

**GelMA-** Gelatina metacrilada

**IPN-** Instituto Pedro Nunes

**Irg2959-** Irgacure 2959

**IV-** Infravermelho

**MAA-** Anidrido metacrílico

**MTS-** *3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium*

**MTS/PMS-** *3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium/phenazine methosulfate*

**NHDF-** Fibroblastos normais dermais humanos

**PBS-** Tampão fosfato salino

**PCL-** Poli ( $\epsilon$ -caprolactona)

**PVD-** *Physical vapor deposition*

**QSMA-** Quitosano metacrilado

**RMN-** Ressonância magnética nuclear

**SEM-** Microscopia eletrônica de varrimento

**SLC-** Sistemas de liberação controlada

**T<sub>f</sub>**- Temperatura de fusão

**TFE-** Trifluoroetanol

**T<sub>g</sub>**- Temperatura de transição vítrea

**TGA**- Análise termogravimétrica

**UV**- Ultravioleta











## Motivação, objetivos e estrutura da dissertação

A engenharia de tecidos tem vindo a evoluir e a ganhar cada vez mais expressão na medicina, procurando solucionar diversos problemas de forma menos agressiva, mais rápida e minimizando os riscos para o paciente. Uma das aplicações da engenharia de tecidos está relacionada com a utilização de *scaffolds* (matrizes tridimensionais) que funcionam como suporte para a regeneração da pele [1]. A pele possui um papel crucial na proteção do corpo e apesar de possuir a capacidade de se auto-regenerar, caso esse processo seja perturbado ou a área da lesão seja demasiado extensa, a regeneração não ocorre de forma eficaz. Neste sentido, é vantajoso recorrer a *scaffolds* que suportam o crescimento do novo tecido. Desta forma é reduzida a necessidade de recorrer a dadores de pele que, para além de insuficientes face às necessidades, acarretam problemas adicionais como a possibilidade de rejeição por parte do paciente [2]. Do ponto de vista estético, os *scaffolds* permitem ainda melhorar significativamente o aspeto da área danificada, uma vez que reduzem substancialmente a formação de cicatrizes [3].

A presente dissertação tem como objetivo a produção de membranas assimétricas com ação farmacológica para regeneração da pele, utilizando a técnica de *electrospinning*. As referidas membranas apresentam essencialmente três funções: a proteção da área danificada de agressões externas e infeções, o suporte para o crescimento de novo tecido e a aceleração da regeneração desse mesmo tecido. Para tal, a membrana é constituída por duas camadas distintas: a camada externa composta por policaprolactona (PCL) e a camada interna constituída por gelatina, quitosano e o antibiótico moxifloxacina. A camada de PCL (polímero sintético), para além possuir características hidrofóbicas que imitam a camada exterior da pele e evitam a desidratação, confere resistência mecânica à membrana e permite proteger a zona da ferida de agressões externas. A camada interna do *scaffold* tem caráter hidrofílico e contém gelatina e quitosano (modificados), dois polímeros naturais que apresentam grande biocompatibilidade, embora menor resistência mecânica que a PCL. Entre outras características, a gelatina apresenta propriedades favoráveis à adesão celular e o quitosano apresenta propriedades antimicrobianas. Combinando os vários polímeros enunciados, conseguem-se otimizar as características finais da membrana, de modo a que esta possa ter a aplicação desejada. A adição do antibiótico moxifloxacina à camada interna da membrana ajuda a evitar a ocorrência de infeções provocadas por bactérias durante o período de regeneração, melhorando assim o desempenho do *scaffold*.

Ambas as camadas da membrana assimétrica são compostas por fibras, produzidas pela técnica de *electrospinning*. As fibras conferem à membrana a estrutura porosa necessária para

a adesão e proliferação celular, sendo que à medida que se dá o crescimento do novo tecido cutâneo, a membrana vai biodegradando e sendo substituída pela pele recém-formada [4].

A presente dissertação encontra-se organizada em 5 capítulos principais. O Capítulo 1 contém uma introdução teórica, que visa fazer o enquadramento dos vários conceitos associados ao tema, como a engenharia de tecidos, os biomateriais, a estrutura da pele, o princípio de funcionamento do *electrospinning* e a incorporação de fármacos.

No Capítulo 2 são apresentados os objetivos experimentais e resumidas as etapas percorridas até à obtenção das membranas finais.

O Capítulo 3 incide sobre os materiais e métodos utilizados, sendo que é neste capítulo que são detalhados todos os procedimentos experimentais realizados tanto para a produção das membranas, como para a sua caracterização físico-química, testes de biocompatibilidade e estudos de libertação do fármaco.

O Capítulo 4 é direcionado para a discussão dos resultados obtidos a partir das técnicas descritas no capítulo anterior e o Capítulo 5 para as conclusões finais do trabalho e perspetivas futuras.

# Capítulo I. Introdução

## I.1. Engenharia de tecidos

Doenças, lesões e traumatismos podem conduzir a danos e degeneração de órgãos e tecidos no corpo humano, que necessitam de tratamentos para facilitar a sua reparação, substituição ou regeneração [5]. O tratamento de lesões graves na pele normalmente baseia-se no transplante de pele de um local para outro no mesmo paciente (um autoenxerto) ou de um indivíduo para outro (um aloenxerto). Embora estas abordagens tenham revolucionado a problemática da regeneração de tecidos, existem algumas restrições em ambas as técnicas. A colheita de autoenxertos é dispendiosa, dolorosa e limitada por questões anatómicas, infeções e hematomas. Os aloenxertos também apresentam problemas como a insuficiência de tecido a aplicar em todos os pacientes, os riscos de rejeição pelo sistema imunológico do paciente e a possibilidade de infeção ou transmissão de doenças do doador para o recetor [2].

A engenharia de tecidos (ET) é uma área interdisciplinar que oferece uma alternativa às técnicas convencionais e tem como objetivo regenerar os tecidos danificados em vez de substituí-los, desenvolvendo dispositivos ou sistemas biológicos que restauram, mantêm ou melhoram a função do tecido original [1], [2]. Sendo uma área muito interdisciplinar, requer conhecimentos provenientes de diversas áreas como biotecnologia, engenharia química, engenharia biomédica, biomateriais, física, química, biologia molecular, entre outras [5]. Deste modo, desenvolvem-se substitutos para órgãos e tecidos doentes ou danificados e o seu sucesso baseia-se essencialmente na matriz ideal que suporta adesão e proliferação celular [2], [6].

Existem várias abordagens que têm sido usadas em engenharia de tecidos tais como a utilização de células isoladas (do paciente) para substituição de células danificadas; a utilização de substâncias de indução como fatores de crescimento (que promovem adesão, proliferação, migração e diferenciação celulares) ou ainda a utilização de matrizes tridimensionais que funcionam como suporte físico para a adesão e proliferação das células (*scaffolds*) [7], [5].

Existem diversos métodos de preparação destes scaffolds (filmes, géis, nanopartículas, fibras poliméricas). Um dos métodos mais promissores é a preparação de matrizes tridimensionais formadas por fibras poliméricas produzidas pela técnica de *electrospinning*.

## I.2. Biomateriais

Os materiais utilizados em engenharia de tecidos são denominados de biomateriais. Define-se biomaterial como aquele que está em contacto com fluídos ou tecidos biológicos e que faz parte de uma estrutura viva ou um dispositivo médico. O uso de biomateriais tem o objetivo de melhorar ou substituir uma função natural de um sistema biológico. Aplicam-se

biomateriais em áreas como medicina e farmácia, sendo que uma das vertentes destes materiais é a sua combinação com sistemas de libertação controlada de fármacos [2].

Para poderem ser utilizados como biomateriais, há alguns requisitos que devem ser cumpridos como a biocompatibilidade, a degradabilidade adequada à aplicação a que se destina e a não toxicidade. Para além disso devem ser passíveis de ser esterilizados sem perderem as propriedades originais [5], [8].

Os *scaffolds* utilizados como matrizes para regeneração de tecidos podem ser fabricados recorrendo a vários tipos de materiais: cerâmicos, metálicos, poliméricos ou compósitos. Dependendo do tipo de aplicação, assim se determina a escolha do material [2]. Os cerâmicos e metálicos são indicados para tecidos duros; os poliméricos são utilizados maioritariamente em aplicações para tecidos moles. Os materiais compósitos são constituídos por mais que um tipo de material e têm a particularidade de combinar as propriedades de cada um de modo a tirar partido das suas vantagens individuais e assim conseguirem características que não se conseguiriam utilizando apenas um dos tipos de material [2].

Os materiais metálicos possuem elevada resistência mecânica, elevada condutividade elétrica e térmica, e resistem a elevadas forças de tensão. No entanto, podem sofrer corrosão, são pouco biocompatíveis, muito densos e difíceis de fabricar. São utilizados maioritariamente para fios de sutura, raízes de implantes dentários, próteses de anca, joelho, vértebras, mandíbula e crânio [8], [9].

Os materiais cerâmicos resistem à corrosão, são inertes e possuem elevada biocompatibilidade e dureza. A condutividade térmica destes materiais é inferior à dos metais e são geralmente bons isolantes elétricos. Contudo são mais frágeis, não resilientes (quebram em vez de deformarem), pouco resistentes ao impacto, e exigem condições de processamento mais severas (elevadas pressões e temperaturas). Estes materiais são aplicados em ortopedia, dispositivos cardiovasculares, neuroestimulação e medicina dentária [2], [8], [9].

Podem ser usados como biomateriais polímeros naturais ou polímeros sintéticos, quer sejam biodegradáveis quer não biodegradáveis. De uma forma geral os materiais poliméricos são facilmente produzidos e a menor custo, são resistentes, pouco densos, possuem elevada resistência elétrica e podem ter características como a elasticidade e flexibilidade. A principal desvantagem é o facto de se deformarem ao longo do tempo, devido às suas fracas propriedades mecânicas. Este tipo de materiais é usado em suturas, encaixes de quadril, *stents* vasculares, ligamentos artificiais, e outras aplicações em tecidos moles [2], [5], [10].

Os materiais compósitos combinam dois ou mais dos tipos de materiais referidos e possuem propriedades intermédias entre eles, sendo favoráveis na medida em que tiram partido das vantagens de cada um. Estes materiais são normalmente inertes, possuem boa

compatibilidade, resistência à corrosão e são produzidos à medida da aplicação. O seu difícil processamento e elevado custo de produção são as principais desvantagens. São usados em aplicações como válvulas cardíacas artificiais, cimentos dentários e ósseos e implantes de articulações [2], [8].

Na presente dissertação, os *scaffolds* produzidos para regeneração da pele são materiais compósitos, sendo que se conjugam diferentes polímeros (naturais e sintéticos) para produzir a membrana final. Este tipo de materiais é usado uma vez que permite desenvolver mais facilmente membranas com as características ótimas para a aplicação pretendida, tais como a resistência, porosidade e microestrutura [2], [8], [9].

## 1.2.1. Polímeros biodegradáveis

### 1.2.1.1. Naturais

Os polímeros naturais apresentam geralmente biocompatibilidade e propriedades bioativas melhores do que os polímeros sintéticos. Estas características devem-se ao facto de serem semelhantes às macromoléculas com as quais o ambiente biológico está preparado para lidar metabolicamente. Este tipo de polímeros favorece a proliferação e diferenciação celular, facilitando a regeneração dos tecidos. Para além disso, acarretam menos problemas a nível de toxicidade e reações inflamatórias [5], [11].

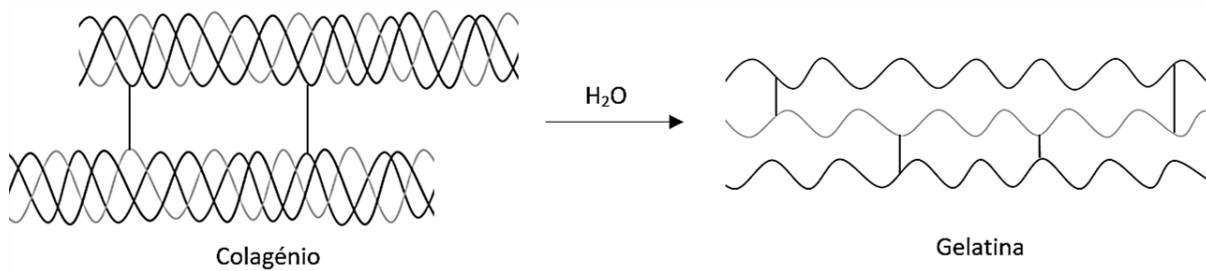
Como desvantagem, os polímeros naturais são muito heterogéneos (dependentes das condições e dos organismos onde se formaram), pelo que se torna difícil controlar o seu peso molecular e ramificações. Para além disso têm de ser purificados de modo a evitar a transmissão de doenças, principalmente se forem de origem animal. Outra desvantagem dos polímeros naturais prende-se com o facto de estes se degradarem a temperaturas inferiores ao seu ponto de ebulição, dificultando a sua utilização. Uma vez que apresentam algumas limitações como a sua fácil degradação enzimática, fácil hidrólise das ligações entre monómeros e fraca resistência mecânica, recorre-se por vezes à sua reticulação (*crosslinking*) ou combinação com polímeros sintéticos. No caso da regeneração da pele, ao reticular e combinar polímeros naturais com polímeros sintéticos, obtém-se um produto final com melhores propriedades mecânicas e por isso mais adequado à aplicação em questão [12].

Os polímeros naturais podem ser divididos em três grandes grupos: as proteínas (colagénio, gelatina, elastina, queratina, fibrina, etc.), os polissacarídeos (ácido hialurónico, celulose, amido, agarose, quitosano, etc.) e os polinucleótidos (ácido desoxirribonucleico e ácido ribonucleico) [5]. Os monómeros que constituem as proteínas são os aminoácidos. No

caso dos polissacarídeos, as unidades de repetição são os monossacarídeos e nos polinucleótidos são os nucleótidos.

## Gelatina

A gelatina é uma biomacromolécula obtida como produto da hidrólise da proteína mais abundante na pele, o colagénio (Figura 1) [13].



*Figura 1-Formação da gelatina por hidrólise do colagénio.*

Existem vários tipos de colagénio, no entanto, a gelatina deriva apenas do colagénio do tipo I, que pode ser proveniente de duas fontes distintas: bovina ou suína. Dependendo das condições de processamento do colagénio (temperatura, pH e duração do processo), a gelatina pode ter diferentes características. No caso da gelatina do tipo A, as condições de pré-tratamento são ácidas, enquanto a gelatina do tipo B provém de um pré-tratamento alcalino. Uma vez que o ponto isoelétrico da gelatina do tipo A é mais próximo do pH do organismo (entre 7 e 9), esta é usada preferencialmente em engenharia de tecidos [14].

A gelatina é uma proteína solúvel em água, exibe boa biocompatibilidade, baixa imunogenicidade e permite um elevado crescimento celular, pelo que é usada em aplicações biomédicas e farmacêuticas [5]. A limitação da gelatina para este tipo de aplicações consiste no facto de esta se dissolver facilmente à temperatura fisiológica (aproximadamente 37 °C). Para colmatar esta desvantagem procede-se frequentemente à sua reticulação, o que melhora também as propriedades mecânicas, sem comprometer a biocompatibilidade [15].

## Quitina e quitosano

A quitina e o quitosano são copolímeros constituídos por unidades de 2-acetamido-2-desoxi-D-glicopiranosose e 2-amino-2-desoxi-D-glicopiranosose unidas por ligações glicosídicas  $\beta$ . Estes polissacarídeos são biocompatíveis, biodegradáveis e os seus produtos de degradação são inofensivos. A quitina é o segundo polímero mais abundante na natureza e tem origem essencialmente no exosqueleto dos crustáceos. A sua estrutura está representada na Figura 2 [11], [16].



O quitosano é obtido por desacetilação ácida ou alcalina do grupo acetamida da quitina, sendo que quanto maior o grau de desacetilação (que raramente é completa), maior a biocompatibilidade. Apesar de a desacetilação poder ocorrer em meio ácido, esta hipótese não é muito utilizada devido à suscetibilidade das ligações glicosídicas à hidrólise ácida [17], [18]. A estrutura do quitosano encontra-se representada na Figura 3.

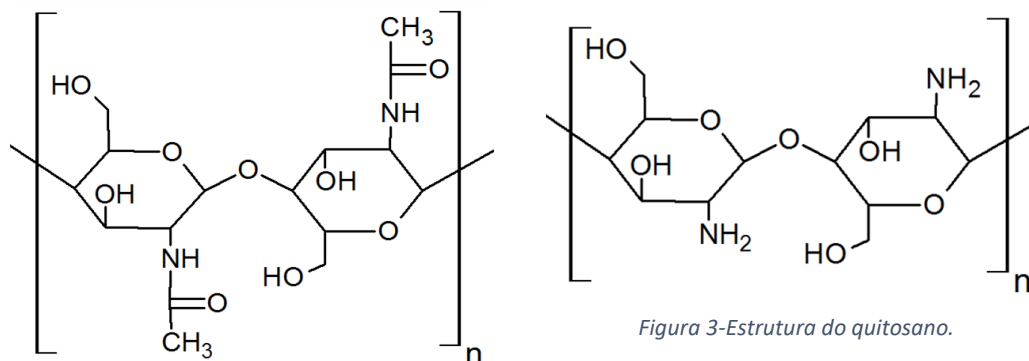


Figura 2-Estrutura da quitina.

Figura 3-Estrutura do quitosano.

Ao contrário do quitosano, que é solúvel em soluções aquosas diluídas de ácidos orgânicos e inorgânicos (devido à predominância das unidades de 2-amino-2-desoxi-D-glicopirranose), a quitina é insolúvel na maior parte dos solventes (predominância de unidades de 2-acetamido-2-desoxi-D-glicopirranose) [17], [4].

O quitosano apresenta carácter catiónico, o que lhe confere a capacidade de interação com moléculas carregadas negativamente como é o caso dos glicosaminoglicanos da matriz extracelular. O facto de ter grupos polares ( $\text{NH}_2$ ) torna este polímero capaz de se ligar a outros polímeros por meio de ligações de hidrogénio [17], [18].

Quanto à degradação do quitosano, esta pode ser levada a cabo por enzimas existentes no corpo (como a lisozima) e é tanto mais rápida quanto maior o grau de desacetilação [16].

Uma vez que o quitosano é mais solúvel (principalmente se for quitosano modificado), e é relativamente fácil de obter e não implica elevados custos, este é, por norma, usado em detrimento da quitina. Para além disso, promove a regeneração de vários tecidos (pele, tecido ósseo, etc.) e possui propriedades antimicrobianas, antitrombogénicas, antioxidantes e de bioaderência, o que é relevante para aplicações na área da engenharia de tecidos [16], [19].

### 1.2.1.2. Sintéticos

Para além dos polímeros existentes na natureza, existem ainda os polímeros sintéticos, que são produzidos de forma artificial. Uma vez que são sintetizados pelo homem, podem ser adaptadas à finalidade a que se destinam [5], [20].

As suas boas propriedades mecânicas, fácil processamento e estabilidade tornam estes polímeros apelativos do ponto de vista da engenharia de tecidos [5].

Grande parte dos polímeros de origem sintética apenas sofre degradação por hidrólise química e é resistente à hidrólise enzimática, pelo que é mais fácil controlar a sua degradação comparativamente aos polímeros naturais [20].

Dentro dos polímeros sintéticos, os mais utilizados neste tipo de aplicações são os poliésteres, que são polímeros que contêm o grupo funcional éster. Os poliésteres podem ser alifáticos, aromáticos ou não aromáticos. Os alifáticos são os mais indicados para a área biomédica devido à facilidade de ocorrência da reação de hidrólise quando em contacto com fluidos corporais [21].

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

A poli ( $\epsilon$ -caprolactona) (PCL) é um poliéster alifático linear semicristalino já aprovado pela *Food and Drug Administration* (FDA) [4]. Relativamente às características físico-químicas, a PCL tem uma temperatura de transição vítrea ( $T_g$ ) de  $-60\text{ }^\circ\text{C}$  e uma temperatura de fusão ( $T_f$ ) situada entre  $55$  e  $60\text{ }^\circ\text{C}$ . Estas características devem-se ao facto de o polímero possuir cadeias de carbono muito extensas e com reduzida mobilidade, o que lhe confere boas propriedades mecânicas e carácter hidrofóbico [22]. A estrutura da PCL encontra-se ilustrada na Figura 4.

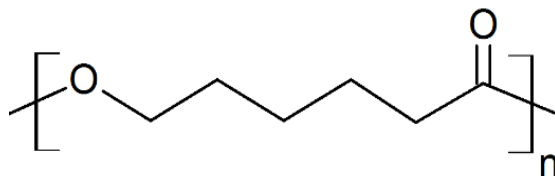


Figura 4-Estrutura da policaprolactona.

O tempo de degradação da PCL é entre 2 a 3 anos, pelo que pode ser usada para aplicações em que é necessária uma maior durabilidade do material. O processo de degradação consiste em três passos: a quebra da cadeia polimérica por hidrólise, formação de cadeias mais curtas (oligómeros) e fagocitose pelos macrófagos [21].

A sua bioestabilidade, biodegradabilidade, biocompatibilidade, solubilidade em diversos solventes orgânicos, capacidade de ser processado a baixas temperaturas e boas propriedades mecânicas, permitem que este polímero seja utilizado em *scaffolds* para engenharia de tecidos. Uma vez que é um polímero hidrofóbico, a sua capacidade de inchaço e degradação hidrolítica são menores face a outros polímeros biodegradáveis. Esta característica pode ser vantajosa para inúmeras aplicações, no entanto acarreta a desvantagem da adesão celular não ser muito

elevada, devido à sua reduzida bioatividade. Quando pretendida uma maior adesão celular é usual proceder-se à sua mistura com polímeros naturais [18], [21].

### 1.3. Estrutura da Pele

A pele é o órgão de maior tamanho e peso do corpo humano e exerce diversas funções como a função sensorial, regulação térmica, defesa, controlo do fluxo sanguíneo, proteção contra agentes externos e manutenção da hidratação do corpo [4], [23].

A pele é constituída por várias camadas: a epiderme, a derme e a hipoderme. A epiderme é a camada mais externa da pele e é composta por queratinócitos (responsáveis pela produção de queratina), melanócitos (responsáveis pela produção de melanina, pigmento que dá cor à pele; e pela proteção contra os raios UV), células de *Langerhans* (responsáveis pela defesa imunológica) e células de *Merkel* (com função sensorial) [4]. A epiderme está ligada à derme através da membrana basal, local onde são produzidos os queratinócitos. Esta junção dermo-epidérmica forma cristas que aumentam a superfície de contacto entre as duas camadas, o que facilita a passagem de nutrientes [23].

A derme é responsável pela resistência, hidratação e elasticidade da pele (devido ao colagénio, elastina e fibrilina) e é constituída por tecido conjuntivo, vasos sanguíneos e linfáticos, glândulas sudoríparas, folículos pilosos e células nervosas [4].

A camada mais interna da pele é denominada de hipoderme ou tecido celular subcutâneo. Esta é constituída essencialmente por tecido conjuntivo posicionado em torno dos adipócitos (células que armazenam gordura). A hipoderme fornece proteção contra traumas e choques mecânicos e funciona como isolante (devido ao armazenamento de energia) [4].

Na Figura 5 encontra-se uma esquematização de um corte ao longo das três camadas da pele: epiderme, derme e hipoderme [4], [24].

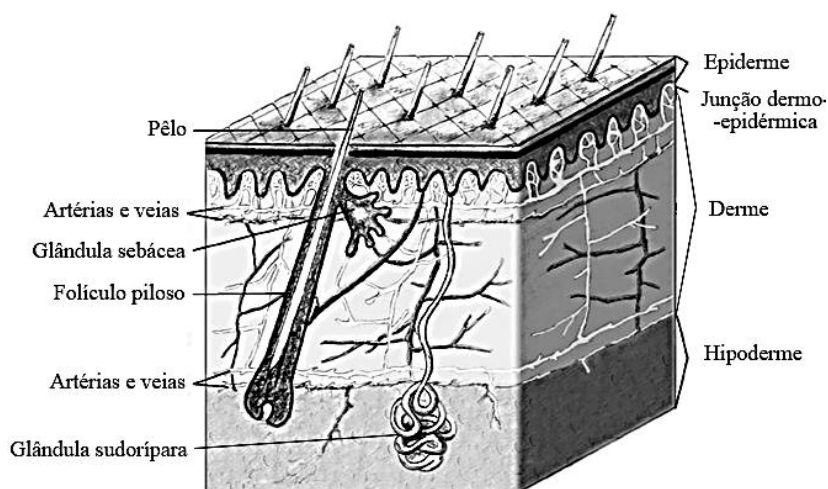


Figura 5-Esquema de um corte ao longo das várias camadas da pele (Adaptado de [24]).

## 1.4. Scaffolds

Como anteriormente referido, os *scaffolds* são matrizes tridimensionais que servem de suporte para o crescimento de tecidos. Estas matrizes podem ser sintéticas ou biológicas, degradáveis ou não degradáveis, dependendo da finalidade a que se destinam [10].

Para que possa ocorrer o crescimento de novos tecidos, a matriz tem de permitir a adesão, proliferação, diferenciação e migração celulares. Nos *scaffolds* destinados a engenharia de tecidos, a estrutura porosa e a função biológica são extremamente importantes, de modo a imitar ao máximo a matriz extracelular (ECM) [4], [5], [6].

A ECM é uma entidade estrutural natural do corpo que serve de suporte celular e é constituída por três tipos de biomoléculas: as proteínas estruturais (colagénio e elastina), as proteínas especializadas (fibrina, fibronectina e laminina) e os proteoglicanos. O colagénio fornece resistência e a elastina promove a flexibilidade. A fibrina é constituída por fibras elásticas encontradas no tecido conjuntivo, a fibronectina é responsável pela ligação entre as superfícies celulares e as células e a laminina auxilia na diferenciação, migração e adesão celulares. Os proteoglicanos são compostos por um núcleo proteico ligado covalentemente a cadeias de glicosaminoglicanos (GAG). Os GAG contêm dissacarídeos carregados negativamente, pelo que se ligam facilmente (de modo não-específico) a moléculas com carga elétrica oposta (incluindo fatores de crescimento). Para além disso, atraem catiões que carregam água, pelo que ajudam a manter a hidratação da matriz [4], [7].

Os *scaffolds* atuam então como uma ECM temporária de modo a guiar a formação de tecidos [4]. Podem ser aplicados tanto em tecidos moles como em tecidos duros, sendo que o objetivo é a substituição da zona danificada por uma matriz, permitindo o crescimento e desenvolvimento do novo tecido, com funções e propriedades semelhantes às do tecido vizinho.

### 1.4.1. Requisitos dos *scaffolds*

Para que possam ser utilizadas como *scaffolds* para regeneração de tecidos, as matrizes devem ter determinadas propriedades:

- Biocompatibilidade e não toxicidade, de modo a evitar respostas inflamatórias. Os produtos de degradação do material usado devem ser também não tóxicos e metabolizáveis pelo organismo [2];
- Ser não-cancerígenas [5];
- Mimetizar o mais possível a matriz extracelular (ECM) [5];
- Suportar a adesão e proliferação celular [5];

- Propriedades mecânicas semelhantes às do tecido original e que permitam o seu manuseamento aquando da implantação no paciente [2];
- Resistência à tração ou compressão a que serão sujeitos depois de aplicados, de modo a garantir a proteção das células aderidas;
- Porosidade elevada (usualmente acima de 90%) e interconectividade entre poros de forma a permitir a difusão de nutrientes, transporte de gases, crescimento celular e vascularização do tecido recém-formado [5];
- Adequada morfologia de superfície de maneira a que a matriz possua permeabilidade, rugosidade e porosidade, o que aumenta a sua área específica e conseqüentemente a adesão celular [2];
- Biodegradabilidade apropriada, isto é, a matriz deve degradar-se a uma velocidade semelhante à da formação do novo tecido [2]; [5].

As características finais dos scaffolds dependem fortemente quer dos materiais quer da técnica usada no seu fabrico. Quer uns quer outra têm assim de ser escolhidos e ajustados de forma a adequar as propriedades finais da matriz às exigências da aplicação pretendida [2].

#### **1.4.2. Requisitos dos scaffolds para regeneração da pele**

Perante uma situação de dano na pele ou outros tecidos moles, a utilização dos métodos cirúrgicos convencionais não resolve completamente o problema da cicatrização e acarreta inúmeros problemas, como referido no capítulo 1.1.

Os fatores mais importantes a ter em conta e que influenciam o processo de regeneração são a degeneração tecidual, o dano oxidativo, o desequilíbrio de humidade na ferida, as infeções e outras complicações na área da ferida cirúrgica, trauma ou queimadura.

A cicatrização de uma ferida é um processo que compreende várias etapas sequenciais destinadas a restaurar a estrutura e a função das células e tecidos danificados [25]. A sequência de eventos inclui a hemostasia, inflamação, migração, proliferação e remodelação. A hemostasia é a etapa durante a qual as plaquetas sofrem desagregação de modo a libertar os fatores de crescimento necessários para o processo de inflamação. Estes desencadeiam a cicatrização através da atração e ativação de fibroblastos, células endoteliais e macrófagos [4], [23].

A fase de inflamação ocorre em simultâneo e consiste na penetração de neutrófilos e fagócitos dentro das células mortas [23], [26].

Na migração ocorre a deslocação de novas células epiteliais para a área onde é necessário substituir as células mortas. A etapa de proliferação consiste em cobrir toda a área da ferida

com células epiteliais e fibroblastos, sendo que em simultâneo ocorre a vascularização e a contração da ferida [27].

Por fim, dá-se a etapa de remodelação ou maturação. Nesta fase os fibroblastos cobrem toda a superfície danificada formando uma nova camada de pele [23]. Esta sequência de eventos é controlada por vários fatores, moléculas de sinalização e células [28].

O curativo ideal para feridas na pele deve proporcionar troca gasosa e humidade necessária para uma regeneração completa. O material deve também ser flexível e fácil de manusear, de modo a poder ser adaptado a diferentes conformações e tamanhos de feridas. Para além disso deve evitar infeções causadas pela penetração de agentes patogénicos estranhos. A incubação dos agentes patogénicos locais também deve ser evitada, sendo que para isso o curativo deve assegurar uma eficaz remoção do exsudato (fluido inflamatório extravascular com elevada concentração de proteínas e fragmentos celulares [29]).

#### 1.4.2.1. Membranas assimétricas como scaffolds para a regeneração da pele

Para curativos direcionados para a regeneração da pele, as membranas assimétricas são extremamente atrativas uma vez que se podem ter, em cada uma das camadas que a constituem, as características mais adequadas. Assim, para a camada exterior, pretende-se uma membrana resistente para proteger a ferida de danos físicos e da penetração de agentes patogénicos. Deve ainda ser hidrofóbica para evitar a perda de água e consequente desidratação da pele. Já a camada interior, que fica em contacto com a pele danificada, deve ser porosa e hidrofílica para permitir a absorção dos exsudatos, mantendo o ambiente hidratado necessário para a regeneração eficaz da pele [4], [12]. A hidrofiliidade desta camada é essencial uma vez que contacta diretamente com células e fluidos biológicos [4].

Uma solução possível é usar um polímero sintético hidrofóbico como a PCL na camada exterior e polímeros naturais hidrofílicos como a gelatina e/ou o quitosano na camada interior [30], [31].

#### 1.4.2.2. Scaffolds para regeneração da pele produzidos por *electrospinning* com incorporação de fármacos

Uma das técnicas mais promissoras para produção de *scaffolds* para regeneração da pele é a técnica de *electrospinning* (ou eletrofiação), uma vez que proporciona numerosas vantagens relativamente a outros métodos usados [28]. Os fundamentos desta técnica serão detalhados no capítulo 1.5.

Os curativos para feridas, principalmente nos casos em que o processo de cicatrização é prolongado, devem conter um agente bioativo, normalmente um antibiótico local. Estes pensos bioativos têm sido desenvolvidos com base em filmes, hidrogéis, esponjas e espumas. Recentemente, as fibras obtidas por *electrospinning* têm recebido grande atenção devido às suas características especiais. As características mais diferenciadoras das fibras poliméricas relativamente aos outros sistemas são a sua elevada área superficial e a elevada porosidade. A área de superfície extremamente elevada permite que as fibras removam eficientemente exsudatos e ajustem a humidade da ferida. A elevada porosidade da membrana contribui para a permeabilidade ao ar e à água, troca de nutrientes e metabolitos e, como tamanho de poro é relativamente pequeno, preserva a ferida de infeções bacterianas [4], [32]. A hemostasia (conjunto de mecanismos pelos quais se mantém o sangue dos vasos, sem que ocorra coagulação ou hemorragia) é melhorada e consegue-se um material com maior flexibilidade, característica necessária para cobrir completamente feridas mais complicadas. Para além disso existem grandes possibilidades de funcionalização com várias moléculas bioativas. Finalmente, do ponto de vista estético, as fibras oferecem vantagem na medida em que permitem uma redução na formação de cicatrizes, uma vez que conduzem à proliferação normal das células da pele [3].

A elevada área superficial das fibras assim como a estrutura porosa aberta tridimensional ajudam na difusão de fármacos, resultando num sistema de libertação mais eficiente. Além disso, a administração local de fármaco utilizando fibras pode diminuir a dosagem mínima requerida, o que conduz a uma menor absorção sistémica, reduzindo os efeitos secundários indesejados [33]. A libertação controlada de fármacos será abordada com mais detalhe no capítulo 1.6.

## 1.5. *Electrospinning*

Como anteriormente referido, para obtenção de materiais poliméricos com alta porosidade e área superficial, pode recorrer-se ao método de *electrospinning*. Os materiais porosos baseados em fibras processadas por *electrospinning* são de grande interesse para a engenharia de tecidos, uma vez que as suas propriedades contribuem para uma melhor adesão, proliferação, migração e diferenciação celulares. O *electrospinning* pode ser considerado como uma técnica simples, de baixo custo e versátil para a preparação de fibras de polímero de poucos nanómetros a micrómetros de diâmetro, dependendo das condições de processamento [4], [5], [10].

Este método recorre a uma alta tensão para criar um jato eletricamente carregado de solução de polímero, levando à formação de fibras. Os *scaffolds* de fibras obtidas por *electrospinning* podem ser obtidos tanto a partir de polímeros biodegradáveis (colagénio, elastina, fibrinogénio, fibrina, policaprolactona, gelatina, etc.) como não biodegradáveis (politereftalato de etileno, poliuretano, ácido poliglicólico, polietileno, poliamidas, politetrafluoretileno e misturas destes) [3].

O *electrospinning* inicia-se carregando a seringa com uma solução polimérica previamente preparada. De seguida, uma bomba injetora força a passagem da solução contida na seringa através de um capilar de pequeno diâmetro, formando assim uma gota

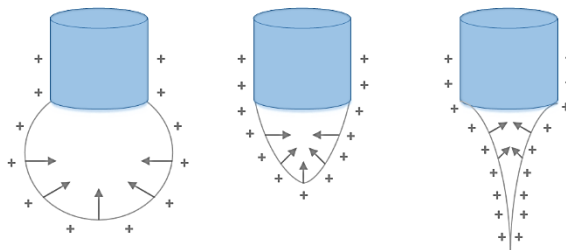


Figura 6-Formação do cone de Taylor (adaptado de [28]).

pendente na ponta da agulha. Aplica-se uma tensão na agulha e como resultado acumulam-se as cargas elétricas na superfície da gotícula de solução [33]. A uma certa tensão crítica, a repulsão de *Coulomb* das cargas supera a tensão de superfície da gota, e forma-se o cone de *Taylor* que dá posteriormente origem a um jato de fibra que é ejetado da ponta da seringa (Figura 6). No trajeto do jato de solução desde a ponta da agulha até ao coletor de carga oposta (onde são recolhidas continuamente as fibras) o solvente evapora, resultando fibras sólidas compostas apenas pelo polímero [3], [33]. A superfície coletora pode ter várias morfologias (plana, cilindro rotativo, etc.) e o jato formado desloca-se na sua direção, levando à formação de uma estrutura membranosa através da deposição contínua de fibras poliméricas [33]. A Figura 7 ilustra esquematicamente o esquema de montagem do processo de *electrospinning*.

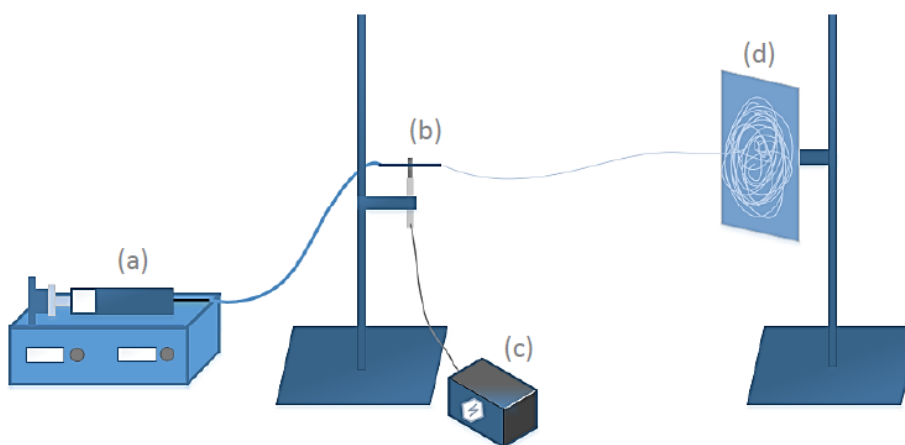


Figura 7-Representação do esquema de montagem do equipamento de electrospinning.

A instalação básica de eletrofiação compreende então quatro partes principais: a seringa (a), a agulha metálica (b), a fonte de alimentação (c) e o coletor metálico (d).



### 1.5.1. Tipos de *electrospinning*

A técnica de *electrospinning* permite ajustar as características das fibras formadas e o formato da matriz final tendo por base a variação dos parâmetros e o uso de diferentes tipos de coletor.

A forma clássica de fazer fibras por *electrospinning* consiste em preparar uma solução polimérica na qual se dissolvem os agentes bioativos que se queiram incorporar na matriz. Esta solução é colocada na seringa e dá-se início ao processo - chama-se *electrospinning* por *blending*.

Quando o agente bioativo não é solúvel no mesmo solvente que o polímero pode-se obter uma emulsão e fazer o *electrospinning* a partir desta emulsão (*emulsion electrospinning*).

Quando se pretendem fazer fibras com mais do que um agente ativo podem-se dissolver ambos no mesmo solvente e continuar a fazer-se um *electrospinning* por *blending*. No entanto pode ser mais conveniente dissolver os agentes bioativos em polímeros diferentes para obter taxas de libertação diferentes e controladas independentemente. Uma forma de o fazer é produzir uma membrana com várias camadas, cada uma com um polímero e condições experimentais diferentes. Outra forma é recorrer ao chamado *electrospinning coaxial*, em que se usam duas agulhas concêntricas, cada uma ligada a uma seringa e a uma bomba injetora, permitindo fazer fibras poliméricas com uma estrutura core-shell [3], [34]. Na Figura 8 estão representados esquematicamente os dois tipos de *electrospinning* mencionados.

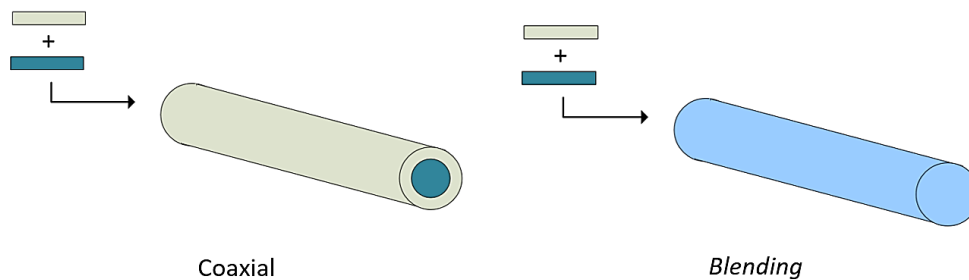


Figura 8-Esquema de fibras obtidas por *electrospinning* coaxial e *blending*.

Na presente tese é utilizado o *electrospinning* por *blending*. Neste tipo de configuração também se podem combinar vários polímeros mas desta vez numa única solução, em que estes se encontram misturados [3], [34].

### 1.5.2. Efeito dos parâmetros no *electrospinning*

Existem vários fatores com influência no processo *electrospinning*. Estes fatores são classificados como parâmetros de *electrospinning*, parâmetros de solução e parâmetros ambientais. Os parâmetros de *electrospinning* incluem a voltagem aplicada, a distância entre a

agulha e o coletor, o caudal de solução polimérica e o diâmetro da agulha. Os parâmetros da solução dizem respeito ao solvente, à concentração de polímero, à viscosidade e à condutividade da solução. Por fim, os parâmetros ambientais compreendem a umidade relativa e a temperatura de operação. Todos estes parâmetros podem perturbar a produção de fibras lisas e sem *beads*, pelo que para otimizar o fabrico de fibras poliméricas é essencial compreender os efeitos dos parâmetros nas mesmas [28].

#### 1.5.2.1. Efeito da voltagem aplicada

O fluxo de corrente gerado a partir de uma fonte de alimentação de alta tensão para uma solução através de uma agulha metálica faz com que a gota esférica se deforme e origine o cone de *Taylor*, formando uma fibra quando é atingida uma tensão crítica (que varia consoante o polímero). Deste modo, abaixo desse limite, não há a formação de fibras mas sim de gotas de solução que caem da ponta da agulha [28], [34].

Aumentando a voltagem para além do valor crítico, formam-se fibras mais longas e de menor diâmetro devido ao maior alongamento da solução de polímero provocado pela repulsão de carga dentro do jato polimérico. No entanto, um aumento na tensão para além do valor limite resulta na pulverização da amostra, deixando de se verificar a formação de fibras [28], [34].

#### 1.5.2.2. Efeito do caudal de solução

O fluxo da solução polimérica através da ponta metálica da agulha determina a morfologia das fibras de *electrospinning*. Conseguem-se obter fibras de superfície lisa através da operação a um caudal crítico que é ótimo para uma determinada solução polimérica. No entanto este valor varia com o sistema polimérico utilizado [28], [34].

Aumentar o caudal para além do valor ótimo não só leva ao aumento do tamanho de poro e do diâmetro da fibra, como também à formação de *beads* (devido à secagem incompleta do jato de fibras durante o percurso entre a ponta da agulha e o coletor metálico). É então usada preferencialmente a taxa de fluxo mínima que permite manter um equilíbrio entre a solução polimérica que sai da agulha e a substituição dessa solução por uma nova durante a formação de jato (sem que haja interrupção) [28], [34].

#### 1.5.2.3. Efeito da distância entre agulha e coletor

A distância compreendida entre a ponta da agulha metálica e o coletor é uma variável essencial na determinação da morfologia das fibras de *electrospinning*. Tal como o campo

elétrico, a viscosidade e o caudal aplicados, este parâmetro também varia com o sistema polimérico utilizado.

A morfologia das fibras é influenciada por esta distância, visto que depende do tempo de deposição, da taxa de evaporação do solvente e do intervalo de instabilidade. Numerosos grupos de pesquisa estudaram o efeito da distância entre a ponta da agulha e o coletor e concluíram que, usando distâncias reduzidas, há um menor alongamento do jato de solução e as fibras resultantes são tendencialmente defeituosas e de grande diâmetro. Para além disso, para distâncias muito pequenas, o solvente não evapora completamente [28], [34].

Quando é aumentada a distância, o diâmetro da nanofibra diminui (jato mais alongado). No entanto, não é vantajoso aumentar demasiado essa distância, de modo a manter a formação de fibras contínuas e sem *beads*. É então crucial manter uma distância ótima para preparar fibras de *electrospinning* lisas, uniformes e com o diâmetro desejado [28], [34].

#### 1.5.2.4. Efeito da concentração de polímero e da viscosidade da solução

O processo de *electrospinning* baseia-se no fenómeno do alongamento uniaxial de um jato de solução carregada na seringa, sendo que esse alongamento é significativamente afetado pela alteração da concentração da solução polimérica. Quando a concentração da solução polimérica é demasiado baixa, verifica-se o fenómeno de *electrospray*, que consiste na dispersão das partículas poliméricas em pequenas gotas (sem formação de fibras). Quando a concentração da solução é demasiado elevada (e consequentemente maior a viscosidade), ocorre a formação de *beads* e de pequenas gotas solidificadas ao longo das fibras. Valores de concentração superiores ao valor crítico dificultam ainda o fluxo da solução, podendo fazer com que esta seque na ponta da agulha metálica, bloqueando-a. Dentro da gama de viscosidades que permite a obtenção de fibras lisas e sem defeitos, quanto menor a viscosidade, menor o diâmetro das fibras [28], [34].

Por conseguinte, conclui-se que, para além dos parâmetros de *electrospinning* já referidos, também a determinação do valor crítico da concentração de solução polimérica (e consequentemente de viscosidade) é essencial para a obtenção de fibras uniformes [28], [34].

#### 1.5.2.5. Efeito da condutividade da solução

A condutividade da solução polimérica carregada na agulha não só afeta a formação do cone de *Taylor*, como também ajuda no controlo do diâmetro das fibras.

A formação do cone de *Taylor* é provocada pela força eletrostática das cargas de superfície criadas pelo campo elétrico externo aplicado. Quando a solução apresenta baixa condutividade, a superfície da gota não tem carga suficiente para que haja a formação do cone de *Taylor*, o que impede totalmente a utilização da técnica de *electrospinning*. Para um valor crítico de condutividade da solução, aumenta a carga na superfície da gota (forma-se o cone de *Taylor*), e diminui o diâmetro da fibra. No entanto, se a condutividade apresentar um valor muito acima crítico, irá novamente impedir a formação de cone de *Taylor* e conseqüentemente a utilização da técnica [28], [34].

#### 1.5.2.6. Papel do solvente no *electrospinning*

A seleção do solvente é um dos fatores-chave para a formação de fibras de *electrospinning* de qualidade. É necessário ter em conta que os solventes ideais para o processo de *electrospinning* são aqueles nos quais os polímeros são completamente solúveis. Outro fator importante é o ponto de ebulição do solvente, que deve ter um valor intermédio. Os solventes muito voláteis têm elevadas taxas de evaporação o que facilita a volatilização dos mesmos durante o percurso da fibra desde a ponta da agulha até ao coletor. No entanto, os solventes altamente voláteis são geralmente evitados visto que taxa de evaporação demasiado elevada provoca a secagem do jato na ponta da agulha. Da mesma forma, também os solventes pouco voláteis são evitados, uma vez que os seus pontos de ebulição elevados impedem a sua secagem durante o tempo do trajeto das fibras. A deposição de fibras com solvente ainda presente leva à formação de nervuras, ou à dissolução das fibras já depositadas na zona que entra em contacto com o solvente não evaporado [28], [34].

#### 1.5.2.7. Efeito da humidade e da temperatura

Além dos parâmetros de *electrospinning* e de solução, também os fatores ambientais (como humidade relativa e temperatura) afetam o diâmetro e a morfologia das fibras. A humidade causa mudanças no diâmetro das fibras, uma vez que tem influência no processo de solidificação do jato. Este fenómeno é também dependente da natureza química do polímero.

A temperatura apresenta dois efeitos: por um lado aumenta a taxa de evaporação do solvente e por outro lado diminui a viscosidade da solução. Ambos os efeitos conduzem a uma diminuição no diâmetro médio das fibras [28], [34].

Apesar de estes dois fatores influenciarem a qualidade das membranas obtidas, são também os mais difíceis de regular, uma vez que geralmente se aplica a técnica em ambientes que não têm atmosfera controlada nem condições constantes ao longo do tempo.

## 1.6. Libertação controlada de fármacos

De modo a melhorar a forma de administrar fármacos são usados, cada vez mais, sistemas de libertação controlada. Esta necessidade surgiu uma vez que a administração de determinado fármaco se destina a um tecido-alvo, mas apenas uma fração da dose aplicada atinge esse mesmo tecido. Tal acontece uma vez que o fármaco é distribuído por vários tecidos ou sofre metabolização e/ou excreção antes de chegar ao local desejado. A administração pode ser realizada por via sistémica ou por via local, sendo que a última aumenta a eficácia do tratamento, uma vez que a concentração de fármaco que atinge o tecido onde a sua função é requerida é superior. No caso da administração sistémica, o fármaco é transportado na corrente sanguínea e a sua atuação é menos localizada e acarreta mais efeitos secundários [35].

Como se observa no gráfico da Figura 9, para uma dosagem apenas, dá-se um aumento da concentração de fármaco até um valor máximo, sendo que a partir desse pico, a concentração de fármaco no sangue diminui até zero. A desvantagem deste tipo de administração consiste na dificuldade em manter a concentração num determinado valor indicado para o tratamento em questão (dose terapêutica), sendo que este deve ser superior ao limite inferior de eficácia, e não deve ultrapassar o limite superior a partir do qual exhibe toxicidade.

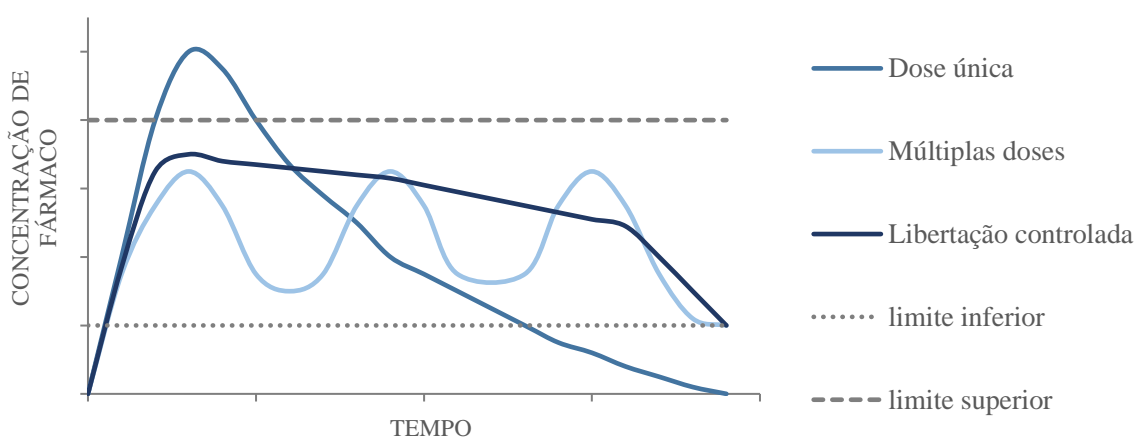


Figura 9-Perfil da concentração de fármaco no sangue para diferentes tipos de dosagem.

De forma a colmatar este obstáculo administram-se várias doses menores ao longo do tempo de tratamento. Ainda assim, apesar de a concentração de fármaco se situar dentro dos limites, esta não apresenta um valor constante. Para obter um nível de concentração aproximadamente constante, é necessário recorrer a sistemas de libertação controlada (SLC) nos quais o fármaco é libertado continuamente ao longo do tempo e próximo do local-alvo (controlo temporal e espacial). Na Figura 9 encontram-se os perfis de concentração de fármaco ao longo do tempo, para os diferentes tipos de dosagem referidos.

Os SLC conseguem controlar a libertação dos fármacos devido às interações físico-químicas entre estes e o material no qual estão incorporados. Estes sistemas têm a capacidade de regular a taxa a que se liberta a substância ativa e/ou transportar essa substância até ao local de atuação. Para desenvolver um SLC é importante compreender as propriedades físico-químicas do fármaco, bem como a sua farmacocinética (efeitos do organismo sobre o fármaco) e farmacodinâmica (mecanismo de ação do fármaco no organismo); as propriedades do material no qual vai ser incorporada a substância ativa; o método de produção do SLC e as barreiras fisiológicas e bioquímicas a que o fármaco é sujeito até ser absorvido [35].

## 1.6.1. Técnicas para a incorporação de fármacos

### 1.6.1.1. Mistura (*Blend*)

Existem vários métodos desenvolvidos para incorporar fármacos em fibras, no entanto a mistura do agente terapêutico com soluções poliméricas é o mais usado. Neste caso, o fármaco é dissolvido ou disperso na solução de polímero para se conseguir que este fique aprisionado nas fibras produzidas por *electrospinning*. Para obter os resultados desejados, têm de ser cumpridos alguns requisitos visto que o comportamento de libertação de fármaco é altamente dependente da distribuição das moléculas de fármaco nas fibras, assim como da morfologia das mesmas. Têm de se ter em conta as propriedades físico-químicas dos polímeros, bem como a sua interação com moléculas de fármaco, uma vez que são parâmetros que afetam significativamente a eficiência da encapsulação, a distribuição do fármaco dentro das fibras e a cinética de libertação do mesmo [3].

Caso a solubilidade do fármaco na solução de polímero seja reduzida, dá-se apenas uma dispersão do fármaco dentro da solução. Durante o processo de *electrospinning* utilizando as referidas dispersões, as moléculas de fármaco podem migrar para perto das superfícies das fibras, não havendo uma distribuição uniforme. Como resultado pode ocorrer a libertação de grande quantidade de fármaco num curto espaço de tempo (a denominada “explosão” de fármaco), o que não é desejável [3].

No caso de o fármaco e o polímero serem solúveis no mesmo solvente, o fármaco pode ser dissolvido diretamente na solução de polímero. No caso de o fármaco e o polímero não serem solúveis no mesmo solvente, o fármaco pode ser solubilizado numa pequena quantidade de outro solvente e depois adicionado à solução de polímero. Desta forma o agente terapêutico é incorporado nas fibras de forma uniforme.

Quando o fármaco e o polímero não são solúveis num solvente comum, o fármaco pode ainda ser dissolvido noutra solução (imiscível com aquela em que o polímero está dissolvido)

e as duas soluções podem ser misturadas, resultando uma emulsão que também pode ser sujeita a *electrospinning*. Neste caso, o fármaco fica encapsulado na matriz polimérica [35].

### 1.6.1.2. Modificação da superfície

A modificação superficial de fibras com biomoléculas é outro método promissor para introduzir biofuncionalidade. Utilizando esta técnica, o agente terapêutico é ligado ou conjugado às superfícies das fibras, tornando-o estrutural e bioquimicamente semelhante ao tecido nativo. Utilizando este método, a libertação do fármaco é atenuada e a funcionalidade das biomoléculas imobilizadas na superfície pode ser preservada. Esta estratégia é usualmente aplicada para resolver o problema da libertação de “explosão” inicial, prolongando também o tempo de libertação. Quando a biomolécula alvo é quimicamente imobilizada na superfície, é mais difícil ser libertada, pelo que esta técnica é vantajosa principalmente para a libertação de genes ou fatores de crescimento, onde é desejável uma libertação lenta e prolongada do fármaco [3].

### 1.6.1.3. Outras abordagens em *electrospinning*

Um dos avanços recentes no desenvolvimento de sistemas de administração de fármacos mais eficientes tem sido incluir terapias de combinação, isto é, administração de vários fármacos com os mesmos ou diferentes efeitos terapêuticos visando melhorar os resultados do tratamento. O fator mais importante nos sistemas de multifármacos é a libertação controlada independente de fármacos, particularmente no cancro ou outras doenças complexas, de modo a evitar a resistência aos agentes terapêuticos. Contudo, a libertação controlada independente de cada fármaco é um obstáculo difícil de contornar. A incorporação de diferentes fármacos no mesmo transportador proporciona a mesma via de difusão e taxa de degradação da matriz e, por conseguinte, é difícil otimizar a taxa de libertação de fármaco individual. Neste contexto, pode recorrer-se a um processo de *electrospinning* sequencial em que se produzem membranas com multicamadas ou a membranas compostas por fibras coaxiais contendo diferentes fármacos nas diversas camadas. Neste tipo de sistemas, o tamanho de fibra e a espessura de cada camada são variáveis muito importantes no controlo da taxa de libertação [34].

## 1.6.2. Mecanismos de libertação controlada de fármacos

Em SLC de base polimérica a libertação do fármaco pode ser controlada por diferentes mecanismos. No caso de o polímero em questão ser biodegradável, a degradação das cadeias poliméricas, por a hidrólise ou catálise enzimática, pode controlar a libertação do fármaco. A

degradação é normalmente classificada por: a degradação superficial (em que a degradação ocorre à superfície do material e este vai reduzindo de tamanho) ou degradação na massa (em que a degradação se dá na totalidade da matriz polimérica e, apesar de manter as suas dimensões iniciais, vai perdendo gradualmente densidade até desaparecer). Estes dois mecanismos encontram-se ilustrados na Figura 10.

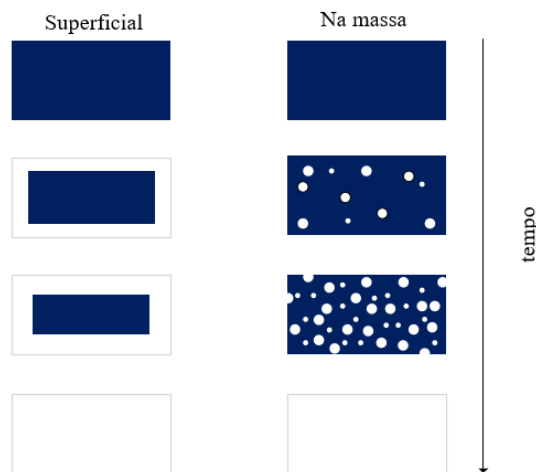


Figura 10-Ilustração dos mecanismos de biodegradação superficial e na massa.

À medida que se dá a degradação do material de base polimérica, dá-se simultaneamente a libertação do fármaco presente no mesmo. Como já foi referido, para além da degradação da matriz polimérica, existem outros mecanismos segundo os quais pode ocorrer o fenómeno de libertação:

A libertação controlada pelo solvente envolve sistemas de libertação controlados pela absorção de água, e sistemas controlados por pressão osmótica. No primeiro caso, a absorção de água por parte da matriz polimérica aumenta a mobilidade das cadeias, permitindo a libertação do fármaco por difusão. No segundo caso, a passagem de solvente devido à diferença de concentrações de fármaco no interior e no exterior de membrana polimérica, força a saída da solução saturada de fármaco presente no interior da matriz [36].

A libertação controlada por fenómenos químicos pode ocorrer devido a sistemas de cadeia pendente e sistemas monolíticos. No caso dos sistemas de cadeia pendente, a libertação do fármaco dá-se devido à hidrólise da ligação covalente entre o fármaco e o polímero. Nos sistemas monolíticos, o fármaco (disperso no material) é libertado pela biodegradação ou bioerosão do polímero [36].

A libertação controlada por difusão pode dividir-se em sistemas monolíticos e sistemas de reservatório. Nos sistemas monolíticos o fármaco liberta-se devido à difusão do mesmo ao longo da matriz polimérica. Nos sistemas de reservatório, o fármaco encontra-se encapsulado por uma membrana de material não biodegradável. Neste caso, o fármaco é difundido lentamente através da membrana [36].



No caso do material preparado no âmbito desta dissertação, ocorre a dissolução das fibras dos polímeros naturais que contêm o fármaco, potenciando a sua libertação por difusão.

### 1.6.3. Moxifloxacina

A moxifloxacina é um antibiótico que integra o grupo das fluoroquinolonas, do qual também fazem parte a ciprofloxacina e a levofloxacina. A sua função é a inibição das enzimas responsáveis pela replicação do ADN das bactérias (ADN *gyrase*, topoisomerase tipo II e topoisomerase IV), afetando assim o seu crescimento celular [37], [38]. A estrutura da moxifloxacina encontra-se na Figura 11.

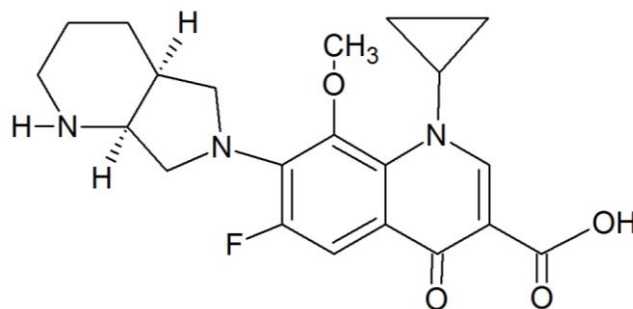


Figura 11-Estrutura da moxifloxacina.

Este fármaco é usado em inúmeras aplicações, sendo eficiente nomeadamente contra os agentes patogénicos das feridas na pele, atuando de modo a impedir a infeção dermatológica durante o processo de cicatrização.

A aplicação tópica de antibióticos constitui uma vantagem na regeneração da pele face aos agentes sistémicos, visto que os últimos apresentam baixa penetração nos tecidos e mais efeitos secundários, uma vez que vão para a corrente sanguínea. Como referido no capítulo 1.6, no caso da aplicação tópica essas desvantagens são reduzidas e há uma maior concentração de fármaco no local-alvo, pelo que o tratamento se torna mais eficaz e mais direcionado para o local onde é desejado o seu efeito [38].

## Capítulo 2. Objetivos experimentais

A presente dissertação tem como objetivo a produção de membranas poliméricas usando a técnica de *electrospinning*. As membranas produzidas são formadas por duas camadas (membranas assimétricas) sendo uma de policaprolactona (PCL) e outra de polímeros naturais (gelatina e quitosano) com incorporação de um fármaco (moxifloxacina). O objetivo destes *scaffolds* é serem usados como auxiliares na regeneração da pele.

Na Figura 12 mostra-se um esquema ilustrando a estrutura destas fibras poliméricas e a forma de aplicação pretendida.

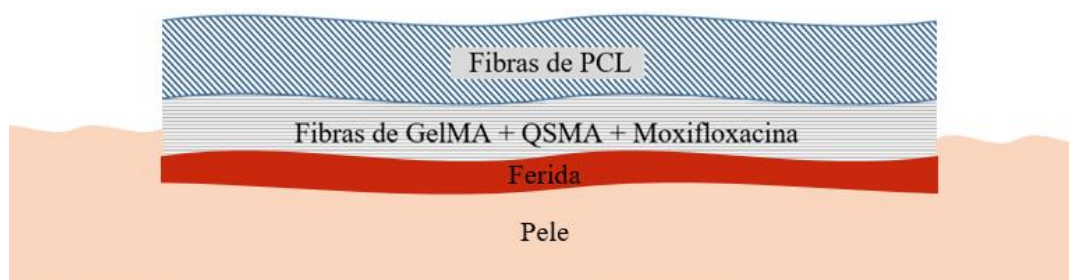


Figura 12-Representação esquemática da membrana assimétrica e sua aplicação.

A escolha da policaprolactona deveu-se essencialmente às suas boas propriedades mecânicas, que permitem a obtenção de fibras muito resistentes e elásticas, e à sua hidrofobicidade, adequada para a parte exterior da membrana para proteger a área danificada de agressões externas e manter a hidratação necessária. Para a segunda camada escolheu-se uma combinação de quitosano com gelatina - o quitosano por possuir propriedades antimicrobianas e a gelatina porque auxilia na adesão celular. Sendo ambos polímeros naturais, a sua biocompatibilidade é elevada. Para além disso, o seu carácter hidrofílico é importante já que será esta a camada fibrosa que ficará diretamente em contacto com as células e os fluidos biológicos [39]. A incorporação do antibiótico moxifloxacina tem como finalidade prevenir infeções dermatológicas.

A metodologia seguida para a obtenção das membranas assimétricas encontra-se esquematizada na Figura 13.

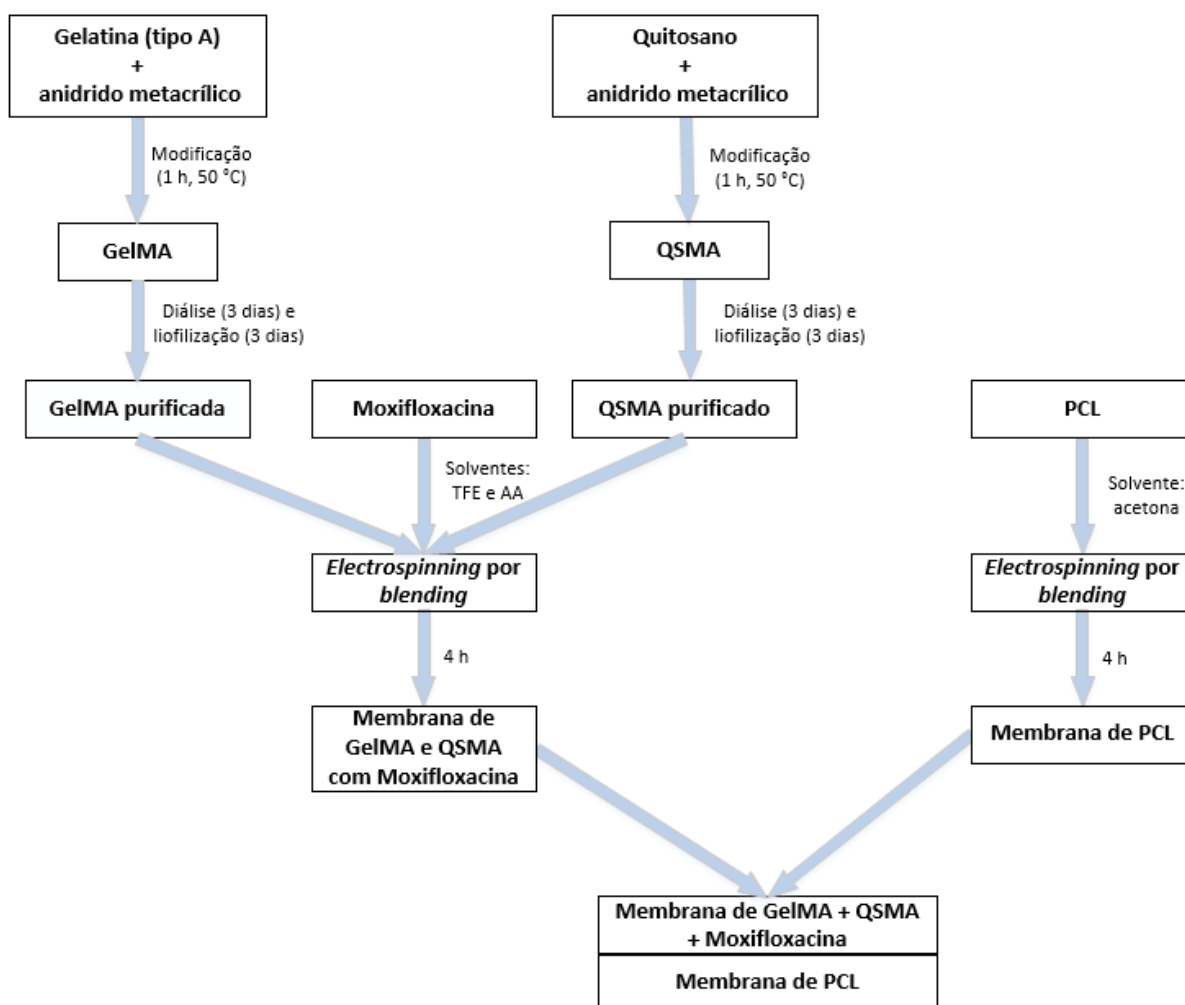


Figura 13-Esquema do procedimento seguido para a obtenção da membrana assimétrica final

Ao todo foram produzidos cinco tipos de membranas: duas amostras de controlo (uma apenas de PCL e outra apenas de GelMA e QSMA) e três de membranas assimétricas, englobando amostras contendo PCL, GelMA e QSMA com e sem fármaco, reticuladas e não reticuladas. Na Tabela 1 encontra-se o resumo de todas as membranas produzidas e respetiva reticulação.

Tabela 1-Resumo das membranas produzidas por electrospinning.

Membrana	PCL	GelMA	QSMA	Moxifloxacina	Fotoreticulação com Irgacure
1	X				
2		X	X		
3	X	X	X		
4	X	X	X		X
5	X	X	X	X	X

## Capítulo 3. Materiais e métodos

### 3.1. Materiais

Os materiais utilizados durante o processo de fabrico e caracterização dos *scaffolds* para regeneração da pele encontram-se na Tabela 2.

Tabela 2- Lista de materiais, respetivas informações e aplicação a que se destinaram.

Material	Distribuidor	Informação adicional	Aplicação
Policaprolactona (PCL)	<i>Sigma-Aldrich</i> ® (Sintra, Portugal)	-	Polímero para solução polimérica
Gelatina tipo A	<i>Sigma-Aldrich</i> ® (Sintra, Portugal)	Proveniente de pele suína	Polímero para solução polimérica
Quitosano	<i>Sigma-Aldrich</i> ® (Sintra, Portugal)	Baixa viscosidade	Polímero para solução polimérica
Dihidrogenofosfato de potássio (KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )	<i>Sigma-Aldrich</i> ® (Sintra, Portugal)	99% pureza	Solução de PBS
Hidrogenofosfato disódico dihidratado (Na <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> *2H <sub>2</sub> O)	<i>Sigma-Aldrich</i> ® (Sintra, Portugal)	98% pureza	Solução de PBS
Cloreto de sódio (NaCl)	<i>Panreac</i>	99,5% pureza	Solução de PBS
Cloreto de potássio (KCl)	<i>Panreac</i>	99,5% pureza	Solução de PBS
Anidrido metacrílico (MAA)	<i>Alfa Aesar</i> (Karlsruhe, Alemanha)	94% pureza	Modificação da gelatina e do quitosano

Tabela 2 (continuação)

Ácido acético glacial	<i>Fisher Scientific</i> (EUA)	99,7% pureza	Solvente para solução polimérica
2,2,2-Trifluoroetanol (TFE)	<i>Fisher Scientific</i> (EUA)	99% pureza	Solvente para solução polimérica
2-hidroxi-1[4-(2-hidroxietoxi)fenil]-2-metil-1-propanona (Irgacure ®2959)	<i>BASF</i> (Alemanha)	97-99% pureza	Fotoiniciador
Moxifloxacina (hydrochloride)	<i>Oftalder</i> (Oeiras, Lisboa)	-	Fármaco
Óxido de deutério (D <sub>2</sub> O)	<i>Euriso-top</i> (Saint-Aubin, França)	99,9% pureza	Solvente para RMN
Meio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM-F12)	<i>Sigma-Aldrich</i> ® (Sintra, Portugal)	-	Ensaio de biocompatibilidade
3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium (MTS)	<i>Promega</i> (Canada, EUA)	-	Ensaio de biocompatibilidade
Fibroblastos normais dermais humanos (NHDF)	<i>PromoCell</i> (Barcelona, Spain)	-	Ensaio de biocompatibilidade

## 3.2. Procedimento

### 3.2.1. Modificação da gelatina

A primeira etapa do processo consistiu em proceder à modificação da gelatina do tipo A. Para isso, fez-se reagir a gelatina com anidrido metacrílico (MAA), o que resultou na sua funcionalização com grupos laterais de metacrilamida. A gelatina modificada obtida após a reação designa-se por GelMA.

O procedimento iniciou-se com a preparação de uma solução tampão fosfato (PBS) de pH 7,4 que mimetiza o pH dos fluidos corporais, conforme descrito no anexo A.

Depois de preparada a solução tampão, procedeu-se à dissolução de 10 g de gelatina em 100 mL da mesma, agitando durante cerca de 20 minutos num banho de água a 50 °C. De seguida, adicionou-se 1 mL de anidrido metacrílico e deixou-se reagir durante 1 h no banho de água a 50 °C [40]. O anidrido metacrílico reagiu com as aminas da gelatina segundo o esquema reacional da Figura 14.

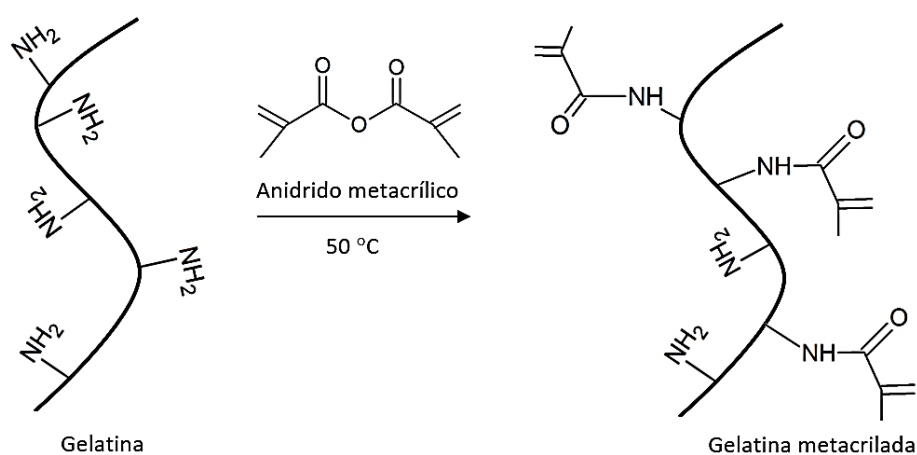


Figura 14-Mecanismo de síntese de gelatina metacrilada (adaptado de [15]).

Após 1 hora de reação, procedeu-se à purificação da gelatina modificada através de um processo de diálise. Para isso, foram utilizadas membranas previamente hidratadas (com um *cut-off* de 12 000 Dalton) nas quais se inseriu a gelatina metacrilada. Após preenchidas as membranas, estas foram colocadas num recipiente com água destilada durante 3 dias (mudando a água 2 vezes por dia). É assim removido o subproduto da reação (ácido metacrílico), as impurezas e o anidrido metacrílico não reagido. Desta forma os produtos potencialmente citotóxicos são eliminados e é garantida a segurança da utilização de GelMA em *scaffolds* para engenharia de tecidos [40].

Depois de realizada a diálise retirou-se a gelatina modificada das membranas e colocou-se em tubos Falcon, que se reservaram no congelador.

Por fim, liofilizou-se a gelatina durante 3 dias de modo a remover a água presente na mesma. O equipamento utilizado para este processo encontra-se na Figura 15. Para manter as amostras congeladas durante a fase inicial, colocou-se gelo em torno dos tubos durante a liofilização.

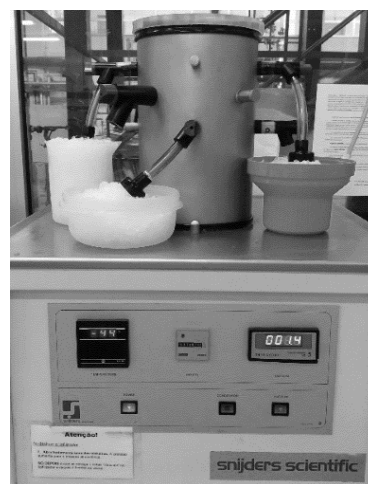


Figura 15-Esquema de montagem da liofilização.

### 3.2.2. Modificação do quitosano

De forma análoga à modificação da gelatina, procedeu-se à modificação do quitosano. Primeiramente preparou-se uma solução aquosa de 2% de ácido acético e dissolveram-se 5 g de quitosano em 200 mL dessa solução, agitando numa placa. Seguidamente, adicionou-se 1 mL de anidrido metacrílico e deixou-se reagir durante 1 h num banho de água a 50 °C. O esquema reacional encontra-se ilustrado na Figura 16 e mostra a substituição do grupo amina do quitosano pelo grupo metacrilato do anidrido metacrílico.

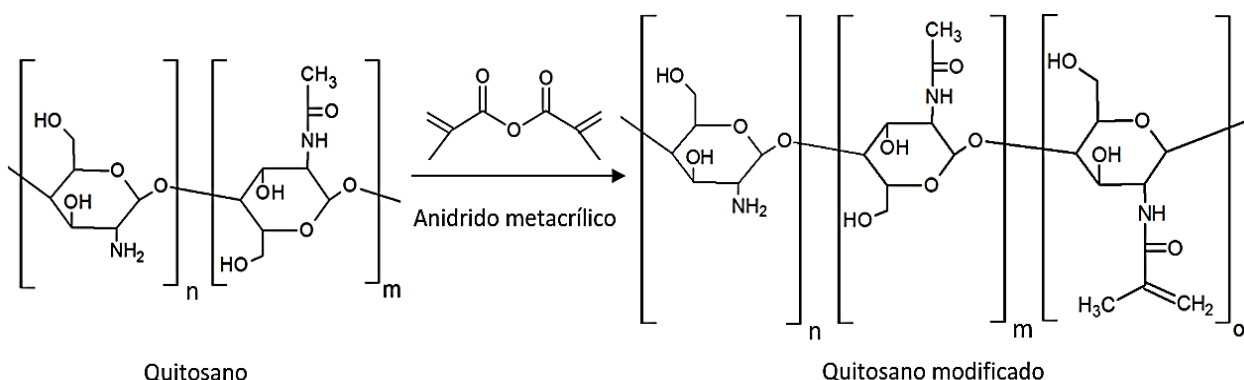


Figura 16-Mecanismo de síntese de quitosano modificado.

Também a purificação do quitosano metacrilado (QSMA) foi feita através de diálise. O quitosano foi colocado em membranas que foram seguidamente inseridas num recipiente com água destilada durante 3 dias, sendo a água mudada 2 vezes por dia.

Depois de realizada a diálise, o QSMA foi transferido para tubos Falcon, que foram colocados no congelador. A liofilização do quitosano modificado após a congelação foi realizada durante 3 dias de modo a remover toda a água presente.

### 3.2.3. Preparação soluções para o *electrospinning*

Antes do processo de produção de fibras por *electrospinning* foi necessário preparar as soluções poliméricas a inserir na seringa. Apesar de terem sido produzidos 5 tipos de membranas, utilizaram-se apenas 3 soluções poliméricas distintas.

Para a membrana de PCL e camada exterior das membranas assimétricas, preparou-se uma solução com uma concentração de 15% em acetona (1,8 g de PCL e 12 mL de acetona). Para a membrana de GelMA e QSMA e segunda camada das membranas assimétricas, preparou-se uma solução composta por 9 mL de uma solução de gelatina modificada e 1 mL de uma solução de quitosano modificado. A solução de gelatina foi previamente preparada adicionando 8 mL de TFE e 2 mL de ácido acético a 1,2 g de GelMA. Para solução de quitosano, utilizaram-se 10 mL de uma solução de 2% de ácido acético e 0,2 g de quitosano modificado.

Nas membranas em que foi colocado o fármaco moxifloxacina, este foi adicionado na quantidade de 10% face à massa de polímero presente na solução de GelMA e QSMA. Uma vez que a massa total de polímeros naturais modificados na solução foi de 1,1g, foram adicionados 110 mg de fármaco.

Na Tabela 3 encontram-se resumidos os polímeros, solventes e condições de operação (voltagem, caudal, distância da agulha ao coletor, humidade e temperatura) usados em cada tipo de solução polimérica.

Tabela 3- Polímeros, solventes e condições de operação utilizados em cada tipo de solução polimérica.

Membrana	Massa de polímeros e fármaco	Volume de solventes	Voltagem (kV)	Caudal (mL/h)	Distância (cm)	T (°C)	Humidade (%)
PCL	1,8 g PCL	12 mL Acetona	20	3	10-20	19	44-67
GelMA + QSMA	1,08 g GelMA 0,02 g QSMA	7,2 mL TFE 1,82 mL AA 0,98 mL Água	18,4	1,3	10-20	22	37
GelMA + QSMA+ Moxifloxacina	1,08 g GelMA 0,02 g QSMA 0,11 g Moxifloxacina	7,2 mL TFE 1,82 mL AA 0,98 mL Água	20	1,3	10-20	21	26-50



### 3.2.4. Preparação das membranas por *electrospinning*

Para a preparação das membranas começou-se por inserir a solução polimérica numa seringa de plástico de diâmetro interno de 15,8 mm. Esta foi posteriormente ligada ao capilar que por sua vez se ligou à agulha metálica por onde sai a solução. Encaixou-se a seringa na bomba doseadora e colocou-se a agulha na direção do coletor (coberto com papel de alumínio). Ao ser aplicada uma voltagem à agulha, ocorreu a formação de um jato de solução polimérica. Ao evaporar o solvente da referida solução, originaram-se fibras sólidas de polímero, que se depositaram no coletor. O esquema de montagem utilizado encontra-se na Figura 17.

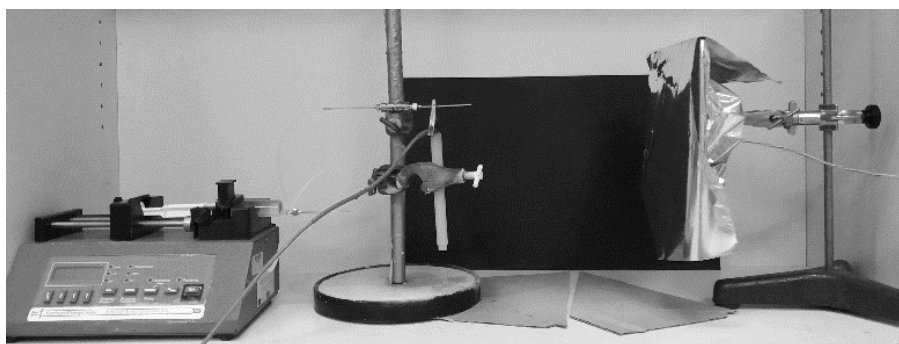


Figura 17-Esquema de montagem do sistema de *electrospinning*.

Ao contrário do que acontece na configuração mais comum, o coletor foi colocado horizontalmente relativamente à agulha. É usual que ocorra a queda de gotas de solução da ponta da agulha e desta forma é minimizada a quantidade de gotas que caem sobre a matriz fibrosa, melhorando assim a qualidade da membrana final.

Foram preparadas membranas simples apenas com GelMA e QSMA e apenas com PCL. As membranas assimétricas foram obtidas através da sobreposição de membranas de GelMA e QSMA e de membranas de GelMA, QSMA com moxifloxacina, às membranas de PCL previamente produzidas.

### 3.2.5. Fotoreticulação dos *scaffolds*

Apesar das inúmeras vantagens da gelatina para aplicações biomédicas, as suas fracas propriedades mecânicas e sensibilidade à água limitam as aplicações da mesma. Para aumentar a resistência deste material e retardar a sua dissolução em soluções aquosas, recorreu-se à reticulação dos *scaffolds* [13]. Tanto a GelMA como o QSMA presentes nas membranas sofreram o processo de reticulação, devido à ligação dos grupos metacrilamida resultantes da modificação.

Após o processo de *electrospinning*, submeteram-se parte das membranas de PCL, GelMA e QSMA e todas as membranas de PCL, GelMA, QSMA e moxifloxacina a um

processo de reticulação com radiação ultravioleta. Para isso, utilizou-se um fotoiniciador com baixa citotoxicidade, o Irgacure® 2959 [41]. No caso das membranas com antibiótico, optou-se por reticular sempre uma vez que, de outra forma, o fármaco presente seria libertado mais rapidamente quando em contacto com fluidos, devido à dissolução da camada de polímeros naturais. Fazendo a reticulação este fica aprisionado na matriz de fibras e a libertação será mais prolongada ao longo do tempo.

Cortaram-se membranas a reticular e mergulharam-se durante 10 min numa porção de uma solução previamente preparada de 100 mg de fotoiniciador dissolvidas em 10 mL de etanol e 90 mL de água destilada. Seguidamente as amostras foram expostas à radiação UV (254-365 nm) durante 10 min de cada face da membrana, utilizando uma lâmpada UV modelo UVGL-48, *Multiband UV*, da *Mineral light® Lamp*.

A reticulação acontece uma vez que o Irgacure® 2959 forma radicais ao ser sujeito à radiação UV. Os radicais formados reagem com as ligações duplas da GelMA e do QSMA e inicia-se a polimerização dos resíduos metacrilamida das cadeias de gelatina e quitosano. Deste modo as várias cadeias ficam ligadas entre si como mostra a Figura 18.

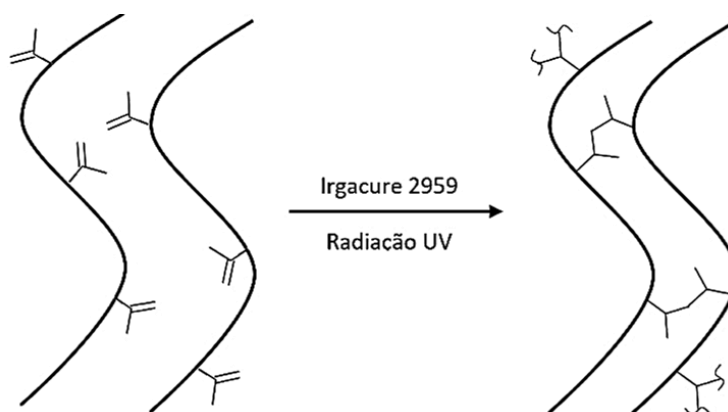


Figura 18-Reação de reticulação com Irgacure® 2959 e radiação UV (adaptado de [15]).

Por fim, colocaram-se as amostras numa estufa a vácuo à temperatura ambiente durante dois dias de modo a remover a água presente.

### 3.3. Caracterização

Após a produção das membranas por *electrospinning*, é fundamental proceder à caracterização das mesmas (bem como dos materiais base utilizados) de modo a estudar a sua composição e verificar se as suas propriedades cumprem os requisitos necessários para a aplicação desejada.

### 3.3.1. Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

A ressonância magnética nuclear é uma técnica que mede a absorção da radiação eletromagnética na região de frequência de 4 a 900 MHz (radiofrequência), permitindo determinar a composição e estrutura química de uma vasta gama de moléculas [42].

Fora submetidas a ressonância magnética nuclear de próton ( $^1\text{H}$ -RMN), amostras de gelatina, GelMA, quitosano e QSMA. O  $^1\text{H}$ -RMN consiste na aplicação da técnica RMN em relação aos núcleos de hidrogénio [37]. A análise foi realizada num espectrofotómetro de 9.4 Tesla, com uma sonda TXI de 5mm. As amostras de gelatina e GelMA foram preparadas utilizando água deuterada ( $\text{D}_2\text{O}$ ). Às amostras de quitosano e QSMA, para além de  $\text{D}_2\text{O}$  foi adicionado ácido acético de modo a auxiliar na dissolução. A análise foi realizada no Laboratório de Ressonância Magnética Nuclear situado no Departamento de Química da Universidade de Coimbra.

### 3.3.2. Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier com Reflexão Total Atenuada (FTIR-ATR)

A técnica de espectroscopia FTIR permite caracterizar compostos químicos, possibilitando fazer uma análise qualitativa das ligações químicas ou estruturas moleculares presentes nas amostras tendo por base frequências específicas para as quais ocorre a sua vibração, em níveis de energia bem definidos [43].

Para proceder à análise por FTIR-ATR utilizou-se um espectrofotómetro *Frontier da PerkinElmer* equipado com um ATR (*Diamond crystal 45°*), e detetor FR-DTGS (*Temperature-stabilized fast recovery deuterated triglycine sulfite*). Na obtenção dos espectros foram efetuados 64 *scans* com uma resolução de  $400\text{ cm}^{-1}$ , à temperatura ambiente.

As amostras sujeitas a esta análise incluíram, para além de todas as membranas produzidas por *electrospinning*, os materiais de base utilizados (gelatina, quitosano, GelMA e QSMA). Para a obtenção de filmes dos materiais de base foram preparadas soluções em água destilada de 5% (no caso da gelatina e GelMA) e de 2% (no caso do quitosano e QSMA) com 5 mg do fotoiniciador Irgacure. Estas soluções foram espalhadas em pequenos vidros de modo a formar uma camada fina e colocadas sob radiação UV até reticularem e formarem filmes passíveis de serem analisados pela técnica indicada.

### 3.3.3. Microscopia eletrónica de varrimento (SEM)

A microscopia eletrónica de varrimento (SEM) é utilizada para a análise microestrutural de materiais sólidos de várias naturezas. Recorrendo a esta técnica obtêm-se as imagens

topográficas dos vários *scaffolds* produzidos, de forma a observar as diferenças na morfologia e diâmetro das fibras presentes [44].

A microscopia eletrónica de varrimento foi executada no Instituto Pedro Nunes (IPN), recorrendo a um microscópio eletrónico de varrimento de alta resolução *Zeiss Merlin* equipado com uma coluna de microscopia *Gemini '2*. Antes da análise as amostras foram cobertas com ouro utilizando um sistema de PVD (*physical vapor deposition*).

Foram capturadas imagens a duas ampliações mais baixas de modo a observar o aspeto geral da malha de fibras (2 000x e 5 000x), a uma ampliação média para proceder à análise dos diâmetros das fibras (20 000x) e, por último, a uma ampliação elevada (50 000x), de modo a observar a morfologia da superfície das fibras individuais.

### 3.3.4. Determinação de ângulos de contacto dinâmicos

A determinação de ângulos de contacto tem como finalidade avaliar a hidrofobicidade ou hidrofiliabilidade da superfície de determinado material. Uma vez que os *scaffolds* se destinam a aplicações biomédicas, é importante analisar a molhabilidade dos mesmos, visto que é uma propriedade que influencia a adesão e proliferação celular.

Para ângulos de contacto superiores a 90°, o material é hidrofóbico, sendo que a partir de 150°C é considerado superhidrofóbico. Quando o ângulo de contacto verificado é inferior a 90°, o material diz-se hidrofílico [45].

Para a determinação dos ângulos de contacto das diferentes membranas, a quantidade de água dispensada pela seringa em cada gota foi de 10 µL. As gravações iniciadas após a queda da gota na superfície da amostra tiveram a duração de 20 segundos (com 5 *frames* por segundo). Com base no vídeo criado, o *software* calculou do ângulo de contacto (ao longo do tempo) formado entre a linha da superfície do material e a gota depositada. O equipamento utilizado para esta análise foi o OCA 20, da *Dataphysics*.

### 3.3.5. Estudos de perda de massa

De forma a avaliar indiretamente a eficácia do processo de reticulação realizam-se estudos de perda de massa das membranas. Quanto mais eficaz o fenómeno de reticulação, menor será a perda de massa verificada. Isto é, se as amostras estiverem devidamente reticuladas a sua perda de massa será menor, uma vez que as cadeias estão ligadas entre si, diminuindo o fenómeno de dissolução.

O procedimento realizado para determinar a perda de massa das membranas consistiu em colocar todas as amostras em água miliQ numa estufa à temperatura de 37 °C (condições

semelhantes às do corpo humano) durante 3 dias, sendo seguidamente lavadas com água destilada e secas sob vácuo à temperatura ambiente até o valor da massa ser constante. Por fim, comparou-se o peso antes e após o processo de modo a avaliar a perda de massa pela seguinte equação:

$$\text{Perda de massa (\%)} = \frac{m_i - m_f}{m_f} * 100$$

A variável  $m_i$  representa a massa de amostra em análise antes do procedimento descrito e  $m_f$  representa a massa da amostra depois de todo o processo.

### 3.3.6. Termogravimetria (TGA)

De modo a estudar a estabilidade térmica das membranas produzidas e dos materiais de base que as compõem, recorre-se à técnica análise termogravimétrica (TGA). A termogravimetria permite determinar a perda de massa da amostra em estudo após esta ser sujeita a um aumento gradual de temperatura.

Para proceder ao teste de TGA foram submetidas as amostras (de massa entre 5 e 10 mg) a um aumento de 10 °C por minuto até aos 600 °C. O procedimento foi realizado num equipamento TGA Q500 da *Thermal Analysis (TA) Instruments*. Deste estudo obtiveram-se os perfis de degradação de cada material recorrendo ao *software* da *TA Instruments (Universal Analysis 2000)*, podendo fazer-se a comparação entre as várias membranas obtidas e polímeros usados [46].

Foram sujeitas a esta técnica todas as membranas e materiais de base utilizados (gelatina, quitosano, GelMA e QSMA), sendo que os últimos foram preparados em filmes tal como descrito no capítulo 3.3.2 para a análise de FTIR-ATR.

### 3.3.7. Biocompatibilidade

Um material biocompatível pressupõe poder ser utilizado em aplicações biomédicas, sem causar reações adversas no hospedeiro, não podendo ser tóxico, nem cancerígeno. No caso dos *scaffolds* para regeneração da pele este requisito é fundamental, uma vez que a membrana estará em contacto direto com fluidos corporais e, portanto, não pode desencadear reações indesejáveis.

A parte 5 da norma ISO 10993 apresenta um modelo para proceder a uma avaliação biológica no sentido de garantir a biocompatibilidade do material. A avaliação da atividade metabólica é realizada a partir do teste calorimétrico MTS (*3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium*) [46].

### 3.3.7.1. Cultura celular de fibroblastos

Uma vez que as membranas produzidas são destinadas a aplicação em engenharia de tecidos para a regeneração da pele, é fundamental proceder a ensaios de cultura celular na presença dos *scaffolds*. As culturas de fibroblastos são fáceis de obter e apresentam uma rápida proliferação celular (sem ter de recorrer a fatores de crescimento), pelo que se utiliza este tipo de células para o estudo em questão.

Os fibroblastos estão envolvidos no processo de cicatrização através da formação de fibras, promovendo a regeneração dos tecidos (como referido no capítulo 1.4.2).

A cultura celular foi realizada nos laboratórios da Universidade da Beira Interior (UBI). Para esta análise foram utilizados fibroblastos normais dermais humanos (NHDF), cultivados em meio DMEM-F12 (Meio Eagle modificado por Dulbecco) contendo 10% (v/v) de soro fetal bovino (FBS) ativado, gentamicina (100 µg/mL) e anfotericina B (100 µg/mL). As culturas foram mantidas sob atmosfera húmida com 5% de CO<sub>2</sub> à temperatura de 37°C, até se verificar um crescimento celular significativo.

Após a incubação das amostras, a avaliação da biocompatibilidade baseou-se na adesão e proliferação das células nos *scaffolds* quando em contacto direto com os materiais desenvolvidos.

### 3.3.7.2. Estudo da viabilidade celular

Para estudar o perfil citotóxico dos *scaffolds* produzidos, procede-se ao teste MTS descrito pela norma ISO10993-5 [46], [47].

O estudo da viabilidade celular foi também realizado nos laboratórios da UBI. O procedimento utilizado encontra-se descrito de seguida.

Primeiramente colocaram-se as membranas numa placa de 96 poços (número de réplicas: n=5)), sendo esta posteriormente sujeita a radiação ultravioleta UV. Após 1h de irradiação, foram adicionadas as células (densidade de 1x10<sup>4</sup> células por poço) e incubadas durante 1, 3 e 7 dias. Decorrido cada tempo de incubação, o meio de cultura foi removido e substituído por 100 µL de novo meio e 20 µL de MTS/PMS.

Seguidamente incubaram-se as células a 37°C e sob atmosfera húmida com 5% de CO<sub>2</sub> durante 4 horas. As células viáveis metabolizam o MTS (devido às enzimas mitocondriais), formando o produto *formazon* e obtendo-se assim uma solução púrpura. Medindo as absorvâncias das soluções de cada poço através de um espectrofotómetro de microplacas (*Biorad Microplate Benchmark*) a um comprimento de onda de 492 nm, consegue-se

determinar a quantidade de células viáveis (sendo que quanto maior a absorvância, maior o número de células).

Como controlo negativo, prepararam-se amostras apenas com células vivas, sem a presença das membranas. Como controlo positivo, foi adicionado etanol (96%) à cultura, provocando assim a morte celular. O procedimento foi realizado numa câmara de fluxo laminar, de modo a garantir um ambiente estéril.

### 3.3.8. Estudo da libertação do fármaco moxifloxacina

O antibiótico moxifloxacina foi incorporado nas fibras de GelMA e QSMA, misturando-o diretamente na solução polimérica a injetar na etapa de *electrospinning*. A concentração de fármaco utilizada foi de 10% (m/m) em relação à massa total dos polímeros. Como a massa total de GelMA e QSMA fez 1,1 g, a massa de moxifloxacina a adicionar foi de 110 mg.

Para avaliar o perfil de libertação de fármaco contido na membrana reticulada de PCL, GelMA, QSMA e moxifloxacina, foram cortadas duas porções de 16 cm<sup>2</sup>. Para funcionar como amostra de controlo, cortaram-se também duas amostras da membrana de PCL, GelMA e QSMA reticulada (sem fármaco). Ambas as membranas foram enroladas, colocadas em tubos de *Falcon* e incubadas a 37°C em 3 mL de PBS (preparado pela metodologia indicada no Anexo A). De modo a acompanhar a libertação ao longo do tempo, foi analisado o meio em diferentes tempos durante 15 dias. Entre análises, o meio foi substituído totalmente por PBS limpo. Medindo a absorvância de cada amostra de meio (a 320 nm num espectrofotómetro *UV-Vis Jasco V-550*) determinou-se a quantidade de moxifloxacina libertada em cada tempo. Para se conseguir quantificar a libertação do fármaco em questão, foi necessário elaborar previamente a curva de calibração para a qual se usaram soluções com concentrações conhecidas e se mediram as respetivas absorvâncias (Anexo B).

## Capítulo 4. Resultados e discussão

### 4.1. Análise RMN dos polímeros naturais antes e após modificação

De modo a confirmar que a reação de modificação da gelatina e do quitosano ocorreu eficazmente, procedeu-se à análise RMN destes materiais. Desta forma foi possível comparar os espectros das amostras antes e após a modificação com anidrido metacrílico.

A partir dos espectros das Figuras 19 e 20 é possível observar os picos (a e b) correspondentes aos hidrogénios das ligações duplas dos grupos metacrilato resultantes da reação de modificação, tanto na GelMA (a 5,4 e 5,6 ppm) como na QSMA (a 5,6 e 6 ppm).

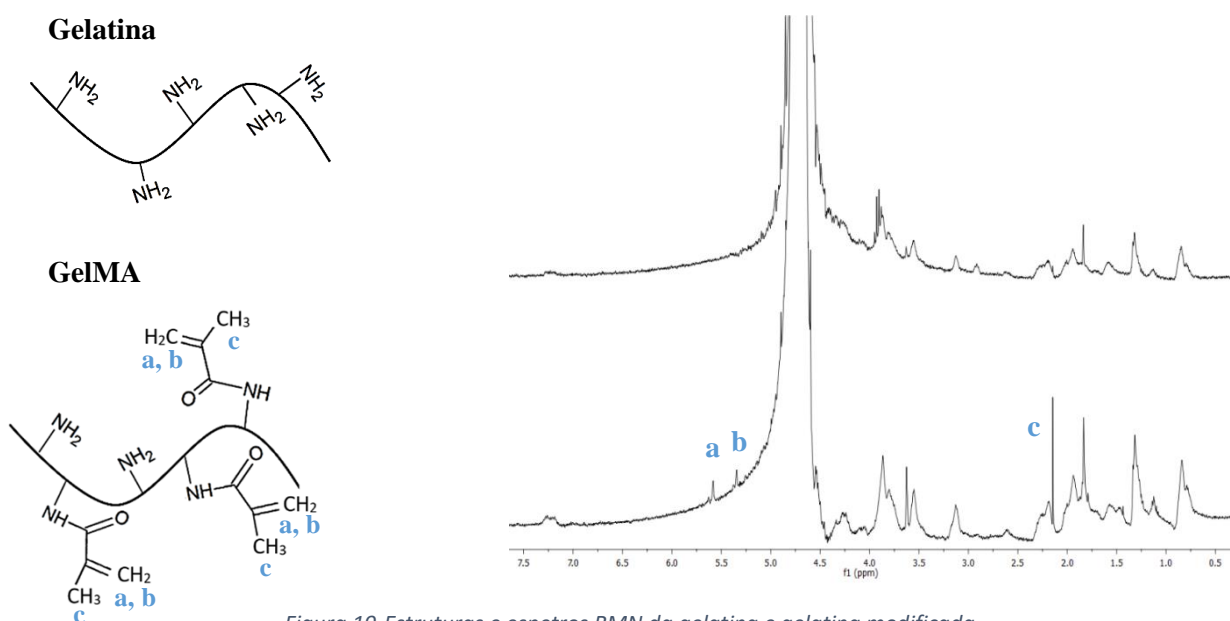


Figura 19-Estruturas e espectros RMN da gelatina e gelatina modificada.

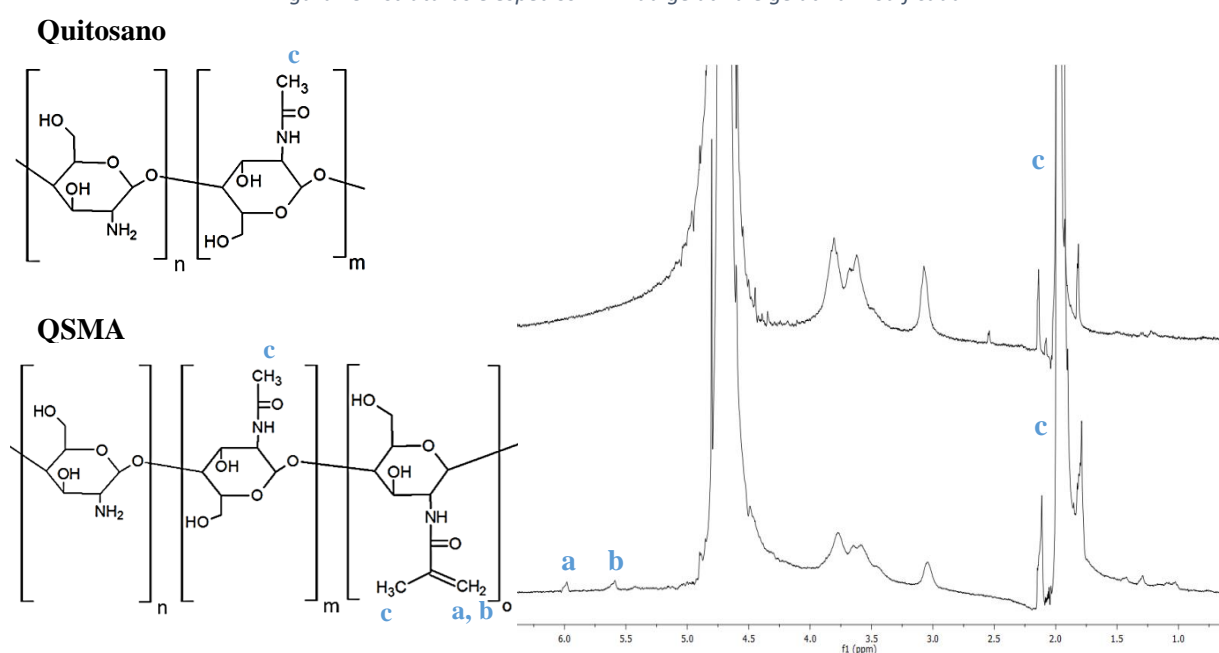


Figura 20-Estruturas e espectros RMN do quitosano e quitosano modificado.



No espectro da gelatina modificada é possível verificar a existência de um pico a 2,15 ppm (c), atribuído aos hidrogénios do grupo metilo do metacrilato. No espectro do quitosano modificado observa-se um pico a 1,9 ppm (c) relacionado com os hidrogénios do metilo dos grupos acetil e metacrilato. Este pico já se encontrava no espectro respeitante ao quitosano não modificado, devido aos grupos acetil presentes no polímero base [16], [48].

A partir destes resultados, e tendo em conta que os picos identificados não estão presentes nos espectros correspondentes aos polímeros antes da modificação pode concluir-se que ocorreu a reação de modificação.

Quanto à determinação do grau de modificação através da área de integração dos picos, não foi possível quantificar. Essa impossibilidade deveu-se ao facto de as análises terem sido realizadas utilizando água deuterada. Este solvente apresenta interações como ligações de hidrogénio que originam um espectro em que os picos não estão bem definidos, dificultando assim a sua análise para efeitos de determinação do grau de substituição.

## 4.2. Síntese dos *scaffolds*

Como anteriormente referido, recorrendo à técnica de *electrospinning* foram obtidos cinco tipos de membranas: membranas de PCL, membranas de GelMA e QSMA, membranas de assimétricas de PCL, GelMA e QSMA (reticuladas e não reticuladas) e membranas assimétricas de PCL, GelMA, QSMA e moxifloxacina reticuladas.

A maior dificuldade ocorreu na fase de produção das membranas com o fármaco moxifloxacina. Apesar de este ser completamente solúvel na solução polimérica de GelMA e QSMA previamente preparada, quando a mesma foi sujeita ao processo, verificou-se a formação de pequenos defeitos na superfície do material depositado, não permitindo a obtenção de membranas lisas como nos restantes casos (Figura 21). Aparentemente não ocorreu a evaporação total do solvente antes de atingir o coletor, provocando a dissolução da matriz já depositada. Tal pode ser atribuído ao facto de a adição de antibiótico destabilizar o meio, alterando as características da solução polimérica.

Todas as membranas não reticuladas apresentaram cor branca. Nas membranas reticuladas foi notória uma mudança de cor para um tom mais amarelado. A cor amarela foi ainda mais evidente nas membranas com fármaco, devido à presença da moxifloxacina (Figura 21).

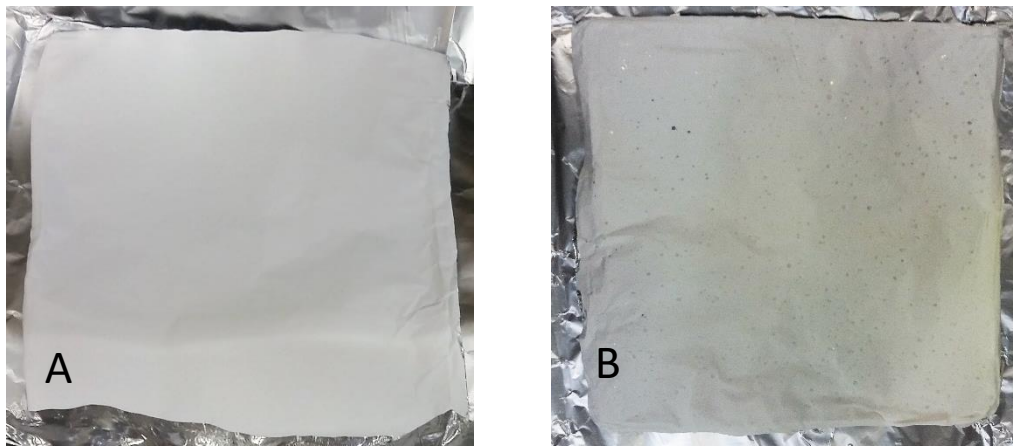


Figura 21- Membranas produzidas por electrospinning: membrana de PCL (A) e membrana assimétrica de PCL, GelMA, QSMA e Moxifloxacina (B).

### 4.3. Caracterização físico-química e morfológica dos scaffolds

#### 4.3.1. FTIR-ATR

De modo a determinar os grupos químicos que caracterizam os polímeros utilizados para produzir as membranas (PCL, GelMA e QSMA) recorreu-se à técnica FTIR-ATR.

Para além das membranas finais, foram ainda submetidas a análise, amostras de gelatina e quitosano não metacrilados, de modo a comprar os espectros antes e após a modificação. Esta análise não foi conclusiva, uma vez que as diferenças entre os espectros de transmitância obtidos são impercetíveis devido à sobreposição dos picos resultantes da modificação com os existentes nos polímeros base (Figura 22).

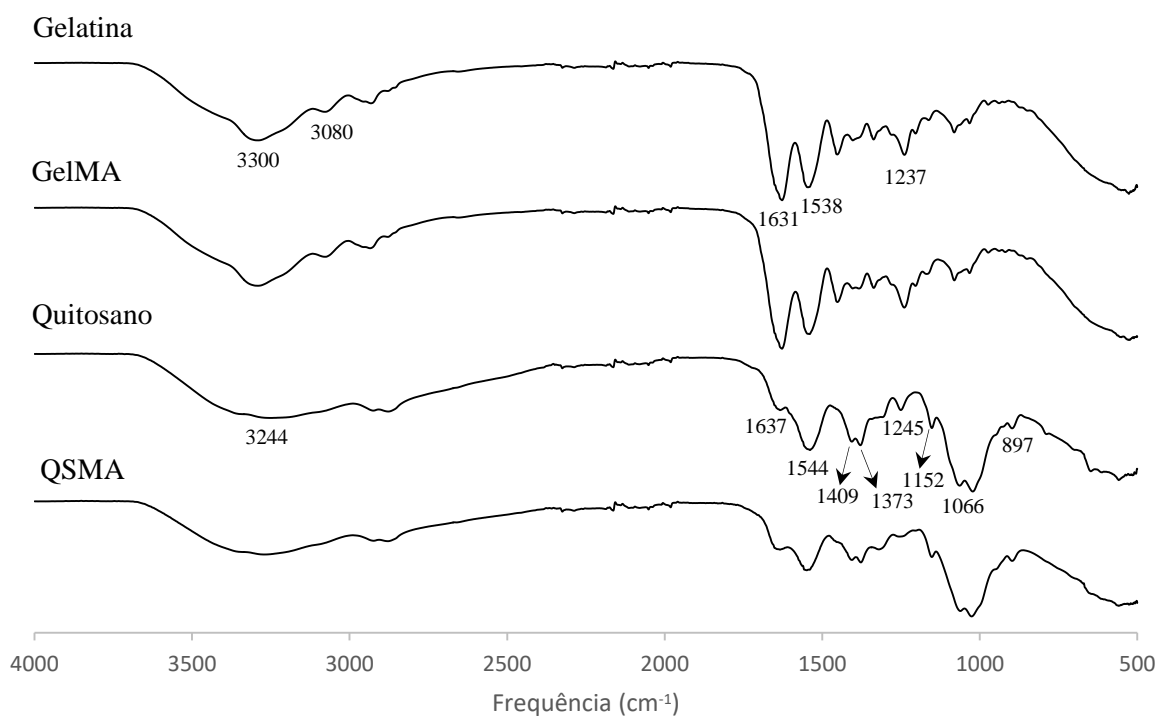


Figura 22-Espectros FTIR-ATR da gelatina, GelMA, quitosano e QSMA.

Relativamente à gelatina, as suas unidades de repetição são unidas por ligações amida (características das proteínas). Este tipo de ligações apresenta cinco bandas de absorção, que se encontram enunciadas na Tabela 4.

Tabela 4-Bandas características da ligação amida num espectro obtido por FTIR-ATR [49].

<b>Banda</b>	<b>Nº de onda (cm<sup>-1</sup>)</b>	<b>Tipo de ligação</b>
Amida A	3300	NH <i>stretching</i>
Amida B	3100	NH <i>stretching</i>
Amida I	1600-1690	C=O <i>stretching</i>
Amida II	1480-1575	CN <i>stretching</i> , NH <i>bending</i>
Amida III	1229-1301	CN <i>stretching</i> , NH <i>bending</i>

Tendo em atenção os valores da Tabela 4, podem analisar-se os espectros obtidos tanto para a gelatina como para a gelatina modificada (Figura 22) e confirmar a existência das bandas características deste polímero natural. Os picos dos espectros da gelatina e GelMA situados a 3300 e 3080 cm<sup>-1</sup> correspondem ao *stretching* da ligação N-H (amida A e B respetivamente). A 1631, 1538 e 1237 cm<sup>-1</sup> encontram-se as bandas denominadas de amidas I, II e II, respetivamente. A amida I diz respeito ao *stretching* da ligação C=O (grupo carbonilo), e as amidas II e III à *bending* da ligação N-H combinada com o *stretching* da ligação C-N.

No espectro relativo ao quitosano, também se podem observar as suas bandas mais características. A 3244 cm<sup>-1</sup> encontra-se uma banda correspondente ao *stretching* da ligação OH juntamente com o *stretching* simétrico da ligação N-H. Na zona dos 1637 cm<sup>-1</sup> está presente a banda respeitante à amida I e nos 1544 cm<sup>-1</sup> a da amida II. Os picos relacionados com a *bending* das ligações OH e CH<sub>3</sub> encontram-se respetivamente a 1409 e 1373 cm<sup>-1</sup>. A 1245 cm<sup>-1</sup> pode observar-se o *stretching* simétrico da ligação CH<sub>3</sub> e a 1152 cm<sup>-1</sup> o *stretching* assimétrico das ligações C=O resultantes da desacetilação. O pico a 1066 cm<sup>-1</sup> é determinado pelo *stretching* da ligação C=O provocado pelas ligações C-O-H, C-O-C e CH<sub>2</sub>CO. Por fim, o *wagging* da ligação C-H da estrutura do polissacarídeo encontra-se a 892 cm<sup>-1</sup> [50], [51].

Na Figura 23 pode ver-se a comparação entre os espectros da GelMA, do QSMA e da membrana composta por estes dois materiais. Apesar de não serem evidentes diferenças relevantes entre o espectro da GelMA e o espectro da membrana de GelMA e QSMA devido à reduzida quantidade de QSMA presente na membrana e devido à sobreposição dos picos referentes aos dois componentes, na banda situada entre 2800 e 3670 cm<sup>-1</sup> da membrana é perceptível a conjugação dos espectros dos componentes individuais.

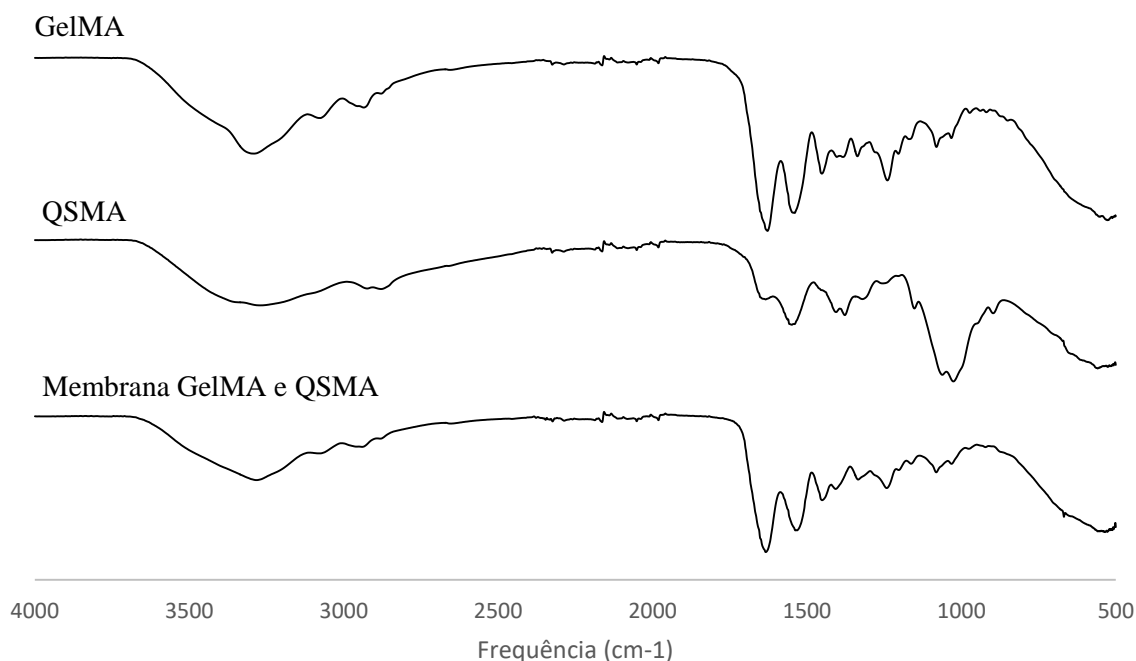


Figura 23-Espetros FTIR-ATR da GelMA, QSMA e da membrana de GelMA e QSMA.

Na Figura 24 encontram-se os espectros de transmitância correspondentes à membrana de PCL, à membrana de GelMA e QSMA e à membrana assimétrica de PCL, GelMA e QSMA.

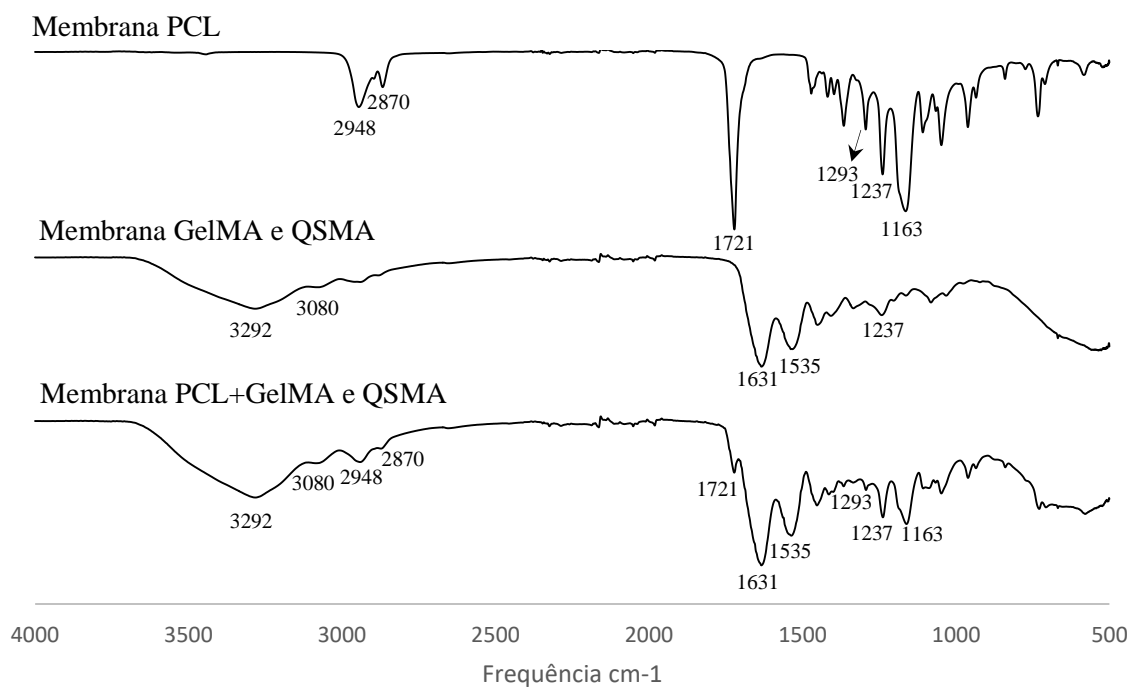


Figura 24-Espetros FTIR-ATR da membrana de PCL, membrana de GelMA e QSMA e membrana de PCL, GelMA e QSMA.

Relativamente ao espectro da PCL, podem observar-se as bandas típicas do *stretching* assimétrico da ligação  $\text{CH}_2$  a  $2948 \text{ cm}^{-1}$  e do *stretching* simétrico a  $2870 \text{ cm}^{-1}$ . A banda característica do grupo carbonilo ( $\text{C}=\text{O}$ ) encontra-se a  $1721 \text{ cm}^{-1}$  e o pico correspondente ao *stretching* das ligações  $\text{C}-\text{O}$  e  $\text{C}-\text{C}$  encontra-se a  $1293 \text{ cm}^{-1}$ . Por fim, a  $1237$  e  $1163 \text{ cm}^{-1}$  são

visíveis, os picos relativos ao *stretching* das ligações C-O-C (assimétrico e simétrico respectivamente) [52].

Relativamente aos *scaffolds* compostos por PCL, GelMA e QSMA, pode observar-se que os espectros obtidos apresentam os picos mais característicos de cada polímero presente. A ligação C=O característica dos ésteres indica a presença de PCL e situa-se num pequeno pico a  $1721\text{ cm}^{-1}$ . A  $2948\text{ cm}^{-1}$  e  $2870\text{ cm}^{-1}$  encontram-se os picos relativos ao *stretching* simétrico e assimétrico dos grupos  $\text{CH}_2$  da PCL. A  $1163\text{ cm}^{-1}$  encontra-se a banda correspondente ao *stretching* simétrico da ligação C-O-C da PCL. Alguns dos restantes picos da PCL também são visíveis, embora menos evidentes.

A  $1631\text{ cm}^{-1}$  observa-se a banda correspondente ao *stretching* da ligação C=O, referente à amida I presente na gelatina e no quitosano modificados. Na região dos  $1535\text{ cm}^{-1}$  verifica-se a existência de bandas correspondentes à amida II também presente na GelMA e QSMA. O pico relativo à amida III da GelMA encontra-se sobreposto à banda do *stretching* assimétrico da ligação C-O-C da PCL, a  $1237\text{ cm}^{-1}$ . Relativamente às amidas A e B da GelMA, estão presentes a  $3292$  e  $3080\text{ cm}^{-1}$  respetivamente.

Na Figura 25, encontram-se os espectros de transmitância referentes à membrana de PCL, GelMA e QSMA antes e após a reticulação, bem como o espectro da membrana com adição de fármaco, após reticulação. Foram analisadas as duas camadas das membranas assimétricas. Na Figura 25 são apresentados os espectros da camada de GelMA e QSMA das três membranas. Os espectros relativos à camada de PCL são iguais ao obtido para a membrana de PCL (previamente apresentado na Figura 24).

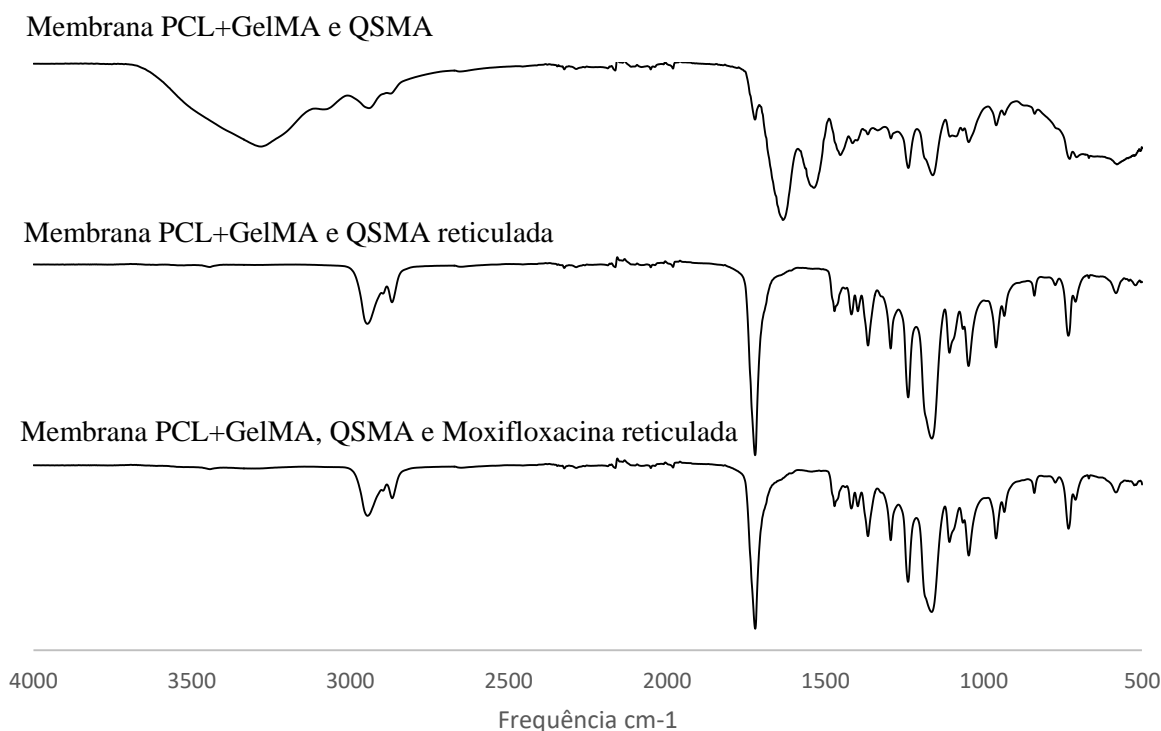


Figura 25-Espetros FTIR-ATR da membrana de PCL, GelMA e QSMA antes e após a reticulação e da membrana de PCL, GelMA, QSMA e Moxifloxacina reticulada.

Observando os espectros da Figura 25 verifica-se que nas membranas reticuladas não são visíveis picos referentes aos polímeros naturais, sendo que os espectros são idênticos ao da PCL. Tais resultados podem atribuir-se à ocorrência de dissolução total ou parcial da camada de GelMA e QSMA aquando da imersão das matrizes na solução de Irgacure® 2959. Nesse caso as membranas analisadas seriam essencialmente constituídas por PCL, ou teriam uma quantidade bastante inferior de polímeros naturais face à quantidade de PCL, sendo assim impercetíveis nesta análise.

#### 4.3.2. SEM

De modo a analisar a morfologia das diferentes membranas obtidas, estas foram sujeitas à técnica de microscopia eletrónica de varrimento (SEM). Os resultados das imagens da superfície das membranas permitem ter uma noção da morfologia e distribuição de diâmetros das fibras que compõem as mesmas.

Nas Figuras 26, 27 e 28 são apresentadas as imagens de SEM obtidas para as diferentes matrizes em 4 ampliações distintas. As membranas analisadas englobaram: membrana de PCL, membrana de GelMA e QSMA reticulada e membrana de GelMA e QSMA não reticulada. Nas referidas figuras podem analisar-se ainda os histogramas que dão uma estimativa da distribuição dos diâmetros das fibras em cada membrana.



Na Tabela 5 encontram-se resumidos os diâmetros médios das fibras presentes em cada matriz.

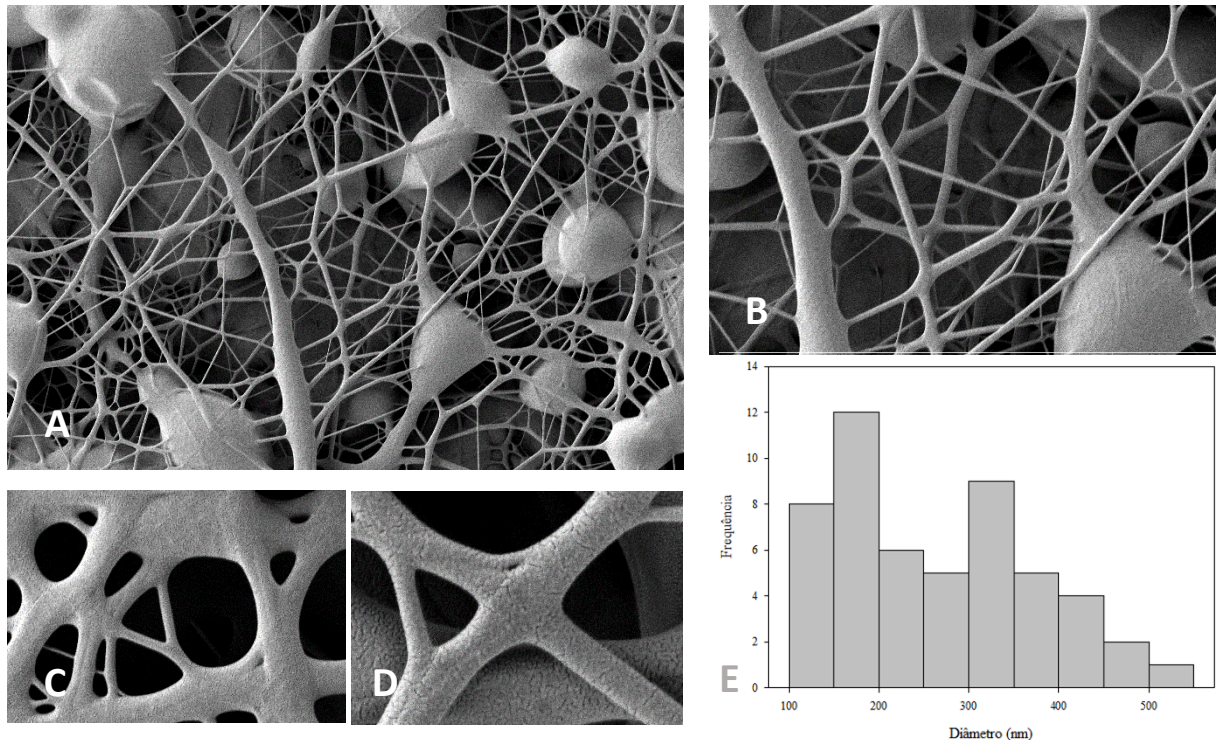


Figura 26- Imagens da superfície da membrana de PCL obtidas por SEM a ampliações de 2 000x, 5 000x, 20 000x e 50 000 (A, B, C e D respectivamente) e histograma dos diâmetros das fibras (E).

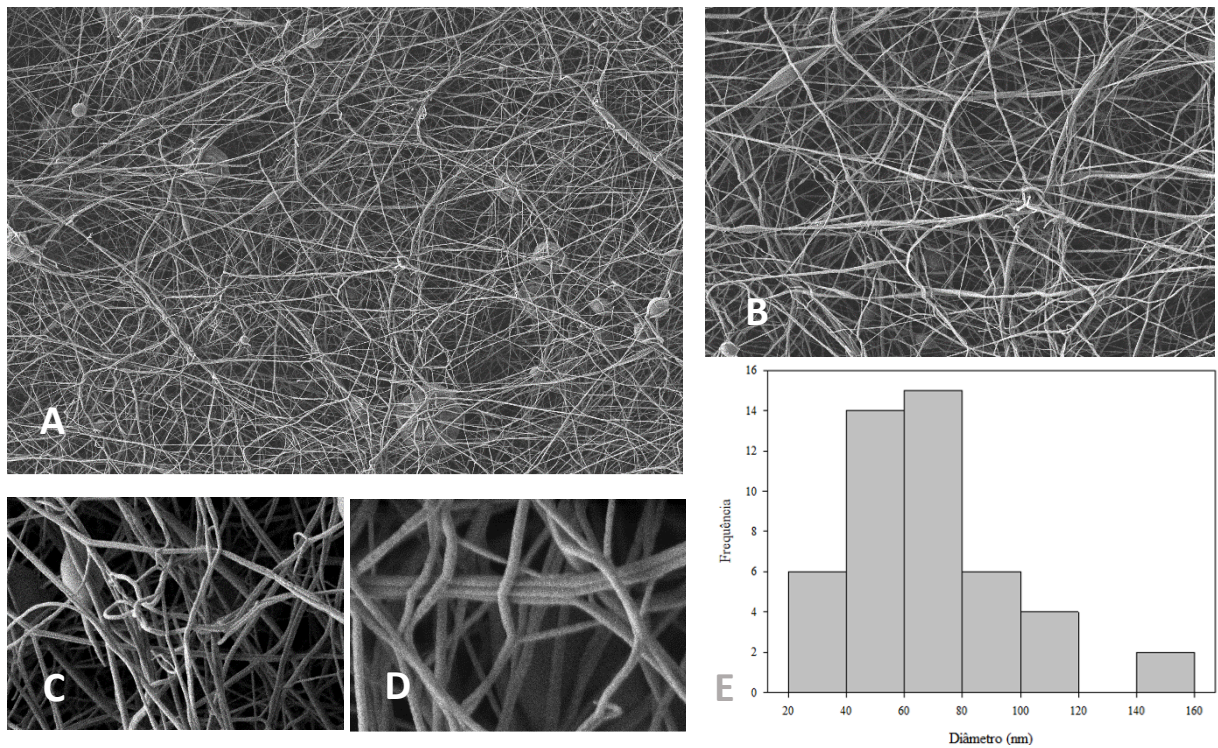


Figura 27-Imagens da superfície da membrana de polímeros naturais (não reticulada) obtidas por SEM a ampliações de 2 000x, 5 000x, 20 000x e 50 000x (A, B, C e D respectivamente) e histograma dos diâmetros das fibras (E).



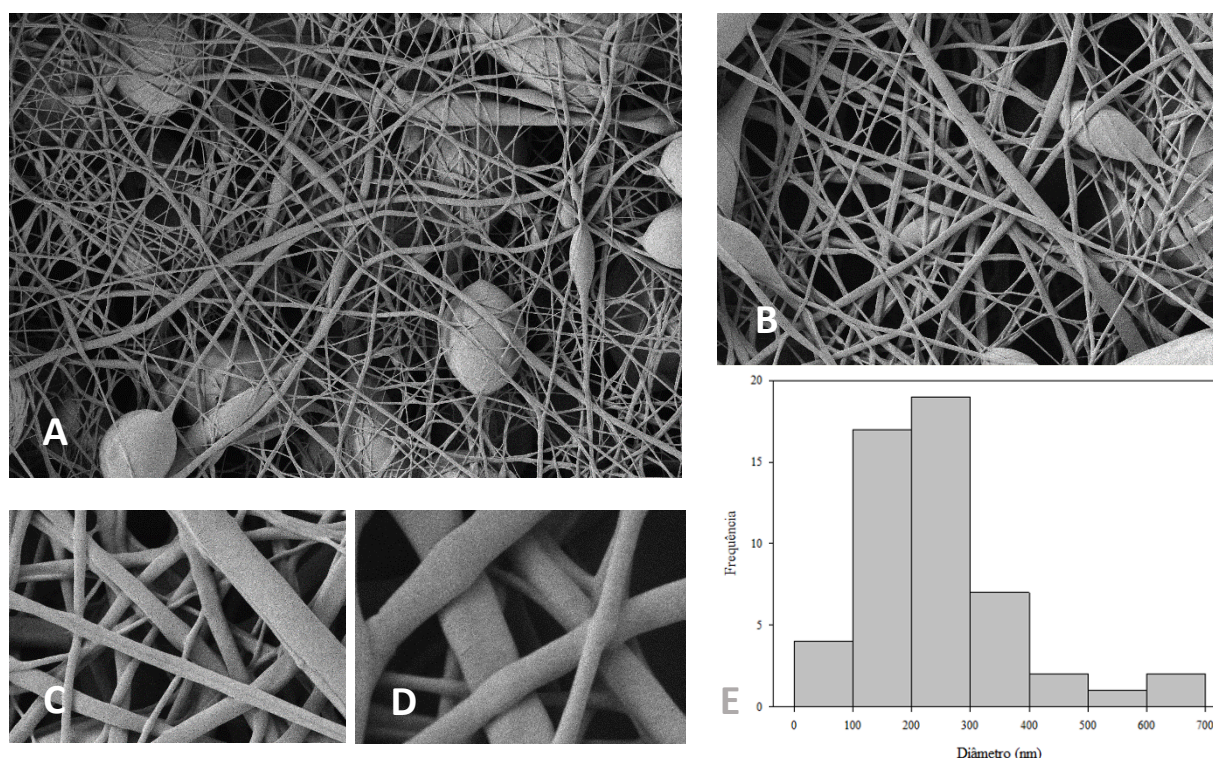


Figura 28-Imagens da superfície da membrana de polímeros naturais (reticulada) obtidas por SEM a ampliações de 2 000x, 5 000x, 20 000x e 50 000x (A, B, C e D respectivamente) e histograma dos diâmetros das fibras (E).

Tabela 5-Diâmetros médios das fibras que compõem as membranas obtidas por electrospinning.

Membrana	Diâmetro (nm)
PCL	262,7 ± 104,7
GelMA + QSMA	68,1 ± 25,7
GelMA + QSMA reticulada	241,9 ± 129,8

Através da análise das Figuras 26, 27 e 28 é bastante notória a desorganização das fibras que constituem as membranas. Tal já era esperado, uma vez que a deposição das fibras no coletor durante o processo de *electrospinning* é completamente aleatória.

As fibras de PCL presentes na Figura 26 apresentam um diâmetro médio superior ao verificado nas membranas constituídas por GelMA e QSMA nas Figuras 27 e 28 (valores na Tabela 5). O maior diâmetro das fibras de PCL pode ser atribuído ao maior caudal aplicado aquando da sua produção (3 mL/h) em comparação com o caudal usado na preparação das membranas de GelMA e QSMA (1,3 mL/h). Havendo um caudal maior para uma tensão semelhante, a fibra é menos alongada, e consequentemente o diâmetro é maior [40].

Quanto à distribuição de diâmetros, todas as amostras analisadas apresentaram uma gama de valores alargada, resultando em elevados valores de desvio padrão (Tabela 5). No entanto, a membrana de GelMA e QSMA não reticulada, apresenta menor dispersão que as restantes.



Relativamente ao aspeto geral da matriz de PCL, é possível observar uma rede de fibras com presença de *beads* (“grânulos”). Apesar de também se verificar a formação de *beads* nas membranas de GelMA e QSMA, este fenómeno foi mais visível na membrana de PCL. A menor viscosidade da solução polimérica de PCL dificulta a formação do cone de *Taylor* e conseqüentemente resulta na ejeção de gotas (em vez de fibras) que formam *beads* ao serem depositadas na matriz [50]. Para além disso, a baixa condutividade do solvente usado na preparação das membranas de PCL (acetona) também afeta a formação do cone de *Taylor*. Outro fator a ter em consideração é a humidade da atmosfera envolvente. Durante a produção das membranas de PCL este parâmetro variou entre os 44 e os 67%, afetando a taxa de evaporação do solvente e levando à união das fibras (efeito de “teia”). Na preparação das membranas compostas por polímeros naturais a humidade verificada foi inferior (37%), pelo que a evaporação do solvente não terá sido tão problemática.

Quanto à comparação das fibras de GelMA e QSMA reticuladas e não reticuladas, verifica-se que o diâmetro é superior no caso das membranas reticuladas. Apesar de a conformação mais estável da gelatina ser a forma helicoidal, quando esta é submetida ao processo de *electrospinning* as forças eletrostáticas fazem com que haja o alongamento das cadeias de polímero. No entanto, durante a imersão das membranas na solução de Irgacure®, as cadeias de gelatina têm tendência a retomar a sua conformação mais estável. O rearranjo das cadeias na forma de hélice resulta no encolhimento das fibras, fazendo com que o diâmetro seja superior nas fibras sujeitas à reticulação [31]. Antes da reticulação, as fibras apresentam valores de diâmetro bastante inferiores a 100 nm, podendo ser consideradas nanofibras.

Relativamente à morfologia de superfície das fibras individuais não é possível tirar conclusões significativas, uma vez que a textura observada nas mesmas se deve essencialmente ao revestimento de ouro e não à fibra em si. Uma vez que as membranas produzidas são materiais extremamente porosos, foi necessário fazer um revestimento com maior quantidade de ouro de maneira a conseguir imagens com a ampliação e resolução desejadas. Desta forma, para melhorar a qualidade das imagens obtidas, comprometeu-se a fiabilidade da análise da morfologia de superfície das matrizes.

#### 4.4. Ângulos de contacto dinâmicos

Da determinação dos ângulos de contacto dinâmicos das membranas produzidas, resultaram os perfis da Figura 29.

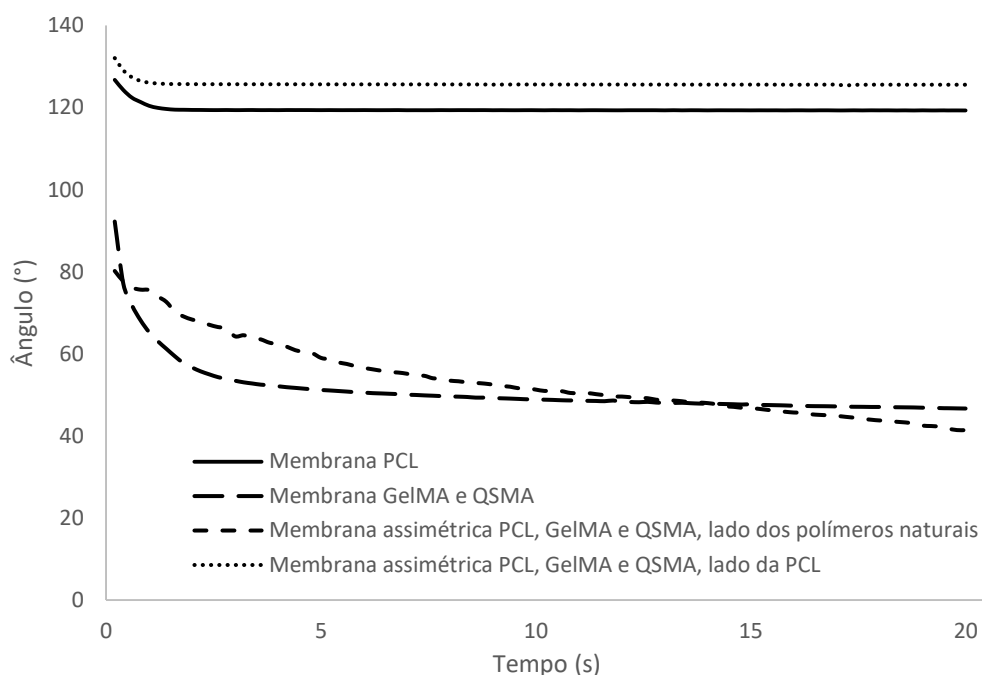


Figura 29-Ângulos de contacto dinâmicos das membranas produzidas por electrospinning.

Relativamente à membrana composta apenas por fibras de PCL, o ângulo de contacto médio é de  $119,55^\circ$ . Sendo um valor superior a  $90^\circ$ , significa que o espalhamento da gota dispensada sobre a superfície da matriz foi reduzido, pelo que se confirma a sua hidrofobicidade.

A membrana de GelMA e QSMA apresenta valores de ângulo de contacto muito inferiores aos obtidos para a PCL (valor médio de  $50,89^\circ$ ), uma vez que ocorre o espalhamento da gota na superfície. Os valores obtidos indicam que, tal como esperado, a matriz é hidrofílica.

Como as membranas assimétricas são constituídas por camadas de materiais diferentes, também o ângulo de contacto será diferente em cada uma das faces. A camada correspondente à PCL apresenta um ângulo de contacto de  $125,75^\circ$ , enquanto a camada de GelMA e QSMA apresenta um ângulo de  $53,66^\circ$ . Estes valores são semelhantes aos obtidos para as membranas simples, sendo que a diferença observada se encontra dentro do erro experimental associado à medição.

A conjugação das propriedades de molhabilidade de cada material permitem obter o comportamento desejado na membrana final. É importante que a camada de PCL tenha molhabilidade reduzida, uma vez que estará em contacto com o ambiente exterior e tem a função de evitar a desidratação da ferida. Por outro lado, a camada interior apresenta carácter

hidrofílico, fator necessário visto que estará contacto direto com os fluidos biológicos e tem de possibilitar a adesão e proliferação celular.

#### 4.5. Estudo de perda de massa

Amostras de cada uma das membranas foram mergulhadas em água miliQ e colocadas numa estufa a 37 °C durante 3 dias, tendo sido posteriormente secas até remoção completa da água. Através dos valores de massa obtidos antes e após o processo, foram calculadas percentagens de perda de massa, que se encontram resumidas na Tabela 6.

*Tabela 6-Valores de percentagem de perda de massa obtidos para cada membrana.*

<b>Membrana</b>	<b>Perda de massa (%)</b>
PCL	0,12 ± 0,21
GelMA + QSMA	100,00 ± 0,00
PCL + GelMA + QSMA	4,95 ± 0,89
PCL + GelMA + QSMA reticulada	2,43 ± 1,27
PCL + GelMA + QSMA + Moxifloxacina reticulada	3,38 ± 0,68

Analisando os valores obtidos, confirma-se que a membrana de PCL é a que apresenta menor percentagem de perda de massa após os 3 dias (0,12%). Este valor indica que o polímero não sofre dissolução quando colocado em contacto com água.

A membrana de GelMA e QSMA dissolve tal como esperado, uma vez que é composta por polímeros naturais, suscetíveis à degradação hidrolítica. Neste caso a matriz é totalmente dissolvida na água miliQ ao longo dos 3 dias de ensaio.

Nas membranas assimétricas reticuladas verifica-se uma perda de massa bastante superior à verificada para a PCL. Este facto elimina a possibilidade apontada na discussão dos espectros obtidos pela técnica FTIR-ATR de a camada formada por GelMA e QSMA ter dissolvido totalmente no processo de fotoreticulação. Uma vez que a PCL não sofre perda de massa significativa, a degradação verificada nas membranas que contêm as duas camadas é atribuída essencialmente à camada de polímeros naturais. Deste modo, se a referida camada dissolvesse totalmente quando mergulhada na solução de fotoiniciador, os resultados de perda de massa da membrana seriam mais próximos aos da PCL, pelo que o valor de percentagem perdida seria mínimo. Tal não se verificou, pelo que se pode concluir que a camada de GelMA e QSMA não sofreu dissolução total. Ainda que tenha ocorrido dissolução, há uma pequena porção dessa camada que permanece na membrana e sofre posteriormente reticulação.

Relativamente à comparação entre as membranas assimétricas de PCL, GelMA e QSMA reticuladas e não reticuladas é notória a diminuição da perda de massa no caso da membrana reticulada (2,43% face aos 4,95% da membrana não reticulada). Esta pode indicar que o processo de modificação dos polímeros naturais (gelatina e quitosano) e posterior fotoreticulação ocorreram eficazmente. Os grupos metacrilados da GelMA e QSMA ligam-se entre si quando sujeitos à radiação UV, aumentando a estabilidade das fibras e diminuindo a sua dissolução. No entanto, esta diminuição da percentagem de perda de massa pode ser também uma consequência da menor quantidade de GelMA e QSMA presente na membrana assimétrica face à quantidade de PCL (devido ao referido fenómeno de dissolução dos polímeros naturais que ocorre durante o processo de reticulação). Se a massa total da membrana pesada inicialmente tem maior percentagem de PCL do que a membrana após a reticulação, e uma vez que a perda de massa da PCL é praticamente nula, é de esperar que a percentagem de perda de massa das membranas assimétricas reticuladas seja menor.

Por fim, a membrana assimétrica reticulada contendo o antibiótico moxifloxacina apresenta uma perda de massa de 3,38 %. O valor é um pouco superior ao obtido para a membrana reticulada sem fármaco, sendo que a diferença verificada pode estar relacionada com a libertação do fármaco aprisionado nas fibras.

Com esta análise conclui-se que a adição do polímero sintético PCL aumenta a estabilidade das membranas em ambiente aquoso, o que se traduz numa grande vantagem para a aplicação em *scaffolds* para a regeneração da pele. Quanto à reticulação, embora os resultados indiquem que ocorreu eficazmente, não é possível retirar conclusões fiáveis, uma vez que não é o único fenómeno com influência no cálculo em questão.

#### 4.6. Análise Termogravimétrica

De modo a testar a estabilidade térmica das matrizes poliméricas, estas foram sujeitas à técnica de TGA. A partir dos resultados obtidos, determinaram-se as temperaturas de degradação iniciais e finais para cada membrana, a percentagem de perda de massa e a temperatura correspondente a 50% de perda de massa (temperatura de degradação derivada - DTG). Esta análise serve também (de forma indireta) para verificar a presença dos diversos materiais nas membranas produzidas, através dos respetivos perfis de degradação.

Nas Figuras 30 e 31 podem observar-se os gráficos onde se encontram as curvas termogravimétricas e DTG respeitantes ao quitosano e QSMA e à gelatina e GelMA.

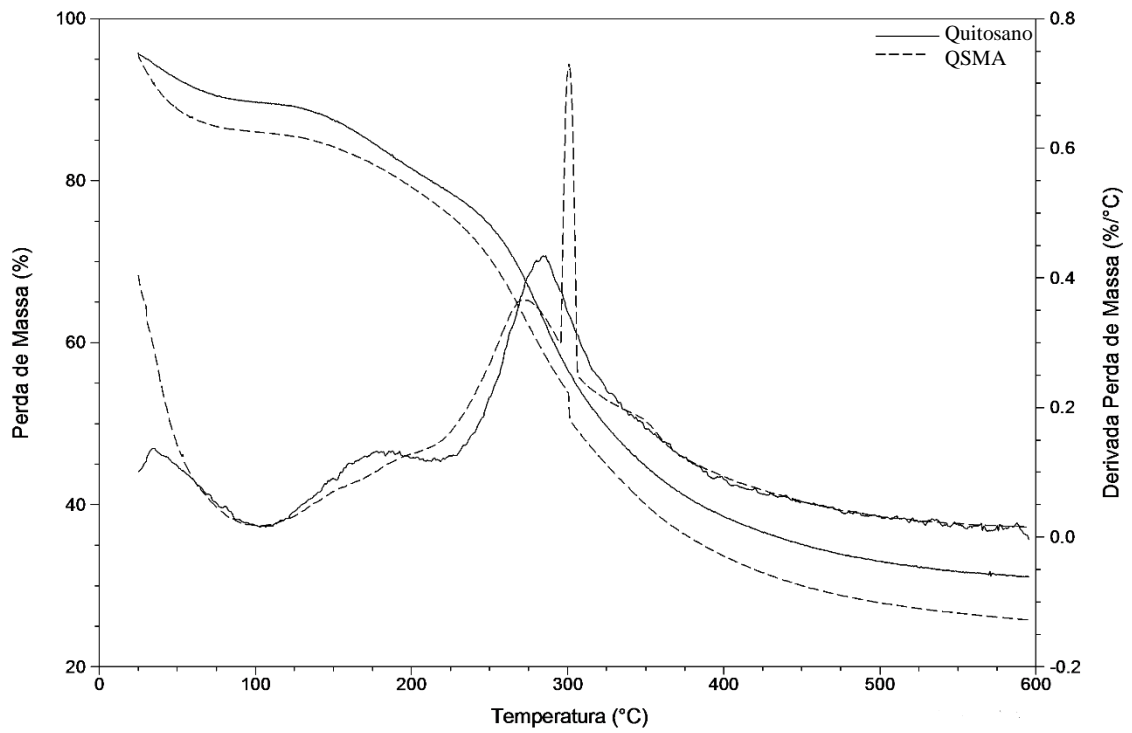


Figura 30-Curvas termogravimétricas e DTG para o quitosano e QSMA.

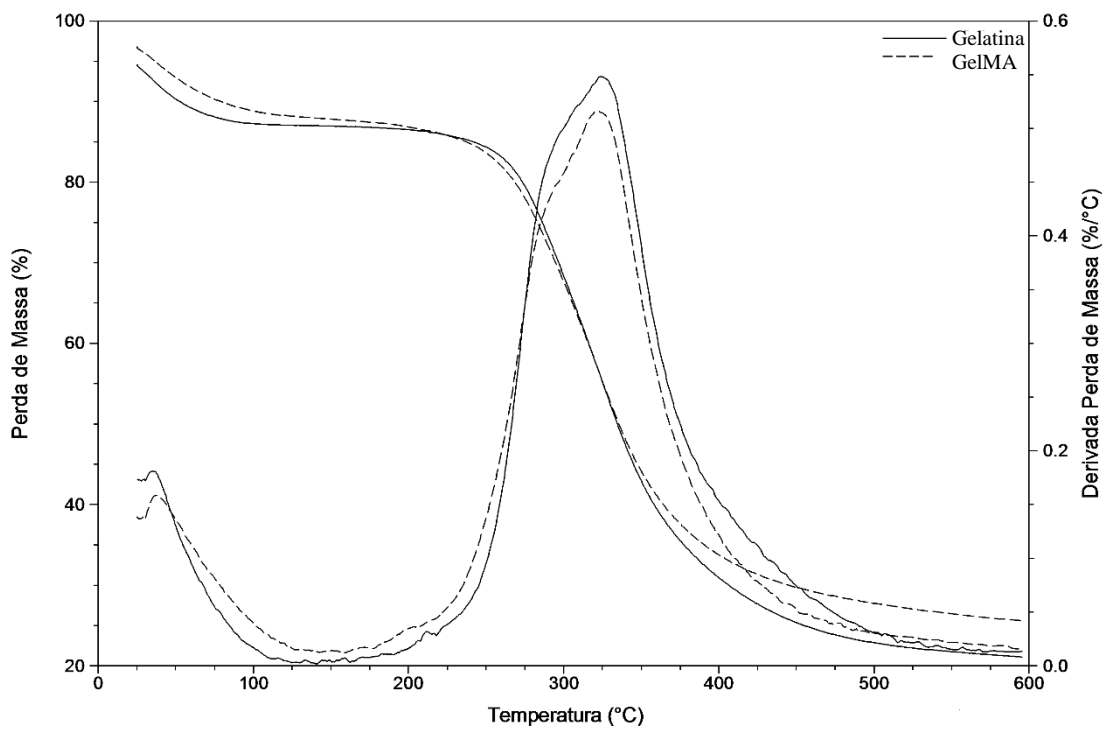


Figura 31-Curvas termogravimétricas e DTG para a gelatina e GelMA.

Os gráficos que comparam os perfis do quitosano e da gelatina antes e após a reação de modificação indicam que esse processo não afetou significativamente a estabilidade térmica dos materiais. Estes polímeros apresentam um primeiro estágio corresponde à perda de água residual (até aos 100°C) e um segundo respeitante à degradação do polímero. A referida perda de água é característica nas curvas termogravimétricas dos polímeros naturais devido ao facto de a água se apresentar naturalmente ligada à estrutura dos mesmos. No caso da curva termogravimétrica do quitosano modificado pode observar-se um pequeno degrau, que origina um pico na curva DTG. Esse “artefacto” não descreve o comportamento da amostra, refletindo apenas a sensibilidade do aparelho utilizado face a perturbações externas à análise.

No caso do quitosano é visível um pico DTG situado entre os 100 e os 250 °C que indica mais um patamar de degradação. Este patamar deve-se ao facto de o quitosano ser um polímero natural que não é homogéneo e que pode conter impurezas. Para além disso, uma vez que provém da desacetilação da quitina, e visto que esta reação nunca é completa, é plausível que existam dois patamares de degradação.

A Figura 32 apresenta os perfis de degradação da membrana composta apenas por PCL, da membrana de GelMA e QSMA e da membrana assimétrica de PCL, GelMA e QSMA.

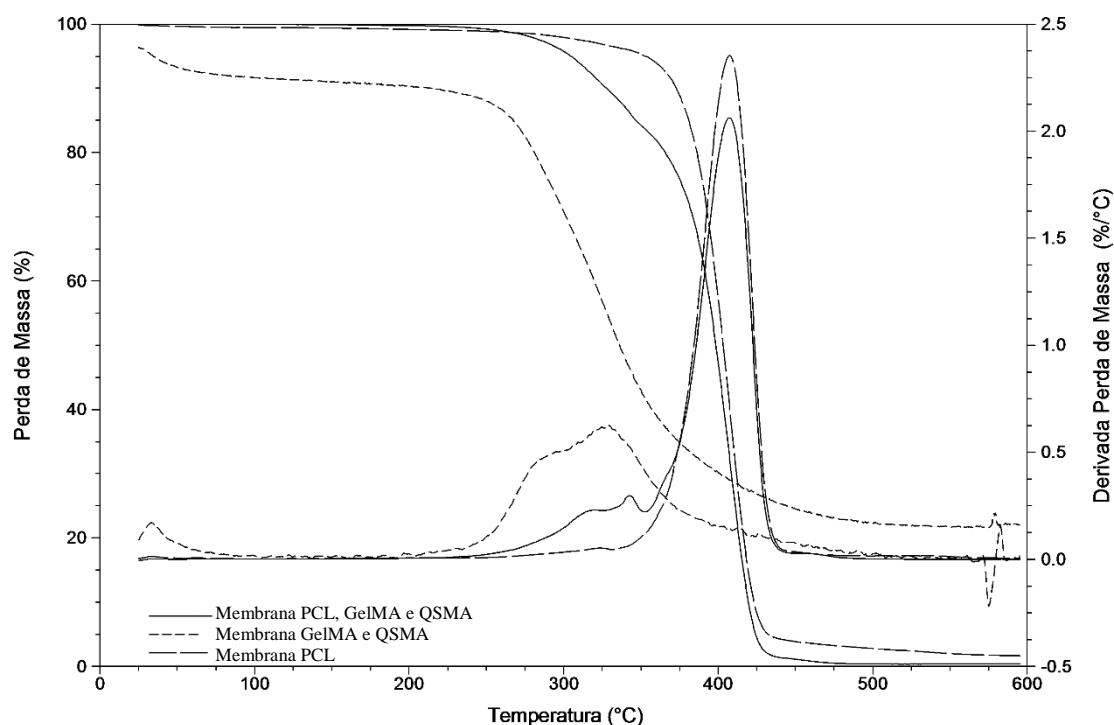


Figura 32-Curvas termogravimétricas e DTG para a membrana de PCL, membrana de GelMA e QSMA e membrana de PCL, GelMA, QSMA.

Ao contrário dos polímeros naturais, a PCL apresenta apenas um estágio de degradação, uma vez que não absorve água (carácter hidrofóbico). Relativamente à membrana de GelMA e QSMA, esta apresenta um perfil semelhante ao da GelMA, tal como seria de esperar devido à

predominância deste componente face ao QSMA (1,08 g para 0,02g). Apesar de a PCL degradar a temperaturas mais elevadas do que o quitosano e a gelatina, estes dois polímeros naturais apresentam menor percentagem de perda de massa final.

A membrana assimétrica composta por uma camada de PCL e outra de GelMA e QSMA apresenta um perfil mais próximo da PCL (presente em maior quantidade). No entanto é visível um segundo estágio coincidente com o perfil dos polímeros naturais presentes. Observando os perfis de degradação das diferentes membranas é notório que as matrizes que contêm PCL são mais estáveis do que a composta apenas por GelMA e QSMA. Este facto veio confirmar que a adição do polímero sintético aos polímeros naturais aumentou a resistência à temperatura nas membranas finais.

Os perfis da Figura 33 englobam as membranas de PCL, GelMA e QSMA produzidas antes e após a fotoreticulação, e a membrana com moxifloxacina reticulada.

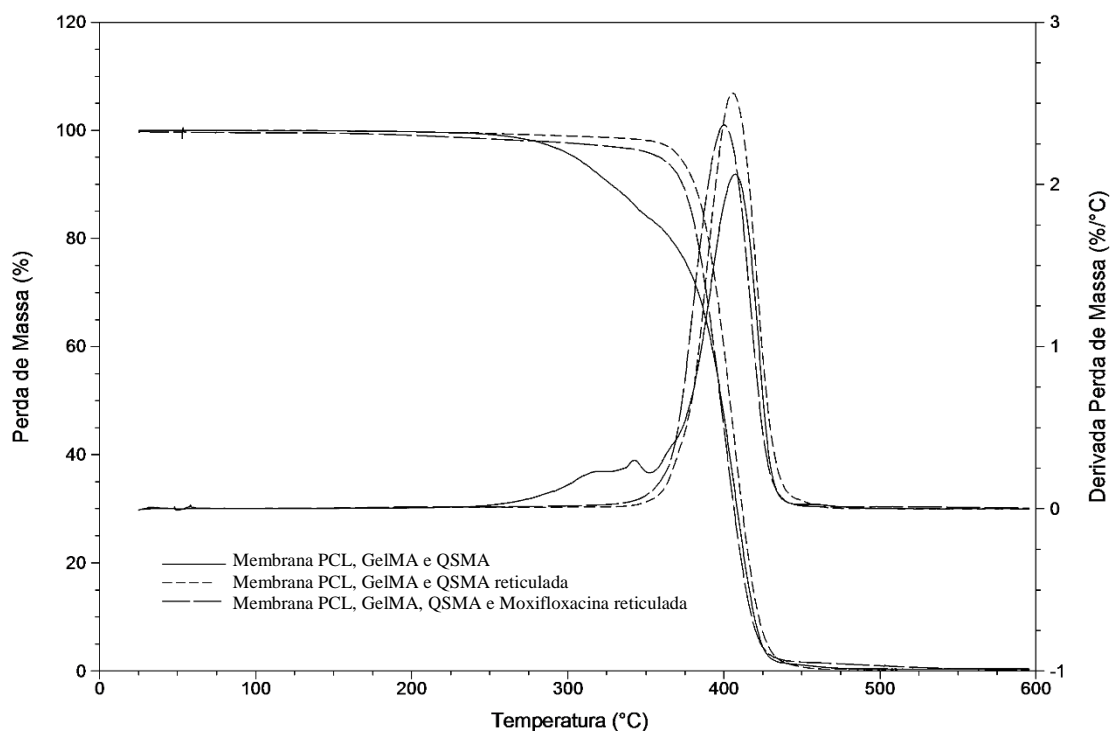


Figura 33-Curva termogravimétrica e DTG para a membrana de PCL, GelMA e QSMA reticulada e não reticulada e membrana de PCL, GelMA, QSMA e moxifloxacina reticulada.

A curva respeitante à matriz não reticulada apresenta dois estágios de degradação enquanto as matrizes reticuladas apresentam apenas um (semelhante ao da PCL). Esta aproximação do perfil das membranas reticuladas ao perfil da PCL é atribuída à já referida dissolução de parte da camada de GelMA e QSMA aquando da imersão das membranas na solução de fotoiniciador. Tal como foi anteriormente mencionado, este fenómeno faz com que a quantidade de polímeros naturais presentes seja menor em comparação com a quantidade de

PCL, o que leva a que as propriedades da membrana final se assemelhem mais às do polímero sintético.

Na Tabela 7, estão condensados os valores de temperatura de degradação dos diferentes materiais analisados, a percentagem de perda de massa e a temperatura de degradação derivada. Os dois valores de  $T_D$  retirados dos perfis correspondem à temperatura em que começa a haver perda de massa ( $T_{D, inicial}$ ) e à temperatura para a qual a perda de massa estabiliza ( $T_{D, final}$ ). Os valores de DTG dizem respeito às temperaturas obtidas a partir dos picos das derivadas das curvas (correspondente a 50% da perda de massa).

*Tabela 7-Valores de temperatura de degradação inicial e final, percentagem de perda de massa e DTG.*

<b>Material</b>	<b><math>T_{D, inicial}</math> (°C)</b>	<b><math>T_{D, final}</math> (°C)</b>	<b>Perda de massa (%)</b>	<b>DTG (°C)</b>	
Gelatina	201	483	63	325	
GelMA	203	466	58	322	
Quitosano	121	461	55	177	284
QSMA	139	476	56	172	275
Memb. PCL	333	446	93	407	
Memb. GelMA + QSMA	199	449	66	328	
Memb. PCL+ GelMA + QSMA	281	441	96	328	407
Memb. PCL+ GelMA + QSMA reticulada	347	449	97	406	
Memb. PCL+ GelMA + QSMA + Moxifloxacina reticulada	336	447	95	401	

Ao analisar a Tabela 7 pode constatar-se a elevada estabilidade térmica das membranas assimétricas fotoreticuladas. Estas apresentam resistência até temperaturas superiores a 330 °C, o que permite que sejam sujeitas a processos a elevadas temperaturas.



## 4.7. Biocompatibilidade

### 4.7.1. Estudo da viabilidade celular

De forma a avaliar a adesão e crescimento de fibroblastos humanos quando em contacto direto com as matrizes produzidas, realizou-se na UBI um estudo *in vitro* da citotoxicidade das mesmas.

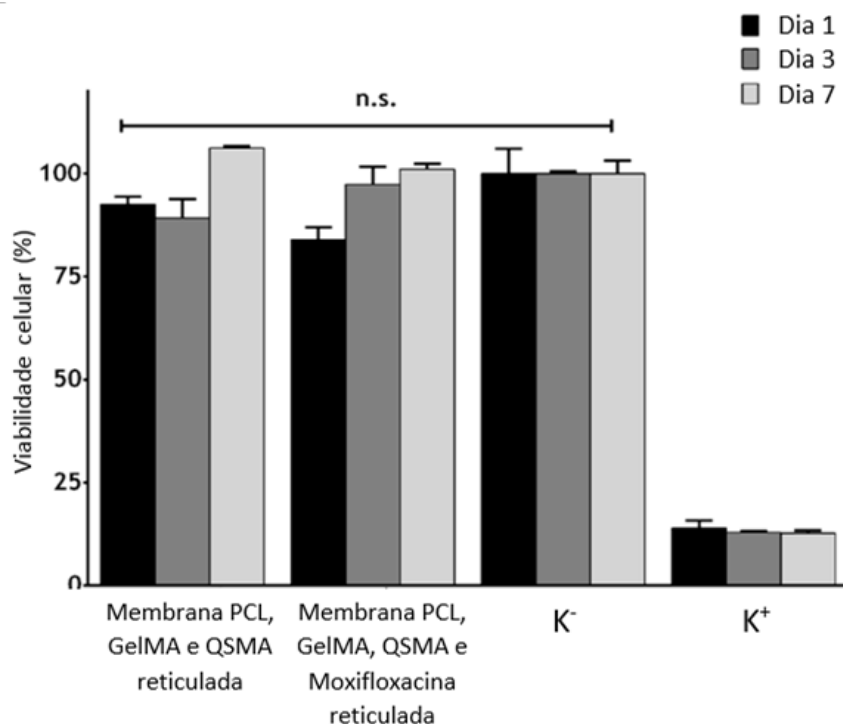


Figura 34-Percentagem de viabilidade celular dos fibroblastos após 1, 3 e 7 dias de contacto com as membranas assimétricas reticuladas com e sem fármaco. Controlo negativo com células vivas (K<sup>-</sup>) e controlo positivo com células mortas (K<sup>+</sup>).

Os fibroblastos foram cultivados e incubados por períodos de 1, 3 e 7 dias e na Figura 34 encontra-se a resposta fisiológica das células à presença das membranas assimétricas reticuladas com e sem fármaco.

Analisando as percentagens obtidas para os *scaffolds* desenvolvidos, observa-se que a viabilidade celular é elevada em todos casos (sempre superior a 80%), sendo que no período de incubação de 7 dias atinge os 100% (valores semelhantes aos obtidos para o controlo negativo: K<sup>-</sup>). Conclui-se que os materiais desenvolvidos não apresentam toxicidade significativa e promovem a adesão e proliferação celulares, sendo portanto biocompatíveis.

Os resultados obtidos para as duas membranas analisadas indicam que nos períodos de incubação de 1 e 7 dias a percentagem de viabilidade celular é ligeiramente superior na amostra sem fármaco. No período de 3 dias, a maior percentagem verifica-se para a membrana com fármaco. Estas pequenas diferenças não são significativas e podem atribuir-se ao erro associado ao estudo realizado.

Seguidamente (Figura 35) são apresentadas as imagens captadas através de um microscópio ótico para cada uma das membranas sujeitas ao estudo, para os diferentes períodos de incubação.

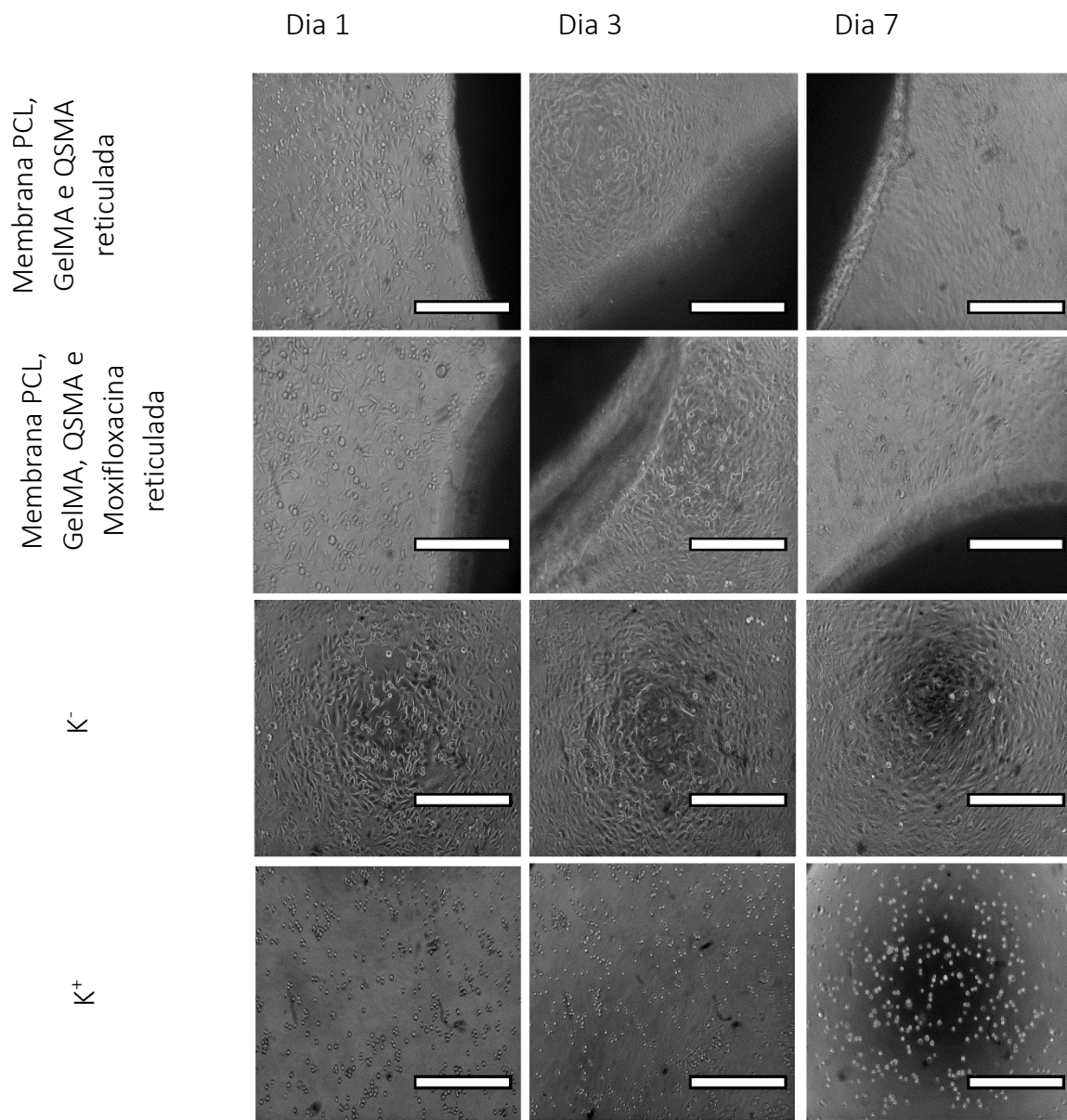


Figura 35-Imagens obtidas por microscópio ótico das culturas celulares de fibroblastos para as diferentes membranas estudadas e para o controlo negativo ( $K^-$ ) e positivo ( $K^+$ ) ao fim de 1, 3 e 7 dias.

Através das imagens da Figura 35 é possível observar que as células presentes nas duas membranas sujeitas à análise adotaram uma estrutura fusiforme ao fim de 7 dias de cultura. O mesmo acontece no controlo negativo ( $K^-$ ) composto por células vivas. No caso do controlo positivo ( $K^+$ ) os fibroblastos apresentam forma esférica uma vez que são células mortas.

## 4.7. Estudo da libertação do fármaco moxifloxacina

Uma vez que foi inserido o antibiótico moxifloxacina nas membranas assimétricas, é importante avaliar o perfil de libertação ao longo do tempo, neste caso, 14 dias. O gráfico construído através dos dados resultantes da medição da absorvância (a 321 nm) em diferentes momentos, encontra-se na Figura 36.

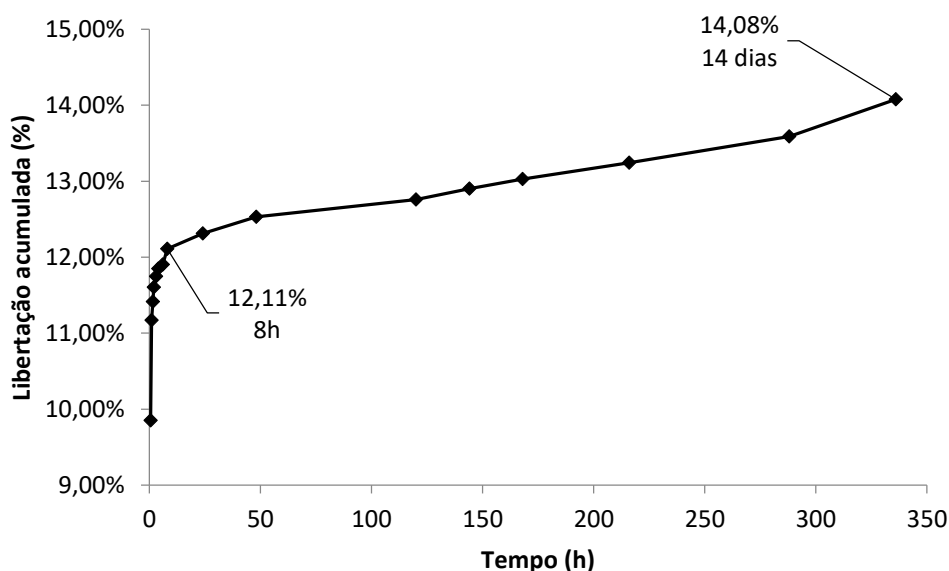


Figura 36-Perfil de libertação da moxifloxacina contida na membrana assimétrica em água miliQ.

Como é evidente no perfil da Figura 36 a libertação da moxifloxacina dá-se essencialmente nas primeiras 8 horas de contacto da membrana com o meio (PBS). A partir desse momento, o valor continua a aumentar mas em menor percentagem.

Ao fim dos 14 dias, o total de moxifloxacina libertada constituiu cerca de 14% da quantidade teórica inicialmente presente na membrana. É importante referir que, uma vez que parte da camada de GelMA, QSMA e moxifloxacina dissolve no processo de reticulação, a quantidade de fármaco que teoricamente estaria presente na porção da membrana que foi utilizada no ensaio de libertação é muito superior à quantidade real. Deste modo, parte da moxifloxacina contida nas fibras já teria sido libertada para a solução de Irgacure ®.

Quanto à rapidez da libertação do antibiótico, prende-se com o facto de este estar presente na camada composta por polímeros naturais. Apesar da reticulação retardar a dissolução da GelMA e QSMA, estes polímeros dissolvem mais rapidamente que a PCL, logo a libertação da moxifloxacina também será mais rápida. Uma possível solução seria a incorporação do fármaco também na camada de PCL.

Apesar de ser desejável uma libertação mais prolongada ao longo do tempo, os resultados obtidos indicam que é possível a incorporação e libertação de fármacos através deste tipo de materiais.

## Capítulo 5. Conclusões e trabalho futuro

### 5.1. Conclusões gerais

Neste projeto foram produzidas membranas assimétricas para a regeneração da pele compostas por uma camada de PCL e uma camada de gelatina metacrilada (GelMA), quitosano metacrilado (QSMA) e antibiótico moxifloxacina.

A gelatina e o quitosano metacrilados foram obtidos a partir da funcionalização da gelatina e do quitosano com anidrido metacrílico. Para a preparação das duas camadas de matrizes fibrosas foi utilizada a técnica *electrospinning* por *bending*, sendo que na camada de GelMA e QSMA foi adicionado o fármaco diretamente à solução a injetar.

De modo a avaliar as propriedades de cada camada foram também preparadas membranas simples. Procedeu-se, ainda, à reticulação de algumas das matrizes obtidas com o fotoiniciador Irgacure® 2959 e radiação UV.

Todas as matrizes foram produzidas conforme previsto inicialmente, pelo que se pode concluir que a técnica utilizada é adequada para a obtenção de materiais desta natureza. Visualmente, todas as membranas apresentaram cor branca e superfície lisa à exceção da membrana com moxifloxacina, que devido à presença do fármaco apresenta um tom amarelado. Nesta última membrana, observou-se ainda a presença de pequenos defeitos à superfície, não tendo ficado tão uniforme como as restantes. As membranas sujeitas ao processo de fotoreticulação apresentaram uma cor mais amarelada quando comparadas com as mesmas membranas não reticuladas.

A partir dos espectros de RMN concluiu-se que ocorreu a reação de modificação, tanto da gelatina como do quitosano, devido à presença dos picos respeitantes à metacrilamida.

Os espectros de FTIR confirmaram a presença dos materiais poliméricos utilizados em cada camada da membrana, a partir da comparação dos picos das membranas assimétricas com os das membranas simples e com os da literatura. Nas membranas reticuladas não foi possível identificar os picos atribuídos à gelatina e quitosano devido à perda de parte dessa camada aquando da imersão das membranas na solução de Irgacure®.

Através das imagens de SEM foi possível observar o aspeto das matrizes e retirar algumas conclusões relativamente à influência dos parâmetros de *electrospinning* no resultado final. Apesar de em todas as membranas analisadas se ter verificado a formação de fibras, foi notória a presença de *beads*, principalmente nas membranas de PCL. As imagens de SEM permitiram ainda determinar o diâmetro médio das fibras. Verificou-se que o diâmetro médio das fibras de PCL é superior ao das fibras de polímeros naturais.

Os resultados obtidos para os ângulos de contacto dinâmicos mostraram que a camada de PCL tem carácter hidrofóbico, enquanto a camada constituída por GelMA e QSMA apresenta carácter hidrofílico.

O estudo de perda de massa indicou que o processo de fotoreticulação permite retardar a dissolução das membranas diminuindo, assim, a perda de massa nas membranas finais quando em contacto com meio aquoso.

A análise termogravimétrica comprovou que, apesar de a GelMA e o QSMA serem menos resistentes à temperatura do que a PCL, os materiais finais são termicamente estáveis, podendo ser sujeitos a processos de esterilização a elevadas temperaturas sem sofrerem degradação.

Relativamente ao antibiótico incorporado na membrana, verificou-se uma maior libertação nas primeiras 8h de contacto com o meio, sendo que a partir desse momento até ao dia 14, a quantidade dispersada foi muito reduzida.

Os resultados obtidos indicam que os *scaffolds* produzidos apresentam características promissoras na área da regeneração da pele, confirmando mais uma vez que a conjugação de materiais de diferentes naturezas (neste caso, polímeros naturais e sintéticos) permitem obter um produto final de melhor qualidade, e mais adequado à aplicação para a qual foi concebido. No entanto, muitos fatores teriam de ser otimizados até obter a membrana ideal para o efeito desejado.

## 5.2 Trabalho futuro

Apesar de ter sido cumprido o objetivo do projeto: obtenção de membranas assimétricas com libertação farmacológica com vista à regeneração da pele existem alguns aspetos a melhorar e a analisar futuramente.

Como foi possível concluir, os parâmetros de *electrospinning* têm elevada influência no resultado obtido, pelo que o estudo de todas as variáveis é essencial para obter o resultado pretendido. Nesse sentido, o primeiro passo seria a otimização das condições do *electrospinning* para todas as membranas produzidas, tentando deste modo eliminar a formação de *beads* e melhorar morfologia de superfície das membranas com fármaco.

Testes às propriedades mecânicas das amostras, tais como a resistência à tração e ao alongamento não foram realizados, pelo que esse seria um ponto importante a estudar, tendo em conta a aplicação dos *scaffolds*. É crucial que as membranas tenham capacidade para suportar o manuseamento aquando da aplicação e que não sofram rutura após serem aplicadas.

Apesar da impossibilidade de realização de testes de hemocompatibilidade (trombogenicidade e índice hemolítico), estes são essenciais para avaliar o comportamento das

matrizes quando em contacto com sangue. Deste modo, deveriam ser realizados os referidos testes, tanto *in vitro* como *in vivo* (numa fase posterior).

Seria também vantajoso proceder à repetição de alguns dos testes realizados no âmbito do projeto (como biocompatibilidade *in vitro*, perda de massa e estudo da libertação da moxifloxacina), de forma a tornar os resultados mais fiáveis e reproduzíveis.

A realização de testes de biocompatibilidade *in vivo* seria fundamental para garantir que os materiais produzidos não apresentam qualquer perigo para a saúde dos pacientes nos quais estes seriam aplicados (como respostas inflamatórias ou reações alérgicas). Os testes *in vitro* dão uma indicação acerca deste aspeto, no entanto seriam necessários resultados mais fiáveis.

Dado que o fármaco utilizado é um antibiótico, as membranas deveriam ser submetidas a ensaios com cultura bacteriana de modo a avaliar o comportamento dos materiais quando em contacto com este tipo de células.

Outro aspeto a estudar futuramente seria a incorporação do fotoiniciador Irgacure® diretamente na solução polimérica que é sujeita ao processo de *electrospinning*. Deste modo seria evitada a perda por dissolução de parte da camada composta por polímeros naturais quando as membranas são mergulhadas na solução de Irgacure®. Também poderia proceder-se à reticulação usando outro tipo de reticulante, como é o caso do glutaraldeído.

Poderiam ainda ser testadas diferentes quantidades de fármaco a incorporar na camada de GelMA e QSMA, e os perfis de libertação para as diferentes concentrações de moxifloxacina. As proporções dos diferentes polímeros poderiam ser estudadas, de forma a otimizar a performance do *scaffold* a nível de propriedades, degradação e sistema de libertação. Também poderia ser estudada a incorporação de fármaco nas duas camadas da membrana assimétrica ou a introdução do fármaco por modificação da superfície na membrana, em vez da dissolução do mesmo na solução polimérica.

Por fim, uma vez garantida a biocompatibilidade, hemocompatibilidade e a otimização dos materiais, poderiam ser realizados testes *in vivo* de forma a estudar eficácia dos *scaffolds* na regeneração da pele. Deste modo seria possível perceber se o tempo de degradação das membranas e a libertação do fármaco são suficientes para auxiliar no crescimento de um novo tecido e evitar a ocorrência de infeções bacterianas.

## Referências Bibliográficas

- [1] Howard, D.; Buttery, L.; Shakesheff, K.; Roberts, S. (2008). Tissue engineering: strategies, stem cells and scaffolds. *Journal of Anatomy*, **213**: 66-72.
- [2] O'Brien, F. (2011). Biomaterials & scaffolds for tissue engineering, *Materials Today*, **14**.
- [3] Zamani, M.; Prabhakaran, M.; Ramakrishna, S. (2013). Advances in drug delivery via electrospun and electrosprayed nanomaterials. *International Journal of Nanomedicine*. **8**: 2997-3017.
- [4] Tavakol, S.; Jalili-Firoozinezhad, S.; Mashinchian, O.; Mahmoudi, O. (2016) Bioinspired Nanotechnologies for Skin Regeneration. *Nanoscience in Dermatology*, **26**: 337-352.
- [5] Dhandayuthapani, B.; Yoshida, Y.; Maekawa, T.; Kumar, D. (2011). Polymeric Scaffolds in Tissue Engineering Application: A Review. *International Journal of Polymer Science*.
- [6] Huang, R.; Li, W.; Lv, X.; Lei, Z.; Bian, Y.; Deng, H.; Wang, H.; Li, J.; Li, X. (2015). Biomimetic LBL structured nanofibrous matrices assembled by chitosan/collagen for promoting wound healing, *Biomaterials*, **53**: 58-75.
- [7] Meyer, U.; Meyer, T.; Handschel, J.; Wiesmann, H. (2009). *Fundamentals of Tissue Engineering and Regenerative Medicine*, Springer, Heidelberg.
- [8] Patel, N.; Gohil, P. (2012). A Review on Biomaterials: Scope, Applications & human Anatomy Significance. *International Journal of Emerging Technology and Advanced Engineering*, **2**: 91-101.
- [9] Saini, M.; Singh, Y.; Arora, P.; Arora, V.; Jain, K. (2015). Implant biomaterials: A comprehensive review. *World Journal of Clinical Cases*, **3**: 52-57.
- [10] Dobrovolskaya, I.; Popryaadukhin, P.; Yudin, V.; Ivan'kova, E.; Elokhovskiy; Weishauptova, Z.; Balik, K. (2015). Structure and properties of porous films based on aliphatic copolyamide developed for cellular technologies. *Journal of Materials Science Materials in Medicine*, **26**: 46.
- [11] Vishakha, K.; Kishor, B.; Sudha, R. (2012). Natural Polymers-A Comprehensive Review. *International Journal of Research in Pharmaceutical and Biomedical Sciences*, **3**: 1597-1613.
- [12] 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**: 115.
- [13] Farris, S.; Song, J.; Huang, Q. (2010). Alternative Reaction Mechanism for the Cross-Linking of Gelatin with Glutaraldehyde. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **58**: 998-1003.
- [14] Gorgieva, S.; Kokol, V. (2011). Chapter 2: Collagen- vs. Gelatine-Based Biomaterials and Their Biocompatibility: Review and Perspectives em *Biomaterials Applications for Nanomedicine*, editado por Rosario Pignatello, 17-18, INTECH.



- [15] Nichol, J.; Koshy, S.; Bae, H.; Hwang, C.; Yamanlar, S.; Khademhosseini, A. (2010). Cell-laden microengineered gelatin methacrylate hydrogels. *Biomaterials*, **31**: 5536-5544.
- [16] Yu, L.; Kazazian, K.; Shoichet, M. (2007). Peptide surface modification of methacrylamide chitosan for neural tissue engineering applications. *Journal of Biomedical Materials Research*, **82**: 243-255.
- [17] Azevedo, V.; Chaves, S.; Bezerra, D.; Fook, M.; Costa, A. (2007). Quitina e Quitosana: aplicações como biomateriais. *Revista Eletrônica de Materiais e Processos*, **2.3**: 27-34.
- [18] Giri, T.; Thakur, A.; Alexander, A.; Ajazuddin; Badwaik, H.; Tripathi, D. (2012). Modified chitosan hydrogels as drug delivery and tissue engineering systems: present status and applications. *Acta Pharmaceutica Sinica B*, **5**: 439-449.
- [19] Tavares, V.A.C.D.B. (2011). *Matrizes de Policaprolactona e Quitosano para aplicação em Engenharia de Tecidos*. Tese de mestrado em Engenharia Biomédica. Faculdade de ciências e tecnologia. Universidade nova de Lisboa, Lisboa, 47 pp.
- [20] Maitz, M.F. (2015). Applications of synthetic polymers in clinical medicine. *Biosurface and Biotribology*, **1**: 161-176.
- [21] Gunatillake, P.; Adhikari, R. (2003). Biodegradable Synthetic Polymers for Tissue Engineering. *European Cells and Materials*, **5**: 1-16.
- [22] Hsu, C.M. (2003). *Electrospinning of Poly( $\epsilon$ -Caprolactone)*. Faculty of the Worcester Polytechnic Institute. Degree of Master in Materials Science and Engineering, 98 pp.
- [23] Timmons, J. (2006). Skin function and wound healing physiology. *Wound essentials*, **1**: 8-17.
- [24] Amirlak, B. (2005). *Skin Anatomy*. Acedido em: 15.05.2017, em: <https://goo.gl/LQvOuN>.
- [25] Morgado, P.; Aguiar-Ricardo, A.; Correia, I. (2015). Asymmetric membranes as ideal wound dressings: An overview on production methods, and performance relationship. *Journal of Membrane Science*, **490**: 139-151.
- [26] Enoch S.; Leaper D. (2017). Basic Science of wound healing. *Surgery*, **26:2**: 31-37.
- [27] Young, A.; McNaught, C. (2011). The physiology of wound healing. *Surgery*, **29:10**: 475-479.
- [28] Haider, A.; Haider, S.; Kang, I. (2015). A comprehensive review summarizing the effect of electrospinning parameters and potential applications of nanofibers in biomedical and biotechnology. *Arabian Journal of Chemistry*.
- [29] Smirnova, N.; Petrova, N.; Lebedeva, I.; Popryadukhin, P.; Dobroval'skaya, I.; Yudin, V. (2016). Tissue reconstruction of skin failures and soft-tissue injuries using regenerative medicine methods. *St. Petersburg Polytechnical University Journal: Physics and Mathematics*, **2**: 322-328.
- [30] Haider, S.; Al-Masry, W.; Bukhari, N.; Javid, M. (2010). Preparation of the Chitosan Containing Nanofibers by Electrospinning Chitosan–Gelatin Complexes. *Polymer Engineering and Science*, **50**: 1887-1893.



- [31] Jafari, J.; Emami, S.; Samadikuchaksaraei, A.; Bahar, M.; Gorjipour, F. (2011). Electrospun chitosan–gelatin nanofibrous scaffold: Fabrication and *in vitro* evaluation. *Bio-Medical Materials and Engineering* **21**: 99-112.
- [32] Boateng, J.; Matthews, K.; Stevens, H.; Eccleston, G. (2008). Wound Healing Dressing and Drug Delivery Systems: A Review. *Journal of pharmaceutical sciences*, **97**: 2892-2923.
- [33] Shaikh, R.; Pillay, V.; Choonara, Y.; Toit, L.; Ndesendo, V.; Bawa, P.; Cooppan, S. (2010). A Review of Multi-Responsive Membranous Systems for Rate-Modulated Drug Delivery. *American Association of Pharmaceutical Scientists*, **11**: 441-459.
- [34] Esentürk, İ.; Erdal, M.; Güngör, S. (2016). Electrospinning method to produce drug-loaded nanofibers for topical/ transdermal drug delivery applications. *J. Fac. Pharm. Istanbul*, **46**: 49-69.
- [35] Coimbra, P. (2010). *Preparação e Caracterização de Sistemas de Liberação Controlada de Fármacos com base em Polímeros de Origem Natural*. Dissertação submetida à Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade de Coimbra para obtenção do grau de Doutor em Engenharia Química, 242 pp.
- [36] R. Srikar, A. L. Yarin, C. M. Megaridis, A. V. Bazilevsky, and E. Kelley (2008). Desorption limited mechanism of release from polymer nanofibers. *Langmuir*, **24**: 965–974.
- [37] Guay, D. (2006). Moxifloxacin in the treatment of skin and skin structure infections. *Therapeutics and Clinical Risk Management*, **4**: 417-434.
- [38] Jacobsen, F.; Fisahn, C.; Sorkin, M.; Thiele, I.; Hirsch, T.; Stricker, I.; Klaassen, T.; Roemer, A.; Fugmann, B.; Steinstraesser, L. (2011). Efficacy of Topically Delivered Moxifloxacin against Wound Infection by *Pseudomonas aeruginosa* and Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, **5**: 2325-2334.
- [39] Dhandayuthapani, B.; Krishnsn, U.; Sethuraman, S. (2010). Fabrication and characterization of chitosan-gelatin blend nanofibers for skin tissue engineering. *Journal of biomedical materials research B: Applied biomaterials*, **94**: 264-272.
- [40] Yue, K.; Santiago, G.; Alvarez, M.; Tamayol, A.; Annabi, N.; Khademhosseini, A. (2015). Synthesis, properties, and biomedical applications of gelatin methacryloyl (GelMA) hydrogels. *Biomaterials*, **73**: 254-271.
- [41] Klotz, J.; Gawlitta, D.; Rosenberg, P.; Malda, J.; Melchels, W. (2016). Gelatin-Methacryloyl Hydrogels: Towards Biofabrication-Based Tissue Repair. *Trends in Biotechnology*, **34**: 394-407.
- [42] Tema 10: Espectroscopia de ressonância magnética nuclear. Em *Fundamentos de Química Orgânica*, 193-208. Acedido em: 12.07.2017, em [goo.gl/3ibnRw](http://goo.gl/3ibnRw).
- [43] Technical Note, *FT-IR Spectroscopy Attenuated Total Reflectance (ATR)*. (2005) Perkin Elmer. Acedido em: 12.07.2017, em [goo.gl/JhBWV5](http://goo.gl/JhBWV5).
- [44] Vernon-Parry, K. (2000). Scanning Electron Microscopy: an introduction. *III-Vs Review*, **13**: 40-44.

- [45] Benedix, R.; Dehn, F.; Quaas, J; Orgass, M. (2005). Application of titanium dioxide photocatalysis to create *self-cleaning* building materials, *Lacer*, **5**: 157-168.
- [46] ISO 10993-5 (2009). Biological evaluation of medical devices – Part5: Tests for *in vitro* cytotoxicity, third edition.
- [47] Borelli, V.; Medeiros, F.; Maia, M.; Medeiros, R.; Higa, O. Biocompatibilidade de biomateriais: Estudo exploratório sobre a aplicação da norma ISO 10.993. The 6th *Latin American Congresso f Artificial Organs and Biomaterials*. Acedido em: 13.07.2017, em: [goo.gl/UfWi8R](http://goo.gl/UfWi8R).
- [48] Lai, T.; Yu, J.; Tsai, W. (2016). Gelatin methacrylate/carboxybetaine methacrylate hydrogels with tunable crosslinking for controlled drug release. *Journal of Materials Chemistry B*, **4**: 2304-2313.
- [49] Kong, J.; Yu, S. (2007). Fourier Transform Infrared Spectroscopic Analysis of Protein Secondary Structures. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica*, **39**: 549-559.
- [50] Campana, S.; Signini, R. (2001) Efeito de Aditivos na Desacetilação de Quitina. *Polímeros: Ciência e Tecnologia*, **11**: 169-173.
- [51] Negrea, P.; Caunii, A.; Sarac, I; Butnariu, M. (2015). The Study of Infrared Spectrum of Chitin and Chitosan Extract as Potential Sources of Biomass. *Digest Journal of Nanomaterials and Biostructures*, **10**: 1129-1138.
- [52] Elzein, T.; 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.





## Anexo A - Preparação de PBS

Para preparar a solução de PBS misturaram-se 3,81 g de fosfato de potássio monobásico ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ), 12,64 g de fosfato de sódio dihidratado dibásico ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ), 0,2 g de cloreto de potássio (KCl) e 8,0 g de cloreto de sódio (NaCl) em 1L de água miliQ (água ultrapura e sem sais).

O  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  é a componente ácida e o  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  a componente básica, sendo que são estes dois reagentes que permitem obter o pH de 7,4, semelhante ao do organismo. Os sais KCl e NaCl servem para mimetizar a força iónica existente nos fluidos corporais.

## Anexo B - Curva de calibração da Moxifloxacina

De modo a poder aferir as concentrações de moxifloxacina no meio aquando do estudo da libertação do fármaco, é necessário proceder à elaboração de uma curva de calibração, que relaciona a concentração, com a variável a medir no espectrofotómetro: a absorvância.

Através da preparação de soluções de moxifloxacina de concentrações conhecidas e da medição da absorvância dessas mesmas soluções, elabora-se um gráfico que dá a indicação da relação entre as duas variáveis. Desta forma, para as amostras relativas à libertação do fármaco, e cuja concentração é desconhecida, é possível determinar a partir da absorvância medida, a quantidade de moxifloxacina no meio (recorrendo à curva previamente elaborada).

O perfil obtido e respetiva reta de ajuste encontram-se na Figura B.

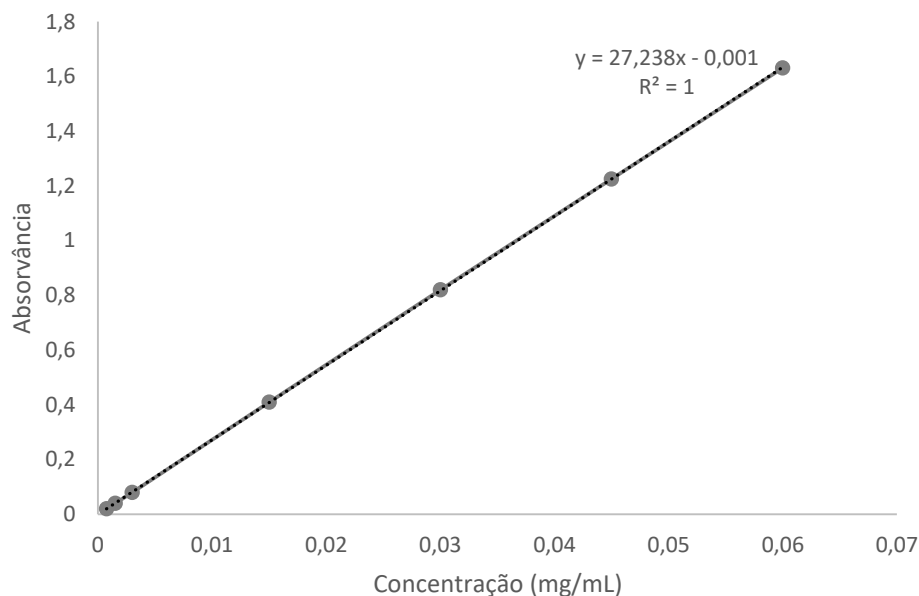


Figura B- Reta de calibração da moxifloxacina e respetivo ajuste.