



UNIVERSIDADE D
COIMBRA



Mariana Hugo Borges Barreto Silva

NOVOS MATERIAIS PARA A OXIGENAÇÃO MELHORADA
DE CULTURA DE CÉLULAS E DE *SCAFFOLDS*
PARA ENGENHARIA DE TECIDOS

Dissertação de Mestrado Mestrado em Instrumentação Biomédica e Biomateriais,
orientada pelo Professor Doutor Hermínio José Cipriano de Sousa
e pela Professora Doutora Carmen Álvarez-Lorenzo
e apresentada ao Departamento de Física da Faculdade de Ciências e Tecnologia
da Universidade de Coimbra

Setembro de 2018

Departamento de Física

NOVOS MATERIAIS PARA A OXIGENAÇÃO MELHORADA DE CULTURA DE CÉLULAS E DE *SCAFFOLDS* PARA ENGENHARIA DE TECIDOS

Mariana Hugo Borges Barreto Silva

Tese no âmbito do Mestrado em Instrumentação Biomédica e Biomateriais orientada pelo Professor Doutor Hermínio José Cipriano de Sousa e pela Professora Doutora Carmen Álvarez-Lorenzo e apresentada ao Departamento de Física da Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade de Coimbra.

Setembro de 2018



FACULDADE DE
CIÊNCIAS E TECNOLOGIA
UNIVERSIDADE DE
COIMBRA



Esta cópia da tese é fornecida na condição de que quem a consulta reconhece que os direitos de autor são pertença do autor da tese e que nenhuma citação ou informação obtida a partir dela pode ser publicada sem a referência apropriada.

This copy of the thesis has been supplied on condition that anyone who consults it is understood to recognize that its copyright rests with its author and that no quotation from the thesis and no information derived from it may be published without proper acknowledgement.

Não sou nada.
Nunca serei nada.
Não posso querer ser nada.
À parte isso, tenho em mim todos os sonhos do mundo.
—Álvaro de Campos

Agradecimentos

Ao chegar ao fim mais uma etapa da minha vida, não posso deixar de agradecer a quem me marcou ao longo destes cinco anos.

Começo por agradecer ao Professor Hermínio C. Sousa e à Doutora Ana M. Dias por todo o conhecimento e sabedoria partilhados com tanta dedicação e paciência, pela disponibilidade para me ajudarem e guiarem ao longo de todo o percurso e por me terem ensinado a perseverar mesmo quando as coisas como não corriam como esperado, nunca me negando chamadas e conferências por Skype quando estava longe. Neste ano, pude crescer académica, profissional e pessoalmente graças aos Professores. Agradeço também à Doutora Mara M. Braga, por me ter auxiliado nas diferentes etapas do projeto.

Em segundo lugar, quero agradecer à Doutora Carmen Álvarez-Lorenzo e ao Doutor Ángel Concheiro Nine, por me terem dado a oportunidade de fazer investigação no Departamento de Farmácia e Tecnologia Farmacêutica da Universidade de Santiago de Compostela e por me terem acolhido tão bem, ajudando-me e orientando-me sempre que necessitava, tendo disponibilizado todos os materiais e meios para o prosseguimento deste projeto.

À Cláudia Buga, ao Gustavo Marques, à Patricia Días e ao Fernando Álvarez por toda a colaboração, dedicação, auxílio, ensinamentos e discussão de ideias ao longo deste projeto. Nunca me disseram que não.

Ao Professor Abel Ferreira, à Professora Graça Rasteiro e à Doutora Sílvia Cendán pela colaboração e disponibilização de equipamentos essenciais à realização deste trabalho.

Um agradecimento especial às pessoas fantásticas do B18, do Laboratório de Ciclodextrinas e dos Laboratórios do piso 0 da Universidade de Santiago de Compostela, pela sua boa disposição, brincadeiras, apoio, disponibilidade, discussões de ideias, momentos de descanso, por me terem acolhido de forma tão calorosa e por nunca terem deixado de me motivar e encorajar a dar mais.

A todos os amigos que o DF me deu, em especial à Bia, à Rita e ao Pedro pelos momentos passados e, em particular, neste ano pelo seu apoio incondicional. Mesmo a quilómetros de distância nunca deixaram de acreditar em mim e encorajaram-me mesmo nos momentos em que parecia que o mundo ia desabar. Está mais que provado que a distância física não é impedimento da amizade. Os cinco anos da vossa amizade moldaram-me, sem vocês não seria eu mesma. Às minhas afilhadas Marta e Mariana por toda amizade,

carinho, boa disposição e confiança depositada em mim. À Addy por ter sido a melhor companheira de casa que podia ter pedido, pelos bolos, pelas quesadillas, pelas noites de *home cinema* e por me fazer sempre rir. À Diana por ter sido a portuguesa em Espanha que compreendia as minhas frustrações laboratoriais e pessoais, e que não dizia que não a experiências gastronómicas galegas.

Por último, quero agradecer aos meus Pais pelo carinho, dedicação, apoio, paciência e por todos os ensinamentos e valores que me transmitiram desde pequenina, por todo investimento que fizeram em mim ao longo destes anos: o que sou hoje devo-o a eles. Ao meu irmão por acreditar em mim e nas minhas capacidades, e pelas conversas sobre a vida. À minha tia por dar daqueles mimos que me fizeram esquecer os dias “maus” de laboratório.

Resumo

A oxigenação define-se como o processo através do qual os organismos aeróbios têm acesso ao oxigénio molecular, O₂, em sistemas biológicos. Este elemento é importante no microambiente celular *in vivo*, em sistemas de culturas celulares *in vitro* e *ex vivo*, e em sistemas para aplicações em Engenharia de Tecidos. Este elemento desempenha um papel fundamental em diferentes processos biológicos, como, por exemplo, aceitador final de eletrões no processo de respiração oxidativa, para obtenção de ATP, e como molécula sinalizadora e reguladora do processo de diferenciação celular. Uma das problemáticas transversais aos atuais sistemas utilizados para mimetizar as condições das células em ambiente fisiológico, e nos *scaffolds* desenvolvidos para aplicações em Engenharia de Tecidos, é a oxigenação insuficiente do meio, que pode originar situações de hipoxia que culminam na morte celular. No entanto, apesar de já existirem moléculas/materiais transportadores e/ou geradores artificiais de oxigénio, estes ainda apresentam limitações no que diz respeito à estabilidade, toxicidade e modulação da libertação de O₂ no tempo, para que desempenhem a função pretendida de forma eficiente.

Neste trabalho propõe-se a preparação de um sistema inovador baseado em nanocápsulas de sílica, contendo no seu interior um líquido iónico (LI) que possui capacidade para absorver, reter e/ou libertar quantidades apreciáveis de oxigénio, mantendo a sua estabilidade química e mecânica. O LI escolhido é da família dos fosfónios (trihexil(tetradecil) fosfónio bis(trifluorometilsulfonil)imida, [P_{6,6,6,14}][NTf₂]).

As nanocápsulas de sílica do tipo *core/shell* (nc/Si-LI) foram desenvolvidas por combinação de técnicas de microemulsão e método sol-gel em meio aquoso. Paralelamente, foram desenvolvidos *scaffolds* do tipo polimérico, à base de colagénio e ácido hialurónico, como estrutura para incorporação das nc/Si-LI sintetizadas e de suporte ao crescimento, proliferação e diferenciação celular.

Para a preparação das microemulsões, começou-se por determinar a concentração micelar crítica (CMC) pelo método do anel de du Nouÿ para cinco diferentes sistemas de surfactantes, tendo-se optado por aquele que apresentava características mais adequadas tendo em vista a aplicação pretendida. Seguiu-se o desenvolvimento de duas formulações de emulsões que diferiam na proporção LI/surfactantes, por forma a determinar qual seria a mais estável para usar na síntese de nc/Si-LI. Esta fase envolveu o estudo dos diâmetros

hidrodinâmicos e das cinéticas de formação e degradação das emulsões obtidas por emulsificação do LI disperso.

Para a preparação das nc/Si-LI foram estudadas as condições experimentais da hidrólise e de condensação da sílica a partir de um precursor de alcoxi-silano (tetraetilortosilicato, TEOS), as condições de processamento, lavagem/remoção e armazenamento das nc/Si-LI formadas foram otimizadas. Foram sintetizadas nc/Si-LI para as duas formulações de emulsão desenvolvidas, com duas razões LI/surfactantes distintas uma vez que ambas as emulsões desenvolvidas apresentaram propriedades promissoras.

Para a preparação dos *scaffolds*, os polímeros escolhidos são caracterizados por estimularem a migração e divisão celular, e por possuírem excelente biocompatibilidade, imunoneutralidade e biodegradabilidade controlável. Por forma a estabilizar a estrutura destes polímeros, o *scaffold* foi reticulado com *N*-(3-dimetilaminopropil)-*N'*-etilcarbodiimida hidrocloreídico (EDC) e sal de sódio *N*-hidroxisulfosuccinamida (sulfo-NHS), através do estabelecimento de ligações entre os grupos carboxilo de ácido hialurónico e grupos amina do colagénio. As condições de síntese, processamento e lavagem das matrizes foram otimizadas por forma a obter *scaffolds* com características adequadas ao objetivo do trabalho.

Todos os materiais preparados foram caracterizados por diferentes técnicas. Os diâmetros hidrodinâmicos das emulsões de LI e das nc/Si-LI formadas foram avaliados através do estudo da Dispersão Dinâmica da Luz (DLS), sendo que o diâmetro das nc/Si-LI foi também determinado por microscopia de varrimento eletrónico (SEM) e microscopia de varrimento por transmissão eletrónica (STEM). A carga à superfície das nc/Si-LI foi aferida por medidas de potencial zeta, a composição química das nc/Si-LI foi identificada por espectroscopia de infravermelhos por Transformada de Fourier (FTIR) e os rendimentos das reações foram estimados por análise termogravimétrica (TGA).

Os ensaios de citotoxicidade, LDH e WST-1, para as células Balb/3T3, foram realizados para todos os materiais desenvolvidos, tendo sido testadas diferentes concentrações e formulações de nc/Si-LI (com e sem líquido iónico no interior), LI puro (diferentes concentrações e formas de contacto com as células), *scaffolds* desenvolvidos, com e sem nc/Si-LI incorporadas, e nanopartículas de sílica mesoporosa, como controlo. As condições experimentais para realização dos ensaios foram sendo otimizadas para cada material testado e tendo em consideração os resultados obtidos. Finalmente, os materiais desenvolvidos foram sujeitos a testes para avaliar a sua capacidade de absorver/libertar oxigénio. Estes ensaios permitiram estudar a evolução da concentração de O₂ no meio

aquoso onde as amostras são adicionadas. O ensaio de oxigenação pretendeu analisar a difusão do O₂ do interior das amostras a testar para o meio envolvente. Por sua vez, o ensaio de desoxigenação teve como objetivo a quantificação da capacidade de absorção de O₂, proveniente da água saturada, para cada uma das amostras em estudo, sendo que a concentração testada foi igual à do ensaio de oxigenação. Após obtenção de resultados, procedeu-se à quantificação da difusão de O₂ pelo LI, a partir da determinação do coeficiente de transferência de oxigénio ($K_L a$), por análise dos perfis de sorção/libertação de O₂ medidos.

De forma resumida, os principais resultados obtidos ao longo deste trabalho permitiram concluir que as emulsões de LI para o tempo de sonicação de 25 minutos permanecem estáveis até 72 horas após a sua formação e um diâmetro hidrodinâmico de aproximadamente 262,2 nm. As nc/Si-LI obtidas apresentam dimensões numa gama adequada à sua utilização para oxigenação de meios de cultura de células e *scaffolds* para Engenharia de Tecidos (50-300 nm) e que a sua superfície é carregada negativamente (< -18 mV). A análise de TGA permitiu calcular eficazmente a quantidade de LI e de sílica presente em cada amostra. Os valores de percentagem de LI incorporada nas nc/Si-LI foi de 43,14% (formulação A) e 54,68% (formulação B) e de sílica foi de 52,60% (formulação A) e 50,01% (formulação), sendo ainda possível concluir que os rendimentos estimados não foram afetados pelo tipo de processamento a que as nanocápsulas foram sujeitas. Os ensaios de absorção e libertação de O₂ permitiram concluir que as nc/Si-LI, as emulsões de LI e os *scaffolds*, sem e com incorporação de nc/Si-LI, são capazes de consumir e de libertar O₂, o que é de elevada importância para a sua utilização como *scaffold* para oxigenação, pois permite aumentar a quantidade de O₂ presente no local de aplicação, aumentando a viabilidade e proliferação celular. Os valores de $K_L a_1$ obtidos para sorção de O₂ foram de -3,03 para a emulsão de LI, -4,28 para as nc/Si-LI e de -4,50 para os *scaffolds* com nc/Si-LI incorporadas. Por sua vez, os valores obtidos para a libertação de O₂ foram de 1,62, 1,17 e 1,50, respetivamente.

Apesar de os resultados respeitantes aos ensaios de citotoxicidade não terem sido muito positivos, uma vez que foi provado que o LI utilizado neste trabalho é citotóxico, é possível contornar-se esta situação procedendo a alterações no sistema, como, por exemplo, escolher outro LI hidrofóbico menos citotóxico (p.e., da família das colinas ou imidazólios, ou então proceder-se à troca do anião por outro menos hidrofóbico, sem que a hidrofobicidade do LI seja comprometida) ou proceder-se à otimização do revestimento de sílica, por forma a que não ocorra lixiviação do LI no meio em que é administrado (p.e.,

aumento da espessura, diminuição da porosidade). De qualquer forma, o sistema desenvolvido neste trabalho pode ser usado para outros processos que não envolvam o contacto com células (p.e., sistemas para separação de gases para a indústria).

Com este trabalho fica demonstrado que é possível encapsular um LI hidrofóbico em nanocápsulas de sílica, usando técnicas de microemulsão com sistemas de surfactantes adequados, combinadas com métodos de sol-gel em meio aquoso. Foi também demonstrado que as nanocápsulas e os *scaffolds* com nc/Si-LI incorporadas apresentavam características favoráveis para a sua aplicação em sistemas de oxigenação para meio de cultura celular ou para suporte polimérico em Engenharia de Tecidos. No futuro próximo espera-se que a otimização das nanocápsulas torne o sistema desenvolvido útil para o proposto definido.

Abstract

Oxygenation is defined as the process by which all the living organisms receive molecular oxygen, O₂, in biological systems. O₂ is a key element in the *in vivo* microenvironment and in *in vitro* and *ex vivo* systems with applications in Tissue Engineering. This element plays a major role in a variety of biological processes, such as final electrons acceptor in oxidative phosphorylation, the process by which the cells is able to obtain ATP. Furthermore, it also plays an important role in the process of signaling and regulating cell is differentiation. One of the main problems of the present systems that mimic the cell is conditions and environment in the physiological context, as well as in the scaffolds developed for Tissue Engineering applications, lies in the lack of oxygenation in the medium, leading to hypoxia and culminating with cell dead. To overcome this problem, molecules/materials that can act as artificial carriers and/or generators of O₂ were developed. However, the proposed alternatives still present limitations in what regards to its stability, toxicity, and modulation of the O₂ release over time, for them to play their role/function in a proper and efficient way.

In this work it is proposed an innovative system that comprises silica nanocapsules, with an ionic liquid (IL) in its core that has a high capacity to absorb, retain and release considerable amounts of O₂, without having it affecting its mechanical and chemical stability. The selected IL belongs to the phosphonium family, (trihexyl(tetradecyl) phosphonium bis(trifluoromethylsulfonyl)imide, [P_{6,6,6,14}][NTf₂]).

The core/shell silica nanocapsules (nc/Si-IL) were obtained through the combination of microemulsion and sol-gel techniques in aqueous medium. At the same time, polymeric scaffolds from hyaluronic acid and collagen were developed, as structures for the incorporation of the synthesized nanocapsules and as cell growth, proliferation and differentiation support.

For the preparation of the emulsions, the first step was to determine the critical micellar concentration (CMC) by the ring of du Nouÿ method for five different surfactants systems. The one that presented more suitable characteristics was chosen for the proposed application. Subsequently, two emulsions formulations were developed, that differed in the IL/surfactants proportion. The purpose was to determine which one would be more stable for the synthesis of the nanocapsules. In this step, the hydrodynamic diameter and the

kinetics of formation and degradation of emulsions was studied, by Dynamic Light Scattering (DLS) technique.

For the preparation of the core/shell silica nanocapsules (nc/Si-IL) the conditions of silica is hydrolysis and condensation, from the alcoxi-silane precursor (tetraethylorthosilicate, TEOS), and the conditions of processing, washing, removing and storage were studied. Two formulations of nc/Si-IL were synthesized from the developed emulsions, with different IL/surfactants proportions, since both presented promising properties.

For the preparation of the scaffolds the chosen polymers are known for stimulating cell migration and proliferation, whilst presenting high levels of biocompatibility, immunoneutrality and controllable biodegradability. To stabilize the structure of these polymers, *N*-(3-dimethylaminopropyl)-*N*'-ethylcarbodiimide hydrochloride (EDC) and *N*-hydroxysulfosuccinamide sodium salt (sulfo-NHS) were used as crosslinking agents, through the bonds established between the carboxylic groups from the hyaluronic acid and amine groups from the collagen. Synthesis, processing and washing conditions of the scaffolds were optimized, in order to obtain scaffolds with the desired characteristics for the pretended application.

All the prepared materials were subjected to different characterization techniques. The hydrodynamic diameters of the IL emulsion and nc/Si-IL were evaluated by DLS, also the nc/Si-IL diameter was obtained from Scanning Electron Microscopy (SEM) and Scanning Transmission Electron Microscopy (STEM). The charge on the surface of the nc/Si-IL was measured by Zeta Potential, the nc/Si-IL chemical composition was given by Fourier Transformed Infrared Spectroscopy (FTIR), and the reaction yield calculated from the data of the thermogravimetric analysis (TGA).

The cytotoxicity assays LDH and WST-1 were performed for all the materials using Balb/3T3 cells. Different concentrations of nc/Si-IL (with and without IL), pure IL (different concentrations and methods of contact with the cells), scaffolds with and without nc/Si-IL, and mesoporous silica nanoparticles, as control, were tested. The experimental conditions to perform the cytotoxicity assays were optimized considering the results obtained for each one of the tested materials.

Finally, the developed materials were submitted to O₂ sorption/release tests, in order to evaluate their capability to absorb/release oxygen. These assays allowed the study of the O₂ concentration evolution in the aqueous medium were the samples were added. The oxygenation assay gives information on the O₂ diffusion from the core of the samples to

the surrounding environment. In turn, the deoxygenation assay aims to quantify the O₂ sorption capability of the sample, that is present in the saturated aqueous medium. After data collection, the O₂ diffusion by IL was determined from the oxygen transfer coefficient ($K_L a$), by analysis of the O₂ sorption/release profiles obtained.

Briefly, the data collected over this work allowed to conclude that the IL emulsion obtained for 25 minutes of sonication remains stable for at least 72 hours after formation and that the micelles present a hydrodynamic diameter of 262,2 nm, approximately. The nc/Si-IL dimensions varies in a range that is appropriate to their application for cell culture mediums and tissue engineering scaffolds oxygenation (50-300 nm), also their surface is negatively charged (<-18 mV), for both samples. The information given by TGA enabled the IL and silica percentages calculation in each analysed sample. The IL incorporated in the nc/Si-IL percentage was of 43,1% (formulation A) and 54,7% (formulation B), and the silica percentage was of 50,1% (formulation B). Also concluded that the type of processing to which the nc/Si-IL were submitted did not affect the reaction rates. The O₂ sorption and release assays provided valuable information about the capacity of all the samples to capture and release O₂, IL emulsion, nc/Si-IL and scaffolds with and without nc/Si-IL. This as to be the main feature of the material, since the goal is to raise the levels of O₂ at the implantation site, hence improving the cell viability and proliferation. The $K_L a_1$ values for O₂ sorption were of -3,03 for the IL emulsion, -4,28 for the nc/Si-IL and of -4,50 for the *scaffolds* with nc/Si-IL incorporated. In turn, the values for O₂ release were of 1,62, 1,17 and 1,50, respectively.

Although the cytotoxicity assays results were not extremely positive, it was proved that the IL used in the present work is cytotoxic, it is possible turn the situation around by making alterations in the developed systems. For example, to choose another hydrophobic IL less cytotoxic (i.e., cations from the choline and imidazolium families, or to change the anion for another one less hydrophobic, without compromising the overall hydrophobicity). Another possible option is to optimize the features of silica shell (i.e., thickness, porosity), this way the lixiviation of IL to the medium can be avoided. Otherwise, the system wherein proposed can be applied in other processes that do not implies the contact with cells (i.e., system for gas separation for industry).

In this work the hydrophobic IL was successfully encapsulated in silica nanocapsules, by applying microemulsion and sol-gel techniques to surfactants systems suitable for the purpose. Moreover, it was demonstrated that the nanocapsules and the scaffolds with nanocapsules have favourable features for future application in systems for

cell culture oxygenation, as well as, for polymeric support for Tissue Engineering. In the future, its intended to improve this nanocapsules system in order to make it viable and useful for the desired purpose.

Índice de matérias

Agradecimentos	i
Resumo	iii
Abstract	vii
Índice de matérias	xi
Índice de figuras.....	xiii
Índice de tabelas.....	xix
Lista de abreviaturas	xxi
Motivações e objetivos	1
1. Papel da oxigenação em sistemas biológicos e em aplicações farmacêuticas e biomédicas	3
1.1 Culturas celulares <i>in vitro</i> e Engenharia de Tecidos	4
1.2 Outras aplicações farmacêuticas e biomédicas para terapêutica e diagnóstico.....	5
1.3 Tecnologias de oxigenação para culturas de células <i>in vitro</i> e Engenharia de Tecidos: vantagens e limitações	9
2. Nanossistemas para oxigenação.....	19
2.1 Nanoesferas e nanocápsulas	20
2.2 Metodologias de síntese de nanocápsulas à base de sílica	22
2.3 Líquidos com elevada capacidade para absorver, reter e libertar oxigénio	23
2.4 Citotoxicidade de líquidos iónicos	25
2.5 Matrizes poliméricas de suporte para oxigenação.....	30
3. Metodologias para avaliação <i>in vitro</i> da biocompatibilidade de materiais.....	37
4 Materiais e Métodos.....	43
4.1 Materiais.....	43
4.2 Métodos de preparação e processamento	45
4.2.1 Preparação de emulsões dos sistemas em estudo	45
4.2.2 Preparação micro/nano cápsulas usando um método sol-gel em meio aquoso .	47

4.2.3 Preparação de matrizes poliméricas para suporte ao crescimento celular.....	49
4.3 Caracterização de emulsões	52
4.4 Caracterização físico química das micro/nano cápsulas	54
4.5 Caracterização dos <i>scaffolds</i> à base de ácido hialurónico e colagénio	56
4.6 Ensaio de citotoxicidade	56
4.7. Quantificação da sorção/libertação de oxigénio para os sistemas desenvolvidos...	62
5. Resultados experimentais e discussão	65
5.1 Emulsões	65
5.2 Micro/nano cápsulas de sílica usando o método sol-gel em meio aquoso.....	71
5.3 <i>Scaffolds</i> à base de ácido hialurónico e colagénio	84
5.4 Citotoxicidade	88
5.5 Sorção/libertação de oxigénio para os sistemas desenvolvidos	101
Conclusões	107
Trabalho futuro	109
Referências bibliográficas.....	111
Anexos	131
Anexo A – Frases H/P de saúde e segurança	131
Anexo B – Outros <i>scaffolds</i> desenvolvidos.....	136
Anexo C1- Concentração micelar crítica para vários sistemas de surfactantes	139
Anexo C2 – Resultados experimentais dos ensaios de DLS.....	142
Anexo D - Protocolo preparação amostras para STEM	144
Anexo E - Preparação do meio de cultivo para as células Balb/3T3	144
Anexo F – Descrição detalhada dos ensaios de citotoxicidade.....	145
Anexo G – Cálculo de <i>KLa</i> 1.....	148

Índice de figuras

Figura 1 – Curvas de saturação do O ₂ à temperatura de 37 °C para a hemoglobina, diferentes PFCs e água pura. (Legenda: — hemoglobina 130 mg/mL; — 20% de Fluosol (nome comercial); — 100% de brometo de perfluorooctil (PFOB); — água; - - pO ₂ no sangue venoso; - - pO ₂ no sangue arterial; - - pO ₂ no ar atmosférico; ···· 95% oxigênio). Adaptado da referência ¹	11
Figura 2 - Mecanismo de captura e libertação do O ₂ : (A) HbOCs e (B) transportadores de O ₂ à base de PFCs. (C) Relação entre o conteúdo em O ₂ e a pO ₂ em para: — HbOCs e — transportadores de oxigênio à base de PFCs. Adaptado da referência ⁵⁶	11
Figura 3 – Sistema híbrido líquido-sólido-líquido para cultura de células que consiste numa fase líquida de PFC saturado de O ₂ , uma fase sólida que corresponde ao <i>scaffold</i> de PLA fibroso e uma outra fase líquida de meio de cultura para células (DMEM). Adaptado da referência ⁷⁰	13
Figura 4 – Reação Diels-Alder.	16
Figura 5 – Representação esquemática de microtanques isolados por um revestimento polimérico. Adaptada da referência ⁸⁰	17
Figura 6 – Representação esquemática de diferentes tipos de nanopartículas. Adaptada da referência ⁸¹	19
Figura 7 – Representação esquemática do mecanismo de nucleação da sílica, desenvolvimento das partículas primárias e crescimento das partículas. Adaptado da referência ⁹¹	22
Figura 8 - Estruturas químicas dos catiões e aniões mais utilizados para produção de LIs. Adaptado da referência ⁹⁵	24
Figura 9 – Representação esquemática da inserção do LI na bicamada fosfolipídica e formação de vesículas LI-lípidos. Adaptada da referência ¹⁰¹ . (Legenda: vermelho – bicamada fosfolipídica; amarelo – líquidos iônicos).	28
Figura 10 – Representação esquemática de um sistema para libertação controlada de O ₂ para aumento da sobrevivência e diferenciação das células derivadas da cardioesfera (CDC), em condições de hipoxia. Adaptado da referência ¹⁴⁵	34
Figura 11 – Representação esquemática do material gerador de oxigênio, fabricado a partir de PDMS-CaO ₂ . A difusão da água para o interior é evitada pela hidrofobicidade do PDMS,	

enquanto que o oxigénio, gerado via reação hidrolítica com o peróxido de cálcio, é rapidamente difundido para fora do PDMS. Adaptado da referência ¹⁴⁶	34
Figura 12 – Processo de produção das micropartículas do tipo <i>core/shell</i> por coservação e imobilização da catalase na superfície. Adaptado da referência ¹⁴⁸	35
Figura 13 – Representação esquemática de um <i>scaffold</i> gerador de oxigénio à base de queratina e fibroína de seda. Adaptado da referência ¹⁴⁹	36
Figura 14 - Representação esquemática das diferentes etapas do trabalho desenvolvido.	46
Figura 15 - Metodologia para obtenção das micro/nano cápsulas.	48
Figura 16 - Esquema da reação de reticulação por combinação de EDC e sulfo-NHS. Adaptado da referência ¹⁸⁹	51
Figura 17 - Esquematização do procedimento experimental para preparação das matrizes poliméricas de ácido hialurónico e colagénio.	52
Figura 18 - Micrografia celular das células Balb/3T3 para a) baixa densidade e b) elevada densidade ¹⁹⁷	57
Figura 19 - Esquematização do procedimento experimental generalizado para realização do ensaio WST-1.....	59
Figura 20 - Representação esquemática do sistema experimental para os ensaios de quantificação de sorção/libertação de oxigénio, e respetiva legenda.	62
Figura 21 – Representação genérica do cálculo da constante <i>KLa1</i> para o ensaio de a) consumo de O ₂ do meio e b) difusão de O ₂ para o meio.....	64
Figura 22 - Representação dos resultados da tensão superficial γ (mN/m) em função da concentração total de surfactantes para todos os sistemas estudados.	66
Figura 23 - Representação dos resultados da tensão superficial γ (mN/m) em função da concentração total de surfactantes para todos os sistemas excluindo o valor de tensão superficial da água (coluna esquerda) e incluindo o valor de tensão superficial da água no ajuste linear (coluna direita).....	68
Figura 24 - a) Cinética de formação para o sistema [P _{6,6,6,14}][NTf ₂]/[S1:S2:0]; b) Cinética de estabilidade para o sistema [P _{6,6,6,14}][NTf ₂]/[S1:S2:0]. (Legenda: ■ - 5 minutos; ■ - 10 minutos; ■ - 15 minutos; ■ - 20 minutos; ■ - 25 minutos; ■ - 30 minutos).	69
Figura 25 - Evolução dos valores de potencial zeta e pH da mistura reacional ao longo das sucessivas fases do processo de formação de nc/Si-LI. Para esta análise foram usadas amostras de nc/Si-LI das formulações A e B. (Legenda: ● - Potencial zeta para as nc/Si-LI formulação A; ▲ - Potencial zeta para as nc/Si-LI formulação B; ■ - pH). Nota: por motivos de propriedade industrial os valores de pH são omitidos.....	71

Figura 26 - Evolução do diâmetro hidrodinâmico das nc/Si-LI (nm) ao longo das sucessivas fases do processo sol-gel. Para esta análise foram usadas amostras de nc/Si-LI das formulações A e B. (Legenda: ● – Evolução do dh das nc/Si-LI da formulação A; ▲ - Evolução do dh das nc/Si-LI da formulação B).....	73
Figura 27 - Imagens obtidas através de lupa após liofilização: a) nc/Si-LI formulação A; b) nc/Si-LI formulação B.	74
Figura 28 - Microscopia de SEM para amostra de nc/Si-LI liofilizadas. Formulação A: a) escala de 10 µm e b) escala de 1 µm; Formulação B: c) escala de 10 µm e d) escala de 1 µm.	75
Figura 29 - Microscopia de SEM para amostra de nc/Si-LI não-liofilizadas. Formulação A: a) e c) escala de 100 nm; b) e d) escala de 200 nm. Formulação B: e) escala de 100 nm; f), g) e h) escala de 200 nm.	77
Figura 30 - Microscopia de STEM para amostra de nc/Si-LI não-liofilizadas. Formulação A: a) escala de 1 µm; b), c) e d) escala de 200 nm; Formulação B: e) e g) escala de 1 µm; f) e h) escala de 200 nm.	80
Figura 31 - Espectros obtidos através de FTIR do resíduo de sílica, do [P _{6,6,6,14}][NTf ₂], de amostra de cápsulas liofilizadas para as formulações A e B.	83
Figura 32 – Representação da percentagem de <i>swelling</i> ao longo do tempo para duas formulações de matrizes, sem e com incorporação de cápsulas (60% wt.). (Legenda: ● – 1A15: <i>scaffold</i> formulação 1A sujeito a reticulação durante 15 horas; ■ – 1B15: <i>scaffold</i> formulação 1B sujeito a reticulação durante 15 horas; ▲ – 1A15 + AC: <i>scaffold</i> formulação 1A sujeito a reticulação durante 15 horas com nc/Si-LI formulação A centrifugadas incorporadas; ▼ – 1B15 + AC: <i>scaffold</i> formulação 1B sujeito a reticulação durante 15 horas com nc/Si-LI formulação A centrifugadas incorporadas).	84
Figura 33 – Microscopia SEM para cortes longitudinais dos <i>scaffolds</i> . Sem nc/Si-LI incorporadas: a) e b) estrutura externa - escala de 100 µm; c) e d) estrutura interna - escala de 20 µm e de 10 µm. Com nc/Si-LI incorporadas: e) e f) estrutura externa - escala de 100 µm; h) e i) estrutura interna - escala de 20 µm.	87
Figura 34 – Ensaio preliminar para determinação do tempo de incubação e densidade celular ideais para realização do WST-1. (Legenda: ▲ – 5K células; ● – 10K células; ■ – 15K células).	88
Figura 35 – Viabilidade celular após 24 (primeira barra) e 48 horas (segunda barra) de incubação para 6 diferentes concentrações de nc/Si-LI das formulações A e B, que foram	

submetidas a três diferentes metodologias de processamento: centrifugação (C), liofilização (L) e em suspensão (S).....	89
Figura 36 – Viabilidade celular após 24 e 48 horas de incubação com o LI, para duas metodologias de adição de LI no meio de cultura: a) adição direta no poço (AD), concentrações de 1, 5 e 10% v/v; b) dissolução prévia em meio de cultura (AMC), concentrações de 0,01, 0,1 e 1% v/v.....	91
Figura 37 – Viabilidade celular pelo ensaio LDH para 4 horas de incubação com o LI em HBSS para as concentrações de 0,01, 0,1 e 1% v/v.....	93
Figura 38 – Viabilidade celular pelo ensaio LDH para 24 e 72 horas de incubação com o LI para as concentrações de 1 e 5% v/v. (Legenda: ■ – 24 horas; ■ – 48 horas).	94
Figura 39 – Evolução temporal da viabilidade celular para 24 horas de incubação com o LI para três tempos de dissolução em meio de cultura. (Legenda: -▲- 72 horas; ●●● - 96 horas; --■-- - 120 horas).	94
Figura 40 – Viabilidade celular para 24 e 48 horas de incubação para três formulações de <i>scaffolds</i> que diferem no grau de reticulação (A e B) e tempo de reticulação (15 e 72 horas). (Legenda: ■ – 24 horas; ■ – 48 horas). Nota: a concentração de reticulantes para a formulação 1A é inferior à da formulação 1B.	95
Figura 41 - Viabilidade celular para 24 e 48 horas de incubação para duas formulações de <i>scaffolds</i> que diferem no grau de reticulação. Neste ensaio procedeu-se à incorporação de três concentrações de nc/Si-LI da formulação A centrifugadas (AC) ou em suspensão (S) nos <i>scaffolds</i> : 0, 30 e 60% wt., por duas metodologias distintas: aquando da reticulação (R) e após liofilização (AP). (Legenda: ■ – 24 horas; ■ – 48 horas). Nota: a concentração de reticulantes para a formulação 1A é inferior à da formulação 1B.	96
Figura 42 - Viabilidade celular para 72 horas de incubação para cinco formulações de <i>scaffolds</i> 1B. Neste ensaio procedeu-se à incorporação de nc/Si-LI na concentração de 0 e 0,01% wt. para as formulações de nc/Si-LI (A e B) sujeitas a dois tipos de processamento: centrifugadas (C) e em suspensão (S). (Legenda: ■ – 24 horas; ■ – 48 horas).	97
Figura 43 - Imagens microscópicas dos <i>scaffolds</i> respeitantes aos resultados de viabilidade celular, apresentados na Figura 42, após realização do teste WST-1. a) e b) controlo: células; c) e d) controlo: <i>scaffold</i> 1B; e) e f) <i>scaffold</i> 1B_AC: com nc/Si-LI formulação A centrifugadas incorporadas; g) e h) <i>scaffold</i> 1B_BC: com nc/Si-LI formulação B centrifugadas incorporadas.	99
Figura 44 – Viabilidade celular após 24 horas de incubação: a) concentração de nc/Si-LI correspondente à quantidade de LI não-citotóxico para 72 horas de incubação, em que se	

procedeu à remoção do LI do seu interior; b) meio de cultura (AMC) que esteve previamente incubado com uma concentração de nc/Si-LI (60% wt. *scaffold*) correspondente a 0,95 e 1,44% v/v de LI para as formulações A e B, respetivamente, sendo que estas foram removidas posteriormente, por centrifugação. (Legenda: ■ – 24 horas; ■ – 48 horas)..... 100

Figura 45 – Ensaio de sorção de O₂ com saturação prévia da água e adição de 10 mL de amostra (1:4 v/v): a) perfis para a água, emulsão de LI e suspensão de nc/Si-LI; b) imagem ampliada da alínea a); c) perfis da água, *scaffolds* sem e com nc/Si-LI incorporadas; d) imagem ampliada da alínea c). (Legenda: ■ – Adição de água degaseificada; ● – Adição de emulsão de LI degaseificada; ▲ – Adição de suspensão de nc/Si-LI degaseificadas; Δ – Adição de *scaffolds* sem nc/Si-LI incorporadas degaseificados; ▲ – Adição de *scaffolds* com nc/Si-LI incorporadas degaseificados). 102

Figura 46 - Ensaio de libertação de O₂ com saturação prévia da água e adição de 10 mL de amostra: a) perfis da água, emulsão de LI e suspensão de nc/Si-LI; b) imagem ampliada da alínea a); c) perfis da água, *scaffolds* sem e com nc/Si-LI incorporadas; d) imagem ampliada da alínea c). (Legenda: ■ – Adição de água gaseificada; ● – Adição de emulsão de LI gaseificada (1:4 v/v); ▲ – Adição de suspensão de nc/Si-LI gaseificada (1:4 v/v); Δ – Adição de suspensão de nc/Si-LI gaseificada (1:2 v/v); ◇ – Adição de *scaffolds* sem nc/Si-LI incorporadas gaseificados (1:4 v/v); ◆ - Adição de *scaffolds* com nc/Si-LI incorporadas gaseificados (1:4 v/v))..... 103

Figura 47 – Representação comparativa dos valores de *KLa*₁ obtidos em função da concentração de LI. a) para a água, emulsão de LI e suspensão de nc/Si-LI; b) para os *scaffolds* sem e com nc/Si-LI incorporadas. (Legenda: ● – adição de água degaseificada; ■ – adição de emulsão de LI degaseificada; ▲ – adição de suspensão de nc/Si-LI degaseificada (1:4 v/v); ○ – adição água gaseificada; □ – adição de emulsão de LI gaseificada; Δ – adição de suspensão de nc/Si-LI gaseificada (1:4 v/v); ▽ - adição de suspensão de nc/Si-LI gaseificada (1:2 v/v); ◆ - adição de *scaffolds* sem nc/Si-LI incorporadas degaseificados; ▼ - adição de *scaffolds* com nc/Si-LI incorporadas degaseificados; ◇ - adição de *scaffolds* sem nc/Si-LI incorporadas gaseificados; ▽ - adição de *scaffolds* com nc/Si-LI incorporadas gaseificados)..... 105

Figura 48 – Esquematização do processo de reticulação do alginato de sódio com cloreto de cálcio, agente reticulante ²³³..... 136

Figura 49 – Viabilidade celular após 24 e 72 horas de contacto com as matrizes de alginato e gel plurónico F127.	138
---	-----

Índice de tabelas

Tabela 1 -Solubilidade do O ₂ em diferentes PFCs para a temperatura de 37 °C e a 1 atm. Adaptada da referência ⁶²	13
Tabela 2 – Valores de solubilidade de O ₂ , N ₂ e CO ₂ em diferentes LIs, e respectivas condições e método de determinação.	26
Tabela 3 – Resumo da informação recolhida relativa à toxicidade do LI, ou do catião ou do anião que constituem o LI utilizado neste trabalho.	31
Tabela 4 - Ensaio para avaliação da citotoxicidade, vantagens e desvantagens.	39
Tabela 5 - Reagentes utilizados para preparação das emulsões e das micro/nano cápsulas. Informações de interesse relativas aos mesmos.....	43
Tabela 6 - Reagentes utilizados para preparação de matrizes poliméricas de suporte ao crescimento celular. Informações de interesse relativas aos mesmos.....	44
Tabela 7 - Reagentes utilizados para realização dos ensaios de citotoxicidade e respetivo fornecedor.	44
Tabela 8 - Especificações do procedimento de emulsificação para o sistema estudado e para estudo das cinéticas de formação e degradação. (Nota: por motivos de propriedade industrial não são indicados os valores precisos estudados).....	47
Tabela 9 - Concentrações testadas de agentes reticulantes EDC e sulfo-NHS para duas formulações de matrizes poliméricas, com períodos de reticulação de 15 e 72 horas.....	51
Tabela 10 – Identificação das condições de síntese para cada um dos sistemas mencionados neste trabalho.	65
Tabela 11 – Dados obtidos através de TGA para as micro/nano cápsulas preparadas em 48 mL de suspensão.	82
Tabela 12 – Condições experimentais usadas para os ensaios de sorção/libertação de O ₂ para cada um dos sistemas estudados e valores de <i>KLa</i> ₁ determinados por duas metodologias distintas. O <i>KLa</i> ₁ corresponde à média dos <i>KLa</i> ₁ determinados para cada um dos perfis obtidos e o <i>KLa</i> ₁ médio corresponde ao <i>KLa</i> ₁ determinado para o perfil correspondente à média dos perfis obtidos separadamente.	104
Tabela 13 – Declive da reta de ajuste ao perfil obtido, número de pontos utilizados para realização do ajuste linear (n) e coeficiente de correlação (R ²) do ajuste respetivo. Os valores de <i>KLa</i> ₁ foram determinados por duas metodologias distintas. O <i>KLa</i> ₁ corresponde à média dos <i>KLa</i> ₁ determinados para cada um dos perfis obtidos e o <i>KLa</i> ₁ médio	

corresponde ao $KLa1$ determinado para o perfil correspondente à média dos perfis obtidos separadamente..... 148

Lista de abreviaturas

ATP – Adenosina trifosfato (do inglês: *Adenosine triphosphate*)

ATR – do inglês *Attenuated total reflection*

AVC – Acidente vascular cerebral

CMC – Concentração micelar crítica

dh – Diâmetro hidrodinâmico

DLS – Dispersão dinâmica de luz (do inglês: *Dynamic light scattering*)

DMEM – Meio de Eagle Modificado de Dulbecco (do inglês: *Dulbecco's Modified Eagle Medium*)

EDC – *N*-(3-dimetilaminopropil)-*N*'-etilcarbodiimida hidrocloreto

[emim]Cl – 1-Etil-3-metilimidazólio cloreto

[emim][OAc] – 1-Etil-3-metilimidazólio acetato

[emim][Me₂PO₄] – 1-Etil-3-metilimidazólio dimetilfosfato

ET – Engenharia de tecidos

FTIR – Espectroscopia de infravermelhos por transformada de Fourier (do inglês: *Fourier Transformed Infrared Spectroscopy*)

HA – Ácido hialurônico (do inglês: *Hyaluronic acid*)

HbOC – Transportadores de oxigênio artificiais à base de hemoglobina (do inglês: *Hemoglobin-based oxygen carriers*)

HEPES – Ácido hidroxietil piperazinoetanosulfônico

HULK – Hiperóxido sob presença da luz (do alemão: *Hyperoxide Unter Licht Konditionierung*)

LDH – Lactato desidrogenase

LI – Líquido iônico

MO – Microscopia ótica

PBS – Tampão fosfato salino (do inglês: *Phosphate buffer saline*)

PCL – Poli(caprolactona)

PFC – Perfluorocarbonetos

PLGA – Poli(ácido glicólico-co-ácido láctico) (do inglês: *Poly(lactide-co-glycolide)*)

[P_{4,4,4,4}]Cl – Tetrabutílfosfônio cloreto

[P_{4,4,4,4}][OAc] – Tetrabutílfosfônio acetato

[P_{8,4,4,4}]Cl – Octiltributílfosfônio acetato

ROS – espécies reativas de oxigênio (do inglês: *Reactive oxygen species*)

SEM – Microscopia eletrônica de varrimento (do inglês: *Scanning electron microscopy*)

STEM – Microscopia eletrônica de varrimento por transmissão (do inglês: *Scanning transmission electron microscopy*)

Sulfo-NHS – Sal de sódio N-hidroxisulfosuccinamida

TEOS – Tetraetilortossilicato

TGA – Análise termogravimétrica (do inglês: *Thermogravimetric analysis*)

TMOS – Tetrametoxisilano

VEGF – Fator de crescimento vascular endotelial (do inglês: *Vascular endothelial growth factor*)

Motivações e objetivos

O oxigénio molecular, O₂, é uma molécula essencial à vida de todos os organismos aeróbios, em sistemas biológicos, nomeadamente de aceitador final de eletrões para produção de ATP, no processo conhecido por fosforilação oxidativa e molécula sinalizadora de diferentes vias metabólicas. Em condições de hipoxia, baixas concentrações de O₂ em meio fisiológico ou *in vitro*, as células entram em *stress* oxidativo, o metabolismo anaeróbico tem como produto ácido láctico que, quando acumulado nos tecidos, apresenta efeito tóxico, ocorrendo morte celular, e estimulando a expressão de determinadas proteínas presentes em quadros patológicos, por exemplo, do fator de crescimento do endotélio vascular (VEGF) e do fator indutor de hipoxia 1 α (HIF-1 α), característicos da doença cancro.

Nas culturas celulares *in vitro* e em estruturas de suporte para aplicações de Engenharia de Tecidos, o acesso ao O₂ é limitado e demorado, devido ao processo de difusão inerente, comprometendo a viabilidade celular. Ao longo dos anos, várias estratégias têm sido propostas para facilitar o transporte de oxigénio e aumentar a taxa de sobrevivência das células, nomeadamente através do uso de transportadores artificiais de O₂ e aplicação *in vivo/in situ* de biomateriais geradores de oxigénio. São exemplos destes: a hemoglobina livre, que atua como a hemoglobina presentes nas hemácias; os perfluorocarbonetos (PFCs), que são líquidos com elevada capacidade para absorver, reter e libertar gases, e os peróxidos que são compostos capazes de produzir oxigénio *in situ* por reação com a água. No entanto, apesar das potencialidades já identificadas para estes sistemas, há ainda aspetos que carecem de otimização, por forma a viabilizar a sua comercialização e utilização em sistemas biológicos. Estas alternativas têm como principais desvantagens a sua baixa estabilidade ao longo do tempo, potencial citotóxico (quer pelo produto em si, quer pelos produtos da sua degradação), o facto de serem facilmente eliminados pelo organismo e não permitirem uma libertação controlada de O₂ num determinado período de tempo, comprometendo a viabilidade celular.

Nesta dissertação é apresentada uma nova abordagem que consiste no desenvolvimento de uma formulação de nanocápsulas de sílica do tipo *core/shell* à base de sílica (*shell*) e líquido iónico (LI) (*core*), mais estável, biocompatível e não tóxica, incorporada numa matriz polimérica biocompatível para aplicações em meio de cultura de células *in vitro* e em Engenharia de Tecidos. O LI usado neste trabalho, o [P_{6,6,6,14}][NTf₂],

foi escolhido pela elevada capacidade de absorção, retenção e libertação de gases, nomeadamente de O₂ e CO₂, do meio circundante, estimulando conseqüentemente o crescimento, proliferação e diferenciação celular. Para produção das nanocápsulas foi criada uma microemulsão estabilizada por um sistema de surfactantes inovador, seguida de método sol-gel. As matrizes poliméricas conjugam dois polímeros naturais, ácido hialurónico e colagénio, sendo estes biocompatíveis e biodegradáveis que atuam como agentes estimuladores da adesão e proliferação celular.

Adicionalmente, pretende-se caracterizar química, física e morfológicamente os materiais obtidos e, numa fase posterior, realizar ensaios de citotoxicidade e de quantificação da absorção/libertação de O₂ pelos mesmos. Estes têm por objetivo determinar se o sistema proposto neste trabalho, para oxigenação de culturas de células *in vitro* e para aplicações em Engenharia de Tecidos, reúne as propriedades e, conseqüentemente, se apresenta potencial para, no futuro, ser considerado como alternativa viável para substituição dos atuais materiais utilizados como transportadores e/ou geradores artificiais de oxigénio *in vitro* e *in vivo*.

1. Papel da oxigenação em sistemas biológicos e em aplicações farmacêuticas e biomédicas

O oxigénio molecular, O₂, é uma molécula essencial a todos os organismos vivos aeróbios e um elemento importante no microambiente celular *in vivo* e em sistemas de culturas celulares *in vitro* e *ex vivo*. O oxigénio molecular é o aceitador final de eletrões no processo de fosforilação oxidativa, que resulta na produção de ATP nas mitocôndrias, num processo conhecido por respiração aeróbia. Além disso, atua também como molécula sinalizadora e reguladora do processo de diferenciação celular, nomeadamente de células estaminais cardíacas, musculares e embrionárias, devido aos gradientes de concentração gerados por esta molécula ¹.

Desta forma, é clara a importância e relevância do desenvolvimento de novos materiais e sistemas que permitam uma oxigenação melhorada das culturas celulares para vários fins (p.e., biorreactores para síntese de fármacos, biorreactores para regeneração de tecidos, estudos de patologias e modelos de doenças) e dos *scaffolds* utilizados para aplicações em Engenharia de Tecidos (ET). Idealmente, quando se cultivam células em ambiente laboratorial e em biorreactores, as condições devem mimetizar o mais possível as condições *in vivo*, por forma a que os resultados obtidos *in vitro* possam ser preditivos daqueles obtidos em contexto fisiológico. Para tal, podem ser monitorizados e manipulados uma variedade de parâmetros (p.e., concentração de O₂, temperatura, pH, força iónica, tipo e concentração de outras moléculas existentes em contexto fisiológico), uma vez que a manutenção da viabilidade, diferenciação e função celular requerem que estas condições químicas e físicas do meio sejam rigorosamente controladas, podendo estas variar consideravelmente com o tipo celular ou tecido ¹. Do mesmo modo, os *scaffolds* para ET devem também mimetizar os microambientes presentes *in vivo* e as respetivas matrizes extracelulares. Nestes, e devido à natureza tridimensional dos tecidos que se pretendem substituir, o oxigénio tem de se difundir através de múltiplas camadas de células e do material constituinte do *scaffold* para que alcance as regiões mais internas da matriz polimérica. Este facto, quando combinado com as elevadas taxas de consumo de oxigénio que são inerentes a certos tecidos (p.e., tecido hepático), torna claro que a difusão do oxigénio através de meios biológicos pode ser insuficiente sem o uso de sistemas/materiais que transportem ou gerem oxigénio ².

1.1 Culturas celulares *in vitro* e Engenharia de Tecidos

As condições padrão normalmente usadas para cultura de células *in vitro* foram desenvolvidas essencialmente para tipos celulares que são de rápido e fácil crescimento, como, por exemplo, os fibroblastos, linhas de células cancerígenas e bactérias. Nestas condições de cultura convencionais, as células são normalmente cultivadas a 37 °C, e em atmosferas com aproximadamente 5% v/v de CO₂, 21% v/v de oxigénio atmosférico e entre 95-98% de humidade relativa. Porém, a concentração de oxigénio *in vitro* deveria ser idêntica à atmosférica apenas para certas linhas celulares, como, por exemplo, os fibroblastos e linhas cancerígenas; outros tipos celulares, como por exemplo das células estaminais, requerem um microambiente mais direcionado e específico para as suas necessidades, nomeadamente atmosfera com concentrações de oxigénio compreendidas entre 1-8% v/v. Logo, as concentrações de oxigénio usualmente presentes nas culturas de células não são representativas das concentrações de oxigénio que estão presentes na maioria dos tecidos. Desde 2015, foram desenvolvidos vários estudos que pretendem aferir quais os efeitos da concentração de oxigénio presente em meios de cultura no crescimento, proliferação e diferenciação de diferentes tipos celulares, tanto para sistemas *in vitro* como para sistemas *ex vivo* ³⁻⁷. A informação resultante destes estudos permitirá no futuro, por exemplo, aplicar níveis de oxigénio dinâmicos, de forma a estimular a proliferação de células estaminais adultas, bem como permitir o controlo *in vitro* dos tipos celulares produzidos e dos processos para regeneração de tecidos ⁸.

Por sua vez, um dos principais desafios na fabricação de *scaffolds* para ET reside no insuficiente fornecimento de oxigénio a todo o microambiente (biomaterial e tecidos circundantes). Sem que haja um sistema eficaz de distribuição de oxigénio, como, por exemplo vasos sanguíneos no interior do *scaffold* ou uma rede de canais artificiais para perfusão, a hipoxia no interior destes dispositivos, pode limitar a sua eficácia para aplicações como implantes de suporte à regeneração de tecidos ⁹.

Os biomateriais utilizados para o tipo de aplicações mencionado anteriormente podem ser de diferentes tipos, nomeadamente do tipo polimérico, inorgânico ou compósito. A maioria dos suportes baseados em polímeros naturais ou artificiais, como, por exemplo, à base de quitosano, gelatina, alginato, colagénio tipo I e ácido hialurónico, têm como principal vantagem a biocompatibilidade e biodegradabilidade e, além disso, podem também estimular a adesão, migração, divisão e diferenciação celular essenciais à regeneração de tecidos ¹⁰⁻¹³. Porém, e além da sua heterogeneidade, as suas propriedades

mecânicas podem não ser as mais adequadas ao ambiente de forças mecânicas característico dos sistemas fisiológicos (p.e., forças de stress e tensão) ¹⁴. Por outro lado, *scaffolds* biodegradáveis à base de polímeros sintéticos, que apresentam propriedades mais controláveis e homogêneas, têm também sido alvo de intensa investigação para este tipo de aplicações, é o caso do poli(ácido glicólico-co-ácido láctico) (PLGA), a poli(caprolactona) (PCL) e os poli(uretanos) (PUR) ¹⁵. Estes materiais podem ser utilizados para diferentes tipos de aplicações para estimulação da regeneração celular, uma vez que as suas propriedades podem ser facilmente modificadas, controladas e, normalmente, geram uma resposta inflamatória mínima no hospedeiro e os seus produtos da degradação não são citotóxicos e são reabsorvidos ou eliminados pelo organismo ¹⁶. Recentemente, *scaffolds* à base de poli(éster uretanos) (PEUR) têm sido também estudados, tendo sido demonstrado que estes promovem a infiltração celular e que se degradam em produtos não-citotóxicos, representando assim uma classe de biomateriais bastante promissora para várias aplicações nas áreas de medicina regenerativa, nomeadamente de tecido cardíaco nervoso e de músculo esquelético ¹⁷.

Por fim, os biomateriais compósitos, que podem conjugar as propriedades dos diferentes biomateriais que os constituem (p.e., biomateriais poliméricos e inorgânicos), podem permitir a obtenção de produtos finais com características intermédias e aos que lhes deram origem e conferir propriedades mais ajustadas à aplicação pretendida, como, por exemplo, o aumento da estabilidade mecânica, a melhoria da capacidade interação do *scaffold* com os tecidos e o controlo da libertação de substâncias bioativas/sinalizadores (p.e. fatores de crescimento e antibióticos) ¹⁸⁻²¹. São exemplos destes biomateriais aqueles que resultam da conjugação de quitosano, alginato e hidroxiapatite de cálcio, de colagénio, gelatina e hidroxiapatite de cálcio ou ainda de fosfato de cálcio combinado com outros biopolímeros, e que podem ser usados como suporte à regeneração óssea por estimulação da diferenciação dos osteoblastos e proliferação dos osteoclastos ^{22,23}.

1.2 Outras aplicações farmacêuticas e biomédicas para terapêutica e diagnóstico

Para além do papel que desempenha em tecidos/células *in vivo* e *in vitro*, e em *scaffolds* para aplicação em Engenharia de Tecidos, o O₂ pode desempenhar papéis relevantes em muitas outras aplicações farmacêuticas e biomédicas. Por exemplo, o O₂

pode também ser usado como molécula sinalizadora em biossensores, sendo que o seu consumo pode, por exemplo, fornecer informação acerca da concentração de glucose no sangue no diagnóstico e/ou monitorização de doentes com diabetes ²⁴. Outras aplicações deste tipo são, por exemplo, aquelas para diagnóstico de doenças relacionadas com o *stress* oxidativo (p.e., cancro, diabetes, doenças neurodegenerativas, doenças cardiovasculares) ^{25,26}. Também pode ser utilizado para a determinação do colesterol, o qual é uma substância associada ao diagnóstico de doenças como arteriosclerose, diabetes, doença cardíaca coronária e icterícia obstrutiva ²⁷.

O O₂ pode também ser usado para outras aplicações terapêuticas e biomédicas, como, por exemplo:

- a) Terapia fotodinâmica (PDT);
- b) Terapia de oxigénio hiperbárico;
- c) Ventilação Mecânica;
- d) Oxigenação membranar extracorporeal (ECMO);
- e) ¹⁷O – Ressonância Magnética Nuclear (NMR);
- f) Agente de contraste para Ressonância Magnética;
- g) Imagiologia do fluxo sanguíneo cerebral por Tomografia por Emissão de Positrões (PET) e Tomografia por Emissão de Positrões/Tomografia Computorizada (PET/CT);

Aplicações Terapêuticas

A terapia fotodinâmica (PDT) tem sido estudada e aplicada nos últimos anos como uma modalidade terapêutica usada para o tratamento de alguns tipos de tumores malignos, nomeadamente cancro da pele, do esófago e dos pulmões ²⁸. A PDT é um tratamento quimioterapêutico que envolve: 1) administração e acumulação seletiva de um agente fotossensível; 2) uma área alvo onde existe uma boa perfusão de O₂; e 3) irradiação posterior com luz de um determinado comprimento de onda adequado para a ativação do agente fotossensível pré-administrado, o qual inicia uma cadeia de reações fotoquímicas que resultam na produção de ROS, tais como o singlete de O₂ e outros radicais livres altamente citotóxicos e capazes de induzir a morte celular. Esta terapia permite assim controlar tumores localizados através da sua necrose, por apoptose ou autofagia ²⁹⁻³¹. A disponibilidade de O₂ no local é essencial para o sucesso desta terapêutica, uma vez que, caso este não esteja presente, não se verifica a produção de ROS e a consequente regressão

tumoral. Apenas células expostas a estas três etapas sequenciais podem ser destruídas, pelo que esta terapia apresenta elevada seletividade para certos tipos celulares, quer por acumulação preferencial do agente fotossensível nestas, quer por ativação precisa do mesmo pela luz ^{32,33}.

A terapia de oxigénio hiperbárico implica o uso de pressurização por forma a aumentar as concentrações de oxigénio fornecido ao organismo e a tumores ³⁴. Esta técnica começou a ser utilizada nos anos 70 em ensaios clínicos, nos quais doentes eram submetidos a radioterapia dentro destas câmaras, numa tentativa de forçar mais O₂ no sangue e tumores. Estudos demonstraram que respirar nesta câmara aumentava os níveis de ROS (produzidos aquando da radioterapia) nestes doentes, o que demonstra o papel crítico que o O₂ desempenha no tratamento de várias doenças ³⁵.

Sendo o O₂ é uma molécula essencial para a vida, ele é ainda administrado a doentes em hospitais e unidades de cuidados intensivos para outros fins. Por exemplo, a ventilação mecânica (MV), que garante uma troca de gases adequada por inspiração de uma determinada concentração de oxigénio (FiO₂), é aplicada para que se alcance uma saturação arterial de oxigénio (SpO₂) \geq 90%. Por vezes, para determinados tratamentos, são necessárias condições de hiperoxia, ou seja, elevadas concentrações de O₂ e de SpO₂, conseqüentemente ^{36,37}. Estas práticas clínicas não têm por objetivo a cura de determinada doença, mas sim assegurar que o doente ganha tempo para que o seu organismo recupere, tornando assim possível a aplicação de outras terapias específicas. De referir ainda que, quando os doentes são sujeitos a procedimento cirúrgicos, estes podem ter de ser submetidos a ventilação mecânica, uma vez que os processos anestésicos usados podem afetar a função respiratória ³⁸.

Outro caso onde o O₂ desempenha um papel fundamental é na oxigenação membranar extracorporeal (ECMO), a qual é um tipo de suporte de vida extracorporeal (ECLS) que fornece apoio completo ou parcial ao coração e pulmões, no caso de insuficiência cardiopulmonar ou de insuficiência pulmonar ³⁹. A ECMO é semelhante aos procedimentos extracorporais de diálise e plasmaferese, uma vez que o sangue é desviado para fora do corpo e é oxigenado, enquanto o CO₂ é removido, antes de voltar ao corpo. Nestes dispositivos, as trocas gasosas ocorrem num dispositivo designado por pulmão membranoso ou oxigenador ^{40,41}. Existem três diferentes tipos de ECMO: Venovenoso (VV) fornece apenas suporte respiratório, Venoarterial (VA), que fornece suporte cardíaco e respiratório, e remoção extracorporeal do dióxido de carbono ⁴².

Aplicações de Diagnóstico

O consumo de glucose e oxigénio e a produção de ATP no cérebro são processos que estão interligados. O isótopo de O₂, oxigénio-17 (¹⁷O), pode ser monitorizado por ressonância magnética nuclear (NMR) para avaliação de *uptake* e *washout* de agentes exógenos marcados com ¹⁷O em estudos da perfusão de tecidos ou para deteção de metabolitos que contenham O₂ ⁴³⁻⁴⁶. No entanto, a maior vantagem da realização de ¹⁷O NMR *in vivo* consiste na determinação da taxa metabólica de consumo do oxigénio em humanos e em outros seres vivos ⁴⁷. Os valores obtidos poderão fornecer informação acerca do normal ou anormal funcionamento do cérebro, relacionadas com uma variedade de doenças cerebrais. Esta metodologia está a ser otimizada para que no futuro se possa proceder à imagiologia da taxa metabólica de oxigénio cerebral, o que poderá ter um impacto significativo no estudo do metabolismo oxidativo cerebral e também noutros órgãos, como o coração ⁴³.

O O₂ desempenha também um papel crítico na fisiologia e patofisiologia do pulmão. A capacidade de deteção e caracterização do *uptake* de oxigénio por parte do pulmão tem um elevado potencial de diagnóstico de doenças pulmonares, como por exemplo a fibrose cística, bronquite crónica e doença pulmonar obstrutiva crónica. De forma geral, estudos funcionais do pulmão focam-se na ventilação e nos processos de troca de gases, nomeadamente os que envolvem oxigénio. O uso direto do oxigénio como agente de contraste (CA) em Ressonância Magnética é bastante útil para avaliação da função pulmonar ⁴⁸. Tal é possível uma vez que se verificam diferenças nas imagens obtidas, quando os sujeitos respiram oxigénio puro ou ar ambiente ^{49,50}. O sinal é modificado devido aos processos envolvidos na transferência de oxigénio – ventilação, difusão e perfusão ⁵¹.

Outro exemplo é a imagiologia não-invasiva do fluxo sanguíneo cerebral (CBF), a qual permite a deteção e acompanhamento dos doentes com desordens neurológicas, incluindo doenças cerebrovasculares e neurodegenerativas. Atualmente, a Tomografia por emissão de positrões (PET) com [¹⁵O]H₂O é considerada a metodologia de referência para medições do CBF, bem como do metabolismo cerebral ⁵²⁻⁵⁴. Outra possível aplicabilidade do agente de contraste [¹⁵O]H₂O (água marcada isotopicamente por ¹⁵O) é na identificação e caracterização de distúrbios da perfusão cardíaca após radioterapia aplicada para tratamento do cancro da mama, através da realização de PET/CT. Nestes casos, o objetivo é encontrar uma correlação entre a localização das alterações e a distribuição espacial da dose administrada ⁵⁵.

1.3 Tecnologias de oxigenação para culturas de células *in vitro* e Engenharia de Tecidos: vantagens e limitações

Nos últimos anos, têm-se estudado algumas moléculas transportadoras de O₂ no sangue, como, por exemplo, para tornar mais eficiente o transporte de O₂ dos pulmões para outros órgãos ou de tecidos circundantes para o interior de *scaffolds*. Estas moléculas foram estudadas tanto para aplicações *in vitro* como para aplicações *in vivo*, como materiais transportadores ou geradores de O₂ *in situ*.

Nos seres humanos, a função de transportador de O₂ é desempenhada pela hemoglobina (uma metaloproteína), a qual liga o O₂ a um dos seus quatro grupos heme, (que é um anel de porfirina com um átomo de ferro no centro). Mais de 98% do oxigénio do sangue é transportado pelas hemácias, os veículos de transporte da hemoglobina. Como estes transportadores de O₂ estão normalmente ausentes nos meios de cultura utilizados em laboratório, o fornecimento de oxigénio às células e tecidos nestas condições está assim dependente essencialmente da difusão, a qual é normalmente um processo menos eficiente e demorado, uma vez que a velocidade de difusão está dependente do gradiente de concentrações de O₂ presente nos locais de interesse. Por essa mesma razão, o uso de transportadores de oxigénio artificiais têm sido alvo de intensa investigação nos últimos anos. Os transportadores de oxigénio artificiais não têm obrigatoriamente de estabelecer uma ligação química com o O₂, como no caso da hemoglobina. Assim, existem transportadores sintéticos em que o O₂ se difunde no interior do mesmo por gradiente de concentração e até outros onde o O₂ também pode ser produzido por reação química *in situ*. Um destes transportadores sintéticos de O₂ são os perfluorocarbonetos, os quais possuem a capacidade de dissolver elevadas quantidades de oxigénio (cerca de 10-20 vezes superior à da água pura). Outros exemplos de transportadores sintéticos são a hemoglobina livre (não transportada por hemácias), ou outros derivados sintéticos da hemoglobina.

Os perfluorocarbonetos (PFCs) líquidos são hidrocarbonetos em que todos os átomos de hidrogénio foram substituídos por átomos de flúor. Estes compostos são geralmente quimicamente inertes, sendo por isso biocompatíveis em certas concentrações em meio fisiológico, e muito insolúveis em água ou alguns lípidos. Estes compostos normalmente apresentam ainda uma baixa polaridade sendo miscíveis com gases não-polares numa gama de composições apreciável. Exemplos destes gases são O₂, dióxido de carbono (CO₂), monóxido de carbono (CO) e óxido nítrico (NO), os quais se conseguem

dissolver em PFCs em quantidades elevadas, devido a interações de van der Waals favoráveis que são estabelecidas entre os gases e PFCs ⁵⁶.

Os PFCs líquidos podem ser utilizados diretamente como transportadores de oxigénio injetáveis (p.e., para tratamento de anemias) ou como agentes de contraste injetáveis para imagiologia por ultrassons. Em alternativa, podem ser emulsificados em solução aquosa para o mesmo tipo de administrações ^{57,58}. Como se pretende que estas emulsões sejam aplicadas em sistemas *in vivo*, tecidos ou cultura células, deve-se garantir que possuem valores de pH e de pressão osmótica adequados, sendo que, idealmente para sistema injetáveis na corrente sanguínea, a emulsão final deverá possuir um pH e uma osmolaridade idênticos aos do sangue (pH=7,4 e 200 mOsm.dm⁻³). Os desafios principais na utilização de emulsões aquosas de PFCs estão relacionadas com o facto de estas apresentarem uma elevada volatilidade, serem rapidamente eliminadas da circulação sanguínea e serem muito instáveis. Existem três mecanismos principais que podem contribuir para a instabilidade destas emulsões: coagulação, coalescência e o fenómeno *Ostwald ripening*. Os dois últimos têm como efeito um aumento do tamanho das gotículas formadas por fusão de gotículas de menores dimensões e por difusão entre gotículas da fase contínua, respetivamente, enquanto que a coagulação consiste na formação de agregados de partículas ^{1,59,60}. Esta alteração do tamanho das gotículas influencia diretamente a superfície através da qual ocorre o transporte de oxigénio entre as fases aquosa e PFC. Geralmente, o tamanho destas gotículas é da ordem das dezenas ou das centenas de nanómetros, por oposição às hemácias, as quais possuem um diâmetro de cerca de 7 µm. Apesar das emulsões de PFCs apresentarem menor solubilidade para o oxigénio em relação aos transportadores de oxigénio à base de hemoglobina (Figura 1), estas possuem uma velocidade de libertação de oxigénio para os tecidos superiores, quando comparada com a das hemácias ⁶¹. Isto deve-se ao facto dos PFCs apresentarem maior área de superfície de trocas e também ao tipo de interações estabelecidos com a molécula de oxigénio: a solubilidade do O₂ nos PFCs é um fenómeno essencialmente baseado na Lei de Henry, enquanto que a ligação do oxigénio à hemoglobina baseia-se num fenómeno ligando-aceitador, que é descrito pela equação de Hill (Figura 2). Consequentemente, a quantidade de oxigénio dissolvida nos PFCs aumenta de forma linear com a pressão parcial de O₂ e é inversamente proporcional à temperatura ⁶².

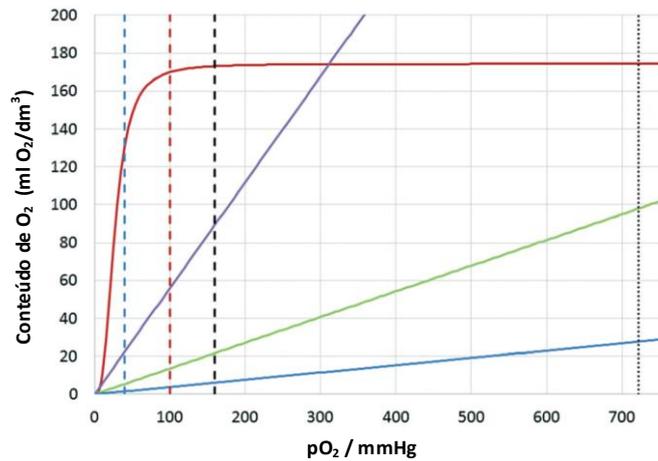


Figura 1 – Curvas de saturação do O₂ à temperatura de 37 °C para a hemoglobina, diferentes PFCs e água pura. (Legenda: — hemoglobina 130 mg/mL; — 20% de Fluosol (nome comercial); — 100% de brometo de perfluorooctil (PFOB); — água; - - pO₂ no sangue venoso; - - pO₂ no sangue arterial; - - pO₂ no ar atmosférico; 95% oxigênio). Adaptado da referência ¹.

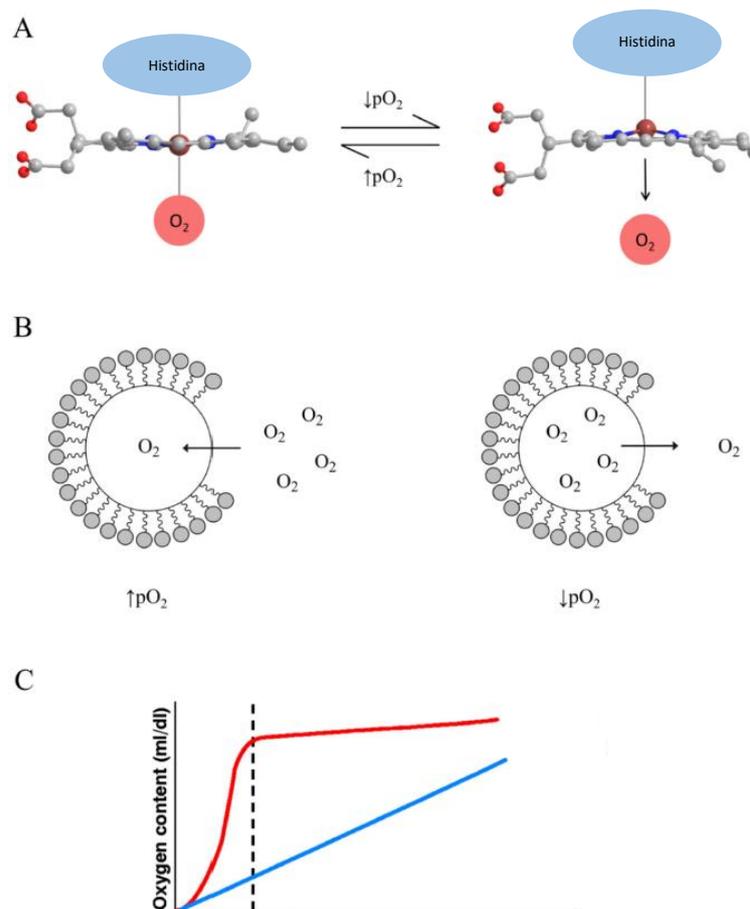


Figura 2 - Mecanismo de captura e liberação do O₂: (A) HbOCs e (B) transportadores de O₂ à base de PFCs. (C) Relação entre o conteúdo em O₂ e a pO₂ em para: — HbOCs e — transportadores de oxigênio à base de PFCs. Adaptado da referência ⁵⁶.

Várias formulações de PFCs foram já testadas em testes clínicos, entre os anos 70 e 90. De entre estas, a emulsão conhecida pelo nome comercial de *Oxygent*, composto por

58% m/v de brometo de perfluorooctil e 2% m/v de brometo de perfluorodecil, foi a que apresentou os resultados mais promissores em termos de biocompatibilidade, capacidade de transporte de oxigénio e estabilidade de emulsão nas fases I e II desses testes clínicos. No entanto, na fase III destes testes, verificou-se um aumento do risco de ataque cardíaco, bem como o aparecimento de efeitos secundários neurológicos adversos ^{63,64}.

Estes e outros problemas foram igualmente identificados em testes clínicos e não-clínicos para formulações à base de PFCs pelo que, atualmente, não há qualquer produto no mercado para uso médico à base de PFCs como agentes artificiais de transporte de oxigénio ¹. A exposição prolongada a certos PFCs, como por exemplo as emulsões de nome comercial Fluosol[®], Perftoran[®] e Oxypherol[®], pode causar efeitos secundários imediatos ou posteriores em alguns indivíduos, tais como hipotensão, rubor cutâneo, febre, hipertensão pulmonar, pressão torácica e pressão venosa central elevada ^{65,66}. Assim, concluiu-se que a utilização de PFCs em humanos tem de ser ainda estudada e testada cuidadosamente ⁶⁷. Não obstante, apesar destes resultados adversos para usos em humanos, outros estudos mostraram alguns efeitos positivos quando a perfluorodecalina foi incorporado em meios de cultura, nomeadamente para produção de músculo cardíaco. Para este caso, observou-se um aumento da atividade contráctil, da viabilidade celular e da expressão de genes associados ao desenvolvimento de músculo cardíaco funcional. Para tecidos da traqueia e rim, esta formulação aumentou ainda a viabilidade, diferenciação e função celular ⁶⁸. Outros estudos demonstraram também que, quando se adicionam PFCs, como por exemplo o oxadiazola fluorada, em ambientes hipóxicos, ocorre um aumento da taxa de sobrevivência celular, por libertação controlada de oxigénio, sendo, portanto, potenciais modulares das concentrações de oxigénio *in vivo* ⁶⁹.

Outra metodologia para utilização de PFCs, neste caso concreto de perfluorodecalina, foi sugerida por Pilarek et al. (2014), onde este é incorporado num sistema de cultura 3D do tipo líquido/líquido organizado em camadas. Nesta arquitetura de sistema, o *scaffold* é colocado na interface de contacto entre os líquidos. O meio de cultura que está em contacto com a parte superior do *scaffold* assegura o transporte dos nutrientes para as células e a parte inferior que está em contacto com os PFCs (devido à sua elevada densidade) garante a oxigenação eficiente das células que se encontram imobilizadas na camada intermédia, isto é, no *scaffold* como representado na Figura 3. A perfluorodecalina é previamente saturada com ar atmosférico comprimido, que assegura a transferência de massa de gases, nomeadamente O₂ e CO₂. No entanto, este sistema apresentou libertação de O₂ mais significativa apenas durante 24 horas após implantação ⁷⁰.

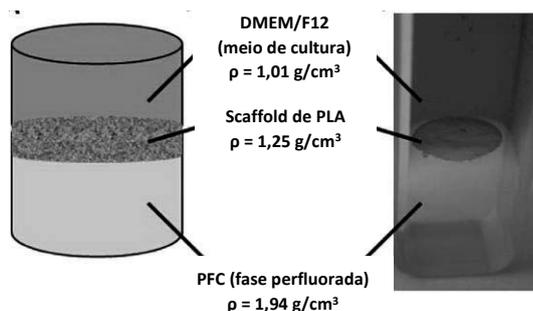


Figura 3 – Sistema híbrido líquido-sólido-líquido para cultura de células que consiste numa fase líquida de PFC saturado de O₂, uma fase sólida que corresponde ao *scaffold* de PLA fibroso e uma outra fase líquida de meio de cultura para células (DMEM). Adaptado da referência ⁷⁰.

Os PFCs mais utilizados em sistemas biológicos para otimização da libertação de O₂ em situações de hipoxia, os seus nomes e solubilidade do O₂ nos mesmos encontram-se apresentados na Tabela 1.

Tabela 1 -Solubilidade do O₂ em diferentes PFCs para a temperatura de 37 °C e a 1 atm. Adaptada da referência ⁶².

Composto	Solubilidade O ₂ (mM)
Éter perfluorodi-hexílico	21,78
Tetrafluoreto de enxofre perfluorodibutílico	18,87
Perfluorotriisobutilamina	17,43
Perfluoro-(<i>N</i> -etilmorfolina)	19,69
Perfluoro- <i>N,N</i> -dipropilmetilamina	20,67
Perfluorotrietilamina	21,16
Perfluoro- <i>N</i> -metilpiperidina	16,24
Perfluoro- <i>N</i> -metilmorfolina	14,76
Perfluoro- <i>N,N</i> -dimetil- <i>N</i> -hexilamina	20,24
Perfluoro- <i>N</i> -butilmorfolina	19,88
Perfluoro-4-(<i>N,N</i> -dimetil-2-aminoetil)- morfolina	17,71
F-Tetrabutilperfluorociclohexano	16,90
Perfluorodecalina	15,72*

* valor determinado para a temperatura de 25 °C.

Os transportadores de oxigénio artificiais à base de hemoglobina (HbOCs) surgem como alternativa aos PFCs. Atualmente, encontram-se a ser desenvolvidas novas metodologias que permitirão no futuro a utilização de hemoglobina isolada do sangue de outras espécies como transportadora de oxigénio artificial em seres humanos, como, por

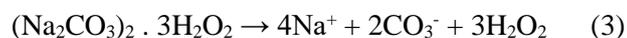
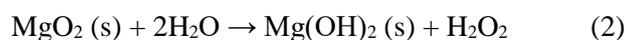
exemplo, a hemoglobina bovina, suína e equina, uma vez que são produtos da indústria alimentar e, como tal, apresentam um custo reduzido e vasta disponibilidade ⁷¹.

Vários têm sido os autores a reportar o sucesso da aplicabilidade deste conceito. A título de exemplo, Chen and Palmer (2010) suplementaram o meio de um reator, que pretendia mimetizar a função/atividade do fígado, com hemoglobina bovina purificada e verificaram que a taxa de respiração aeróbia celular aumentou, juntamente com o metabolismo de fármacos. Porém, verificou-se também o aumento da expressão dos genes associados ao metabolismo das ROS, ou seja, a oxidação da hemoglobina estava a afetar o metabolismo celular ⁷¹. Por forma a prevenir o *stress* oxidativo celular, Centis et al. (2011) propuseram o encapsulamento das células em géis de fibrina, evitando-se desta forma interações diretas entre a hemoglobina e as células minimizando, conseqüentemente, o *stress* oxidativo celular. De referir que também foi verificada uma redução da expressão do gene associado à resposta das células quando em condições de hipoxia ⁷².

No entanto, a hemoglobina apresenta como desvantagem a sua baixa estabilidade, uma vez que é gradualmente oxidada na forma de metemoglobina, a qual não consegue estabelecer ligação com o O₂. Conseqüentemente, os HbOCs têm de ser armazenados em condições *oxygen-free* (livre de oxigénio) e usados imediatamente após exposição ao oxigénio. Outra das desvantagens associadas ao uso da hemoglobina, deve-se ao facto de a hemoglobina quando livre no sangue estimular processos que apresentam um efeito tóxico para o organismo, sendo que o mais importante é a captura do NO que tem um efeito vasoconstritor agudo. Por forma a ultrapassar as desvantagens associadas à utilização da hemoglobina como transportador artificial de O₂ no sangue, têm sido estudadas diferentes técnicas para incorporação e polimerização deste tipo transportadores artificiais de O₂. É possível afirmar que, apesar das suas vantagens, estes sistemas necessitam de mais estudos relativos à sua aplicabilidade na área de ET ⁵⁶.

Outra das possíveis alternativas seria a utilização de peróxidos para fornecimento de oxigénio. Esta ideia é promissora uma vez que estes materiais geram O₂ em vez de simplesmente o distribuírem. O O₂ é gerado por decomposição do peróxido de hidrogénio (H₂O₂) em O₂ de forma direta ou por dissolução de peróxidos sólidos, como, por exemplo, percarbonato de sódio e peróxido de cálcio ou magnésio. Porém, é necessário garantir que a libertação de O₂ ocorre durante um período de tempo adequado à aplicação pretendida. Como descrito nas equações que se apresentam de seguida, a formação de H₂O₂ ocorre numa primeira fase por exposição de peróxidos sólidos inorgânicos à água (equações de

(1) a (3)). Posteriormente, ocorre decomposição deste último em O₂, na segunda etapa da reação (equação (4)) ⁷³:



Uma outra vantagem do uso de peróxidos é o facto de apresentarem uma taxa de libertação de O₂ diferente dependendo do tipo de peróxido utilizada, sendo possível escolher qual o mais adequado em função do objetivo, nomeadamente, se se pretende ou não uma libertação sustentada no tempo. Um dos desafios inerentes à utilização de peróxidos está relacionado com a libertação de cations Ca²⁺ para o meio reacional, que poderá afetar negativamente alguns tipos celulares, por interferirem no equilíbrio osmótico do meio. Ng et al. (2010) desenvolveram uma metodologia na qual procederam à incorporação de H₂O₂ em micropartículas de PLGA ⁷⁴. Posteriormente, Abdi et al. (2011) procederam à incorporação dessas mesmas micropartículas em matrizes de alginato 3D e realizaram testes celulares *in vitro*. Os resultados mostraram que as células apresentavam 100% de viabilidade celular, contra 60-65% de viabilidade celular quando privadas das micropartículas. Apesar dos peróxidos se apresentarem como materiais promissores, a produção de O₂ ocorreu apenas durante 5 horas. Estes resultados motivaram outros grupos de investigação a desenvolver novas metodologias de incorporação dos peróxidos em sistemas para ET, por forma a prolongar a libertação/produção de O₂ no tempo ⁷⁵.

Outra das desvantagens associadas à utilização de peróxidos em sistemas biológicos está relacionada com a produção de ROS citotóxicas, como subproduto da reação de produção de O₂. Como resposta a esta problemática, uma das soluções encontradas foi proceder-se à incorporação da enzima catalase nestes sistemas. Esta enzima está presente nos peroxissomas, tendo como função a conversão do H₂O₂ em O₂ e água, sem que ocorra produção de ROS. As ROS são moléculas sinalizadoras biológicas que participam na resposta inflamatória, podendo originar ou exacerbar o processo inflamatório no local de implantação do biomaterial. São, conseqüentemente, necessários mais estudos por forma a compreender melhor as conseqüências da produção de ROS pelo biomaterial implantado, quer para sistemas *in vitro* quer para sistemas *in vivo* ⁷⁶.

Os endoperóxidos apresentam um princípio de funcionamento idêntico ao dos peróxidos, mas sem as desvantagens inerentes a estes. Benz et al. (2013) procederam à

incorporação de endoperóxidos (p.e., hidrocarbonetos aromáticos, nomeadamente o naftaleno e derivados da 2-piridona) em pequenas moléculas orgânicas para libertação de O₂. Quando em contacto com água, ocorre libertação de O₂ via reação inversa Diels-Alder (Figura 4), durante 8 a 13 horas. Este tempo de libertação poderá ser prolongado através do estabelecimento de ligações covalentes com um polímero sintético, por exemplo, PLGA e PCL. Numa fase posterior, o mesmo grupo de investigação realizou estudos *in vitro* da libertação controlada destas espécies, endoperóxidos metilados derivados de piridona combinados com vitamina C, sendo que estes compostos foram incorporados em pequenas moléculas orgânicas e administrados ao meio de cultura celular das células fibroblastos 3T3 e de músculo liso de rato, em condições de hipoxia. Foram escolhidas estas linhas celulares por desempenharem um papel importante na regeneração de tecido, uma vez que são as principais constituintes do tecido vascular e conetivo, respetivamente. Foi verificado que a incorporação destas estruturas orgânicas modificadas aumentou significativamente a viabilidades celular para as duas linhas celulares testadas ⁷⁷. No futuro, os endoperóxidos, quer ligados covalentemente a *scaffolds* quer na forma livre, poderão ser utilizados como veículos para fornecimento de O₂ a feridas necróticas.

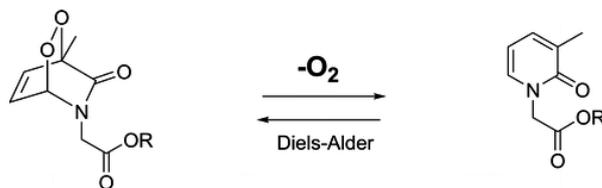


Figura 4 – Reação Diels-Alder.

Nos últimos anos, têm surgido vários estudos que defendem a abordagem HULK (do alemão Hyperoxide Unter Licht Konditionierung), cujo objetivo é a produção de tecidos quiméricos contendo células fotossintéticas que atuam como fonte local de O₂, através de um mecanismo independente da perfusão de O₂: fotossíntese. Hopfner et al. (2014) propõem um *scaffold* para cicatrização de feridas que ativamente produz O₂. Para tal, procederam à incorporação de uma alga unicelular *Chlamydomonas reinhardtii* num *scaffold* à base de colagénio, conseqüentemente, este sistema produz continuamente O₂ como resposta à exposição à luz. Os resultados preliminares de co-cultura da matriz fotossintética com fibroblastos NHI 3T3 foram satisfatórios, pelo que esta metodologia se apresenta como alternativa viável para oxigenação sob condições de hipoxia *in vitro* e *in vivo*. Esta técnica necessita de exposição contínua à luz, logo só poderá ser utilizada para desenvolvimento de *scaffolds* para aplicação tópica ou para tecidos pouco profundos ⁷⁸.

Outra tecnologia proposta são as microbolhas, que consistem num núcleo gasoso rodeado por um revestimento fino. O revestimento pode ser produzido à base de diferentes compostos, como por exemplo, lípidos, polímeros (p.e., dextrano e quitosano) e surfactantes. As microbolhas são atualmente utilizadas como agente de contraste para técnicas de imagiologia, porém também apresenta potencial para libertação de O_2 localmente, aquando do reventamento das mesmas por aplicação de ultrassons ⁷⁹. Outra possibilidade são os microtanques que consistem em esferas ocas de carbonato de cálcio carregadas com O_2 , que são posteriormente incorporadas em matrizes poliméricas, por exemplo à base de PCL. Quando os microtanques são administrados em culturas celular, o O_2 difunde-se do seu interior para o meio de cultura durante 24 horas. O tempo de libertação poderá ser controlado por manipulação da espessura e composição do revestimento, bem como pela escolha do polímero onde as esferas são incorporadas (Figura 5) ⁸⁰.

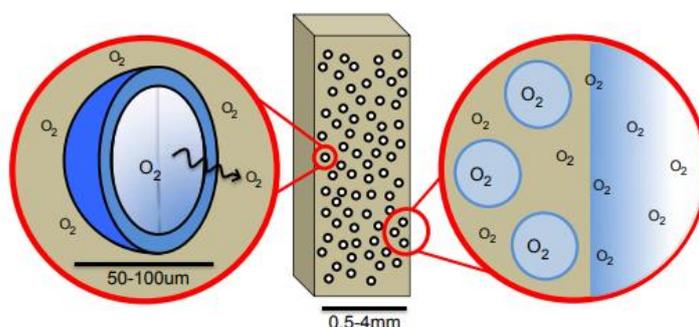


Figura 5 – Representação esquemática de microtanques isolados por um revestimento polimérico. Adaptada da referência ⁸⁰.

Por forma a ultrapassar as problemáticas abordadas neste subcapítulo e otimizar a oxigenação de sistemas *in vitro*, *ex vivo* e *in vivo*, os investigadores estão focados em desenvolver, aperfeiçoar e manipular os sistemas existentes, por forma a melhorar a resposta celular através da incorporação dos transportadores e/ou geradores artificiais de O_2 em veículos adequados. Para tal é necessário melhorar a sua estabilidade, conseguir controlar temporalmente a libertação do O_2 e estudar mecanismos por forma a evitar as vias reacionais, pelas quais estes podem apresentar efeito tóxico.

2. Nanossistemas para oxigenação

Face às limitações já identificadas referentes às tecnologias atuais para oxigenação em ET e culturas de células *in vitro*: rápida libertação de O₂, tempo de libertação de O₂ não permite a vascularização do *scaffold* por forma a evitar a necrose do tecido, resposta inflamatória ou imunogénica por parte do indivíduo, produção de ROS, o principal desafio prende-se com o desenvolvimento de veículos seguros e estáveis para administração das alternativas atuais de transportadores e geradores artificiais de O₂. Com o objetivo de ultrapassar as problemáticas mencionadas, a nanotecnologia tem contribuído com o desenvolvimento de nanossistemas biocompatíveis (orgânicos, inorgânicos ou compósitos) para a sua administração, de entre os quais se destacam micelas, lipossomas, nanoesferas e nanocápsulas, entre outras nanopartículas, que se encontram representadas na Figura 6.

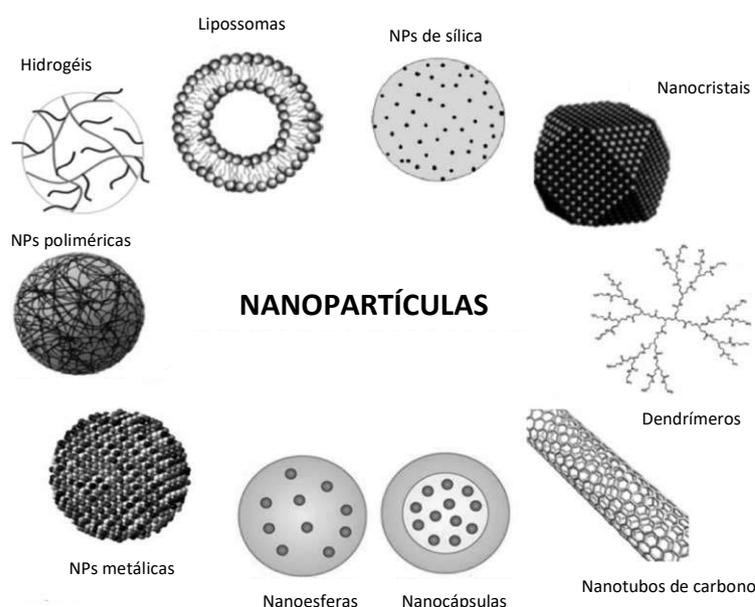


Figura 6 – Representação esquemática de diferentes tipos de nanopartículas. Adaptada da referência ⁸¹.

Estes sistemas de administração oferecem numerosas vantagens relativamente às formulações convencionais, evitando a degradação e lixiviação prematura do composto, evitando efeito citotóxico, controlando o perfil de libertação de O₂, assegurando e melhorando a biocompatibilidade e melhorando a eficiência da troca de gases do sistema. De todas as vantagens acima referidas, de realçar a razão superfície/volume elevada que garante uma máxima área de superfície para difusão de gases, sendo essencial o controlo das propriedades da superfície das partículas. A superfície das partículas pode ser modificada com grupos funcionais ou moléculas sinalizadoras, alterando as suas

propriedades físicas, químicas e melhorando a sua biodistribuição, tendo em conta o seu propósito, tempo de circulação e internalização celular^{82,83}.

Neste sentido, estes nanossistemas apresentam-se como alternativas bastante promissoras para melhoramento das tecnologias previamente desenvolvidas. Desta forma, tendo por base o estudo da literatura acima descrito e a informação previamente recolhida por outros alunos do grupo GSP (do inglês *Green and Sustainable Processes*) da Universidade de Coimbra, neste trabalho procurou-se desenvolver uma formulação inovadora para obtenção de micro/nano cápsulas de sílica através do método sol-gel, contendo no seu interior líquidos com capacidade para dissolver quantidades apreciáveis de O₂.

A aplicabilidade desta metodologia não se esgota nas áreas acima mencionadas, culturas celulares *in vitro* e *scaffold* para Engenharia de Tecidos, podendo também ser bastante útil para sistemas de remoção/absorção de CO₂, preservação de órgãos para realização de transplantes, construção de biorreatores para diferentes aplicações em biotecnologia, captação de outros gases nocivos como o CO e o NO. Poderá ainda atuar como método para internalização celular de certos compostos de interesse^{73,84,85}.

2.1 Nanoesferas e nanocápsulas

As nanoesferas são estruturas sólidas e densas, nas quais LIs, PFCs e outros líquidos com elevada capacidade para absorver, reter e libertar oxigénio podem ser encapsulados no seu interior. Também pode servir para dissolver, aprisionar, incorporar, adsorver ou estabelecer ligações químicas com fármacos. Podem ser de carácter orgânico (constituídas à base de polímeros), inorgânico (por exemplo, à base de sílica) ou compósito. O seu diâmetro varia entre 100 e 200 nm. Estas partículas são extremamente sensíveis à opsonização (que leva à fagocitose das mesmas), devido às características hidrofóbicas da superfície. Consequentemente, a superfície destas nanopartículas tem de ser modificada para que o tempo de circulação na corrente sanguínea aumente. A facilidade de manipulação e modificação das suas superfícies são propriedades que as tornam em alternativas bastante atrativas para nanomedicina.

Cápsulas são definidas como sistemas vesiculares ou “reservatórios”, sendo que a cavidade é rodeada por um revestimento de materiais sólidos. As suas características estruturais, como a grande cavidade interior, baixa densidade e comportamento coloidal,

converteram as cápsulas numa interessante área de estudo para modulação das características químicas e físicas de diferentes materiais aumentando a estabilidade, área ativa e volume de poros, atuando como agente porogénico. Adicionalmente, estas também se apresentam extremamente atrativas para encapsulamento de uma variedade de substâncias, sólidas, líquidas ou uma dispersão ⁸⁶. Em particular, a diversidade de morfologias e composições de cápsulas poliméricas, lipossomas e esferas ocas inorgânicas tornas estas estruturas em veículos interessantes para incorporação e imobilização de agentes funcionais, como fármacos, enzimas, corantes, genes, peptídeos e outras moléculas bioativas ^{55,81,83}.

As cápsulas de sílica apresentam-se como metodologia promissora de encapsulamento para aplicações na área biomédica, porque combinam as vantagens da sílica e da estrutura de cápsula. A sílica é um material não-tóxico e biocompatível, sendo reconhecido como seguro pela agência US Food and Drug Administration (FDA). De referir que a sua produção é de baixo custo, apresenta estabilidade química e mecânica e transparência ótica. A superfície da sílica é rica em grupos hidroxilo, o que a torna intrinsecamente hidrofílica e assegura a estabilidade coloidal. Adicionalmente, a superfície da sílica pode ser facilmente modificada.

Ao longo dos anos, diversas têm sido as técnicas desenvolvidas para a síntese de cápsulas de sílica de diferentes dimensões, formas e a química da superfície. As nanocápsulas à base de sílica (<100 nm) são de particular interesse, uma vez que partículas destas dimensões reduz de forma significativa a sua captura pelo sistema retículo-endotelial; aumenta o tempo de circulação no sangue; aumenta a internalização celular e facilita a transposição de barreiras fisiológicas, por exemplo, a barreira hemato-encefálica e o endotélio ^{87,88}.

De entre todos os materiais estruturalmente estáveis, os materiais à base de sílica possuem estruturas definidas e propriedades de superfície que são conhecidas por serem compatíveis. A sílica é, por norma, o material de eleição para a utilização de nanopartículas inorgânicas em sistemas biológicos, sendo utilizada para melhorar a biocompatibilidade de sistemas de libertação controlada, de fármacos, como nanopartículas magnéticas, biopolímeros e micelas ⁸⁹.

2.2 Metodologias de síntese de nanocápsulas à base de sílica

Os avanços na nanotecnologia associados às características atrativas da sílica para uso em sistemas biológicos estimulou o desenvolvimento da produção de nanosílica. Uma vez que as partículas de sílica extraídas de fontes naturais apresentam impurezas metálicas, o que não é desejável para aplicações biomédicas e farmacêuticas. Neste contexto, foram desenvolvidas novas metodologias para produção de partículas sintéticas de sílica com níveis de pureza aceitáveis.

O método sol-gel é um método químico muito versátil utilizado para a produção de sílica, de vidro e de materiais cerâmicos, originando produtos de elevado grau de pureza, homogêneos e de dimensões controladas. O método sol-gel geralmente utiliza como precursores alcóxidos de metal, sais inorgânicos ou compostos organometálicos, como por exemplo tetrametilsilano (TMOS) e o tetraetilortosilicato (TEOS), que são, numa fase inicial, dissolvidos em água ou outros solventes, como o etanol, à temperatura ambiente ou a temperaturas mais elevadas. Os precursores sofrem uma série de reações de hidrólise e condensação até formarem uma dispersão de partículas sólidas de dimensões coloidais (1-1000 nm) denominada de sol, a qual sofre posterior gelificação via policondensação ou poliesterificação, para se obter o gel. É importante controlar o pH da solução a fim de prevenir a precipitação e garantir um gel homogêneo, que pode ser obtido com a adição de um catalisador ácido, como o HCl, ou de um catalisador básico, como o NH_3 ⁹⁰.

As reações do TEOS que originam partículas de sílica, através do processo sol-gel, são apresentadas de forma esquematizada na Figura 7.

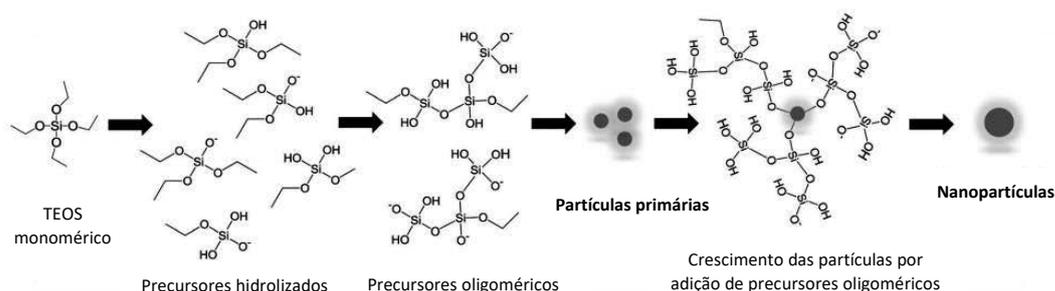


Figura 7 – Representação esquemática do mecanismo de nucleação da sílica, desenvolvimento das partículas primárias e crescimento das partículas. Adaptado da referência ⁹¹.

A hidrólise das moléculas de TEOS origina grupos silanol. A polimerização que ocorre entre os grupos silanol cria ligações siloxano (Si-O-Si) que são a base estrutural da

sílica. A formação da sílica pode ser dividida em duas etapas: nucleação e crescimento. Dois modelos são propostos para descrever o mecanismo de crescimento da sílica: 1) adição de monómero e 2) agregação controlada. O primeiro modelo proposto afirma que, após nucleação inicial intensa, o crescimento das partículas ocorre por adição de monómeros hidrolisados. Contrariamente, o segundo modelo apresentado defende que a nucleação ocorre continuamente ao longo da reação, sendo que os núcleos (partículas primárias) se agregam posteriormente formando dímeros, trímeros e outras partículas de maior dimensão⁹¹.

O método sol-gel possui inúmeras vantagens, tais como a síntese química a baixas temperaturas. É possível ainda obter compostos homogêneos, tamanho pequeno de partículas e controle na morfologia das mesmas, quando comparado com os métodos de síntese mais convencionais de preparação de cerâmicos. No entanto, os precursores utilizados no sol-gel são relativamente caros e como o processo envolve uma série de etapas é necessária uma monitorização constante do mesmo⁹².

Com o desenvolvimento da técnica foram sido propostas modificações ao método sol-gel, como, por exemplo, o uso de surfactantes ou polímeros como molde. Nestes casos, a sílica condensa em torno das micelas, dando origem a nanocápsulas de sílica. Tendo em mente a aplicação proposta nesta dissertação e as características pretendidas para as nanocápsulas, desenvolveu-se um sistema emulsificante inovador, o qual foi posteriormente sujeito à metodologia sol-gel. A técnica sol-gel permite ter diferentes pontos de controlo ao longo do processo de síntese, desta forma assegura-se que o produto final corresponde ao pretendido.

2.3 Líquidos com elevada capacidade para absorver, reter e libertar oxigénio

Os perfluorocarbonetos são líquidos de elevada capacidade para absorver, reter e libertar oxigénio, que apresentam solubilidade para o O₂ compreendida entre 14 e 22 mM, tendo sido abordados no Capítulo 1.3. Devido às desvantagens da utilização destes em sistemas *in vivo* e *in vitro*, surgem como alternativa os líquidos iónicos. Os líquidos iónicos (LI) são sais que consistem em iões e que permanecem no estado líquido para temperaturas inferiores a 100 °C ou à temperatura ambiente (25 °C) - Líquidos Iónicos à Temperatura Ambiente (RTILs)^{93,94}. Nos últimos anos, tem surgido uma grande variedade de LIs devido

às suas características, nomeadamente serem líquidos numa gama alargada de temperaturas (cerca de 300 °C); o ponto de fusão ser próximo da temperatura ambiente; apresentarem capacidade de dissolver uma grande variedade de materiais, incluindo orgânicos, inorgânicos e poliméricos, apresentarem elevada polaridade; poderem ser reutilizados e reciclados e apresentarem grande capacidade de absorção, retenção e libertação de gases ⁹³. Os catiões e aniões mais comuns para a formulação de líquidos iónicos encontram-se representados na Figura 8 ⁹⁵.

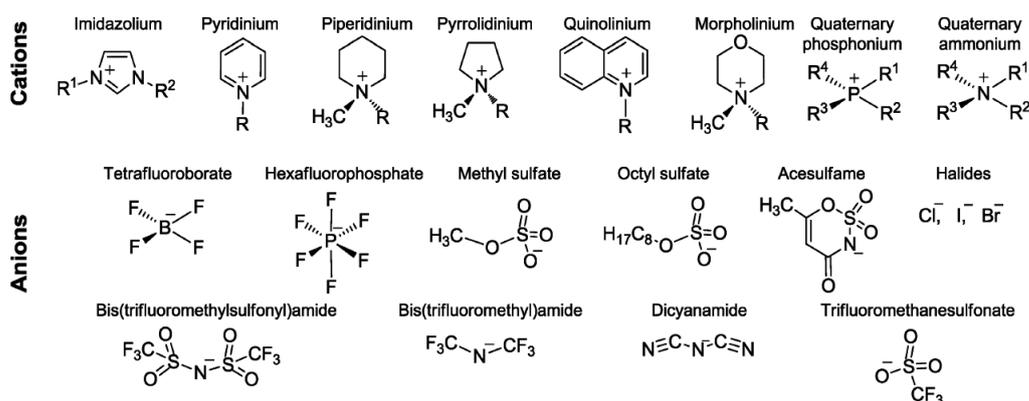


Figura 8 - Estruturas químicas dos catiões e aniões mais utilizados para produção de LIs. Adaptado da referência ⁹⁵.

A dimensão, distribuição de cargas à superfície dos iões, assimetria do catião e interações de Van der Waals são fatores que influenciam o ponto de fusão do LI, sendo que quanto maior a dimensão do catião e a assimetria menor será o ponto de fusão deste ⁹⁶. Outro fator que influencia o ponto de fusão é a presença ou não de pontes de hidrogénio fortes na rede ⁹⁵. Os LIs mais comuns são formados pela combinação de um catião orgânico e um anião que pode ser orgânico ou inorgânico. A diversidade de LIs existentes permite que o solvente seja concebido e adaptado de acordo com as necessidades e propósito do sistema a utilizar. Normalmente, as propriedades são controladas através da variação do comprimento e do número de ramificações dos grupos alquila incorporados no catião ^{94,96}.

Tendo em conta as características dos LI, nomeadamente o facto das propriedades poderem ser facilmente manipuladas consoante o catião e anião escolhidos e a sua elevada capacidade de absorção, retenção e libertação de gases na sua estrutura, de referir O₂ e CO₂, estes foram escolhidos para serem incorporados nas nanocápsulas desenvolvidas neste trabalho. O LI escolhido, [P_{6,6,6,14}][NTf₂], para além do que foi mencionado anteriormente é também hidrofóbico, sendo este aspeto importante para assegurar que o mesmo permanece no interior da nanocápsula.

Na Tabela 2 são apresentados os valores de solubidade de O₂, N₂ e CO₂ para diferentes LIs, e respectivas condições e métodos para determinação dos mesmos.

2.4 Citotoxicidade de líquidos iónicos

Os LIs têm sido apelidados de solventes “verdes” e “seguros”, porém estes não são sempre “verdes” nem “amigos do ambiente”, uma vez que falham em satisfazer todos os critérios da “química verde. O principal argumento é o facto de estes serem tóxicos para diferentes organismos, como enzimas, culturas de células, microrganismos, plantas, seres vertebrados e invertebrados. O seu grau de toxicidade é superior ao dos solventes convencionais, como o metanol, etanol, propanol em várias ordens de grandeza. Recentemente, estudos toxicológicos permitiram descobrir algumas tendências gerais relativas ao efeito de vários catiões e/ou aniões em termo de citotoxicidade e ecotoxicidade, porém, muito mais estudos *in vitro* e *in vivo* têm de ser realizados ^{97,98}.

Nos últimos anos, foi investigada a toxicidade dos LIs em diferentes linhas celulares humanas e de roedores ^{99,100}. Os resultados revelaram que a toxicidade e, em especial, a citotoxicidade, dos LIs depende fortemente da sua hidrobicidade. Os LIs mais hidrofóbicos, nomeadamente os que possuem uma longa cadeia lateral hidrocarbonada ou um anião ou grupo principal de dimensões consideráveis hidrofóbico, tendem a apresentar alto potencial de toxicidade para os seres humanos e ambiente ¹⁰¹. O estudo realizado por Fatemi et al. (2011) concluiu que os principais fatores estruturais moleculares que determinam a citotoxicidade dos LIs são a simetria, grupo substituinte e distribuição de carga nos catiões. De acordo com os resultados recolhidos, os modelos sugerem que o aumento significativo de grupos substituintes aumenta consideravelmente a citotoxicidade do LI. Adicionalmente, os modelos obtidos para 25 aniões diferentes sugerem que as propriedades do anião, em comparação com as do catião, representam um efeito secundário na citotoxicidade. Desta forma, ter informação acerca da atividade bioquímica dos LIs, tendo por base a sua estrutura química, poderá fornecer informação importante relativamente ao seu impacto a nível biológico e ambiental ¹⁰².

Tabela 2 – Valores de solubilidade de O₂, N₂ e CO₂ em diferentes LIs, e respectivas condições e método de determinação.

LI	O ₂ (mM)	N ₂ (mM)	CO ₂ (mM)	T (°C)	Método	Referência
[P _{6,6,14}][NTf ₂]* Trihexil(tetradecil)fosfônio bis(trifluorometilsulfoni)imida	7,3		38	25 (O ₂) e 30 (CO ₂)	Voltametria cíclica - Butler-Volmer e <i>Lag-time</i>	103,104
	7,3			25	Voltametria cíclica - Marcus-Hush	
	6,0 ± 0,5		38 ± 4	30	<i>Lag-time</i>	105
	7,8 ± 1,5			25	Voltametria cíclica	106
[P _{6,6,14}][Cl] Trihexil(tetradecil)fosfônio cloreto			49 ± 5	30	<i>Lag-time</i>	105
[P _{6,6,14}][DCA] Trihexil(tetradecil)fosfônio dicianamida			59 ± 3	30	<i>Lag-time</i>	105
[BMPyr][NTf ₂] Butil-1-metilpirrolidínio bis(trifluorometilsulfoni)imida	10			25	Voltametria cíclica	107
[HMPyr][NTf ₂] 1-hexil-1-metilpirrolidínio bis(trifluorometilsulfoni)imida	14,5			25	Voltametria cíclica	107
[MOPMPip][NTf ₂] 1-(3-metilpropil)-1-metilpiperidínio bis(trifluorometilsulfoni)imida	14,3			25	Voltametria cíclica	107
[EMIM][NTf ₂] 1-etil-3-metilimidazólio bis(trifluorometilsulfoni)imida	3,9		82,2	20 ± 3 (O ₂) e 30 (CO ₂)		
	<10	<10	90	30	Voltametria cíclica e <i>Lag-time</i>	104,108,109
[C ₆ mim][NTf ₂] 1-hexil-3-metilimidazólio bis(trifluorometilsulfoni)imida			70,2	30		

	11,6	20 ± 3	Lag-time
[N _{6,2,2}][NTf ₂]			
Trietil(hexil)amónio bis(trifluorometilsulfonil)imida	3,9	25	Voltametria cíclica 110
[C4dmim][NTf ₂]			
1-butil-2,3-dimetilimidazólio bis(trifluorometilsulfonil)imida	3,4	25	Voltametria cíclica 110
[C4mim][NTf ₂]			
1-butil-3-metilimidazólio bis(trifluorometilsulfonil)imida	3,1	25	Voltametria cíclica 110
[C4mpyr][NTf ₂]			
N-butil-N-metilpirrolidínio bis(trifluorometilsulfonil)imida	3,6	25	Voltametria cíclica 110
[N _{4,1,1,1}][NTf ₂]			
Trimetil(butil)amónio bis(trifluorometilsulfonil)imida	ND	30	58,2 ± 4,9 Lag-time 111
[N _{6,1,1,1}][NTf ₂]			
Trietil(hexil)amónio bis(trifluorometilsulfonil)imida	NQ	30	73 ± 4 Lag-time 111
[N _{10,1,1,1}][NTf ₂]			
Dimetil(decil(i-propil))amónio bis(trifluorometilsulfonil)imida	NQ	30	59,1 ± 3 Lag-time 111
[N _{4,1,1,3}][NTf ₂]			
Dimetil(butil(i-propil))amónio bis(trifluorometilsulfonil)imida	ND	30	51,0 ± 2,1 Lag-time 111
[N _{6,1,1,3}][NTf ₂]			
Dimetil(hexil(i-propil))amónio bis(trifluorometilsulfonil)imida	ND	30	56,5 ± 2,3 Lag-time 111
[N _{10,1,1,3}][NTf ₂]			
Dimetil(decil(i-propil))amónio bis(trifluorometilsulfonil)imida	NQ	30	57,4 ± 4,2 Lag-time 111
[N _{1,4,4,4}][NTf ₂]			
Tributil(metil)amónio bis(trifluorometilsulfonil)imida	12 ± 4	30	14 ± 5 53 ± 5 Lag-time 111
[N _{1,8,8,8}][NTf ₂]			
Triocetil(metil)amónio bis(trifluorometilsulfonil)imida	NQ	30	61,5 ± 6,3 Lag-time 111
[N _{6,2,2,2}][NTf ₂]			
Trietil(hexil)amónio bis(trifluorometilsulfonil)imida	ND	30	47,8 ± 11,5 Lag-time 111

* Líquido iónico usado neste trabalho. Para além da boa capacidade para dissolver oxigénio é hidrofóbico (máxima capacidade de absorção de água de 0,7%).

ND – não detetável

NQ - não quantificável

Os LIs de base fosfônio (PhILs) apresentam elevada estabilidade química e térmica, assim como elevada viscosidade, quando comparados com LIs à base de catiões imidazólio e amônio. Os PhILs são normalmente aplicados na catálise de transferência de fase, sendo também usados como solventes e catalisadores para extração/separação de biomoléculas devido à sua hidrofobicidade e poder de solvente intrínsecos ^{112,113}.

Neste trabalho, o LI escolhido, $[P_{6,6,6,14}][NTf_2]$, apresenta elevada hidrofobicidade, tendo este sido um dos critérios de seleção, uma vez que esta propriedade favorece o processo de emulsificação e diminui a difusão do LI para o exterior da cápsula. A cápsula formada também contribui para diminuição do risco de citotoxicidade por aprisionamento do LI. O mecanismo citotóxico associado aos LIs hidrofóbicos reside nas interações hidrofóbicas entre o LI e os segmentos hidrofóbicos das proteínas e da membrana celular de células vivas, o que facilita a sua internalização nos organismos celulares ¹¹⁴. Consequentemente, pode ocorrer inibição da atividade de enzimas e perturbação estrutural das membranas celulares (alteração da permeabilidade e expansão). Recentemente, têm sido realizados estudos de simulação molecular dinâmica, para melhor estudar e compreender as interações entre a bicamada fosfolipídica e os LIs, em função do aumento gradual do tamanho da cadeia alquílica em catiões e aniões hidrofóbicos ^{115,116}. As simulações realizadas mostraram que, para concentrações milimolares (mM), ocorre inserção de catiões na bicamada, independentemente do tamanho da cadeia alquílica, por indução do aumento da rugosidade da membrana celular que culmina com a rutura da mesma, dando origem a micelas LI-lípidos ^{117,118}. No caso de iões hidrofílicos, como o $[Cl]^-$, estes tendem a dispersar-se livremente no meio aquoso, enquanto que, no caso dos LIs que possuem aniões altamente hidrofóbicos, como o $[NTf_2]$, quer o anião quer o catião penetram a bicamada fosfolipídica (Figura 9).

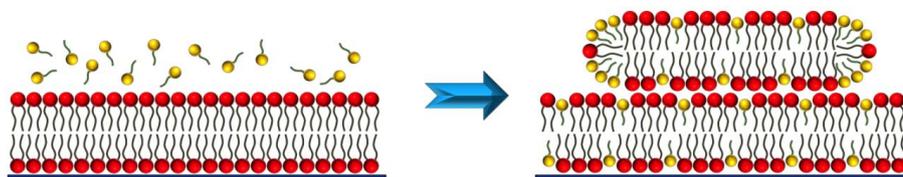


Figura 9 – Representação esquemática da inserção do LI na bicamada fosfolipídica e formação de vesículas LI-lípidos. Adaptada da referência ¹⁰¹. (Legenda: vermelho – bicamada fosfolipídica; amarelo – líquidos iônicos).

Jing et al. (2016) observaram que a concentração crítica de LI mais baixa, para que ocorra expansão da bicamada fosfolipídica, coincide com os valores de IC_{50} para a viabilidade das linhas celulares animais, HEK-293 (células embrionárias de rim humano) e C6 (células de glioma de rato). Esta relação observada permite confirmar que o principal

mecanismo inerente à citotoxicidade dos LIs é a perturbação induzida na estrutura da biomembrana. Para além disso, a avaliação do potencial antimicrobiano dos LIs à base de piperazínio e guanidínio, para as bactérias *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*, demonstrou que a toxicidade está diretamente relacionada com carga da membrana bacteriana, ou seja, se esta é gram positiva ou negativa ¹⁰¹.

Em 2009, Kumar et al. (2009) publicaram um estudo sobre a potencial atividade anticancerígena dos LIs de base amónio e fosfónio. Os testes foram realizados para 60 linhas celulares tumorais humanas, tendo-se verificado que o comprimento da cadeia alquílica substituinte desempenha um papel fundamental na atividade anti-tumoral e citotoxicidade dos LIs. Sumariamente, verificou-se que os PhILs são mais ativos e menos citotóxicos do que os de base amónio, sendo que os resultados mostraram claramente que a fácil modificação dos LIs (mudança do catião/anião e modificação do catião com diferentes substituintes) permite controlar a atividade biológica e citotoxicidade ¹⁰⁰.

Mikkola et al. (2015) procederam à realização de testes de toxicidade em células epiteliais de córnea humana, lipossomas e *E. coli*. com os LIs que se apresentam como mais promissores para aplicações na área do bioprocessamento a larga escala. Estes são à base de imidazólio e fosfónio (p.e., [P_{4,4,4,4}]Cl, [P_{4,4,4,4}][OAc], [P_{8,4,4,4}]Cl, [emim]Cl, [emim][OAc], [emim][Me₂PO₄], [DBNH][OAc]) . Os resultados obtidos permitiram comprovar que os LIs à base de imidazólio não afetam a viabilidade celular, para a gama de concentrações compreendida entre 1×10^{-1} e 1×10^{-5} mM. Por sua vez, verificou-se que a única concentração de LIs à base de fosfónio que não afetou a viabilidade celular foi de 1×10^{-5} mM. Com estes ensaios foi possível provar que a toxicidade se encontra diretamente relacionada com o comprimento da cadeia, hidrofobicidade, cargas superficiais e distribuição de tamanho dos lipossomas, podendo ocorrer disrupção da bicamada lipídica, visto que foi confirmado que a forma de interação dos LIs é afetada pelo tamanho dos lipossomas e a distribuição de cargas à sua superfície ¹¹⁹.

Por forma a averiguar a toxicidade de LIs para diferentes tipos de células humanas, foram testadas as seguintes linhas celulares: LoVo (adenocarcinoma colonorrectal), DLD-1 (adenoma colorretal), HepG2 (cancro do fígado), AGS (adenoma estomacal), A549 (cancro dos pulmões), HaCaT (linha de queratinócitos humanos imortais). O líquido iónico estudado foi a sacarina de didecildimetilamónio ([DDA][Sac]) que apresentou uma toxicidade acrescida nas células dos pulmões e células da pele (linhas A549 e HaCaT). Os resultados de viabilidade são aceitáveis para todas as linhas celulares para a concentração

de 0,5 μM , quando esta é aumentada para concentrações superiores a 6 μM a viabilidade é praticamente nula ¹²⁰.

De entre a literatura consultada, alguns dos artigos estudaram o LI utilizado neste trabalho ($[\text{P}_{6,6,6,14}][\text{NTf}_2]$), ou então o catião ($[\text{P}_{6,6,6,14}]^+$) ou anião ($[\text{NTf}_2]^-$) correspondente. Na Tabela 3 apresenta-se resumidamente os ensaios realizados e as conclusões retiradas.

2.5 Matrizes poliméricas de suporte para oxigenação

O O_2 é uma molécula chave envolvida em vários processos fisiológicos e é particularmente importante durante o processo de cicatrização de feridas e reparação de tecidos. Sobre este assunto, há fortes evidências de que o O_2 está envolvido em cada uma das etapas do processo de cicatrização. Sen et al., (2009) provaram que o processo de cicatrização é afetado quando o fornecimento de O_2 é insuficiente. Entre outras funções, o O_2 é essencial em feridas, por forma a assegurar o fornecimento de energia (níveis de ATP) para os novos tecidos em formação e para assegurar a correta deposição e polimerização das fibras de colagénio ¹²¹. O O_2 é também necessário para formação de ROS, que atuam como moléculas de sinalização, prevenindo a infeção das feridas por rutura da membrana bacteriana por oxidação. Adicionalmente, o metabolismo anaeróbico tem como produto ácido láctico, que quando acumulado nos tecidos, é tóxico ¹²²⁻¹²⁴.

Os *scaffolds* para Engenharia de Tecidos têm que ser porosos para garantir uma troca eficiente de gases e massa, com boas características mecânicas por forma a promover a adesão e crescimento celular, diferenciação e migração, e apresentam um desempenho superior aos modelos 2D, uma vez que melhor mimetizam o microambiente e as interações célula-célula presentes no tecido animal *in vivo* ¹²⁵. Para além do papel desempenhado como estrutura mecânica e de suporte, os *scaffolds* podem ainda atuar como sistema para libertação controlada de fármacos, medir quantitativamente determinadas variáveis fisiológicas, como por exemplo, o *stress* mecânico e analitos específicos ¹²⁶.

Tabela 3 – Resumo da informação recolhida relativa à toxicidade do LI, ou do catião ou do anião que constituem o LI utilizado neste trabalho.

Foco do estudo	Observações	Referência
Anião	LIs hidrofóbicos com o anião [NTf ₂] apresentam maior citotoxicidade para microorganismos. Quando conjugado com catião hidrofílico de curta cadeia alquílica, a citotoxicidade do LI aumenta porque a migração do anião para a fase aquosa é facilitada. Anião mais tóxico para a bactéria <i>Clostridium</i> sp.. Os autores sugerem a combinação deste anião com cátions mais benignos, como por exemplo piperidínio cíclico não aromático, pirrolidínio e colina.	127
IL	Exposição das células CCO a uma concentração de 23% v/v de LI. O LI foi detetado na fração membranas das células, o que evidencia que este permanece entre as membranas lipídicas. A citotoxicidade observada é devido ao processo de necrose, o que significa que as células morrem quase instantaneamente após contacto com o LI.	128
Catião	Avaliação da citotoxicidade de LIs de base guanidínio, fosfónio e imidazólio para as bactérias luminescentes marinhas <i>Vibrio fischeri</i> . No caso do catião fosfónio, os aniões brometo, cloreto e metanosulfonato têm um efeito insignificante nos resultados de EC ₅₀ . A toxicidade dos LIs de base fosfónio tende a aumentar com o aumento do comprimento da cadeia alquílica e são mais tóxicos que os análogos da família dos imidazólios.	129
Catião	Conclui que os ILs à base de [P _{6,6,6,14}] podem ser considerados estruturas benignas, uma vez que os halos de inibição obtidos são inferiores comparativamente aos de referência para as bactérias luminescentes marinhas <i>Vibrio fischeri</i> .	130
IL	Testes de citotoxicidade realizados para as linhas celulares HT-29 e CaCo-2, para uma concentração de 6000 µM. A viabilidade é de aproximadamente 60% para as HT-29 e de 100% para as CaCo-2, após 4 horas de contacto. De entre todos os compostos testados (família dos imidazólios, alicat, guanidínio e colina) o LI usado neste trabalho foi dos que apresentou maior citotoxicidade associada.	131
IL	Testes de citotoxicidade realizados para duas culturas celulares, HepG2 e CaCo-2, nas quais o LI foi adicionado nas concentrações de 100, 1000 e 7500 µM a HBSS. Tempo de incubação de 4 horas, após as quais a viabilidade celular não é afetada.	132
IL	Teste de citotoxicidade realizado para 24 e 72 horas de contacto com o LI. Foi utilizada a linha celular SAOS-2 e as concentrações testadas foram de 1 e 5% v/v.. Após cada um dos períodos de incubação confirmou-se por LDH que a viabilidade celular permanece superior a 85%.	133

A difusividade em *scaffolds* para ET é essencial para que o fornecimento de O₂ e nutrientes ao tecido em formação seja assegurado, bem como para garantir a remoção de metabolitos que possam ser tóxicos¹³⁴. Caso algum dos aspetos falhe, ocorre necrose e a abordagem utilizada é inviabilizada. Um trabalho que se dedicou ao estudo da difusão de oxigénio em *scaffolds* de PCL demonstrou que existe uma forte relação entre a porosidade e arquitetura dos poros e a difusividade¹³⁵. De referir que a reabsorção do *scaffold* e a formação de novo tecido afetam a difusividade, pelo que esta apresenta dependência temporal¹³⁶.

Atualmente, um dos principais desafios em ET consiste no estabelecimento de vascularização para tecidos e órgãos implantados. Particularmente, para tecidos de grandes dimensões, que consistem em implantes com células imobilizadas que requerem um fornecimento de sangue adequado para que a viabilidade celular seja mantida, não interferindo com o metabolismo celular. Estudos afirmam que células que estejam a mais de algumas centenas de micrómetros de um vaso sanguíneo não sobrevivem por limitações da difusão^{137,138}. Consequentemente, surgem complicações devido à baixa difusão de O₂ e nutrientes que resultam em morte celular. Por forma a ultrapassar esta problemática, várias estratégias têm sido propostas para facilitar o transporte de O₂ e aumentar a taxa de sobrevivência das células. São exemplos os fatores de crescimento angiogénico, como o VEGF, que aumentam a eficiência da resposta angiogénica, porém a taxa a que ocorre angiogénese não é alterada. Outra possibilidade é o implante ser colocado de forma adjacente a um local altamente vascularizado, no entanto a localização fisiológica deste está dependente do tecido-alvo para o material desenvolvido^{139,140}. Neste contexto, surgem estudos que sugerem a incorporação de transportadores sintéticos de oxigénio e de biomateriais geradores de oxigénio.

Seifu et al. (2011) sugeriram a incorporação de partículas porosas de zeolito fluoradas como parte integrante de um *scaffold* para regeneração do músculo liso vascular, cardíaco e cartilagem. A matriz polimérica à base de poli(uretano carbonato) foi produzida pela combinação das metodologias de evaporação de solvente e lixiviação de partículas, tendo sido utilizado NH₄Cl como agente porogénico. A concentração de oxigénio dissolvido e a proliferação celular aumentaram na presença do sistema desenvolvido. Este ensaio teve a duração de 7 dias e foram utilizadas células de músculo liso da artéria coronária humana¹⁴¹. Por sua vez, Oh et al. (2009) propuseram a incorporação de um biomaterial gerador de oxigénio numa estrutura para ET. A tecnologia tem por base a decomposição química do percarbonato de cálcio sólido aquando do contacto com a água,

originando O_2 e íões de sódio e percarbonato (subprodutos biocompatíveis). Desta forma, a viabilidade celular é mantida em condições de hipoxia, prevenindo a necrose. As partículas geradoras de O_2 à base de percarbonato de cálcio foram incorporadas num *scaffold* 3D de PLGA, tendo sido utilizado como agente porogénico partículas de parafina, posteriormente removidas com etanol e hexano. Este *scaffold* fornece um ambiente adequado à sobrevivência celular quando em condições de hipoxia local, tendo assegurado níveis de O_2 adequados à proliferação celular de fibroblastos NIH 3T3 durante 10 dias. Esta solução tem como principal objetivo resolver os problemas associados aquando da transplantação de implantes de dimensões consideráveis ¹⁴².

Harrison et al. (2007) procederam à incorporação de percarbonato de sódio num filme de PLGA, porém, após apenas 70 horas *in vitro*, a quantidade deste composto tinha sido significativamente reduzida. Por sua vez, quando aplicados *in vivo*, numa primeira fase, atuaram como barreira protetora da pele exposta e desvascularizada, este efeito protetor apresentou uma dependência temporal devido à decomposição gradual do percarbonato de sódio. Após 3 dias, foi verificado que o tempo de contacto com o *scaffold* foi insuficiente para assegurar a formação de novos vasos no *scaffold*. Concluindo, a necrose do tecido foi evitada, mas devido à degradação do material gerador de O_2 não foi garantido vascularização adequada ¹⁴³.

A terapia de células estaminais apresenta potencial para regeneração do tecido cardíaco danificado após ataque cardíaco, porém a eficácia desta metodologia é extremamente reduzida, devido à baixa sobrevivência das células associada a condições de hipoxia ¹⁴⁴. Li et al. (2012) desenvolveram um sistema capaz de libertar continuamente O_2 para as células progenitoras cardíacas constituído por microsferas à base de PLGA libertadoras de peróxido de hidrogénio (H_2O_2), aquando da decomposição pela enzima catalase. Estas foram incorporados num hidrogel termosensível à base de N-isopropilacrilamida (NIPAAm) + ácido acrílico (AAc) + hisroxietil metracrilato-oligo(hidroxibutarato) (HEMA-oHB) (Figura 10).

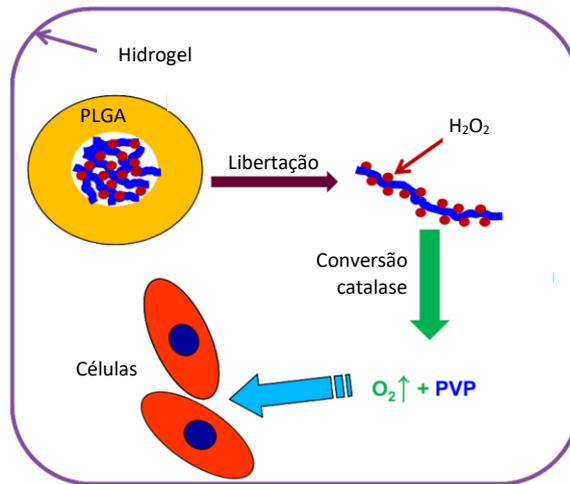


Figura 10 – Representação esquemática de um sistema para liberação controlada de O_2 para aumento da sobrevivência e diferenciação das células derivadas da cardioesfera (CDC), em condições de hipoxia. Adaptado da referência ¹⁴⁵.

Os resultados foram positivos, uma vez que este sistema melhorou a sobrevivência e diferenciação de células derivadas da cardioesfera (CDC) em células cardíacas, não tendo ocorrido morte celular após 7 dias. Com este sistema, foi conseguida uma liberação sustentada de oxigênio ao longo de duas semanas ¹⁴⁵.

Por forma a prevenir a morte celular induzida por hipoxia para as células β do pâncreas (presentes nos Ilhéus de Langerhans), conhecidas pelas elevadas taxas de consumo de O_2 , Pedraza et al. (2012), desenvolveram um biomaterial produtor de oxigênio *in situ*, que assegura o imediato acesso ao O_2 por parte das células. Este consiste no encapsulamento de peróxido de cálcio em discos de polidimetilsiloxano (PDMS) (Figura 11). Desta forma, ao escolher um material com elevada permeabilidade ao O_2 , a difusão de O_2 para os tecidos circundantes é mais eficiente ¹⁴⁶.

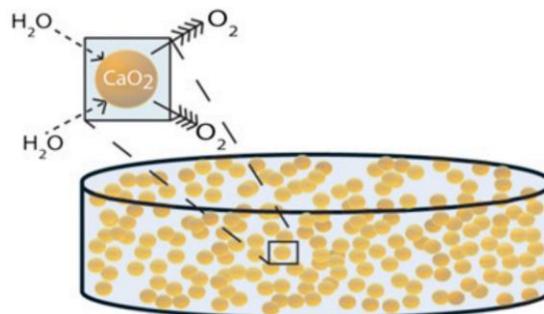


Figura 11 – Representação esquemática do material gerador de oxigênio, fabricado a partir de PDMS- CaO_2 . A difusão da água para o interior é evitada pela hidrofobicidade do PDMS, enquanto que o oxigênio, gerado via reação hidrolítica com o peróxido de cálcio, é rapidamente difundido para fora do PDMS. Adaptado da referência ¹⁴⁶.

O sistema tem potencial aplicação no transplante de células β para a *diabete mellitus* tipo 1, por estes requererem uma elevada dose de células e, conseqüentemente, grandes requisitos de oxigénio. Montazeri et al. (2016) propuseram também uma nova abordagem que pretende assegurar o sucesso da transplantação de ilhéus de Langerhans isolados, uma vez que este é um dos tratamentos mais promissores para a *diabete mellitus* tipo 1 ¹⁴⁷. A falta de oxigénio no período pós-transplantação pode levar à inviabilização da função e morte dos ilhéus, visto que os fatores angiogénicos libertados nesta fase são inadequados para estimulação da angiogénese. Neste estudo desenvolveram micropartículas com estrutura *core-shell*, cujo núcleo (*core*) é de polivinilporrilidona (PVP)/H₂O₂ e o revestimento de PLGA (*shell*), onde a enzima catalase é imobilizada (por forma a garantir a libertação controlada de oxigénio) (Figura 12) ¹⁴⁸.

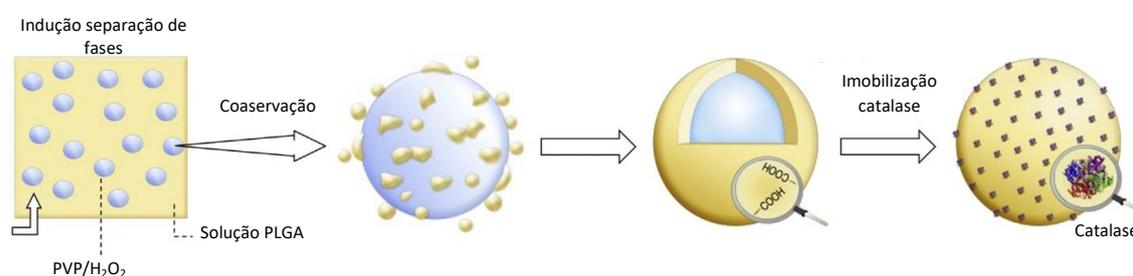


Figura 12 – Processo de produção das micropartículas do tipo *core/shell* por coaservação e imobilização da catalase na superfície. Adaptado da referência ¹⁴⁸.

Por forma a ocorrer estimulação simultânea da angiogénese, foi desenvolvido um *scaffold* compósito à base de colagénio com fibrina-heparina/VEGF imobilizada, que atua como sistema para libertação controlada do VEGF. A conjugação destes dois sistemas, *scaffold* e micropartículas, permitiu melhorar a taxa de sucesso do implante de ilhéus pancreáticos isolados de ratos Wistar em ratinhos B6NU. Os resultados positivos devem-se à revascularização e oxigenação observadas no local de implantação, que se traduzem na reversão da diabetes. Numa primeira instância foram realizados testes de citotoxicidade em células MIN6 (linha celular pancreática), para as quais se verificou estimulação da proliferação celular até 7 dias após incubação com o sistema.

No ramo da engenharia de tecido uretral, Lv et al. (2016) propõem um *scaffold* produtor de O₂ à base de um sistema que conjuga queratina humana, fibroína de seda, gelatina e peróxido de cálcio (CaO₂), sendo que as partículas de CaO₂ apresentam uma estrutura *core-shell* e a gelatina encontra-se a revestir estes núcleos, por deposição preferencial (Figura 13) ¹⁴⁹.

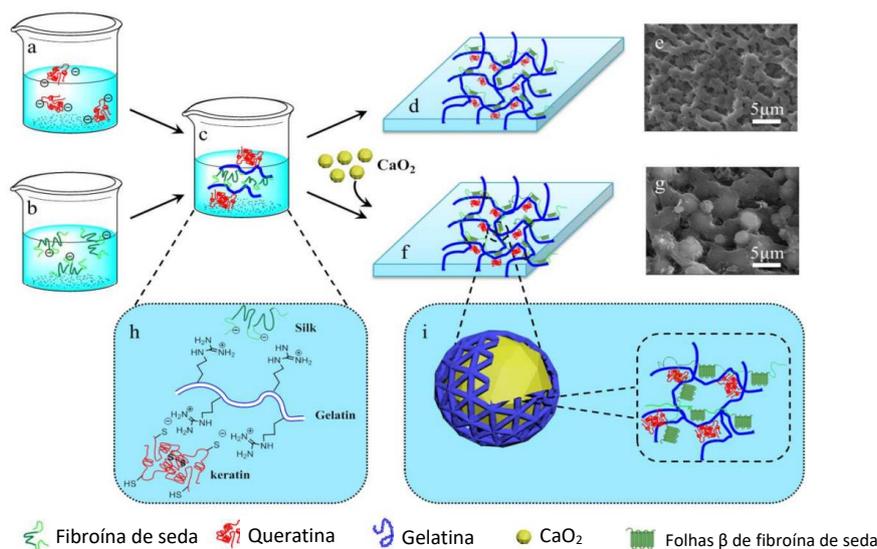


Figura 13 – Representação esquemática de um *scaffold* gerador de oxigênio à base de queratina e fibroína de seda. Adaptado da referência ¹⁴⁹.

Os testes *in vitro* com células de músculo liso de coelho mostraram que este *scaffold* liberta elevadas quantidades de O₂ ao longo de duas semanas e promove o crescimento celular. Os resultados preliminares apontam que este *scaffold* é indicado para reparação de defeitos no trato urinário.

Schenck et al. (2015), propõem uma abordagem mais revolucionária, incorporação uma solução de microalgas *Chlamydomonas reinhardtii* fotossintéticas num *scaffold* comercializado à base de colagénio (Integra matriz single layer – IM – Integra Life Science Corporation, USA) para regeneração da pele, na qual esta solução foi incorporada. Para inoculação de *C. reinhardtii*, a suspensão de algas foi misturada com fibrinogénio, esta solução foi posteriormente pipetada nos *scaffolds*. Os testes *in vivo*, com embriões de peixe zebra e posterior implantação do sistema fotossintético em ratos, permitiram confirmar que as algas não desencadeiam resposta imunológica e que as células sobreviveram 5 dias *in vivo*. No futuro, as algas poderão ser geneticamente modificadas, por forma a secretarem VEGF, estimulando simultaneamente a formação de novos vasos sanguíneos ¹⁵⁰.

São diferentes as abordagens propostas para diferentes tipos de *scaffolds* que têm por objetivo aumentar a disponibilidade de O₂ em diferentes contextos biológico. No entanto, estas soluções propostas carecem de otimização, nomeadamente modulação da libertação de O₂ ao longo do período de implantação.

3. Metodologias para avaliação *in vitro* da biocompatibilidade de materiais

Nas últimas décadas, tem sido grande a variedade de biomateriais desenvolvidos com diferentes propriedades físico-mecânicas, químicas e bioquímicas consoante a aplicação biomédica pretendida ¹⁵¹. A biocompatibilidade pode ser definida como “a qualidade de não ter efeito tóxico ou nocivo nos sistemas biológicos”. Mais recentemente, a definição do termo foi revista, sendo atualmente definida como “a capacidade de um material poder ser aplicado num hospedeiro e gerar uma resposta apropriada para a aplicação específica a que se destina. O material em si e os seus produtos de degradação não devem desencadear respostas inflamatórias, alérgicas, imunes, tóxicas, mutagénicas e carcinogénicas” ¹⁵². A biocompatibilidade dos biomateriais está intimamente relacionada com o comportamento das células quando em contacto com o material e, particularmente, com a adesão celular à superfície do mesmo ¹⁵³.

A avaliação da biocompatibilidade *in vitro* ocorre no exterior de organismos vivos e usa culturas de células ou extratos de tecido. As vantagens dos testes *in vitro* residem na boa reprodutibilidade, facilidade em determinar os grupos de controlo, velocidade, custo reduzido e evita complicações legais e éticas. As metodologias para avaliação da biocompatibilidade *in vitro* permitem o estudo da viabilidade e morfologia celular, e da expressão proteica como indicadores da diferenciação celular ^{154,155}. Nestes ensaios são utilizadas células humanas ou de outros mamíferos, após crescimento em placas de cultura, sob condições controladas ¹⁵⁶. As linhas celulares mais comumente utilizadas são fibroblastos de ratos (L-929, 3T3) ou células epiteliais humanas. Estas linhas celulares imortais são escolhidas por apresentarem um comportamento previsível, bem compreendido e consistente ¹⁵⁷. As células permanecem em cultura até ser formada uma monocamada de células, sendo o material a testar adicionado ao poço de cultura numa fase posterior. Terminado o período de incubação, a placa é examinada ao microscópio e as modificações morfológicas na linha celular são observadas. Por forma a avaliar os danos celulares, são normalmente utilizados corantes, uma vez que as células vivas tendem a metabolizar o corante, ao contrário das células que apresentam rutura membranar, indicador de morte celular.

A escolha do ensaio a realizar influencia a avaliação da citotoxicidade para todos os biomateriais. Outros parâmetros como a linha celular, controles positivos e negativos, tipo de ensaio de citotoxicidade e tempo de cultura têm de ser cuidadosamente selecionados aquando da avaliação da biocompatibilidade ¹⁵⁸. Adicionalmente, a escolha dos tipos celulares deverá ter em consideração a aplicação para a qual o material em estudo se destina. Por exemplo, as células de Schwann e linhas celulares de neuroblastomas são úteis para a determinação da citotoxicidade *in vitro* de materiais para regeneração nervosa ¹⁵⁹. As linhas celulares de osteoblastos fetais humanos e de osteossarcoma podem ser selecionadas para avaliação da compatibilidade de materiais para implantes ortopédicos ¹⁶⁰. Por sua vez, os queratinócitos e fibroblastos podem ser escolhidos para determinação da citotoxicidade de materiais desenvolvidos para tratamento/cicatrização de feridas ¹⁶¹.

Ao longo dos anos, estudos realizados por forma a analisar as diferentes metodologias disponíveis para avaliação da citotoxicidade de materiais, permitiram concluir que as metodologias que implicam procedimentos de contagem de células ou de colónias de células não são confiáveis, uma vez que pode ocorrer morte celular sem que haja alteração perceptível da morfologia da célula. Desta forma, a utilização de métodos que forneçam informação relativa a pontos de controlo do processo celular são aconselháveis, visto que também podem fornecer informação relativa à natureza da citotoxicidade ¹⁶². Por exemplo, o *stress* oxidativo pode ser monitorizado através de um produto fluorescente (ensaio DCF - diclorofluoresceína) gerado pela oxidação do substrato não fluorescente, 2',7'-diclorofluoresceína diacetato (H₂DCF-DA). Da mesma forma, ensaio colorimétricos como o MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difeniltetrazólio brometo) e LDH (lactato desidrogenase) monitorizam a atividade metabólica e a morte celular, tendo por base a redução de substratos capazes de absorver radiação para comprimentos de onda específicos ¹⁶³. Atualmente, os ensaios de citotoxicidade que detetam alterações da atividade metabólica são os mais aceites pela comunidade científica, uma vez que são capazes de detetar ligeiras reduções na viabilidade metabólica, o que se correlaciona com a capacidade de proliferação celular ¹⁶⁴. Na Tabela 4 são enumerados os ensaios para avaliação da citotoxicidade de biomateriais, respetivas vantagens e desvantagens.

Tabela 4 - Ensaios para avaliação da citotoxicidade, vantagens e desvantagens.

Ensaio	Vantagens	Desvantagens	Referência
Azul tripiano	Método simples e rápido capaz de fornecer resultados aproximados.	Trabalhoso, não permite distinguir entre células vivas e mortas quando a densidade celular é elevada. Fornece estimativas aproximadas.	165
MTT ¹	Fornecer uma curva dose-resposta precisa para número de células reduzido. Permite testar diferentes parâmetros em simultâneo. Simples e de elevada reprodutibilidade.	Inespecífico para células. Não há discriminação entre efeito citotóxico e citostático (quando uma substância ou processo interfere ou inibe a proliferação celular). Podem ocorrer interferência espectrais. Requer um passo adicional de solubilização. Eliminação do solvente orgânico.	166
MTS ²	Simples, rápido, flexível e não-radioativo. Protocolos estabelecidos e várias publicações que o apoiam.	Interferência química por parte dos agentes redutores. Apresenta uma sensibilidade de 1000 células para as placas de 96 poços. Requer entre 1-4 horas de período de incubação. Não consegue recolher valores de controlo correspondentes ao ponto inicial.	167,168
XTT ³	Medição num único ponto temporal. Solúvel em meio de cultura, adequado para uso com linhas celulares de células não-aderentes e aderentes.	Requer a presença de fenozinemetossulfato (PMS) para redução efetiva.	169
WST-1 ⁴	Não necessita de solvente orgânico para solubilização. Mais sensível que o MTT. Tempo de reação curto. Não é necessário proceder à lavagem ou extração de células para realização do ensaio. Desenvolvimento rápido da cor.	Mede a atividade metabólica das células. Específico para as células e meio de cultura.	170

¹ brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-y)-2,5-difeniltetrazólio

² 3-(4,5-dimetiltiazol-2-y)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H tetrazólio

³ 2,3-bis (2-metoxi-4-nitro-5-sulfofenil)-5-[(fenilamino)-carbonil]-2H tetrazólio) de sódio

⁴ 4-[3-(4-iodofenil)-2-(4-nitrofenil)-2H-5-tetrazólio]-1,3-benzeno dissulfonato

LDH (lactato desidrogenase)	Os resultados refletem a integridade da membrana. O reagente não danifica as células viáveis. Tem um tempo de meia vida longo. Pode ser conjugado com qualquer outro ensaio e é rápido (normalmente o período de incubação é de 10 minutos).	Não muito sensível. Contaminação do <i>background</i> devido ao uso de FBS na formulação do meio de cultura. Necessária adição de uma solução <u>stop</u> da reação.	171
NRU (vermelho neutro)	Muito sensível e imediatamente quantificável. É pelo menos duas vezes mais barato que todos os outros ensaios. Não usa reagentes instáveis, como requerido para os testes de viabilidade que usam sais de tetrazólio. Estimativa do número total de células por análise do conteúdo proteico.	Uma vez começado tem de ser terminado o mais rapidamente possível.	172
GSH (estiminação glutatona)	Não usa reagentes instáveis, como requerido para os testes de viabilidade que usam sais de tetrazólio. Estimativa do número total de células por análise do conteúdo proteico.	Uma vez começado tem de ser terminado o mais rapidamente possível.	173
AlamarBlue®	Eliminação dos passos de lavagem/fixação e extração. Incorporação de um indicador do crescimento celular colorimétrico ou fluorimétrico.	Técnica de contagem celular não direta. Para elevado número de células e tempos de cultura prolongados ocorre a reação inversa ao processo de redução	174

Os estudos *in vitro* representam uma das primeiras abordagens para avaliação da biocompatibilidade dos biomateriais e, por essa mesma razão, devem mimetizar o melhor possível o ambiente *in vivo*. Existem diferentes tipos e fontes de células, pelo que é possível adequar o estudo pretendido a tipos celulares específicos. Adicionalmente, existem diferentes modelos de cultura que têm por objetivo reproduzirem o melhor possível as condições experimentais às presentes *in vivo*. Consoante as características do material e resposta pretendida, existem diferentes testes que poderão ser realizados para avaliação da citotoxicidade/biocompatibilidade. A avaliação da resposta em modelos de cultura celular não consegue prever por si só a resposta a longo termo *in vivo*, devido às características do ambiente fisiológico, de referir: reatividade, degradação, cinética e dinâmica do mesmo. Portanto, torna-se clara a necessidade da avaliação da genotoxicidade e de diferentes efeitos, nomeadamente epigenéticos, carcinogénicos e imunogénicos, por forma a garantir o sucesso e a aceitabilidade clínica do material ¹⁷⁵.

4 Materiais e Métodos

Neste capítulo descrevem-se todas as etapas envolvidas no desenvolvimento das micro/nano cápsulas e das matrizes poliméricas sem e com incorporação de cápsulas. Estas irão ser incorporadas em meio de cultura celular ou em matrizes poliméricas de suporte ao crescimento celular.

Os produtos químicos utilizados nestes processos, bem como as técnicas de síntese e caracterização química, física e de avaliação citológica são também apresentados e detalhados. É importante referir que, por motivos de propriedade industrial da Universidade de Coimbra, alguns detalhes deste trabalho, como nomes de compostos, concentrações ou condições experimentais específicas, serão ocultados ou renomeados.

4.1 Materiais

Os materiais utilizados para a síntese de micro/nano cápsulas de sílica são apresentados na Tabela 5.

Tabela 5 - Reagentes utilizados para preparação das emulsões e das micro/nano cápsulas. Informações de interesse relativas aos mesmos.

Reagente	Pureza (%)	Fornecedor
Surfactante S1	-	Alfa Aesar
Surfactante S2	98,00	Sigma Aldrich
Surfactante S3	≥ 97	Anatrace
Tetraetilortosilicato (TEOS)	99,00	Sigma Aldrich
Hidróxido de sódio (NaOH)	≥ 99,99	Sigma Aldrich
Ácido clorídrico (HCl)	36,46	Pancreac Quimica
Trihexil(tetradecil)fosfónio bis(trifluorometilsulfonil) imida (CYPHOS IL 109 [®] , [P _{6,6,6,14}][NTf ₂])	98,60	Cytec
Sal orgânico	99,5	Sigma Aldrich

As membranas de diálise semipermeáveis (12-14 kD MWCO, Spectra/Por 4[®]) usadas foram adquiridas à Spectrum Labs.

O oxigénio (O₂; 99,999%) e o azoto (N₂; 99,999%) usados nos ensaios de sorção, para oxigenação e degaseificação, respetivamente, foram adquiridos à Praxair.

Na Tabela 6, encontram-se discriminados os reagentes utilizados para a síntese dos *scaffolds* para incorporação das micro/nano cápsulas de sílica:

Tabela 6 - Reagentes utilizados para preparação de matrizes poliméricas de suporte ao crescimento celular. Informações de interesse relativas aos mesmos.

Reagente	Propriedade	Fornecedor
Sal de alginato de sódio proveniente de alga castanha	Baixa viscosidade	Sigma Aldrich
Cloreto de cálcio dihidratado (CaCl ₂ .H ₂ O)	Pureza, ≥ 93%	Sigma Aldrich
Pluronic® F127	adequado a culturas celulares	Sigma Aldrich
Colagénio natural	d=1,023 g/mL	Fagron
Ácido hialurónico (HA)	Mw = 360 000 g/mol	Guinama
HEPES	Pureza, ≥ 99,5	Sigma Aldrich
<i>N</i> -(3-dimetilaminopropil)- <i>N'</i> -etilcarbodiimida hidrocloreto (EDC)	Pureza, ≥ 98%	Acros Organics
Sal de sódio <i>N</i> -hidroxisulfosuccinamida (sulfo-NHS)	Pureza, ≥ 98%	Sigma Aldrich
Acetona	reagente grau de laboratório	Fisher Chemical

Para os ensaios de citocompatibilidade *in vitro* dos reagentes e materiais desenvolvidos foram utilizados os seguintes reagentes presentes na Tabela 7:

Tabela 7 - Reagentes utilizados para realização dos ensaios de citotoxicidade e respetivo fornecedor.

Reagente	Fornecedor
Meio Eagle Modificado de Dulbecco (Dulbecco's Modified Eagle Medium), Mistura de nutrientes F-12 (Ham) - sem e com vermelho fenol	GIBCO®
Soro Fetal Bovino (FBS)	GIBCO®
L-glutamina	GIBCO®
Antibióticos (penicilina 10.000 UI/mL, estreptomicina 10.000 µg/mL) – <i>Pen Strep</i>	GIBCO®
Solução Salina Equilibrada de Hank (Hanks's Balanced Salt Solution - HBSS)	GE Healthcare Life Sciences - HyClone™
Tampão Fosfato Salino (PBS)	Sigma Aldrich
Tripsina-EDTA	Sigma Aldrich
Kit de Detecção de Citotoxicidade ^{PLUS} (LDH)	Roche
Reagente de Proliferação Celular (WST-1)	Roche

A citocompatibilidade *in vitro* dos materiais desenvolvidos foi avaliada com células fibroblastos BALB/3T3 (CCL-163, ATCC). Os frascos de cultura, de 75 e 175 cm², e as placas de 48 e 96 poços para realização dos ensaios celulares foram fornecidos pela Fisher Scientific.

Como mencionado anteriormente, por motivos de propriedade industrial certos produtos químicos usados não podem ser revelados, como é o caso dos co-surfactantes S1, S2 e S3, e do sal orgânico. Porém, pode-se indicar que os surfactantes S1 e S2 são não-iônicos, e o S3 é zwitteriônico.

As frases de Precaução e Perigo correspondentes a cada um dos reagentes utilizados neste trabalho encontram-se discriminadas no Anexo A.

4.2 Métodos de preparação e processamento

As formulações foram desenvolvidas, otimizadas e caracterizadas em 4 fases, que se encontram esquematizadas na Figura 14. Para obtenção do material final foram várias as etapas que são apresentadas de forma detalhada em cada um dos tópicos seguintes.

4.2.1 Preparação de emulsões dos sistemas em estudo

A emulsão preparada foi do tipo O/W (*oil-in-water*) e apresenta uma composição de surfactantes do tipo [S1:S2:0], sendo que foram estudadas duas proporções diferentes LI/[S1:S2:0] – formulação A e B. O meio disperso para os diferentes sistemas foi o LI [P_{6,6,6,14}][NTf₂].

A solução de surfactantes foi preparada com uma concentração compreendida entre 1 e 10 mM, à temperatura de 25 °C e com agitação de 300 rpm. A solução é deixada em agitação no *shaker* (Unitron 22013, HT Infors) durante a noite (aproximadamente 18 horas) por forma a garantir a completa dissolução dos surfactantes. Posteriormente, procedeu-se à incorporação da fase dispersa, LI, sem agitação adicional, sendo que a razão meio disperso/surfactantes apresenta um valor compreendido entre 1 e 20. A mistura foi emulsificada por aplicação de ultrassons e, devido ao facto deste processo libertar elevadas quantidades de energia, a mesma é arrefecida por um banho de gelo, evitando-se desta forma o sobreaquecimento e garantindo a homogeneização das condições de sonicação do sistema (Tabela 8).

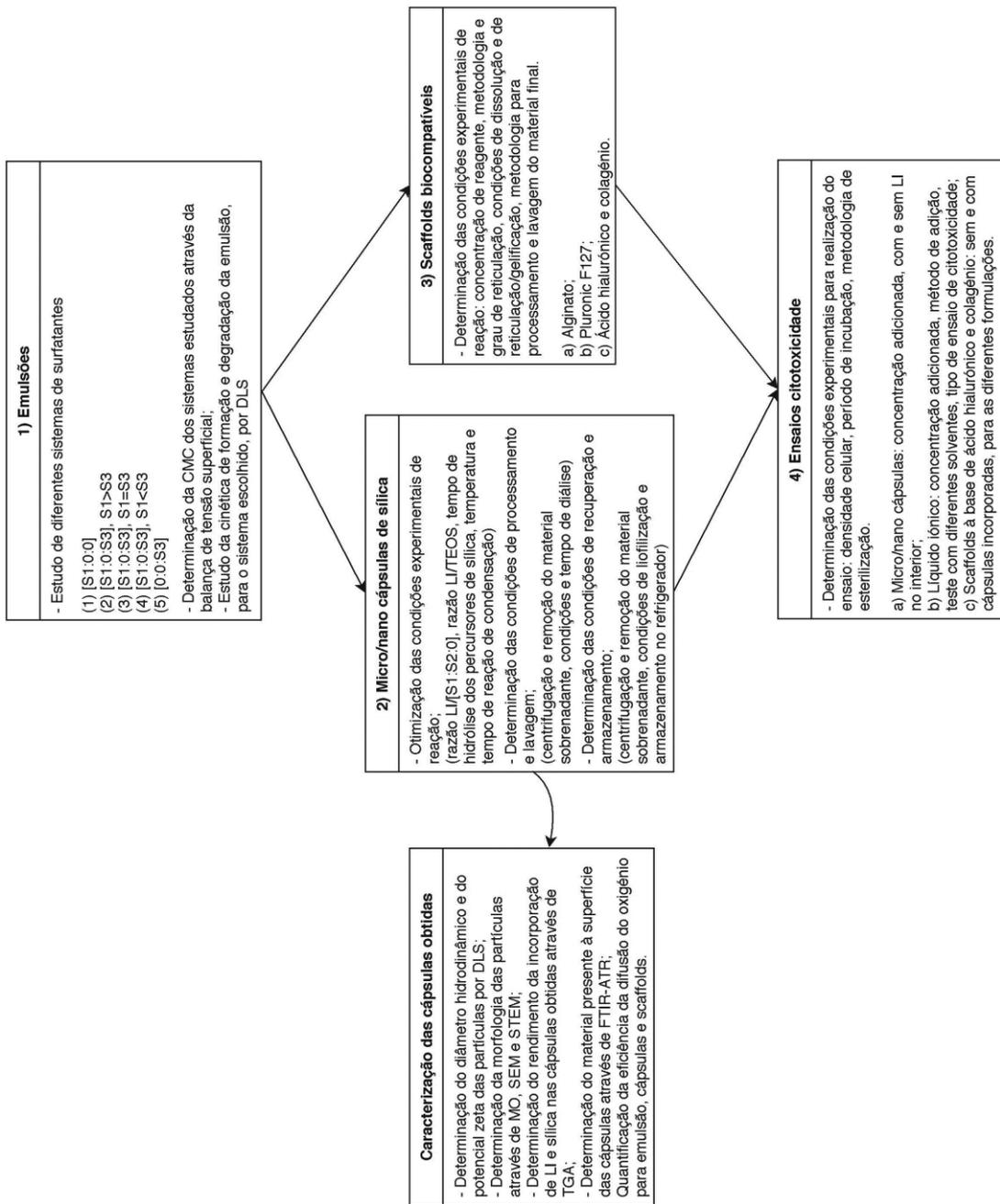


Figura 14 - Representação esquemática das diferentes etapas do trabalho desenvolvido.

Tabela 8 - Especificações do procedimento de emulsificação para o sistema estudado e para estudo das cinéticas de formação e degradação. (Nota: por motivos de propriedade industrial não são indicados os valores precisos estudados).

LI/[S1:S2:0]	
Concentração molar de surfactantes (mM)	Valor entre 1 e 10
Razão meio disperso/surfactantes (mol/mol)	Valor entre 1 e 20, sendo que a razão da formulação A é superior à da B
Volume de meio contínuo adicionado pré-emulsificação (mL)	Valor entre 0,1 e 2
Característica da sonda de ultrassons	<ul style="list-style-type: none"> ● 750 W, 20 kHz, Sonics Vibra-cell, sonda macrotip (12,7 mm de diâmetro), pulsada, amplitude 10-40%.
Cinética de formação	<ul style="list-style-type: none"> ● Análise DLS de amostras recolhidas de 5 em 5 minutos entre os 5 e 30 minutos de sonicação; ● Temperatura de câmara 25 °C, tempo de estabilização 60 segundos, 5 repetições por medição, modelo de análise CONTIN.
Cinética de degradação	<ul style="list-style-type: none"> ● Análise DLS após 24, 48 e 72 horas; ● Temperatura de câmara 25 °C, tempo de estabilização 60 segundos, 5 repetições por medição, modelo de análise CONTIN.

4.2.2 Preparação micro/nano cápsulas usando um método sol-gel em meio aquoso

O método sol-gel em meio aquoso foi a metodologia selecionada para preparação das micro/nano cápsulas de sílica contendo LI, por reações de hidrólise e condensação. De seguida apresenta-se uma esquematização do procedimento experimental efetuado (Figura 15).

Com a informação recolhida nas etapas que antecederam a produção das cápsulas, isto é, métodos de caracterização aplicados à emulsão, os dois sistemas desenvolvidos foram emulsificados.

Após o processo de emulsificação da mistura, seguiu-se a preparação da solução de TEOS em condições ácidas (de concentração pré-estabelecida) juntamente com a adição controlada de um catalisador ácido (HCl, 0,5 M) à emulsão, em condições de pH adequado. Os sistemas reagiram durante 60-70 minutos, após este intervalo de tempo e após confirmação da dissolução do TEOS em meio ácido, esta solução foi adicionada gota-a-

gota à emulsão acidificada. Seguiu-se a adição de uma quantidade pré-determinada do sal orgânico, que tem como principal função a redução da velocidade de reação de condensação, sendo possível a obtenção de partículas mais uniformes e a redução do efeito de agregação entre as mesmas ^{176,177}.

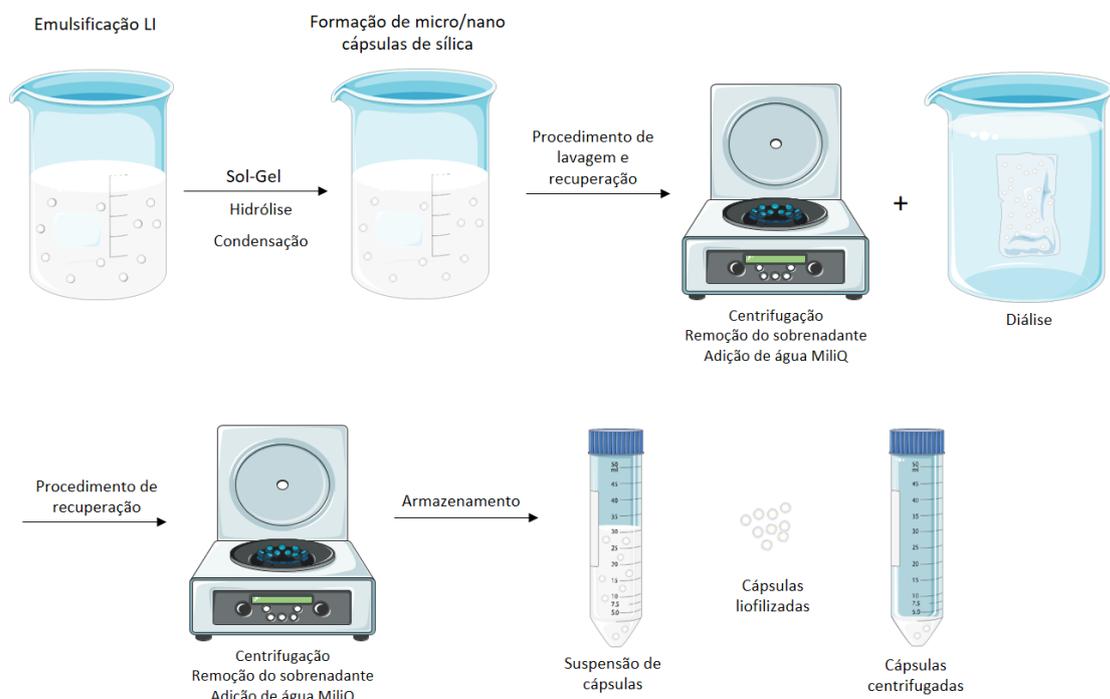


Figura 15 - Metodologia para obtenção das micro/nano cápsulas.

Por último, por forma a promover a reação de condensação ajustou-se o pH da reação com uma solução básica (NaOH, 0,5 mM). A reação de condensação tem uma duração de 6 horas sob agitação de 1200 rpm, à temperatura de 40 °C. Nas diferentes etapas do processo de obtenção de cápsulas, as variáveis temperatura e pH foram controladas, com o objetivo de assegurar a reprodutibilidade do mesmo.

Finalizada a reação de condensação segue-se a lavagem das nc/Si-LI, sendo esta etapa essencial para remoção do excesso de surfactantes e de TEOS que não tenham reagido. Começou-se por centrifugar a suspensão de nc/Si-LI (HERMLE Z366, Labortechnik) a 3000 rpm por 5 minutos, recolheu-se o sobrenadante e adicionou-se água bi-destilada, tendo este passo sido repetido. Posteriormente, as nc/Si-LI foram ressuspendidas por agitação mecânica e a solução transferida para 2 membranas de diálise imersas num banho de água destilada, renovada a cada 2 horas, sob agitação suave com o objetivo de promover a lavagem das cápsulas. Este procedimento teve a duração de 72 horas.

Por último, a suspensão de nc/Si-LI contida em cada membrana foi transferida para um tubo de falcon e centrifugada a 3000 rpm durante 3 minutos, seguida de outra centrifugação a 5000 rpm durante 5 minutos, tendo os tubos de falcon permanecido, posteriormente, em repouso durante mais 5 minutos. Após este período de tempo, o sobrenadante foi removido, e adicionou-se água mili-Q, por forma a perfazer um volume total de 10 mL. Após esta etapa recolheu-se uma alíquota de amostra para análise termogravimétrica (TGA). As suspensões de nc/Si-LI foram armazenadas no refrigerador a ± 4 °C.

Tendo em vista a otimização do armazenamento das nc/Si-LI, considerou-se a liofilização das mesmas por forma a serem guardadas secas após este processo. Caso fossem necessárias bastaria resuspendê-las. Este procedimento tinha também como objetivo a agilização do manuseamento das nc/Si-LI, quer para as técnicas de caracterização, que se seguiram, como também para a posterior incorporação nas matrizes poliméricas desenvolvidas. Para liofilização da suspensão de nc/Si-LI, começou-se por congelar as amostras a -80 °C no liofilizador durante 1 hora (devido ao facto do ponto de fusão do LI ser de -50 °C), garantindo-se desta forma que este congela e não é extraído do interior das nc/Si-LI aquando da liofilização¹⁷⁸. Porém, existem alguns riscos associados ao congelamento rápido das amostras, nomeadamente a possível fragilização ou rutura da cápsula de sílica formada em torno do LI.

A síntese para cada uma das formulações estudadas foi repetida, quer para otimização de ambos os sistemas em estudo, quer para obter quantidade suficiente de material para os métodos de caracterização e avaliação que se seguiram.

4.2.3 Preparação de matrizes poliméricas para suporte ao crescimento celular

Alginato de sódio e *Pluronic*s

Inicialmente, começou-se por desenvolver matrizes à base de alginato, devido ao seu fácil manuseamento e por ser um conhecido material biocompatível. Porém, apesar desta característica e das propriedades mecânicas promissoras associadas às mesmas, as células não proliferam neste tipo de matrizes, sendo apenas apropriadas para imobilização celular^{179,180}. Também se produziram matrizes à base de *Pluronic*s, por serem termosensíveis, hidrofílicos, apresentarem baixa toxicidade e criarem um microambiente que estimula a adesão celular, o que os torna em materiais bastante interessantes para

aplicações *in vivo*. No entanto, estas não possuem macroporosidade adequada, apresentam fraca estabilidade mecânica e reduzida estabilidade e integridade em meio aquoso^{181–183}. Estas são, portanto, apropriadas como meio para administração das cápsulas, mas não como estrutura de suporte ao desenvolvimento celular e de tecidos.

O procedimento experimental desenvolvido para produção de cada uma destas matrizes apresenta-se no Anexo B.

Ácido hialurónico e colagénio

Com base na pesquisa bibliográfica, foram desenvolvidas novas matrizes poliméricas à base de ácido hialurónico e colagénio, nas quais se conjugaram estes dois polímeros conhecidos pela sua biocompatibilidade, imunoneutralidade, biodegração controlável e por estimularem a migração e divisão celular, uma vez que são constituintes naturais dos tecidos^{184–186}. Por forma a estabilizar a estrutura destes polímeros, o *scaffold* foi reticulado com EDC (*N*-(3-dimetilaminopropil)-*N*'-etilcarbodiimida hidrocloreídico) e sulfo-NHS (sal de sódio *N*-hidroxisulfosuccinamida), através do estabelecimento de ligações entre os grupos carboxílico do ácido hialurónico e os grupo amina do colagénio, representadas na Figura 16^{187,188}. As condições de síntese, processamento e lavagem foram sendo otimizadas ao longo do tempo.

Foram preparadas duas formulações para a matriz polimérica: (1) HA 2% m/v + colagénio 4% m/v; (2) HA 4% m/v + colagénio 2% m/v, sendo que estas composições foram adaptadas do trabalho realizado pela aluna Mathie Najberg a realizar Doutoramento da Universidade de Angers em colaboração com a Universidade de Santiago de Compostela.

A solução de ácido hialurónico foi preparada por dissolução no *buffer* HEPES ($C_{\text{Hepes}} = 20 \times 10^{-3}$ M, $C_{\text{NaCl}} = 0,15$ M, pH = 7,4) num frasco de 20 mL com agitador magnético (700 rpm). A solução permaneceu em agitação durante a noite por forma a garantir a dissolução completa do polímero. Seguidamente, procedeu-se à adição do volume pré-determinado de colagénio à solução de ácido hialurónico, sem retirar a agitação (700 rpm). Após dissolução completa dos polímeros (durante 24 horas a 25 °C) adicionaram-se os agentes de reticulação, EDC e o sulfo-NHS, sendo que para garantir a homogeneização da solução, devido à viscosidade característica da mesma, utilizou-se uma seringa (volume total de 5 mL) que, posteriormente, serviu para distribuir a solução pelos poços de uma placa de cultura de 96 poços. Este procedimento assegura que as matrizes

poliméricas produzidas apresentam dimensões adequadas, para serem, posteriormente, colocadas nas placas de 48 poços utilizadas para realização dos ensaios de citotoxicidade.

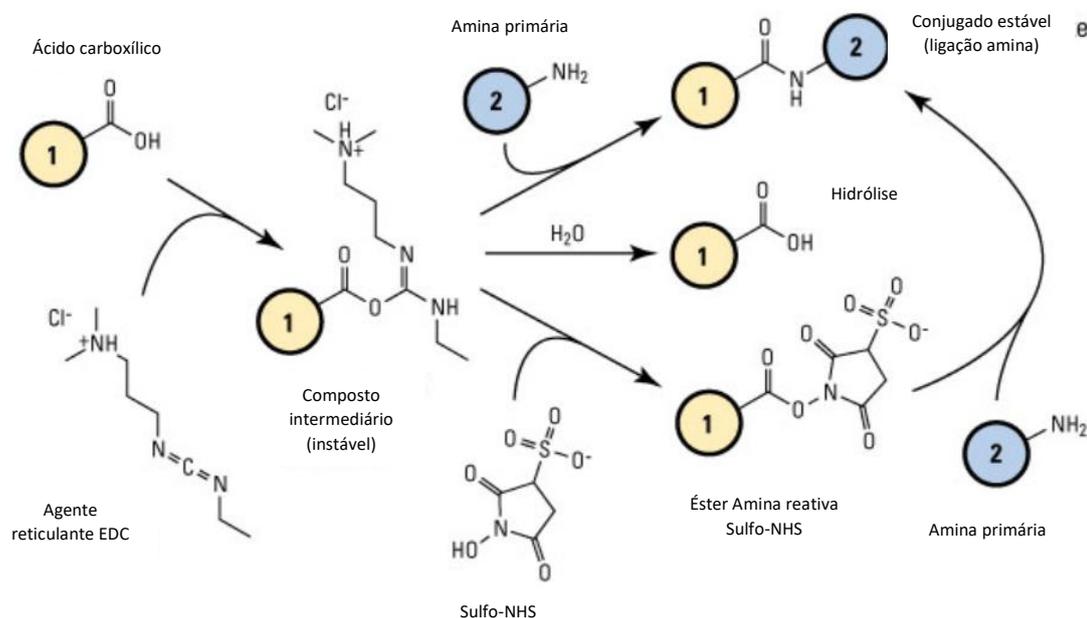


Figura 16 - Esquema da reação de reticulação por combinação de EDC e sulfo-NHS. Adaptado da referência ¹⁸⁹.

As formulações, concentração dos agentes reticulantes e tempo de reticulação para os *scaffolds* desenvolvidos são apresentados na Tabela 9.

Tabela 9 - Concentrações testadas de agentes reticulantes EDC e sulfo-NHS para duas formulações de matrizes poliméricas, com períodos de reticulação de 15 e 72 horas.

	C_{EDC} (mg/mL)	$C_{\text{sulfo-NHS}}$ (mg/mL)
(1) HA + colagénio (EDC-NHS) _A – 1A	5	1,8
(1) HA + colagénio (EDC-NHS) _B – 1B	7,5	2,7
(2) HA + colagénio (EDC-NHS) _A – 2A	5	1,8
(2) HA + colagénio (EDC-NHS) _B – 2B	7,5	2,7

A placa foi coberta com *parafilm* e armazenada no frigorífico a 4 °C, onde decorreu a reação de reticulação. A reação de reticulação foi testada para dois tempos distintos: 15 horas e 72 horas. Posteriormente, os géis foram congelados a -20 °C durante 24 horas e, seguidamente, liofilizados no liofilizador (Telstar[®], Lyoquest) a -70 °C e 0.01 mBar, durante 24 horas. O procedimento de síntese das matrizes encontra-se esquematizado na Figura 17.

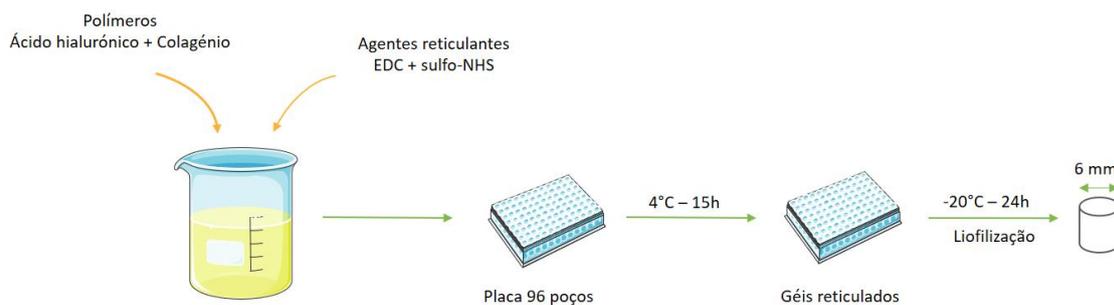


Figura 17 - Esquemática do procedimento experimental para preparação das matrizes poliméricas de ácido hialurônico e colagénio.

Matrizes à base de ácido hialurônico e colagénio com incorporação de cápsulas

Para a incorporação das nc/Si-LI na matriz foram testadas duas metodologias distintas: por pipetagem no interior da matriz de uma solução de meio de cultura contendo nc/Si-LI dissolvidas ou por incorporação das mesmas à mistura polimérica antes da adição do agente reticulante.

A solução de ácido hialurônico e colagénio (não-reticulada) foi preparada segundo o procedimento descrito na secção anterior, manteve-se o mesmo tempo de reação, condições de agitação e temperatura. Antes de se proceder à fase final da sua síntese, foi adicionada uma determinada quantidade de cápsulas. As quantidades de cápsulas incorporadas testadas foram: 0,001, 0,1, 1, 30 e 60% wt., em relação ao peso total das matrizes após liofilização.

A mistura permaneceu em agitação durante 3 horas para favorecer a distribuição homogénea das nc/Si-LI na matriz polimérica.

4.3 Caracterização de emulsões

Concentração micelar crítica para distintos sistemas de surfactantes

A concentração micelar crítica (CMC) das misturas de surfactantes foi determinada a partir de valores de tensão superficial de solução de surfactantes usando uma balança de tensão superficial (Sigma70, KSV Instruments) e o método do anel de du Noüy. Por forma a completar o trabalho iniciado pelos alunos Sylvia Sousa, Cláudia Buga e Gustavo Marques foram estudadas cinco composições relativas de surfactantes em solução aquosa: (1) [S1:0:0] ($S_{1,1}:S_{2,1}:S_{3,1}$); (2) [S1:0:S3], $S1 > S3$ ($S_{1,3}:S_{2,3}:S_{3,3}$); (3) [S1:0:S3], $S1 = S3$ ($S_{1,5}:S_{2,5}:S_{3,5}$); (4) [S1:0:S3], $S1 < S3$ ($S_{1,7}:S_{2,7}:S_{3,7}$); (5) [0:0:S3] ($S_{1,8}:S_{2,8}:S_{3,8}$).

Para cada um dos sistemas a estudar foram preparadas diferentes soluções em que se manteve a proporção de surfactantes e se alterou a concentração molar por diluições sucessivas. As concentrações molares a avaliar variaram entre 6 e 0,005 mM, o que permite obter uma curva que traduz a variação da tensão superficial em função da concentração molar de surfactantes. Posteriormente, determinaram-se os valores de CMC tendo por base as metodologias descritas na literatura.

Antes de se proceder à aquisição das medições para determinado sistema é realizada a calibração do sistema com água bi-destilada. A aquisição de dados teve uma duração compreendida entre 30 minutos e 6 horas, até o sistema atingir um valor estável de tensão superficial, sendo que o critério utilizado para determinar o ponto de paragem da aquisição foi que os 10 últimos valores medidos apresentassem um desvio padrão inferior a $\pm 1\%$. Por forma a evitar que as impurezas presentes na água bi-destilada influenciassem as medições, a água bi-destilada usada para a calibração e preparação das soluções foi previamente filtrada por um filtro de poli/tetrafluoroetileno (PTFE, 0.45 μm).

No Anexo C1 encontram-se os dados obtidos para os diferentes sistemas de surfactantes testados pelos elementos do grupo de investigação GSP da Universidade de Coimbra.

Cinética de formação e degradação da emulsão selecionada para este trabalho

Os estudos cinéticos relativos à formação e estabilidade da emulsão permitiram aferir qual o tempo de exposição aos ultrassons mais indicado para emulsificação de cada uma das formulações em análise. Para tal procedeu-se à recolha de 6 amostras de 1,2 mL, espaçadas de 5 minutos entre si ao longo de 30 minutos totais de exposição da emulsão aos ultrassons. Após recolha das alíquotas estas foram analisadas pelo método de difusão de luz dinâmica (Zetasizer Nano Range, Malvern). As mesmas alíquotas foram armazenadas para estudo da estabilidade da emulsão, tendo sido analisadas novamente no DLS às 24, 48 e 72 horas.

Relativamente ao tratamento dos dados adquiridos, para cada conjunto de 5 medições efetuadas foram eliminadas as que apresentavam grandes erros e apenas foram analisados os valores do pico médio, pois é o mais representativo da amostra. No Anexo B2 apresentam-se os resultados obtidos pelo grupo GSP para diferentes formulações de emulsões através das duas metodologias do *Zetasizer*^{190–193}.

4.4 Caracterização físico química das micro/nano cápsulas

Dynamic Light Scattering e Potencial Zeta

A técnica DLS permitiu avaliar o diâmetro hidrodinâmico das nanocápsulas. No mesmo aparelho foi também obtido o potencial zeta, sendo este último responsável por fornecer informação acerca do potencial elétrico gerado na superfície das partículas, na zona apelidada de dupla camada elétrica. De referir que o valor absoluto do potencial zeta é indicador da estabilidade do sistema coloidal, isto é, quanto maior for o seu valor maior será a repulsão das partículas do sistema e, conseqüentemente, ocorre redução da agregação/floculação entre as partículas. De acordo com a literatura, as suspensões coloidais são consideradas estáveis para valores de potencial zeta superiores a + 30 mV ou inferiores a -30 mV ^{191,194}.

As partículas foram analisadas em pontos-chave do seu processo de obtenção, nomeadamente: 1) após emulsificação do LI; 2) após hidrólise do co-precursor de sílica; 3) após adição do TEOS hidrolisado à mistura; 4) após adição do sal orgânico; 5) após o aumento do pH da emulsão; 6) após reação de condensação; 7) após diálise. As condições de análise aplicada a estas amostras são iguais às descritas na Tabela 8, previamente apresentada.

Microscopia de Varrimento Eletrónico e Microscopia de Varrimento Eletrónico por Transmissão

A morfologia das nc/Si-LI foi avaliada por microscopia ótica, SEM e STEM (Gemini ULTRA PLUS, Zeiss). O SEM foi efetuado para a voltagem de 3 kV e revestimento de irídio com a espessura de 10 nm (o revestimento foi feito por um equipamento específico (Q150T S, Quorum) e o processo teve a duração de 10 minutos). Neste caso, analisaram-se cápsulas em suspensão aquosa evaporadas às condições PTN para as ampliações de 100K, 150K e 300K; e amostras liofilizadas ressuspendidas para as ampliações de 1K, 20K e 30K. As amostras a analisar foram previamente colocadas sobre discos de silício (ANAME) por forma a melhor adsorver as nc/Si-LI e aumentar o contraste.

O STEM foi realizado para nc/Si-LI não-liofilizadas. O procedimento de preparação da amostra encontra-se descrito no Anexo D. Para esta técnica de imagiologia, começou-se por homogeneizar a amostra no vortex, durante 30 segundos. De seguida, uma gota de cada amostra foi colocada na superfície das grelhas metálicas e deixada a secar durante 2 minutos em condições PTN. Com papel de filtro removeu-se cuidadosamente o

excesso, virou-se a grelha ao contrário e adicionou-se uma gota de uma solução de ácido fosfórico a 2% m/v, agente de contraste para compostos orgânicos, e deixou-se reagir durante 10 minutos. Após esta etapa, a amostra ficou pronta a ser analisada. No caso do STEM a voltagem aplicada foi de 20 kV e as imagens adquiridas para as ampliações de 20K, 25K, 30K, 50K, 100K e 150K.

Análise Termogravimétrica

A análise termogravimétrica (TGA) foi realizada para amostras das formulações de nc/Si-LI em suspensão e liofilizadas usando um equipamento Q600 da TA Instruments. As amostras foram estudadas para temperaturas no intervalo de 25 a 600 °C, a uma taxa de aquecimento de 10 °C/min e sobre uma atmosfera de azoto à taxa de 100 mL/min, para quantificação relativa dos compostos presentes nas nc/Si-LI (LI e sílica) e cálculo do rendimento da incorporação dos mesmos.

A mesma análise foi realizada para alíquotas (0,5 mL) das suspensões de cápsulas usadas para os ensaios de sorção e libertação de O₂, tendo por objetivo o conhecimento da concentração efetiva de nc/Si-LI em cada suspensão utilizada para o ensaio.

Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier

As amostras de nc/Si-LI liofilizadas foram estudadas através de FTIR (FT-NIR/MIR, PerkinElmer), por sistema de refletância (ATR) com uma resolução de 4 cm⁻¹ e 128 acumulações entre 4000 e 500 cm⁻¹. Com a realização deste ensaio pretendeu-se analisar os compostos presentes à superfície das nc/Si-LI, por forma a avaliar-se se as modificações efetuadas ao procedimento de produção de nc/Si-LI foram as apropriadas para evitar a lixiviação de LI para a superfície e exterior da nanocápsula. Os resultados obtidos foram comparados com os espetros de FTIR para amostras de LI e sílica. Estas últimas análises foram efetuadas no FTIR (FT/IR, Jasco), em que os dados foram obtidos com uma resolução de 4 cm⁻¹ e 128 acumulações entre 4000-400 cm⁻¹.

4.5 Caracterização dos *scaffolds* à base de ácido hialurónico e colagénio

Swelling

Os ensaios de *swelling* em PBS foram realizados para todas as formulações de matrizes, sem e com incorporação de cápsulas. As amostras secas foram pesadas e imersas em PBS, e colocadas na estufa (DIN 12880 3.1, Heraeus) a 37 °C. Em intervalos de tempos regulares (1 hora) cada amostra foi novamente pesada, após ter sido retirado, cuidadosamente, o excesso de água com papel de filtro. A percentagem de *swelling* (S) foi calculada através da seguinte expressão:

$$S (\%) = \frac{m_t - m_i}{m_i} \times 100 \quad (5)$$

onde m_t é a massa da amostra no tempo de medição t e m_i a massa da amostra seca. Foram realizadas medições em triplicata para cada amostra.

Microscopia de Varrimento Eletrónico

O efeito das nc/Si-LI no processo de reticulação, bem como a distribuição das mesmas foram avaliados por SEM (Gemini ULTRA PLUS, Zeiss). Para tal analisaram-se *scaffolds* sem e com nc/Si-LI incorporadas para a voltagem de 5 kV e revestimento de irídio com 10 nm de espessura. Neste caso, foram obtidas imagens da estrutura interna e externa dos *scaffolds* para as ampliações de 1K, 2K, 100K, 200K e 500K.

4.6 Ensaios de citotoxicidade

Os procedimentos realizados respeitam o protocolo de teste de contato direto ISO-10993-5:1999¹⁹⁵.

Cultura de células

O tipo de células utilizado para realização destes ensaios foram fibroblastos, tendo-se iniciado uma cultura de Balb/3T3. Estas células encontravam-se armazenadas num congelador de temperatura ultra-baixa (MDF-1156 A TN, Sanyo), a -149 °C. A densidade celular de cultura adequada para os frascos de 75 cm² é de, aproximadamente, 750K células, pipetou-se 1 mL da solução de células para um frasco de cultura de 75 cm² que continha

11 mL de meio de cultura indicado para o tipo de células escolhido, DMEM/F-12 completo. O procedimento de preparação do meio de cultura encontra-se descrito no Anexo E

Este tipo de células atinge uma confluência de 80% em aproximadamente 4 dias, pelo que após este período de tempo é necessário tripsinizar as células podendo realizar-se um ensaio ou apenas transferi-las para um novo frasco de cultura (Figura 18). O meio de cultura das células necessita de ser trocado a cada 2 dias para garantir que têm acesso a nutrientes e sais, e que os metabolitos da sua atividade são eliminados ¹⁹⁶.

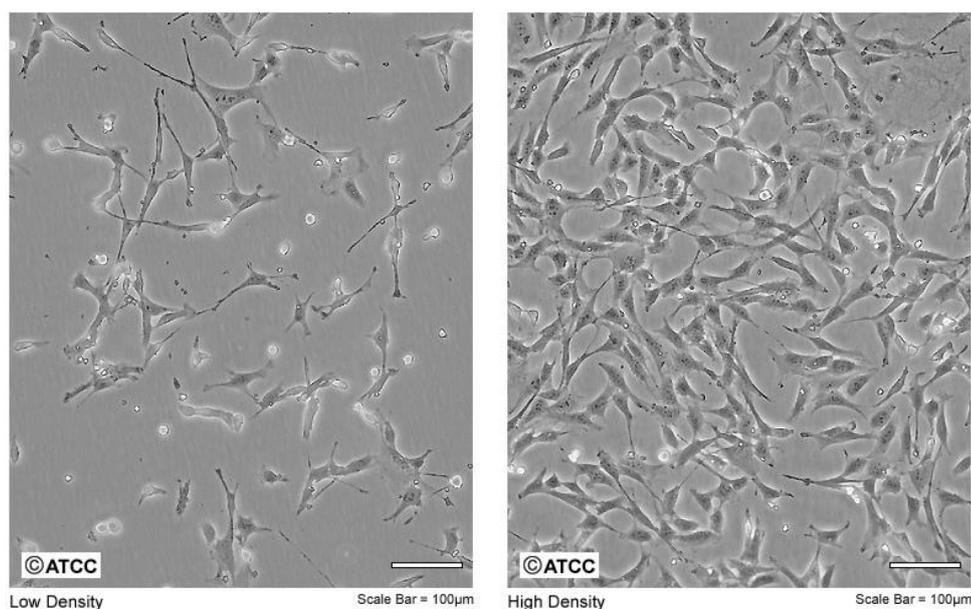


Figura 18 - Micrografia celular das células Balb/3T3 para a) baixa densidade e b) elevada densidade ¹⁹⁷.

Tripsinização de células

O processo de tripsinização das células, que antecede a realização de um ensaio de citocompatibilidade, começa com a retirada do frasco da cultura de células da incubadora (INE 500, Memmeter) e posterior colocação na hotte de fluxo vertical (DIN 12960, CleanAir) ou horizontal (SMH-100, Telstar), onde se realizam as etapas que se seguem. O primeiro passo consiste em remover o meio de cultura contido no frasco e adicionar 10 mL PBS (1X) para lavagem, seguindo de agitação mecânica do frasco durante 5 minutos para garantir a dissolução de metabolitos celulares e outros compostos, evitando o estabelecimento de ligações inespecíficas da tripsina. Após 5 minutos, removeu-se o PBS e adicionou-se 5 mL de tripsina-EDTA, o frasco de cultura é fechado e levado novamente para a incubadora onde permanece durante 2 minutos, sendo esta etapa essencial para garantir que as células aderidas passam a estar em suspensão para que se possa trabalhar com as mesmas. O frasco é de seguida observado ao microscópio ótico (T5100, Nikon

Eclipse) para verificar se ainda existem células aderidas. Para que a reação de tripsinização termine (de referir que caso a etapa anterior se prolongue pode ocorrer morte celular), pipetam-se 7 mL de meio de cultura para o frasco e procede-se à homogeneização do seu conteúdo com a ajuda da pipeta, obtendo-se a suspensão de células.

A suspensão de células é transferida para um tubo de falcon de 15 mL e centrifugada (1.0R, Megafuge) a 1200 rpm durante 4 minutos. Após centrifugação, o sobrenadante é removido e as células ressuspendidas na alíquota de meio de cultura que permanece no tubo de falcon. Posteriormente, o volume contido no tubo de falcon é normalizado para 10 mL do qual se retiram 0,5 mL. Num copo de vidro, são adicionados 9,5 mL de solução isotónica e os 0,5 mL de suspensão de células, seguindo-se a homogeneização da mistura e a contagem das células no contador (Beckman Counter, Multisizer 3 Coulter Counter). O software do aparelho gera como resultado da análise da amostra um gráfico que apresenta uma distribuição normal, o valor de sigma indica o número de células por mL, o que permite determinar o volume necessário de suspensão para realização do ensaio. O número de células por mL de solução é obtido a partir da seguinte expressão:

$$No \frac{células}{ml} = sigma \times 20 \quad (6)$$

Para os ensaios realizados, a densidade celular foi de 10K células/poço, em placas de 48 poços, porque as células Balb/3T3 apresentam uma taxa de proliferação bastante elevada. Após realização dos cálculos e preparação da suspensão de células a colocar nos poços, segue-se a pipetagem de 300 µl (placas de 48 poços) ou 200 µl (placas de 96 poços) da suspensão em cada um dos poços e a adição dos controlos positivos e negativos. Para cada amostra testada foram realizadas triplicatas.

Ensaio WST-1 (micro/nano cápsulas, LI e sobrenadante)

As placas de cultura são armazenadas na incubadora durante 24 horas, por forma a garantir a formação de uma monocamada de células, na superfície do fundo do poço, sobre a qual se adiciona, posteriormente, o composto ou material a estudar. O período de incubação das células com o mesmo variou entre 24 e 72 horas. No ponto temporal em que se pretende aferir a viabilidade celular retira-se a placa de cultura da incubadora e remove-se o meio presente em cada um dos poços com a ajuda de uma bomba de vácuo (Millipore Vacuum Pump, XF54 230 50). Seguidamente, procede-se à adição da mesma quantidade de meio de cultura fresco e de 10% do volume total do poço em reagente WST-1 (30 e 20

µl, respetivamente). A homogeneização do volume do poço é feita com a pipeta. Finalmente, envolve-se a placa em papel de alumínio, por forma a evitar interferência da luz ambiente sobre os resultados, visto que o reagente utilizado é fotossensível, e armazenase na incubadora onde decorre a reação durante 3 horas.

Após o período de incubação com o reagente, a placa é retirada da incubadora e levada para a hotte onde se procede à transferência de 100 µl do conteúdo do poço da placa de 48 para uma placa de 96 poços (procedimento apenas realizado para a placa de 48 devido às características do equipamento de espectrofotometria). A placa é colocada no leitor de microplacas de ELISA (BioRad, Model 680) e a absorvância lida para 450 nm. O software do equipamento gera uma tabela com os valores de absorvância correspondentes a cada um dos poços. A viabilidade celular é estimada a partir da expressão:

$$Viabilidade\ celular\ (\%) = \frac{Abs_{amostra} - Abs_{branco}}{Abs_{controle} - Abs_{branco}} \quad (7)$$

sendo que $Abs_{controle}$ corresponde ao poço em que temos as células em meio de cultura.

Na Figura 19 apresenta-se esquematicamente o procedimento experimental para realização do ensaio WST-1.

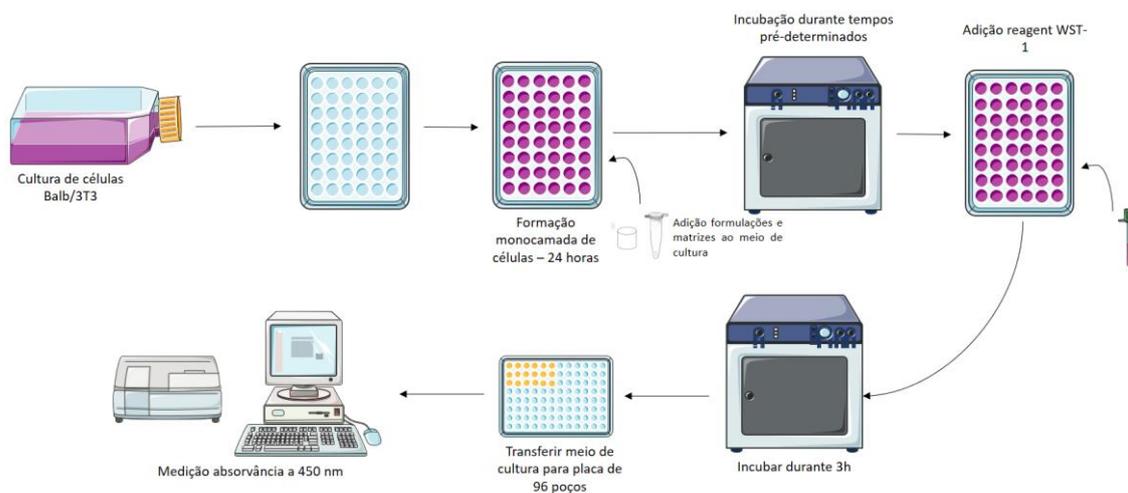


Figura 19 - Esquemática do procedimento experimental generalizado para realização do ensaio WST-1.

Ensaio WST-1 (scaffolds)

Após obtenção dos *scaffolds* por liofilização, estes foram preparados para realização do ensaio de citotoxicidade. As matrizes poliméricas foram colocadas em tubos de falcon de 50 mL e lavadas em solução de PBS com 2% de antibióticos (penicilina 10.000

UI/mL, estreptomicina 10.000 µg/mL) durante 4 horas (intervalo de tempo que garante a estabilização do seu volume/dimensão final), sob uma agitação orbital de 200 rpm e a uma temperatura constante de 37 °C. De seguida, a solução de lavagem foi trocada e substituída por outra nova, a duração desta etapa foi de 20 minutos, tendo a mesma sido repetida por duas vezes.

Finalizado o processo de lavagem, os *scaffolds* foram colocados nas placas de cultivo para realização do ensaio e armazenados na incubadora (INE 500, Memmeter) a uma temperatura de 37 °C com uma atmosfera de 5% de CO₂ e humidade relativa de 95%.

Antes de se proceder à adição da suspensão de células aos poços é removido o meio de cultura em que os *scaffolds* se encontravam. De seguida, procede-se à adição de 600 µl da solução de suspensão de células em meio de cultura sem vermelho fenol, com uma densidade de 10K células/poço.

Este ensaio decorre durante 72 horas, uma vez que o objetivo é verificar se as células aderem e proliferam no suporte polimérico desenvolvido. Após as 72 horas segue-se a adição do reagente WST-1, incubação durante 3 horas e posterior medição das absorvância no leitor de placas de ELISA, como descrito anteriormente.

Ensaio LDH

O protocolo experimental é idêntico ao descrito anteriormente, apenas difere na metodologia utilizada para aferição da viabilidade celular. Após terminar o tempo de incubação das células com o LI, adicionou-se 8,25 µl de solução de lise no poço correspondente ao controlo positivo (meio de cultura + células), a placa foi colocada novamente na incubadora e deixada a reagir durante 15 minutos. Posteriormente, transferiram-se 100 µl de cada um dos poços da placa de 48 para a placa de 96. Preparou-se o reagente para o ensaio, adicionaram-se 60 µl da solução catalisadora a 2,7 mL da solução corante. Por fim, 100 µl desta solução foram adicionados a cada um dos poços da placa de 96. A placa foi novamente levada para a incubadora onde permaneceu durante 10 minutos. Após este período de tempo, a placa é colocada no leitor de microplacas de ELISA (BioRad, Model 680) e a absorvância lida para 490 nm. O software do equipamento gera uma tabela com os valores de absorvância correspondentes a cada um dos poços. A viabilidade celular é estimada a partir da expressão:

$$Viabilidade\ celular\ (\%) = \left(1 - \frac{Abs_{amostra} - Abs_{controlo-}}{Abs_{controlo+} - Abs_{controlo-}}\right) \times 100 \quad (8)$$

Para este ensaio foram seguidas duas abordagens tendo em conta referências na literatura. Nomeadamente, testaram-se as concentrações 1% e 5% v/v (LI adicionado diretamente ao meio de cultura), e também 0,01, 0,1 e 1% v/v (LI dissolvido previamente em HBSS).

Após preparação das soluções, seguiu-se a remoção do meio de cultura de cada um dos poços e adição de 300 µl das soluções de LI. Finalizado o tempo de incubação, procedeu-se à realização do ensaio de LDH como descrito anteriormente.

Os ensaios realizados permitiram obter informações sobre diferentes amostras: (1) nc/Si-LI, (2) LI puro; (3) *scaffolds* sem nc/Si-LI incorporadas; (4) *scaffolds* com nc/Si-LI incorporadas; (5) nc/Si, após remoção do LI por sucessivas lavagens com acetona; (6) sobrenadante nc/Si-LI; (7) MCM-41 (nanocápsulas de sílica mesoporosa). Para cada uma das amostras foram testadas diferentes concentrações e metodologias que se encontram discriminadas no Anexo F.

4.7. Quantificação da sorção/libertação de oxigénio para os sistemas desenvolvidos

Para realização dos ensaios de sorção recorreu-se ao sistema esquematizado na Figura 20, no qual foram testadas as nc/Si-LI, a emulsão de LI e os *scaffolds* à base de ácido hialurónico e colagénio com e sem nc/Si-LI incorporadas. A água serviu de referência para todas as amostras. Foram realizados dois tipos de ensaio distintos: oxigenação e desoxigenação, que permitem estudar a evolução da concentração de oxigénio (ppm) no meio aquoso onde as amostras são adicionadas.

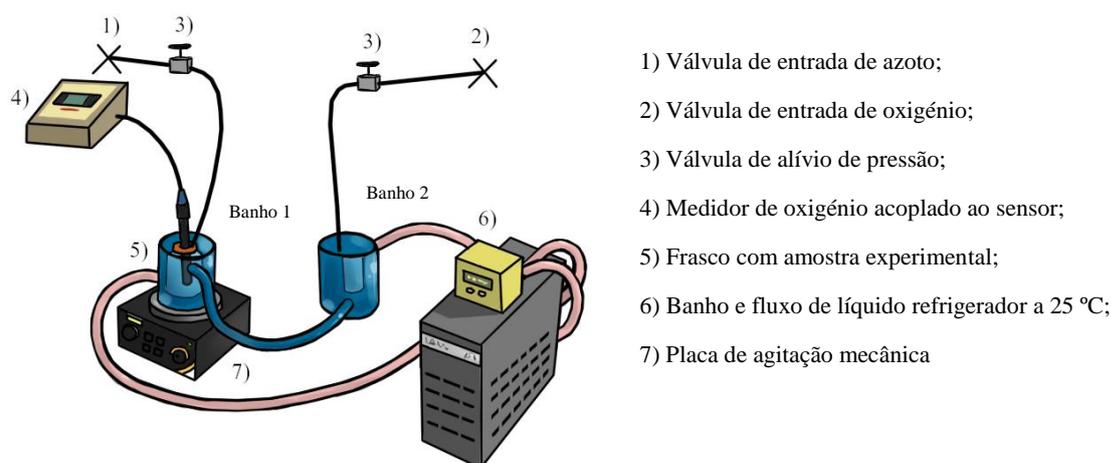


Figura 20 - Representação esquemática do sistema experimental para os ensaios de quantificação de sorção/libertação de oxigénio, e respetiva legenda.

Os ensaios realizados decorreram a uma temperatura controlada de 25 °C e com uma agitação constante de 300 rpm. As medições foram realizadas com o medidor de oxigénio (C3010, Consort), sendo que cada ensaio foi antecedido por uma calibração prévia.

O ensaio de oxigenação pretende analisar a difusão do O₂ do interior das amostras a testar para o meio envolvente, para a concentração de $V_{\text{inicial de água}} = 30 \text{ mL}$ e $V_{\text{amostra}} = 10 \text{ mL}$. O procedimento experimental foi efetuado de igual forma para cada material em estudo. O volume de amostra foi desgaseificado durante 1 hora (no banho 1) através de um fluxo contínuo de N₂ a 2 bar. Após garantir que o volume inicial de amostra (10 mL) a testar estava desgaseificado (~ 0 ppm), a válvula de N₂ foi fechada e a amostra a analisar transferida para o banho 2 onde se procedeu à oxigenação da mesma durante 1 hora com um fluxo contínuo de O₂, à pressão de 1 bar, saturando a amostra. Simultaneamente, procedeu-se à desgaseificação dos 30 mL de água. Após 1 hora fecharam-se ambas as válvulas, O₂ e N₂, e com a ajuda de uma seringa (de volume 20 mL) adicionou-se o volume

de amostra inicial gaseificada (contido no vial) ao frasco *Schott* que contém o volume de água desgaseificado. Desta forma, é possível analisar a evolução da concentração de O₂ no meio por consequência da adição da amostra. Uma vez que se parte do princípio de que as cápsulas têm a capacidade de absorver gases, nomeadamente O₂, deverá ser observado um aumento da concentração de O₂ disponível no sistema, comparativamente ao sistema de referência.

Por sua vez, o ensaio de desoxigenação tem como objetivo a quantificação da capacidade de sorção de O₂, proveniente da água saturada para o meio, para cada uma das amostras em estudo, sendo que a concentração testada foi igual à do ensaio de oxigenação e o procedimento experimental efetuado para cada uma das amostras. Começou-se por desgaseificar 30 mL de água durante 1 hora, com um fluxo contínuo de N₂ a 2 bar, após desgaseificação da amostra (~ 0 ppm) fechou-se a válvula de N₂. De seguida, procedeu-se à abertura da válvula de O₂, à pressão de 1 bar, com o objetivo de oxigenar o meio aquoso previamente desgaseificado. Quando o valor de concentração de O₂ medido pelo sensor é de aproximadamente 2 ppm a válvula de O₂ é fechada, e o sistema tende novamente para o equilíbrio após atingir um máximo correspondente à saturação do sistema. Os valores lidos pelo sensor foram gravados até o sistema atingir novamente o equilíbrio (~ 8,3 ppm). Simultaneamente, procedeu-se à desgaseificação da amostra que se pretende estudar com um fluxo contínuo de N₂, sendo que este procedimento teve a duração de 1 hora. Quando o sistema atingiu o equilíbrio (~8,3 ppm), adicionou-se os 10 mL de amostra desgaseificada com ajuda de uma seringa. Com este ensaio, pretende-se estudar a evolução da concentração de O₂ no meio e assim obter informação acerca da capacidade que o material testado tem para a captação de gases, esperando-se observar uma diminuição na concentração de O₂ disponível no sistema.

Após obtenção de resultados, procedeu-se à quantificação da difusão de O₂ pelo LI a partir da determinação do coeficiente de transferência de oxigénio ($K_L a$) por análise dos perfis de sorção/libertação de O₂ medidos. A abordagem escolhida foi o método de desgaseificação estático que postula que o aumento da concentração de O₂ dissolvido é dado por:

$$\frac{dc_i}{dt} = K_L a (C^* - C_i) \quad (9)$$

Por integração da equação (9) obtém-se a expressão que representa a relação, do tipo $y = mx$, entre os valores de concentração de O_2 e o tempo, correspondendo o $K_L a$ ao declive dessa reta:

$$\int_0^{C_i} \frac{dC_i}{C^* - C_i} = K_L a \int_0^t dt \Leftrightarrow \ln(C^* - C_i) = -K_L a \cdot t + \ln(C^*) \Leftrightarrow$$

$$\Leftrightarrow \ln\left(\frac{C^* - C_i}{C^* - C_0}\right) = -K_L a \cdot t \quad (10)$$

em que C^* corresponde à concentração de saturação de O_2 dissolvido no meio, C_0 a concentração de O_2 no momento que antecede a adição de amostra, C_i a concentração de O_2 para o ponto i e $K_L a$ corresponde ao coeficiente volumétrico de transferência de O_2 .

Sabendo que o valor de saturação de oxigénio dissolvido na água (C^*) a 25 °C é 8,3 ppm, procedeu-se ao cálculo do quociente $\ln\left(\frac{C^* - C_i}{C^* - C_0}\right)$ para os diferentes sistemas em estudo. A representação dos valores deste quociente em função do tempo, permite a obtenção de um perfil idêntico ao representado na Figura 21.

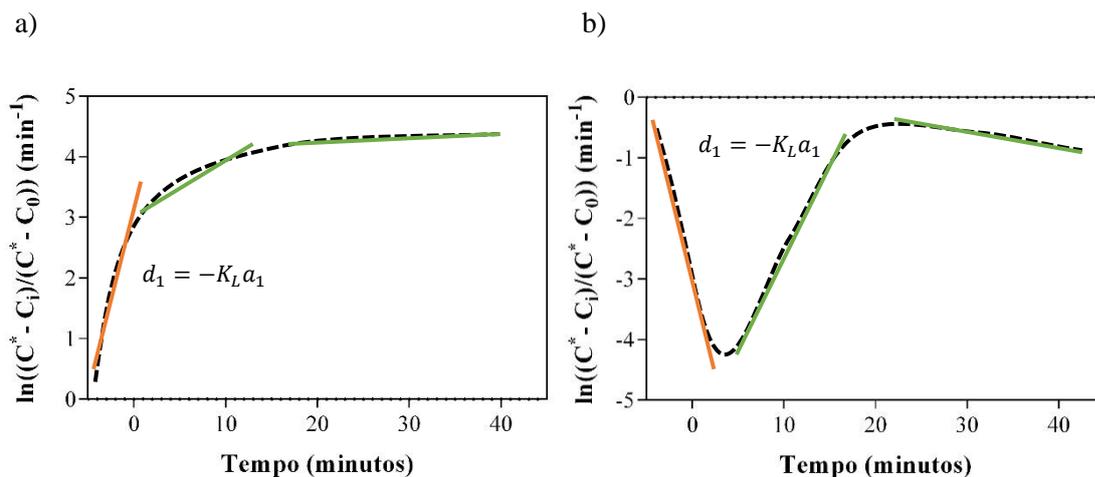


Figura 21 – Representação genérica do cálculo da constante $K_L a_1$ para o ensaio de a) consumo de O_2 do meio e b) difusão de O_2 para o meio.

Neste trabalho, o foco de estudo foi a primeira reta do perfil, identificada a laranja na Figura 21, cujo declive fornece informação acerca da transferência inicial de O_2 por difusão aquando da adição da amostra. Os outros declives observados (retas verdes) correspondem a diferentes fenómenos de transferência que ocorrem em simultâneo, por exemplo solvatação, que não foram analisados. O sinal correspondente ao valor de $K_L a_1$ pode ser positivo ou negativo consoante o sentido em que ocorre a difusão de oxigénio no sistema ¹⁹⁸.

5. Resultados experimentais e discussão

Nas secções 5.1 e 5.2, correspondentes à caracterização efetuada para as emulsões de LI e formulações de nc/Si-LI procede-se à comparação de 3 sistemas, sendo que 2 destes foram desenvolvidos neste trabalho e o outro na dissertação de Cláudia Buga, apelidada de formulação C ¹⁹⁹. De seguida, apresenta-se na Tabela 10 uma descrição das condições de síntese para cada formulação.

Tabela 10 – Identificação das condições de síntese para cada um dos sistemas mencionados neste trabalho.

	LI/[S1:S2:S3]	T _{condensação} (°C)	V _{TEOS} (ml)
Formulação A	2x	40	2y
Formulação B	x	40	2y
Formulação C	2x	25	y

5.1 Emulsões

Concentração micelar crítica para cinco sistemas de surfactantes

A determinação da concentração micelar crítica (CMC) é essencial para garantir a formação de emulsões em meio aquoso. Neste trabalho a CMC foi determinada a partir da análise da variação de tensão superficial de diferentes soluções contendo diferentes misturas e concentrações de surfactantes.

Na Figura 22 apresentam-se os resultados da tensão superficial γ (mN/m) em função da concentração total de surfactantes C (mM) para diferentes misturas de surfactantes ($S_{1,i}:S_{2,i}:S_{3,i}$). De referir que parte da informação relativa à CMC destes cinco sistemas foi previamente obtida na tese de mestrado da aluna Sylvia Sousa ¹⁷⁷. Este estudo teve como principal objetivo uma melhor compreensão dos sistemas, nomeadamente qual o efeito da concentração dos surfactantes S1 e S3 na tensão superficial. As curvas apresentam perfil idêntico ao reportado na literatura, uma fase descendente de declive acentuado à qual se segue o ponto de transição até se atingir uma zona de declive próximo do zero, zona de estabilidade após o valor de CMC. Esta última região indica a saturação da superfície, ou seja, a região em que um aumento da concentração de surfactantes do sistema não tem efeito significativo no valor de tensão superficial ^{200,201}.

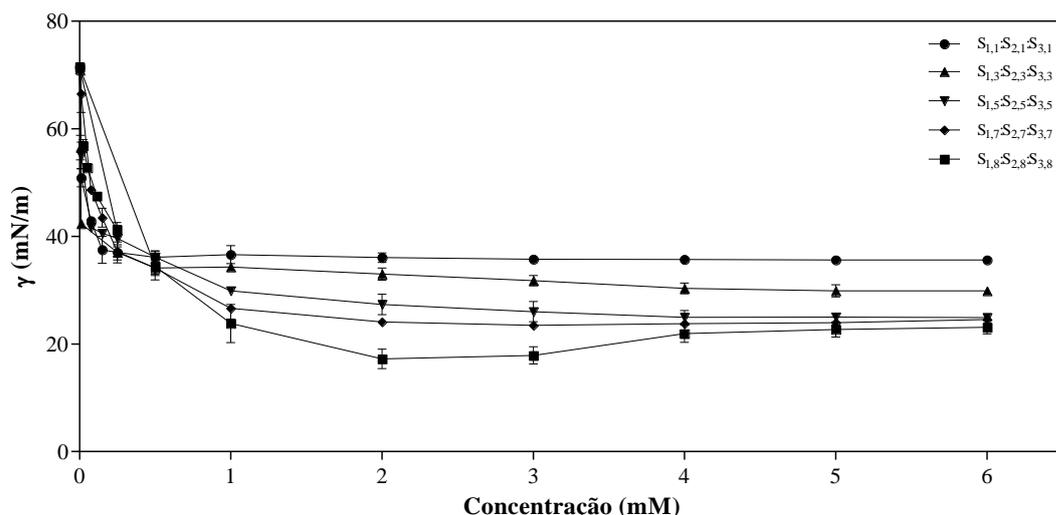
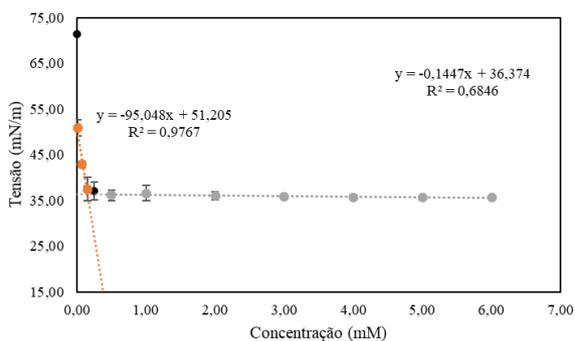


Figura 22 - Representação dos resultados da tensão superficial γ (mN/m) em função da concentração total de surfactantes para todos os sistemas estudados.

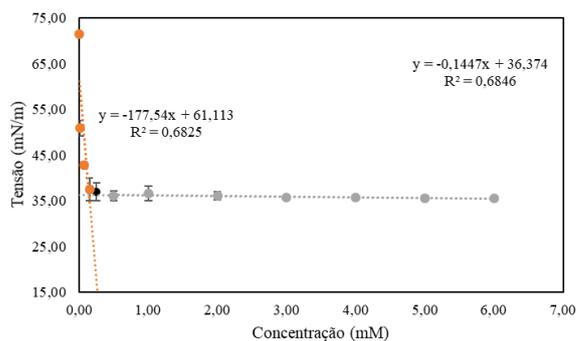
A análise do gráfico (progressão vertical descendente das curvas) permite verificar que quanto maior a concentração de S3 na mistura de surfactantes, combinada com a diminuição gradual da concentração de S1, menor o valor de tensão superficial. Este comportamento deve-se maioritariamente ao poder tensioativo característico do S3, uma vez que é um composto fluorado, ao contrário do S1 que é um composto hidrogenado ²⁰². De referir que o sistema S_{1,8}:S_{2,8}:S_{3,8}, ao contrário dos restantes, não apresenta o comportamento característico reportado na literatura, apresentando um valor mínimo de tensão superficial para o ponto de transição, ponto a partir do qual o perfil se torna constante. Este tipo de perfil pode dever-se à presença de contaminantes ou de produtos resultantes de reações de hidrólise, que apresentam um efeito tensioativo superior ao do surfactante S3. Tal não se observa para concentrações mais elevadas, uma vez que as micelas que se começam a formar tendem a solubilizar estes compostos.

Para estes sistemas realizaram-se dois tipos de ajuste linear para determinação da CMC, sendo que estes diferem na inclusão ou não da tensão superficial da água no ajuste. Na Figura 23 apresentam-se os ajustes realizados para cada composição em estudo.

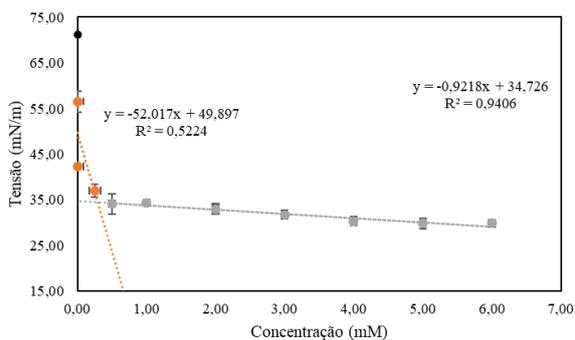
[S_{1,1}:S_{2,1}:S_{3,1}] s/água



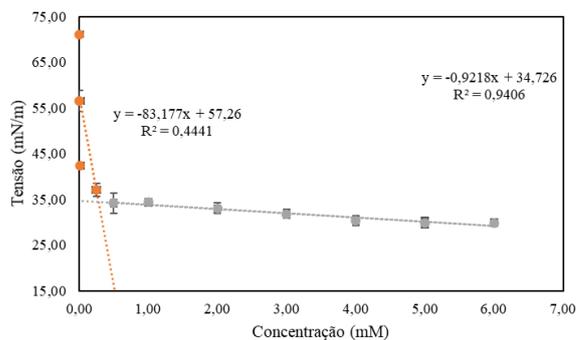
[S_{1,1}:S_{2,1}:S_{3,1}] c/água



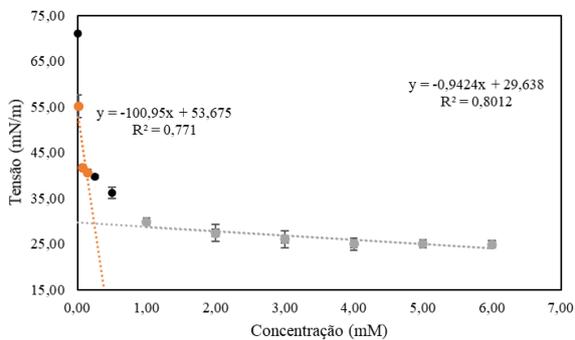
[S_{1,3}:S_{2,3}:S_{3,3}] s/água



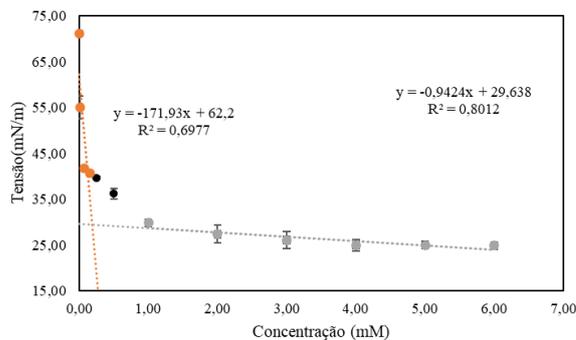
[S_{1,3}:S_{2,3}:S_{3,3}] c/água



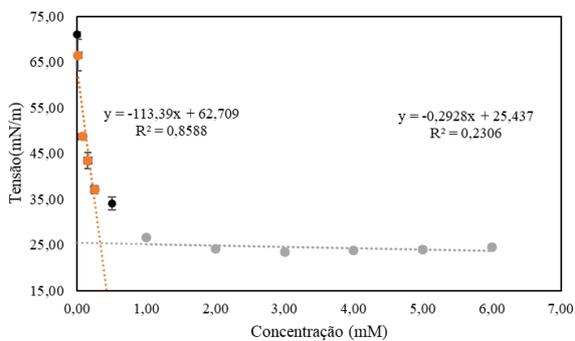
[S_{1,5}:S_{2,5}:S_{3,5}] s/água



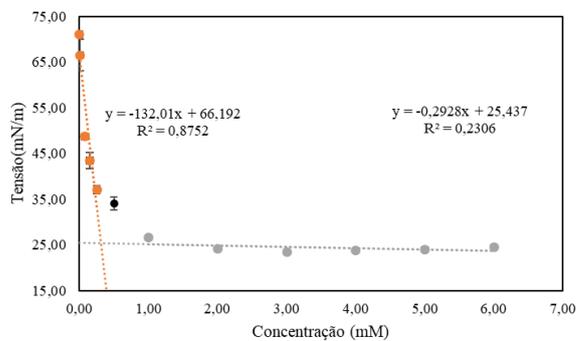
[S_{1,5}:S_{2,5}:S_{3,5}] c/água



[S_{1,7}:S_{2,7}:S_{3,7}] s/água



[S_{1,7}:S_{2,7}:S_{3,7}] c/água



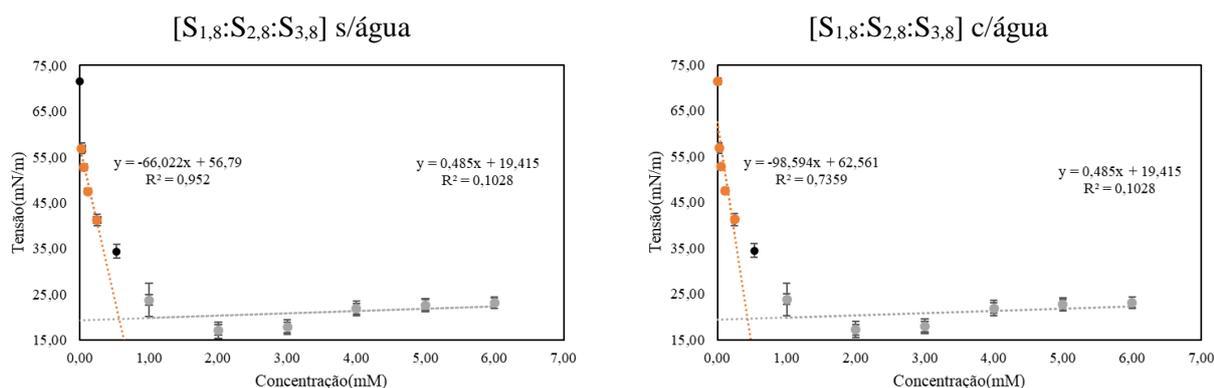


Figura 23 - Representação dos resultados da tensão superficial γ (mN/m) em função da concentração total de surfactantes para todos os sistemas excluindo o valor de tensão superficial da água (coluna esquerda) e incluindo o valor de tensão superficial da água no ajuste linear (coluna direita).

Com base nos gráficos criados, extrapolaram-se os valores experimentais de CMC, que podem ser consultados na Tabela C1 do Anexo C, sendo que nesta tabela apresentam-se os valores obtidos para todos os sistemas estudados pelo grupo GSP. A CMC foi calculada a partir da interseção das duas retas representadas em cada um dos gráficos. Na análise em que se procede à inclusão do valor da tensão superficial medido para a água bi-distilada, pretende-se que o aumento da amostragem se reflita numa melhoria do ajuste (traduzido pelo valor de R^2 – quadrado do coeficiente de correlação) da regressão linear aplicada, porém tal não se verificou para todos os sistemas.

De acordo com a literatura, o valor de tensão superficial tem de ser determinado para pelo menos cinco concentrações abaixo da concentração correspondente ao ponto de transição, sendo obtidos, conseqüentemente, valores R^2 superiores aos aqui apresentados. Como tal não foi possível de realizar neste trabalho, após análise visual do gráfico estipulou-se usar um valor de concentração C para todas as misturas de surfactantes, significativamente superior ao da CMC, que foi tido como referência para formulação das emulsões.

Cinética de formação e de estabilidade da emulsão de LI em água

O sistema $[P_{6,6,6,14}][NTf_2]/[S1:S2:0]$ foi o selecionado para formação das nc/Si-LI. Para tal, realizaram-se estudos cinéticos para melhor compreender a influência do tempo de sonicação do sistema na formação de micelas e a estabilidade das mesmas ao longo do tempo para a formulação B. Este estudo foi realizado apenas para esta formulação, porque para a formulação A a relação LI/[S1:S2:0] é igual à que foi estudada pela Cláudia Buga, apesar de outros parâmetros de síntese terem sido alterados não interferem com os resultados obtidos. Assim, monitorizou-se a variação do diâmetro hidrodinâmico das

micelas (dh) formadas para diferentes tempos de sonicação (cinética de formação) e para quatro tempos após formação da emulsão (cinética de degradação). Os dados obtidos encontram-se na Figura 24.

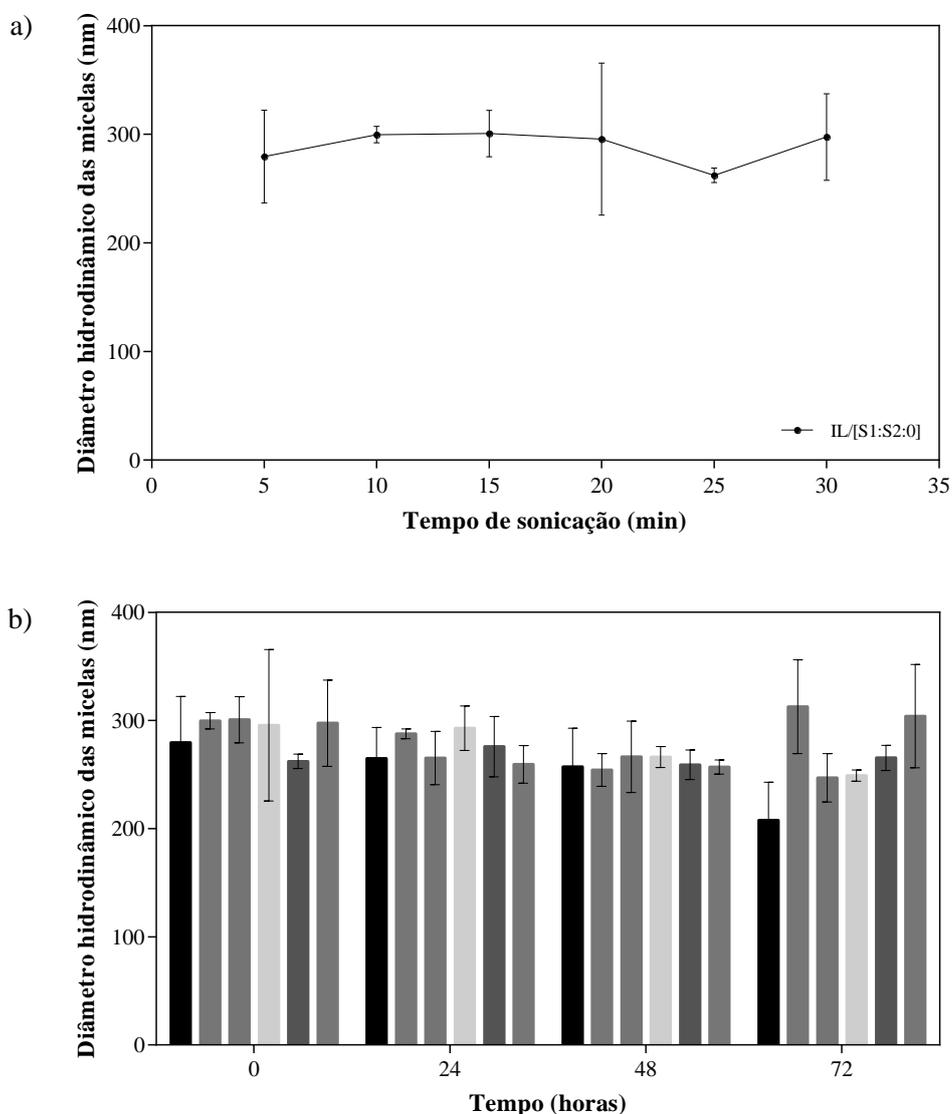


Figura 24 - a) Cinética de formação para o sistema $[P_{6,6,6,14}][NTf_2]/[S1:S2:0]$; b) Cinética de estabilidade para o sistema $[P_{6,6,6,14}][NTf_2]/[S1:S2:0]$. (Legenda: ■ - 5 minutos; ■ - 10 minutos; ■ - 15 minutos; ■ - 20 minutos; ■ - 25 minutos; ■ - 30 minutos).

Na Figura 24 a), respeitante à cinética de formação para emulsificação do sistema com a *macrotip*, observa-se que o dh aumenta entre os 5 e 10 minutos e tende a estabilizar ao prolongar-se o tempo de sonicação até aos 20 minutos, sendo que para estes tempos o desvio padrão associado tende a aumentar. Este resultado deve-se à maior polidispersividade associada ao valor de dh das micelas para os diferentes tempos de sonicação.

Por sua vez, tendo em conta os dados apresentados na Figura 24 referentes à cinética de estabilidade das emulsões, com o aumento do tempo após formação verifica-se que os dh tendem para um valor constante até às 72 horas, ocorrendo simultaneamente diminuição do desvio padrão associado a cada um dos tempos de sonicação. Tendo em conta estes resultados pode inferir-se que o sistema emulsificado tende para um dh de equilíbrio, independentemente do tempo de sonicação, sendo que este é inferior ao do tempo de formação, podendo este facto dever-se à fragmentação/degradação das micelas em outras de diâmetro inferior. Para as 72 horas, o padrão é alterado, sendo que as micelas formadas após 5 minutos de sonicação apresentam um decréscimo de dh bastante significativo. Neste caso, o tempo de fornecimento de energia ao sistema é insuficiente para que o sistema permaneça emulsificado após 72 horas, ocorrendo degradação das micelas. Para os tempos de sonicação 10 e 30 minutos verifica-se aumento do dh, podendo este dever-se à formação de aglomerados de micelas. Para os tempos de sonicação compreendidos entre os 15 e 25 minutos, o diâmetro não é consideravelmente afetado com o aumento do tempo de armazenamento, sendo, portanto, associados a uma emulsificação mais eficiente do sistema de surfactantes e, conseqüentemente, mais estável.

Pela comparação dos dados da Figura 24 com os apresentados em Buga (2018), formulação C, verifica-se uma alteração do perfil referente à cinética de formação, o dh médio final das micelas diminuiu e o desvio padrão aumentou de forma generalizada. Como tal, é possível concluir que a alteração da razão LI/[S1:S2:0] assegura partículas mais pequenas, úteis para a aplicação pretendida. Tendo em conta estes resultados e atendendo que as variações registadas ao longo das cinéticas não são significativas, o tempo de sonicação escolhido para a formação das emulsões usadas para a síntese de nc/Si-LI foi de 25 minutos.

Os dados apresentados apontam para que as partículas obtidas tenham um diâmetro médio de $262,2 \pm 6,6$ nm, sendo este valor inferior ao das formulações estudadas por Sousa (2017) para o líquido iónico [OMIM][NTf₂] (o diâmetro máximo das micelas variou entre 400 e 480 nm) e por Buga (2018) para o líquido iónico [P_{6,6,6,14}][NTf₂] (o diâmetro máximo das micelas variou entre 195 e 345 nm). Contudo, os desvios padrão associados ao dh são superiores aos de Sousa (2017), o que pode ser um indicador de que o LI usado neste trabalho apresenta maior instabilidade quando incorporado em emulsão.

5.2 Micro/nano cápsulas de sílica usando o método sol-gel em meio aquoso

Evolução do tamanho e potencial zeta das nc/Si-LI

A análise dos resultados obtidos durante esta etapa laboratorial permitiu verificar que o índice de polidispersividade (PDI) das amostras varia entre 0,2 e 0,7, o que significa que as micelas apresentam um diâmetro hidrodinâmico (dh) variável. Por esta mesma razão, o algoritmo de análise aplicado aos dados recolhidos foi o CONTIN, indicado para amostras heterogêneas em termos de dh, por permitir uma maior fidelidade em termos de representação dos dados recolhidos ^{190,191}.

Durante o procedimento de obtenção de cápsulas foi medido o pH da reação, o diâmetro das nc/Si-LI e o potencial zeta em sete fases distintas da reação, para melhor controlo e compreensão deste processo. Para cada uma das fases procedeu-se à recolha de uma alíquota da amostra, correspondente aos seguintes passos do processo de formação das nc/Si-LI: 1) imediatamente após emulsificação do sistema LI/[S1:S2:0]; 2) após hidrólise do co-precursor de sílica; 3) após adição do TEOS hidrolisado à emulsão pré-hidrolisada; 4) após adição do sal orgânico à reação; 5) após o aumento do pH da emulsão, catalisando o início da condensação; 6) após reação de condensação; 7) após três dias de diálise. Como foram produzidas cápsulas com diferente relação LI/[S1:S2:0], esta análise foi efetuada a amostras provenientes de ambas as formulações desenvolvidas, A e B (Figura 25).

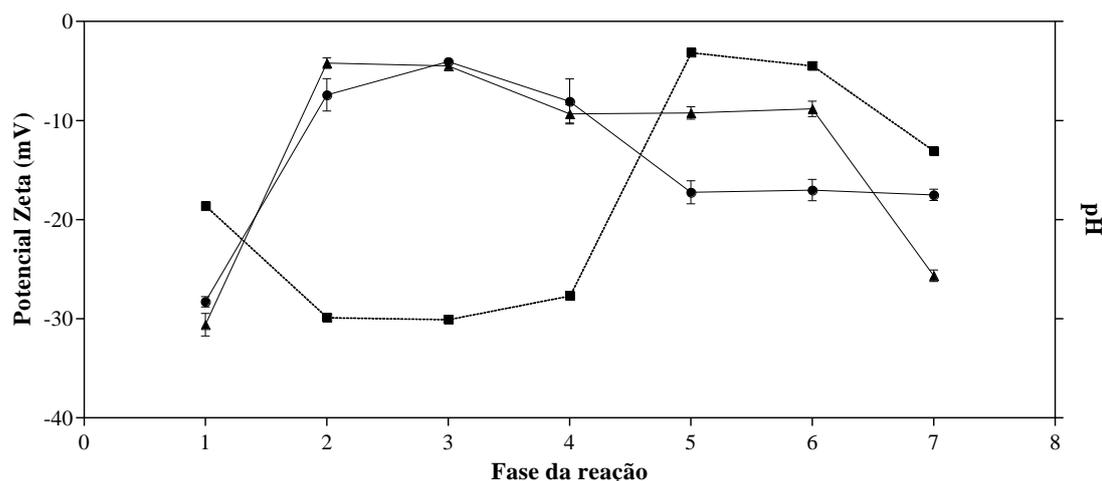


Figura 25 - Evolução dos valores de potencial zeta e pH da mistura reacional ao longo das sucessivas fases do processo de formação de nc/Si-LI. Para esta análise foram usadas amostras de nc/Si-LI das formulações A e B. (Legenda: ● - Potencial zeta para as nc/Si-LI formulação A; ▲ - Potencial zeta para as nc/Si-LI formulação B; ■ - pH). Nota: por motivos de propriedade industrial os valores de pH são omitidos.

A análise da Figura 25 permite verificar que o potencial zeta não foi afetado significativamente pela relação LI/[S1:S2:0] até ao ponto 4, sendo que a partir deste ponto os perfis são diferentes. Após hidrólise da emulsão (ponto 2), o valor de potencial zeta aumenta de $-30,60 \pm 1,15$ mV para $-4,20 \pm 0,53$ mV (formulação A) e de $-28,28 \pm 0,52$ mV para $-7,41 \pm 1,62$ mV (Formulação B). Esta variação reflete o aumento da instabilidade da mistura aquando do início do procedimento sol-gel. No ponto 3 (adição do TEOS hidrolisado), o potencial zeta permanece aproximadamente constante. A adição do sal orgânico (ponto 4) é acompanhada pelo aumento do pH e diminuição significativa do potencial zeta, associada ao aumento de estabilização do sistema promovida pela adição do sal orgânico. O aumento do pH para valores básicos, que atua como catalisador da reação de condensação, é acompanhado pela diminuição do potencial zeta da curva correspondente à formulação A na passagem do ponto 4 para o ponto 5, sendo que após este ponto se mantém constante. Este comportamento indica que a formulação A estabiliza mais rapidamente e para um valor de potencial zeta consideravelmente superior ao atingido pela formulação B. Por sua vez, para esta formulação o potencial zeta permanece aproximadamente constante entre os pontos 4 e 6, verificando-se uma variação significativa do ponto 6 para o ponto 7.

No ponto 7, o potencial zeta estabiliza para valores de $-17,5$ mV (formulação A) e de $-25,5$ mV (formulação B), o que indica que finalizado o processo de obtenção de nc/Si-LI, as nc/Si-LI obtidas são estáveis¹⁹¹. De notar que nos passos anteriores pode ter ocorrido agregação das partículas, o que se reflete no aumento do potencial zeta, observado para os passos posteriores ao ponto 5. Para estas etapas a avaliação visual da amostra permitiu confirmar que ocorre rápida sedimentação das nc/Si-LI quando colocadas na cuvette para o DLS, sendo impossível a determinação do diâmetro hidrodinâmico das mesmas a partir do ponto 6, inclusive.

Os resultados relativos ao dh das nc/Si-LI encontram-se representados na Figura 26. É possível verificar que o dh é praticamente constante e igual para as formulações A e B, tendo em conta os erros associados. Na passagem do ponto 4 para o ponto 5, o dh aumenta consideravelmente para ambas as emulsões. Tal facto é justificado pelo início da reação de condensação e agregação das nc/Si-LI. Após o início da reação de condensação não foi mais possível determinar o dh das nc/Si-LI, devido à formação de agregados que mesmo quando sujeitos a agitação no vortex, aplicação de ultrassons e diluição da suspensão não são separados de forma eficaz.

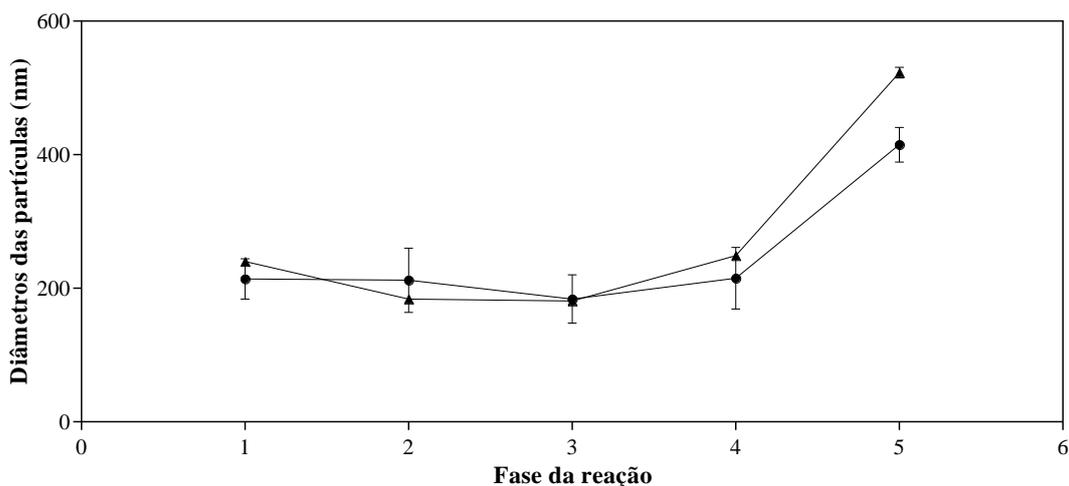


Figura 26 - Evolução do diâmetro hidrodinâmico das nc/Si-LI (nm) ao longo das sucessivas fases do processo sol-gel. Para esta análise foram usadas amostras de nc/Si-LI das formulações A e B. (Legenda: ● – Evolução do dh das nc/Si-LI da formulação A; ▲ - Evolução do dh das nc/Si-LI da formulação B).

Ao comparar os perfis obtidos nas Figuras 25 e 26 deste trabalho com os da formulação C, estes possuem comportamento bastante semelhante até ao ponto 4, podendo a discrepância a partir deste ponto dever-se ao aumento da quantidade de TEOS adicionada ao meio reacional, uma vez que o fator da temperatura apenas entra em consideração para as nc/Si-LI obtidas após o processo de diálise, e a relação LI/[S1:S2:0] não tem influencia porque a tendência é verificada para as formulações A e B.

Caracterização, morfologia e rendimento da reação de formação de nanocápsulas de sílica

A monitorização da morfologia das nc/Si-LI foi realizada por diferentes técnicas óticas. Numa primeira fase foram recolhidas imagens por MO que permitiram verificar que as duas formulações estudadas apresentam nc/Si-LI de dimensões distintas.

Por forma a averiguar qual a melhor metodologia para armazenamento das nc/Si-LI, procedeu-se à liofilização da suspensão de nc/Si-LI, obtida após o procedimento de produção das mesmas. Por forma a confirmar se durante o procedimento de liofilização ocorre alteração da estrutura morfológica das nc/Si-LI, estas foram observadas à lupa, tendo-se confirmado visualmente que não tinha sido modificada. Ambas apresentavam aspeto idêntico, porém as nc/Si-LI da formulação A são mais brancas e de aspeto menos brilhante que as da formulação B (Figura 27).

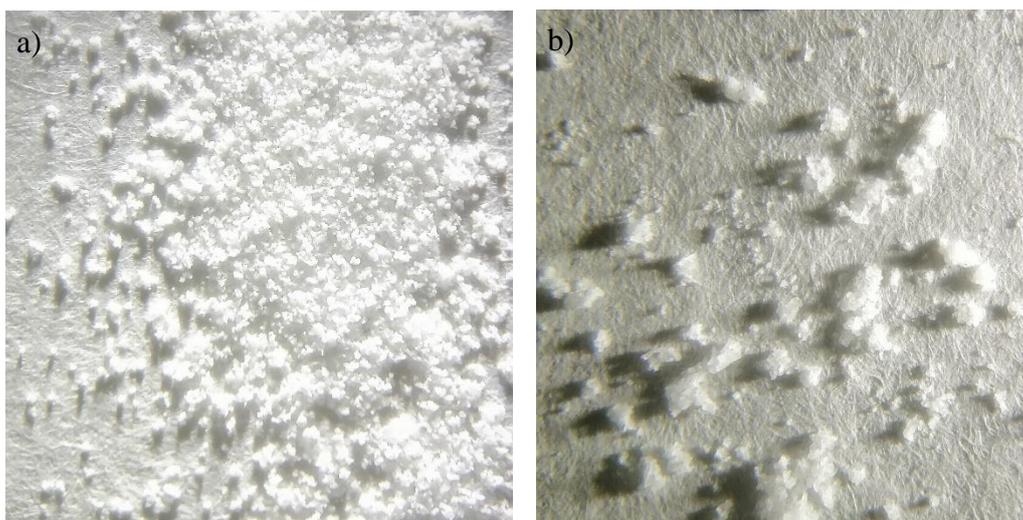


Figura 27 - Imagens obtidas através de lupa após liofilização: a) nc/Si-LI formulação A; b) nc/Si-LI formulação B.

Posteriormente, foram obtidas imagens por microscopia SEM para análise do aspeto morfológico das amostras de nc/Si-LI não-liofilizadas e liofilizadas (Figura 28).

Nas imagens respeitantes à formulação A de nc/Si-LI é possível identificar agregados nc/Si-LI de grandes dimensões e compactos, sendo estes transversais a toda a amostra, observa-se também na imagem de maior ampliação o que parece ser conjuntos de cápsulas colapsados, o que se deve provavelmente à aplicação do vácuo necessário à execução da técnica (Figuras 28 a) e b)). Por sua vez, nas Figuras 28 c) e d), correspondentes à formulação B, verificam-se o mesmo tipo de agregados de nc/Si-LI, porém as estruturas aparentam ser não tão compactas como as da formulação A (Figuras 28 a) e c)). A diferença observada pode dever-se ao facto de na formulação A a quantidade de surfactantes utilizada ser inferior à da formulação B, podendo ser também um indicador de que a quantidade de TEOS adicionada é excessiva (devido aos grandes blocos densos observados). Na Figura 28 d) visualizam-se saliências que se destacam dos agregados de maiores dimensões, partindo do pressuposto que cada saliência corresponde a uma nc/Si-LI, o diâmetro de nc/Si-LI obtido é de 168 nm, aproximadamente.

No SEM realizado das cápsulas não-liofilizadas foi possível determinar as dimensões e avaliar a morfologia das nc/Si-LI obtidas (Figura 29).

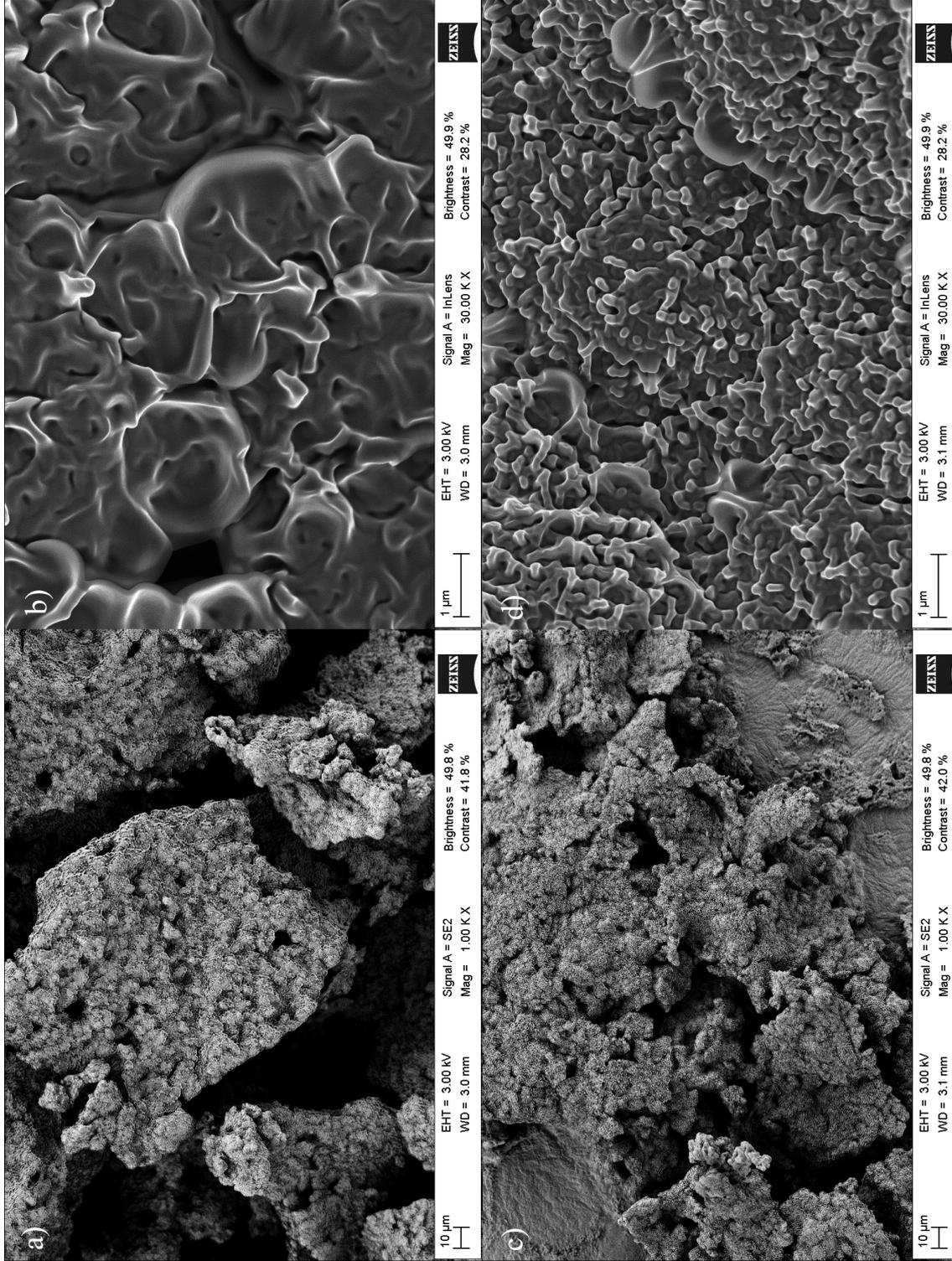
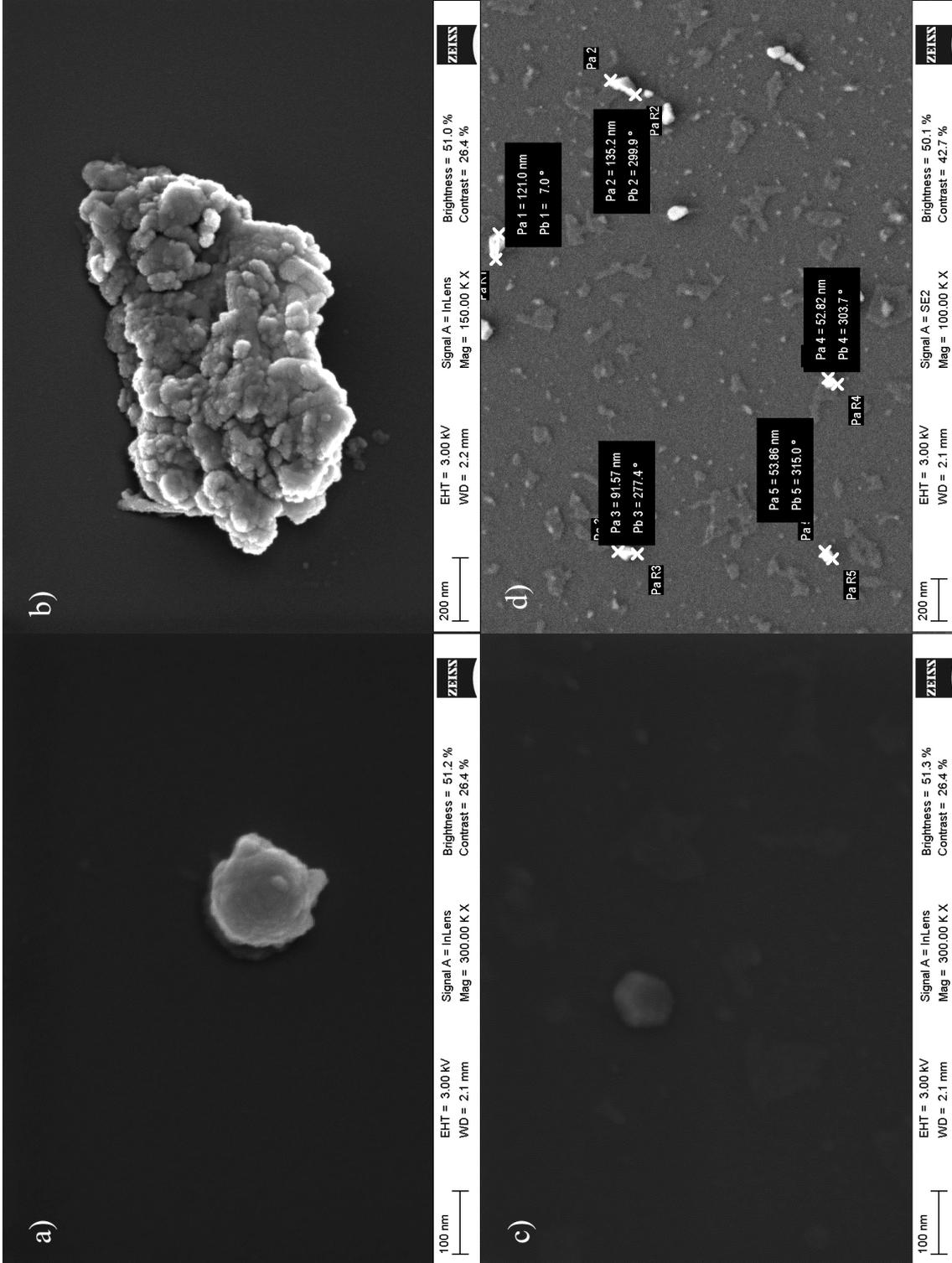


Figura 28 - Microscopia de SEM para amostra de nc/Si-Li liofilizadas. Formulação A: a) escala de 10 μ m e b) escala de 1 μ m; Formulação B: c) escala de 10 μ m e d) escala de 1 μ m.



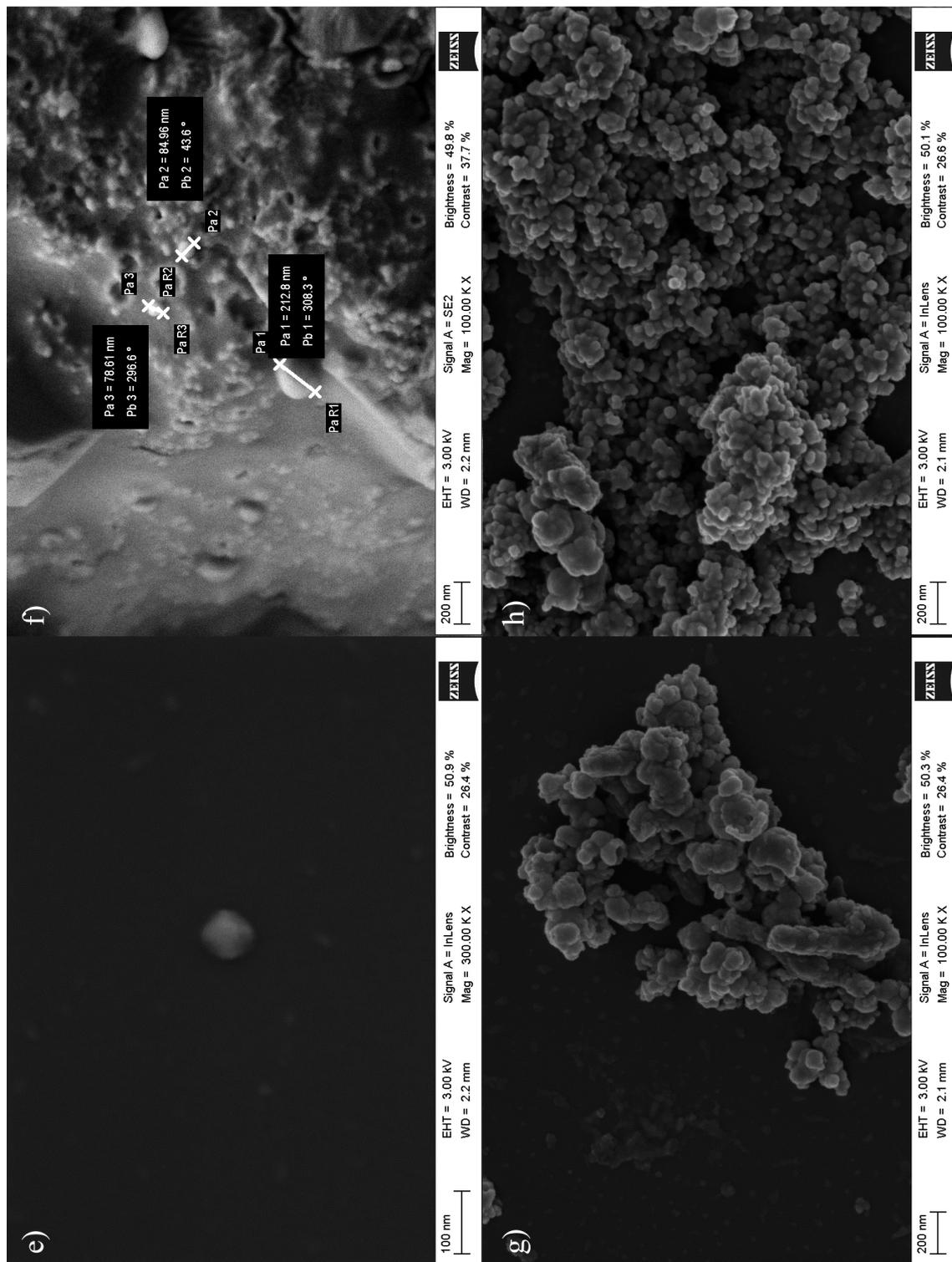


Figura 29 - Microscopia de SEM para amostra de nc/Si-LI não-lyofilizadas. Formulação A: a) e c) escala de 100 nm; b) e d) escala de 200 nm. Formulação B: e) escala de 100 nm; f), g) e h) escala de 200 nm.

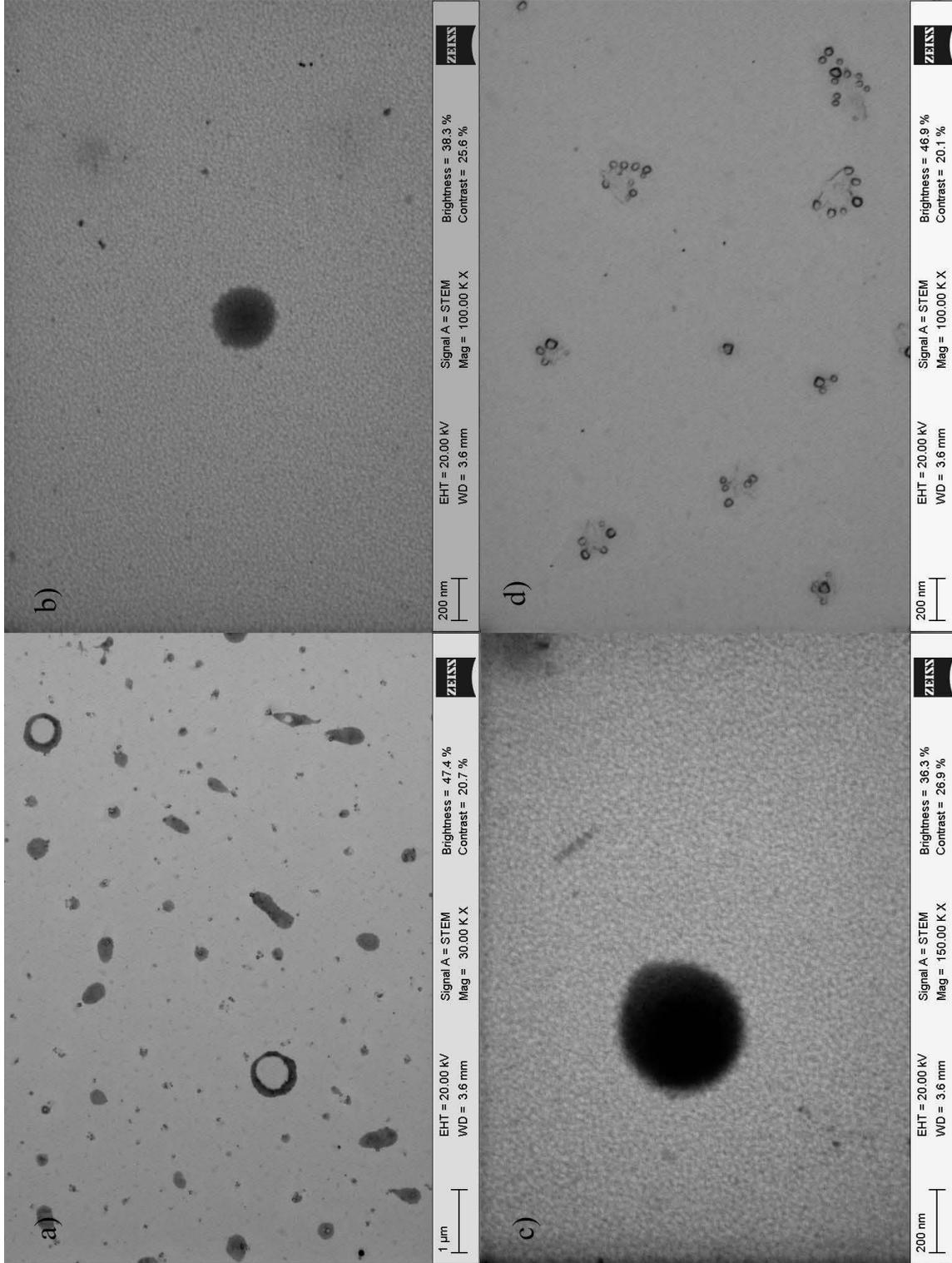
As nc/Si-LI correspondentes à formulação A surgem sob a forma de agregados de nc/Si-LI de menores dimensões, apresentando a sua estrutura um diâmetro de compreendido entre 100 e 200 nm (Figuras 29 a) e b)). Nas restantes imagens é possível observar pequenas nc/Si-LI de forma esférica com diâmetros que variam entre 50 e 150 nm (Figuras 29 c) e d)).

As imagens recolhidas respeitantes à formulação B apresentam estrutura idêntica à da formulação A, como é possível confirmar na Figura 29 e), cujo diâmetro da nc/Si-LI ronda os 60 nm. Na Figura 29 f) observa-se uma estrutura densa com cápsulas incorporadas na sua superfície, de diâmetro compreendido entre 70 e 220 nm. Estes podem formar-se por condensação rápida do TEOS dando origem a estas construções de sílica. É ainda possível ver grandes agregados de nc/Si-LI, sendo que alguns destes são formados por agregados de menores dimensões de forma globular e paralelepipedica (Figuras 29 g) e h)). Uma possível justificação para a formação destes agregados de nc/Si-LI é a reação de condensação do TEOS, em torno das micelas, dar-se tão rapidamente que impede a formação de cápsulas homogéneas e individualizadas. Outra hipótese é que durante a reação de condensação ocorra junção das nc/Si-LI individuais que se formam.

O SEM permite confirmar a presença de aglomerados de nc/Si-LI e que existe uma dispersão de tamanho das nc/Si-LI, que varia entre 50 e 200 nm para a formulação A e entre 60 e 250 nm para a formulação B. Com base nesta informação, é possível concluir que as medições efetuadas pelo DLS correspondem a aglomerados de nc/Si-LI de menores dimensões, como os visíveis nas Figuras 29 b) e g), visto que de acordo com a análise DLS as partículas apresentam diâmetro compreendido entre 155 e 220 nm. De referir, que outra possível justificação para a diferença de valores observada é o facto do dh corresponder ao diâmetro das nc/Si-LI molhadas, que tende a ser superior ao das mesmas quando secas.

Ao comparar as imagens obtidas para as formulações A e B, com as da formulação C, observa-se o mesmo tipo de estruturas, mas de diâmetro inferior e de superfície mais homogénea. Desta forma, conclui-se que os parâmetros modificados na reação de síntese, temperatura a que decorre a reação de condensação e quantidade de TEOS influenciam as características morfológicas das nc/Si-LI obtidas.

Foram também adquiridas imagens STEM para as amostras de nc/Si-LI não-liofilizadas (Figura 30).



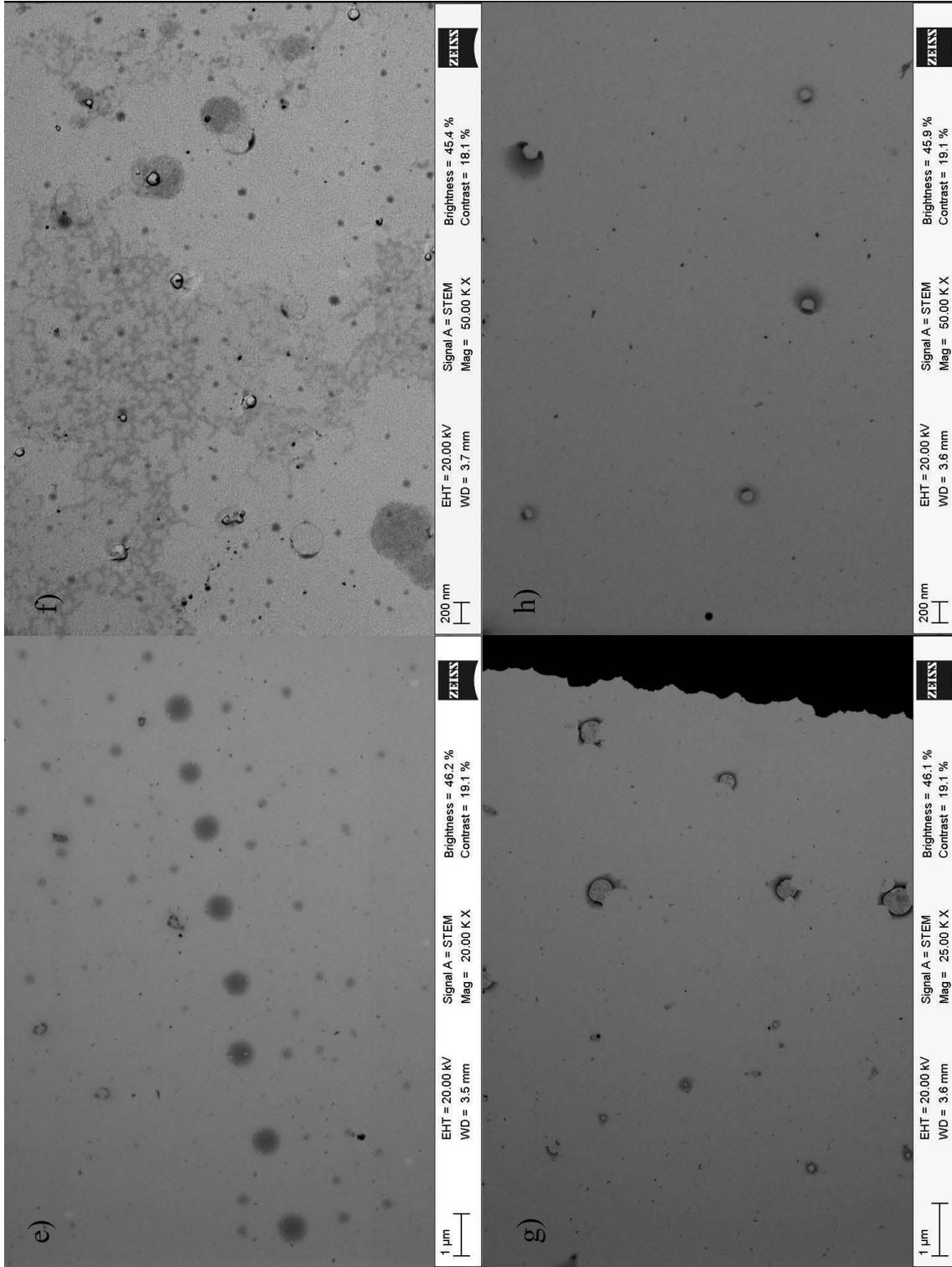


Figura 30 - Microscopia de STEM para amostra de nc/Si-LI não-litofiliizadas. Formulação A: a) escala de 1 μm; b), c) e d) escala de 200 nm; Formulação B: e) e g) escala de 1 μm; f) e h) escala de 200 nm.

Juntamente com as imagens obtidas por SEM, o STEM permite confirmar a forma esférica das nc/Si-LI, com um diâmetro de aproximadamente de 200 nm para ambas as formulações. Na Figura 30 a) é possível observar duas estruturas com 500 nm de diâmetro, que provavelmente correspondem a nc/Si-LI em que o LI saiu do seu interior, vendo-se perfeitamente o invólucro de sílica que forma a nc/Si-LI. As outras estruturas que se observam correspondem a aglomerados de sílica formados aquando da etapa de condensação. O mesmo tipo de nc/Si-LI está presente em diferentes zonas da amostra (Figuras 30 b) e c)). Na Figura 30 d) visualizam-se vários conjuntos de pequenas nc/Si-LI, equivalentes aos agregados de pequenas dimensões também observados por SEM (Figura 29).

As imagens obtidas para a formulação B apresentam um aspeto ligeiramente distinto. As estruturas observadas nas Figuras 30 e), b) e c) parecem ser idênticas, porém apresentam diferentes tonalidades, que poderão dever-se à quantidade de LI retido nestas ou ao plano em que estas se encontram. A Figura 30 f) permite a visualização das nc/Si-LI formadas, a região mais escura no seu interior corresponde, provavelmente, ao LI. Por sua vez, nas duas últimas imagens (Figuras 30 g) e h)) visualizam-se nc/Si-LI com dimensões entre os 200 e 300 nm, porém em algumas das nc/Si-LI o invólucro apresenta algumas falhas. As aparentes “falhas” no revestimento das nc/Si-LI poderão ser devidas à sobreposição com outras nc/Si-LI da amostra, sendo então estas resultantes de um efeito ótico; ainda outra possibilidade é estas terem origem no processo de sonicação realizado aquando da preparação das amostras.

A variedade de diâmetros obtidos para as nc/Si-LI pelas diferentes técnicas de caracterização aplicadas indica que a amostragem utilizada para realização dos testes é representativa da totalidade da amostra. O diâmetro das nc/Si-LI varia entre os 50 e os 300 nm para ambas formulações.

Caracterização química das micro/nano cápsulas

A formação de micro/nano cápsulas de sílica e a presença de LI [P_{6,6,6,14}][NTf₂] no interior das nc/Si-LI foi confirmada a partir dos resultados da análise termogravimétrica (TGA). Foram analisadas 6 amostras de nc/Si-LI em suspensão e 2 amostras de nc/Si-LI liofilizadas, para cada uma das formulações estudadas. Para a análise termogravimétrica foram usadas alíquotas homogêneas de, aproximadamente, 60 µL, de cada uma das

formulações em estudo, permitindo desta forma inferir a massa de LI e sílica presente em cada uma delas.

A partir dos perfis termogravimétricos obtidos foi possível estimar a percentagem de LI presente nas nc/Si-LI e a percentagem de sílica formada, sendo que a Tabela 11 apresenta a compilação dos resultados obtidos. As amostras são identificadas segundo a nomenclatura do tipo $X_{i,j}$, em que X é a formulação, i é o identificador do método de processamento da amostra (S para cápsulas em suspensão e L para cápsulas liofilizadas) e j é o número da réplica.

Tabela 11 – Dados obtidos através de TGA para as micro/nano cápsulas preparadas em 48 mL de suspensão.

	Massa de orgânicos (LI + S1 + S2) (g)	Massa de inorgânicos ($(SiO_2)_n$) (g)	LI presente relativamente ao adicionado (m/m %)	$(SiO_2)_n$ formada relativamente à esperada (m/m %)	Fração de LI (m/m %)	Fração de Si (m/m %)	Rendimento de sólidos de reação (m/m %)	Concentração LI (mg/mL)
AS_1								
AS_2								
AS_3	0,230 ±	0,036 ±	43,143 ±	52,595 ±	86,505 ±	13,495 ±	46,874 ±	9,598 ± 0,088
AS_4	0,009	0,003	1,768	3,731	±	±	1,888	
AS_5					0,791	0,685		
AS_6								
AL_1	0,229 ±	0,034 ±	42,925 ±	50,262 ±	86,966 ±	13,034 ±	46,389 ±	
AL_2	0,004	0,003	0,690	4,280	±	±	0,134	
BS_1								
BS_2								
BS_3	0,291 ±	0,040 ±	54,675 ±	50,013 ±	88,248 ±	11,752 ±	58,244 ±	9,864 ± 0,073
BS_4	0,010	0,005	1,797	6,949	±	±	2,251	
BS_5					1,137	1,137		
BS_6								
BL_1	0,276 ±	0,037 ±	51,790 ±	54,126 ±	88,193 ±	11,807 ±	55,185 ±	
BL_2	0,009	0,002	1,646	3,174	±	±	1,165	
					0,941	0,941		

Os resultados mostram que os valores de sílica formada em relação à esperada variaram entre 50,01% e 54,13% e a percentagem de LI incorporado variou entre 42,93% e 54,68%.

Ao comparar as duas formulações preparadas neste trabalho verifica-se que a formulação B apresenta um rendimento de sólidos da reação significativamente superior à da formulação A (aproximadamente 10%). Os valores obtidos para as nc/Si-LI em suspensão são semelhantes aos obtidos para as nc/Si-LI liofilizadas.

A presença de $[P_{6,6,6,14}][NTf_2]$ na superfície das nc/Si-LI liofilizadas foi confirmada pelos resultados da análise FTIR (Figura 31).

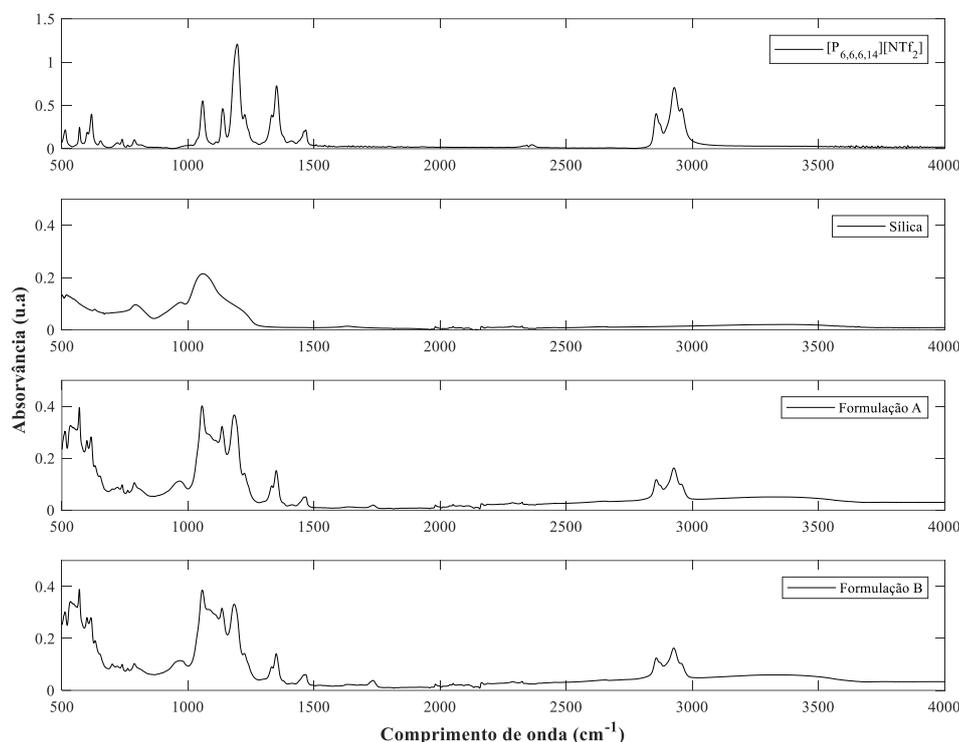


Figura 31 - Espectros obtidos através de FTIR do resíduo de sílica, do $[P_{6,6,6,14}][NTf_2]$, de amostra de cápsulas liofilizadas para as formulações A e B.

Na análise FTIR do resíduo de sílica obtido após análise no TGA observa-se um pico aos 800 cm⁻¹ e a banda de maior absorvância entre os 1000 e os 1200 cm⁻¹, correspondente à vibração do grupo ($\equiv Si - O - Si \equiv$), característico da sílica obtida a partir do precursor TEOS pelo método sol-gel. A amostra do LI exibiu picos característicos entre os 1000 e os 1500 cm⁻¹ e na zona correspondente às ligações (C-H) situadas entre os 2850-3000 cm⁻¹. Por comparação entre espectros percebe-se claramente que se encontram vestígios de LI na superfície das amostras das nc/Si-LI liofilizadas de ambas as formulações. Isto significa que apesar de assegurarmos que o congelamento da amostra ocorre a uma temperatura inferior à temperatura de fusão do LI, este continua a ser lixiviado do interior das nc/Si-LI. Tal poderá ser devido à porosidade das nc/Si-LI ou aquando do processo de congelamento o LI aumentar de volume e fragilizar a estrutura das nc/Si-LI. Outra ainda possível justificação poderá ser o facto da razão LI/TEOS utilizada na reação de formação das nc/Si-LI ser demasiado elevada, podendo ser necessário aumentar a quantidade de TEOS adicionado à reação por forma a garantir que o revestimento das nc/Si-LI é completo e resistente a este processo experimental ²⁰³.

5.3 *Scaffolds* à base de ácido hialurônico e colagénio

Os *scaffolds* obtidos foram, numa primeira fase, sujeitas a ensaios de degradação. Neste processo, procedeu-se à adição das mesmas num determinado volume de PBS a 37 °C, durante 72 horas. Após este período de tempo procedeu-se à verificação de quais mantinham a sua estrutura e apresentavam características mais promissoras. Inicialmente, oito formulações foram desenvolvidas para os *scaffolds*. Após este teste preliminar, estas foram reduzidas a três, uma vez que a 1A72 e todas as formulações 2 se dissolveram na solução de PBS.

O efeito do grau de reticulação e da incorporação de nc/Si-LI na capacidade de absorção de água dos *scaffolds* à base de ácido hialurônico e colagénio foi estudado por ensaios de *swelling*, cujos resultados são apresentados na Figura 32.

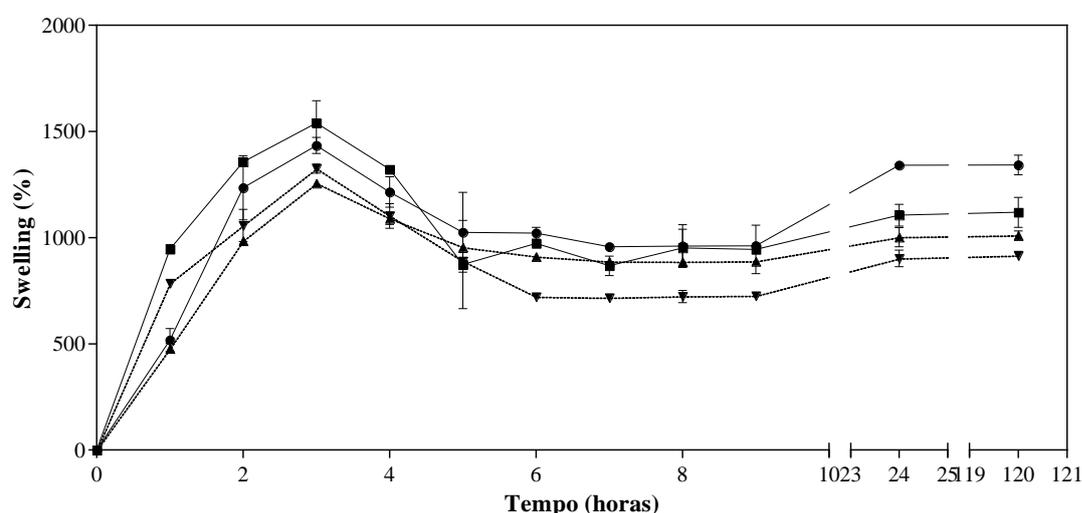


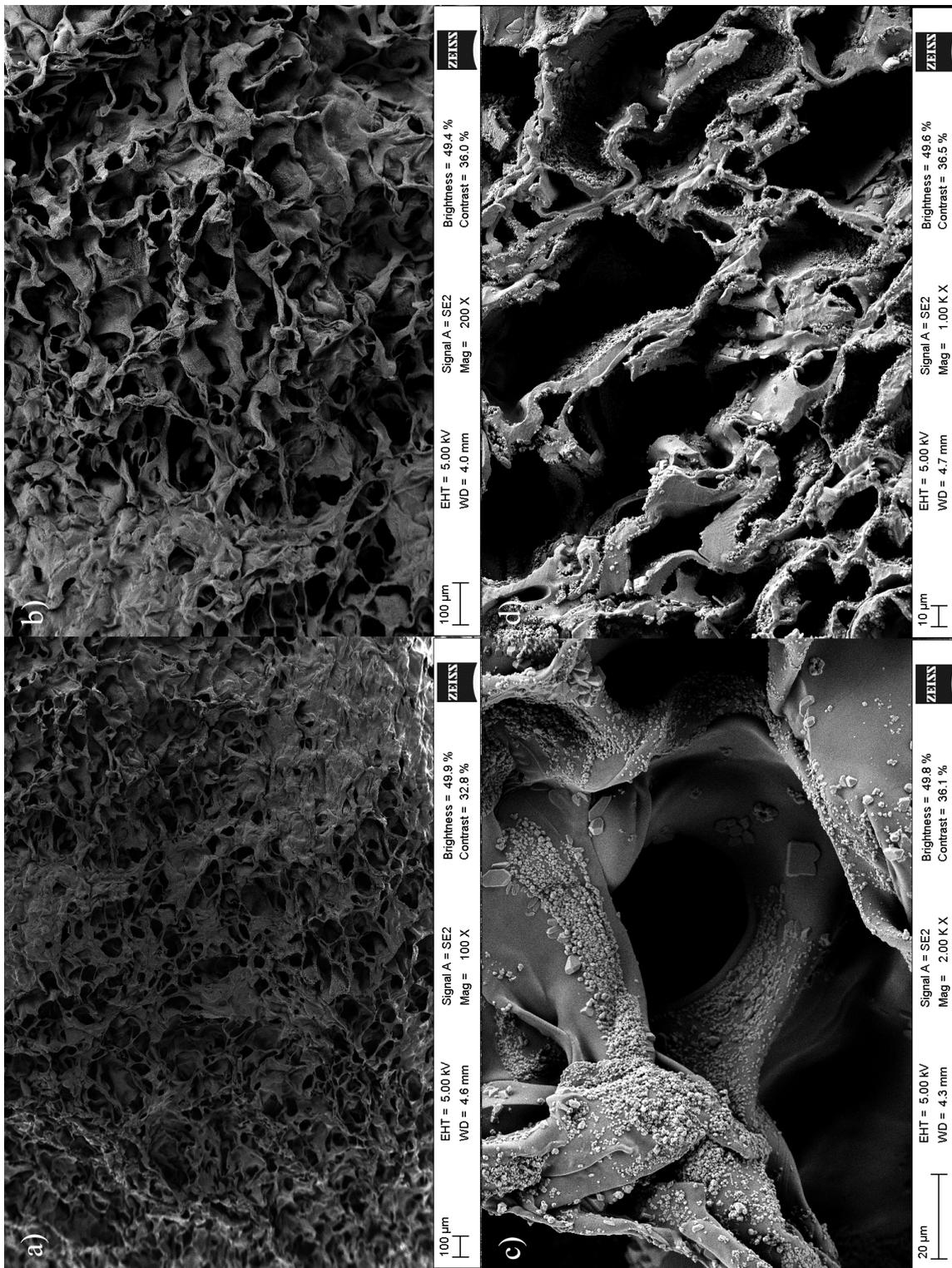
Figura 32 – Representação da percentagem de *swelling* ao longo do tempo para duas formulações de matrizes, sem e com incorporação de cápsulas (60% wt.). (Legenda: ● – 1A15: *scaffold* formulação 1A sujeito a reticulação durante 15 horas; ■ – 1B15: *scaffold* formulação 1B sujeito a reticulação durante 15 horas; ▲ – 1A15 + AC: *scaffold* formulação 1A sujeito a reticulação durante 15 horas com nc/Si-LI formulação A centrifugadas incorporadas; ▼ – 1B15 + AC: *scaffold* formulação 1B sujeito a reticulação durante 15 horas com nc/Si-LI formulação A centrifugadas incorporadas).

Observa-se que a massa de *scaffold* correspondente ao menor grau de reticulação aumenta cerca de 960% em relação ao seu peso seco quando imersa em PBS (1A15). Por sua vez, um aumento de 950% é verificado para o *scaffold* que apresenta uma reticulação 25% superior (1B15). Desta forma conclui-se que a diferença de reticulação não afeta de forma significativa a quantidade de PBS absorvida pelo hidrogel. Os perfis correspondentes aos *scaffolds* contendo nc/Si-LI são idênticos aos anteriores, seguindo a tendência de aumento até às 3 horas e tendência para estabilizar entre as 6 e 8 horas de incubação. Observa-se uma redução do índice de intumescimento em 200%, aproximadamente, em

relação aos *scaffolds* sem nc/Si-LI incorporadas, sendo que a matriz 1A15 + AC estabiliza em torno dos 880% em relação ao seu peso seco, este valor é superior ao obtido para a matriz 1B15 + AC, 720%. Este facto é justificado pela reticulação extra das cápsulas com os polímeros por estabelecimento de pontes de hidrogénio.

A estrutura do *scaffold*, sem e com nc/Si-LI incorporadas, foi analisada por SEM (Figura 33) por forma a avaliar o efeito da incorporação de nc/Si-LI na porosidade dos *scaffolds*, assim como a distribuição das nc/Si-LI no suporte polimérico desenvolvido. As nc/Si-LI incorporadas neste *scaffold* correspondem à formulação A, pois foi esta que obteve melhores resultados nos ensaios de citotoxicidade (Figura 42).

Os *scaffolds* com nc/Si-LI incorporadas parecem apresentar poros mais bem definidos e de maiores dimensões, e estrutura mais regular (Figuras 33 e) e f)) quando comparados com os *scaffolds* sem nc/Si-LI incorporadas (Figuras 33 a) e b)). Tal deve-se provavelmente ao processo de processamento das amostras e ao facto de as nc/Si-LI interferirem no processo de reticulação do *scaffold*. Ao comparar as Figuras 33 d) e g) verifica-se que o *scaffold* sem nc/Si-LI incorporadas possui uma espessura de parede de poro superior. É possível ver estruturas cristalinas na superfície das paredes dos poros (Figura 33 c)), as quais se devem à utilização do *buffer* HEPES para a síntese dos *scaffolds*. Nas Figuras 33 g) e h) de maior ampliação não se observam nc/Si-LI na secção transversal das paredes dos poros, pelo menos que sejam visíveis pela técnica aplicada. Tal pode ser justificado pela reduzida dimensão das mesmas e dos seus agregados, quando comparados com a espessura da parede do poro, que varia entre 5 e 20 μm .



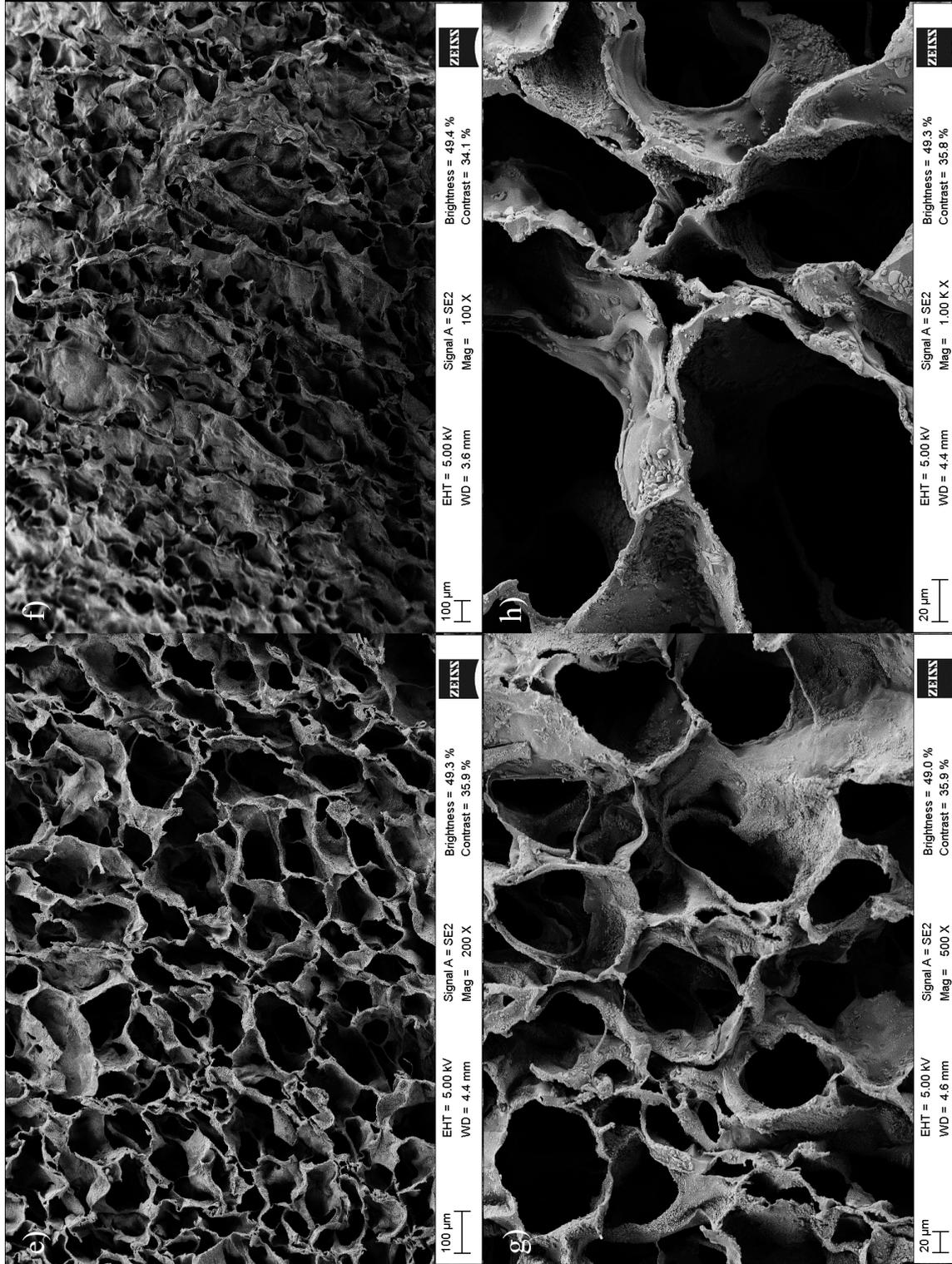


Figura 33 – Microscopia SEM para cortes longitudinais dos *scaffolds*. Sem nc/Si-LI incorporadas: a) e b) estrutura externa - escala de 100 μm; c) e d) estrutura interna - escala de 20 μm e de 10 μm. Com nc/Si-LI incorporadas: e) e f) estrutura externa - escala de 100 μm; h) e i) estrutura interna - escala de 20 μm.

5.4 Citotoxicidade

O ensaio usado para estudar a citotoxicidade dos materiais sintetizados foi o WST-1, tendo-se começado por realizar um ensaio preliminar de forma a aferir qual seria a densidade de células (nº de células/poço de cultura) e tempo de incubação ótimos por forma a assegurar que não ocorre saturação durante a análise espectrofotométrica (Figura 34).

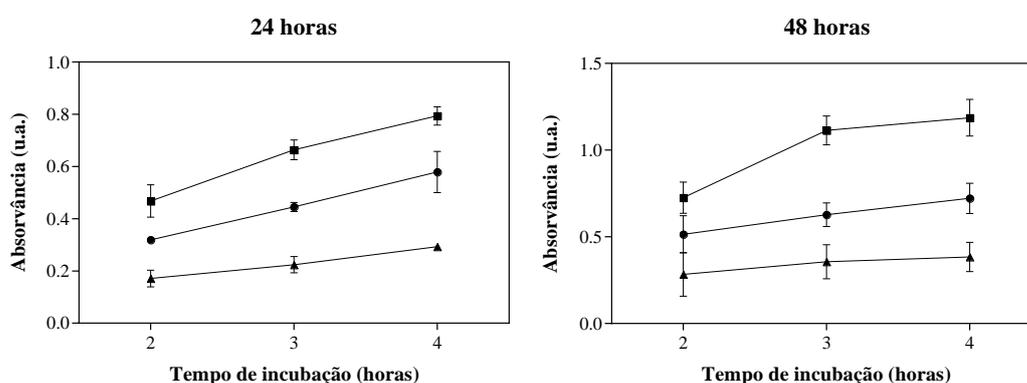


Figura 34 – Ensaio preliminar para determinação do tempo de incubação e densidade celular ideais para realização do WST-1. (Legenda: ▲ – 5K células; ● – 10K células; ■ – 15K células).

A Figura 34 permite verificar que há aumento significativo do sinal (absorvância) com o aumento do tempo de incubação do reagente de duas para três horas. Por sua vez, o efeito da densidade celular é idêntico entre cada um dos aumentos do nº de células realizado, tendo-se optado por uma densidade celular de 10 000 células/poço e tempo de incubação de 3 horas.

Micro/nano cápsulas de sílica

A primeira etapa consistiu na avaliação da citotoxicidade das nc/Si-LI produzidas, tendo-se testado diferentes concentrações de cada uma das formulações em estudo e com diferentes tipos de processamento. Este estudo foi efetuado uma vez que o tipo de processamento pode afetar a morfologia das nc/Si e, conseqüentemente, o modo de interação destas com as células. Adicionaram-se nc/Si-LI que foram sujeitas a três tipos de processamento distintos: centrifugação (C); liofilização (L); e em suspensão (S). Os resultados obtidos apresentam-se na Figura 35.

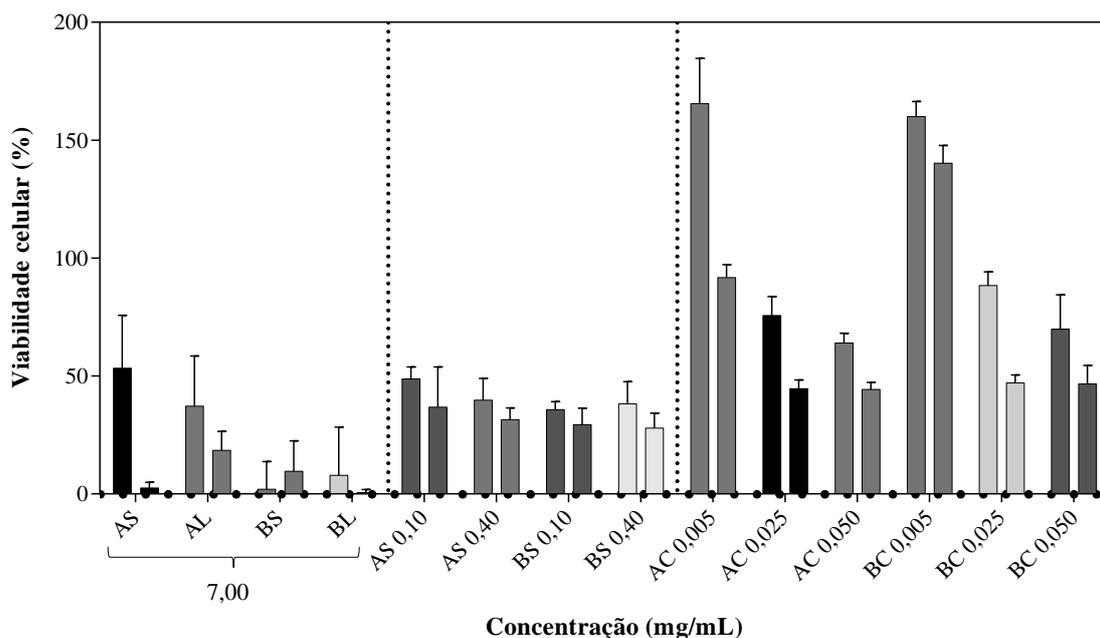


Figura 35 – Viabilidade celular após 24 (primeira barra) e 48 horas (segunda barra) de incubação para 6 diferentes concentrações de nc/Si-LI das formulações A e B, que foram submetidas a três diferentes metodologias de processamento: centrifugação (C), liofilização (L) e em suspensão (S).

O gráfico apresenta-se dividido em três blocos distintos. No primeiro bloco, os valores de viabilidade celular medidos são bastante inferiores aos esperados. De referir, que a primeira concentração de nc/Si-LI testada foi de 7 mg/mL, uma vez que estudos preliminares de ensaios de oxigenação com as nc/Si-LI da formulação C mostraram que esta concentração induz um efeito significativo na oxigenação de um meio aquoso¹⁹⁹. É possível observar que viabilidade celular tende a diminuir com o aumento do tempo de contacto com as nc/Si-LI, sendo esta diminuição mais significativa para a formulação A.

A forma de processamento da amostra parece ter impacto na viabilidade celular, visto que a diferença de citotoxicidade entre as 24 e 48 horas para a formulação A foi mais significativa para a amostra de nc/Si-LI em suspensão do que para a liofilizada (AS e AL), a amostra B é inconclusiva. Ao final das 48 horas de incubação verificou-se a sedimentação das nc/Si-LI no fundo do poço, formando uma espécie de monocapa o que pode ter dificultado o acesso aos nutrientes e sais de que as células necessitam para o seu normal crescimento e desenvolvimento.

Para este ensaio, um dos controlos negativos foi meio de cultura com nc/Si-LI, por forma a se averiguar se a leitura da absorvância estaria a ser afetada por nc/Si-LI que tivessem permanecido no interior do poço, mesmo após sucção e transferência do volume para a placa onde se efetua a leitura da absorvância. Concluiu-se que o valor de absorvância

não é afetado pela presença de nc/Si-LI no volume a analisar. Desta forma, os resultados obtidos podem dever-se a possíveis interações específicas entre as nc/Si-LI com o reagente WST-1 quando na presença de células, ou por algum tipo de interação específico entre as nc/Si-LI e as células. Além disso, verificou-se que as concentrações de nc/Si normalmente testadas na literatura eram bastante inferiores às usadas neste trabalho tendo-se então reduzido consideravelmente as concentrações de nc/Si-LI a testar nos ensaios seguintes ²⁰⁴⁻²⁰⁷.

No segundo bloco ambas as concentrações das duas formulações apresentam um comportamento idêntico para os dois pontos temporais. Os resultados foram no geral mais satisfatórios e coerentes, mas longe de serem os pretendidos e esperados, visto que para estas concentrações a viabilidade celular obtida na literatura para nc/Si é superior a 80% ¹⁸⁶. Por forma a identificar uma concentração não tóxica de nc/Si-LI, foram testadas concentrações inferiores, tendo-se também optado por centrifugar as suspensões de nc/Si-LI, uma vez que a água que estávamos a adicionar ao meio de cultura poderia estar a influenciar o equilíbrio osmótico do mesmo, tendo impacto direto no desenvolvimento das células.

No terceiro bloco de resultados apresentado na Figura 35 observa-se que a única concentração para a qual a viabilidade é satisfatória após 48 horas de incubação é a de 0,005 mg/mL. De forma geral, os valores de viabilidade celular obtidos para as formulações sujeitas a centrifugação são superiores aos das nc/Si-LI processadas de forma diferente. Estes resultados parecem indicar que ao adicionar a amostra centrifugada não se afeta o equilíbrio osmótico.

Com estes resultados determinou-se a concentração de nc/Si-LI que não apresenta efeito citotóxico para 48 horas de contacto, e demonstrou-se que parece existir uma relação entre a viabilidade celular e o tipo de processamento a que as nc/Si-LI são sujeitas.

Nesta fase colocou-se a hipótese de que a lixiviação de LI do interior das nc/Si-LI para o meio poderia justificar a baixa viabilidade celular observada, apesar de haver indicações de estudos prévios que este LI não era citotóxico. Esta afirmação é apoiada pelas evidências encontradas e apresentadas no Capítulo 2.4.. Por forma, a esclarecer esta possibilidade foram realizados ensaios com LI puro.

Líquido Iónico ([P_{6,6,6,14}][NTf₂])

Os resultados obtidos para a citotoxicidade do LI são apresentados na Figura 36.

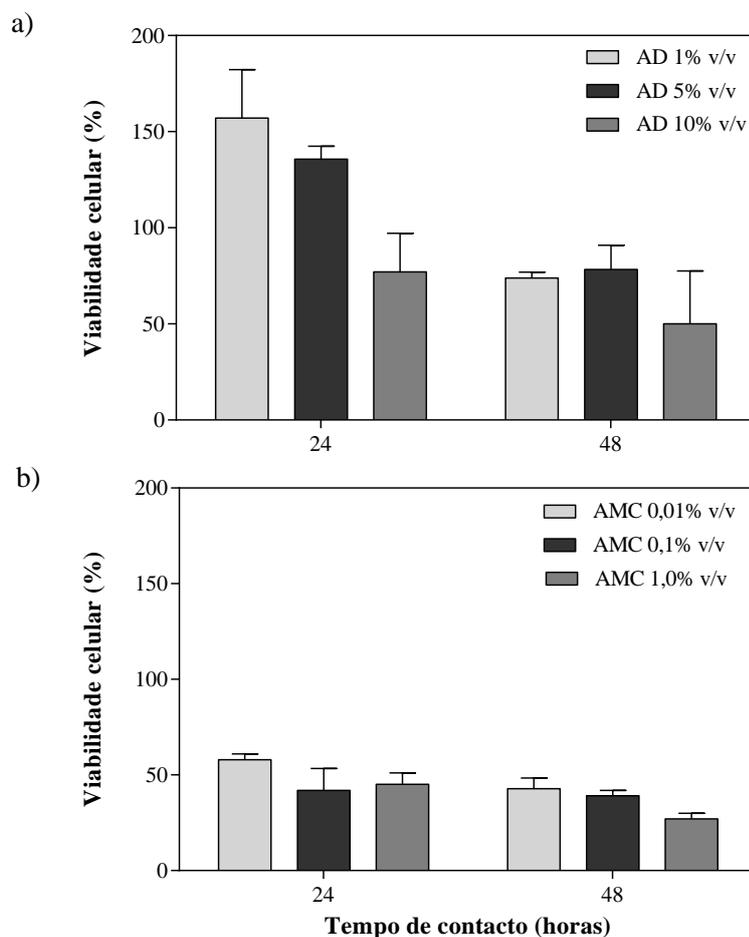


Figura 36 – Viabilidade celular após 24 e 48 horas de incubação com o LI, para duas metodologias de adição de LI no meio de cultura: a) adição direta no poço (AD), concentrações de 1, 5 e 10% v/v; b) dissolução prévia em meio de cultura (AMC), concentrações de 0,01, 0,1 e 1% v/v.

Para os ensaios em que o LI foi diretamente adicionado ao meio de cultura do poço com a monocamada de células já formada (Figura 36 a)) foram testadas as concentrações de 1 e 5% v/v, uma vez que estas haviam sido previamente testadas por um membro do grupo GSP que obteve resultados de viabilidade celular aceitáveis. Os resultados foram de 100 e 110% de viabilidade celular após 24 horas, tendo esta reduzido para 90 e 95% após 72 horas de contacto para as concentrações de LI de 1 e 5% v/v, respetivamente ¹³³. Contudo, no presente trabalho o mesmo não foi verificado, tendo a viabilidade celular reduzido de forma significativa das 24 para as 48 horas, 47,0% e 57,7% para as concentrações de LI de 1 e 5% v/v, respetivamente. Estes resultados indicam que as concentrações de LI testadas são muito elevadas e mesmo que o LI se dissolva apenas parcialmente no meio de cultura, a quantidade dissolvida é suficiente para afetar a

viabilidade celular. Para além deste facto, observou-se que o LI não solubiliza instantaneamente no meio de cultura, formando uma segunda fase, pelo que o ensaio realizado desta forma não simula o que ocorre quando se adicionam nc/Si-LI aos poços de cultura. Adicionalmente, testaram-se concentrações de LI mais baixas tendo por base valores encontrados na literatura ^{208,209}. Os resultados apresentados na Figura 36 b) mostram que esta modificação procedimental teve um impacto claro nos resultados obtidos, visto que apesar das concentrações testadas serem significativamente inferiores, a viabilidade celular diminui de forma bastante significativa para as 24 horas de contacto, sendo apenas superior a 50% para a concentração 0,01% v/v (57,9%), seguida de uma ligeira redução para as 48 horas, em que os valores de viabilidade são inferiores a 45% para toda a gama de concentrações testada.

Conclui-se com estes resultados que o nível de citotoxicidade do LI varia consideravelmente consoante a metodologia utilizada para a realização do ensaio de citotoxicidade. Quando se coloca o LI a dissolver em meio de cultura (agitação orbital de 200 rpm, a 25 °C, durante 72 horas), o LI apesar de pouco solúvel dissolve mais do que quando adicionado diretamente ao volume contido no poço, sem ser sujeito a qualquer tipo de homogeneização. O impacto considerável na viabilidade pode ser justificado pelo desequilíbrio iónico gerado no meio de cultura após adição do LI que provoca *stress* celular podendo culminar com a morte das células. Outra justificação possível, é o LI interagir com a bicamada fosfolipídica das células, originando a sua rutura e, conseqüentemente, morte celular.

Por forma a confirmar a toxicidade do LI estudado, adaptou-se o protocolo descrito na literatura ¹³² para avaliação da citotoxicidade do [P_{6,6,6,14}][NTf₂] e cujo procedimento se encontra descrito no capítulo 4.6. Neste caso, o tipo de ensaio para aferir a citotoxicidade foi o LDH, o LI foi dissolvido previamente em HBSS, os tipos celulares foram diferentes e o tempo de contacto com as células em cultura foi de apenas 4 horas. Os valores de viabilidade celular obtidos apresentam-se na Figura 37.

Os resultados obtidos são idênticos aos apresentados na literatura o que significa que os resultados de viabilidade celular satisfatórios obtidos não são diretamente dependentes do tipo de células utilizado, nem do operador. Estes resultados parecem indicar que ao trocar o meio de cultura original por HBSS (como na referência ¹³²), este por ser rico em sais (como por exemplo, cloreto de sódio, cloreto de potássio, fosfato de potássio e fosfato de sódio) promove a troca do catião e/ou do anião do LI por iões do

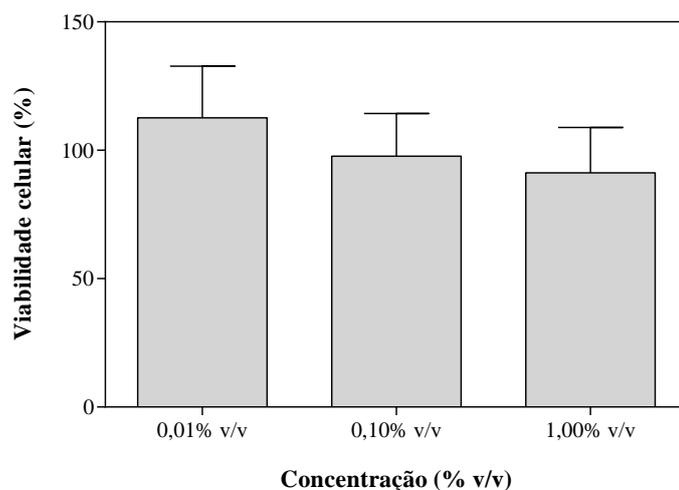


Figura 37 – Viabilidade celular pelo ensaio LDH para 4 horas de incubação com o LI em HBSS para as concentrações de 0,01, 0,1 e 1% v/v.

meio, dando origem a produtos menos tóxicos do que os iniciais ²¹⁰. Por oposição, o meio de cultura usado neste trabalho, DMEM/F-12, não contém sais, pelo que tanto o catião como o anião originais do LI vão estar solubilizados no meio que vai estar em contacto com as células. Tal como discutido anteriormente, desta forma quer o anião quer o catião do LI podem interagir com a bicamada fosfolipídica das células, levando à sua rutura e consequente morte celular.

Finalmente é importante referir que o período de contato foi de apenas 4 horas de acordo com o protocolo original, sendo este um curto período de incubação apenas útil para aferir se o composto apresenta citotoxicidade aguda.

A realização do ensaio LDH também teve como objetivo avaliar se o tipo de metodologia escolhido para determinação da citotoxicidade do LI teria impacto significativo nos resultados obtidos. Para o efeito, adaptou-se o protocolo descrito em Rosa (2013), no qual é aferida a citotoxicidade para o mesmo LI para as concentrações de 1 e 5% v/v. De referir que o tipo de ensaio realizado foi o LDH e os tipos celulares diferentes. Os resultados obtidos são apresentados na Figura 38.

Neste ensaio, aquando da adição direta do LI ao poço procedeu-se à homogeneização do volume do poço com a pipeta. Esta etapa poderá ser justificativa dos resultados obtidos serem tão discrepantes dos apresentados na literatura ¹³³, uma vez que este processo estimula a solubilização do LI no meio de cultura e facilita o contacto direto entre este e as células.

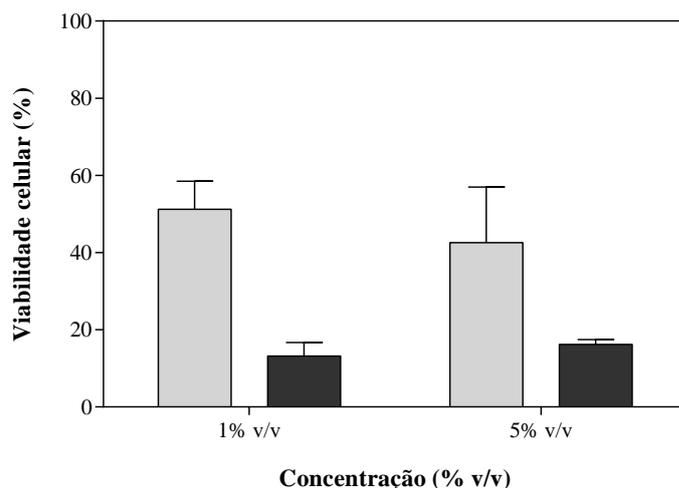


Figura 38 – Viabilidade celular pelo ensaio LDH para 24 e 72 horas de incubação com o LI para as concentrações de 1 e 5% v/v. (Legenda: ■ – 24 horas; ■ – 48 horas).

A Figura 38 permite verificar que o composto deixa de ser biocompatível logo após 24 horas, porém em Rosa (2013) este permanece biocompatível após 72 horas de incubação.

Finalmente, e tendo em conta os resultados obtidos, conclui-se que a citotoxicidade atribuída ao LI é muito dependente da sua solubilização no meio de cultura, pelo que foi estudado o efeito do tempo de incubação do meio de cultura com o LI, após 72 horas de dissolução iniciais, na viabilidade celular (Figura 39).

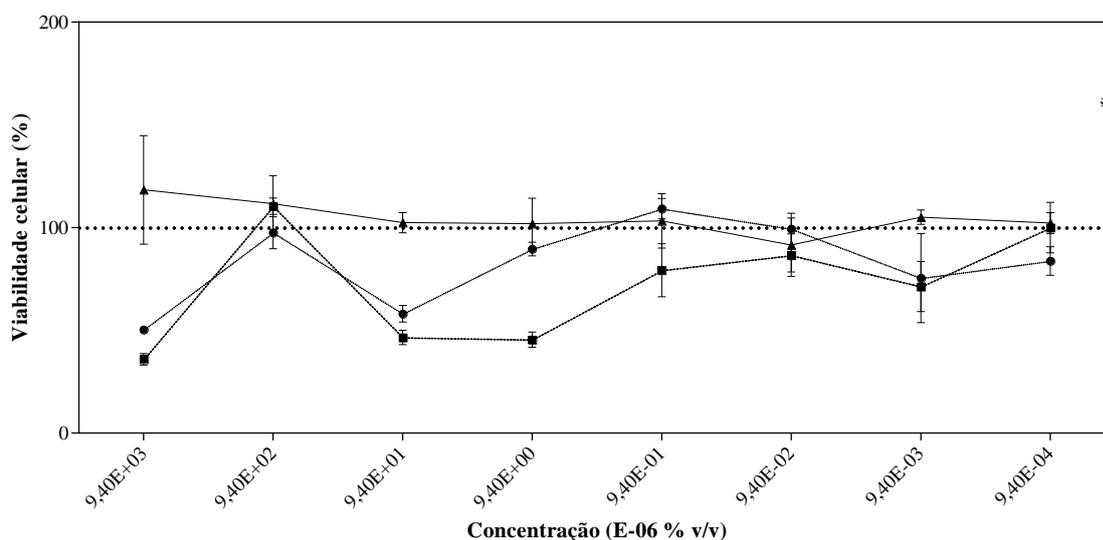


Figura 39 – Evolução temporal da viabilidade celular para 24 horas de incubação com o LI para três tempos de dissolução em meio de cultura. (Legenda: -▲- 72 horas; ●- 96 horas; -■- 120 horas).

Na Figura 39 verifica-se que após 72 horas a maior concentração testada apresenta uma percentagem de viabilidade celular aceitável, porém com o aumento do tempo de

contacto a concentração máxima não-citotóxica tende a diminuir, passando a ser de $9,4 \times 10^{-6}$ % v/v para as 96 horas e de $9,4 \times 10^{-8}$ % v/v para as 120 horas. Isto deve-se ao facto de ao prolongar o período de tempo em que o LI permanece em contacto com o meio de cultura, sob agitação e temperatura controlada, ocorre maior solubilização do LI no mesmo. A concentração não-citotóxica não estabilizou ao fim de 5 dias de contacto sucessivo e por limitações temporais não foi possível prolongar a duração do ensaio.

Scaffolds à base de ácido hialurónico e colagénio

Primeiramente, começou-se por avaliar a citotoxicidade dos *scaffolds* que apresentaram melhor estabilidade em PBS a 37 °C. Os resultados de viabilidade celular são apresentados na Figura 40.

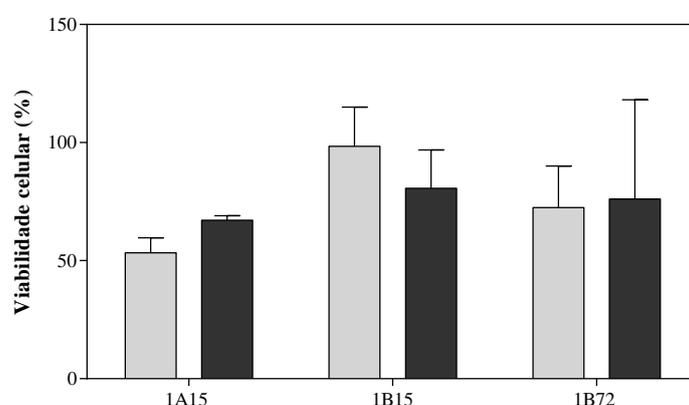


Figura 40 – Viabilidade celular para 24 e 48 horas de incubação para três formulações de *scaffolds* que diferem no grau de reticulação (A e B) e tempo de reticulação (15 e 72 horas). (Legenda: ■ – 24 horas; ■ – 48 horas). Nota: a concentração de reticulantes para a formulação 1A é inferior à da formulação 1B.

Na Figura 40 é possível verificar que o *scaffold* 1B15 é o que apresenta melhores resultados de viabilidade celular, 98,4% após 24 horas e 80,6% após 48 horas, o que pode ser devido às suas propriedades mecânicas e porosidade estimularem o crescimento e proliferação celular. A mesma formulação reticulada durante mais tempo (1B72) também apresenta resultados de viabilidade celular aceitáveis (72,5% e 76,1%, respetivamente), porém a estrutura tridimensional deste *scaffold* fica menos estável após o período de incubação com as células, tendo sido excluída para caracterização posterior. O suporte polimérico com menor grau de reticulação (1A15) não apresentou resultados de viabilidade satisfatórios. No entanto, como não se sabia com exatidão de que forma a incorporação das nc/Si-LI na formulação do *scaffold* poderia influenciar o processo de reticulação, optou-se por manter a matriz 1A15 para ensaios posteriores.

A etapa seguinte consistiu na realização de ensaios de proliferação nos *scaffolds* com diferentes percentagens de nc/Si-LI incorporadas na sua estrutura, tendo estas sido

incorporadas de diferentes formas, visto que já foi confirmado que este fator tem impacto na viabilidade celular. Começou-se por testar matrizes poliméricas em que a quantidade de nc/Si-LI da formulação A adicionadas correspondia a 30 e 60% do seu peso (wt.). As nc/Si-LI em suspensão (S) e centrifugadas (C) foram ou adicionadas à mistura de reagentes para obtenção dos *scaffolds* ou integradas após liofilização *scaffolds*. Isto é, as nc/Si-LI foram adicionadas a um determinado volume de meio de cultura e, após homogeneização da solução, procedeu-se à pipetagem do volume correspondente ao do *swelling* máximo do *scaffold* no interior do mesmo. Os resultados são apresentados na Figura 41.

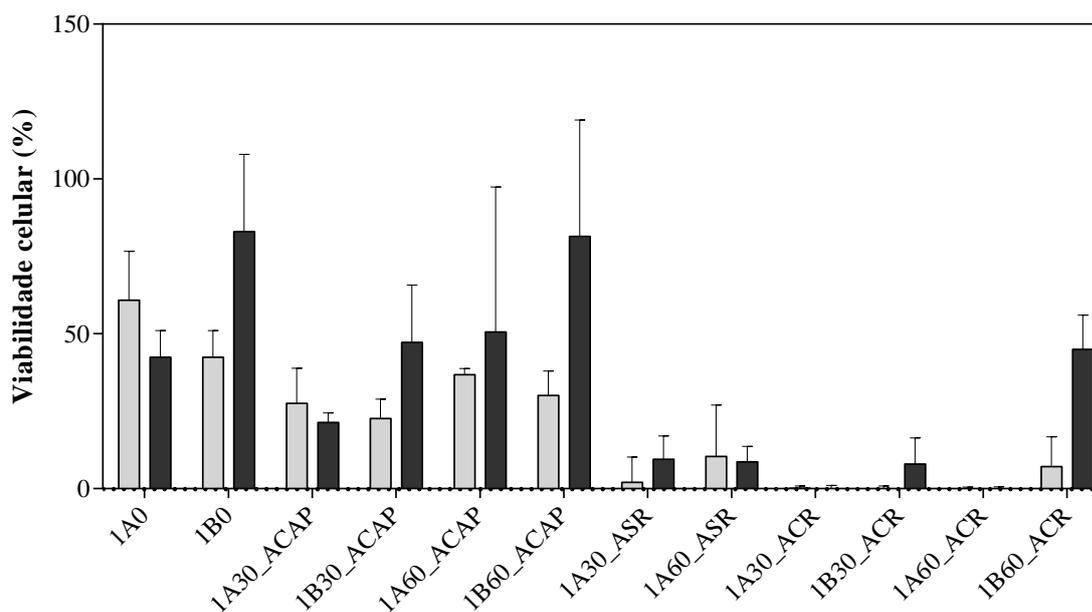


Figura 41 - Viabilidade celular para 24 e 48 horas de incubação para duas formulações de *scaffolds* que diferem no grau de reticulação. Neste ensaio procedeu-se à incorporação de três concentrações de nc/Si-LI da formulação A centrifugadas (AC) ou em suspensão (S) nos *scaffolds*: 0, 30 e 60% wt., por duas metodologias distintas: aquando da reticulação (R) e após liofilização (AP). (Legenda: ■ – 24 horas; ■ – 48 horas). Nota: a concentração de reticulantes para a formulação 1A é inferior à da formulação 1B.

Os valores de viabilidade celular obtidos foram inferiores a 50% para a maioria das amostras, tendo em conta os erros associados. Conclui-se que independentemente da concentração de nc/Si-LI, grau de reticulação do *scaffold*, metodologia de processamento das nc/Si-LI e técnica de integração das nc/Si-LI no *scaffold*, nenhum deles é apropriado à aplicação pretendida. De referir que os *scaffolds* em que as nc/Si-LI foram integradas após obtenção dos mesmos obtiveram resultados mais altos de viabilidade celular (códigos em que aparece AP). Nesta metodologia de incorporação das nc/Si-LI, adição posterior, o processo de reticulação decorre sem interferência das nc/Si-LI, pelo que o efeito de reticulação adicional provocado pelas mesmas, comprovado nos ensaios de *swelling* (Figura 32), não se verifica para estas amostras. Por outro lado, o *scaffold*, com nc/Si-LI incorporadas aquando do processo de reticulação, provavelmente apresenta uma

porosidade e uma estrutura distinta, consequência da reticulação promovida pelas nc/Si-LI, que pode afetar a forma como as células interagem com ele, sendo a viabilidade celular inferior. Porém, a metodologia de adição de nc/Si-LI após liofilização não era a mais eficiente, pelo que foi descartada.

Com base nos resultados de citotoxicidade, discutidos previamente, após contacto do meio com LI durante 72 horas (Figura 39), foi testada a incorporação nos *scaffolds* da quantidade de nc/Si-LI considerada como não-citotóxica ($9,4 \times 10^{-3}$ % v/v) para este ponto temporal. Após 72 horas de incubação destes *scaffolds* com as células realizou-se o ensaio WST-1, e os resultados são apresentados na Figura 42.

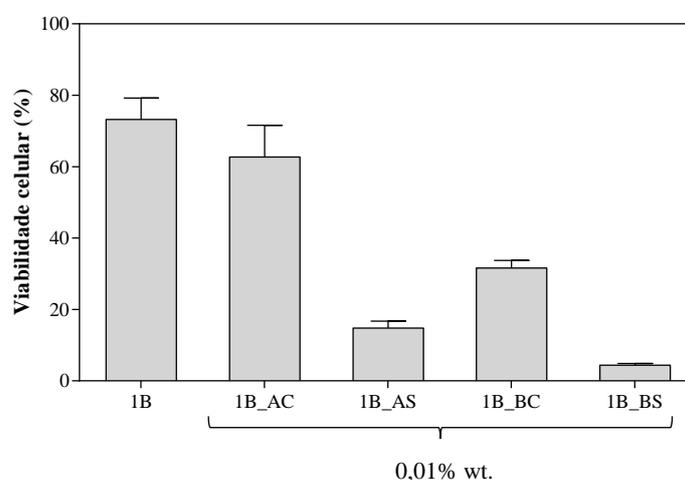


Figura 42 - Viabilidade celular para 72 horas de incubação para cinco formulações de *scaffolds* 1B. Neste ensaio procedeu-se à incorporação de nc/Si-LI na concentração de 0 e 0,01% wt. para as formulações de nc/Si-LI (A e B) sujeitas a dois tipos de processamento: centrifugadas (C) e em suspensão (S). (Legenda: ■ – 24 horas; ■ – 48 horas).

Para este ensaio foram testadas as duas formulações de nc/Si-LI (A e B) para duas metodologias de processamento distintas (em suspensão (S) e centrifugadas (C)). Ao comparar-se as percentagens de viabilidade obtidas para as nc/Si-LI centrifugadas, 62,7% (formulação 1B_AC) e 31,6% (formulação 1B_BC), com os obtidos para as cápsulas em suspensão, 14,8% (formulação 1B_AS) e 4,4% (formulação 1B_BS), conclui-se que a centrifugação das nc/Si-LI é a metodologia de processamento mais adequada. Os *scaffolds* sem nc/Si-LI incorporadas apresentam um nível de viabilidade celular de 73,2%, logo o *scaffold* com nc/Si-LI incorporadas que apresentou melhor desempenho representou uma redução de viabilidade celular de 14,3%. Este valor é considerado satisfatório apesar de, em trabalhos futuros, dever-se proceder à otimização do mesmo.

A diferença de viabilidade celular associada ao tipo de processamento a que as cápsulas são submetidas, deve-se possivelmente ao facto de, durante o tempo de

armazenamento das mesmas, o LI ter tempo de se dissolver na água em que se encontram suspensas. Posteriormente, aquando da adição de determinado volume de suspensão de nc/Si-LI à mistura polimérica, o LI, dissolvido na água, é incorporada no *scaffold* interagindo diretamente com o meio de cultura e com as células, quando estas proliferam no interior do *scaffold*.

A formulação A apresentou melhores resultados em termos de citotoxicidade, comparativamente à formulação B, pelo que os ensaios de sorção/libertação de O₂ foram apenas realizados para a formulação A.

Após realização do ensaio WST-1, obtiveram-se imagens microscópicas dos diferentes poços da placa que permitiram a avaliação visual da distribuição das células nos controlos e nos *scaffolds*, sem e com nc/Si-LI incorporadas (Figura 43).

A análise das duas primeiras filas de imagens da Figura 43 permite verificar uma ligeira diminuição do número de células, quando se comparam as alíneas b) e c) da Figura 43, devido ao contacto destas com o *scaffold*. Porém, os resultados são satisfatórios. Nas Figuras 43 c) e d) observa-se a distribuição das células pela superfície do *scaffolds* sem nc/Si-LI. Quando estas duas imagens são comparadas com a Figura 43 e) e f) verifica-se uma redução não significativa do número de células entre os *scaffolds* 1B e os *scaffolds* 1B_AC, sendo que na Figura 43 e) é possível observar parte da estrutura do *scaffold* e as células que se encontram no seu interior. As Figuras 43 g) e h), correspondentes à formulação B de nc/Si-LI incorporadas no *scaffold* (1B_BC) apresentam uma redução considerável do número de células observado, quando comparadas com as imagens anteriores.

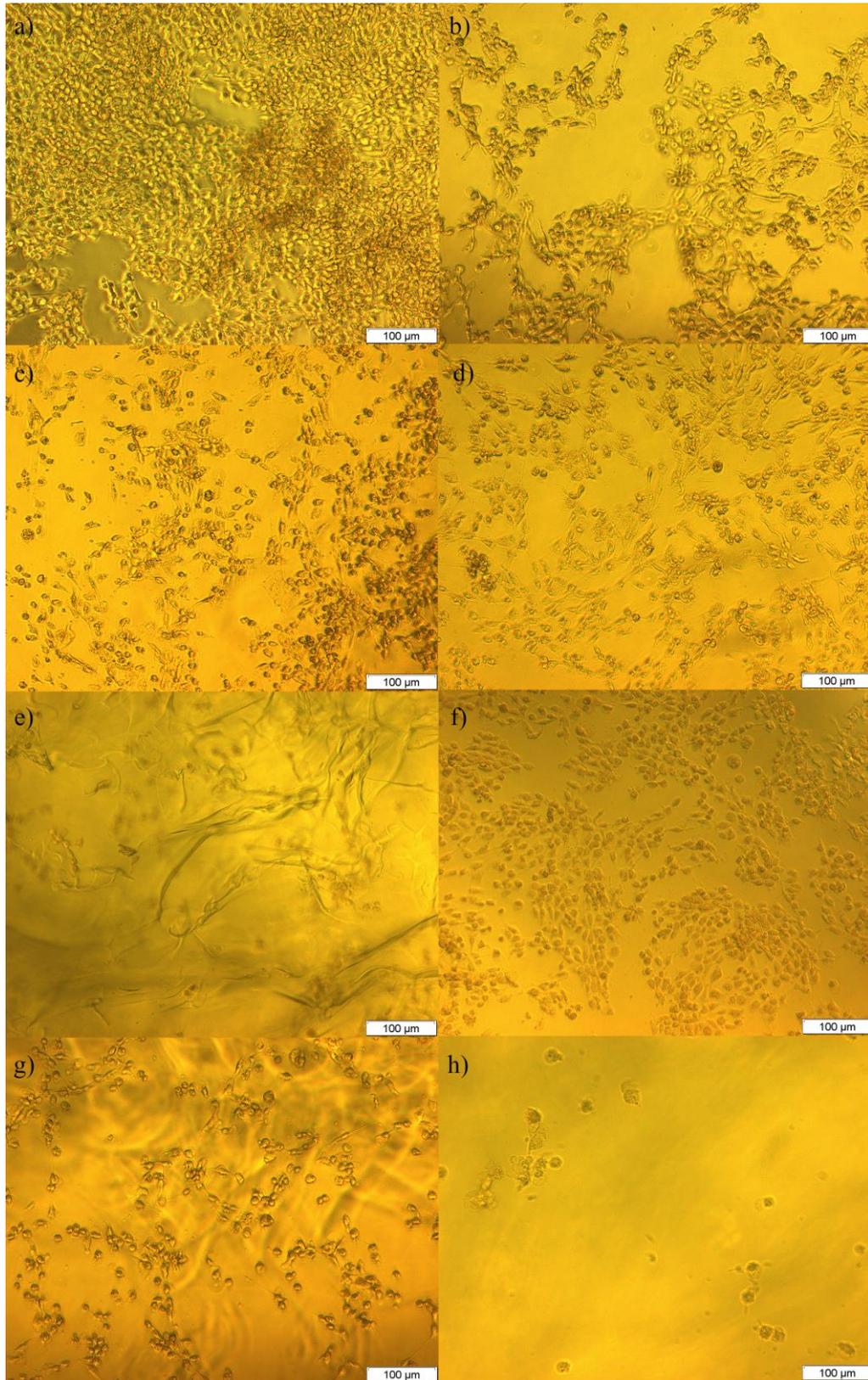


Figura 43 - Imagens microscópicas dos scaffolds respeitantes aos resultados de viabilidade celular, apresentados na Figura 42, após realização do teste WST-1. a) e b) controlo: células; c) e d) controlo: *scaffold* 1B; e) e f) *scaffold* 1B_AC: com nc/Si-LI formulação A centrifugadas incorporadas; g) e h) *scaffold* 1B_BC: com nc/Si-LI formulação B centrifugadas incorporadas.

Ensaio complementares

Para além dos ensaios discutidos foram ainda realizados ensaios complementares com o objetivo de confirmar se a citotoxicidade associada às nc/Si-LI desenvolvidas se deve principalmente ao LI e/ou a interações desfavoráveis entre as nc/Si-LI e as células. Com este objetivo foram realizados ensaios de citotoxicidade para: i) concentração de nc/Si-LI correspondente à quantidade de LI não-citotóxico para 72 horas de incubação, em que se procedeu à remoção do LI do seu interior (Figura 44 a)); ii) partículas de sílica mesoporosa MCM-41, correspondente à quantidade de sílica presente nas nc/Si-LI para a concentração de LI não-citotóxico após 72 horas de incubação; iii) meio de cultura (AMC) que esteve previamente incubado com uma concentração de nc/Si-LI (60% wt. *scaffold*) correspondente a 0,95 e 1,44% v/v de LI para as formulações A e B, respetivamente, sendo que estas foram removidas, posteriormente, por centrifugação (Figura 44 b)).

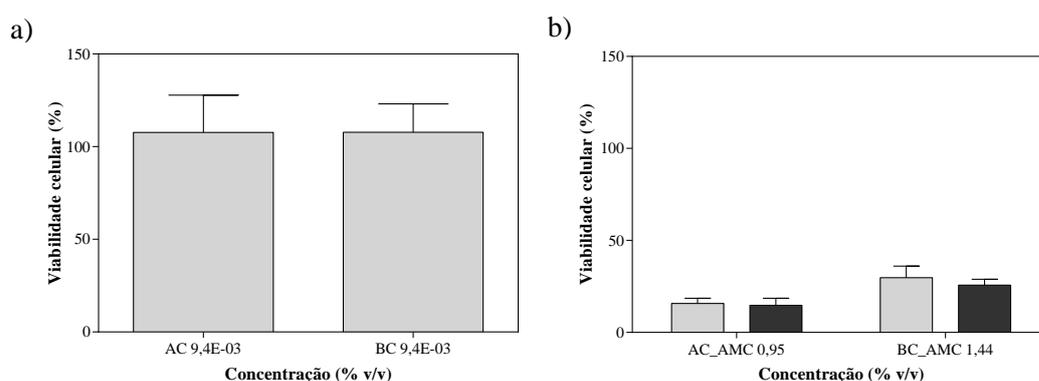


Figura 44 – Viabilidade celular após 24 horas de incubação: a) concentração de nc/Si-LI correspondente à quantidade de LI não-citotóxico para 72 horas de incubação, em que se procedeu à remoção do LI do seu interior; b) meio de cultura (AMC) que esteve previamente incubado com uma concentração de nc/Si-LI (60% wt. *scaffold*) correspondente a 0,95 e 1,44% v/v de LI para as formulações A e B, respetivamente, sendo que estas foram removidas posteriormente, por centrifugação. (Legenda: ■ – 24 horas; ■ – 48 horas).

Na Figura 44 a) em que se testaram nc/Si-LI vazias, correspondente à concentração não-citotóxica de LI após 72 horas de contato, fica provado que as cápsulas vazias não afetam a viabilidade celular. O mesmo foi verificado para as partículas comerciais de sílica mesoporosa MCM-41 (gráfico não apresentado), em que após 72 horas de incubação a viabilidade celular medida foi de $92,5 \pm 6,91\%$. A Figura 44 b) mostra claramente que o meio de cultura que esteve em contacto com as nc/Si-LI apresenta um efeito altamente tóxico para as células, sendo uma evidencia de que as nc/Si-LI libertam LI para o meio de cultura. Estes resultados foram idênticos aos obtidos para o LI puro, apresentados na Figura 37 b). Conclui-se, portanto, que a redução da viabilidade celular está essencialmente associada ao LI utilizado na síntese das nc/Si-LI.

5.5 Sorção/libertação de oxigénio para os sistemas desenvolvidos

Nesta etapa procedeu-se ao estudo da evolução da concentração de oxigénio em meio aquoso quando nele eram adicionadas determinadas quantidades de emulsão LI/[S1:S2:0], nc/Si-LI, *scaffolds* sem e com nc/Si-LI incorporadas. O ensaio de sorção de O₂, no qual se procede à saturação prévia da água seguida da adição de amostra degaseificada, permitiu concluir que todos os sistemas testados são capazes de remover O₂ do meio, devido ao gradiente de difusão gasoso gerado no sistema (Figura 45). A análise do perfil de variação de concentração de O₂ com o tempo permite confirmar que a degaseificação prévia do sistema foi eficiente, sendo que o valor de concentração de O₂ após 1 hora de degaseificação é inferior a 0,2 ppm. Posteriormente, inicia-se a oxigenação do sistema, verificando-se uma sobressaturação inicial do sistema que atinge ~12 ppm. Porém, após 6 horas este valor atinge o valor de equilíbrio (~8,3 ppm).

Nas alíneas a) e b) da Figura 45 a comparação dos três perfis obtidos permite verificar que todas as amostras provocam uma diminuição significativa da concentração de O₂ disponível no meio, sendo esta mais acentuada para a emulsão. Tal deve-se ao facto de quando em emulsão, o LI não ter nenhuma barreira física ao fenómeno de difusão, apenas a interface água/LI. Por outro lado, no caso das cápsulas, a sílica funciona como uma barreira à difusão do gás, dificultando a difusão do O₂ do meio para o LI, que está no interior das nc/Si-LI. Este será o fator limitante, uma vez que a concentração de LI (quantificada através dos dados recolhidos pelo TGA e apresentados na Tabela 12) não difere de forma significativa entre a emulsão e as nc/Si-LI (13,3 e 9,8 mg/mL, respetivamente).

Na Figura 45 c) e d), respeitante aos resultados obtidos para os *scaffolds*, foi possível observar que a diminuição da concentração de O₂ disponível no meio é idêntica para ambos, o que pode dever-se ao facto da concentração de LI presente no *scaffold* com nc/Si-LI incorporadas não ser significativa, por forma a resultar num aumento de gradiente de difusão de O₂ do meio para o interior do *scaffold* com nc/Si-LI incorporadas.

Adicionalmente, foi realizado o ensaio de libertação de O₂, em que o gradiente de difusão do gás acontece no sentido inverso, ou seja, das amostras previamente oxigenadas para o meio aquoso previamente degaseificado. Os resultados são apresentados na Figura 46.

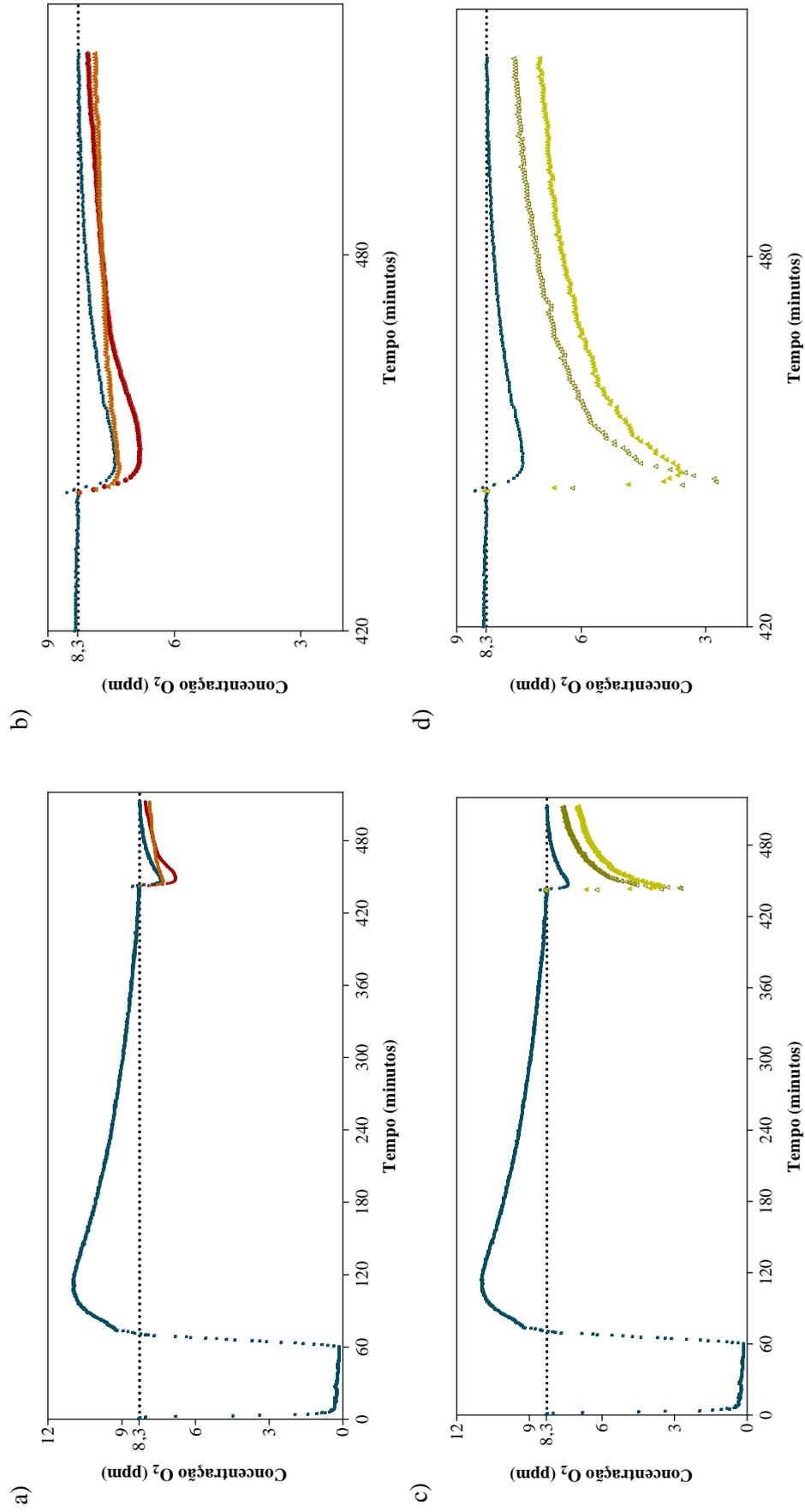


Figura 45 – Ensaio de sorção de O_2 com saturação prévia da água e adição de 10 mL de amostra (1:4 v/v): a) perfis para a água, emulsão de LI e suspensão de nc/Si-LI; b) imagem ampliada da alínea a); c) perfis da água, *scaffolds* sem e com nc/Si-LI incorporadas; d) imagem ampliada da alínea c). (Legenda: ■ – Adição de água desgasificada; ● – Adição de emulsão de LI desgasificada; ▲ – Adição de suspensão de nc/Si-LI desgasificadas; △ – Adição de *scaffolds* sem nc/Si-LI incorporadas desgasificados; ▼ – Adição de *scaffolds* com nc/Si-LI incorporadas desgasificados).

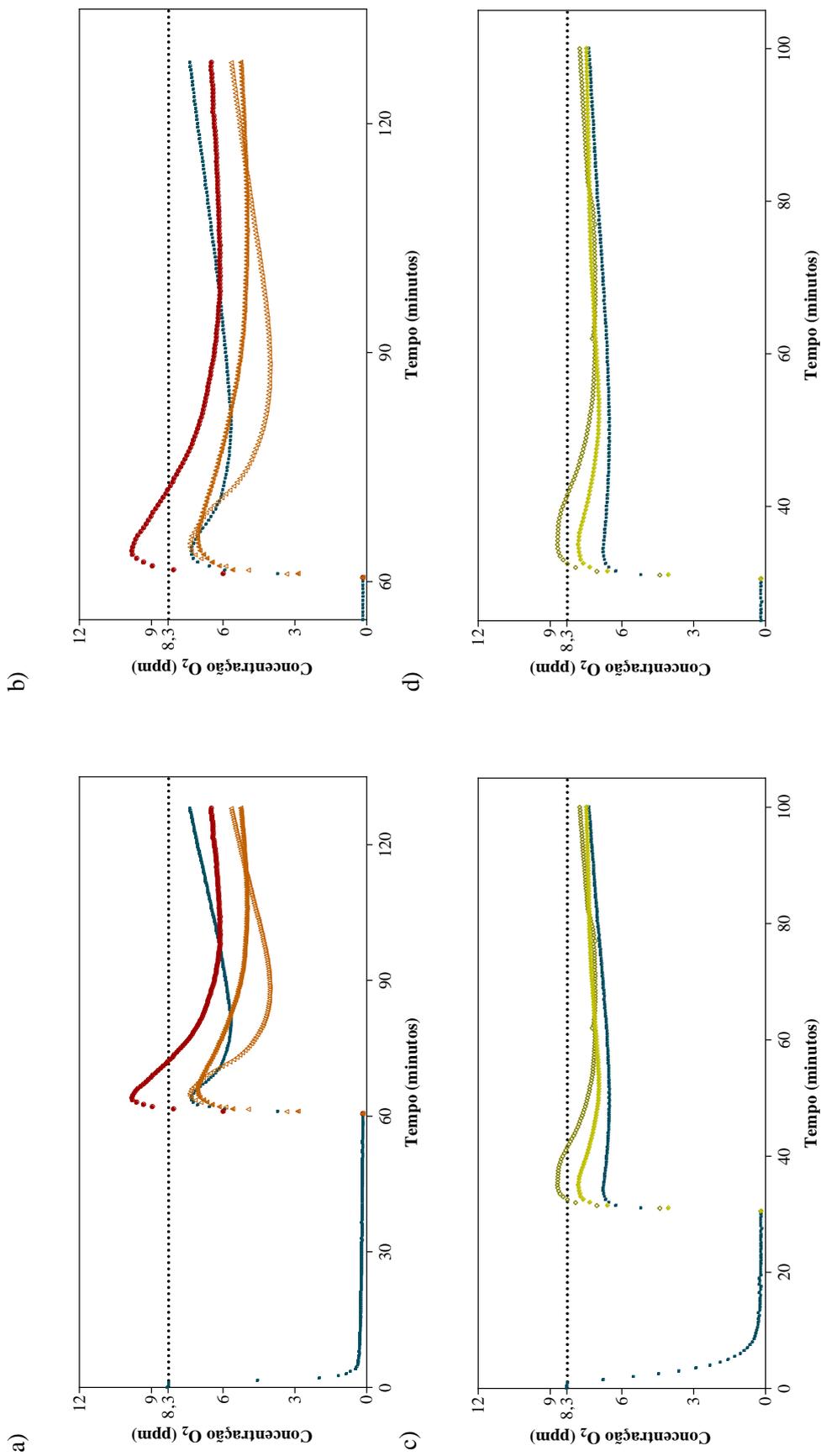


Figura 46 - Ensaio de libertação de O_2 com saturação prévia da água e adição de 10 mL de amostra: a) perfis da água, emulsão de LI e suspensão de nc/Si-LI; b) imagem ampliada da alínea a); c) perfis da água, *scaffolds* sem e com nc/Si-LI incorporadas; d) imagem ampliada da alínea c). (Legenda: ■ - Adição de emulsão de LI gaseificada (1:4 v/v); ▲ - Adição de suspensão de nc/Si-LI gaseificada (1:4 v/v); △ - Adição de suspensão de nc/Si-LI incorporadas gaseificadas (1:2 v/v); ◇ - Adição de *scaffolds* sem nc/Si-LI incorporadas gaseificadas (1:4 v/v); ◆ - Adição de *scaffolds* com nc/Si-LI incorporadas gaseificadas (1:4 v/v)).

Nas alíneas a) e b) da Figura 46 observa-se que a amostra oxigenada de emulsão de LI provoca um rápido aumento na concentração de O₂ no sistema, sendo este superior ao registado para todas as outras amostras em estudo. Para o ensaio com as nc/Si-LI foram testadas duas proporções, 1:2 v/v e 1:4 v/v, confirmando-se que o aumento da concentração de O₂ no sistema é idêntico para ambas, pelo que apesar de se aumentar a proporção nc/Si-LI/meio, o gradiente de difusão permanece inalterado.

Relativamente às alíneas c) e d) da Figura 46, verifica-se que os *scaffolds* com e sem nc/Si-LI incorporadas apresentam perfis de libertação idênticos. Tal como mencionado anteriormente, esta observação pode ser justificada pelo facto da concentração de LI presente no *scaffold* com nc/Si-LI incorporadas não ser significativa, por forma a resultar num aumento de gradiente de difusão de O₂ do interior do *scaffold* com nc/Si-LI incorporadas para o meio.

O cálculo dos coeficientes de difusão de oxigénio ($K_L a_1$) associados aos diferentes perfis obtidos nos ensaios de oxigenação e desoxigenação do sistema permitiu quantificar e comparar a eficiência da difusão de oxigénio para os diferentes sistemas em estudo (Tabela 12). O valor de $K_L a_1$ diz respeito à fase mais crítica da difusão de oxigénio, caracterizado por uma rápida variação devido ao gradiente que se estabelece entre a amostra adicionada e o meio aquoso. No Anexo G encontra-se detalhada a análise feita para determinação dos $K_L a_1$.

Tabela 12 – Condições experimentais usadas para os ensaios de sorção/libertação de O₂ para cada um dos sistemas estudados e valores de $K_L a_1$ determinados por duas metodologias distintas. O $K_L a_1$ corresponde à média dos $K_L a_1$ determinados para cada um dos perfis obtidos e o $K_L a_1$ médio corresponde ao $K_L a_1$ determinado para o perfil correspondente à média dos perfis obtidos separadamente.

Amostra	V _{água inicial} (mL)	V _{amostra adicionada} (mL)	Tempo desgaseificação e oxigenação	LI (mg/mL)	$K_L a_1$	$K_L a_1$ médio
Água	30	10	1 hora	0	-4,50 ± 0,33	-4,52
Emulsão	30	10		13,32 ± 0,27	-3,03 ± 0,23	-3,05
Cápsulas	30	10		9,75 ± 0,16	-4,28 ± 0,11	-4,28
<i>Scaffolds</i> sem cápsulas	30	10		0	-5,26 ± 0,40	-5,25
<i>Scaffolds</i> com cápsulas	30	10		0,27 ± 0,02	-4,50 ± 0,54	-4,48
Ensaio de sorção de O₂						

Ensaio de liberação de O₂	Água	30	10	30 minutos	0	1,42 ± 0,21	1,41
				1 hora	0	1,26 ± 0,03	1,26
	Emulsão	30	10	1 hora	9,01 ± 0,37	1,62 ± 0,07	1,73
	Cápsulas	30	10	1 hora	12,36 ± 0,71	1,17 ± 0,46	1,13
						10	10
	Scaffolds sem cápsulas	30	10	30 minutos	0	1,66 ± 0,36	1,66
	Scaffolds com cápsulas	30	10	30 minutos	0,27 ± 0,02	1,50 ± 0,08	1,60

No ensaio de sorção os $K_L a_1$ têm valores negativos, uma vez que a difusão de O₂ se dá no sentido do seu consumo do meio aquoso. Inversamente, no ensaio de liberação estes tomam valores positivos, em consequência da difusão se dar no sentido do aumento da sua concentração no meio aquoso. Na Figura 47 encontra-se a representação dos valores obtidos para $K_L a_1$ em função da concentração de LI no meio. Esta concentração de LI foi calculada tendo por base os resultados do TGA (Tabela 12).

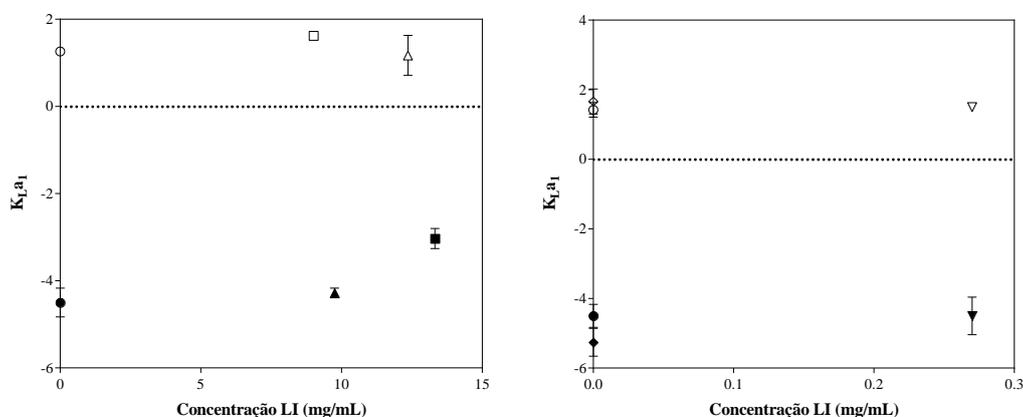


Figura 47 – Representação comparativa dos valores de $K_L a_1$ obtidos em função da concentração de LI. a) para a água, emulsão de LI e suspensão de nc/Si-LI; b) para os *scaffolds* sem e com nc/Si-LI incorporadas. (Legenda: ● – adição de água desgaseificada; ■ – adição de emulsão de LI desgaseificada; ▲ – adição de suspensão de nc/Si-LI desgaseificada (1:4 v/v); ○ – adição água gaseificada; □ – adição de emulsão de LI gaseificada; △ – adição de suspensão de nc/Si-LI gaseificada (1:4 v/v); ▽ - adição de suspensão de nc/Si-LI gaseificada (1:2 v/v); ◆ - adição de *scaffolds* sem nc/Si-LI incorporadas desgaseificados; ▼ - adição de *scaffolds* com nc/Si-LI incorporadas desgaseificados; ◇ - adição de *scaffolds* sem nc/Si-LI incorporadas gaseificados; ▽ - adição de *scaffolds* com nc/Si-LI incorporadas gaseificados).

No ensaio de adição de amostras desgaseificadas, Figura 47 a) (símbolos a cheio) a constante difusiva apresenta valores próximos para a água (●) e suspensão de nc/Si-LI (▲), apesar de esta conter LI. O mesmo não se verificou para a emulsão de LI em que o valor

da constante foi significativamente inferior, contrariamente ao esperado uma vez que a única barreira à difusão é a interface água/LI. No ensaio inverso, adição de amostras gaseificadas (símbolos vazios), a amostra de emulsão de LI foi a que mais rapidamente difundiu O₂ para o meio. Entre as nc/Si-LI e a água, verificou-se que ambas difundem o O₂ para o meio com a mesma velocidade. A emulsão de LI apresentou melhor desempenho devido ao facto de a única barreira existente à difusão do O₂ neste caso ser a interface LI/água, enquanto as nc/Si-LI possuem um revestimento de sílica.

No que diz respeito aos ensaios realizados para os *scaffolds*, Figura 47 b), verificou-se que quer aquando da adição das amostras desgaseificadas, quer aquando da adição das amostras gaseificadas, os valores de constante de difusividade são idênticos, tendo em conta os desvios padrão associados. Isto pode dever-se ao facto da quantidade de LI incorporada no *scaffold* ser demasiado baixa para que traduza num aumento do gradiente de difusividade. Em ensaios futuros deverá proceder-se à incorporação de maior quantidade de nanocápsulas nos *scaffolds* desenvolvidos.

Conclusões

O objetivo deste trabalho consistiu na síntese e caracterização de uma formulação de nanocápsulas otimizada para melhoria da oxigenação do meio para culturas células e de *scaffolds* para Engenharia de Tecidos. As nc/Si-LI foram formadas por encapsulação de um líquido iónico em nanocápsulas de sílica, através de métodos de microemulsão e técnicas de sol-gel. A matriz polimérica foi criada por conjugação de dois polímeros, ácido hialurónico e colagénio, e sujeita a reticulação química pelos agentes EDC e sulfo-NHS conjugados, sendo a estrutura final obtida por liofilização. Estes materiais foram selecionados devido às suas propriedades únicas, como, por exemplo, biocompatibilidade e biodegradabilidade.

A imobilização do LI dentro das nc/Si-LI foi bem-sucedida, porém não foi possível evitar lixiviação do LI pelos tipos de processamento experimentados, tal afirmação é apoiada pelos resultados do FTIR para as amostras liofilizadas e pelo ensaio de citotoxicidade realizado ao sobrenadante que esteve em contacto com nc/Si-LI em suspensão aquosa. Porém, verificou-se que, ao centrifugar as nc/Si-LI, após a sua obtenção, o efeito citotóxico das mesmas era reduzido.

A matriz polimérica à base de ácido hialurónico e colagénio desenvolvida para a incorporação de cápsulas foi bem conseguida, uma vez que permite a proliferação das células no seu interior. Assim sendo, poderá ser utilizada em trabalhos futuros.

Foi avaliada a citotoxicidade das nc/Si-Li, nc/Si, nanocápsulas de sílica mesoporosa MCM-41, LI, sobrenadante da suspensão de cápsulas e matrizes poliméricas, sem e com nc/Si-LI incorporadas, visando aferir se os materiais desenvolvidos eram biocompatíveis. No início do trabalho, todos os materiais utilizados eram considerados biocompatíveis e não tóxicos para o organismo humano, permitindo uma aplicação segura e capaz de servir de alternativa às formulações utilizadas atualmente, tendo por base dados da literatura.

Comprovou-se, contudo, que o LI incorporado na formulação das nanocápsulas é tóxico para as células, pelo que, para trabalhos futuros, terá de se proceder ao desenvolvimento de uma nova formulação de nanocápsulas, em que se proceda à troca do LI por outro que também apresente características hidrofóbicas ou à seleção de outro líquido hidrofóbico com elevada capacidade de solubilização e libertação de gases. Outra hipótese é a otimização desta formulação de nanocápsulas, por forma a que seja assegurado que o LI não é lixiviado para a superfície e exterior da nc/Si-LI. Outra alternativa pode ser

a alteração do propósito do material desenvolvido, podendo o sistema ser otimizado para outras aplicações que não as biomédicas, como, por exemplo, para separação de gases industriais.

Finalmente, foi aferida a capacidade das nc/Si+LI, emulsão de LI e dos *scaffolds* com e sem nc/Si-LI incorporadas para sorção e libertação de O₂, tendo como objetivo avaliar o ser potencial como sistema para fornecimento de oxigênio, quer para culturas celulares *in vitro* quer para *scaffolds* em ET. Todas as amostras estudadas revelaram ser capazes de capturar e difundir O₂, sendo a constante de difusão de O₂, $K_L a_1$, superior para os *scaffolds* com nc/Si-LI incorporadas para o ensaio respeitante à sorção de O₂ e emulsão de LI no ensaio de libertação de O₂, tendo apenas em conta os resultados obtidos para as amostras que possuem LI na sua composição. Desta forma, comprovou-se a capacidade do [P_{6,6,6,14}][NTf₂] para sorção e libertação eficaz de O₂, quer na emulsão, quer encapsulado na nanocápsulas de sílica e posterior incorporação nos *scaffolds* poliméricos.

As condições experimentais para a realização destes ensaios estão a ser otimizadas e deverão ser repetidos num futuro próximo.

Trabalho futuro

Ao longo do desenvolvimento deste trabalho foram sendo identificados aspetos procedimentais que poderiam ser melhorados e que, por limitação temporal, não foram possíveis de aplicar. De referir:

- Reduzir a libertação de LI para a superfície e exterior das nanocápsulas. Neste sentido deve-se ajustar algumas condições da sua síntese, como por exemplo aumentar o tempo de sonicação (garante emulsificação completa do sistema), alterar o sistema de surfactantes (aumentar eficácia da emulsificação do LI), aumentar a quantidade de TEOS adicionada (formação de um revestimento de sílica mais uniforme e menos poroso), reduzir a composição relativa LI/[S1:S2:0] (aumentar eficácia da emulsificação do LI);
- Diminuir temperatura a que ocorre reação de condensação, para que as partículas formadas apresentem uma estrutura mais homogénea;
- Reduzir aglomeração das nc/Si-LI, por aumento do volume de água utilizado aquando da síntese (suspensão mais diluída, logo menor contacto partícula-partícula) ou por aplicação de ultrassons após o processo de síntese (estimula dispersão das partículas no meio);
- Adicionar à formulação da matriz polimérica elementos modificadores que aumentem a biocompatibilidade, como por exemplo PLL (do inglês *Poly-L-Lysine*) que estimula a adesão celular;
- Realizar microscopia SEM para as matrizes poliméricas com maior quantidade de nanocápsulas incorporadas, após o procedimento de lavagem, para verificar se se observam as mesmas na estrutura da matriz;
- Proceder à incorporação de um marcador fluorescente para a sílica aquando preparação da mistura polimérica para a matriz com cápsulas incorporadas, para que seja possível observar como estas se distribuem na estrutura polimérica;
- Escolher outro LI hidrofóbico menos citotóxico (p.e., da família das colinas ou imidazólios, ou então proceder-se à troca do anião por outro menos hidrofóbico, sem que a hidrofobicidade do IL seja comprometida). Outra possibilidade é otimizar o revestimento de sílica, por forma a que não ocorra lixiviação do LI no meio em que é administrado (p.e., aumento da espessura, diminuição da porosidade).

Posteriormente, repetir os ensaios de citotoxicidade para o LI, formulação de nanocápsulas com o novo LI e proceder à incorporação da mesma na matriz à base ácido hialurónico e colagénio desenvolvida;

- Realizar microscopia confocal dos *scaffolds* com nc/Si-LI após proliferação celular no seu interior, por forma a avaliar a distribuição das células;
- Melhorar as condições experimentais do ensaio de sorção/libertação de O₂ com recurso a caudalímetros e medidores de pressão, por forma a melhor controlar-se o fluxo de O₂ e N₂.

Referências bibliográficas

1. Oomen PE, Skolimowski MD, Verpoorte E. Implementing oxygen control in chip-based cell and tissue culture systems. *Lab Chip*. 2016;16(18):3394-3414.
2. Fedorovich NE, Kuipers E, Gawlitta D, Dhert WJA, Alblas J. Scaffold Porosity and Oxygenation of Printed Hydrogel Constructs Affect Functionality of Embedded Osteogenic Progenitors. *Tissue Eng Part A*. 2011;17(19-20):2473-2486.
3. Kodama S, Mori I, Roy K, Yang Z, Suzuki K, Watanabe M. Culture condition-dependent senescence-like growth arrest and immortalization in rodent embryo cells. *Radiat Res*. 2001;155(1):254-262.
4. Eliasson P, Jönsson J. The hematopoietic stem cell niche: low in oxygen but a nice place to be. *J Cell Physiol*. 2010;222(1):17-22.
5. Moussavi-Harami F, Duwayri Y, Martin JA, Moussavi-Harami F, Buckwalter JA. Oxygen effects on senescence in chondrocytes and mesenchymal stem cells: consequences for tissue engineering. *Iowa Orthop J*. 2004;24:15.
6. Ivanovic Z, Hermitte F, de la Grange PB, et al. Simultaneous maintenance of human cord blood SCID-repopulating cells and expansion of committed progenitors at low O₂ concentration (3%). *Stem Cells*. 2004;22(5):716-724.
7. Ivanovic Z. Respect the anaerobic nature of stem cells to exploit their potential in regenerative medicine. *Regen Med*. 2013;8(6):677-680.
8. Jež M, Rožman P, Ivanović Z, Bas T. Concise Review: The Role of Oxygen in Hematopoietic Stem Cell Physiology. *J Cell Physiol*. 2015;230(9):1999-2005.
9. White JC, Godsey ME, Bhatia SR. Perfluorocarbons enhance oxygen transport in alginate-based hydrogels. *Polym Adv Technol*. 2014;25(11):1242-1246.
10. Chung TW, Yang J, Akaïke T, et al. Preparation of alginate/galactosylated chitosan scaffold for hepatocyte attachment. *Biomaterials*. 2002;23(14):2827-2834.
11. Rodríguez-vázquez M, Vega-ruiz B, Ramos-zúñiga R, Saldaña-koppel DA, Quiñones-olvera LF. Chitosan and Its Potential Use as a Scaffold for Tissue Engineering in Regenerative Medicine. *BioMed Research International*. 2015;2015.
12. Yan J, Li X, Liu L, Wang F, Tai WZ, Zhang Q. Potential use of collagen-chitosan-hyaluronan tri-copolymer scaffold for cartilage tissue engineering. *Artif Cells, Blood Substitutes, Biotechnol*. 2006;34(1):27-39.
13. Rad AT, Ali N, Kotturi HSR, et al. Conducting scaffolds for liver tissue engineering.

- J Biomed Mater Res - Part A*. 2014;102(11):4169-4181.
14. Caló E, Khutoryanskiy V V. Biomedical applications of hydrogels: A review of patents and commercial products. *Eur Polym J*. 2015;65:252-267.
 15. Rossi F, Santoro M, Perale G. Polymeric scaffolds as stem cell carriers in bone repair. *J Tissue Eng Regen Med*. 2015;9(10):1093-1119.
 16. Martin JR, Gupta MK, Page JM, et al. A porous tissue engineering scaffold selectively degraded by cell-generated reactive oxygen species. *Biomaterials*. 2014;35(12):3766-3776.
 17. Guelcher SA. Biodegradable Polyurethanes: Synthesis and Applications in Regenerative Medicine. *Tissue Eng Part B Rev*. 2008;14(1):3-17.
 18. Rezwan K, Chen QZ, Blaker JJ, Boccaccini AR. Biodegradable and bioactive porous polymer/inorganic composite scaffolds for bone tissue engineering. *Biomaterials*. 2006;27(18):3413-3431.
 19. Boccaccini AR, Blaker JJ, Maquet V, Day RM, Jérôme R. Preparation and characterisation of poly(lactide-co-glycolide) (PLGA) and PLGA/Bioglass® composite tubular foam scaffolds for tissue engineering applications. *Mater Sci Eng C*. 2005;25(1):23-31.
 20. Yao J, Radin S, S. Leboy P, Ducheyne P. The effect of bioactive glass content on synthesis and bioactivity of composite poly (lactic-co-glycolic acid)/bioactive glass substrate for tissue engineering. *Biomaterials*. 2005;26(14):1935-1943.
 21. Luginbuehl V, Meinel L, Merkle HP, Gander B. Localized delivery of growth factors for bone repair. *Eur J Pharm Biopharm*. 2004;58(2):197-208.
 22. Vozzi G, Corallo C, Carta S, et al. Collagen-gelatin-genipin-hydroxyapatite composite scaffolds colonized by human primary osteoblasts are suitable for bone tissue engineering applications: In vitro evidences. *J Biomed Mater Res - Part A*. 2014;102(5):1415-1421.
 23. Kim HL, Jung GY, Yoon JH, et al. Preparation and characterization of nano-sized hydroxyapatite/alginate/chitosan composite scaffolds for bone tissue engineering. *Mater Sci Eng C*. 2015;54:20-25.
 24. Lei Y, Sun R, Zhang X, Feng X, Jiang L. Oxygen-Rich Enzyme Biosensor Based on Superhydrophobic Electrode. *Adv Mater*. 2016;28(7):1477-1481.
 25. Jomova K, Valko M. Advances in metal-induced oxidative stress and human disease. *Toxicology*. 2011;283(2-3):65-87.
 26. Quaranta M, Nugroho Prasetyo E, Koren K, et al. Enzyme-based online monitoring

- and measurement of antioxidant activity using an optical oxygen sensor coupled to an HPLC system. *Anal Bioanal Chem.* 2013;405(7):2371-2377.
27. Prasad J, Joshi A, Jayant RD, Srivastava R. Cholesterol biosensors based on oxygen sensing alginate-silica microspheres. *Biotechnol Bioeng.* 2011;108(9):2011-2021.
 28. Chen Q, Huang Z, Chen H, Shapiro H, Beckers J, Hetzel FW. Improvement of tumor response by manipulation of tumor oxygenation during photodynamic therapy. *Photochem Photobiol.* 2002;76(2):197-203.
 29. Dougherty TJ. Photodynamic therapy of cancer. In: *Advances in Photochemotherapy.* Vol 997. International Society for Optics and Photonics; 1989:2-8.
 30. Sibata CH, Colussi VC, Oleinick NL, Kinsella TJ. Photodynamic therapy in oncology. *Expert Opin Pharmacother.* 2001;2(6):917-927.
 31. Via L, Magno S. Photochemotherapy in the treatment of cancer. *Curr Med Chem.* 2001;8(12):1405-1418.
 32. Henderson BW, Fingar VH. Oxygen limitation of direct tumor cell kill during photodynamic treatment of a murine tumor model. *Photochem Photobiol.* 1989;49(3):299-304.
 33. Moan J, Juzeniene A. The role of oxygen in photodynamic therapy. *Adv Photodyn Ther Basic Transl Clin.* 2008;24(5):135-149.
 34. Moen I, Stuhr LEB. Hyperbaric oxygen therapy and cancer—a review. *Target Oncol.* 2012;7(4):233-242.
 35. Zhou Z, Song J, Nie L, Chen X. Reactive oxygen species generating systems meeting challenges of photodynamic cancer therapy. *Chem Soc Rev.* 2016;45(23):6597-6626.
 36. ACCCN. Australian Critical Care Journal. *Elsevier.* 2018;27:7314.
 37. Panwar R, Capellier G, Schmutz N, et al. Current oxygenation practice in ventilated patients-an observational cohort study. *Anaesth Intensive Care.* 2013;41(4):505-514.
 38. Hyzy RC, Editor S, Parsons PE, Editor D, Finlay G. Modes of mechanical ventilation Modes of mechanical ventilation. 2013:1-18.
 39. Allen S, Holena D, McCunn M, Kohl B, Sarani B. A review of the fundamental principles and evidence base in the use of Extracorporeal Membrane Oxygenation (ECMO) in critically ill adult patients. *J Intensive Care Med.* 2011;26(1):13-26.
 40. Sorbo L Del, Cypel M, Fan E. Extracorporeal life support for adults with severe

- acute respiratory failure. *Lancet Respir Med*. 2014;2(2):154-164.
41. Brodie D, Bacchetta M. Extracorporeal Membrane Oxygenation for ARDS in Adults. *N Engl J Med*. 2011;365(20):1905-1914.
 42. Anand S, Jayakumar D, Aronow WS, Chandy D. Role of extracorporeal membrane oxygenation in adult respiratory failure: an overview. *Hosp Pract (1995)*. 2016;44(2):76-85.
 43. Zhu XH, Chen W. In vivo oxygen-17 NMR for imaging brain oxygen metabolism at high field. *Prog Nucl Magn Reson Spectrosc*. 2011;59(4):319-335.
 44. Arai T, Mori K, Nakao S, et al. In vivo oxygen-17 nuclear magnetic resonance for the estimation of cerebral blood flow and oxygen consumption. *Biochem Biophys Res Commun*. 1991;179(2):954-961.
 45. Gerothanassis IP. Oxygen-17 NMR spectroscopy: Basic principles and applications (Part I). *Prog Nucl Magn Reson Spectrosc*. 2010;56(2):95-197.
 46. Pekar J, Ligeti L, Ruttner Z, et al. In Vivo measurement of cerebral oxygen consumption and blood flow using ^{17}O MRI. *Magn Reson Med*. 1991;21:313-319.
 47. de Graaf RA, Brown PB, Rothman DL, Behar KL. Natural abundance ^{17}O NMR spectroscopy of rat brain in vivo. *J Magn Reson*. 2008;193(1):63-67.
 48. Jakob PM, Wang T, Schultz G, Hebestreit H, Hebestreit A, Hahn D. Assessment of Human Pulmonary Function Using Oxygen-Enhanced T1 Imaging in Patients with Cystic Fibrosis. *Magn Reson Med*. 2004;51(5):1009-1016.
 49. Arnold JFT, Kotas M, Fidler F, Pracht ED, Flentje M, Jakob PM. Quantitative regional oxygen transfer imaging of the human lung. *J Magn Reson Imaging*. 2007;26(3):637-645.
 50. Chen Q, Jakob PM, Griswold MA, Levin DL, Hatabu H, Edelman RR. Oxygen enhanced MR ventilation imaging of the lung. *Magn Reson Mater Physics, Biol Med*. 1998;7(3):153-161.
 51. Hemberger KRF, Jakob PM, Breuer FA. Multiparametric oxygen-enhanced functional lung imaging in 3D. *Magn Reson Mater Physics, Biol Med*. 2015;28(3):217-226.
 52. Fan AP, Jahanian H, Holdsworth SJ, Zaharchuk G. Comparison of cerebral blood flow measurement with [^{15}O]-water positron emission tomography and arterial spin labeling magnetic resonance imaging: A systematic review. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2016;36(5):842-861.
 53. Vestergaard MB, Lindberg U, Aachmann-Andersen NJ, et al. Comparison of global

- cerebral blood flow measured by phase-contrast mapping MRI with $^{15}\text{O-H}_2\text{O}$ positron emission tomography. *J Magn Reson Imaging*. 2017;45(3):692-699.
54. Deng X, Rong J, Wang L, et al. Chemistry for Positron Emission Tomography: Recent Advances in ^{11}C -, ^{18}F -, ^{13}N - and ^{15}O -labeling Reactions. *Angew Chemie Int Ed*. 2018. Accepted Author Manuscript.
 55. Żyromska A, Małkowski B, Wiśniewski T, Majewska K, Reszke J, Makarewicz R. $^{15}\text{O-H}_2\text{O}$ PET/CT as a tool for the quantitative assessment of early post-radiotherapy changes of heart perfusion in breast carcinoma patients. *Br J Radiol*. 2018;91:1088.
 56. Farris AL, Rindone AN, Grayson WL. Oxygen delivering biomaterials for tissue engineering. *J Mater Chem B*. 2016;4(20):3422-3432.
 57. Shaffer TH, Wolfson MR, Greenspan JS, Hoffman RE, Davis SL, Clark LC. Liquid ventilation in premature lambs: uptake, biodistribution and elimination of perfluorodecalin liquid. *Reprod Fertil Dev*. 1996;8(3):409-416.
 58. Shaffer TH, Wolfson MR. Liquid ventilation: an alternative ventilation strategy for management of neonatal respiratory distress. *Eur J Pediatr*. 1996;155(2):S30-S34.
 59. Rüdiger S. Methods for forecasting the usefulness of perfluorocarbons for blood substitutes. *J Fluor Chem*. 1989;42(3):403-412.
 60. Meinert H, Fackler R, Knoblich A, Mader J, Reutor P, Röhlke W. On the perfluorocarbon emulsions of second generation. *Biomater Artif Cells Immobil Biotechnol*. 1992;20(1):95-113.
 61. Tremper KK, Cullen BF. US Clinical Studies of the Treatment of Anemia with Fluosol-DA 20%. *Artif Organs*. 1984;8(1):19-24.
 62. Spiess BD. Perfluorocarbon emulsions as a promising technology: a review of tissue and vascular gas dynamics. *J Appl Physiol*. 2009;106(4):1444-1452.
 63. Castro CI, Briceno JC. Perfluorocarbon-based oxygen carriers: review of products and trials. *Artif Organs*. 2010;34(8):622-634.
 64. Niiler E. Setbacks for blood substitute companies. *Nature Publishing Group*. 2002:962.
 65. Flaim SF. Pharmacokinetics and side effects of perfluorocarbon-based blood substitutes. *Artif Cells, Blood Substitutes, Biotechnol*. 1994;22(4):1043-1054.
 66. Spahn DR, Kocian R. Artificial O_2 carriers: status in 2005. *Curr Pharm Des*. 2005;11(31):4099-4114.
 67. Goh F, Gross JD, Simpson NE, Sambanis A. Limited beneficial effects of

- perfluorocarbon emulsions on encapsulated cells in culture: Experimental and modeling studies. *J Biotechnol.* 2010;150(2):232-239.
68. Cohn CS, Cushing MM. Oxygen Therapeutics: Perfluorocarbons and Blood Substitute Safety. *Crit Care Clin.* 2009;25(2):399-414.
 69. Palumbo FS, Di Stefano M, Piccionello AP, et al. Perfluorocarbon functionalized hyaluronic acid derivatives as oxygenating systems for cell culture. *RSC Adv.* 2014;4(44):22894-22901.
 70. Pilarek M, Grabowska I, Senderek I, et al. Liquid perfluorochemical-supported hybrid cell culture system for proliferation of chondrocytes on fibrous polylactide scaffolds. *Bioprocess Biosyst Eng.* 2014;37(9):1707-1715.
 71. Chen G, Palmer AF. Hemoglobin Regulates the Metabolic, Synthetic, Detoxification, and Biotransformation Functions of Hepatoma Cells Cultured in a Hollow Fiber Bioreactor. *Tissue Eng Part A.* 2010;16(10):3231-3240.
 72. Centis V, Proulx P, Vermette P. PEGylated liposomes encapsulating human hemoglobin enhance oxygen transfer and cell proliferation while decreasing cell hypoxia in fibrin. *Biochem Eng J.* 2011;55(3):162-168.
 73. Camci-Unal G, Alemdar N, Annabi N, Khademhosseini A. Oxygen-releasing biomaterials for tissue engineering. *Polym Int.* 2013;62(6):843-848.
 74. Ng SM, Choi JY, Han HS, Huh JS, Lim JO. Novel microencapsulation of potential drugs with low molecular weight and high hydrophilicity: Hydrogen peroxide as a candidate compound. *Int J Pharm.* 2010;384(1-2):120-127.
 75. Abdi SIH, Ng SM, Lim JO. An enzyme-modulated oxygen-producing micro-system for regenerative therapeutics. *Int J Pharm.* 2011;409(1-2):203-205.
 76. Wang J, Zhu Y, Bawa HK, et al. Oxygen-generating nanofiber cell scaffolds with antimicrobial properties. *ACS Appl Mater Interfaces.* 2011;3(1):67-73.
 77. Benz S, Nötzli S, Siegel JS, Eberli D, Jessen HJ. Controlled oxygen release from pyridone endoperoxides promotes cell survival under anoxic conditions. *J Med Chem.* 2013;56(24):10171-10182.
 78. Hopfner U, Schenck TL, Chávez MN, et al. Development of photosynthetic biomaterials for in vitro tissue engineering. *Acta Biomater.* 2014;10(6):2712-2717.
 79. Eisenbrey JR, Albala L, Kramer MR, et al. Development of an ultrasound sensitive oxygen carrier for oxygen delivery to hypoxic tissue. *Int J Pharm.* 2015;478(1):361-367.
 80. Cook CA, Hahn KC, Morrisette-McAlmon JBF, Grayson WL. Oxygen delivery

- from hyperbarically loaded microtanks extends cell viability in anoxic environments. *Biomaterials*. 2015;52(1):376-384.
81. Caban S, Aytekin E, Sahin A, Capan Y. Nanosystems for drug delivery. *OA Drug Des Deliv*. 2014;2(1):1-19.
 82. Cheng L, Wang C, Feng L, Yang K, Liu Z. Functional nanomaterials for phototherapies of cancer. *Chem Rev*. 2014;114(21):10869-10939.
 83. Goldberg M, Langer R, Jia X. Nanostructured materials for applications in drug delivery and tissue engineering. *J Biomater Sci Polym Ed*. 2007;18(3):241-268.
 84. Liu X, He M, Lv N, Xu H, Bai L. Selective absorption of CO₂ from H₂, O₂ and N₂ by 1-hexyl-3-methylimidazolium tris(pentafluoroethyl)trifluorophosphate. *J Chem Thermodyn*. 2016;97:48-54.
 85. Ebrahimkhani MR, Neiman JAS, Raredon MSB, Hughes DJ, Griffith LG. Bioreactor technologies to support liver function in vitro. *Adv Drug Deliv Rev*. 2014;69-70:132-157.
 86. Mora-Huertas CE, Fessi H, Elaissari A. Polymer-based nanocapsules for drug delivery. *Int J Pharm*. 2010;385(1-2):113-142.
 87. Zhang Y, Hsu BYW, Ren C, Li X, Wang J. Silica-based nanocapsules: synthesis, structure control and biomedical applications. *Chem Soc Rev*. 2015;44(1):315-335.
 88. Darbandi M, Thomann R, Nann T. Hollow silica nanospheres: in situ, semi-in situ, and two-step synthesis. *Chem Mater*. 2007;19(7):1700-1703.
 89. Letchford K, Burt H. A review of the formation and classification of amphiphilic block copolymer nanoparticulate structures: micelles, nanospheres, nanocapsules and polymersomes. *Eur J Pharm Biopharm*. 2007;65(3):259-269.
 90. Caruso F, Hyeon T, Rotello V, Zink JJ. Nanomedicine themed issue Mesoporous silica nanoparticles in biomedical applications. *Chem. Soc. Rev*. 2012;41(7):2590-2605.
 91. Dixit CK, Bhakta S, Kumar A, Suib SL, Rusling JF. Fast nucleation for silica nanoparticle synthesis using a sol-gel method. *Nanoscale*. 2016;8(47):19662-19667.
 92. Joslin P. Synthesis, characterization and surface modification of nanocrystalline cathode materials for lithium battery applications. <http://shodhganga.inflibnet.ac.in/bitstream/10603/1303/8/08> c. Accessed July, 27.
 93. Zhao D, Wu M, Kou Y, Min E. Ionic liquids: Applications in catalysis. *Catal Today*. 2002;74(1-2):157-189.

94. Rogers RD, Seddon KR. Ionic Liquids - Solvents of the future. *Sci Chem.* 2003;302:792-793.
95. Plechkova N V., Seddon KR. Applications of ionic liquids in the chemical industry. *Chem Soc Rev.* 2008;37(1):123-150.
96. Marsh KN, Boxall JA, Lichtenthaler R. Room temperature ionic liquids and their mixtures - A review. *Fluid Phase Equilib.* 2004;219(1):93-98.
97. Zhao C, Wang H, Yan N, et al. Ionic-liquid-like copolymer stabilized nanocatalysts in ionic liquids: II. Rhodium-catalyzed hydrogenation of arenes. *J Catal.* 2007;250(1):33-40.
98. Huddleston JG, Visser AE, Reichert WM, Willauer HD, Broker GA, Rogers RD. Characterization and comparison of hydrophilic and hydrophobic room temperature ionic liquids incorporating the imidazolium cation. *Green Chem.* 2001;3(4):156-164.
99. Ranke J, Müller A, Bottin-Weber U, et al. Lipophilicity parameters for ionic liquid cations and their correlation to in vitro cytotoxicity. *Ecotoxicol Environ Saf.* 2007;67(3):430-438.
100. Kumar V, Malhotra S V. Study on the potential anti-cancer activity of phosphonium and ammonium-based ionic liquids. *Bioorg Med Chem Lett.* 2009;19(16):4643-4646.
101. Jing B, Lan N, Qiu J, Zhu Y. Interaction of ionic liquids with a lipid bilayer: a biophysical study of ionic liquid cytotoxicity. *J Phys Chem B.* 2016;120(10):2781-2789.
102. Fatemi MH, Izadiyan P. Cytotoxicity estimation of ionic liquids based on their effective structural features. *Chemosphere.* 2011;84(5):553-563.
103. Tanner EEL, Xiong L, Barnes EO, Compton RG. One electron oxygen reduction in room temperature ionic liquids: A comparative study of Butler-Volmer and Symmetric Marcus-Hush theories using microdisc electrodes. *J Electroanal Chem.* 2014;727:59-68.
104. Kilaru PK, Scovazzo P. Correlations of low-pressure carbon dioxide and hydrocarbon solubilities in imidazolium-, phosphonium-, and ammonium-based room-temperature ionic liquids. Part 2. Using activation energy of viscosity. *Ind Eng Chem Res.* 2008;47(3):910-919.
105. Ferguson L, Scovazzo P. Solubility, diffusivity, and permeability of gases in phosphonium-based room temperature ionic liquids: Data and correlations. *Ind Eng*

- Chem Res.* 2007;46(4):1369-1374.
106. Evans RG, Klymenko O V., Saddoughi SA, Hardacre C, Compton RG. Electroreduction of oxygen in a series of room temperature ionic liquids composed of group 15-centered cations and anions. *J Phys Chem B.* 2004;108(23):7878-7886.
 107. Hayyan M, Mjalli FS, Hashim MA, Alnashef IM, Tan XM. Electrochemical reduction of dioxygen in Bis (trifluoromethylsulfonyl) imide based ionic liquids. *J Electroanal Chem.* 2011;657(1-2):150-157.
 108. Buzzeo MC, Klymenko O V., Wadhawan JD, Hardacre C, Seddon KR, Compton RG. Voltammetry of oxygen in the room-temperature ionic liquids 1-ethyl-3-methylimidazolium bis((trifluoromethyl)sulfonyl)imide and hexyltriethylammonium bis((trifluoromethyl)sulfonyl)imide: One-electron reduction to form superoxide. Steady-state and transien. *J Phys Chem A.* 2003;107(42):8872-8878.
 109. Morgan D, Ferguson L, Scovazzo P. Diffusivities of gases in room-temperature ionic Liquids: Data and correlations obtained using a lag-time technique. *Ind Eng Chem Res.* 2005;44(13):4815-4823.
 110. Huang X, Rogers EI, Hardacre C. Supporting Information for “ The Reduction of Oxygen in Various Room Temperature Ionic Liquids in the Temperature Range 293 – 318 K : Exploring the Applicability of the Stokes-Einstein Relationship in Room Temperature Ionic Liquids .” 1865;44(0):1-4.
 111. Condemarin R, Scovazzo P. Gas permeabilities, solubilities, diffusivities, and diffusivity correlations for ammonium-based room temperature ionic liquids with comparison to imidazolium and phosphonium RTIL data. *Chem Eng J.* 2009;147(1):51-57.
 112. Bradaric CJ, Downard A, Kennedy C, Robertson AJ, Zhou Y. Industrial preparation of phosphonium ionic liquids. *Green Chem.* 2003;5(2):143-152.
 113. Dake SA, Kulkarni RS, Kadam VN, et al. Phosphonium ionic liquid: a novel catalyst for benzyl halide oxidation. *Synth Commun.* 2009;39(21):3898-3904.
 114. Matzke M, Stolte S, Arning J, Uebers U, Filser J. Ionic liquids in soils: effects of different anion species of imidazolium based ionic liquids on wheat (*Triticum aestivum*) as affected by different clay minerals and clay concentrations. *Ecotoxicology.* 2009;18(2):197-203.
 115. Cromie SRT, Del Pópolo MG, Ballone P. Interaction of room temperature ionic liquid solutions with a cholesterol bilayer. *J Phys Chem B.* 2009;113(34):11642-

- 11648.
116. Bingham RJ, Ballone P. Computational study of room-temperature ionic liquids interacting with a POPC phospholipid bilayer. *J Phys Chem B*. 2012;116(36):11205-11216.
 117. Yoo B, Shah JK, Zhu Y, Maginn EJ. Amphiphilic interactions of ionic liquids with lipid biomembranes: a molecular simulation study. *Soft Matter*. 2014;10(43):8641-8651.
 118. Lim GS, Jaenicke S, Klähn M. How the spontaneous insertion of amphiphilic imidazolium-based cations changes biological membranes: a molecular simulation study. *Phys Chem Chem Phys*. 2015;17(43):29171-29183.
 119. Mikkola SK, Robciuc A, Lokajová J, et al. Impact of amphiphilic biomass-dissolving ionic liquids on biological cells and liposomes. *Environ Sci Technol*. 2015;49(3):1870-1878.
 120. Jodynis-Liebert J, Nowicki M, Murias M, et al. Cytotoxicity, acute and subchronic toxicity of ionic liquid, didecyldimethylammonium saccharinate, in rats. *Regul Toxicol Pharmacol*. 2010;57(2-3):266-273.
 121. Loenarz C, Coleman ML, Boleininger A, et al. The hypoxia-inducible transcription factor pathway regulates oxygen sensing in the simplest animal, *Trichoplax adhaerens*. *EMBO Rep*. 2011;12(1):63-70.
 122. Dalton SJ, Whiting CV, Bailey JR, Mitchell DC, Tarlton JF. Mechanisms of chronic skin ulceration linking lactate, transforming growth factor- β , vascular endothelial growth factor, collagen remodeling, collagen stability, and defective angiogenesis. *J Invest Dermatol*. 2007;127(4):958-968.
 123. Dhall S, Do D, Garcia M, et al. A novel model of chronic wounds: importance of redox imbalance and biofilm-forming bacteria for establishment of chronicity. *PLoS One*. 2014;9(10):e109848.
 124. Sen CK, Gordillo GM, Roy S, et al. Human skin wounds: a major and snowballing threat to public health and the economy. *Wound repair Regen*. 2009;17(6):763-771.
 125. Jenkins J, Dmitriev RI, Morten K, McDermott KW, Papkovsky DB. Oxygen-sensing scaffolds for 3-dimensional cell and tissue culture. *Acta Biomater*. 2015;16:126-135.
 126. Bancroft GN, Sikavitsas VI, Van Den Dolder J, et al. Fluid flow increases mineralized matrix deposition in 3D perfusion culture of marrow stromal osteoblasts in a dose-dependent manner. *Proc Natl Acad Sci*. 2002;99(20):12600-12605.
 127. Santos AG, Ribeiro BD, Alviano DS, Coelho MAZ. Toxicity of ionic liquids toward

- microorganisms interesting to the food industry. *Rsc Adv.* 2014;4(70):37157-37163.
128. Cvjetko Bubalo M, Vidović S, Radojčić Redovniković I, Jokić S. Green solvents for green technologies. *J Chem Technol Biotechnol.* 2015;90(9):1631-1639.
 129. Grzonkowska M, Sosnowska A, Barycki M, Rybinska A, Puzyn T. How the structure of ionic liquid affects its toxicity to *Vibrio fischeri*? *Chemosphere.* 2016;159:199-207.
 130. Ventura SPM, Marques CS, Rosatella AA, Afonso CAM, Goncalves F, Coutinho JAP. Toxicity assessment of various ionic liquid families towards *Vibrio fischeri* marine bacteria. *Ecotoxicol Environ Saf.* 2012;76:162-168.
 131. Frade RFM, Matias A, Branco LC, Afonso CAM, Duarte CMM. Effect of ionic liquids on human colon carcinoma HT-29 and CaCo-2 cell lines. *Green Chem.* 2007;9(8):873-877.
 132. Dias AMA, Marceneiro S, Braga MEM, et al. Phosphonium-based ionic liquids as modifiers for biomedical grade poly(vinyl chloride). *Acta Biomater.* 2012;8(3):1366-1379.
 133. Rosa AB. Poly (ϵ -caprolactone)/SBA-15 composite biomaterials plasticized with greener additives. 2013. Projeto de Dissertação de Mestrado na área científica de Engenharia Química, Universidade de Coimbra.
 134. Boccardi E, Belova I V, Murch GE, Boccaccini AR, Fiedler T. Oxygen diffusion in marine-derived tissue engineering scaffolds. *J Mater Sci Mater Med.* 2015;26(6):200.
 135. Karande TS. Effect of scaffold architecture on diffusion of oxygen in tissue engineering constructs. 2007. PhD Thesis.
 136. Kang T-Y, Kang H-W, Hwang CM, et al. The realistic prediction of oxygen transport in a tissue-engineered scaffold by introducing time-varying effective diffusion coefficients. *Acta Biomater.* 2011;7(9):3345-3353.
 137. Lutolf MP, Hubbell JA. Synthetic biomaterials as instructive extracellular microenvironments for morphogenesis in tissue engineering. *Nat Biotechnol.* 2005;23(1):47.
 138. Priya SG, Jungvid H, Kumar A. Skin tissue engineering for tissue repair and regeneration. *Tissue Eng Part B Rev.* 2008;14(1):105-118.
 139. Ahrendt G, Chickering DE, Ranieri JP. Angiogenic growth factors: a review for tissue engineering. *Tissue Eng.* 1998;4(2):117-130.
 140. Atala A, Bauer SB, Soker S, Yoo JJ, Retik AB. Tissue-engineered autologous

- bladders for patients needing cystoplasty. *Lancet*. 2006;367(9518):1241-1246.
141. Seifu DG, Isimjan TT, Mequanint K. Tissue engineering scaffolds containing embedded fluorinated-zeolite oxygen vectors. *Acta Biomater*. 2011;7(10):3670-3678.
 142. Oh SH, Kim TH, Im G II, Lee JH. Investigation of Pore Size Effect on Chondrogenic Differentiation of Adipose Stem Cells Using a Pore Size Gradient Scaffold. 2010;127:1948-1955.
 143. Harrison BS, Eberli D, Lee SJ, Atala A, Yoo JJ. Oxygen producing biomaterials for tissue regeneration. *Biomaterials*. 2007;28(31):4628-4634.
 144. Shake JG, Gruber PJ, Baumgartner WA, et al. Mesenchymal stem cell implantation in a swine myocardial infarct model: engraftment and functional effects. *Ann Thorac Surg*. 2002;73(6):1919-1926.
 145. Li Z, Guo X, Guan J. An oxygen release system to augment cardiac progenitor cell survival and differentiation under hypoxic condition. *Biomaterials*. 2012;33(25):5914-5923.
 146. Pedraza E, Coronel MM, Fraker CA, Ricordi C, Stabler CL. Preventing hypoxia-induced cell death in beta cells and islets via hydrolytically activated, oxygen-generating biomaterials. *Proc Natl Acad Sci*. 2012:201113560.
 147. McCall M, Shapiro AMJ. Update on islet transplantation. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2012:a007823.
 148. Montazeri L, Hojjati-Emami S, Bonakdar S, et al. Improvement of islet engrafts by enhanced angiogenesis and microparticle-mediated oxygenation. *Biomaterials*. 2016;89:157-165.
 149. Lv X, Li Z, Chen S, et al. Structural and functional evaluation of oxygenating keratin/silk fibroin scaffold and initial assessment of their potential for urethral tissue engineering. *Biomaterials*. 2016;84:99-110.
 150. Schenck TL, Hopfner U, Chávez MN, et al. Photosynthetic biomaterials: A pathway towards autotrophic tissue engineering. *Acta Biomater*. 2015;15:39-47.
 151. Serrano MC, Pagani R, Vallet-Regí M, et al. In vitro biocompatibility assessment of poly (ϵ -caprolactone) films using L929 mouse fibroblasts. *Biomaterials*. 2004;25(25):5603-5611.
 152. Grainger DW. *The Williams Dictionary of Biomaterials*. Vol 2. Liverpool University Press; 1999.
 153. Anselme K. Osteoblast adhesion on biomaterials. *Biomaterials*. 2000;21(7):667-

- 681.
154. Bouet G, Cruel M, Laurent C, Vico L, Malaval L, Marchat D. Validation of an in vitro 3D bone culture model with perfused and mechanically stressed ceramic scaffold. *eCells Mater J*. 2015;29:250-267.
 155. Klammert U, Reuther T, Blank M, et al. Phase composition, mechanical performance and in vitro biocompatibility of hydraulic setting calcium magnesium phosphate cement. *Acta Biomater*. 2010;6(4):1529-1535.
 156. Kawahara H. Studies on the effects of dental metals upon the mesenchymal cells in tissue culture. *J Osaka Odontol Soc*. 1955;18:348.
 157. Schmalz G, Schmalz C. Toxicity tests on dental filling materials. *Int Dent J*. 1981;31(3):185-192.
 158. Van Tienhoven EAE, Korbee D, Schipper L, Verharen HW, De Jong WH. In vitro and in vivo (cyto) toxicity assays using PVC and LDPE as model materials. *J Biomed Mater Res Part A An Off J Soc Biomater Japanese Soc Biomater Aust Soc Biomater Korean Soc Biomater*. 2006;78(1):175-182.
 159. Jain S, Sharma A, Basu B. In vitro cytocompatibility assessment of amorphous carbon structures using neuroblastoma and Schwann cells. *J Biomed Mater Res Part B Appl Biomater*. 2013;101(4):520-531.
 160. Tripathi G, Basu B. A porous hydroxyapatite scaffold for bone tissue engineering: Physico-mechanical and biological evaluations. *Ceram Int*. 2012;38(1):341-349.
 161. Wilson JR, Mills JG, Prather ID, Dimitrijevič SD. A toxicity index of skin and wound cleansers used on in vitro fibroblasts and keratinocytes. *Adv Skin Wound Care*. 2005;18(7):373-378.
 162. Nilsson-Thorell CB, Muscalu N, Andren AH, Kjellstrand PT, Wieslander AP. Heat sterilization of fluids for peritoneal dialysis gives rise to aldehydes. *Perit Dial Int*. 1993;13(3):208-213.
 163. Kroll A, Dierker C, Rommel C, et al. Cytotoxicity screening of 23 engineered nanomaterials using a test matrix of ten cell lines and three different assays. *Part Fibre Toxicol*. 2011;8(1):9.
 164. Ciapetti G, Cenni E, Pratelli L, Pizzoferrato A. In vitro evaluation of cell/biomaterial interaction by MTT assay. *Biomaterials*. 1993;14(5):359-364.
 165. Elia MC, Storer RD, Harmon LS, et al. Cytotoxicity as measured by trypan blue as a potentially confounding variable in the in vitro alkaline elution/rat hepatocyte assay. *Mutat Res Mutagen Relat Subj*. 1993;291(3):193-205.

166. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods*. 1983;65(1-2):55-63.
167. Cory AH, Owen TC, Barltrop JA, Cory JG. Use of an aqueous soluble tetrazolium/formazan assay for cell growth assays in culture. *Cancer Commun*. 1991;3(7):207-212.
168. Malich G, Markovic B, Winder C. The sensitivity and specificity of the MTS tetrazolium assay for detecting the in vitro cytotoxicity of 20 chemicals using human cell lines. *Toxicology*. 1997;124(3):179-192.
169. Stevens MG, Olsen SC. Comparative analysis of using MTT and XTT in colorimetric assays for quantitating bovine neutrophil bactericidal activity. *J Immunol Methods*. 1993;157(1-2):225-231.
170. Ishiyama M, Miyazono Y, Sasamoto K, Ohkura Y, Ueno K. A highly water-soluble disulfonated tetrazolium salt as a chromogenic indicator for NADH as well as cell viability. *Talanta*. 1997;44(7):1299-1305.
171. Fotakis G, Timbrell JA. In vitro cytotoxicity assays: comparison of LDH, neutral red, MTT and protein assay in hepatoma cell lines following exposure to cadmium chloride. *Toxicol Lett*. 2006;160(2):171-177.
172. Shukla RK, Kumar A, Pandey AK, Singh SS, Dhawan A. Titanium dioxide nanoparticles induce oxidative stress-mediated apoptosis in human keratinocyte cells. *J Biomed Nanotechnol*. 2011;7(1):100-101.
173. Sharma V, Shukla RK, Saxena N, Parmar D, Das M, Dhawan A. DNA damaging potential of zinc oxide nanoparticles in human epidermal cells. *Toxicol Lett*. 2009;185(3):211-218.
174. O'Brien J, Wilson I, Orton T, Pognan F. Investigation of the Alamar Blue (resazurin) fluorescent dye for the assessment of mammalian cell cytotoxicity. *Eur J Biochem*. 2000;267(17):5421-5426.
175. Thrivikraman G, Madras G, Basu B. In vitro/in vivo assessment and mechanisms of toxicity of bioceramic materials and its wear particulates. *RSC Adv*. 2014;4(25):12763-12781.
176. Acton QA. *Organosilicon Compounds-Advances in Research and Application*. ScholarlyMedia LLC; 2012.
177. Sousa SF. Membranas de base PVA mais eficientes para a captura e separação de gases. 2017. Projeto de Dissertação de Mestrado na área científica de Engenharia Química, Universidade de Coimbra.

178. Martinis EM, Berton P, Monasterio RP, Wuilloud RG. Emerging ionic liquid-based techniques for total-metal and metal-speciation analysis. *TrAC Trends Anal Chem.* 2010;29(10):1184-1201.
179. Kong HJ, Smith MK, Mooney DJ. Designing alginate hydrogels to maintain viability of immobilized cells. *Biomaterials.* 2003;24(22):4023-4029.
180. Rowley JA, Madlambayan G, Mooney DJ. Alginate hydrogels as synthetic extracellular matrix materials. *Biomaterials.* 1999;20(1):45-53.
181. Jang YJ, Chun SY, Kim GN, et al. Characterization of a novel composite scaffold consisting of acellular bladder submucosa matrix, polycaprolactone and Pluronic F127 as a substance for bladder reconstruction. *Acta Biomater.* 2014;10(7):3117-3125.
182. Yap LS, Yang MC. Evaluation of hydrogel composing of Pluronic F127 and carboxymethyl hexanoyl chitosan as injectable scaffold for tissue engineering applications. *Colloids Surfaces B Biointerfaces.* 2016;146:204-211.
183. Diniz IMA, Chen C, Xu X, et al. Pluronic F-127 hydrogel as a promising scaffold for encapsulation of dental-derived mesenchymal stem cells. *J Mater Sci Mater Med.* 2015;26(3):1-10.
184. Zhu C, Fan D, Wang Y. Human-like collagen/hyaluronic acid 3D scaffolds for vascular tissue engineering. *Mater Sci Eng C.* 2014;34(1):393-401.
185. Mathews S, Bhonde R, Gupta PK, Totey S. Novel biomimetic tripolymer scaffolds consisting of chitosan, collagen type 1, and hyaluronic acid for bone marrow-derived human mesenchymal stem cells-based bone tissue engineering. *J Biomed Mater Res - Part B Appl Biomater.* 2014;102(8):1825-1834.
186. Kirk JF, Ritter G, Finger I, Sankar D, Reddy JD, Talton JD, Cobb RR. Mechanical and biocompatible characterization of a cross-linked collagen-hyaluronic acid wound dressing. *Biomater.* 2013;34(4):e25633.
187. Olde Damink LHH, Dijkstra PJ, Van Luyn MJA, Van Wachem PB, Nieuwenhuis P, Feijen J. Cross-linking of dermal sheep collagen using a water-soluble carbodiimide. *Biomaterials.* 1996;17(8):765-773.
188. Tomihata K, Ikada Y. Crosslinking of hyaluronic acid with glutaraldehyde. *J Polym Sci Part A Polym Chem.* 1997;35(16):3553-3559.
189. ThermoFisher. Sulfo-NHS plus EDC (carbodiimide) crosslinking reaction scheme. <https://www.thermofisher.com/pt/en/home/life-science/protein-biology/protein-biology-learning-center/protein-biology-resource-library/pierce-protein->

- methods/carbodiimide-crosslinker-chemistry.html. Accessed March 16, 2018.
190. Iego ND. Guidelines for Dynamic Light Scattering Measurement and Analysis. *NanoComposix*. 2012;3:1-8.
 191. Malvern Instruments - Zetasizer Nano Series User Manual. 2003, 2004.
 192. Using DLS Deconvolution Algorithms to Acquire Intensity Weighted Particle Size Distribution from Measured Correlogram. In: *Sponsored Content by Malvern Instruments Ltd*. 2014:1-15.
 193. Application of Dynamic Light Scattering (DLS) to Protein Therapeutic Formulations: Principles, Measurements and Analysis. In: *A Malvern Instruments Bioscience Development Initiative Executive*. 2014.
 194. Bhattacharjee S. DLS and zeta potential—What they are and what they are not? *J Control Release*. 2016;235:337-351.
 195. Puga AM, Rey-Rico A, Magariños B, Alvarez-Lorenzo C, Concheiro A. Hot melt poly- ϵ -caprolactone/poloxamine implantable matrices for sustained delivery of ciprofloxacin. *Acta Biomater*. 2012;8(4):1507-1518.
 196. ATCC. Product Sheet BALB/3T3 (ATCC® CCL-163™). Accessed March 2, 2018.
 197. ATCC. Cell micrograph. <https://www.lgstandards-atcc.org/~media/42358BDA1258430391CC36EA3E0ACC46.ashx>. Accessed March 2, 2018.
 198. Moutafchieva D, Popova D, Dimitrova M, Tchaoushev S. Experimental determination of the volumetric mass transfer coefficient. *J Chem Technol Metall*. 2013;48(4):351-356.
 199. Buga CS. Nanossistemas mais eficientes para terapia fotodinâmica. 2018. Projeto de Dissertação de Mestrado na área científica de Engenharia Biomédica, Universidade de Coimbra.
 200. Mukejeree, P., Mysels K. *Critical Micelle Concentrations of Aqueous Surfactant Systems*. National Standard reference data system; 1971.
 201. Lin S-Y, Lin Y-Y, Chen E-M, Hsu C-T, Kwan C-C. A study of the equilibrium surface tension and the critical micelle concentration of mixed surfactant solutions. *Langmuir*. 1999;15(13):4370-4376.
 202. Kovalchuk NM, Trybala A, Starov V, Matar O, Ivanova N. Fluoro-vs hydrocarbon surfactants: Why do they differ in wetting performance? *Adv Colloid Interface Sci*. 2014;210:65-71.
 203. Al-Oweini R, El-Rassy H. Synthesis and characterization by FTIR spectroscopy of

- silica aerogels prepared using several $\text{Si}(\text{OR})_4$ and $\text{R}''\text{Si}(\text{OR}')_3$ precursors. *J Mol Struct.* 2009;919(1-3):140-145.
204. Kim I-Y, Joachim E, Choi H, Kim K. Toxicity of silica nanoparticles depends on size, dose, and cell type. *Nanomedicine Nanotechnology, Biol Med.* 2015;11(6):1407-1416.
 205. Ahmad J, Ahamed M, Akhtar MJ, et al. Apoptosis induction by silica nanoparticles mediated through reactive oxygen species in human liver cell line HepG2. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2012;259(2):160-168.
 206. Lin W, Huang Y, Zhou X-D, Ma Y. In vitro toxicity of silica nanoparticles in human lung cancer cells. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2006;217(3):252-259.
 207. Lu X, Qian J, Zhou H, et al. In vitro cytotoxicity and induction of apoptosis by silica nanoparticles in human HepG2 hepatoma cells. *Int J Nanomedicine.* 2011;6:1889.
 208. Yu J, Zhang S, Dai Y, Lu X, Lei Q, Fang W. Antimicrobial activity and cytotoxicity of piperazinium- and guanidinium-based ionic liquids. *J Hazard Mater.* 2016;307:73-81.
 209. Xia X, Wan R, Wang P, Huo W, Dong H, Du Q. Toxicity of imidazoles ionic liquid [C16mim]Cl to Hela cells. *Ecotoxicol Environ Saf.* 2018;162:408-414.
 210. Irvinesci, Hank's Balanced Salt Solution. http://www.irvinesci.com/uploads/technical-documentations/HBSS_Formulation.pdf. Acedido em 27/07/2018.
 211. Sigma-Aldrich, Ficha de Dados de Segurança, Tetraetoxisilano $\geq 99.0\%$, <https://www.sigmaaldrich.com/MSDS/MSDS/PleaseWaitMSDSPage.do?language=&country=PT&brand=ALDRICH&productNumber=86578&PageToGoToURL=https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/aldrich/86578?lang=pt®ion=PT>, 2018, acedido em 13/09/2018.
 212. Sigma-Aldrich, Ficha de Dados de Segurança, Hidróxido de sódio Solução BioUltra, <https://www.sigmaaldrich.com/MSDS/MSDS/PleaseWaitMSDSPage.do?language=&country=PT&brand=SIGMA&productNumber=72068&PageToGoToURL=https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/72068?lang=pt®ion=PT>, 2017, acedido em 13/09/2018.
 213. Sigma-Aldrich, Ficha de Dados de Segurança, Ácido clorídrico 36.5-38.0%, <https://www.sigmaaldrich.com/MSDS/MSDS/DisplayMSDSPage.do?country=PT&language=pt&productNumber=H1758&brand=SIGMA&PageToGoToURL=https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/H1758?lang=pt®ion=PT>

- 58%3Flang%3Dpt, 2016, acessado em 13/09/2018.
214. Sigma-Aldrich, Ficha de Dados de Segurança, Trihexiltetradecilfosfónio bis(trifluorometilsulfonil)amida $\geq 95.0\%$, <https://www.sigmaaldrich.com/MSDS/MSDS/PleaseWaitMSDSPage.do?language=&country=PT&brand=ALDRICH&productNumber=50971&PageToGoToURL=https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/aldrich/50971?lang=pt®ion=PT>, 2014, acessado em 13/09/2018.
215. Sigma-Aldrich, Ficha de Dados de Segurança, Ácido algínico de sódio, <https://www.sigmaaldrich.com/MSDS/MSDS/DisplayMSDSPage.do?country=PT&language=pt&productNumber=A2033&brand=SIGMA&PageToGoToURL=https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/a2033?lang=pt®ion=PT>, 2011, acessado em 13/09/2018.
216. Sigma-Aldrich, Ficha de Dados de Segurança, Cloreto de cálcio, <https://www.sigmaaldrich.com/MSDS/MSDS/PleaseWaitMSDSPage.do?language=&country=PT&brand=SIGALD&productNumber=C1016&PageToGoToURL=https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigald/c1016?lang=pt®ion=PT>, 2018, acessado em 13/09/2018.
217. Sigma-Aldrich, Ficha de Dados de Segurança, Pluronic® F-127, <https://www.sigmaaldrich.com/MSDS/MSDS/PleaseWaitMSDSPage.do?language=&country=PT&brand=SIGMA&productNumber=P2443&PageToGoToURL=https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/p2443?lang=pt®ion=PT>, 2015, acessado em 13/09/2018.
218. Sigma-Aldrich, Ficha de Dados de Segurança, Solução de Colagénio Tipo I, <https://www.sigmaaldrich.com/MSDS/MSDS/PleaseWaitMSDSPage.do?language=&country=PT&brand=SIGMA&productNumber=C8919&PageToGoToURL=https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/c8919?lang=pt®ion=PT>, 2016, acessado em 13/09/2018.
219. Guinama, Ficha de Dados e Segurança, Hialuronato de sódio, [https://www.guinama.com/media/tecnico/90851_FDS_HIALURONATO_DE_SÓDIO \(Portugués\).pdf](https://www.guinama.com/media/tecnico/90851_FDS_HIALURONATO_DE_SÓDIO_(Portugués).pdf), 2017, acessado em 13/09/2018.
220. Sigma-Aldrich, Ficha de Dados e Segurança, Solução tampão HEPES $\geq 99.5\%$, <https://www.sigmaaldrich.com/MSDS/MSDS/DisplayMSDSPage.do?country=PT&language=pt&productNumber=H3375&brand=SIGMA&PageToGoToURL=https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/h3375?lang=pt®ion=PT>

- 75%3Flang%3Dpt, 2014, acessado em 13/09/2018.
221. Acros Organics, Ficha de Dados e Segurança, 1-(3-Dimethylaminopropyl)-3-ethylcarbodiimide hydrochloride, https://www.acros.com/DesktopModules/Acros_Search_Results/Acros_Search_Results.aspx?search_type=CatalogSearch&SearchString=171440100, 2018, acessado em 13/09/2018.
222. Sigma-Aldrich, Ficha de Dados e Segurança, N-Hidroxisulfosucinimida sódica, <https://www.sigmaaldrich.com/MSDS/MSDS/DisplayMSDSPage.do?country=PT&language=pt&productNumber=56485&brand=ALDRICH&PageToGoToURL=https%3A%2F%2Fwww.sigmaaldrich.com%2Fcatalog%2Fproduct%2Faldrich%2F56485%3Flang%3Dpt>, 2013, acessado em 13/09/2018.
223. Sigma-Aldrich, Ficha de Dados e Segurança, Acetona, <https://www.sigmaaldrich.com/MSDS/MSDS/DisplayMSDSPage.do?country=PT&language=pt&productNumber=90872&brand=SIAL&PageToGoToURL=https%3A%2F%2Fwww.sigmaaldrich.com%2Fcatalog%2Fproduct%2Fsial%2F90872%3Flang%3Dpt>, 2016, acessado em 13/09/2018.
224. ThermoFisher, Ficha de Dados e Segurança, DMEM/F-12, <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/11320033?SID=srch-srp-11320033>, 2016, acessado em 13/09/2018.
225. ThermoFisher, Ficha de Dados e Segurança, Fetal Bovine Serum, <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/16000044?SID=srch-srp-16000044>, 2017, acessado em 13/09/2018.
226. ThermoFisher, Ficha de Dados e Segurança, L-Glutamine (200 mM), <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/25030081?SID=srch-srp-25030081>, 2016, acessado em 13/09/2018.
227. ThermoFisher, Ficha de Dados e Segurança, Penicillin-Streptomycin (10,000 U/mL), <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/15140163?SID=srch-srp-15140163>, 2014, acessado em 13/09/2018.
228. ThermoFisher, Ficha de Dados e Segurança, HBSS, no calcium, no magnesium, no phenol red, <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/14175095>, 2016, acessado em 13/09/2018.
229. Sigma-Aldrich, Ficha de Dados e Segurança, Phosphate buffered saline 10× concentrate, <https://www.sigmaaldrich.com/MSDS/MSDS/PleaseWaitMSDSPage.do?language>

- =&country=PT&brand=SIGMA&productNumber=P5493&PageToGoToURL=https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/p5493?lang=pt®ion=PT, 2013, acessado em 13/09/2018.
230. Sigma-Aldrich, Ficha de Dados e Segurança, tripsina em solução de EDTA (1x) testada em cultura celular, <https://www.sigmaaldrich.com/MSDS/MSDS/PleaseWaitMSDSPage.do?language=&country=PT&brand=SIGMA&productNumber=T3924&PageToGoToURL=https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/t3924?lang=pt®ion=PT>, 2017, acessado em 13/09/2018.
231. Roche, Ficha de Dados e Segurança, Cytotoxicity Detection Kit (LDH), http://netdocs.roche.com/DDM/Effective/0000000000001004022000793_000_06_005_Native.pdf, 2015, acessado em 13/09/2018.
232. Sigma-Aldrich, Ficha de Dados e Segurança, Cell Proliferation Reagent, <https://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigmaaldrich/docs/Roche/Bulletin/1/cellprorobul.pdf>., 2016, acessado em 13/09/2018.
233. Sodium alginate reticulation with calcium chloride. May, 2013. <https://scienceandfooducla.files.wordpress.com/2013/06/alginategelation1.png>. Accessed March 24, 2018.
234. Aka-Any-Grah A, Bouchemal K, Koffi A, et al. Formulation of mucoadhesive vaginal hydrogels insensitive to dilution with vaginal fluids. *Eur J Pharm Biopharm.* 2010;76(2):296-303.

Anexos

Anexo A – Frases H/P de saúde e segurança

Produto	Precaução	Perigo	Cuidados no manuseamento	Referências
Surfactante S1	NA	NA	Evitar o contacto com a pele e os olhos. Evitar a inalação do vapor ou da névoa.	*
Surfactante S2	NA	NA	Usar equipamento pessoal de proteção. Evitar o contacto com a pele e os olhos. Providenciar uma ventilação adequada.	*
Surfactante S3	P264; P302+P352; P332+P313; P305+P351+P338; P337+P313	H315; H319	Evitar o contacto com a pele e os olhos. Evitar a inalação do vapor ou da névoa. Providenciar uma adequada ventilação para evitar formação de vapores. Manter afastado de qualquer chama ou fonte de ignição - Não fumar. Tome medidas para impedir a formação de electricidade estática.	*
TEOS	P210; P261; P280; P304 + P340 + P312; P337 + P313; P403 + P235	H226; H319; H332; H335	Manter afastado de qualquer chama ou fonte de ignição - Não fumar. Tome medidas para impedir a formação de electricidade estática.	211
NaOH	P260; P280; P303 + P361 + P353; P304 + P340 + P310; P305 + P351 + P338 + P310	H290; H314	Evitar a formação de pó e aerossóis. Providenciar uma adequada ventilação em locais onde se formem poeiras.	212
HCl	P260; P280; P303 + P361 + P353; P304 + P340 + P310; P305 + P351 + P338	H290; H314; H335	Evitar o contacto com a pele e os olhos. Evitar a inalação do vapor ou da névoa.	213
CYPHOS IL 109®, [P _{6.6.14}][NTf ₂]	P280; P305 + P351 + P338; P310	H226; H302; H314	Evitar o contacto com a pele e os olhos. Evitar a inalação do vapor ou da névoa. Manter afastado de qualquer chama ou fonte de ignição - Não fumar. Tome medidas para impedir a formação de electricidade estática.	214
Sal orgânico	NA	NA	Providenciar uma adequada ventilação em locais onde se formem poeiras. Providenciar uma adequada ventilação em locais onde se formem poeiras.	*

Sal de alginato de sódio proveniente de alga castanha	NA	NA	Providenciar uma adequada ventilação em locais onde se formem poeiras. Medidas usuais de proteção preventiva contra incêndio.	215
Cloreto de cálcio dihidratado	H319	P305 + P351 + P338	Evitar o contacto com a pele e os olhos. Evitar a formação de pó e aerossóis. Providenciar uma adequada ventilação em locais onde se formem poeiras.	216
Pluronic® F127	NA	NA	Providenciar uma adequada ventilação em locais onde se formem poeiras.	217
Colagénio natural	NA	NA	Não é uma substância ou mistura perigosa de acordo com o Regulamento (CE) No. 1272/2008.	218
Ácido hialurónico	NA	NA	O produto não exige medidas de manuseamento especiais. Não utilizar nunca pressão para esvaziar os recipientes, não são recipientes resistentes à pressão. Na zona de aplicação deve ser proibido fumar, comer e beber. Cumprir com a legislação sobre segurança e higiene no trabalho. Conservar o produto em recipientes de um material idêntico ao original.	219
HEPES	NA	NA	Providenciar uma adequada ventilação em locais onde se formem poeiras.	220
EDC	P301 + P330 + P331; P312; P302 + P352; P333 + P313; P337 + P313; P280	H302; H315; H317; H319; H410	Providenciar uma adequada ventilação em locais onde se formem poeiras. Usar o equipamento de proteção individual exigido.	221
Sulfo-NHS	NA	NA	Providenciar uma adequada ventilação em locais onde se formem poeiras. Medidas usuais de proteção preventiva contra incêndio	222
Acetona	P210; P280; P304 + P340 + P312; P305 + P351 + P338; P337 + P313; P403 + P235	H225; H319; H336	Evitar o contacto com a pele e os olhos. Evitar a inalação do vapor ou da névoa. Manter afastado de qualquer chama ou fonte de ignição - Não fumar. Tome medidas para impedir a formação de electricidade estática.	223
DMEM/F-12	NA	NA	Usar o equipamento de proteção individual exigido.	224
FBS	NA	NA	Usar o equipamento de proteção individual exigido. Não são necessários conselhos especiais de manuseamento.	225
L-glutamina	NA	NA	Usar o equipamento de proteção individual exigido.	226
Antibióticos (penicilina 10.000 UI/mL, estreptomicina 10.000 µg/mL) – Pen Strept	P304 + P340; P305 + P351 + P338; P312; P302 + P352; P333 + P313; P280; P261	H315; H320; H317; H335	Evitar o contacto com a pele, olhos e vestuário. Usar equipamento pessoal de proteção.	227
HBSS	NA	NA	Usar o equipamento de proteção individual exigido.	228

PBS	NA	NA	Não é uma substância ou mistura perigosa de acordo com o Regulamento (CE) No. 1272/2008.	229
Tripsina-EDTA	NA	NA	Não é uma substância ou mistura perigosa de acordo com o Regulamento (CE) No. 1272/2008.	230
Kit de Detecção de Citotoxicidade ^{PLUS} (LDH)	NA	NA	Não é uma substância ou mistura perigosa de acordo com o Regulamento (CE) No. 1272/2008.	231
Reagente de Proliferação Celular (WST-1)	NA	NA	Não é uma substância ou mistura perigosa de acordo com o Regulamento (CE) No. 1272/2008.	232

* não se pode revelar por motivo de propriedade industrial da Universidade de Coimbra.

NA – Não aplicável.

Frases H

- H225 - Líquido e vapor facilmente inflamáveis.
- H314 - Provoca queimaduras na pele e lesões oculares graves.
- H315 - Provoca irritação cutânea.
- H317 - Pode provocar uma reação alérgica cutânea.
- H319 - Provoca irritação ocular grave.
- H320 - Provoca irritação ocular.
- H226 - Líquido e vapor inflamáveis.
- H290 - Pode ser corrosivo para os metais.
- H302 - Nocivo por ingestão.
- H332 - Nocivo por inalação.
- H335 - Pode provocar irritação das vias respiratórias.
- H336 - Pode provocar sonolência ou vertigens.
- H410 – Muito tóxico para os organismos aquáticos.

Frases P

- P210 - Manter afastado do calor, superfícies quentes, faísca, chama aberta e outras fontes de ignição. Não fumar.
- P260 - Não respirar as poeiras/ fumos/ gases/ névoas/ vapores/ aerossóis.
- P261 - Evitar respirar as poeiras/ fumos/ gases/ névoas/ vapores/ aerossóis.
- P264 - Lavar cuidadosamente após manuseamento.
- P280 - Usar luvas de protecção/ vestuário de protecção/ protecção ocular/ protecção facial.
- P310 - Contacte imediatamente um CENTRO DE INFORMAÇÃO ANTIVENENOS ou um médico.
- P312 - Caso sinta indisposição, contacte um CENTRO DE INFORMAÇÃO ANTIVENENOS ou um médico
- P301 + P330 + P331 – EM CASO DE INGESTÃO: enxaguar a boca. NÃO provocar o vômito.
- P302 + P352 - SE ENTRAR EM CONTACTO COM A PELE: lavar com sabonete e água abundantes
- P303 + P361 + P353 - SE ENTRAR EM CONTACTO COM A PELE (ou o cabelo): retirar imediatamente toda a roupa contaminada. Enxaguar a pele com água/tomar um duche.

P304 + P340 - EM CASO DE INALAÇÃO: retirar a vítima para uma zona ao ar livre e mantê-la em repouso numa posição que não dificulte a respiração

P304 + P340 + P310 - EM CASO DE INALAÇÃO: retirar a pessoa para uma zona ao ar livre e mantê-la numa posição que não dificulte a respiração. Contacte imediatamente um CENTRO DE INFORMAÇÃO ANTIVENENOS ou um médico.

P304 + P340 + P312 - EM CASO DE INALAÇÃO: retirar a pessoa para uma zona ao ar livre e mantê-la numa posição que não dificulte a respiração. Caso sinta indisposição, contacte um CENTRO DE INFORMAÇÃO ANTIVENENOS/médico.

P305 + P351 + P338 - SE ENTRAR EM CONTACTO COM OS OLHOS: enxaguar cuidadosamente com água durante vários minutos. Se usar lentes de contacto, retire-as, se tal lhe for possível. Continuar a enxaguar.

P332 + P313 – Em caso de irritação cutânea: consulte um médico

P333 + P313 - Em caso de irritação ou erupção cutânea: consulte um médico

P337 + P313 - Caso a irritação ocular persista: consulte um médico.

P370 + P378 - Em caso de incêndio: para extinguir utilizar areia seca, um produto químico seco ou espuma resistente ao álcool.

P403 + P235 - Armazenar em local bem ventilado. Conservar em ambiente fresco.

Anexo B – Outros *scaffolds* desenvolvidos

Matrizes poliméricas à base de alginato

Inicialmente, desenvolveram-se matrizes à base de alginato de sódio, tendo como agente reticulante o cloreto de cálcio. Começou-se por preparar uma solução de alginato de sódio (2% m/v) através da dissolução do pó em água bi-destilada num vial, com um agitador magnético (800 rpm). Após a dissolução completa do polímero (durante 24h a 25 °C), procedeu-se à preparação da solução de agente reticulante, através da dissolução do pó de cloreto de cálcio em água bi-destilada num vial, com um agitador magnético (800 rpm) até se verificar dissolução completa do composto (durante 5 minutos a 25 °C). A massa de agente reticulante foi sendo progressivamente aumentada desde 2 até 22 mg, para um volume total de 10 ml. Para este último valor, obteve-se um hidrogel final com as características pretendidas, correspondendo a um grau de reticulação de 4,5 %. A solução de agente reticulante foi sendo adicionada gota-a-gota à solução de alginato de sódio para garantir a formação de uma solução homogénea. Após reticulação durante a noite (reação esquematizada na Figura 33), seguiu-se o procedimento de liofilização da amostra no liofilizador (Telstar, Lioquest), a -80 °C e a uma pressão de 0,001 mBar, durante 24 horas. Por último, os *scaffolds* foram lavados em PBS por forma a remover o excesso de reticulante, e armazenados no exsiccador, à temperatura ambiente.



Figura 48 – Esquematização do processo de reticulação do alginato de sódio com cloreto de cálcio, agente reticulante ²³³.

De seguida, por forma a agilizar o procedimento de incorporação deste material nos poços das placas para os ensaios de citotoxicidade que se seguiram, teve de se proceder a modificações no procedimento experimental para a sua obtenção. Primeiramente, preparou-se a solução de alginato (2% m/v), como descrito anteriormente. Após dissolução completa do polímero seguiu-se o congelamento da amostra durante aproximadamente 15 horas e, posteriormente, procedeu-se à liofilização das amostras no liofilizador (Telstar, Lioquest), a -80 °C e a uma pressão de 0,001 mBar, durante 24 horas. As amostras tinham

um volume de 5 mL. Após obtenção das amostras liofilizadas procedeu-se à reticulação por imersão das mesmas numa solução de CaCl_2 (2,75% m/v), preparada de igual forma à descrita anteriormente, sendo que para cada amostra o volume total de solução de agente reticulante é de 40 mL. As matrizes obtidas foram imersas na solução reticulante durante 1 hora, tendo-se aferido que as matrizes para as quais o tempo de reticulação era superior apresentavam uma maior durabilidade e manutenção das características físicas durante um maior período de tempo. Posteriormente, efetuou-se lavagem das mesmas em solução de PBS durante 10 minutos, sendo este procedimento repetido 3 vezes. Por último, repetiu-se o processo de reticulação, liofilização e lavagem, as amostras foram reservadas no exsiccador à temperatura ambiente.

Apesar destas matrizes apresentarem características promissoras, nomeadamente *swelling* (capacidade de retenção de água), aquando da realização dos primeiros ensaios de citotoxicidade para estas matrizes chegou-se à conclusão que não estimulavam a proliferação celular, verificando-se uma redução significativa após 24 horas de incubação, como se pode observar na Figura 34. Perante os resultados obtidos nos testes de citotoxicidade preliminares e com base na literatura, optou-se por criar uma nova matriz.

Hidrogéis de F127

A bibliografia consultada apresenta duas metodologias diferentes para dissolução do plurónico: quente e fria, sendo que ambas foram testadas ²³⁴.

Começou-se por preparar uma solução de F127 (18% m/v) através da dissolução do pó em água bi-destilada num vial, com um agitador magnético (800 rpm). A dissolução do plurónico decorreu num banho de óleo, à temperatura de 90 °C, durante 4 horas. Durante o período de dissolução, de 30 em 30 minutos abria-se o vial por forma a aliviar a pressão no seu interior. Finalizadas as 4 horas, retirou-se o vial do banho de óleo e deixou-se o mesmo à temperatura ambiente, tendo-se verificado que após 5 minutos estava gelificado. Posteriormente, armazenou-se o mesmo no *shaker* a 37 °C, passados 15 minutos estava novamente gelificado.

A técnica de dissolução do plurónico a frio também foi testada. Neste caso, preparou-se uma solução de F127 (18% m/v) através da dissolução do pó em água bi-destilada num vial, com um agitador magnético (800 rpm). A dissolução do plurónico decorreu no refrigerador, à temperatura de 4 °C, durante 12 horas. Após este período de tempo, o conteúdo do vial foi transferido para uma caixa de Petri e colocado na estufa

(LSIS-B2V/VC 111, VENTICELL) a 30 °C, passado 2 horas obteve-se um gel que permaneceu armazenado na estufa.

Estes géis apresentam características promissoras, nomeadamente a termosensibilidade e temperatura de gelificação próxima à temperatura corporal. Aquando da realização dos primeiros ensaios de citotoxicidade para estas matrizes chegou-se à conclusão que não estimulavam a proliferação celular de forma significativa, verificando-se uma redução significativa após 24 horas de incubação, como se pode observar na Figura 34. Tendo em conta os resultados obtidos e com base na literatura, esta abordagem foi descartada.

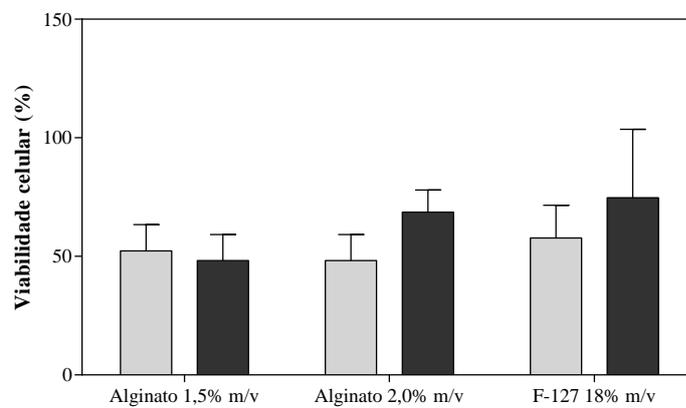


Figura 49 – Viabilidade celular após 24 e 72 horas de contacto com as matrizes de alginato e gel plurónico F127.

Anexo C1- Concentração micelar crítica para vários sistemas de surfactantes

Tabela C1 - Resultados experimentais dos ensaios de tensão superficial (γ , mN/m) em função da concentração total de surfatantes (C, mM) para todos os sistemas estudados. Os dados por mim obtidos encontram-se a negrito.

Sistema	C (mM)	γ (mN/m)	$\delta\gamma$ (mN/m)	CMC		
				A	B	C
S_{1,1}:S_{2,1}:S_{3,1} *	6,000	35,62	0,381	0,156	0,139	1,000
	5,000	35,64	0,461			
	4,000	35,73	0,460			
	3,000	35,75	0,434			
	2,000	36,05	0,861			
	1,000	36,62	1,665			
	0,500	36,10	1,098			
	0,250	37,02	1,960			
	0,150	37,50	2,500			
	0,075	42,89	0,496			
	0,010	50,89	1,697			
	0,000	71,45	0,029			
S_{1,2}:S_{2,2}:S_{3,2} **	6,000	34,22	0,317	0,213	0,220	1,000
	5,000	33,97	0,023			
	4,000	33,87	0,225			
	3,000	33,87	0,390			
	2,000	34,79	0,338			
	1,000	35,33	0,568			
	0,500	34,44	0,017			
	0,250	32,11	0,342			
	0,010	48,73	2,524			
	0,005	51,54	2,768			
	0,000	72,40	0,000			
	S_{1,3}:S_{2,3}:S_{3,3} *	6,000	29,86			
5,000		29,87	1,121			
4,000		30,32	0,994			
3,000		31,78	0,950			
2,000		33,00	1,148			
1,000		34,31	0,225			
0,500		34,13	2,196			
0,250		37,04	1,440			
0,010		42,34	0,157			
0,005		56,53	2,283			
0,000		71,09	0,475			
S_{1,4}:S_{2,4}:S_{3,4} ***		6,000	26,81	0,559	0,546	0,435
	5,000	27,37	1,131			
	4,000	27,51	0,834			
	3,000	28,07	1,315			
	2,000	28,97	1,846			
	1,000	29,34	0,078			
	0,500	31,12	3,019			
	0,250	33,74	1,725			
	0,070	39,87	2,779			
	0,000	72,40	0,000			

S_{1,5}:S_{2,5}:S_{3,5} *	6,000	24,89	0,173	0,240	0,190	2,000
	5,000	25,00	0,509			
	4,000	24,94	1,284			
	3,000	26,00	1,874			
	2,000	27,36	1,904			
	1,000	29,86	0,701			
	0,500	36,16	1,181			
	0,250	39,66	0,310			
	0,150	40,60	0,395			
	0,075	41,66	0,561			
	0,010	55,05	2,476			
0,000	71,09	0,475				
S_{1,6}:S_{2,6}:S_{3,6} **	6,000	22,27	0,205	0,669	0,509	2,000
	5,000	22,20	0,707			
	4,000	21,55	1,344			
	3,000	20,69	0,007			
	2,000	21,56	0,368			
	1,000	24,96	0,099			
	0,500	27,92	0,898			
	0,250	36,69	1,782			
	0,070	40,94	1,216			
	0,000	72,40	0,000			
	S_{1,7}:S_{2,7}:S_{3,7} *	6,000	24,57			
5,000		23,98	0,052			
4,000		23,77	0,394			
3,000		23,45	0,233			
2,000		24,09	0,441			
1,000		26,62	0,057			
0,500		34,11	1,372			
0,250		37,15	0,913			
0,150		43,49	1,767			
0,075		48,69	0,424			
0,010		66,52	3,484			
S_{1,8}:S_{2,8}:S_{3,8} *	0,000	71,09	0,475	0,562	0,435	2,000
	6,000	23,12	1,235			
	5,000	22,71	1,409			
	4,000	21,93	1,645			
	3,000	17,88	1,595			
	2,000	17,23	1,798			
	1,000	23,82	3,551			
	0,530	34,44	1,506			
	0,247	41,27	1,289			
	0,114	47,51	0,429			
	0,052	52,76	0,521			
	0,023	56,84	1,151			
	0,000	71,45	0,029			

* Dados obtidos por Sylvania Sousa, “Membranas de base PVA mais eficientes para a captura e separação de gases”, dissertação do MIEQ, 2016 – 2017.

** Dados obtidos por Cláudia Buga, “Nanossistemas mais eficientes para terapia fotodinâmica”, dissertação do MIEB, 2016 – 2018.

*** Dados obtidos por Gustavo Marques, “Instrumentos biomédicos com capacidade de oxigenação aumentada”, dissertação do MIEB, 2017 – presente.

Uma vez que as concentrações relativas de surfatantes não podem ser reveladas, no sentido de possibilitar a comparação entre cada sistema são apresentadas os seguintes critérios: $S_{1,1} > S_{1,2} > S_{1,4} > S_{1,6}$; $S_{1,2} = S_{1,3}$; $S_{1,4} = S_{1,5}$; $S_{1,6} = S_{1,7}$; $S_{1,8} = 0$; $S_{2,1} = S_{2,3} = S_{2,5} = S_{2,7} = S_{2,8} = 0$; $S_{2,2} = S_{2,4} = S_{2,6}$; $S_{3,1} = S_{3,2} = 0$; $S_{3,3} = S_{3,4}$; $S_{3,5} = S_{3,6}$; $S_{3,3} < S_{3,5} < S_{3,7} < S_{3,8}$.

Anexo C2 – Resultados experimentais dos ensaios de DLS

Tabela C2 - Resultados experimentais dos ensaios de DLS efetuados às emulsões de líquidos iônicos (OMIM[NTf₂]⁺ e [P_{14,6,6,6}][NTf₂]⁻) para todos os sistemas estudados pelo grupo GSP da UC. Apresenta-se o dH (nm) das partículas em função do tempo de sonicação (min) para a cinética de formação (0 horas) e para a cinética de degradação (24, 48 e 72 horas). Encontram-se ainda discriminados os valores obtidos através do método de análise do pico médio e do método Z-average. Os dados por mim obtidos encontram-se a negrito.

Sistema	At sonicação (min)	Cinética de Formação						Cinética de Degradação									
		Instante (0 horas)						24 horas			48 horas			72 horas			
		Pico médio (nm)	Desvio padrão (nm)	Z-average (nm)	Desvio padrão (nm)	Pico médio (nm)	Desvio padrão (nm)	Z-average (nm)	Desvio padrão (nm)	Pico médio (nm)	Desvio padrão (nm)	Z-average (nm)	Desvio padrão (nm)	Pico médio (nm)	Desvio padrão (nm)	Z-average (nm)	
S _{1,1} :S _{2,1} :S _{3,1} *	5	323,9	2,89	257,2	5,3	406,6	5,36	387,2	8,58	304,3	2,76	245,6	4,81	291,0	9,40	233,50	0,85
	10	385,3	2,40	377,5	33,7	404,8	2,69	339,3	2,62	319,8	3,46	227,8	0,21	311,3	2,57	222,30	2,89
	15	380,4	4,08	307,5	18,7	384,1	3,26	310,4	6,34	304,4	3,86	235,4	1,21	373,5	4,53	305,95	11,10
	20	373,1	3,18	245,1	3,6	311,8	2,40	280,2	1,84	300,7	4,68	224,6	0,32	293,8	4,25	226,63	13,56
	25	347,4	3,09	287,8	2,7	369,8	21,78	360,2	3,89	303,2	3,70	237,2	1,78	308,6	7,47	241,00	5,12
	30	459,6	24,40	419,0	1,1	422,0	6,36	417,3	13,58	315,5	3,08	230,2	2,95	304,1	6,46	288,00	19,02
S _{1,2} :S _{2,2} :S _{3,2} *	5	254,7	2,75	221,7	1,49	260,7	5,40	212,6	0,56	263,3	2,76	224,6	2,47	256,6	3,32	207,40	2,46
	10	284,5	3,74	222,0	2,82	331,1	2,45	255,1	2,73	295,1	4,53	260,1	6,51	285,3	0,78	227,15	0,64
	15	284,6	1,69	229,8	3,79	356,6	2,37	282,1	7,67	296,7	9,55	261,6	4,37	284,6	1,91	238,43	4,61
	20	326,7	1,91	229,3	0,14	284,9	0,95	259,0	4,10	288,7	0,55	268,6	3,47	295,8	1,65	223,53	1,24
	25	388,2	3,04	311,2	7,21	284,2	2,55	257,9	0,64	291,3	9,05	264,0	7,14	295,4	6,90	222,57	1,14
	30	360,5	26,87	251,3	10,96	397,6	4,24	380,5	23,05	403,8	2,05	353,3	5,20	286,3	4,53	218,85	0,21
S _{1,3} :S _{2,3} :S _{3,3} **	5	242,2	19,12	338,2	77,86	215,4	19,04	422,7	104,71	208,3	5,03	259,9	41,95	218,5	27,47	247,10	65,27
	10	268,5	42,04	188,5	18,22	275,7	43,01	233,6	24,32	277,1	70,26	219,2	55,38	244,5	24,01	216,18	4,59
	15	318,3	13,38	253,7	28,11	277,3	67,07	238,1	39,53	299,8	23,61	225,9	4,95	319,8	39,38	250,16	25,97
	20	322,8	19,14	226,4	2,20	299,5	51,00	261,7	23,26	332,7	13,26	272,0	17,11	334,5	16,73	233,99	7,37
	25	292,3	35,24	251,0	26,94	334,8	12,30	230,8	3,06	305,5	39,76	254,0	37,31	301,4	27,02	250,11	31,93
	30	355,3	25,74	244,9	10,59	273,0	4,59	231,8	7,79	303,0	30,21	272,0	8,44	340,7	7,82	243,71	20,54
S _{1,4} :S _{2,4} :S _{3,4} **	5	208,9	10,72	722,7	254,20	228,5	9,38	431,5	102,86	219,0	6,21	495,0	210,52	220,4	9,55	407,44	145,74
	10	291,1	3,88	206,8	3,45	265,2	11,52	220,3	21,28	266,7	5,16	238,2	32,65	273,1	6,12	246,55	30,22
	15	303,9	13,65	248,2	15,15	255,2	10,68	222,3	9,40	305,6	26,19	232,2	15,35	294,5	21,30	220,07	17,96
	20	333,4	6,92	243,9	9,88	276,1	11,29	251,5	15,07	274,1	15,06	247,3	7,43	275,4	15,42	250,16	12,80
	25	304,9	22,17	222,9	3,69	272,1	18,02	209,7	3,62	274,8	21,93	203,7	12,69	291,2	12,92	209,83	7,97
	30	290,2	19,06	239,2	27,16	307,5	31,71	232,1	33,66	309,3	42,92	227,6	16,14	311,1	25,58	230,48	23,40

* Dados obtidos por Sílvia Sousa, “Membranas de base PV A mais eficientes para a captura e separação de gases”, dissertação do MIEQ, 2016 – 2017.

** Dados obtidos por Cláudia Buga, “Nanossistemas mais eficientes para terapia fotodinâmica”, dissertação do MIEB, 2016 – 2018.

Novamente, visto que as concentrações relativas de surfatantes não podem ser reveladas, no sentido de possibilitar a comparação entre cada sistema são apresentadas os seguintes critérios: $S_{1,1} < S_{1,2}$; $S_{2,1} = S_{2,2}$; $S_{3,1} > S_{3,2} = 0$. O sistema S1 foi testado para o líquido iônico OMIM recorrendo à sonda microtip, o sistema S2 foi testado para o líquido iônico OMIM recorrendo à sonda microtip, o sistema S3 foi testado para o líquido iônico $[P_{14,6,6,6}][NTf_2]$ recorrendo à sonda microtip e o sistema S4 foi testado para o líquido iônico $[P_{14,6,6,6}][NTf_2]$ recorrendo à sonda macrotip.

Anexo D - Protocolo preparação amostras para STEM

Previamente à análise das amostras por STEM procedeu-se à preparação das diluições das formulações de cápsulas. Começou-se por retirar 2 gotas, com uma pipeta de Pasteur, de cada um dos *falcons* com cápsulas em suspensão e adicionaram-se 36 gotas de água bi-destilada. De seguida, transferiu-se uma gota desta última solução para um novo *epENDORF* e adicionaram-se 8 gotas de água bi-destilada. Sonicou-se durante 3 minutos, após os quais transferiram-se 2 gotas da solução para outro *epENDORF* e adicionaram-se 6 de água bi-destilada. Desta última, retirou-se 1 gota e adicionaram-se 3 gotas de água bi-destilada, correspondendo este ao *epENDORF* com a formulação final a ser analisada.

Anexo E - Preparação do meio de cultivo para as células Balb/3T3

As células Balb/3T3 são normalmente cultivadas no Meio de Dulbecco Modificado, Mistura de nutrientes F-12, este tem elevada concentração de aminoácidos, pretendendo recriar o meio proteico em que as células de mamíferos se desenvolvem. Este possui o corante vermelho fenol, indicador do pH do meio. O meio é suplementado com 10% de FBS (soro fetal bovino), rico em fatores de crescimento que satisfazem necessidades metabólicas específicas das células. É também suplementado com 1% de penicilina e estreptomicina, esta combinação de antibióticos ajuda a prevenir a contaminação da cultura celular por bactérias gram-positivas e gram-negativas. A penicilina interfere diretamente com a parede celular das bactérias e indiretamente por estimulação de libertação de enzimas e modificação da parede celular. Por sua vez, a estreptomicina liga-se à subunidade 30S dos ribossomas bacterianos, desencadeando a inibição da síntese proteica e morte de bactérias. Por fim, o meio é ainda suplementado com 1% de L-glutamina, aminoácido essencial como componente do meio de cultura, uma que é das principais fontes de energia para as células em cultura, crucial para uma performance celular ótima.

Anexo F – Descrição detalhada dos ensaios de citotoxicidade

Amostra	Concentrações testadas	Objetivo
Nc/Si-LI	AL 7,000 mg/mL	<p>A primeira concentração testada teve por base os resultados apresentados na tese de Cláudia Buga¹⁹⁹. Os ensaios de solubilidade realizados permitiram concluir que para se verificar efeito na oxigenação do sistema é necessário um volume de cápsulas correspondente a 1/4 do volume total. Neste caso, o valor foi extrapolado para o volume total colocado no poço. Para as cápsulas em suspensão o cálculo foi direto, para as liofilizadas determinou-se a massa de cápsulas que estaria presente nesse volume, a partir dos dados obtidos por TGA. As soluções de cápsulas foram preparadas por adição do volume/massa correspondente a um volume pré-determinado de meio de cultura e, posteriormente, adicionado aos poços da placa onde já se havia formado a monocamada de células.</p> <p>Neste ensaio pretendeu-se aferir qual o efeito da formulação e metodologia de processamento da amostra na viabilidade celular.</p>
	AS 7,000 mg/mL	
	BL 7,000 mg/mL	
	BS 7,000 mg/mL	
LI	AS 0,100 mg/mL	<p>Com base na pesquisa bibliográfica chegou-se à conclusão de que a concentração testada anteriormente apesar de ser de interesse é bastante elevada, originando morte celular, pelo que se optou por testar concentrações mais baixas, correspondentes às concentrações mais elevadas encontradas na literatura consultada</p> <p>O procedimento experimental não sofreu alteração.</p> <p>A concentração de cápsulas administrada foi reduzida, tendo por base os resultados anteriores, com o objetivo de determinar-se a concentração para a qual as cápsulas não apresentavam efeito tóxico para as células. Procedeu-se à centrifugação das cápsulas em suspensão, uma vez que ao estar a adicionar água ao meio de cultura perturba-se o equilíbrio osmótico do sistema, podendo ter um impacto direto no desenvolvimento celular.</p> <p>O procedimento experimental permaneceu inalterado.</p> <p>Quantidade limite que se pode adicionar ao meio de cultura sem afetar significativamente o equilíbrio osmótico. Pipeta-se diretamente o volume de LI no poço da placa de cultura.</p> <p>Quantidades previamente testadas por aluna de Mestrado do grupo GSP na Faculdade de Farmácia da Universidade de Santiago de Compostela¹³³.</p> <p>Diminuição das concentrações testadas face aos resultados obtidos.</p> <p>O protocolo experimental sofreu alterações: as soluções de LI em meio de cultura permaneceram 72 horas com agitação orbital a 200 rpm, a uma temperatura de 25 °C. Desta forma, ocorre estimulação da</p>
	AS 0,400 mg/mL	
	AS 7,000 mg/mL	
	BS 0,100 mg/mL	
	BS 0,400 mg/mL	
	AC 0,005 mg/mL	
	AC 0,025 mg/mL	
	AC 0,050 mg/mL	
	BC 0,005 mg/mL	
	BC 0,025 mg/mL	
	BC 0,050 mg/mL	
	AD 10,00% v/v	
	AD 1,00% v/v	
AD 5,00% v/v		
AMC 1,00% v/v		
AMC 0,01% v/v		
AMC 0,10% v/v		
AMC 1% v/v		

	<p>solubilização do LI no meio de cultura, por forma a melhor avaliar a sua interação com as células. A solução foi, posteriormente, adicionada aos poços da placa de cultura com as células.</p> <p>Ensaio para tentativa de replicação dos resultados de citotoxicidade do LI apresentados em Dias, A. <i>et al.</i> (2012). O protocolo encontra-se descrito no capítulo 4.6 ¹³².</p> <p>Ensaio cujo objetivo é a determinação da concentração para a qual o LI não apresenta efeito tóxico para as células.</p> <p>As soluções de diferentes concentrações foram preparadas e permaneceram com agitação orbital a 200 rpm e a uma temperatura controlada de 25 °C para três pontos temporais distintos (72h, 96h e 120h). O ensaio WST-1 é realizado após 24 horas de contacto das células com a solução de LI.</p> <p>A quantidade máxima de cápsulas incorporada nas matrizes foi adicionada diretamente ao meio de cultura e permaneceu em contacto com o mesmo durante 72 horas, com agitação orbital de 200 rpm e a uma temperatura constante de 25 °C. Com este ensaio pretendeu-se averiguar se a quantidade de LI que é libertada pelas cápsulas e que se dissolve no meio de cultura apresenta ou não efeito citotóxico.</p> <p>De referir que as percentagens testadas correspondem à quantidade de LI presente na quantidade de cápsulas correspondente a 60% wt. das matrizes obtidas.</p> <p>Tendo por base os resultados obtidos no ensaio em que se testaram 8 diferentes concentrações de LI em meio de cultura, determinou-se a concentração máxima não citotóxica para 72 horas, após 24 horas de contacto com as células.</p> <p>Com base nos dados de TGA foi possível determinar a quantidade de cápsulas a que tal concentração equivalia, tendo-se procedido à lavagem das mesmas em acetona, por forma a garantir a remoção completa do LI do seu interior. Com este ensaio pretendeu-se verificar se a citotoxicidade atribuídas às nc/Si-LI se deve somente ao LI ou também à cápsula de sílica.</p> <p>Ensaio realizado para avaliar a citotoxicidade da sílica mesoporosa, tida como biocompatível. Tal como anteriormente, preparou-se uma solução destas partículas em meio de cultura por forma a obter-se a concentração pretendida. Posteriormente, a solução foi distribuída pelos poços da placa de cultura.</p>
	<p>HBSS 0,01% v/v</p> <p>HBSS 0,10% v/v</p> <p>HBSS 1,00% v/v</p> <p>AMC 9,4×10⁻³ % v/v</p> <p>AMC 9,4×10⁻⁴ % v/v</p> <p>AMC 9,4×10⁻⁵ % v/v</p> <p>AMC 9,4×10⁻⁶ % v/v</p> <p>AMC 9,4×10⁻⁷ % v/v</p> <p>AMC 9,4×10⁻⁸ % v/v</p> <p>AMC 9,4×10⁻⁹ % v/v</p> <p>AMC 9,4×10⁻¹⁰ % v/v</p>
Sobrenadante nc/Si-LI	<p>AC 0,95% v/v</p> <p>BC 1,44% v/v</p>
Nc/Si	<p>AC 9,4×10⁻³ % v/v</p> <p>BC 9,4×10⁻³ % v/v</p>
MCM-41	<p>9,4×10⁻³ % v/v</p>

<p>Scaffolds HA + colagénio sem nc/Si-LI incorporadas</p>	<p>1A15 1B15 1B72</p>	<p>Avaliação da citotoxicidade das matrizes puras, sem adição de cápsulas, por forma a aferir se eram ou não biocompatíveis e, consequentemente, um bom veículo de administração do material desenvolvido. Os <i>scaffolds</i> foram colocados em meio de cultura, durante 30 minutos, antes da sua adição direta aos poços para incharem, por forma a assegurar que o volume de meio de cultura no poço permanecia constante, evitando limitação do acesso aos sais e nutrientes por parte das células.</p>
<p>1A30_ACAP/ACR/ASR 1A60_ACAP/ACR/ASR 1B30_ACAP/ACR/ASR 1B60_ACAP/ACR/ASR</p>	<p>Primeiros valores testados de cápsulas adicionadas por forma a aferir se se teria de diminuir ou aumentar a quantidade incorporada nas matrizes. Foram avaliadas diferentes formas de incorporação, bem como cápsulas que tinham sido sujeitas a diferentes tipos de processamento.</p>	
<p>Scaffolds HA + colagénio com nc/Si-LI incorporadas</p>	<p>1B_AC 0,01% wt. 1B_AS 0,01% wt. 1B_BC 0,01% wt. 1B_BS 0,01% wt.</p>	<p>Tendo por base os resultados obtidos no ensaio em que se testaram 8 diferentes concentrações de LI em meio de cultura, determinou-se a concentração máxima não citotóxica para a 72 horas, após 24 horas de contacto com as células. Com base nos dados de TGA foi possível determinar a quantidade de cápsulas a que tal concentração equivalia tendo-se procedido à incorporação dessa mesma quantidade aquando do fabrico de novas matrizes. Ao realizar este ensaio pretende-se verificar se após 72 horas de contacto com as matrizes as células conseguem proliferar no interior das mesmas.</p>
<p>1B_AC 0,1% wt. 1B_AC 1,0% wt. 1B_BC 0,1% wt. 1B_BC 1,0% wt.</p>	<p>A quantidade de cápsulas incorporada nestas matrizes é a minimamente aceitável para que se possa associar o efeito na oxigenação do meio às mesmas.</p>	

A ordem que se apresenta na tabela foi a seguida experimentalmente, sendo a evolução dos valores testados e metodologias aplicadas resultante da análise dos valores de viabilidade celular obtidos para cada um dos ensaios realizados. Ao longo das iterações também o protocolo experimental foi evoluindo e sendo adaptado.

Anexo G – Cálculo de $K_L a_1$

Tabela 13 – Declive da reta de ajuste ao perfil obtido, número de pontos utilizados para realização do ajuste linear (n) e coeficiente de correlação (R^2) do ajuste respetivo. Os valores de $K_L a_1$ foram determinados por duas metodologias distintas. O $K_L a_1$ corresponde à média dos $K_L a_1$ determinados para cada um dos perfis obtidos e o $K_L a_1$ médio corresponde ao $K_L a_1$ determinado para o perfil correspondente à média dos perfis obtidos separadamente.

	Amostra	$K_L a_1$	Declive	n	R^2	$K_L a_1$ médio	n	R^2
Ensaio de sorção de O ₂	Água	-4,50 ±	-4,73	3	0,90	-4,52	3	0,90
		0,33	-4,26	3	0,89			
	Emulsão	-3,03 ±	-3,01	3	0,87	-3,05	3	0,88
			-3,27	3	0,86			
			0,23	-2,81	3			
	Cápsulas	-4,28 ±	-4,20	3	0,90	-4,28	3	0,84
			0,11	-4,36	3			
	Scaffolds sem cápsulas	-5,26 ±	-5,54	3	0,89	-5,25	3	0,86
			0,40	-4,98	3			
	Scaffolds com cápsulas	-4,50 ±	-4,88	3	0,83	-4,48	3	0,87
0,54			-4,12	3	0,91			
Ensaio de libertação de O ₂	Água	1,42 ±	1,27	3	0,98	1,41	3	0,95
		0,21	1,57	3	0,90			
		1,26 ±	1,27	3	0,99			
		0,03	1,24	3	0,99			
	Emulsão	1,62 ±	1,67	3	0,94	1,73	3	0,99
			0,07	1,56	3			
	Cápsulas	1,17 ±	0,86	3	0,99	1,13	3	0,98
			0,46	1,48	4			
		0,91 ±	0,87	3	0,99			
		0,05	0,94	3	0,99			
	Scaffolds sem cápsulas	1,66 ±	1,47	3	0,99	1,66	4	0,99
			0,36	1,91	3			
Scaffolds com cápsulas	1,50 ±	1,44	4	0,99	1,60	3	0,99	
		0,08	1,55	4				0,99

