



Patrícia Inês Soares Almeida dos Santos

# Preparação de matrizes fibrosas fotoreticuladas para a regeneração de tecido vascular

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

setembro 2016



Patrícia Inês Soares Almeida dos Santos

Preparação de matrizes  
fibrosas fotoreticuladas para  
a regeneração de tecido  
vascular

Dissertação do Mestrado Integrado em Engenharia Química, sob a orientação da Professora Doutora Maria Margarida Lopes Figueiredo e da Investigadora Pós-doc. Patrícia Manuela Almeida Coimbra  
Apresentada ao Departamento de Engenharia Química da Faculdade de Ciências e  
Tecnologia da Universidade de Coimbra

**Supervisor (es)**

Professora Doutora Maria Margarida Lopes Figueiredo  
Investigadora Pós-doc. Patrícia Manuela Almeida Coimbra

**Instituições**

Departamento de Engenharia Química  
Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade de Coimbra

Coimbra

2016



UNIVERSIDADE DE COIMBRA

*“A perplexidade é o início do conhecimento.”*

Kahlil Gilbran

## **AGRADECIMENTOS**

Gostaria de expressar, ainda que seja por poucas palavras, a minha gratidão às pessoas que me ajudaram na realização deste trabalho.

Quero começar por agradecer à Professora Doutora Maria Margarida Figueiredo pelo apoio e incentivo no desenvolvimento deste trabalho. Agradeço à Doutora Patrícia Coimbra pela sua disponibilidade, orientação pelo exemplo de dedicação e competência.

À Doutora Paula Ferreira e à Doutora Patrícia Alves pela disponibilidade, ajuda e acompanhamento na realização dos testes de hemocompatibilidade.

Agradeço aos meus amigos pelo apoio e pelos bons momentos jamais esquecidos durante estes anos. Em especial à Marta Duarte, pelo companheirismo, motivação e amizade durante todo este percurso.

Finalmente, agradeço à minha família por toda a ajuda e compreensão, por todas as palavras que me ajudaram a ultrapassar as adversidades que se impuseram neste percurso.

A todos o meu mais sincero obrigada!

## **RESUMO**

As doenças cardiovasculares são a principal causa de mortalidade a nível global. As complicações causadas por estas doenças obrigam ao recurso a cirurgias de *bypass* usando, geralmente, um vaso autólogo. Quando isto não é possível, a alternativa passa pelo uso de próteses vasculares heterólogas ou sintéticas. Face às limitações apresentadas por estes materiais, atualmente o trabalho de investigação dirige-se no sentido de desenvolver próteses por técnicas de engenharia de tecidos, ou seja, recorrendo a materiais biodegradáveis. Assim, a engenharia de tecidos propõe soluções para a reparação de vasos sanguíneos utilizando polímeros biodegradáveis como *scaffolds*. Os *scaffolds* fornecem o suporte necessário para que as células se fixem, proliferem e mantenham a sua função diferencial, favorecendo, desta forma, a regeneração do tecido.

No presente trabalho pretendeu-se desenvolver um *scaffold* adequado para a regeneração de tecido vascular. Para tal fabricaram-se várias matrizes fibrosas fotoreticuladas, compostos por policaprolactona (PCL) e gelatina modificada com grupos metacrilamida (GelMA). A gelatina foi inicialmente funcionalizada com grupos metacrílicos de forma a possibilitar a sua reticulação química por polimerização radicalar. As matrizes fibrosas foram produzidas por *electrospinning*, empregando duas variações desta técnica: *electrospinning* por *blending* e *electrospinning* coaxial. A primeira abordagem permitiu a produção de fibras homogéneas, compostas pela mistura de PCL e GelMA, enquanto que na segunda abordagem produziram-se fibras com uma estrutura “casca”-núcleo (*core-shell*), com o núcleo da fibra formado por PCL e a camada exterior formada por GelMA. Em ambas as abordagens produziram-se fibras com diferentes proporções dos dois componentes. Após o processo de *electrospinning* todas as membranas obtidas foram submetidas a um processo de fotoreticulação por irradiação de luz UV, de forma a reticular quimicamente a GelMA presentes nas fibras.

As diferentes membranas poliméricas desenvolvidas, foram caracterizadas relativamente às suas propriedades químicas, morfológicas e biológicas.

A análise SEM permitiu concluir que as fibras fotoreticuladas produzidas por *electrospinning* por *blending* apresentam sinais de degradação quando a concentração de

*Preparação de matrizes fibrosas fotoreticuladas para a regeneração de tecido vascular*

GelMA é mais elevada. Por sua vez, o processo de fotoreticulação não influencia a morfologia da superfície das fibras coaxiais. A análise de FTIR permitiu identificar a presença dos dois polímeros utilizados nas fibras sintetizadas. O estudo de perda de massa comprovou indiretamente o sucesso do processo de fotoreticulação, revelando que as membranas fotoreticuladas perdem menos massa que as suas homólogas não reticuladas. A determinação dos ângulos de contacto dinâmicos demonstrou que o *scaffold* de PCL exibia um carácter marcadamente hidrofóbico, contrariamente às membranas compósitas com GelMA que evidenciam um carácter hidrofílico. Relativamente aos estudos de hemocompatibilidade, estes demonstraram que o *scaffold* composto por PCL apresenta uma menor tendência para formar trombos. Todas as membranas compostas por GelMA são trombogénicas, sendo a formação de trombos mais elevada no caso das fibras coaxiais. A determinação do índice hemolítico sugere que nenhum dos *scaffolds* produzidos apresenta carácter hemolítico, apresentando um índice hemolítico inferior a 5 %. Por fim, os estudos de viabilidade celular demonstram que os fibroblastos dermais, quando em contacto com as membranas sintetizadas, têm a capacidade de proliferar e aderir aos materiais.

Face aos resultados apresentados, conclui-se que os *scaffolds* sintetizados possuem elevado potencial para o uso na regeneração do tecido vascular.

**PALAVRAS-CHAVE:** *Electrospinning*, fotoreticulação, *scaffolds*, gelatina, policaprolactona, biocompatibilidade.

## **ABSTRACT**

Cardiovascular diseases are the leading cause of mortality around the globe. The complications caused by these diseases require the use of bypass surgery using, generally, autografts. When these vessels are not available, the alternative is the use of heterologous or synthetic prosthesis. Given the limitations presented by these materials, currently, the research work is directed towards the development of prostheses by tissue engineering techniques, using biodegradable materials. Thus, tissue engineering offers solutions for repairing blood vessels using biodegradable polymers as *scaffolds*. The *scaffolds* provide the necessary support for the cells to attach, proliferate and maintain their differential function, favoring the tissue regeneration

The work here described aimed to the development of suitable scaffolds for vascular regeneration. For this purpose, photocrosslinkable fibrous mats composed of polycaprolactone (PCL) and gelatin methacrylamide (GelMA) were produced. Gelatin was firstly functionalized with methacrylic groups, in order to enable its chemical crosslinking by radical polymerization. Fibers mats were produced by electrospinning, using two variations of this technique: blending electrospinning and coaxial electrospinning. The first approach allowed the production of homogeneous fibers, composed of a blend of PCL and GelMA. The use of the second approach made it possible to produce fibers with a core-shell structure, with a nucleus made from PCL and a shell composed of GelMA. For both approaches, fibers with different proportions of PCL and GelMA were produced. After fabrication, all mats were, subjected to a photocrosslinking process by irradiation with UV light, in order to achieve the chemical photocrosslinking of the GelMA present in the fibers

The different developed polymeric membranes were characterized regarding their chemical, morphological and biological properties.

The SEM analysis revealed that photocrosslinked fibers produced by blending electrospinning showed signs of degradation, especially in the fibers with the highest amount of GelMA. On the other hand, the photocrosslinking process didn't affect the surface morphology of the coaxial fibers. The FTIR analysis confirmed the presence of the two polymers in fibers chemical composition. The weight loss study indirectly proved the success

*Preparação de matrizes fibrosas fotoreticuladas para a regeneração de tecido vascular*

of the photocrosslinking process, by revealing that the photocrosslinking membranes lost less mass than their uncrosslinked counterparts. The dynamic water contact angles measurements showed that the PCL scaffold exhibited a markedly hydrophobic character, opposite to the composite membranes composed of GelMA, that had a hydrophilic character. Hemocompatibility tests demonstrated that PCL *scaffold* has a nonthrombogenic surface. All membranes with GelMA presented a thrombogenic nature and the blood clots formation was higher for the coaxial fibers. The determination of hemolytic index showed that none of the produced scaffolds presented a hemolytic character (haemolytic index below 5 %). Finally, the cell viability studies allowed the conclusion that dermal fibroblasts have the ability to proliferate and adhere to the materials when in contact with the synthesized membranes.

In the light of the obtained results, it may be concluded that the synthesized scaffolds present promising features for applications in vascular tissue engineering.

**KEYWORDS:** Electrospinning, photocrosslinking, scaffolds, gelatin, polycaprolactone, biocompatibility.



## ÍNDICE

MOTIVAÇÃO E OBJETIVOS .....	1
ESTRUTURA DA TESE .....	2
CAPÍTULO 1 - INTRODUÇÃO.....	4
1.1. Engenharia de Tecidos e Medicina Regenerativa .....	4
1.1.1. Estratégia para regeneração de tecido vascular .....	5
1.2. <i>Scaffolds</i> .....	7
1.2.1. Requisitos dos <i>scaffolds</i> .....	7
1.2.2. <i>Scaffolds</i> compósitos .....	9
1.3. Polímeros Biodegradáveis .....	10
1.3.1. Polímeros naturais .....	10
1.3.2. Polímeros Sintéticos .....	13
1.4. Técnicas de fabrico de <i>scaffolds</i> .....	14
1.4.1. <i>Electrospinning</i> .....	14
1.4.2. Parâmetros do <i>electrospinning</i> .....	17
CAPÍTULO 2 - OBJETIVOS EXPERIMENTAIS .....	20
2.1. Objetivos Experimentais .....	20
2.1.1. Abordagem experimental I .....	22
2.1.2. Abordagem Experimental II .....	22
CAPÍTULO 3 - MATERIAIS E MÉTODOS .....	23
3.1. Materiais .....	23
3.2. Preparação dos <i>scaffolds</i> .....	24
3.2.1. Modificação da gelatina.....	24
3.2.2. Preparação dos <i>scaffolds</i> compósitos de GelMA e PCL .....	25
3.2.3. Fotoreticulação dos <i>scaffolds</i> compósitos PCL/GelMA.....	28

3.3.	Caracterização dos <i>scaffolds</i> .....	29
3.3.1.	Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier com Reflexão Total Atenuada (FTIR-ATR) .....	30
3.3.2.	Microscopia eletrónica de varrimento (SEM) .....	30
3.3.3.	Determinação de ângulos de contacto dinâmicos .....	31
3.3.4.	Estudos de perda de massa .....	31
3.3.5.	Biocompatibilidade.....	32
3.4.	Hemocompatibilidade .....	34
3.4.1.	Avaliação da trombogenicidade .....	34
CAPÍTULO 4- RESULTADOS E DISCUSSÃO .....		37
4.1.	Síntese dos <i>scaffolds</i> compósitos PCL/GelMA .....	37
4.2.	Caracterização físico-química e morfológica dos <i>scaffolds</i> .....	38
4.3.	Determinação dos ângulos de contacto dinâmicos .....	54
4.4.	Hemocompatibilidade .....	56
4.4.1.	Avaliação da trombogenicidade .....	56
4.4.2.	Determinação do índice hemolítico .....	58
4.5.	Biocompatibilidade .....	59
4.5.1.	Estudo da viabilidade celular.....	59
Capítulo 5 – CONCLUSÕES E TRABALHO FUTURO .....		63
5.1.	Conclusões gerais .....	63
5.2.	Trabalho Futuro .....	65
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....		67

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.1</b> A tríade da ET. Combinando os três elementos chaves tais como células, biomateriais e moléculas sinalizadoras é possível a regeneração de tecidos ou órgãos.....	4
<b>Figura 1.2.</b> Esquema representativo do princípio da Engenharia de Tecidos. (A), (B) Geralmente as células são extraídas de fontes autólogas ou alogénicas e posteriormente cultivadas in vitro. (C) É utilizado um scaffold que tem como objetivo suportar o crescimento celular, na presença de fatores de crescimento e estímulos mecânicos. (D) A combinação dos vários componentes, <i>scaffold</i> , células, fatores de crescimento, e de estímulos mecânicos recria um microambiente funcional que estimula a organização do tecido obtendo-se um enxerto, que é então transplantado para o paciente. ....	6
<b>Figura 1.3</b> Configuração do aparelho de <i>electrospinning</i> . ....	14
<b>Figura 1.4</b> Estratégias de <i>electrospinning</i> : a) <i>electrospinning</i> por <i>blending</i> e b) <i>electrospinning</i> coaxial.....	17
<b>Figura 2.1</b> Esquema do procedimento experimental seguido no desenvolvimento dos <i>scaffolds</i> fibrosos fotoreticulados. ....	21
<b>Figura 3.1</b> Esquema da reação da gelatina com o anidrido metacrílico. ....	24
<b>Figura 3.2</b> Esquema da montagem do sistema de <i>electrospinning</i> por <i>blending</i> .....	25
<b>Figura 3.3</b> Esquema da montagem do sistema de <i>electrospinning</i> coaxial.....	27
<b>Figura 3.4.</b> Reticulação da GelMA por polimerização radicalar dos resíduos metacriamida..	29
<b>Figura 3.5</b> Processo de fotoreticulação das membranas e preparação das membranas para caracterização. ....	29
<b>Figura 4.1</b> Aparência visual dos scaffolds depois de submetidos ao processo de fotoreticulação (irradiação de UV durante 20 minutos). ....	38
<b>Figura 4.2</b> A) B) Fotografias obtidas pela técnica SEM da superfície das fibras de PCL originais com ampliações de 1000x, 10000x, respetivamente; C) histograma dos diâmetros das fibras; D) E) Fotografias obtidas pela técnica SEM da superfície das fibras de PCL fotoreticuladas com ampliações de 1000x, 10000x, respetivamente; F) histograma dos diâmetros das fibras;.....	38
<b>Figura 4.3</b> A) C) E) Fotografias obtidas pela técnica SEM da superfície das fibras originais produzidas por <i>electrospinning</i> por <i>blending</i> com 25, 50 e 75 % de GelMA, respetivamente, (ampliações de 1000x e 10000x) e representação dos respetivos histogramas (A3, C3 e E3); B) D) F) Fotografias obtidas pela técnica SEM da superfície das fibras fotoreticuladas	

produzidas por *electrospinning* por *blending* com 25, 50 e 75 % de GelMA , respetivamente (ampliações de 1000x e 10000x) e representação dos respetivos histogramas (B3, D3 e F3).40

**Figura 4.4.** A) C) E) Fotografias obtidas pela técnica SEM da superfície das fibras originais produzidas por *electrospinning* coaxial com 25, 50 e 75 % de GelMA, respetivamente (ampliações de 1000x e 10000x) e representação dos respetivos histogramas (A3, C3 e E3); B) D) F) Fotografias obtidas pela técnica SEM da superfície das fibras fotoreticuladas produzidas por *electrospinning* coaxial com 25, 50 e 75 % de GelMA, respetivamente (ampliações de 1000x e 10000x) e representação dos respetivos histogramas (B3, D3 e F3).42

**Figura 4.5** Espectro ATR-FTIR dos *scaffolds* compósitos fotoreticulados, produzidos por *electrospinning* por *blending*, compostos por PCL/75, 50 e 25 % GelMA e do *scaffold* de PCL e GelMA puros. ....45

**Figura 4.6** Espectro ATR-FTIR dos *scaffolds* compósitos fotoreticulados, produzidos por *electrospinning* coaxial, compostos por PCL/75, 50 e 25 % GelMA e do *scaffold* de PCL e GelMA puros. ....47

**Figura 4.7** A) B) Fotografias obtidas pela técnica SEM da superfície das fibras compósitas 50GelMA/50PCL fotoreticuladas incubadas e controlo incubadas, respetivamente, produzidas por *electrospinning* por *blending* (ampliações de 5000x, e A3) e B3) imagens SEM obtidas a ampliações de 10000x). Representação dos respetivos histogramas (A2 e B2).....48

**Figura 4.8** Espectro ATR-FTIR do *scaffolds* compósitos 50PCL/50GelMA sintetizados a partir de técnica de *electrospinning* por *blending*. ....49

**Figura 4.9** A) B) e C) Fotografias obtidas pela técnica SEM da superfície das fibras compósitas 50GelMA/50PCL fotoreticuladas originais, fotoreticuladas incubadas e controlo incubadas, respetivamente, produzidas por *electrospinning* coaxial (ampliações de 5000x, e A3), B3 e C3) imagens SEM obtidas a ampliações de 10000x). Representação dos respetivos histogramas (A2, B2 e C2). ....51

**Figura 4.10** Perda de massa, em solução salina tampão fosfato (pH = 7,4), dos *scaffolds* compósitos produzidos a partir de soluções com diferentes proporções de GelMA.....52

**Figura 4.11** Ângulos de contacto dinâmicos dos diferentes *scaffolds* produzidos por *electrospinning*. ....54

**Figura 4.12** Valores médios dos coágulos formados na superfície dos *scaffolds* após 40 min em contacto com o sangue.....56

**Figura 4.13** Valores dos índices hemolíticos obtidos através do contacto direto dos *scaffolds* produzidos por *electrospinning*, por *blending* e coaxial.....58

**Figura 4.14** Avaliação da atividade celular após 1, 3 e 7 dias de contacto com os *scaffolds* compósitos produzidos por *electrospinning* por *blending* e coaxial e do *scaffold* de PCL puro. ....60

**Figura 4.15** Fotografias microscópicas das células de fibroblastos humanos quando em contacto com diferentes *scaffolds* (\*), durante um período de incubação de 1, 3 e 7 dias. K<sup>+</sup> diz respeito ao controlo positivo e K<sup>-</sup> ao controlo negativo. ....61

**Figura 4.16** Fotografias de SEM da cultura celular de fibroblastos humanos na presença dos *scaffolds* durante períodos de 1, 3 e 7 dias. ....62

## ÍNDICE DE TABELAS

<b>Tabela 1.2</b> Estudos realizados no âmbito da ET na produção de <i>scaffolds</i> e/ou outros dispositivos a partir de gelatina. ....	12
<b>Tabela 3.1</b> Resumo dos materiais utilizados.....	23
<b>Tabela 3.2</b> Composição das soluções submetidas a <i>electrospinning</i> por <i>blending</i> e parâmetros associados ao processo. ....	26
<b>Tabela 4.1</b> Valores obtidos para o diâmetro médio das fibras compósitas produzidas por <i>electrospinning</i> por <i>blending</i> e coaxial e respetivo desvio-padrão. ....	43
<b>Tabela 4.2</b> Bandas características do espectro infravermelho das ligações peptídicas (ligação amida). ....	44
<b>Tabela 4.3</b> Perda de massa, em solução salina tampão fosfato (pH = 7,4), dos <i>scaffolds</i> compósitos produzidos a partir de soluções com diferentes proporções de GelMA. ....	53

## NOMENCLATURA

---

<b>AAc</b>	Ácido Acético
<b>ASTM</b>	<i>American Society for Testing and Materials</i>
<b>DMEM-F12</b>	Meio <i>Eagle</i> modificado por Dulbecco
<b>DMF</b>	Dimetilformamida
<b>DNA</b>	Ácido Desoxirribonucleico
<b>ET</b>	Engenharia de Tecidos
<b>FBS</b>	Soro fetal bovino
<b>FDA</b>	<i>Food and Drug Administration</i>
<b>FTIR-ATR</b>	Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier com Reflexão Total Atenuada
<b>GelMA</b>	Gelatina Metacrilamida
<b>Hb</b>	Hemoglobina
<b>IPN</b>	Instituto Pedro Nunes
<b>IPS</b>	Células Pluripotentes Induzidas
<b>ISO</b>	<i>International Organization for Standardization</i>
<b>MAA</b>	Anidrido Metacrílico
<b>MEC</b>	Matriz Extracelular
<b>MTS</b>	<i>3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium</i>
<b>NHDF</b>	Fibroblastos normais dermais humanos
<b>PAA</b>	Poli (ácido acrílico)
<b>PBS</b>	<i>Phosphate Buffer Solution</i>
<b>PCL</b>	poli ( $\epsilon$ -caprolactona)
<b>PET</b>	Poli (Tereftalato de etileno)
<b>p-HEMA</b>	Poli (metacrilato de 2-hidroxietilo)
<b>pI</b>	Ponto isoeletrico
<b>PTFE</b>	Politetrafluoretileno
<b>PVA</b>	Poli (álcool vinílico)
<b>RNA</b>	Ácido ribonucleico

*Preparação de matrizes fibrosas fotoreticuladas para a regeneração de tecido vascular*

<b>SEM</b>	Microscopia Eletrónica de Varrimento
<b>TFE</b>	2,2,2-Trifluoroetanol
<b><math>T_g</math></b>	Temperatura de transição vítrea (°C)
<b>UBI</b>	Universidade da Beira Interior
<b>UV</b>	Radiação ultravioleta
<b><math>W_0</math></b>	Peso inicial da amostra (antes de ser imersa em PBS) (g)
<b><math>W_t</math></b>	Peso final da amostra (depois de ser imersa em PBS) (g)
<b>[Hb]</b>	Concentração de hemoglobina

---



## **MOTIVAÇÃO E OBJETIVOS**

Os problemas cardiovasculares são, atualmente, a principal causa de morte no mundo. De acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS), em 2012, 17,5 milhões de pessoas morreram devido a doenças cardiovasculares. Entre estas patologias, a mais comum é a aterosclerose, onde se verifica um espessamento e perda de elasticidade da parede arterial (Qi *et al.*, 2013). As complicações causadas por esta doença obrigam ao recurso a meios cirúrgicos para restabelecer o fluxo sanguíneo através de uma cirurgia de *bypass* onde, geralmente, é utilizado um vaso autólogo. Quando estes vasos não estão disponíveis recorre-se ao uso de próteses vasculares heterólogas ou sintéticas.

Ensaio clínicos realizados demonstram que as próteses heterólogas, de origem animal ou humana, não têm correspondido às expectativas devido à perda de viabilidade associada à degeneração do tecido (Simão *et al.*, 2013).

Como alternativa às próteses biológicas podem ser usadas próteses vasculares sintéticas produzidas a partir de polímeros como o politetrafluoretileno expandido (PTFE, Gore-Tex®) ou o poli(tereftalato de etileno) (PET, Dacron®), utilizadas com sucesso na substituição de vasos sanguíneos com diâmetro superior a 6 mm (Fu *et al.*, 2014). Todavia estas próteses apresentam algumas limitações. Apesar de apresentarem propriedades mecânicas consistentes, a fraca biocompatibilidade e a pobre interação com as células vasculares comprometem o uso destes materiais na regeneração de tecidos. Para além disso as próteses sintéticas apresentam também um carácter trombogénico, o que as impede de serem utilizadas na substituição de vasos sanguíneos de pequeno diâmetro (< 6 mm) (Correia *et al.*, 2016).

No sentido de melhorar as próteses atualmente disponíveis e desenvolver novos materiais e soluções que ajudem a colmatar as limitações anteriormente mencionadas, atualmente, o trabalho de investigação dirige-se no sentido de desenvolver próteses por técnicas de engenharia de tecidos, ou seja, recorrendo a materiais biodegradáveis.

A Engenharia de Tecidos (ET) vasculares é um campo que tem sofrido um enorme crescimento ao longo da última década e propõe soluções válidas para a reparação dos vasos sanguíneos tendo como principal objetivo a produção de neovasos utilizando células

autólogas utilizando um polímero biodegradável como *scaffold* (Fu *et al.*, 2014). Desta forma, prevê-se que as células produzam a matriz extracelular (MEC), enquanto que o polímero é degradado, sendo criado gradualmente o tecido pretendido (Hasan *et al.*, 2014). Assim, a ET utiliza três componentes para alcançar os resultados **a)** células, **b)** *scaffolds* e **c)** fatores de crescimento (Gautam *et al.*, 2013). O *scaffold* revela-se um componente muito importante pois interage com as células e com os fatores de crescimento de forma a regenerar um tecido específico.

Em geral, um único polímero pode não apresentar todas as propriedades requeridas para o *scaffold*. Neste sentido tem havido um crescente interesse no desenvolvimento de *scaffolds* compósitos, que combinem hidrogéis e matrizes fibrosas numa única estrutura, uma vez que esta estratégia tem o potencial de combinar as vantagens de cada uma das estruturas e, simultaneamente, colmatar as suas desvantagens. Assim, misturando polímeros, é possível produzir um *scaffold* compósito com características desejadas. Para isto, serão utilizados polímeros biodegradáveis e biocompatíveis, nomeadamente a gelatina, para produzir os hidrogéis, e a policaprolactona (PCL), para produzir as matrizes fibrosas.

A preparação de *scaffolds* pode ser efetuada por inúmeras técnicas sendo que o método mais simples, económico e capaz de produzir nanofibras contínuas de diversos materiais é o *electrospinning* (Zhang *et al.*, 2006).

Em suma, este trabalho tem como objetivo produzir *scaffolds* compósitos para aplicações em engenharia de tecidos vasculares, através da produção por *electrospinning* de matrizes fibrosas fotoreticuladas compostas por gelatina metacrilamida (GelMA) e policaprolactona (PCL).

## **ESTRUTURA DA TESE**

O presente trabalho está organizado em cinco capítulos, que, por sua vez, se encontram divididos em subcapítulos onde são detalhados os temas tratados em cada um desses capítulos.

No primeiro capítulo, **Capítulo 1**, é feito o enquadramento da temática abordada na dissertação, descrevendo-se o conceito de Engenharia de Tecidos e a estratégia utilizada para

a regeneração tecidual. É ainda discutido a importância dos polímeros biodegradáveis sendo introduzidos os principais polímeros utilizados no desenvolvimento do trabalho, nomeadamente a gelatina e a PCL. É feita também uma breve descrição do método utilizado na produção de *scaffolds* e dos parâmetros associados a esta técnica. Este capítulo tem como principal objetivo facilitar a compreensão do trabalho realizado.

No **Capítulo 2** é feito um enquadramento do trabalho experimental desenvolvido, procedendo-se à descrição pormenorizada do processo de produção de *scaffolds* através de duas metodologias distintas (*electrospinning* por *blending* e *electrospinning coaxial*). Neste capítulo são estabelecidos os objetivos práticos a atingir.

No **Capítulo 3** são listados os materiais utilizados durante o desenvolvimento do trabalho prático seguindo-se da descrição detalhada da modificação da gelatina com o anidrido metacrílico. Posteriormente especifica-se os procedimentos de preparação de *scaffolds* para as duas abordagens experimentais. Por fim são descritas as técnicas utilizadas na caracterização das fibras obtidas.

No **Capítulo 4** apresentam-se todos os resultados obtidos e a sua discussão. No último capítulo, **Capítulo 5**, resumem-se os aspetos mais significativos do estudo realizado e perspetivam-se trabalhos futuros.

## CAPÍTULO 1 - INTRODUÇÃO

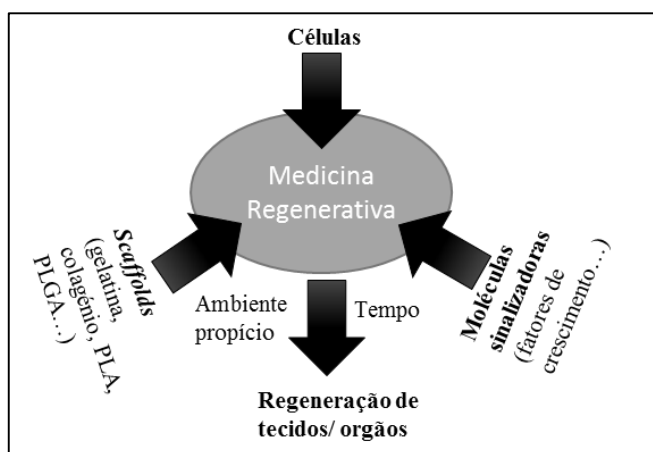
### 1.1. Engenharia de Tecidos e Medicina Regenerativa

A ocorrência de doenças, lesões ou traumas pode conduzir ao dano e à degeneração de tecidos do corpo humano, que necessita de tratamentos para facilitar a sua reparação, substituição ou regeneração.

A Engenharia de Tecidos é um dos campos da medicina regenerativa que surgiu pela primeira vez como uma disciplina distinta no campo das ciências biomédicas em 1993 por Vacanti e Langer's. É uma área multidisciplinar que engloba princípios da bioquímica, engenharia e ciência dos materiais para produzir tecidos artificiais para a reparação ou substituição de tecidos ou órgãos danificados (Elnakady *et al.*, 2015). Este campo da medicina regenerativa, consiste na regeneração de órgãos e tecidos vivos, através do recrutamento de tecido do próprio paciente, que são dissociados em células e cultivadas sobre suportes biológicos ou sintéticos, conhecidos como *scaffolds* (suportes, matrizes tridimensionais), para então serem reinseridos no paciente (Barbanti *et al.*, 2005).

Assim, a reconstrução de um novo tecido, utilizando a ET, baseia-se em três componentes chaves nomeadamente: **i) as células** que são obtidas a partir do tecido do paciente, incluindo nervo, fígado, pâncreas, cartilagem e osso, bem como células estaminais embrionárias, células estaminais adultas, células pluripotentes induzidas (IPS), ou

células precursoras; **ii) Scaffolds**, que acam como suporte físico para a adesão e proliferação das células ; e **iii) fatores de crescimento** que promovem a adesão, proliferação, migração e diferenciação celular, como é apresentado na Figura 1.1.



**Figura 1.1** A tríade da ET. Combinando os três elementos chaves tais como células, biomateriais e moléculas sinalizadoras é possível a regeneração de tecidos ou órgãos. Adaptado de Khang, (2012).

## Capítulo 1 - Introdução

Atualmente a ET é utilizada com sucesso em diversas áreas tais como: ortopédicas, respiratórias, construção de órgãos e vascular.

### 1.1.1. Estratégia para regeneração de tecido vascular

Os problemas cardiovasculares são, atualmente, a principal causa de mortalidade no mundo. Entre estas patologias, a mais comum é a aterosclerose, onde se verifica um espessamento e perda de elasticidade da parede arterial (Qi *et al.*, 2013).

Geralmente, os tratamentos baseiam-se no transplante de tecidos do próprio indivíduo, de uma parte do corpo para outra (enxertos autólogo) ou de um paciente para outro (enxertos alogénicos). Uma outra alternativa passa pelo uso de enxertos vasculares sintéticos. Apesar destes tratamentos serem revolucionários, apresentam diversas limitações (O'Brien, 2011). O uso de enxertos autólogos é caro, doloroso e limitado devido à falta de dadores de tecidos. Para além disso, a obtenção do tecido envolverá um segundo local cirúrgico, sujeito a morbilidade e possíveis complicações como hematoma e inflamação (McKenna *et al.*, 2012; Hasan *et al.*, 2014). Os tecidos alogénicos são alternativas possíveis aos tecidos autólogos, contudo apresentam uma série de fatores de risco, nomeadamente a possibilidade de rejeição do sistema biológico e a possível transmissão de doenças. Os enxertos sintéticos são, geralmente, feitos de Politetrafluoretileno (PTFE) e Polietileno Tereftalato (PET), estando comercialmente disponíveis para substituição de vasos de maior diâmetro (> 6 mm), superando as limitações dos enxertos autólogos tais como a fraca disponibilidade, incompatibilidade de tamanho e a intervenção a uma segunda cirurgia. Contudo, este tipo de enxertos não pode ser utilizado para a substituição de vasos sanguíneos de diâmetro inferior a 6 mm uma vez que os enxertos são vulneráveis a aterosclerose. Além disso, o uso destas próteses resulta em oclusão, devido ao carácter trombogénico e deficiente complacência dos materiais, que por sua vez provoca hiperplasia (Sankaran *et al.*, 2015).

Com o objetivo de colmatar as falhas identificadas pelo uso dos métodos anteriormente mencionados surge um novo ramo da biotecnologia médica, a Engenharia de Tecidos (ET). Esta alternativa tem como objetivo regenerar tecidos danificados, em vez de substituí-los, através do desenvolvimento de substitutos biológicos que restauram, mantêm e melhoram a função do tecido (Ikada, 2006).

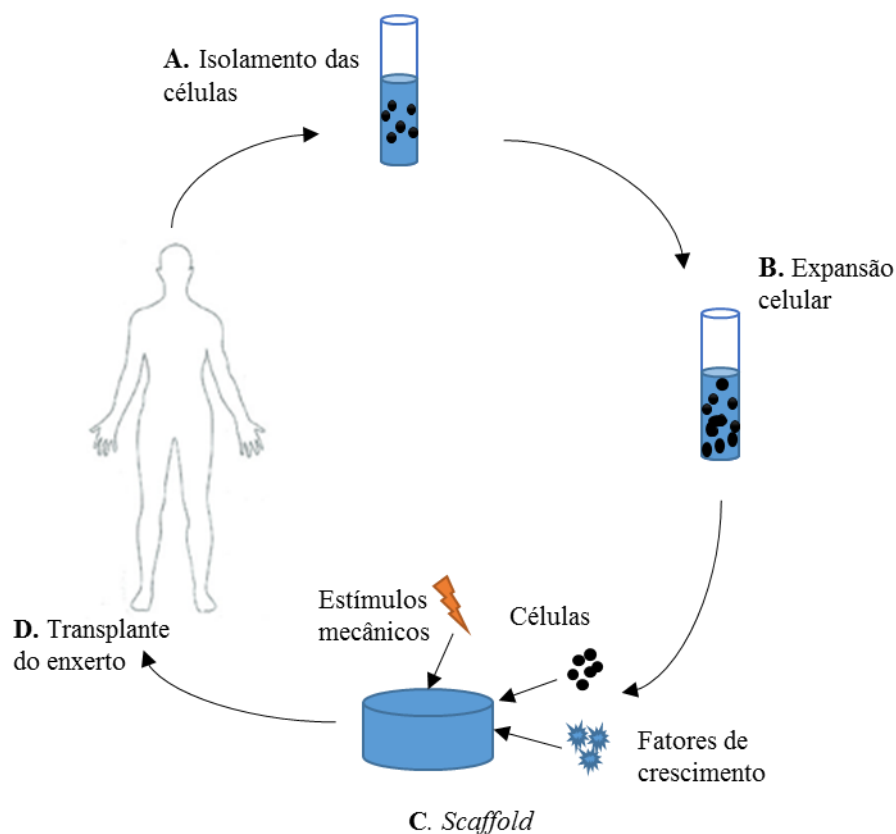
A Engenharia de Tecidos vasculares estuda a formação e crescimento de vasos sanguíneos através da utilização de *scaffolds*, células, fatores de crescimento, citocinas e estímulos mecânicos de forma a ser criado um microambiente fisiológico. Assim, os componentes usados em engenharia vascular são: *scaffolds* biodegradáveis, células

## Capítulo 1 - Introdução

provenientes de uma fonte autóloga ou alogénica, e fatores de crescimento, necessários para criarem um microambiente estimulante, com é ilustrado na Figura 1.2 (Serbo & Gerecht, 2013).

Os *scaffolds* são partes cruciais da engenharia de tecidos, pois promovem a estrutura e a forma para o desenvolvimento do novo tecido.

De acordo com a estratégia apresentada na Figura 1.2 as células progenitoras são isoladas e expandidas em cultura. Posteriormente, estas células são cultivadas *in vitro* e introduzidas num *scaffold*, que juntamente com fatores de crescimento e estímulos mecânicos tem a capacidade de recriar um enxerto vascular, com características semelhantes às do matiz extracelular (MEC) que, por fim, vai ser implantado no paciente. As células vão aderir, proliferar e segregar progressivamente a sua matriz extracelular ao mesmo tempo que o *scaffold* se degrada. Este processo permite a formação de um novo tecido.



**Figura 1.2.** Esquema representativo do princípio da Engenharia de Tecidos. (A), (B) Geralmente as células são extraídas de fontes autólogas ou alogénicas e posteriormente cultivadas *in vitro*. (C) É utilizado um *scaffold* que tem como objetivo suportar o crescimento celular, na presença de fatores de crescimento e estímulos mecânicos. (D) A combinação dos vários componentes, *scaffold*, células, fatores de crescimento, e de estímulos mecânicos recria um microambiente funcional que estimula a organização do tecido obtendo-se um enxerto, que é então transplantado para o paciente.

## Capítulo 1 - Introdução

A funcionalidade deste processo vai depender de diversos aspetos. O isolamento das células e o cultivo *in vitro* requerem condições ambientais ótimas de pH, temperatura etc. É importante mencionar que cada tipo de tecido requer condições distintas, sendo por isso necessário um estudo aprofundado das condições ambientais biológicas *in vivo* para que seja possível uma otimização da cultura celular *in vitro*. O *scaffold* deve permitir a formação do tecido em 3D. Esta estrutura apenas é conseguida de houver uma boa fixação, proliferação e organização celular e se o *scaffold* permitir o fornecimento de nutrientes às células e a eliminação dos resíduos. Assim, para alcançar com sucesso uma aplicação específica é necessário uma otimização de diversos aspetos (Papenburg, 2009).

### 1.2. Scaffolds

A ET utiliza métodos para promover o crescimento de células através da manipulação de vários biomateriais, artificiais ou naturais, que fornecem o suporte para crescimento controlado de tipos específicos de tecido. Estes suportes são chamados de *scaffolds* e têm propriedades físicas, mecânicas e químicas apropriadas á adesão de células e formação de novo tecido.

Um *scaffold* é uma estrutura tridimensional que mimetiza a matriz extracelular, permitindo a adesão, migração e proliferação celular que resulta na regeneração do tecido (Shi, 2006). Assim, a função dos *scaffolds* em ET é tentar replicar as funções destas matrizes extracelulares sendo por isso fundamental a compreensão da sua estrutura, a interação com as células e principais funções.

#### 1.2.1. Requisitos dos *scaffolds*

Com vista a regeneração de diferentes tipos de tecidos, têm sido fabricados inúmeros *scaffolds* a partir de uma variedade de biomateriais e de técnicas de fabrico, os quais têm demonstrado potencial *in vitro* mas falham quando implantados *in vivo*, devido sobretudo a uma incapacidade para a vascularização. Neste sentido, independentemente do tipo de tecido, é importante ter em conta um conjunto de aspetos fundamentais na conceção de um *scaffold* para uso em ET:

## Capítulo 1 - Introdução

- i) **Biocompatibilidade:** O requisito fundamental para um *scaffold* é que este seja biocompatível. Uma vez implantado *in vivo*, o *scaffold* não pode induzir resposta nociva do ambiente biológico, ou seja, os materiais que compõem o *scaffold* e os seus produtos de degradação não podem provocar uma resposta inflamatória inadequada, nem demonstrarem imunogenicidade ou citotoxicidade (Gualandi, 2011).
- ii) **Biodegradabilidade:** O objetivo da ET é levar a que as células do próprio organismo do paciente possam substituir os *scaffolds* nele implantado, isto é, os *scaffolds* não são implantes permanentes. Por conseguinte, o *scaffold* deve ser biodegradável, de modo a permitir que as células produzam a própria matriz extracelular. Para além disso, os subprodutos da degradação não podem ser tóxicos e devem ser capazes de sair do organismo sem interferirem com os restantes órgãos (Gualandi, 2011; O'Brien, 2011)
- iii) **Propriedades mecânicas:** idealmente, o *scaffold* deve possuir propriedades mecânicas consistentes com a localização anatómica na qual vai ser implantado. Partindo de um ponto de vista prático, o *scaffold* tem que ser resistente o suficiente para permitir a cirurgia e o manuseamento durante a implantação. As características mecânicas, nomeadamente a rigidez, a força e a resistência às tensões sofridas *in vivo*, devem ser semelhantes às do tecido nativo até que o novo tecido formado ocupe a matriz do *scaffold* (Chan & Leong, 2008; Gualandi, 2011; O'Brien, 2011).
- iv) **Arquitetura:** A arquitetura do *scaffold* utilizados em ET é um requisito fundamental. O *scaffold* deve apresentar uma estrutura porosa interligada, que facilite o crescimento do tecido, a vascularização e que assegure o transporte de nutrientes e oxigénio e a remoção dos resíduos. Contudo, uma elevada porosidade reduz significativamente as propriedades mecânicas do *scaffold*, pondo em causa a sua integridade estrutural (Gautam *et al.*, 2013). Outro componente chave é o tamanho médio dos poros do *scaffold*. Os poros necessitam de ser grandes o suficiente de forma a permitir a migração celular e facilitar a vascularização. Assim, existe uma gama típica de poros que depende do tipo de célula a utilizar e do tecido (Gualandi, 2011; O'Brien, 2011).

As características do *scaffold*, descritas anteriormente (biocompatibilidade, biodegradabilidade, propriedades mecânicas e arquitetura) estão diretamente relacionadas com dois fatores que influenciam as propriedades do *scaffold*: **1)** o tipo de material polimérico utilizado e **2)** a tecnologia de fabrico do *scaffold*. Por exemplo, os materiais, mesmo que biocompatíveis, podem conter substâncias residuais tóxicas que podem causar efeitos prejudiciais. Tais substâncias podem ser monómeros, de impurezas do



## Capítulo 1 - Introdução

material de partida ou substâncias derivadas do processamento do material (produtos de degradação, solventes orgânicos, etc.). Por outro lado, as propriedades mecânicas dependem não só da matéria-prima utilizada mas também da arquitetura do *scaffold*, que, por sua vez, é determinada pela técnica utilizada para o seu fabrico (Gualandi, 2011).

### 1.2.2. *Scaffolds* compósitos

A regeneração do tecido lesado vai depender fortemente do material utilizado na produção do *scaffold*.

Os *scaffolds* compósitos são fabricados pela combinação de diferentes polímeros, tirando vantagem das características individuais de cada componente individual, e assim visando obter uma sinergia nas propriedades finais. É possível combinar fibras com propriedades físicas e biológicas diferentes tais como fibras hidrofóbicas/hidrofílicas, fibras com diferentes taxas de degradação e fibras sintéticas/biológicas. Desta forma são formadas fibras híbridas com as propriedades desejadas. As características de hidrofílicidade/hidrofobicidade são um fator crítico pois influenciam a coagulação do sangue e adesão celular (Tan *et al.*, 2010). Neste sentido, é importante a produção de *scaffolds* compósitos, constituídos por polímeros sintéticos e naturais, combinando desta forma as propriedades mecânicas adequadas de materiais sintéticos com o excelente comportamento biológico dos polímeros naturais (Catto *et al.*, 2014).

De entre os estudos recentes efetuados nesta área, tem sido dada especial atenção à combinação de poli ( $\epsilon$ -caprolactona), PCL, com polímeros naturais, como a gelatina. A PCL é um polímero linear, hidrofóbico, sintético que apresenta elevada resistência mecânica. Embora as nanofibras de PCL tenham características estruturais semelhantes às da MEC dos tecidos vivos, a sua fraca hidrofílicidade reduz a capacidade de adesão, migração, proliferação e diferenciação celular. Por sua vez a gelatina é um polímero natural, biocompatível, biodegradável, não-imunogénico que promove a adesão, a diferenciação e a proliferação celular (Safaeijavan *et al.*, 2014). Para além disso, este biopolímero é derivado do colagénio, uma proteína presente na MEC de vários tecidos. Desta forma, combinando estes polímeros é possível obter um *scaffold* compósito com boa adesão e proliferação celular e com resistência mecânica adequada (Gautam *et al.*, 2013).

### 1.3. Polímeros Biodegradáveis

Os polímeros biodegradáveis têm sido largamente utilizados em aplicações biomédicas nos últimos anos pois não é necessária a remoção do mesmo depois de serem implantados no organismo, reduzindo o risco para o paciente e os custos associados à segunda cirurgia.

Estes polímeros degradam-se por ação enzimática ou hidrolítica originando produtos e subprodutos não tóxicos e não nocivos para o organismo humano (Barbanti *et al.*, 2005). Esta classe de polímeros pode ser dividido em dois grupos, dependendo da sua origem: polímeros naturais e sintéticos (Nair & Laurencin, 2007).

#### 1.3.1. Polímeros naturais

O polímeros de origem natural têm vindo a ser alvo de grande atenção na construção de *scaffolds* para aplicações em ET devido ao facto das suas propriedades serem semelhantes às dos tecidos nativos e pela possibilidade de induzirem sinais biológicos para conduzir e controlar o crescimento celular (Sewell-Loftin *et al.*, 2011). Estes polímeros podem ser classificados em proteínas (colagénio, gelatina, elastina, queratina etc.), polissacarídeos (celulose, quitina, etc.) e polinucleotídeos (DNA, RNA) (Dhandayuthapani *et al.*, 2011).

Em suma, os polímeros de origem natural possuem propriedades bioativas que favorecem a ligação, proliferação e diferenciação celular, induzindo a formação da matriz extracelular e, conseqüentemente, a regeneração dos tecidos. Contudo o uso destes polímeros apresenta algumas limitações, nomeadamente a dificuldade em controlar a sua degradação pelas diferentes enzimas existentes no organismo, dificultando a determinação do tempo de vida destes polímeros *in vivo* (Ha *et al.*, 2013). Para além disso, os polímeros de origem natural apresentam fraca resistência mecânica, sendo por isso necessário proceder à sua reticulação ou misturá-los com polímeros sintéticos (Fisher *et al.*, 2007).

## Gelatina

A gelatina é uma mistura de fragmentos de proteínas solúveis em água, composta por sequências de aminoácidos. Este biopolímero natural é obtido por hidrólise parcial do colagénio proveniente da pele, tendões ou ossos (Hoque *et al.*, 2014).

O tipo de gelatina obtido depende do pH, temperatura e do tempo de extração utilizado no processamento do colagénio. A gelatina pode ser obtida sob condições de pré-tratamento ácidas, dando origem a gelatina do tipo A (com um ponto isoelétrico (pI) 8 - 9) ou pré-tratamento alcalino, resultando gelatina do tipo B (pI 4 - 5) (Rose *et al.*, 2014).

O uso da gelatina em aplicações biomédicas deve-se à sua excelente biocompatibilidade, baixa imunogenicidade, boa aderência e excelente crescimento celular (Mano *et al.*, 2007). Contudo, os géis de gelatina dissolvem-se facilmente a temperaturas fisiológicas (37 °C), o que limita significativamente o seu uso em aplicações biomédicas. De forma a melhorar a estabilidade térmica e mecânica dos materiais baseados em gelatina e retardar a sua dissolução *in vivo*, têm sido estudados vários métodos de reticulação química da gelatina.

A estratégia desenvolvida neste trabalho tem com base a pré funcionalização da gelatina com grupos suscetíveis a sofrerem polimerização radicalar (grupos metacrílicos) na presença de um fotoiniciador e exposição a luz UV, e conseqüentemente formar estruturas reticuladas quimicamente.

De acordo com estudos efetuados por Y. C. Chen *et al.* (2012) a funcionalização da gelatina com grupos metacrílicos com subsequente foto-polimerização, permite a obtenção *scaffolds* com as propriedades mecânicas desejadas, não comprometendo a biocompatibilidade celular, sendo possível, desta forma, a regeneração de vasos sanguíneos. De facto, estes investigadores relatam que tanto a porosidade como a degradação do material pode ser ajustada pela simples modificação do grau de metacrilização.

Também Zhao *et al.* (2016) defendem que a estratégia anteriormente referida (funcionalização da gelatina com anidrido metacrílico seguida da sua foto-polimerização) resulta na síntese de hidrogéis com características mecânicas e de degradação ideais para a aplicação na produção de *scaffolds* com vista a regeneração da epiderme. Estes autores defendem que, variando a concentração do pré-polímero, gelatina metacrilamida, é possível controlar as propriedades físicas e biológicas dos hidrogéis.

Todavia, e apesar dos estudos anteriormente descritos, sabe-se que a maioria dos hidrogéis não apresentam as propriedades mecânicas desejadas. Uma possível estratégia para

**Capítulo 1 - Introdução**

colmatar este problema pode passar pela incorporação de um segundo polímero sintético, como a PCL, utilizada na realização deste trabalho.

A Tabela 1.2, seguidamente apresentada, descreve alguns artigos publicados no âmbito do desenvolvimento de *scaffolds* a partir de gelatina.

**Tabela 1.2** Estudos realizados no âmbito da ET na produção de *scaffolds* e/ou outros dispositivos a partir de gelatina.

<b>Tipo de scaffold</b>	<b>Método de preparação</b>	<b>Aplicação em ET</b>	<b>Referências</b>
Gelatina-resorcinol formaldeído-glutaraldeído (GFRG)	Reticulação com formaldeído (37 %) e glutaraldeído (50 %)	Cola adesiva, mesmo na presença de tecido degenerativo	(Kodama <i>et al.</i> , 1997)
Selantes de gelatina para enxerto vascular	Gelatina é dissolvida em água a uma concentração de 10 %. Posteriormente ocorre a impregnação do substrato de poliéster. Reticulação com uma solução de formaldeído (20 %).	Prevenção de infecção bacteriana em enxertos vasculares	(Javerliat <i>et al.</i> , 2007)
Películas de gelatina como curativo	Formação de uma película por congelação, a -4 °C durante 3 dias, e esterilização através da radiação gama	Cicatrização de feridas cutâneas	(Tanaka <i>et al.</i> , 2005)
<i>Scaffold</i> nanofibroso de PCL/gelatina	<i>Electrospinning</i> da solução de PCL/gelatina diretamente num curativo de poliuretano (Tegaderm™, 3M Medical)	Cicatrização de feridas e reconstituição dérmica	(Chong <i>et al.</i> , 2007)
Fibras de PCL revestidas com hidrogéis fotoreticuláveis à base de gelatina modificada.	Fibras de PCL são revestidas com diferentes hidrogéis fotoreticuláveis, construídos a partir de gelatina funcionalizada com grupos metacrílicos.	Matrizes fibrosas para aplicação em implantes vasculares.	(Correia <i>et al.</i> , 2016)

### 1.3.2. Polímeros Sintéticos

Os polímeros sintéticos representam o maior grupo de polímeros biodegradáveis sendo largamente utilizados no campo da biomédica dada as suas características (tempo de degradação, propriedades mecânicas, etc.) poderem ser adaptadas a aplicações específicas (Asti & Gioglio, 2014). Contrariamente aos polímeros de base natural, os polímeros sintéticos são produzidos sob condições controladas e em grandes quantidades (Dhandayuthapani *et al.*, 2011). Para além disso, apresentam boas propriedades mecânicas, fácil processamento e não potenciam o desenvolvimento de reações de imunogenicidade (BaoLin & MA, 2014). Alguns polímeros sintéticos degradam-se por hidrólise química. Este processo, contrariamente à degradação enzimática, é independente do local onde vai ocorrer o implante e do paciente no qual vai ser realizado (Maitz, 2015).

Na família dos polímeros sintéticos, os poliésteres têm sido dos mais utilizados em aplicações biomédicas, devido à facilidade de degradação por hidrólise da ligação éster, à possibilidade, em alguns casos, da reabsorção dos produtos da degradação por vias metabólicas e à capacidade de alteração da sua estrutura, sendo possível, desta forma, a alteração da taxa de degradação dos polímeros (Gunatillake, 2003).

Embora os poliésteres sejam largamente estudados para a produção de *scaffolds* com vista à regeneração de tecidos, estes apresentam uma desvantagem, associada à sua degradação. Os produtos de degradação destes polímeros são ácidos ou álcoois. A acidez resultante deste processo pode induzir uma resposta inflamatória, levando à inibição da formação de tecido (Fisher & Reddi, 2003).

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

A poli ( $\epsilon$ -caprolactona) (PCL) é um poliéster alifático linear que é obtida pela polimerização por abertura de anel do monómero cíclico  $\epsilon$ -caprolactona (Gunatillake, 2003). É um polímero semicristalino, com uma temperatura de transição vítrea ( $T_g$ ) de  $-60$  °C, e um ponto de fusão entre os  $55 - 60$  °C. É importante referir que o tempo de degradação deste polímero é de 2 – 3, anos sendo por isso mais atrativo para o uso em implantes de longo prazo (BaoLin & MA, 2014).

## Capítulo 1 - Introdução

A utilização da PCL em aplicações biomédicas foi aprovada pela FDA (*Food and Drug Administration*) na década de 1970. Desde então a PCL tem sido utilizada em inúmeras aplicações biomédicas devido às suas excelentes qualidades, nomeadamente a solubilidade em diversos solventes orgânicos comuns e a capacidade de ser processada a baixas temperaturas. A vantagem de usar a PCL na produção de *scaffolds* prende-se na bioestabilidade, biocompatibilidade e boas propriedades mecânicas apresentadas por este polímero (Sravanthi, 2009). No entanto a hidrofobicidade deste polímero tem sido associada à dificuldade na adesão celular. Uma das soluções encontradas para colmatar este problema passa pela sua mistura com polímeros naturais.

### 1.4. Técnicas de fabrico de *scaffolds*

Com o objetivo de alcançar as características necessárias, os *scaffolds* devem ser fabricados a partir de biomateriais com propriedades adequadas à regeneração do tecido. Para além destes requisitos é importante ter em conta a geometria do *scaffold*. Assim, a seleção da técnica de fabrico do *scaffold* terá que ser baseada nos biomateriais utilizados, nas características do tecido a regenerar e no *design* desejado.

Atualmente existem inúmeros tipos de técnicas, destacando-se: liofilização, lixiviação, separação de fase, *electrospinning*, etc. (Lu *et al.*, 2013). O presente trabalho estuda a formação de matrizes fibrosas pela técnica de *electrospinning*.

#### 1.4.1. *Electrospinning*

A técnica de *electrospinning* permite sintetizar matrizes fibrosas com uma elevada área superficial e porosidade, compostas por fibras ultrafinas. Estas propriedades contribuem para uma melhor adesão, proliferação, migração e diferenciação

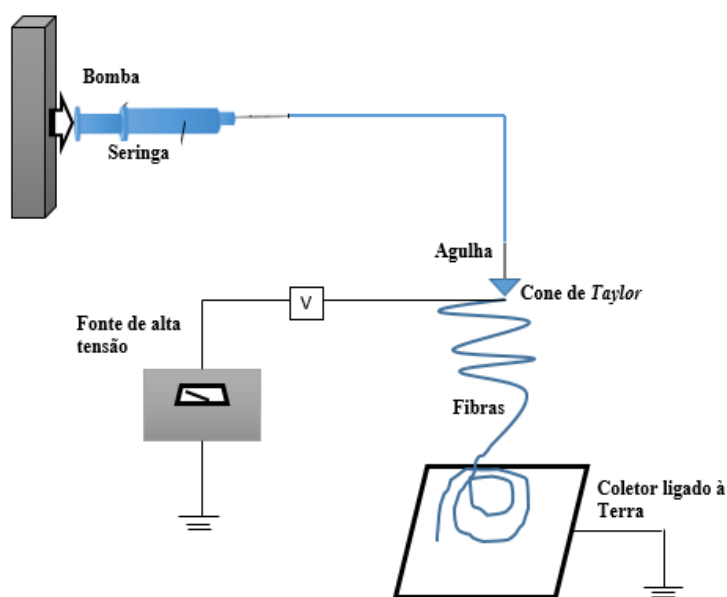


Figura 1.3 Configuração do aparelho de *electrospinning*.

celular, uma vez que mimetizam a morfologia natural da MEC (Elnakady *et al.*, 2015).

A técnica de *electrospinning* usa um campo elétrico para produzir fibras poliméricas ultrafinas com diâmetros que variam de algumas dezenas de nanômetros a alguns micrómetros (Li & Tuan, 2009). Os elementos necessários para a realização da técnica incluem uma alimentação de alta tensão, uma bomba injetora e um coletor ligado à terra, como é ilustrado na Figura 1.3. A bomba injetora impulsiona a solução polimérica, que está contida numa seringa, fazendo-a passar por uma agulha que, por sua vez está eletricamente ligada ao pólo positivo da fonte de alta tensão. O princípio de funcionamento deste método baseia-se na aplicação de um potencial elétrico à solução polimérica que passa pela a agulha, levando a que a solução fique eletricamente carregada. Assim, a gota da solução polimérica que se forma à saída da agulha, para além da força gravítica, está sujeita a forças repulsivas electroestáticas. A partir de um certo valor da tensão aplicada, as forças electroestáticas sobrepõem-se à tensão superficial da solução polimérica, deformando a geometria esférica da gota, e levando a que esta adquira uma configuração cónica denominada por *cone de Taylor*, que provoca a ejeção da solução polimérica na direção do coletor. No trajeto entre a ponta da agulha e o coletor o jato é acelerado e esticado, fazendo com que o solvente se evapore e formando as fibras que se vão depositar no coletor (Ji *et al.*, 2011). (Li & Tuan, 2009).

Em suma, o uso da técnica de *electrospinning* na produção de matrizes fibrosas de base polimérica oferece as seguintes vantagens (Zhang *et al.*, 2005):

- ✓ Capacidade de produzir fibras com diâmetros que podem variar desde alguma dezena de nanômetros a alguns micrómetros. Estas dimensões permitem a obtenção de fibras com dimensões semelhantes às da MEC de uma grande variedade de tecidos nativos e órgãos;
- ✓ Os *scaffolds* obtidos têm uma estrutura altamente porosa e interligada, facilitando o crescimento celular;
- ✓ É uma técnica versátil pois permite o uso de uma elevada variedade de polímeros, mistura de polímeros, e materiais inorgânicos, bem como a integração de aditivos, biomoléculas, e células vivas, satisfazendo os requisitos exigidos por diferentes aplicações;
- ✓ É um método simples e de baixo custo, permitindo também a formação de vários tipos de *scaffolds*.

### ***Electrospinning coaxial versus blending***

O *electrospinning* é uma técnica muito versátil, que possibilita efetuar modificações que permitem ter um grande controlo sobre a estrutura e a morfologia das fibras obtidas. Tais modificações podem ser divididas em 3 categorias: **(1) modificação nos parâmetros**, que permitem ajustar as dimensões da fibra e a morfologia da sua superfície; **(2) modificação nas estratégias de *electrospinning***, que permitem obter fibras com diferentes estruturas e **(3) modificação no tipo de coletor**, que permite ajustar a disposição das fibras.

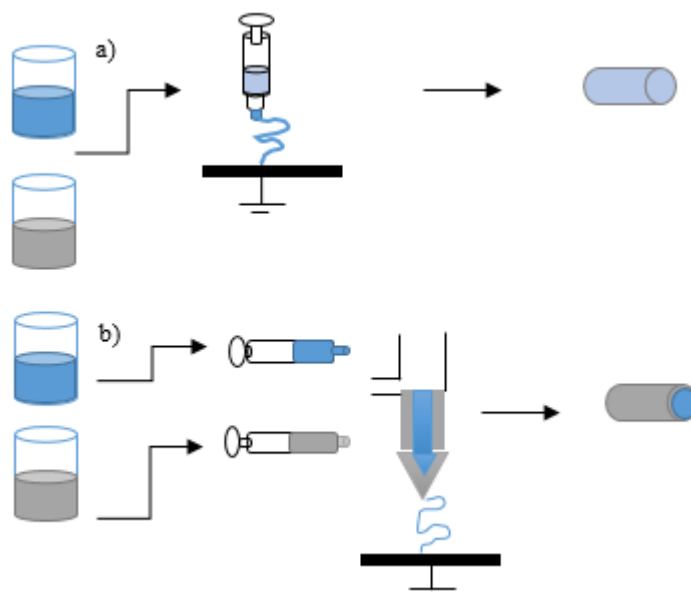
No presente trabalho será estudado a modificação nas estratégias de *electrospinning*. Esta modificação permite a obtenção de diferentes tipos de fibras com excelentes propriedades. De entre as possíveis estratégias de *electrospinning* existentes, o *electrospinning* coaxial tem sido alvo de estudo.

A instalação do equipamento na técnica de *electrospinning* coaxial é idêntica à utilizada para a do *electrospinning* comum (por *blending*). A modificação é feita através da inserção de uma agulha menor que se encaixa de forma concêntrica no interior da agulha maior para realizar a configuração coaxial que permite, de forma independente, ejetar duas soluções poliméricas ao mesmo tempo (Drexler & Powell, 2011; Lu *et al.*, 2016). Desta forma, é possível a produção de fibras com estrutura “*core-shell*”, em que o núcleo é composto por um material diferente da “casca” (Tong & Bin-Jie, 2016).

A estrutura do material do núcleo pode ser usada, por exemplo, para controlar a rigidez do *scaffold*, enquanto o material que constitui a “casca” da fibra pode ser selecionado de forma a promover a adesão e proliferação celular. Uma desvantagem do uso desta técnica está na dificuldade em otimizar os vários parâmetros envolvidos de forma a obter fibras *core-shell* o mais perfeitas possíveis, devido à grande quantidade de variáveis envolvidas e às interações que existem entre elas (Ji *et al.*, 2011).

Como é ilustrado na Figura 1.4, na técnica de *electrospinning* por *blending* há combinação dos polímeros numa única solução, contrariamente ao que acontece no *electrospinning* coaxial onde são preparadas duas soluções independentes.





**Figura 1.4** Estratégias de *electrospinning*: a) *electrospinning* por *blending* e b) *electrospinning* coaxial.

#### 1.4.2. Parâmetros do *electrospinning*

A necessidade de produção de fibras com diâmetro e morfologia controlados levou à realização de muitos estudos sobre a relação entre as propriedades das fibras e os parâmetros variáveis do processo. Há vários parâmetros que influenciam a morfologia das fibras resultantes. Estes parâmetros são, geralmente, classificados em 3 categorias: parâmetros associados à solução polimérica, parâmetros de operação e parâmetros ambientais.

Os parâmetros associados à solução polimérica dependem das propriedades intrínsecas dos polímeros e solventes utilizados e incluem a viscosidade da solução, a condutividade elétrica, a tensão superficial e a volatilidade.

A viscosidade da solução depende sobretudo da massa molecular e da concentração do polímero. Quanto maiores forem estas propriedades mais elevada será a viscosidade. De uma forma geral, quanto maior a viscosidade, maiores serão os diâmetros das fibras formadas, pois um aumento da viscosidade dificulta o estiramento do jato polimérico. Existe também uma viscosidade mínima abaixo da qual não é possível formar fibras.

A tensão superficial é um parâmetro que permite controlar o *cone de Taylor*. Quanto maior for a tensão superficial mais difícil será a formação de um jato pois, a força de repulsão eletrostática requerida para que ocorra a ejeção da solução será maior. Assim, uma tensão

## Capítulo 1 - Introdução

superficial baixa facilita o processo, obtendo-se fibras de boa qualidade, com diâmetro regular (Wendorff *et al.*, 2012).

A condutividade da solução vai influenciar a distribuição das cargas na solução polimérica, afetando o jato formado. Assim, quanto maior for a condutividade maior será a quantidade de cargas presentes na solução a ser injetada, levando à formação de fibras de menor diâmetro devido à repulsão entre as cargas (Ramakrishna, 2005; Shi *et al.*, 2015). Apesar destes serem os principais parâmetros associados à solução polimérica, existem outros que podem também afetar o processo, nomeadamente a pressão de vapor do solvente, a volatilidade, etc.

Relativamente aos parâmetros de operação estes compreendem a tensão elétrica aplicada entre a agulha e o coletor, o caudal de solução polimérica que se faz chegar à agulha e a distância a que é colocado o coletor.

A tensão elétrica é um elemento crucial no processo de *electrospinning*. Tensões elevadas conduzem a um maior número de cargas transportadas na solução. Assim, um aumento da tensão resulta numa maior repulsão entre cargas levando à formação de fibras mais longas e com menor diâmetro. Por outro lado, o aumento do potencial aplicado tem como consequência um aumento da velocidade da solução injetada (menor tempo de voo do jato de solução até ao coletor) e, portanto, conduz à formação de fibras mais curtas e com diâmetros maiores (Ramakrishna, 2005; Haider *et al.*, 2015).

O caudal da solução polimérica que passa pela agulha vai determinar a quantidade de solução disponível a ser injetada (Ramakrishna, 2005). Para uma dada tensão, há um valor correspondente do caudal de alimentação para o qual a *cone de Taylor* é estável. Um aumento do caudal de alimentação leva à formação de fibras com maiores diâmetros. O caudal pode influenciar também a porosidade associada às fibras criadas, verificando-se que quanto maior for o caudal maiores serão os poros (Haider *et al.*, 2015).

A distância entre a ponta da agulha e o coletor metálico desempenha um papel essencial na determinação da morfologia das fibras. A variação deste parâmetro influencia diretamente o tempo de voo da fibra e a intensidade do campo elétrico. Quando a distância entre a agulha e o coletor é reduzida, a fibra percorre uma distância menor até atingir o coletor, obtendo-se fibras menos alongadas. Por outro lado, para distâncias menores a intensidade do campo elétrico aumenta (aumento das forças de repulsão eletrostática) levando à formação de fibras mais alongadas, e com menores diâmetros.

Tal como com a tensão aplicada, também na distância entre a agulha e o coletor existem efeitos contrários, levando à conclusão que, os parâmetros não são independentes uns dos

## **Capítulo 1 - Introdução**

outros, dificultando por vezes o controlo do processo de *electrospinning* (Ramakrishna, 2005; Hasan *et al.*, 2014).

Para além dos parâmetros da solução e de operação é importante ter em conta os parâmetros ambientais, tais como a humidade relativa e a temperatura, dado a sua influência no diâmetro e morfologia das fibras resultantes (Haider *et al.*, 2015).

Quanto mais húmido for o ambiente mais porosa será a fibra formada. O tamanho dos poros aumenta com o aumento da humidade, podendo ocorrer a coalescência destes resultando na obtenção de fibras não uniformes. Para além disso, a humidade do ambiente pode ainda determinar a taxa de evaporação do solvente. Quando os níveis de humidade são elevados, a taxa de evaporação de solvente será baixa e, portanto, a fibra que se vai depositar no coletor irá conter solvente provocando a dissolução e fusão das fibras formadas.

A temperatura pode afetar a viscosidade e a condutividade da solução, dependendo do polímero. O aumento da temperatura provoca um aumento da taxa de evaporação e um aumento da viscosidade (Ramakrishna, 2005).

## CAPÍTULO 2 - OBJETIVOS EXPERIMENTAIS

### 2.1. Objetivos Experimentais

O trabalho desenvolvido nesta dissertação teve como objetivo a preparação de matrizes fibrosas fotoreticuladas para serem utilizadas como *scaffolds* na regeneração de tecido vascular. Estas matrizes foram produzidas por *electrospinning*, utilizando duas variações desta técnica: o *electrospinning* coaxial e o *electrospinning* por *blending*. Depois de preparados, os diferentes *scaffolds* estes foram submetidos a diversas técnicas de caracterização. O esquema apresentado na Figura 2.1 resume a estratégia experimental seguida no desenvolvimento deste trabalho.

Este trabalho centrou-se na avaliação do desempenho das fibras compostas por PCL, GelMA e PCL/GelMA na regeneração de vasos sanguíneos, procurando-se estudar as vantagens apresentadas pela combinação destes polímeros numa mesma estrutura. Para além disso foi possível avaliar a influência da proporção de GelMA nas fibras compósitas PCL/GelMA e comparar as características das fibras sintetizadas pelos dois métodos de *electrospinning* referidos anteriormente.

Com vista à sua caracterização, as estruturas produzidas foram submetidas a algumas técnicas, tais como a Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier com Reflexão Total Atenuada (FTIR-ATR), testes de perda de massa, determinação de ângulos de contacto, Microscopia Eletrónica de Varrimento (SEM), ensaios de viabilidade celular e testes de hemocompatibilidade.

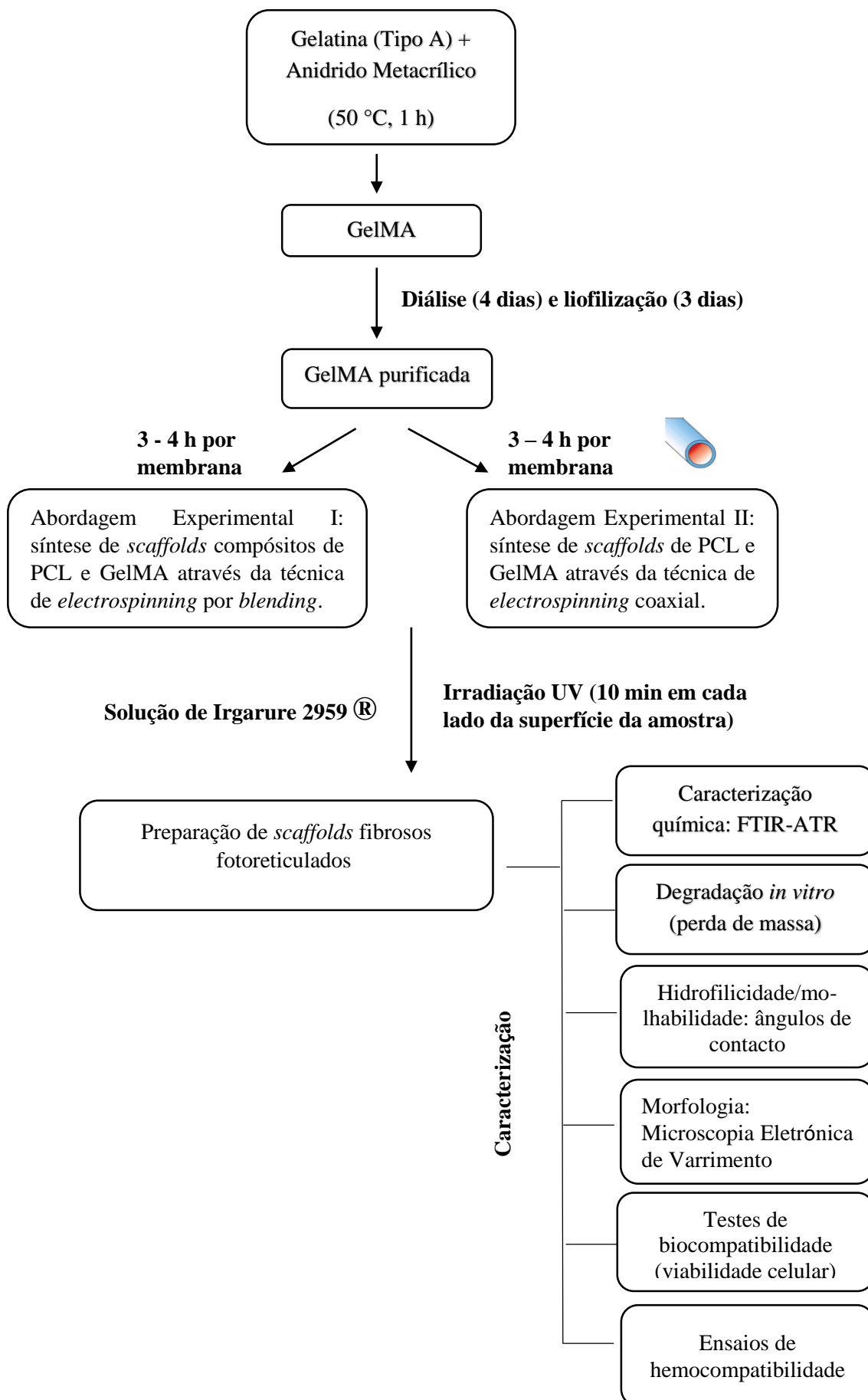


Figura 2.1 Esquema do procedimento experimental seguido no desenvolvimento dos *scaffolds* fibrosos fotoreticulados.

### 2.1.1. Abordagem experimental I

Numa primeira fase procedeu-se à preparação de *scaffolds* compósitos utilizando a técnica de *electrospinning* por *blending*. Posteriormente, os *scaffolds* resultantes foram submetidos a um processo de fotoreticulação.

Inicialmente, os polímeros PCL e gelatina modificada (GelMA) foram adicionados a uma mistura de solventes, obtendo-se uma solução homogénea que, seguidamente, foi sujeita à técnica de *electrospinning*, resultando desta forma uma membrana constituída por fibras compósitas. Subsequentemente, as fibras foram fotoreticuladas. Para tal, mergulhou-se a membrana numa solução de Irgacure 2959® e posteriormente irradiou-se esta, em ambos os lados, com luz ultravioleta. Desta forma as moléculas do fotoiniciador são dissociadas obtendo-se radicais livres que atacam as ligações duplas de carbono presentes na gelatina modificada, iniciando assim uma polimerização radicalar dos resíduos metacrílicos pendentes nas várias cadeias e originando desta forma a reticulação da gelatina.

### 2.1.2. Abordagem Experimental II

A segunda abordagem experimental, tal como na abordagem descrita anteriormente, teve como principal objetivo sintetizar fibras combinando os polímeros de PCL e gelatina modificada. Contudo, a técnica utilizada neste caso foi o *electrospinning* coaxial, obtendo-se fibras com estrutura do tipo *core-shell*. As fibras resultantes foram também submetidas ao mesmo processo de fotoreticulação.

Assim, primeiramente foram preparadas duas soluções independentes de PCL e gelatina modificada, respetivamente, com diferentes solventes. Seguidamente estas soluções foram submetidas à técnica de *electrospinning* coaxial obtendo-se fibras com estrutura *core-shell*, onde o núcleo é constituído por PCL e a “casca” por gelatina modificada. Por fim as fibras resultantes foram sujeitas ao mesmo processo de fotoreticulação.

Em ambas as abordagens foram sintetizadas fibras com diferentes proporções de gelatina modificada, pretendendo-se averiguar qual a influência da concentração deste composto nas fibras finais. Os resultados obtidos, bem como os métodos de síntese e os materiais utilizados serão apresentados seguidamente.

## CAPÍTULO 3 - MATERIAIS E MÉTODOS

### 3.1. Materiais

Na Tabela 3.1. encontram-se resumidos os materiais utilizados ao longo do trabalho.

**Tabela 3.1** Resumo dos materiais utilizados

<b>Material</b>	<b>Distribuidor</b>	<b>Informação adicional</b>	<b>Utilização</b>
Gelatina tipo A	<i>Sigma-Aldrich</i> (Sintra,Portugal)	Proveniente da pele suína	Preparação dos <i>scaffolds</i>
Policaprolactona (PCL)	<i>Sigma-Aldrich</i> (Sintra,Portugal)	-	Preparação dos <i>scaffolds</i>
Clorofórmio	<i>Fisher Scientific</i> (Estados Unidos da América).	99,8 % pureza	Solvente
Dimetilformamida (DMF)	<i>Fisher Scientific</i> (Estados Unidos da América).	99,8 % pureza	Solvente
2,2,2-Trifluoroetanol (TFE)	<i>Fisher Scientific</i> (Estados Unidos da América).	99 % pureza	Solvente
Ácido Acético Glacial (AAc)	<i>Fisher Scientific</i> (Estados Unidos da América).	99,7 % pureza	Solvente
2-hidroxi-1[4-(2-hidroxietoxi)fenil]-2-metil-1-propanona (Irgacure ®2959)	BASF (Alemanha).	97 – 99 %	Fotoiniciador
Meio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM-F12)	<i>Sigma-Aldrich</i> (Sintra, Portugal)	-	Ensaio da biocompatibilidade
3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium (MTS)	<i>Promega</i> (Canada, USA)	-	Ensaio da biocompatibilidade

Tabela 3.1 (Cont.)

Fibroblastos normais	<i>PromoCell (Labclinics, S.A., Barcelona, Spain)</i>		Ensaio da biocompatibilidade
Dihidrogenofosfato de potássio (KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )	<i>Panreac</i>	-	Formação da solução de PBS
Cloreto de sódio (NaCl)	<i>Panreac</i>	-	Formação da solução de PBS
Cloreto de potássio (KCl)	<i>SigmaAldrich</i> ®		Formação da solução de PBS
Hidrogenofosfato disódico (Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> )	<i>Fluka</i>	99 % pureza	Formação da solução de PBS

### 3.2. Preparação dos scaffolds

#### 3.2.1. Modificação da gelatina

A primeira fase do trabalho consistiu na modificação da gelatina. Esta estratégia teve como base a reação direta da gelatina com anidrido metacrílico (MAA). Esta reação permitiu a incorporação de ligações duplas nos grupos pendentes da cadeia polimérica, conferindo ao polímero a capacidade de ser fotoreticulado. O esquema reacional da modificação química da gelatina é apresentado na Figura 3.1.

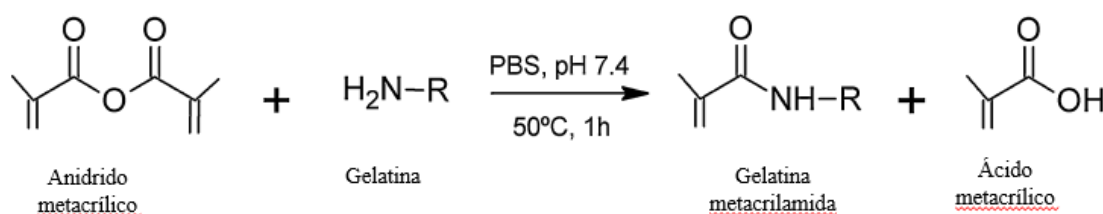


Figura 3.1 Esquema da reação da gelatina com o anidrido metacrílico. Adaptado de Correia et al., (2016).

A síntese da gelatina metacrilamida (GelMA) foi realizada adicionando-se 10 g de gelatina do tipo A a 100 mL de uma solução tampão, PBS, (pH = 7,4) preparada previamente. A dissolução da gelatina em PBS foi realizada à temperatura de 50 °C, sob agitação, sendo posteriormente introduzido 1 mL de anidrido metacrílico. A reação de modificação da gelatina decorreu durante 1h. No final da reação, a solução resultante foi submetida a uma diálise de forma a remover completamente os subprodutos da reação, nomeadamente o ácido metacrílico e outras impurezas de baixo peso molecular, garantindo desta forma a segurança do uso de GelMA na regeneração de tecidos vascular. Assim, a mistura reacional obtida foi



### Capítulo 3 – Materiais e Métodos

colocada em membranas de diálise e estas introduzidas em água desionizada durante 4 dias, sob agitação. Durante esse período a água foi renovada 2 vezes por dia. Depois da etapa de purificação a GelMA foi removida das membranas e colocada no congelador. Por fim procedeu-se à liofilização das mesmas (durante 3 dias) de forma a remover na totalidade a água presente.

#### 3.2.2. Preparação dos *scaffolds* compósitos de GelMA e PCL

A preparação dos *scaffolds* compósitos fotoreticulados foi realizada em duas etapas. A primeira etapa consistiu na preparação das membranas fibrosas compósitas de GelMA e PCL através da técnica de *electrospinning*, seguindo-se da fotoreticulação da GelMA incorporado nas fibras.

Como referido anteriormente, as duas abordagens diferem apenas no tipo de *electrospinning* utilizado para a preparação das fibras, tendo sido utilizado na primeira abordagem o *electrospinning* por *blending* e na segunda o *electrospinning* coaxial, com vista a obtenção de fibras com diferente morfologia

Na preparação das membranas fibrosas utilizando a técnica de *electrospinning* por *blending* combinaram-se os dois polímeros, PCL e GelMA, numa única solução. Foram preparadas diferentes formulações com vista a avaliar a influência da proporção de GelMA nos resultados finais (25, 50 e 75 %, percentagem mássica). Para tal, a PCL e a GelMA foram dissolvidas numa mistura de TFE e ácido acético, à temperatura ambiente e sob agitação. As diferenças físico-químicas dos polímeros utilizados fazem com que estes sejam imiscíveis quando dissolvidos em apenas TFE, formando assim duas fases – uma rica em PCL e outra em GelMA. Esta imiscibilidade vai influenciar o processo de *electrospinning* levando à formação de fibras com uma composição química heterogénea. A adição de ácido acético melhora a miscibilidade de ambos os polímeros levando à formação de uma solução homogénea e estável e,

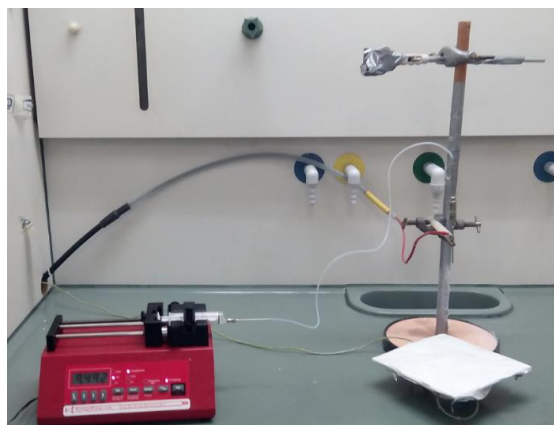


Figura 3.2 Esquema da montagem do sistema de *electrospinning* por *blending*

### Capítulo 3 – Materiais e Métodos

consequentemente, à formação de fibras com uma composição mais homogênea e com melhores propriedades mecânicas (Feng *et al.*, 2012).

Posteriormente a solução resultante foi colocada numa seringa de plástico com 10 mL (diâmetro de 15,8 mm) e esta introduzida numa bomba infusora, modelo NE-1000 *Multiphaser da New Era Pump Systems*. Dependendo da composição da solução, foram utilizados diferentes caudais e voltagens. A Tabela 3.2 resume as diferentes composições das soluções poliméricas, sujeitas ao processo de *electrospinning*, bem como o caudal e a voltagem aplicada em cada caso. A aplicação da tensão permitiu a eletrofiação da solução polimérica com conseqüente formação de fibras que se depositaram num coletor ligado à terra (papel de alumínio). Na Figura 3.2 é apresentado o esquema de montagem do sistema de *electrospinning* utilizado.

**Tabela 3.2** Composição das soluções submetidas a *electrospinning* por *blending* e parâmetros associados ao processo.

Nomenclatura	Polímero		Solvente		Caudal (mL/h)	Voltagem (kV)
	PCL (g)	GelMA (g)	TFE (mL)	Ácido Acético (mL)		
<b>b75PCL25GelMA</b>	0,75	0,25	8	2	3	15
<b>b50PCL50GelMA</b>	0,5	0,5	8	2	3	17
<b>b25PCL75GelMA</b>	0,25	0,75	8	2	3	13

A segunda etapa deste trabalho teve como objetivo a formação de nanofibras do tipo “*core-shell*”, com um núcleo de PCL e uma “casca” de GelMA. Para tal, foram preparadas duas soluções independentes. Também neste caso foram preparadas soluções com diferentes composições. As soluções poliméricas utilizadas no núcleo das fibras foram preparadas através da dissolução de PCL em TFE, à temperatura ambiente e sob agitação. No caso das soluções utilizadas na “casca” da fibra, dissolveu-se GelMA numa mistura de solventes de TFE e ácido acético com o auxílio de um agitador magnético, à temperatura ambiente.

O processamento da estrutura *core-shell* é semelhante ao procedimento anteriormente descrito (Figura 3.3). Primeiramente procedeu-se à transferência das soluções de PCL e de GelMA para duas seringas de plástico distintas, com 10 mL de volume (diâmetro de 15,8 mm). Cada seringa foi acoplada a uma bomba infusora, modelo NE-1000 *Multiphaser da New Era Pump Systems*, e a solução foi ejetada por uma agulha metálica coaxial. O aparelho permaneceu ligado até ao consumo de toda as soluções das seringas.

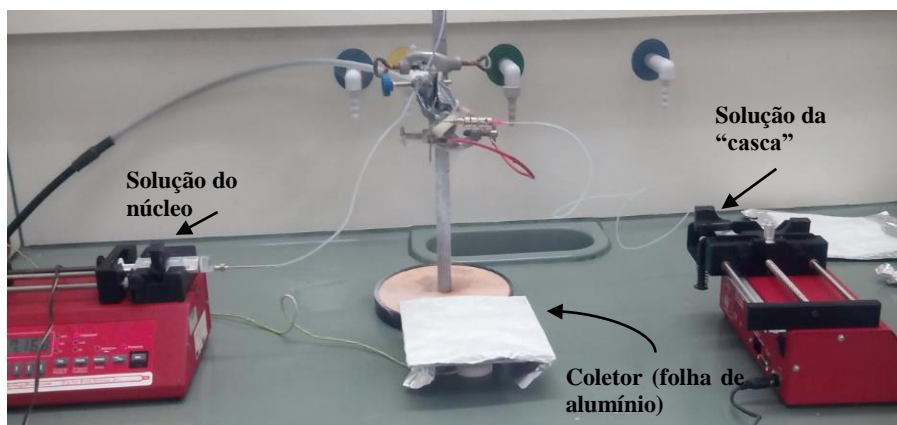


Figura 3.3 Esquema da montagem do sistema de *electrospinning* coaxial.

Na Tabela 3.3 são apresentadas as composições das diferentes soluções poliméricas preparadas bem como o caudal e a voltagem utilizados no processo de *electrospinning* coaxial, em cada caso.

Tabela 3.3. Composição das soluções submetidas a *electrospinning coaxial* e parâmetros associados ao processo.

Nomenclatura	Core		Shell		Caudais (mL/h)		Voltagem (kV)
	Polímero (g)	Solvente	Polímero (g)	Solvente	Core	Shell	
<b>c75PCL25GelMA</b>	1,125 PCL	12 mL TFE	0,375 GelMA	2,4 mL TFE + 0,6 mL AAc	2	0,5	16
<b>c50PCL50GelMA</b>	0,75 PCL	8 mL TFE	0,75 GelMA	4,8 mL TFE + 1,2 mL AAc	2	1,5	17
<b>c25PCL75GelMA</b>	0,375 PCL	4 mL TFE	1,125 GelMA	7,2 mL TFE + 1,8 mL AAc	1	2,25	17

Foram ainda produzidas duas fibras compostas por PCL e GelMA, respetivamente, que funcionaram como controlo, possibilitando desta forma avaliar a influência da concentração de GelMA nas fibras finais.

Na síntese das fibras de PCL, 1 g de PCL foi dissolvida numa mistura de solventes de clorofórmio/DMF (% v/v) (87,5/12,5) em 8 mL, à temperatura ambiente e sob agitação magnética. O clorofórmio foi utilizado devido à sua elevada volatilidade e por ser um bom solvente da PCL. Por sua vez, a adição de DMF deve-se à elevada constante dielétrica

### Capítulo 3 – Materiais e Métodos

apresentada por este composto. Estes efeitos combinados favorecem o processo de *electrospinning* (Alcobia, 2013). A solução resultante foi submetida à técnica de *electrospinning*, tendo sido utilizado o mesmo procedimento referido anteriormente para a produção de fibras por *blending*. Neste caso foi aplicado uma dispersão de caudal de 3 mL/h e uma voltagem de 13 kV.

Por sua vez, na produção de fibras de GelMA, foi dissolvida 1 g de GelMA numa mistura de solventes de 3 mL ácido acético e 8 mL TFE, também à temperatura ambiente e com o auxílio de um agitador magnético. A solução final foi sujeita a *electrospinning*, tendo sido aplicada uma voltagem de 13 kV e uma dispersão de caudal de 3 mL/h.

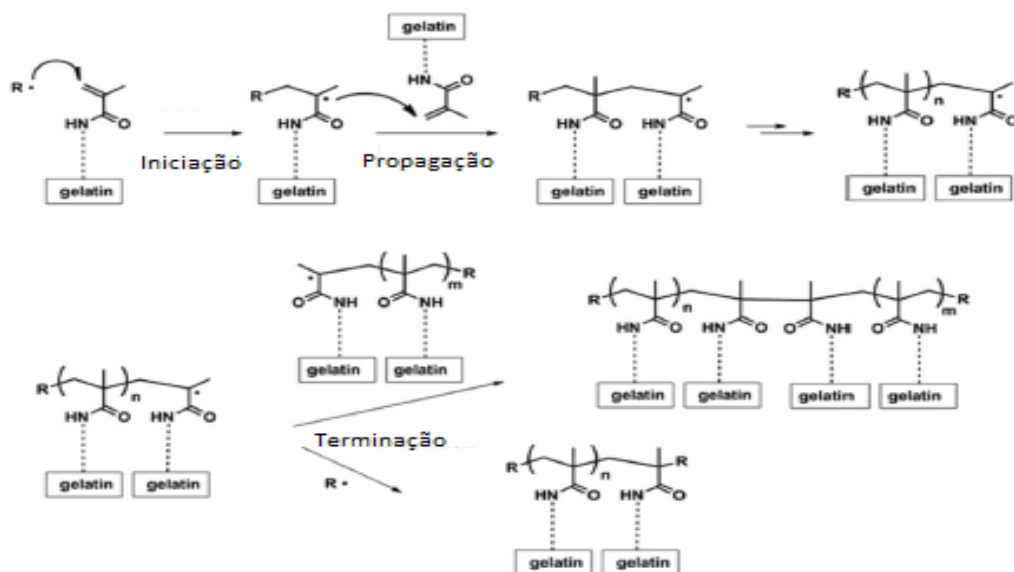
No total foram produzidas 8 membranas fibrosas diferentes que, posteriormente, foram submetidas a um processo de fotoreticulação, que será descrito no próximo capítulo.

#### 3.2.3. Fotoreticulação dos *scaffolds* compósitos PCL/GelMA

Após o processo de *electrospinning*, as membranas fibrosas resultantes foram sujeitas a um processo de fotoreticulação. Para tal, foram dissolvidos 250 mg de Irgacure® 2959 em 250 mL de água *miliQ*. O Irgacure® 2959 foi utilizado como fotoiniciador uma vez que este apresenta baixa citotoxicidade, (Klotz *et al.*, 2016).

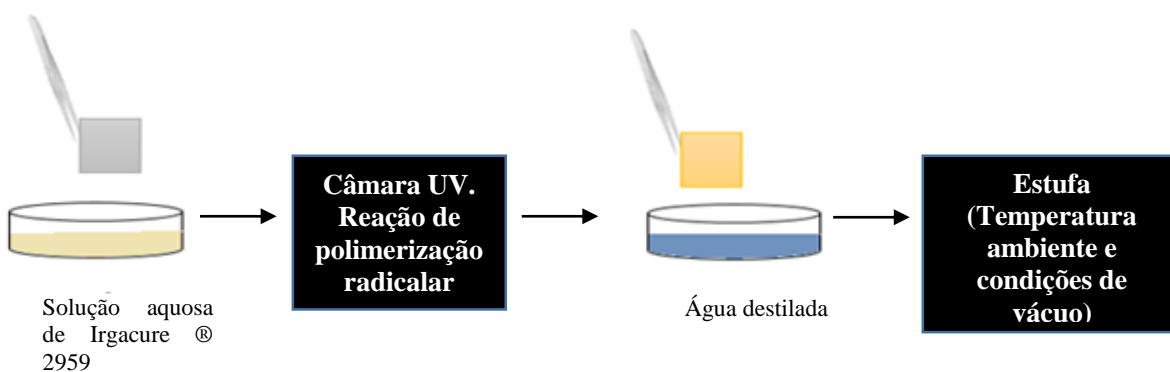
Seguidamente as membranas foram recortadas em quadrados (5 x 5 cm<sup>2</sup>) e mergulhadas, uma a uma, nesta solução. Por fim, procedeu-se à fotoreticulação da GelMA incorporada nas fibras numa câmara (modelo UVGL-48, *Multiband UV*, da *Mineral light® Lamp*, onde as duas superfícies das membranas foram irradiadas com luz UV (comprimentos de onda 254 – 354 nm) durante 10 min cada lado.

Quando exposto à luz UV, o Irgacure® 2959 forma radicais que atacam a ligação dupla da GelMA, iniciando uma polimerização radicalar dos resíduos metacrilamida presentes nas cadeias de gelatina e ligando assim quimicamente as várias cadeias de gelatina, tal como é ilustrado na Figura 3.4. No final deste processo as membranas foram lavadas com água destilada, para remover os vestígios do fotoiniciador.



**Figura 3.4.** Reticulação da GelMA por polimerização radical dos resíduos metacríamida. Adaptado de Yue et al., (2015).

Por fim as amostras foram secas numa estufa de vácuo à temperatura ambiente durante 2 dias. Na Figura 3.5. é apresentado um esquema que resume as etapas necessárias para a obtenção das membranas prontas a serem caracterizadas.



**Figura 3.5** Processo de fotoreticulação das membranas e preparação das membranas para caracterização.

### 3.3. Caracterização dos *scaffolds*

Depois de desenvolvidas as diferentes estruturas poliméricas é importante estudar a morfologia e arquitetura da superfície bem como a química da superfície dessas estruturas. As técnicas utilizadas para a realização desses estudos serão seguidamente descritas.

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

A espectroscopia FTIR (*Fourier Transform InfraRed*) é uma técnica essencial na caracterização de compostos químicos que permite identificar as ligações químicas ou as estruturas moleculares das amostras que são estudadas. O espectro infravermelho é obtido quando a molécula é exposta à radiação eletromagnética na região do infravermelho, absorvendo uma fração da radiação incidente característica de um determinado grupo funcional. A técnica de FTIR pode ainda ser complementada com o ATR (*Attenuated Total Reflectance*) (Stuart, 2004). A técnica utiliza o fenómeno de reflexão interna total no interior de um cristal, para analisar uma amostra em contacto com esse mesmo cristal. O feixe de infravermelho é dirigido para o cristal e a reflexão do feixe no interior do cristal. Desta forma, penetra uma camada fina da superfície da amostra, sofrendo uma perda de energia nos comprimentos de onda em que o material absorve. A intensidade da reflexão é atenuada devido às múltiplas reflexões ao longo do comprimento da amostra. Desta forma é possível obter informação acerca da superfície da amostra (Monteiro, 2007).

A análise FTIR foi realizada num espetrofotómetro *Jasco FT/IR-4200* equipado com um *Golden Gate Single Reflection Diamond ATR*. Na obtenção dos espectros foram efetuados 64 *scans* com uma resolução de  $4\text{ cm}^{-1}$ .

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

A Microscopia Eletrónica de Varrimento (SEM) é um método microscópico extremamente valioso para estudar a morfologia dos materiais e estruturas poliméricas que permite a obtenção de uma imagem ampliada da superfície das membranas fibrosas. O princípio de funcionamento passa por se fazer incidir um feixe de eletrões num ponto da superfície da amostra, e a subsequente recolha dos sinais eletrónicos emitidos pelo material (Santos, 2014). A superfície polimérica foi previamente revestida com uma fina camada de ouro, durante 10 s, de forma a tornarem-se eletricamente condutoras.

Esta técnica permitiu analisar a morfologia das fibras antes e depois de serem fotoreticuladas tendo sido também analisado, no último caso, a morfologia das fibras antes e depois de serem imersas em PBS.

### Capítulo 3 – Materiais e Métodos

Os testes foram realizados no Instituto Pedro Nunes (IPN) e o equipamento utilizado nesta análise foi *Scanning Microscope JSM-5310 da Jeol*. Foram obtidas imagens com ampliações de 1000x, 5000 x e 10000x, que permitiram estimar o diâmetro médio das fibras através de um programa de análise de imagem (*Image J*).

#### 3.3.3. Determinação de ângulos de contacto dinâmicos

A molhabilidade da superfície é uma propriedade importante dos biomateriais podendo afetar a ligação, proliferação, migração e a viabilidade das células. O ângulo de contacto com água pode ser usado para avaliar a hidrofiliicidade/hidrofobicidade da superfície dos materiais (Fu *et al.*, 2014).

Uma gota de água desionizada é depositada automaticamente, sobre a superfície da membrana, sendo este processo registrado em vídeo até que a gota estabilizar ou ser completamente absorvida. Através das imagens, o *software* do aparelho calcula o ângulo de contacto formado entre a gota de água e a superfície da membrana, para cada frame de vídeo. desde o momento em que a gota atinge a superfície. O equipamento utilizado foi OCA 20, da *Dataphysics*.

#### 3.3.4. Estudos de perda de massa

O estudo da perda de massa de um material é um indicativo importante da eficácia do processo de reticulação. Se a reticulação for eficaz a perda de massa será mínima.

Na realização dos testes de perda de massa *in vitro* as amostras dos *scaffolds*, fotoreticulados e não fotoreticulados (controlo), foram colocadas em solução tampão fosfato salino, PBS, a 37 °C (temperatura fisiológica do corpo humano) durante 3 dias. No final desses 3 dias as amostras foram lavadas com água destilada e secas à temperatura ambiente sob vácuo até obterem massa constante, para posterior avaliação da perda de massa.

A percentagem (%) de perda de massa de cada amostra foi quantificada através da Equação 3.1, definida da seguinte forma (Chen *et al.*, 2013):

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

em que  $W_0$  representa o peso inicial da amostra (antes de ser imersa em PBS) e  $W_t$  é o peso da amostra depois de ter sido incubada (durante 3 dias) e seca.

### 3.3.5. Biocompatibilidade

O termo biocompatibilidade refere-se à capacidade de um material de realizar uma resposta apropriada no hospedeiro numa situação específica. Em ET, biocompatibilidade refere-se à capacidade de um *scaffold* de funcionar como substrato para a migração das células para as zonas lesadas do tecido, suportando a sua proliferação e facilitando a regeneração de tecidos sem provocar quaisquer efeitos indesejáveis nestas células (Ruvinov *et al.*, 2014).

Neste sentido o teste de viabilidade celular *in vitro* (ISO 10993-5) deve ser executado para determinar os efeitos biológicos adversos causados pelos materiais utilizados na produção de *scaffolds*. Estes estudos foram realizados na Universidade da Beira Interior (UBI, Covilhã).

A metodologia utilizada na avaliação da viabilidade celular foi a técnica 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium (MTS).

- **Cultura celular de fibroblastos**

A utilização de células em cultura é vantajosa pois diminui o uso de animais em experiências. Assim, os fibroblastos animais e humanos têm sido indispensáveis em diversos tipos de estudos. A utilização de culturas de fibroblastos apresenta inúmeras vantagens, tais como a facilidade de obtenção e a rápida e contínua proliferação destas células. Para além disso, e ao contrário de outros tipos de células, os fibroblastos não necessitam de fatores de crescimento adicionais (Jacob, 2011).

Células de fibroblastos normais dermais humanos (NHDF), foram cultivadas em DMEM-F12, suplementado com 10 % (v/v) de soro fetal bovino (FBS) ativado, anfotericina B (100 µg/mL) e gentamicina (100 µg/mL). O meio de cultura foi substituído a cada dois dias durante o decorrer do ensaio.



### Capítulo 3 – Materiais e Métodos

As culturas de fibroblastos foram mantidas a 37 °C sob atmosfera húmida com 5 % de CO<sub>2</sub>, até as células atingirem uma confluência.

- **Estudo da viabilidade celular**

De forma a avaliar o perfil citotóxico dos materiais sintetizados, realizou-se o teste MTS de acordo com as diretrizes padrão da ISO10993-5. Os materiais foram colocados numa placa de 96 poços (n = 5) e irradiados com luz UV durante 1h. As células foram então adicionadas a uma densidade de  $1 \times 10^4$  células por poço, e incubadas na presença dos materiais por períodos de 1, 3 e 7 dias. Após cada tempo de incubação, o meio de cultura foi removido e substituído por 100 µL de novo meio e 20 µL de MTS/PMS. De seguida, as células foram incubadas por um período de 4 horas, à temperatura de 37 °C, numa atmosfera húmida com 5 % de CO<sub>2</sub>. Finalmente, a absorvância da solução foi medida através espectrofotómetro de microplacas (*Biorad xMark*) a uma absorvância de 492 nm. Foram preparados dois tipos de controlos, o poço que continha células vivas, sem estarem na presença de *scaffolds* foi usado como controlo negativo (K<sup>-</sup>). No controlo positivo (K<sup>+</sup>), foi adicionado etanol 96 % à cultura celular. Este procedimento foi realizado em ambiente estéril, no interior de uma câmara de fluxo laminar.

- **Microscopia eletrónica de varrimento (SEM) das amostras**

A adesão e proliferação dos fibroblastos dermais na presença dos materiais foram ainda caracterizadas por SEM. Depois de incubadas, nas condições descritas anteriormente, as amostras foram fixadas usando 2,5 % (v/v) de glutaraldeído. Seguidamente, estas foram lavadas três vezes em PBS, congeladas em azoto líquido e liofilizadas durante 3 horas. Posteriormente, as amostras foram revestidas com ouro através de um revestidor por crepitação (*Quorum Q150R ES*). As imagens de microscopia eletrónica de varrimento foram adquiridas a diferentes amplitudes, a uma tensão elétrica de 20 kV, usando um microscópio eletrónico de varrimento (*Hitachi S-3400N*).

### 3.4. Hemocompatibilidade

Para garantir o sucesso da aplicação clínica dos *scaffolds* como substitutos dos vasos sanguíneos foram realizados testes *in vitro* que permitiram avaliar o desempenho da estrutura polimérica quando em contacto com o sangue. Para tal, foram realizados testes que permitiram avaliar a trombogenicidade, que se traduz na capacidade do material induzir ou promover a formação de trombos, e determinar o índice hemolítico, indicativo da quantidade de hemoglobina (Hb) que é libertada para o plasma, de acordo com a norma *International Standard Organization (ISO) 10993-4 Biological Evaluation of Medical Devices* (1999).

Estes ensaios foram realizados com sangue de coelho, fornecido pela PROBIOLÓGICA (sangue ACD-A).

#### 3.4.1. Avaliação da trombogenicidade

Para avaliar a formação de trombos na superfície dos *scaffolds* recorreu-se ao método de Imai and Nose (1972), que permite avaliar o carácter trombogénico da amostra de acordo com a massa de coágulo formada na superfície desta após o contacto com o sangue.

As amostras foram colocadas, em triplicado, em caixas de Petri de vidro. Posteriormente depositou-se na superfície de cada amostra 250  $\mu\text{L}$  de sangue ACD-A de coelho, evitando qualquer contacto entre o sangue e a caixa de Petri. Foi colocada a mesma quantidade de sangue em caixas de Petri vazias, tendo sido usadas como controlo positivo pois o vidro é um material muito trombogénico. Ao controlo negativo foi atribuído o valor 0.

Para iniciar o teste de coagulação do sangue adicionaram-se 25  $\mu\text{L}$  de uma solução de  $\text{CaCl}_2$  0,1 M ao sangue presente nas amostras. Seguidamente, as amostras foram colocadas numa estufa, a 37 °C, durante 40 min. Ao fim deste tempo as caixas de Petri foram retiradas da estufa e o processo de coagulação foi interrompido através da adição de 5 mL de água destilada aos coágulos. Posteriormente as soluções obtidas foram filtradas e os coágulos foram fixados e estabilizados no papel de filtro com 1 mL de uma solução de 36,5 % de formaldeído. Por fim, os trombos fixados no papel de filtro (previamente pesado) foram colocados novamente na estufa até se obtido um peso constante, a 37 °C, durante 24 h, tendo sido pesados ao final desse tempo.

Para calcular a percentagem de massa de coágulo formado recorreu-se à Equação 3.2.

$$\% \text{massa de coágulo formado} = \frac{\text{massa}_{\text{amostra}} - \text{massa}_{\text{controle negativo}}}{\text{massa}_{\text{controle positivo}} - \text{massa}_{\text{controle negativo}}} \times 100 \quad (3.2)$$

no qual  $\text{massa}_{\text{amostra}}$  representa a massa do coágulo formado, obtida pela diferença entre a massa do papel de filtro inicial e a massa do papel de filtro com os coágulos,  $\text{massa}_{\text{controle negativo}}$  diz respeito à massa média dos coágulos formados nos controles negativos e  $\text{massa}_{\text{controle positivo}}$  refere-se à massa média de coágulos formados nos controles positivos (Dhandayuthapani *et al.*, 2012).

- **Determinação do índice hemolítico**

Com a realização dos testes de hemólise pretendeu-se avaliar a percentagem de hemólise que os *scaffolds* provocam quando em contacto com o sangue (lise dos glóbulos vermelhos). Este estudo foi realizado recorrendo-se ao método da cianometahemoglobina modificado, descrito na norma *American Society for Testing and Materials* (ASTM) F 756-00. De acordo com o método referido a percentagem de hemólise é calculada com base na quantidade de hemoglobina (Hb) que é libertada para o plasma quando as amostras são colocadas em contacto com uma solução de sangue diluído. Os materiais são, então, classificados com base na sua percentagem de hemólise, de acordo com uma escala hemolítica: hemolíticos (> 5 %), ligeiramente hemolíticos (2 a 5 %) e não hemolíticos (< 2 %) (Mohy *et al.*, 2012).

A determinação do grau de hemólise dos *scaffolds* foi avaliado através do contacto direto dos materiais com o sangue de coelho ACD-A.

Inicialmente os materiais, com uma área superficial de 21 cm<sup>2</sup>, foram cortados e incubados em 7 mL de sangue ACD-A previamente diluído, em tubos de Falcon. Na preparação do controlo positivo foi adicionado 1 mL de sangue de coelho ACD-A a 6 mL de água destilada (100 % de hemólise), enquanto que no controlo negativo adicionou-se 1 mL de sangue ACD-A a 6 mL de PBS. As amostras foram colocadas na estufa a 37 °C durante 3 h. Durante esse período de tempo, em intervalos de 30 min, os tubos foram cuidadosamente invertidos garantindo, desta forma, um melhor contacto entre os materiais e o sangue.

Após o período de incubação as amostras foram centrifugadas a 2100 rpm durante 15 min. O sobrenadante de cada tubo foi utilizado para determinar a quantidade de hemoglobina presente,  $[Hb]$ , através da medição das absorvâncias, num comprimento de onda de 540 nm e com o auxílio do espectrofotómetro *UV-Vis Jasco V-550*.

**Capítulo 3 – Materiais e Métodos**

A percentagem de hemólise foi calculada de acordo com a Equação 3.3.

$$\% \text{ Hemólise} = \frac{[Hb]_{amostra} - [Hb]_{controle\ negativo}}{[Hb]_{controle\ positivo} - [Hb]_{controle\ negativo}} \times 100 \quad (3.3)$$

onde  $[Hb]_{amostra}$  representa a concentração de hemoglobina presente no sobrenadante,  $[Hb]_{controle\ negativo}$  e  $[Hb]_{controle\ positivo}$  são as concentrações de hemoglobina nos controlos negativo e positivo, respetivamente.

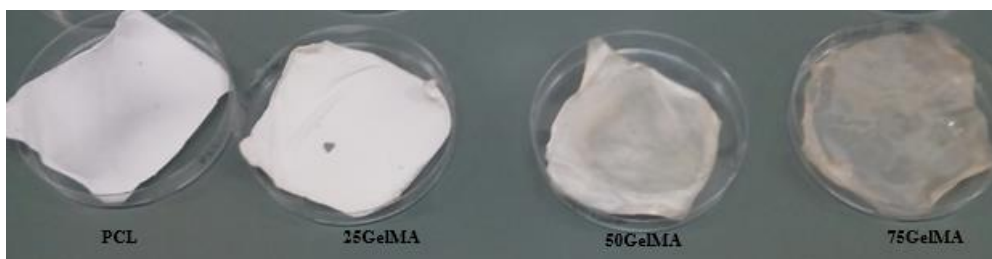
## CAPÍTULO 4- RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1. Síntese dos *scaffolds* compósitos PCL/GelMA

O trabalho experimental desenvolvido conduziu à preparação de diferentes *scaffolds* com vista a sua possível utilização na regeneração de tecido vascular. Os *scaffolds* foram preparados a partir da mistura de polímeros natural e sintético, gelatina do tipo A (modificada) e PCL, respetivamente, utilizando as técnicas de *electrospinning* por *blending* (abordagem experimental I) e *electrospinning* coaxial (abordagem experimental II)

O trabalho teve início com a modificação da gelatina do Tipo A através da reação deste composto com o anidrido metacrílico, de acordo com o procedimento relatado por Coimbra *et al.*, (2014). Desta forma obteve-se gelatina metacrilamida (GelMA), que apresenta ligações de carbono duplas que conferem a este tipo de polímero a capacidade de ser fotoreticulado. Posteriormente foram sintetizados os diferentes tipos de *scaffolds* utilizando as duas técnicas anteriormente referidas. Depois de obtidos os *scaffolds*, estes foram inseridos numa solução aquosa de Irgacure 2959 ® e seguidamente irradiados com luz UV. O processo de fotoreticulação teve como principal objetivo reticular a GelMA presente nas fibras, de forma a impedir a sua solubilização em condições fisiológicas. A aparência das membranas antes e depois de fotoreticuladas alterou-se, tendo ficado - depois de fotoreticuladas - com um tom amarelado, mais intenso no caso de concentrações de gelatina mais altas, como é apresentado na Figura 4.1. No caso das fibras compostas apenas por PCL não se verifica qualquer alteração na sua aparência, antes e depois de sujeitas ao processo de fotoreticulação, indicando que este polímero não sofreu nenhuma alteração química, tal com seria de esperar, pois não possui grupos susceptíveis de fotoreticulação.

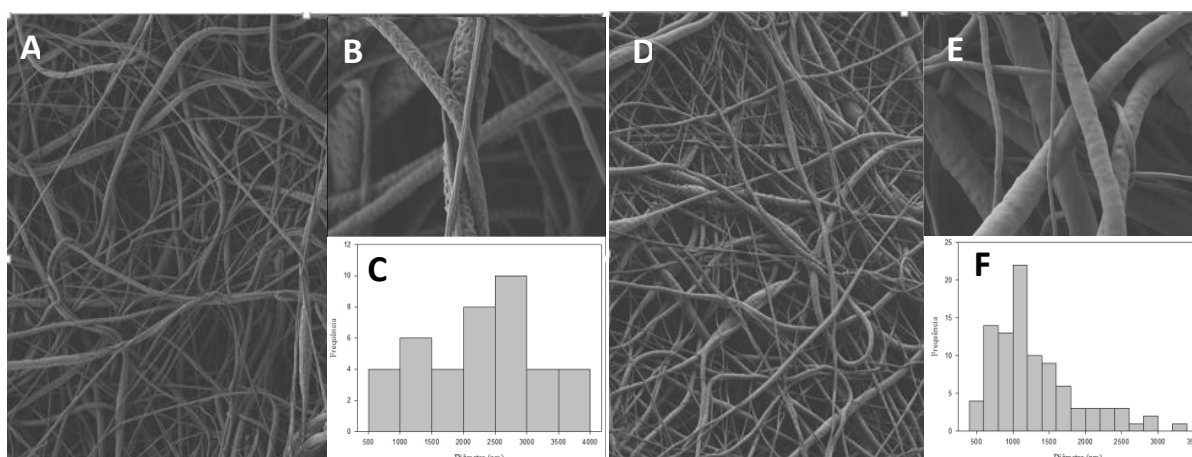
Por fim, as estruturas poliméricas produzidas pelas duas estratégias foram caracterizadas. Os resultados obtidos em cada uma das abordagens será apresentado nos próximos subcapítulos.



**Figura 4.1** Aparência visual dos *scaffolds* depois de submetidos ao processo de fotoreticulação (irradiação de UV durante 20 minutos).

## 4.2. Caracterização físico-química e morfológica dos *scaffolds*

Para avaliar as diferentes morfologias das fibras compósitas de PCL/GelMA, resultantes das diferentes formulações estudadas, todos os *scaffolds* produzidos foram analisados pela técnica SEM. De acordo com a morfologia apresentada foi possível avaliar a influência do processo de fotoreticulação e da concentração de GelMA nos *scaffolds* produzidos. Esta técnica permitiu ainda avaliar a distribuição do diâmetro das fibras. É importante referir que o cálculo dos diâmetros foi efetuado somente com base em uma ou duas imagens, sendo por isso apenas uma estimativa da distribuição de tamanhos e não uma medida rigorosa. A superfície das membranas preparadas foi então observada, a diferentes ampliações. Na Figura 4.2 são apresentadas as fotografias SEM da superfície da membrana de fibras de PCL, originais (não foram submetidas ao processo de fotoreticulação, tendo sido analisadas logo após o processo de *electrospinning*) e fotoreticuladas, a ampliações de 1 000x, e 10 000x, bem como um histograma onde é possível avaliar o diâmetro das fibras.

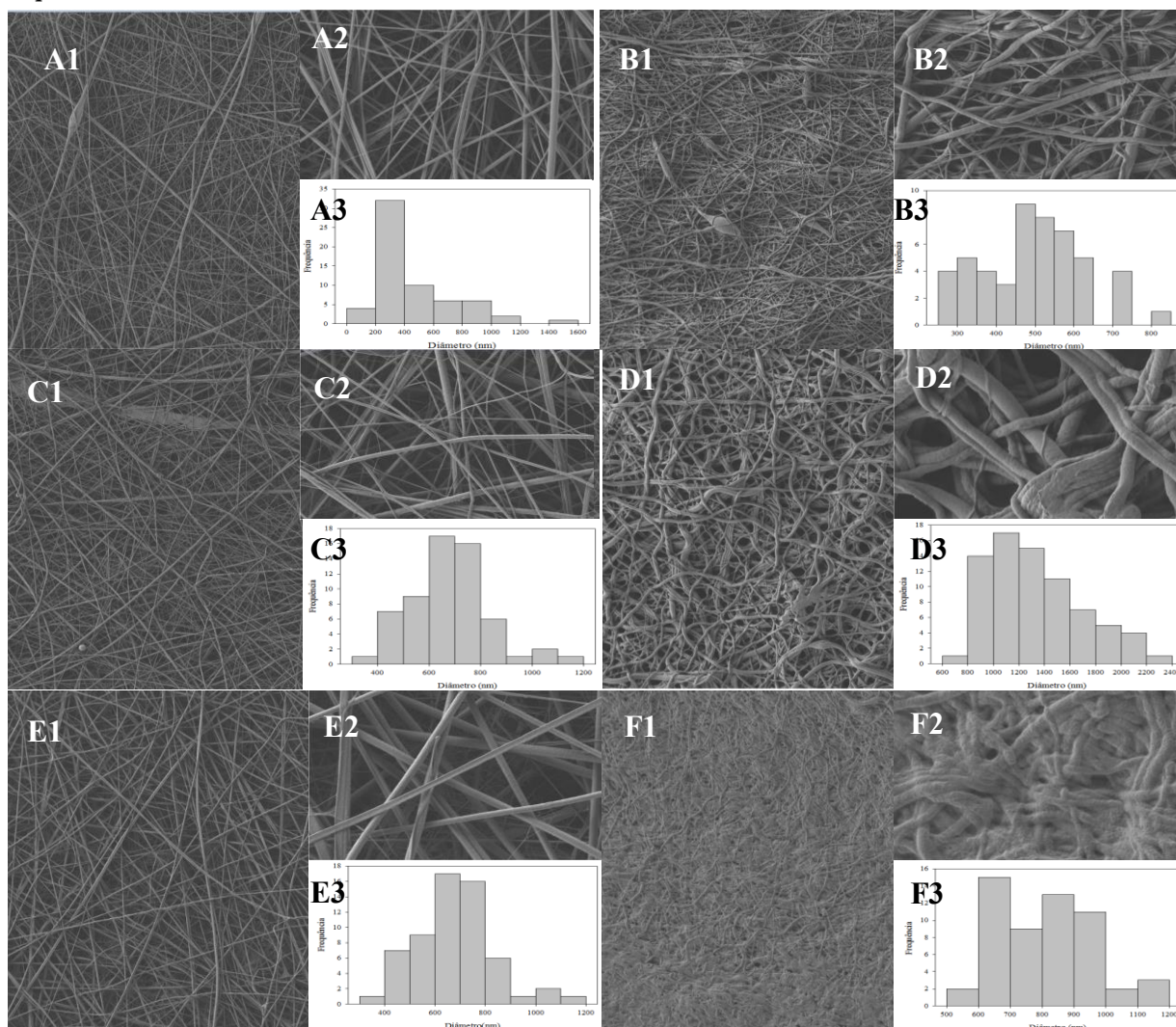


**Figura 4.2** A) B) Fotografias obtidas pela técnica SEM da superfície das fibras de PCL originais com ampliações de 1000x, 10000x, respetivamente; C) histograma dos diâmetros das fibras; D) E) Fotografias obtidas pela técnica SEM da superfície das fibras de PCL fotoreticuladas com ampliações de 1000x, 10000x, respetivamente; F) histograma dos diâmetros das fibras;

#### Capítulo 4 – Resultados e Discussão

De acordo com a Figura 4.2 é possível verificar que as fibras de PCL, tanto as fotoreticuladas (A e B) como as originais (D e E), apresentam uma estrutura desorganizada. Este facto deve-se à técnica de fabrico utilizada na síntese das fibras, *electrospinning*, na qual as fibras são depositadas aleatoriamente no coletor. Das fotografias SEM é ainda possível constatar que as fibras de PCL apresentam uma elevada distribuição de diâmetro, como é também comprovado nos histogramas apresentados em C e F. Com base nos histogramas verifica-se que, em média, as fibras de PCL originais apresentam um diâmetro de  $2240 \pm 897$  nm, ao contrário das fibras fotoreticuladas cujo diâmetro é de  $1307 \pm 583$  nm. Em ambos os casos o desvio padrão é elevado devido à larga distribuição dos diâmetros das fibras. Comparando a morfologia das fibras originais com a morfologia das fibras fotoreticuladas verifica-se que estas não apresentam diferenças significativas. Este resultado era esperado pois a PCL é um polímero de carácter muito hidrofóbico e, portanto, quando em contacto com meio aquoso, onde foi mergulhada durante o processo de fotoreticulação, não sofre alterações morfológicas visíveis. É ainda importante referir que a superfície das membranas de PCL não apresenta “beads”.

Depois de analisadas as fotografias das fibras de PCL é importante averiguar a influência da proporção de GelMA nas fibras sintetizadas e comparar este facto com o processo de fotoreticulação ao qual as membranas foram sujeitas. Assim, na Figura 4.3 apresentam-se as análises SEM realizadas nas membranas produzidas por *electrospinning* por *blending* para as diferentes formulações estudadas, efetuando-se também a analogia entre as membranas originais (não fotoreticuladas) e fotoreticuladas.



**Figura 4.3** A) C) E) Fotografias obtidas pela técnica SEM da superfície das fibras originais produzidas por *electrospinning* por *blending* com 25, 50 e 75 % de GelMA, respetivamente, (ampliações de 1000x e 10000x) e representação dos respetivos histogramas (A3, C3 e E3); B) D) F) Fotografias obtidas pela técnica SEM da superfície das fibras fotoreticuladas produzidas por *electrospinning* por *blending* com 25, 50 e 75 % de GelMA , respetivamente (ampliações de 1000x e 10000x) e representação dos respetivos histogramas (B3, D3 e F3);

Observando a Figura 4.3 verifica-se que uma vez mais as fibras sintetizadas se encontram desorganizadas, devido à técnica de fabrico utilizada. Relativamente às fibras compósitas originais é possível constatar que quanto maior a proporção de GelMA, maior o diâmetro médio das fibras obtido (Tabela 4.1). Este resultado poderá estar relacionado com a viscosidade das soluções sujeitas a *electrospinnig*. Como referido no capítulo 1.5.2., o aumento do diâmetro das fibras tende a aumentar com o aumento da viscosidade das soluções precursoras. Neste caso, verificou-se (empiricamente) que a viscosidade das soluções aumentava com o aumento da proporção de gelatina, o que pode justificar a tendência observada. Analisando a morfologia das membranas originais, verifica-se a formação de fibras achatadas, na forma de fitas. Tal facto poderá estar relacionado com a baixa volatilidade do solvente. Apesar do TFE ser volátil, é utilizado também ácido acético, que



#### Capítulo 4 – Resultados e Discussão

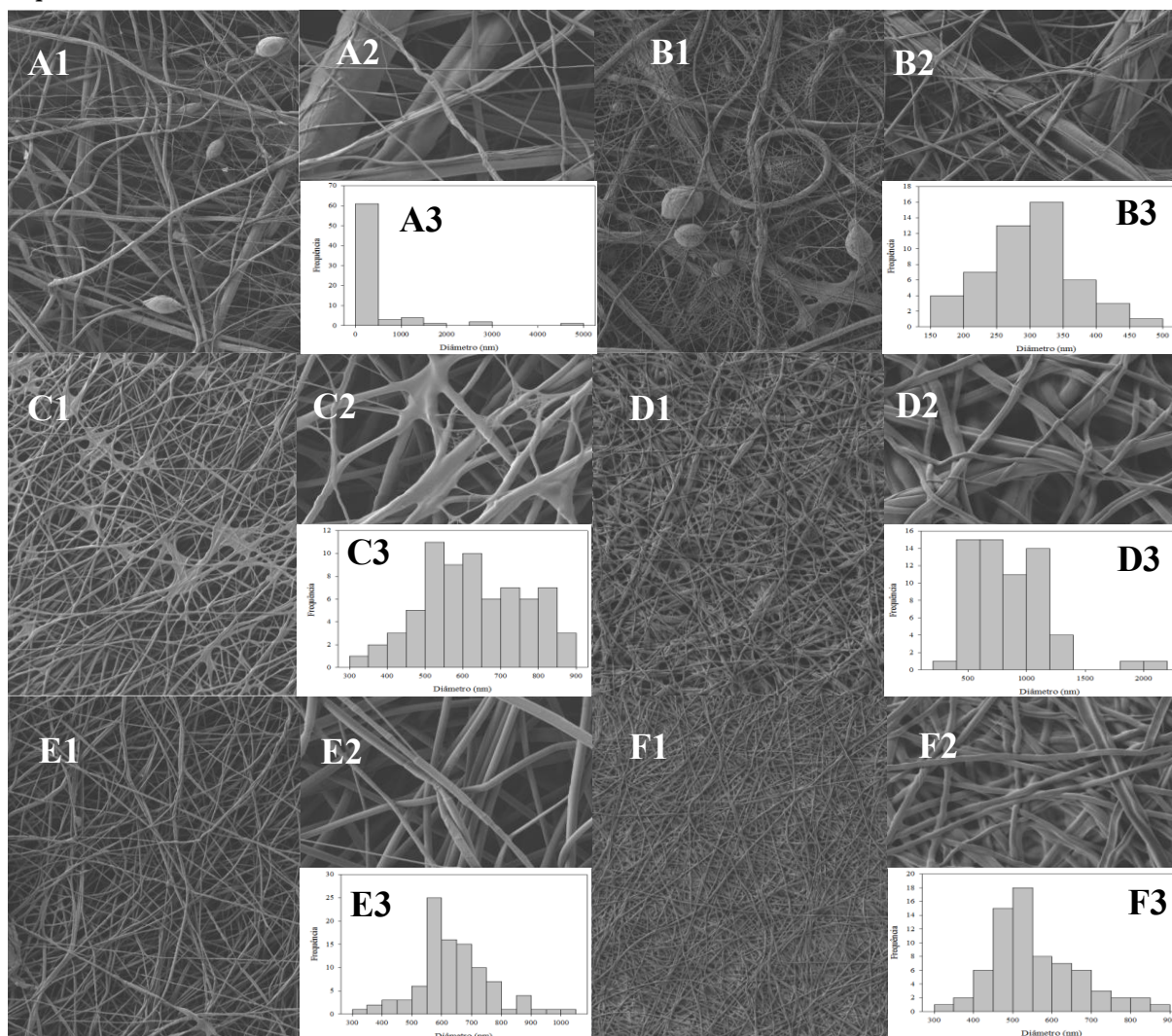
apresenta uma volatilidade muito mais baixa. Se a taxa de evaporação do solvente é muito baixa, a solução não evapora completamente antes do jato fibroso atingir o coletor. Assim é depositada no coletor uma fibra formada por uma película fina de polímero, que contém no seu interior solvente. Quando finalmente o solvente evapora, e sob o efeito da pressão atmosférica, a película polimérica colapsa, originando fibras achatadas (Koombhongse *et al.*, 2001).

Comparativamente com as membranas originais, as morfologias das membranas fotoreticuladas apresentam alterações profundas, como se pode observar nas Figuras 4.3. B, D e F.

A morfologia dos *scaffolds* fotoreticulados deve-se à presença de gelatina, cuja conformação mais estável é em forma de hélice. Contudo, durante processo de *electrospinning* as cadeias de gelatina sofrem um estiramento devido à ação das forças electrostáticas. Quando entram em contacto com uma solução aquosa, durante o processo de foto reticulação, as cadeias de gelatina tendem a voltar à sua forma mais estável, rearranjando-se numa forma helicoidal, o que origina o “encolhimento” e aumento do diâmetro das fibras, sendo este efeito mais visível quanto maior for a proporção de gelatina nas fibras. Assim, as fibras fotoreticuladas apresentam diâmetros consideravelmente superiores aos exibidos pelas suas precursoras originais.

De acordo com as fotografias de SEM apresentadas em A1 e B1 é ainda possível constatar que menores concentrações de GelMA levam à formação de *beads*. Isto acontece, pois, durante o processo de *electrospinning*, o solvente não é completamente evaporado e, consequentemente, quando as fibras atingem o coletor ainda estão “húmidas” levando à formação de *beads*.

Depois de observadas as fotografias das fibras compósitas produzidas por *electrospinning* por *blending* procedeu-se à análise SEM das fibras compósitas sintetizadas a partir da técnica de *electrospinning coaxial*. Na Figura 4.4 apresenta-se a análise efetuada para as fibras compósitas originais e fotoreticuladas, sintetizadas com diferentes proporções de GelMA (25, 50 e 75 %).



**Figura 4.4.** A) C) E) Fotografias obtidas pela técnica SEM da superfície das fibras originais produzidas por *electrospinning* coaxial com 25, 50 e 75 % de GelMA, respectivamente (ampliações de 1000x e 10000x) e representação dos respectivos histogramas (A3, C3 e E3); B) D) F) Fotografias obtidas pela técnica SEM da superfície das fibras fotoreticuladas produzidas por *electrospinning* coaxial com 25, 50 e 75 % de GelMA, respectivamente (ampliações de 1000x e 10000x) e representação dos respectivos histogramas (B3, D3 e F3);

Analisando atentamente a Figura 4.4 pode constatar-se que baixas concentrações de GelMA resultam na formação de *beads*. Tal acontece devido à baixa viscosidade da solução polimérica aliada à elevada tensão superficial. Estes parâmetros dificultam a formação do cone de *Taylor*, levando à ejeção de pequenas gotas que resultam na formação de *beads*.

A morfologia específica apresentada pelas fibras coaxiais 50GelMA poderá estar relacionada com os elevados níveis de humidade da atmosfera na qual é realizado o *electrospinning*.

Assim, a taxa de evaporação do solvente será baixa e, conseqüentemente, a fibra que se deposita no coletor irá conter solvente provocando a fusão do polímero.

Por outro lado, algumas fibras coaxiais 75 GelMA apresentam um diâmetro superior numa dada zona da fibra. Tal resultado poderá ser explicado pela estrutura *core-shell*

#### Capítulo 4 – Resultados e Discussão

apresentada pelas fibras, onde o núcleo é formado por PCL e a “casca” por GelMA. Assim, prevê-se que na região da fibra onde o diâmetro é mais baixo não tenha havido formação da “casca”, tendo-se obtido apenas a parte interior composta por PCL.

No caso das fibras coaxiais verifica-se que o processo de fotoreticulação não vai alterar significativamente a morfologia das fibras. Contudo para as proporções de GelMA mais altas é possível destacar o aparecimento dos hidrogéis de gelatina em torno das fibras. A Tabela 4.1 sumariza os diâmetros médios das fibras dos diferentes *scaffolds* estudados.

Comparando a Figura 4.3 A1 com a Figura 4.4 A1 constata-se que para concentrações de GelMA mais baixas as fibras originais coaxiais apresentam uma maior distribuição de diâmetros exibindo um desvio padrão de 724 nm, contrariamente às fibras *blending* que apresentam um desvio padrão de 279 nm.

**Tabela 4.1** Valores obtidos para o diâmetro médio das fibras compósitas produzidas por *electrospinning* por *blending* e *coaxial* e respetivo desvio-padrão.

Composição	Diâmetro (nm)	
	Fotoreticuladas	Originais
PCL	1307 ± 583	2240 ± 897
PCL+25GelMA (blending)	496 ± 134	458 ± 279
PCL+50GelMA (blending)	1350 ± 367	622 ± 253
PCL+75GelMA (blending)	810 ± 150	680 ± 153
PCL+25GelMA (coaxial)	301 ± 68	464 ± 724
PCL+50GelMA (coaxial)	853 ± 339	632 ± 133
PCL+75GelMA (coaxial)	553 ± 110	642 ± 122

Relativamente aos diâmetros apresentados na Tabela 4.1 pode constatar-se que as fibras produzidas por *electrospinning* coaxial exibem diâmetros menores do que as fibras produzidas por *electrospinning* por *blending*. Este resultado poderá estar associado ao menor caudal utilizado no fabrico das fibras coaxiais.

A técnica SEM não permite comprovar que as fibras sintetizadas são compostas por PCL e GelMA. Assim, recorreu-se à técnica ATR-FTIR para identificar os grupos químicos característicos da PCL e da GelMA nas fibras compósitas. Na Figura 4.5 são apresentados os

#### Capítulo 4 – Resultados e Discussão

espectros obtidos da análise ATR-FTIR dos *scaffolds* compósitos fotoreticulados compostos por PCL/75, 50 e 25 % GelMA e do *scaffold* de PCL.

De referir que todos os espectros apresentados foram normalizados relativamente ao pico mais intenso da PCL, correspondente ao grupo carbonilo (C=O), de forma ser possível proceder à sua comparação.

A gelatina é uma proteína obtida pela desnaturação do colagénio. A ligação amida – que une as unidades de repetição das proteínas dá origem a cinco bandas de absorção características, nomeadamente amida tipo I, II, III e amida A e B, listadas na Tabela 4.2 (Kong & Yu, 2007).

**Tabela 4.2** Bandas características do espectro infravermelho das ligações peptídicas (ligação amida).

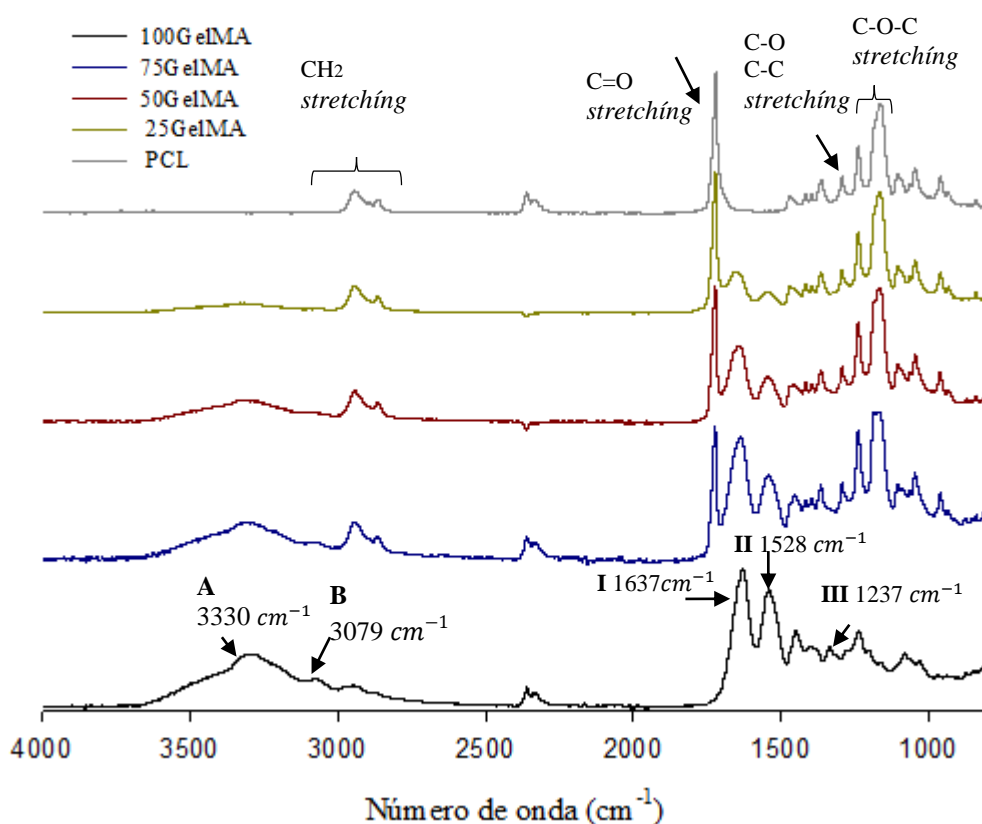
Designação da banda	Número de onda (cm <sup>-1</sup> )	Descrição
Amida A	3300	NH <i>stretching</i>
Amida B	3100	NH <i>stretching</i>
Amida I	1600 – 1690	C=O <i>stretching</i>
Amida II	1480 – 1575	CN <i>stretching</i> , NH <i>bending</i>
Amida III	1229 – 1301	CN <i>stretching</i> , NH <i>bending</i>

Comparando os valores apresentados na Tabela 4.2 e o espectro ATR-FTIR da Figura 4.5 é possível corroborar a presença das bandas características da gelatina na GelMA fotoreticulada demonstrando, desta forma, que os processos de modificação química e de fotoreticulação da gelatina não vão alterar a sua estrutura base. De facto, é visível a presença das ligações da amida A e B, correspondentes ao NH *stretching*, na zona de 3330 cm<sup>-1</sup> e 3079 cm<sup>-1</sup>, respetivamente. É ainda possível observar a 1637 cm<sup>-1</sup> a banda típica da ligação C=O (grupo carbonilo), característica da amida I. As bandas de absorvância representativas das amidas II e III encontram-se a 1528 cm<sup>-1</sup> e 1237 cm<sup>-1</sup>, respetivamente.

A análise ATR-FTIR deveria indicar o sucesso do processo de fotoreticulação dos *scaffolds* compósitos. A reação da gelatina com o MAA permitiu a incorporação de ligações C=C na cadeia polimérica. Depois de submetida ao processo de fotoreticulação, onde os *scaffolds* foram expostos à luz UV, seria de esperar que a ligação C=C desaparecesse. Contudo, a banda típica associada à elongação C=C situa-se entre 1600 – 1640 cm<sup>-1</sup>, que se sobrepõe à banda característica da amida I. Assim, o espectro ATR-FTIR apresentado não

permitiu averiguar o sucesso do processo de fotoreticulação, associado à ausência da banda C=C.

Relativamente ao espectro das fibras de PCL, verifica-se que este apresenta as bandas típicas deste polímero. A  $2943\text{ cm}^{-1}$  e  $2863\text{ cm}^{-1}$  são visíveis as bandas correspondentes ao  $\text{CH}_2$  *stretching*, assimétrico e simétrico, respetivamente. Na zona do  $1718\text{ cm}^{-1}$  observa-se a banda correspondente ao grupo carbonilo (C=O). A  $1290\text{ cm}^{-1}$  é ainda possível evidenciar a presença das bandas típicas correspondentes ao C-O e C-C *stretching* e a  $1236\text{ cm}^{-1}$  e  $1169\text{ cm}^{-1}$  confirma-se a existência de ligações C-O-C *stretching* assimétrico e simétrico, respetivamente.



**Figura 4.5** Espectro ATR-FTIR dos *scaffolds* compósitos fotoreticulados, produzidos por *electrospinning* por *blending*, compostos por PCL/75, 50 e 25 % GelMA e do *scaffold* de PCL e GelMA puros.

Depois de identificados as bandas características dos componentes individuais das fibras, GelMA e PCL, procedeu-se à análise dos espectros dos *scaffolds* compósitos de PCL e 75, 50 e 25 % GelMA, também ilustrados na Figura 4.5.

Analisando os espectros obtidos das fibras compósitas de PCL e GelMA verifica-se que, independentemente da percentagem de GelMA presente, todos os espectros apresentam as

#### Capítulo 4 – Resultados e Discussão

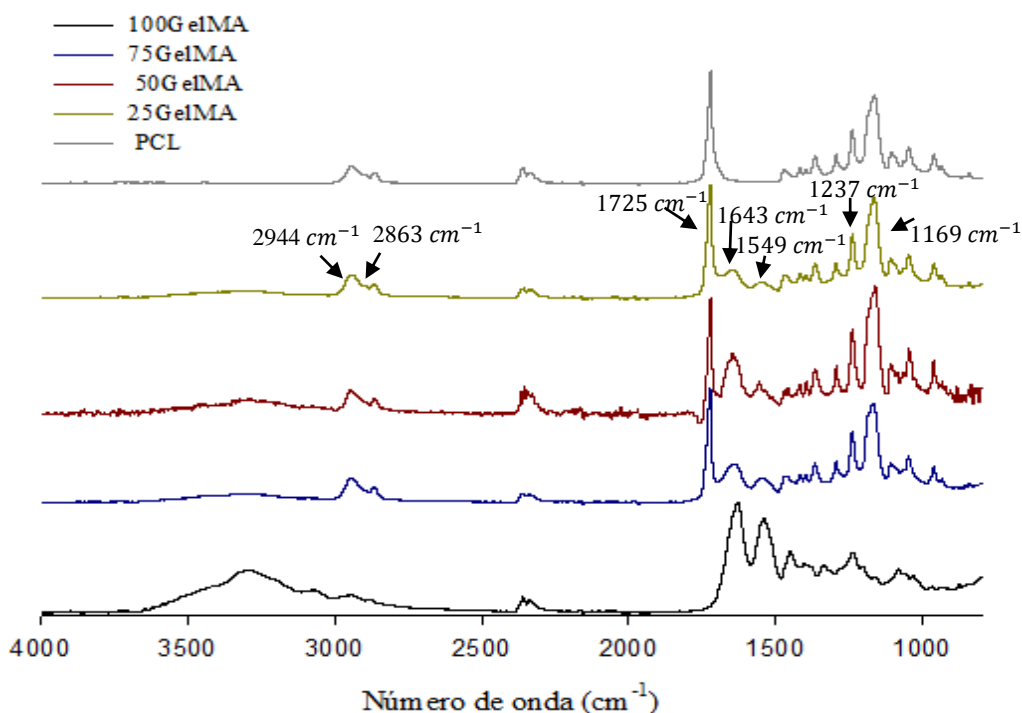
bandas mais características dos dois polímeros. Para as três formulações dos *scaffolds* compósitos estudadas, a  $1725\text{ cm}^{-1}$  observa-se a ligação C=O característica dos ésteres, indicando a presença de PCL nas fibras. Para além disso, a  $2943\text{ cm}^{-1}$  e  $2863\text{ cm}^{-1}$  é ainda notável a presença de bandas de absorção referentes às vibrações *stretching* simétrico e assimétrico dos grupos  $\text{CH}_2$  constituintes da cadeia polimérica do PCL.

Por sua vez, na zona de  $1640\text{ cm}^{-1}$  é visível a banda responsável pela vibração *stretching* dos grupos carbonilos, referente à amida I e na região dos  $1542\text{ cm}^{-1}$  é possível identificar as bandas resultantes das vibrações CN e NH *stretching*, comprovando-se a existência das amidas II. No que diz respeito à amida do tipo III não foi possível verificar se estava ou não presente pois o pico correspondente está sobreposto ao pico da PCL, na região dos  $1237\text{ cm}^{-1}$ .

Por fim, pode ainda constatar-se que os picos correspondentes às amidas A e B não são tão salientes como no caso do hidrogel de GelMA.

Comparando agora os espectros dos *scaffolds* compósitos de PCL e GelMA verifica-se que quanto maior a proporção de GelMA mais intensas são as bandas de absorção características deste polímero, nomeadamente as amidas I e II, e menos intensas são as bandas típicas da PCL. Relativamente aos picos correspondentes às amidas A e B é possível denotar que estes são mais intensos nas fibras compósitas compostas por 75 % GelMA e menos intensos nas fibras compósitas compostas por apenas 25 % GelMA, como seria de esperar.

Os *scaffolds* produzidos por *electrospinning coaxial* foram também analisados através da técnica ATR-FTIR, que permitiu identificar os grupos químicos presentes em cada amostra, possibilitando aferir sobre a presença de GelMA e PCL nas fibras compósitas.



**Figura 4.6** Espectro ATR-FTIR dos *scaffolds* compósitos fotoreticulados, produzidos por *electrospinning coaxial*, compostos por PCL/75, 50 e 25 % GelMA e do *scaffold* de PCL e GelMA puros.

Na Figura 4.6 são apresentados 5 espectros diferentes: GelMA fotoreticulada pura, PCL fotoreticulada pura e 3 espectros referentes às fibras fotoreticuladas coaxiais produzidas a partir de diferentes proporções de GelMA nomeadamente 75, 50 e 25 %.

Observando a Figura 4.6 verifica-se que as fibras compósitas coaxiais apresentam bandas de absorção características da gelatina e da PCL. Para as 3 proporções de gelatina estudadas, a  $1725\text{ cm}^{-1}$  é visível a banda característica dos ésteres, referente ao grupo carbonilo presente na PCL. Por outro lado, detetou-se também o *stretching* simétrico e assimétrico característico dos grupos  $\text{CH}_2$  nas bandas  $2944\text{ cm}^{-1}$  e  $2863\text{ cm}^{-1}$ , respetivamente. A  $1169\text{ cm}^{-1}$  observa-se uma banda bastante acentuada referente à ligação *stretching* simétrica C-O-C. Assim, é possível provar a presença de PCL nas fibras compósitas coaxiais.

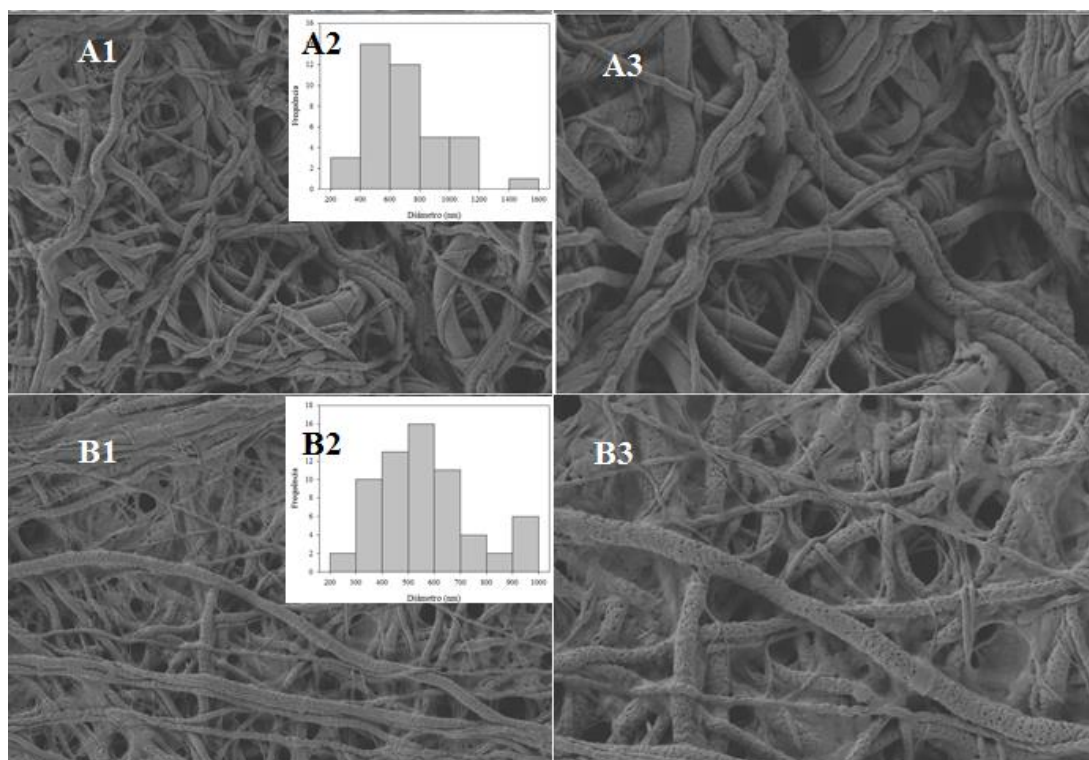
Relativamente às bandas características da gelatina verifica-se a  $1643\text{ cm}^{-1}$  o pico referente à Amida I e a  $1549\text{ cm}^{-1}$  o pico correspondente à Amida II. Uma vez mais não é possível tirar conclusões acerca da Amida III pois o pico correspondente encontra-se sobreposto ao pico referente à ligação *stretching* assimétrica C-O-C, característico da cadeia polimérica da PCL. A região das amidas A e B não é visível em nenhum dos espectros das fibras compósitas coaxiais apresentados.

#### Capítulo 4 – Resultados e Discussão

Os espectros apresentados na Figura 4.6 não permitem tirar conclusões da influência da concentração de gelatina. Este facto poderá ser explicado pela não homogeneidade da composição das fibras coaxiais devido disposição não uniforme dos polímeros nas fibras. É ainda importante referir que durante o processo de *electrospinning coaxial* o consumo das soluções poliméricas não terminava ao mesmo tempo, estando a ser injetado um dos polímeros em excesso (relativamente ao programado).

De forma avaliar a eficiência do processo de fotoreticulação ao qual os *scaffolds* foram submetidos procedeu-se à incubação destes em tampão fosfato salino (PBS, pH = 7,4), a 37 °C e durante 3 dias. Simultaneamente incubaram-se *scaffolds* compósitos não fotoreticulados que serviram de controlo e permitiram avaliar se, de facto, o processo de fotoreticulação tinha sido bem sucedido.

Os resultados dos *scaffolds* compósitos compostos por 50 % PCL/50 % GelMA, produzidos por *electrospinning* por *blending*, serão discutidos seguidamente. Para analisar a morfologia das fibras compósitas 50PCL/50GelMA recorreu-se à análise SEM. Na Figura 4.7 são apresentadas as fotografias SEM dos *scaffolds* compósitos fotoreticulados e controlo após, serem incubados, obtidas a ampliações de 5000x e 10000x. Efetuou-se também uma análise dos diâmetros médios das fibras, apresentados nos histogramas.



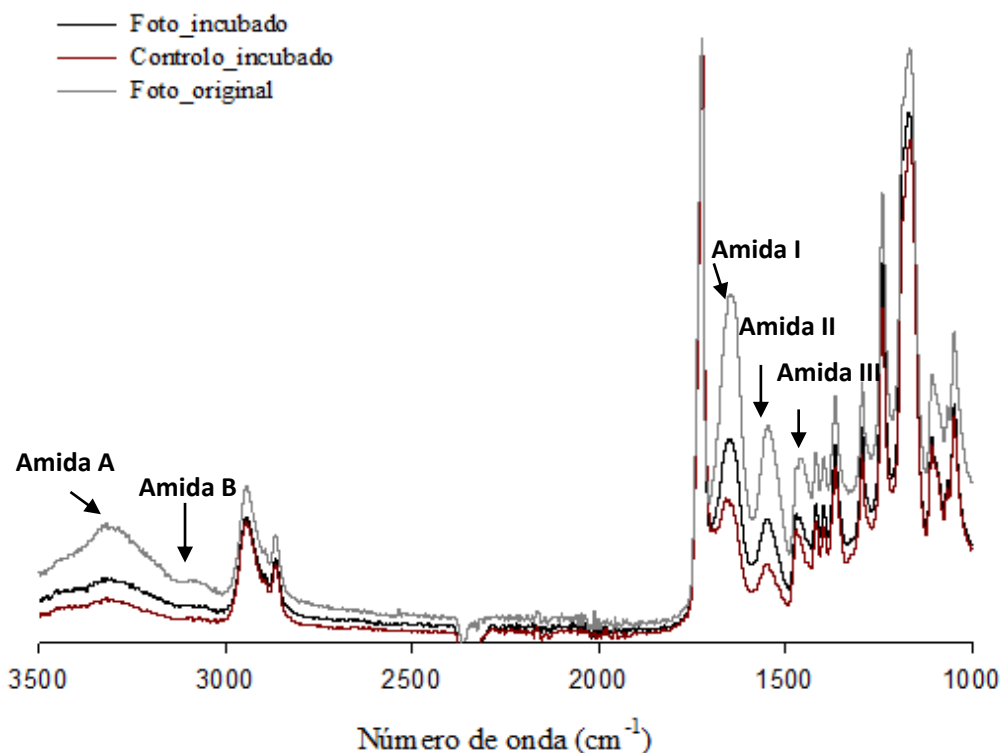
**Figura 4.7** A) B) Fotografias obtidas pela técnica SEM da superfície das fibras compósitas 50GelMA/50PCL fotoreticuladas incubadas e controlo incubadas, respetivamente, produzidas por *electrospinning* por *blending* (ampliações de 5000x, e A3) e B3) imagens SEM obtidas a ampliações de 10000x). Representação dos respetivos histogramas (A2 e B2).



Comparando a superfície das fibras compósitas incubadas (A3 e B3) verifica-se que as fibras que serviram de controlo apresentam alguma porosidade, contrariamente às fibras fotoreticuladas. Tal acontece, pois, a GelMA presente nas fibras controlo não foi submetida ao processo de fotoreticulação e, conseqüentemente, depois de incubadas durante 3 dias em PBS, parte da GelMA vai-se dissolver originando uma superfície porosa. Por conseguinte, a superfície destas fibras vai estar mais degradada, quando comparada com as fibras compósitas fotoreticuladas, onde a gelatina fotoreticulada oferece uma maior resistência à dissolução no meio aquoso.

Uma outra forma de aferir se a gelatina presente nas fibras está, de facto, reticulada é através da análise ATR-FTIR. Se os espectros correspondentes às amostras incubadas forem semelhantes aos espectros iniciais, pode-se concluir que o processo de fotoreticulação resultou. Do ponto de vista da regeneração de vasos sanguíneos o sucesso do processo de fotoreticulação seria excelente, pois seria possível melhorar as propriedades mecânicas e biológicas dos *scaffolds* sintetizados.

Na Figura 4.8 são apresentados os espectros dos *scaffolds* compósitos 50PCL/50GelMA após serem incubados em PBS (controlo e fotoreticulados) e originais fotoreticulados.



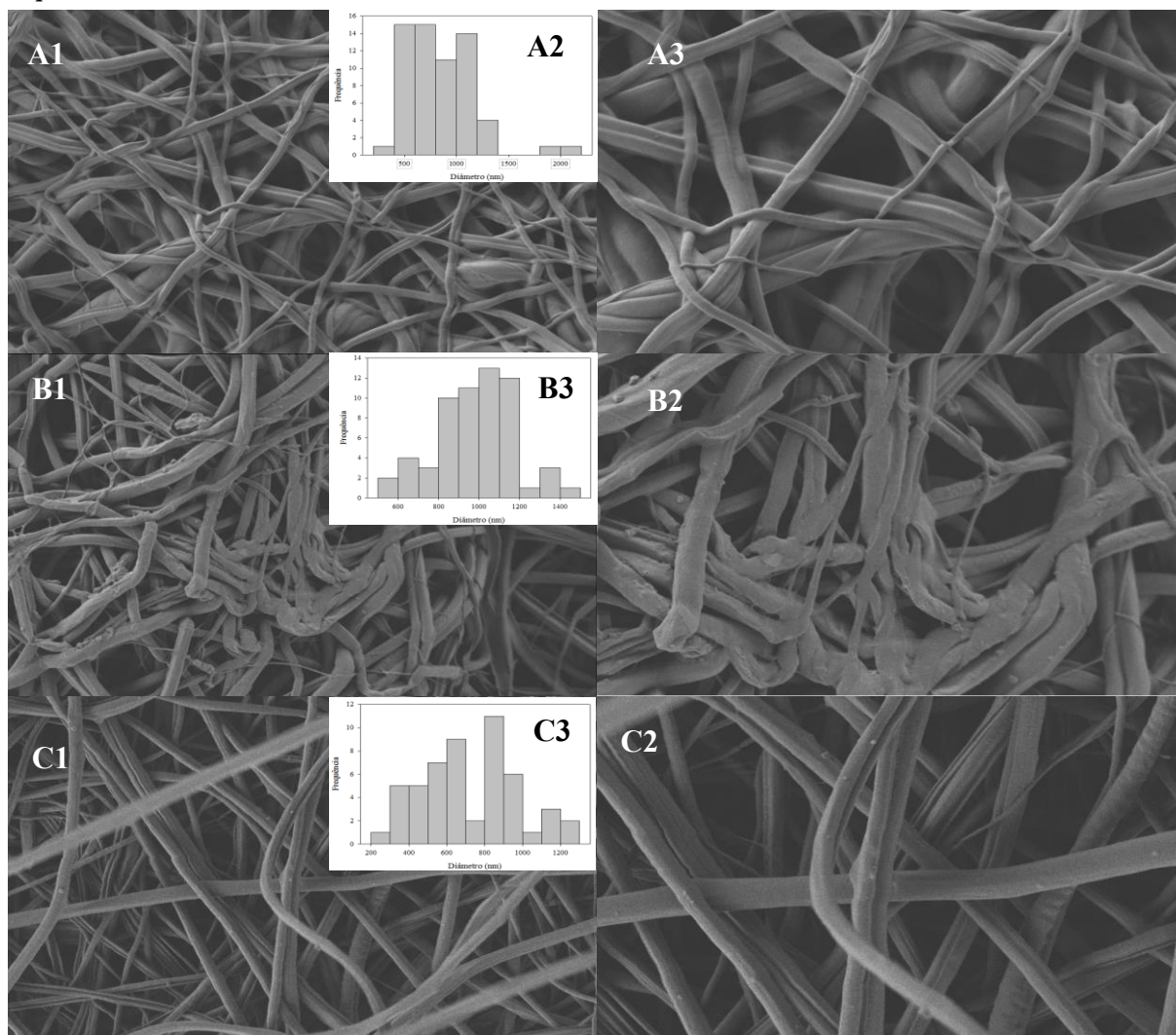
**Figura 4.8** Espectro ATR-FTIR do *scaffolds* compósitos 50PCL/50GelMA sintetizados a partir de técnica de *electrospinning* por *blending*.

#### Capítulo 4 – Resultados e Discussão

Através da análise da Figura 4.8 pode concluir-se que a gelatina incorporada nas fibras compósitas se encontra reticulada pois a intensidade das bandas de absorção características da gelatina é superior no caso fibras fotoreticuladas do que nas fibras controlo. Assim o espectro correspondente às fibras compósitas incubadas fotoreticuladas assemelha-se mais ao espectro das fibras fotoreticuladas originais do que o espectro das fibras controlo incubadas, onde as ligações típicas da gelatina não são tão salientes.

As fibras compósitas sintetizadas a partir da técnica de *electrospinning coaxial* foram igualmente incubadas em PBS durante 3 dias a 37 °C. As análises SEM das fibras compósitas fotoreticuladas (incubadas e originais) e das fibras controlo incubadas são apresentadas na Figura 4.9.

Observando a Figura 4.9 A) e B), que dizem respeito às amostras fotoreticuladas não incubadas e incubadas, respetivamente, durante 3 dias, é possível constatar que não há diferenças visíveis na morfologia das fibras. Este resultado era esperado pois a gelatina foi previamente modificada com MAA e fotoreticulada. Desta forma vai exibir um carácter mais hidrofóbico e, conseqüentemente, uma maior resistência à hidrólise. Esta constatação revela-se vantajosa no que diz respeito à regeneração do tecido vascular pois a degradação do material vai ser mais lenta e, por conseguinte, as células vão ter mais tempo para proliferar e formar uma nova matriz.



**Figura 4.9** A) B) e C) Fotografias obtidas pela técnica SEM da superfície das fibras compostas 50GelMA/50PCL fotoreticuladas originais, fotoreticuladas incubadas e controlo incubadas, respetivamente, produzidas por *electrospinning coaxial* (ampliações de 5000x, e A3), B3 e C3) imagens SEM obtidas a ampliações de 10000x). Representação dos respetivos histogramas (A2, B2 e C2).

Relativamente às fibras incubadas fotoreticuladas, observa-se a presença do hidrogel a revestir a fibra. Esta constatação era esperada pois a GelMA presente foi fotoreticulada conferindo à fibra a capacidade de reter PBS sem que a gelatina seja degradada. Tal facto pode ser comprovado com o aumento do diâmetro de  $853 \pm 339$  nm, no caso das fibras fotoreticuladas originais, para  $981 \pm 191$  nm, para as fibras compostas fotoreticuladas incubadas. Por sua vez, as fibras incubadas não submetidas ao processo de fotoreticulação (controlo) apresentam um diâmetro mais baixo, cerca de  $716 \pm 250$  nm pois a parte da gelatina que constitui a “casca” das fibras foi dissolvida.

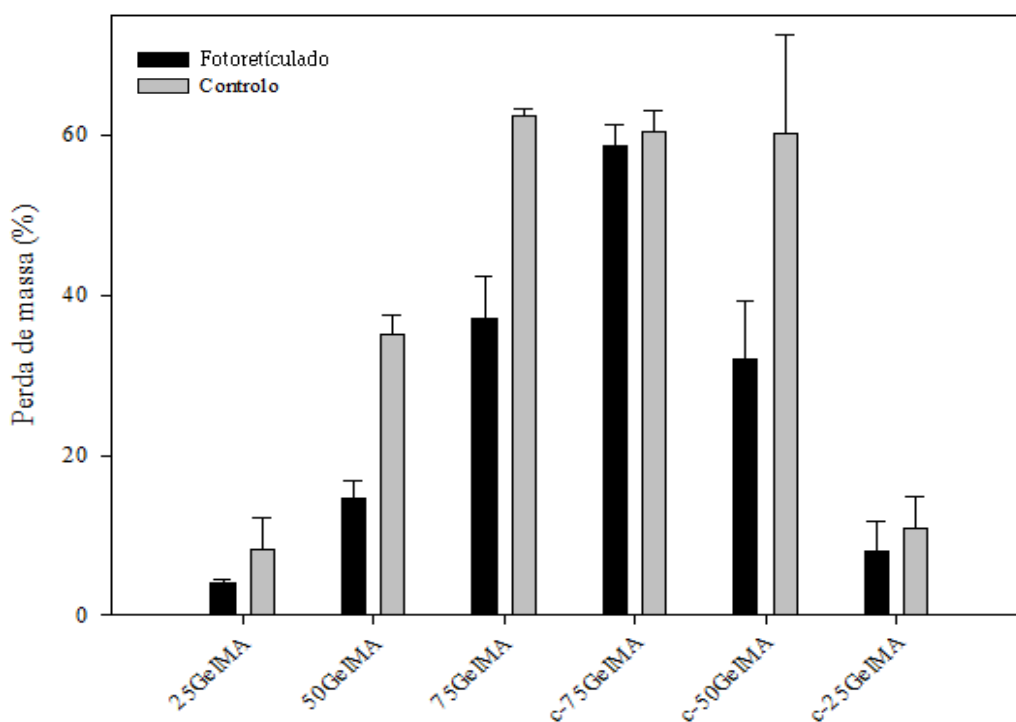
Comparando a morfologia das fibras controlo incubadas produzidas por *electrospinning* por *blending* (Figura 4.7 B) com as mesmas fibras, mas produzidas pela técnica de *electrospinning coaxial* (Figura 4.9 C), verifica-se que as primeiras apresentam uma superfície

#### Capítulo 4 – Resultados e Discussão

porosa, contrariamente às fibras coaxiais que apresentam uma superfície lisa. Este resultado advém da metodologia de fabrico adotada. No caso das fibras sintetizadas por *electrospinning* por *blending*, a GelMA está misturada com a PCL, no interior da fibra. Por sua vez, nas fibras coaxiais, a GelMA constitui a “casca” da fibra e, portanto, quando incubada a camada exterior vai desaparecer, resultando apenas a PCL.

De forma a avaliar quantitativamente eficácia do processo de fotoreticulação efetuou-se um estudo de perda de massa. Assim, se a reticulação for eficaz a perda de massa será mínima.

A Figura 4.10 permite comparar a perda de massa dos *scaffolds* compósitos fotoreticulados e controlo, produzidos a partir de soluções com diferentes proporções de GelMA. A Tabela 4.3 sumariza os resultados obtidos na Figura 4.10.



**Figura 4.10** Perda de massa, em solução salina tampão fosfato (pH = 7,4), dos *scaffolds* compósitos produzidos a partir de soluções com diferentes proporções de GelMA.

#### Capítulo 4 – Resultados e Discussão

**Tabela 4.3** Perda de massa, em solução salina tampão fosfato (pH = 7,4), dos *scaffolds* compósitos produzidos a partir de soluções com diferentes proporções de GelMA.

	Perda de massa (%)	
	<i>Electrospinning blending</i>	<i>Electrospinning coaxial</i>
25GelMA_Foto	3,95 ± 0,55	7,88 ± 3,96
25GelMA_Contr	8,27 ± 4,02	10,79 ± 4,11
50GelMA_Foto	14,60 ± 2,10	31,98 ± 7,43
50GelMA_Contr	35,08 ± 2,58	60,27 ± 12,31
75GelMA_Foto	37,02 ± 5,35	58,78 ± 2,59
75GelMA_Contr	62,44 ± 0,93	60,42 ± 2,64

Analisando atentamente a Figura 4.12 e a Tabela 4.3 é possível observar que todos os *scaffolds* compósitos fotoreticulados apresentam menor perda de massa do que os respetivos controlos, comprovando a eficiência do processo de fotoreticulação e a estabilidade das fibras fotoreticuladas em ambiente biológico.

É ainda possível avaliar o impacto da concentração de GelMA na perda de massa dos *scaffolds*.

Quanto maior for a proporção de GelMA presente nas fibras compósitas maior vai ser a perda de massa e, conseqüentemente, os *scaffolds* vão-se degradar mais rapidamente. Tal facto pode ser explicado pois menor concentração de GelMA implica uma concentração de PCL mais elevada que, sendo um polímero de degradação lenta conduz a uma diminuição do processo de degradação.

Comparando os resultados obtidos para os *scaffolds blending* e *coaxiais*, verifica-se que os últimos apresentam uma perda de massa mais elevada. Este resultado pode ser explicado pelo tipo de estrutura *core-shell* apresentada pelas fibras compósitas coaxiais, onde a parte exterior é composta por gelatina e a parte interior por PCL. Por outro lado, nos *scaffolds* produzidos por *electrospinning* por *blending*, os polímeros estão misturados e, portanto, quando incubadas durante 3 dias em PBS, a perda de massa vai ser menor pois a gelatina encontra-se incorporada na PCL, que é um polímero de carácter hidrofóbico. Contrariamente a superfície das fibras coaxiais é composta apenas por GelMA levando a uma perda de massa superior.

Por fim pode ainda constatar-se que o processo de modificação química da gelatina com MAA resultou pois, se a gelatina não tivesse sido modificada a fotoreticulação seria impossível de se realizar e, conseqüentemente obter-se-iam perdas de massas iguais em ambos os casos estudados (fotoreticulados e controlo).

#### Capítulo 4 – Resultados e Discussão

A velocidade de degradação do material revela-se um fator muito importante na regeneração de tecido vascular. Se o *scaffold* se degradar rapidamente então as células não vão ter tempo suficiente de proliferar e formar uma nova matriz. Por outro lado se a degradação for mais lenta que a regeneração do tecido, o *scaffold* vai dificultar a deposição da matriz extracelular influenciando as funções biológicas do tecido regenerado (Fu *et al.*, 2014). Neste sentido, de acordo com o tempo de regeneração do tecido, poderá optar-se por um *scaffold* com maior concentração de GelMA, se a regeneração for mais rápida, ou por um *scaffold* com uma concentração de PCL mais elevada, se a regeneração do tecido for mais lenta.

### 4.3. Determinação dos ângulos de contacto dinâmicos

A molhabilidade da superfície é uma propriedade importante dos biomateriais pois afeta a migração, proliferação e a viabilidade das células. Neste sentido, foram feitas medições de ângulos de contacto dinâmicos a todas as amostras produzidas a fim de avaliar o grau de hidrofiliicidade ou hidrofobicidade dos *scaffolds* produzidos.

Os resultados obtidos da análise dos ângulos de contacto dinâmicos dos *scaffolds* produzidos por *electrospinning* por *blending* e *coaxial* são apresentados na Figura 4.11. Para uma melhor análise destes resultados são apresentados também os ângulos de contacto dinâmicos das amostras puras de GelMA e PCL.

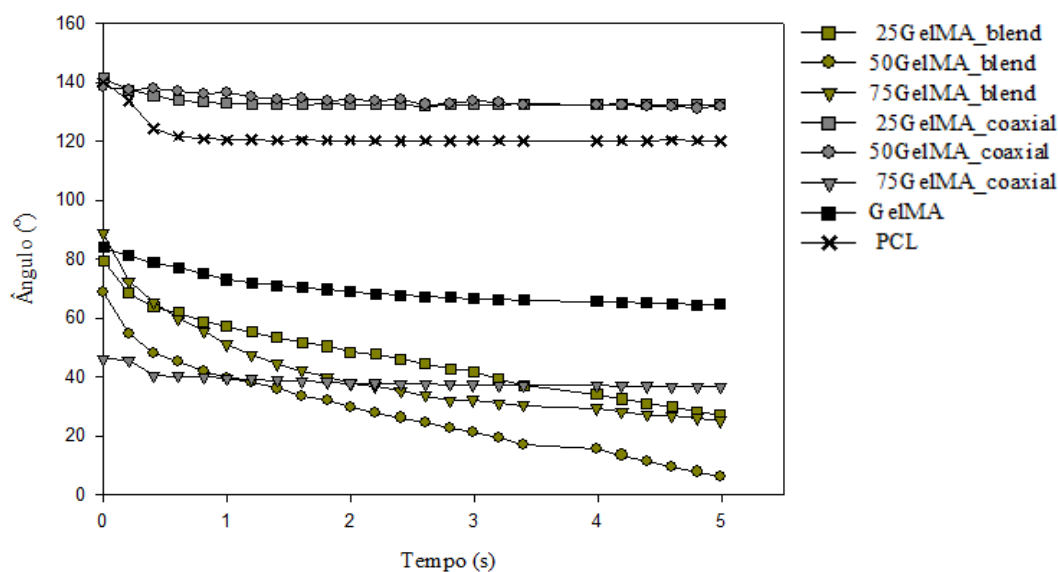


Figura 4.11 Ângulos de contacto dinâmicos dos diferentes *scaffolds* produzidos por *electrospinning*.

#### Capítulo 4 – Resultados e Discussão

Analisando a Figura 4.11 constata-se que os *scaffolds* de PCL apresentam um carácter marcadamente hidrofóbico, exibindo um valor de ângulo de contacto no instante inicial de cerca de 140 °, que decai até aos 122 °, mantendo-se com este valor até ao final do ensaio. Este resultado indica que a gota de água destilada não se espalhou na superfície da amostra e, portanto, a molhabilidade foi muito reduzida. A natureza hidrofóbica da PCL leva a que a sua degradação seja lenta tornando-o um forte candidato na produção de *scaffolds* com vista a regeneração de vasos sanguíneos. Contudo esta propriedade intrínseca da PCL reduz a capacidade de adesão, migração, proliferação e diferenciação celular.

Por sua vez, as fibras de GelMA pura evidenciam um carácter mais hidrofílico, apresentando um ângulo de contacto no instante inicial de 85 ° que diminuí ligeiramente durante o ensaio até atingir um valor de 66 °. Contudo o carácter hidrofílico não é muito acentuado devido à modificação da gelatina com MAA que conduz à alteração da sua estrutura química devido à introdução de grupos que a tornam mais hidrofóbica.

As características hidrofóbicas da PCL foram a grande motivação para a incorporação de GelMA nos *scaffolds* de forma a aumentar a hidrofiliidade dos materiais.

Analisando a influência da proporção de GelMA nas fibras coaxiais, verifica-se que para as proporções de 25 e 50 % os ângulos de contacto obtidos são idênticos e semelhantes aos obtidos para as fibras de PCL puras. Por sua vez, as fibras compostas por 75 % de GelMA exibem características hidrofílicas devido ao aumento de teor de GelMA na “casca” da fibra. Estes *scaffolds* vão proporcionar uma melhor viabilidade celular face às matrizes hidrofóbicas anteriormente referidas.

Relativamente às fibras produzidas por *electrospinning* por *blending* pode observar-se que todos os *scaffolds* compósitos são bastante hidrofílicos, havendo alguma molhabilidade da superfície. A elevada hidrofiliidade apresentada por estas fibras revela-se uma vantagem, na aplicação desejada, pois permite uma rápida infiltração e regeneração celular. Por sua vez a PCL presente nas matrizes vai conferir uma maior resistência evitando a degradação do material no organismo, num curto período de tempo. No que diz respeito ao impacto da concentração de GelMA na hidrofiliidade das fibras produzidas por *electrospinning* por *blending* verifica-se que as fibras com maior concentração de GelMA não são as que exibem um carácter mais hidrofílico, contrariamente ao que seria de esperar. Isto acontece, pois, neste tipo de estudo o fator predominante não é apenas a composição química das membranas, mas também a topografia da superfície. Se a superfície das fibras é mais porosa a infiltração da gota será maior conferindo à fibra uma natureza mais hidrofílica.

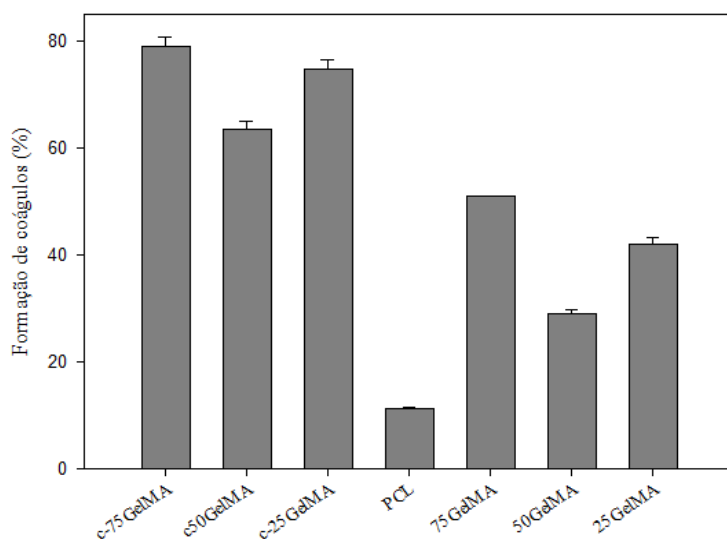
## 4.4. Hemocompatibilidade

Os *scaffolds* vasculares são utilizados quando ocorre a oclusão parcial ou total de um vaso sanguíneo devido a doenças cardiovasculares, sendo a mais comum a aterosclerose. Estes materiais poliméricos são, por isso, utilizados para desobstruir as artérias, facilitando o fluxo do sangue. Assim, foram realizados dois estudos distintos: avaliação da trombogenicidade do *scaffold* e determinação do índice hemolítico de cada material.

### 4.4.1. Avaliação da trombogenicidade

Quando se coloca um “material estranho” em contacto direto com o sangue pode haver alterações nos componentes sanguíneos. Uma das principais preocupações associada à implementação de *scaffolds* em artérias é se o material origina a formação de coágulos. Assim, este teste teve como principal objetivo averiguar se as superfícies dos materiais desenvolvidos conduzem à formação de trombos. É de referir que se o *scaffold* for muito trombogénico então vai impedir o fluxo do sangue, não sendo por isso adequado ao fim pretendido.

Na Figura 4.12 são apresentadas as percentagens de massas de coágulos formados, depois das amostras estarem em contacto com o sangue durante 40 min.



**Figura 4.12** Valores médios dos coágulos formados na superfície dos *scaffolds* após 40 min em contacto com o sangue.



#### Capítulo 4 – Resultados e Discussão

Antes de avaliar e discutir os resultados obtidos, é importante referir que para o *scaffold* composto por 75 % GelMA apenas foi possível realizar um ensaio pois, aquando adição do sangue, este foi completamente absorvido dada a hidrofiliçidade da gelatina. Face a esta adversidade, não foi possível obter o desvio padrão para este *scaffold*.

Analisando a Figura 4.12 constata-se que todos os *scaffolds* sintetizados quando colocados em contacto direto com o sangue induzem a formação de coágulos. Da análise do gráfico verifica-se ainda que das membranas estudadas a que apresenta menor tendência para formar trombos é a membrana de PCL. O carácter hifrofílico/hidrofóbico da superfície tem influência nas interações entre a superfície do material e as proteínas. A adsorção de proteínas leva à adesão de plaquetas na superfície do biomaterial estimulando a formação de trombos. De acordo com a literatura (Vladkova, 2010; van Oeveren, 2013) o aumento da hidrofiliçidade da superfície diminui a adesão celular e, consequentemente reduz o risco de formação de coágulos. Dito isto, seria de esperar que as membranas de PCL apresentassem uma % de formação de coágulos superior aos restantes *scaffolds* compósitos dada a presença de gelatina na composição dos últimos. A gelatina tem natureza hidrofílica e, portanto, seriam expectáveis menores valores de trombogenicidade. Contudo, a gelatina foi modificada quimicamente com MAA e reticulada. Estes processos poderão induzir a formação de trombos. Uma outra explicação possível poderá estar relacionada com os solventes utilizados. De facto, quando é utilizada gelatina esta é dissolvida numa mistura de ácido acético e TFE. Por sua vez, a PCL é dissolvida numa mistura de DMF e clorofórmio. Os resultados obtidos sugerem que a mistura de TFE e ácido acético pode deixar resíduos destes solventes na superfície do material, levando à formação de trombos. Para além disso, fatores como a rugosidade da superfície e o tamanho das fibras poderão, também, influenciar a formação de trombos.

Comparando os *scaffolds* coaxiais com as *scaffolds* produzidos por *blending* verifica-se que os primeiros apresentam valores mais elevados de trombogenicidade. Estes resultados estão de acordo com os valores obtidos nas análises dos ângulos de contacto dinâmicos, onde se verificou que as fibras coaxiais apresentam valores de ângulos de contacto superiores.

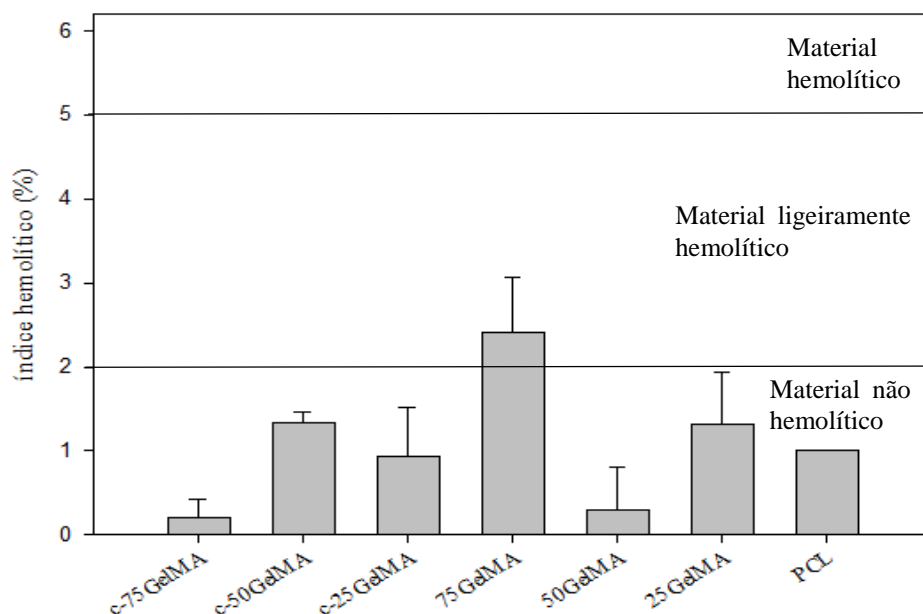
Neste sentido, é crucial dedicar um grande esforço ao desenvolvimento de superfícies poliméricas hemocompatíveis. Uma possível estratégia poderá passar por combinar substâncias anticoagulantes com os polímeros. Entre estas substâncias, a heparina é considerada a biomolécula mais adequada para a inibição de trombos (Murugesan *et al.*, 2008).

4.4.2. Determinação do índice hemolítico

Os testes de hemólise *in vitro* são indispensáveis no desenvolvimento de *scaffolds* com vista a regeneração de vasos sanguíneos, pois permitem a quantificação de baixos níveis de hemoglobina no plasma sanguíneo, que não poderiam ser medidos recorrendo a testes *in vivo* (Alves *et al.*, 2014).

A realização do teste para a determinação do índice hemolítico foi executado através do contacto direto entre o sangue e os *scaffolds*. Os estudos foram conduzidos segundo a norma ASTM F 756-00 que, como referido no Capítulo 3, divide os materiais de acordo com o seu índice hemolítico em três grupos: **1)** hemolíticos (> 5 %); **2)** ligeiramente hemolíticos (2 a 5 %); **3)** e não hemolíticos (< 2 %).

Na Figura 4.13 são apresentados os resultados do índice hemolítico, obtidos para ambas as técnicas de *electrospinning* e para as diferentes proporções de GelMA estudadas.



**Figura 4.13** Valores dos índices hemolíticos obtidos através do contacto direto dos *scaffolds* produzidos por *electrospinning*, por *blending* e coaxial.

De acordo com a classificação anteriormente referida, e observando a Figura 4.13 constata-se que quase todos *scaffolds* estudados não apresentam carácter hemolítico para o tempo que estiveram em contacto com o sangue de coelho, apresentando valores de índices entre 0,21 e 1,33 %. Por sua vez, o *scaffold* composto por 75 GelMA e produzido por *electrospinning* por *blending* exibe um carácter ligeiramente hemolítico, apresentando um

#### Capítulo 4 – Resultados e Discussão

índice de 2,40 %, não excluindo a sua aplicação na área médica. Apesar dos resultados obtidos serem satisfatórios, sugere-se a realização de novos testes *in vitro*, de forma a ser possível garantir a reprodutibilidade das conclusões obtidas. De facto, (van Oeveren, 2013) defende que a interação do sangue com as superfícies dos materiais é algo muito complexo e, portanto, o carácter hemolítico de um material não pode ser avaliado com base em apenas um teste de hemólise. Para além disso, as condições nas quais são realizados os testes *in vitro* bem como os protocolos estabelecidos pela norma ASTM F 756-00 apresentam algumas limitações, factos que têm vindo a ser discutidos por diversos autores (Braune *et al.*, 2013; van Oeveren, 2013).

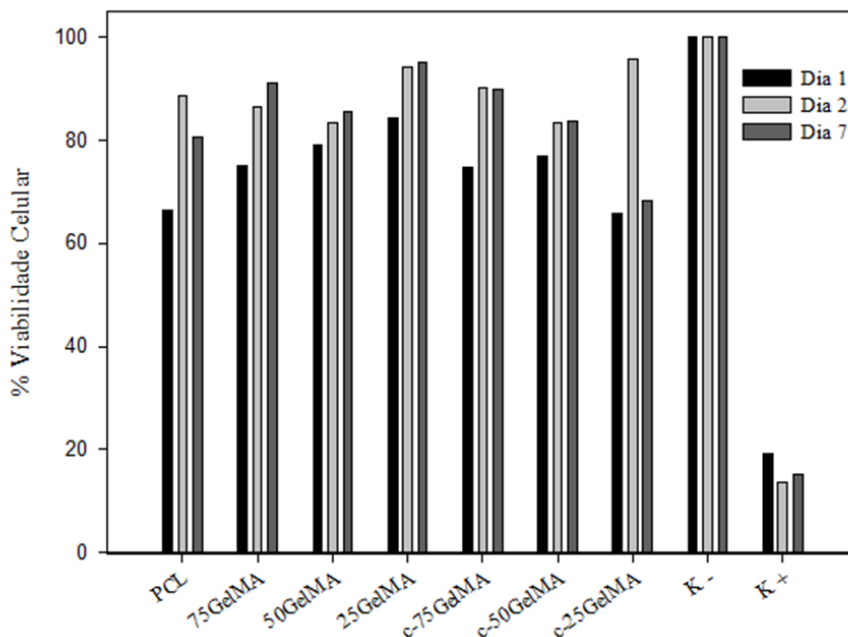
Os resultados obtidos indicam que, no geral, todos os *scaffolds* produzidos exibem um bom contacto com os eritrócitos presentes no sangue, não comprometendo a sua integridade. Assim, os materiais estudados podem ser classificados com hemocompatíveis revelando-se bastantes promissores para a sua utilização como enxertos vasculares.

### 4.5. Biocompatibilidade

#### 4.5.1. Estudo da viabilidade celular

O estudo *in vitro* da viabilidade celular foi realizado na UBI e teve como objetivo avaliar a adesão e proliferação de células de fibroblastos humanos, quando estas são colocadas em contacto direto com a superfície dos materiais. Desta forma, foi possível estudar o perfil citotóxico dos *scaffolds* fotoreticulados sintetizados.

A Figura 4.14 exhibe a resposta fisiológica das células na presença de *scaffolds* compósitos, em termos de percentagens de células viáveis, após um contacto com os materiais por períodos de 1, 3 e 7 dias.



**Figura 4.14** Avaliação da atividade celular após 1, 3 e 7 dias de contacto com os *scaffolds* compósitos produzidos por *electrospinning* por *blending* e coaxial e do *scaffold* de PCL puro.

Observando a Figura 4.14 é possível concluir que todos os *scaffolds* promovem a adesão e proliferação celular, não apresentando problemas de toxicidade. De facto, comparando os resultados de viabilidade celular das membranas sintetizadas com o controlo negativo (K-) (que representa a totalidade das células viáveis (100 %), verifica-se que os *scaffolds* produzidos não apresentam quantidades significativas de compostos tóxicos, sendo por isso biocompatíveis.

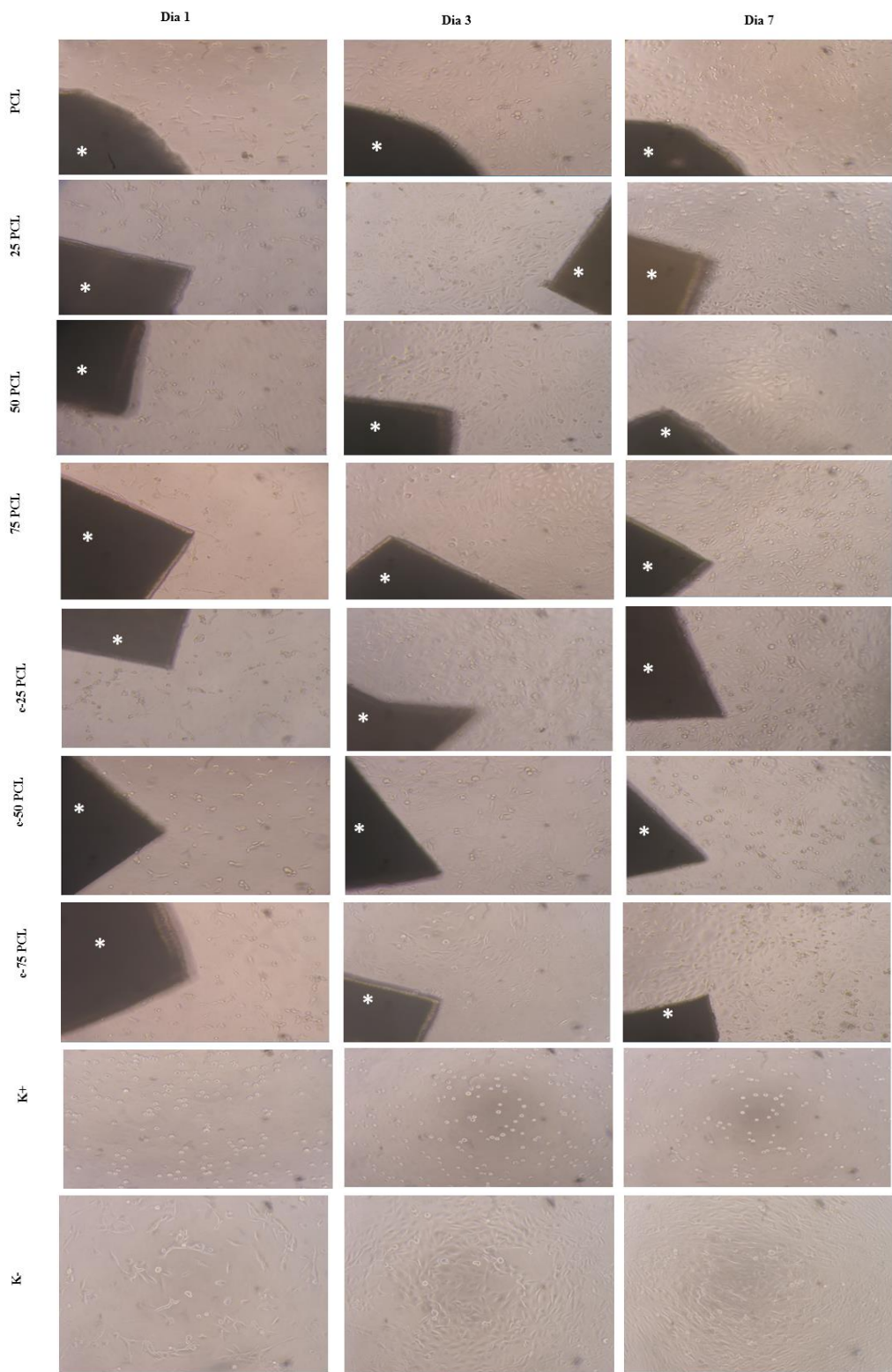
Analisando os resultados verifica-se que todos os *scaffolds* apresentam uma boa adesão celular, após 7 dias, sendo que a percentagem de células viáveis é superior a 60 %.

É ainda visível que as células apresentam respostas semelhantes quando colocadas em contacto direto com os materiais, sugerindo que a concentração de GelMA e a técnica de fabrico não têm influência na biocompatibilidade destes materiais.

Tendo em conta os resultados obtidos, conclui-se que os *scaffolds* desenvolvidos poderão ser extremamente promissores na regeneração de tecidos vasculares, revelando-se produtos biocompatíveis.

De forma a comprovar o sucesso dos materiais poliméricos desenvolvidos, apresenta-se ainda na Figura 4.15 as fotografias captadas por um microscópio ótico obtidas para os diferentes *scaffolds* sintetizados e para os controlos negativo e positivo.

Capítulo 4 – Resultados e Discussão



**Figura 4.15** Fotografias microscópicas das células de fibroblastos humanos quando em contacto com diferentes *scaffolds* (\*), durante um período de incubação de 1, 3 e 7 dias. K<sup>+</sup> diz respeito ao controlo positivo e K<sup>-</sup> ao controlo negativo.

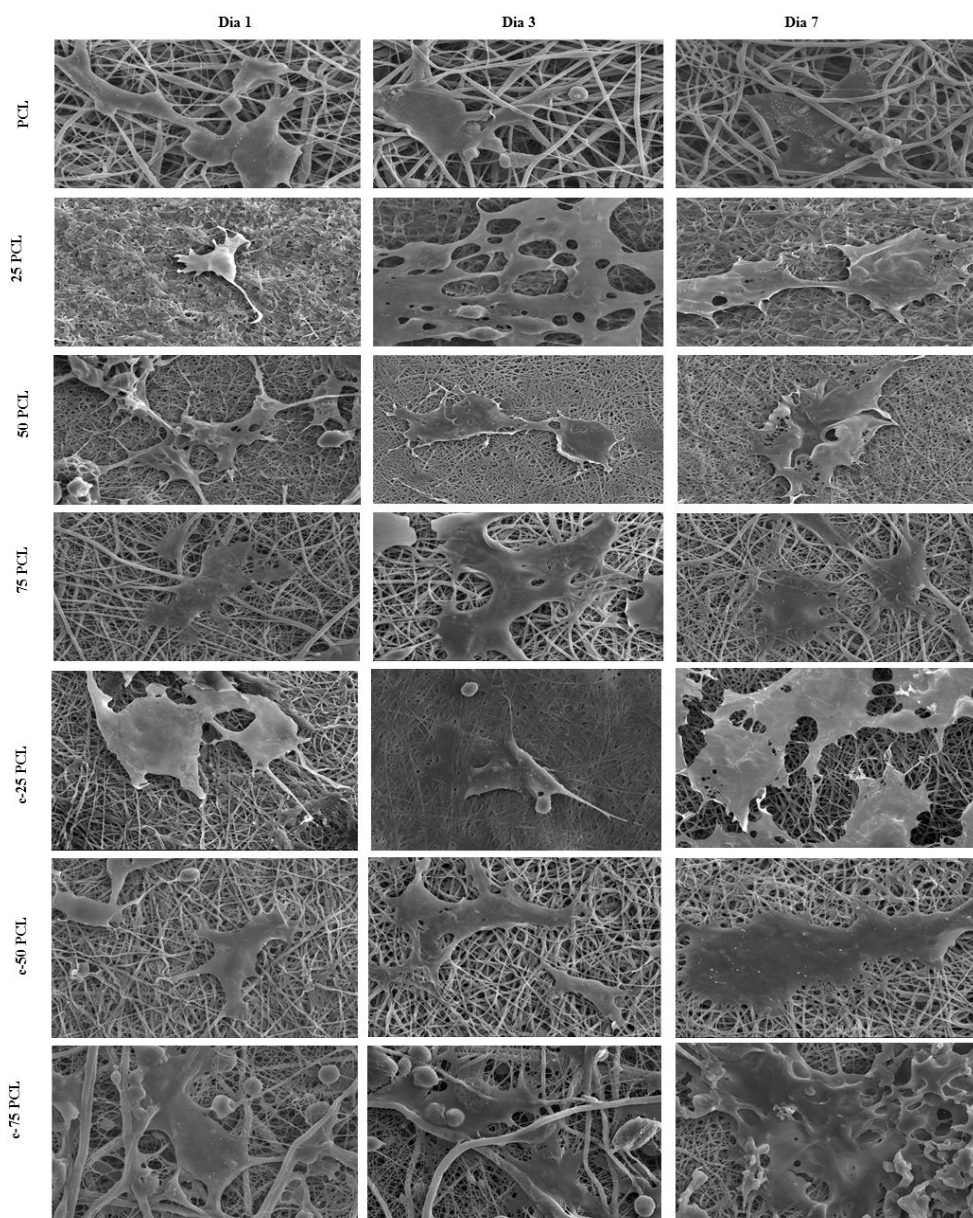
Analisando os resultados, constata-se que durante 7 dias, os fibroblastos em contacto com os materiais estudados, apresentam uma estrutura fusiforme indicando que as células foram capazes de proliferar, permanecendo vivas, como acontece no controlo negativo (K<sup>-</sup>),

**Capítulo 4 – Resultados e Discussão**

contrariamente ao que acontece no controlo positivo ( $K^+$ ) em que as células exibem uma forma esférica ou seja, são células mortas.

A adesão dos fibroblastos às estruturas poliméricas foi também investigada. Na Figura 4.16 são apresentadas as imagens SEM utilizadas para caracterizar a adesão dos fibroblastos dermais humanos à superfície dos materiais.

Analisando os resultados obtidos constata-se que, de facto, os fibroblastos emitem prolongamentos aderindo à superfície dos *scaffolds*. No final de 7 dias a adesão das células é visível e, em alguns casos, é possível observar a penetração dos fibroblastos nos materiais.



**Figura 4.16** Fotografias de SEM da cultura celular de fibroblastos humanos na presença dos *scaffolds* durante períodos de 1, 3 e 7 dias.

## CAPÍTULO 5 – CONCLUSÕES E TRABALHO FUTURO

### 5.1. Conclusões gerais

O presente trabalho teve como objetivo a preparação de membranas fibrosas compostas por gelatina metacrilamida (GelMA)/policaprolactona com vista a regeneração de tecido vascular.

O trabalho realizado consistiu em duas estratégias experimentais: **1)** produção de membranas compósitas nanofibrosas compostas por PCL e GelMA utilizando a técnica *electrospinning* por *blending*, onde há combinação de ambos os polímeros, e **2)** produção de membranas nanofibrosas compostas por PCL e GelMA utilizando a técnica *electrospinning coaxial*, onde as fibras resultantes apresentam uma estrutura do tipo *core-shell*, com um núcleo de PCL e uma “casca” de GelMA.

Em ambas as estratégias foram produzidas membranas poliméricas com diferentes proporções de GelMA, tendo estas sido submetidas a um processo de fotoreticulação, após a adição do fotoiniciador Irgacure® 2959.

A primeira conclusão a tirar dos resultados apresentados neste trabalho é que o processo de *electrospinning*, em ambas as abordagens experimentais, foi realizado com sucesso, demonstrando a capacidade de produção de *scaffolds* de PCL, GelMA e PCL/GelMA a partir desta técnica.

Após o processo de fotoreticulação, por observação a olho nu, verifica-se que a principal diferença entre os *scaffolds* produzidos reside na coloração, dependente da concentração de GelMA que constitui cada membrana. Assim, conclui-se que as membranas poliméricas compostas por maiores proporções de GelMA apresentam um tom mais amarelado.

A morfologia das membranas foi avaliada através da técnica de microscopia eletrónica de varrimento (SEM), de onde se constatou que a superfície das fibras fotoreticuladas, produzidas por *electrospinning* por *blending*, se encontra mais degradada quando a concentração de GelMA é mais elevada. No caso das fibras *coaxiais* verifica-se que o processo de fotoreticulação não vai alterar significativamente a morfologia das fibras e, que,

## Capítulo 5 – Conclusões e Trabalho Futuro

apesar das membranas ostentarem composições, distintas não se assinalam aspetos dispare na morfologia das suas superfícies. A técnica SEM permitiu ainda determinar os diâmetros médios das fibras sintetizadas. Desta análise pode afirmar-se que as fibras produzidas por *electrospinning* coaxial exibem diâmetros menores do que as fibras produzidas por *electrospinning* por *blending*. Adicionalmente, a análise SEM permitiu comprovar a eficiência do processo de fotoreticulação, mostrando que as fibras que não foram submetidas ao processo de fotoreticulação, depois de incubadas em PBS durante 3 dias, apresentavam uma superfície mais degradada quando comparadas com as fibras fotoreticuladas.

As análises de FTIR permitiu identificar a presença dos dois polímeros utilizados nas fibras sintetizadas. Este estudo foi ainda de encontro aos resultados obtidos na técnica SEM, garantindo que a gelatina presente nas fibras estava, de facto, reticulada.

O estudo da perda de massa garantiu, uma vez mais, o sucesso do processo de fotoreticulação. De acordo com este teste, todos os *scaffolds* fotoreticulados apresentam menor perda de massa que os respetivos controlos (não sujeitos ao processo de fotoreticulação) sendo esta perda mais visível quanto maior for a proporção de gelatina. Os resultados mostram ainda que os *scaffolds* coaxiais apresentam uma perda de massa mais elevada que os *scaffolds* produzidos por *blending*, explicado pela estrutura *core-shell* apresentada pelos primeiros.

A determinação dos ângulos de contacto dinâmicos demonstrou que o *scaffold* de PCL exibia um carácter marcadamente hidrofóbico, contrariamente às membranas de GelMA que evidenciam um carácter hidrofílico, não muito acentuado devido à modificação da gelatina com MAA. As fibras produzidas por *electrospinning* por *blending* sugerem que todos os *scaffolds* compósitos produzidos são bastante hidrofílicos.

Relativamente aos estudos de hemocompatibilidade, estes demonstraram que o *scaffold* composto por PCL apresenta uma menor tendência para formar trombos. Todas as membranas compostas por GelMA são trombogénicas, sendo a formação de trombos mais elevada no caso das fibras coaxiais. Os resultados obtidos sugerem que a presença de GelMA nos *scaffolds* induz a formação de trombos. Tal poderá ser explicado pelos processos de funcionalização e fotoreticulação aos quais a gelatina é submetida. A avaliação do carácter hemolítico sugere que apenas o *scaffold* composto por 50 GelMA e produzido pela técnica *electrospinning* por *blending* apresenta um carácter ligeiramente hemolítico. As restantes estruturas poliméricas apresentam um índice hemolítico inferior a 2 % não induzindo, por isso, hemólise do sangue, mostrando-se promissores na regeneração de vasos sanguíneos.



## Capítulo 5 – Conclusões e Trabalho Futuro

A biocompatibilidade *in vitro* foi investigada, através da realização de estudos de viabilidade celular com fibroblastos dermais. Os resultados obtidos sugerem que todos os *scaffolds* produzidos não são citotóxicos e apresentam uma boa adesão celular. A técnica SEM permitiu observar as células em contacto com as membranas, comprovando a adesão e proliferação celular.

Em suma, os resultados apresentados mostram que os *scaffolds* produzidos com base na combinação de hidrogéis foto-polimerizáveis e matrizes fibrosas eletrofiadas possuem elevado potencial para o uso em enxertos vasculares.

### 5.2. Trabalho Futuro

O trabalho realizado permitiu responder ao principal desafio proposto, que foi o desenvolvimento de *scaffolds* compósitos fotoreticulados compostos por PCL e GelMA com vista à regeneração de tecidos vasculares. No entanto, há inúmeras questões a resolver, referindo-se seguidamente alguns potenciais tópicos para investigar em trabalhos futuros. Destaque para:

- Avaliar o potencial dos *scaffolds* produzidos como sistemas de transporte e libertação controlada de fármaco. A formação de trombos no biomaterial pode bloquear o fluxo sanguíneo. Para contornar este problema poderão ser desenvolvidos *scaffolds* com ação farmacológica, que libertem fármacos capazes de reduzir os processos de coagulação.
- Investigar a resistência, o alongamento e a tração destas amostras, de forma a verificar se estas têm as propriedades mecânicas necessárias para suportar os movimentos relacionados com o bombeamento do sangue.
- Realização de mais testes de hemocompatibilidade e biocompatibilidade *in vitro* de forma a serem obtidos resultados mais fiáveis, garantindo a segurança da utilização dos *scaffolds* produzidos como enxertos vasculares. Os testes de hemólise deveriam ser efetuados por contacto indireto, completando os testes realizados por contacto direto, a fim de determinar se as substâncias libertadas pelo material causam hemólise.
- Realização de testes de biocompatibilidade *in vivo*. Desta forma seria possível assegurar a utilização dos materiais na regeneração dos vasos, afastando as hipóteses de possíveis inflamações e trombozes.

### ***Capítulo 5 – Conclusões e Trabalho Futuro***

- Em estudos mais avançados, e confirmando-se a biocompatibilidade do material, poderiam ser incorporados, nos *scaffolds*, fatores de crescimento e realizar testes *in vivo*. Ao fim de algum tempo, deveria observar-se se houve efetivamente a regeneração do tecido.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Alcobia, D. de S. (2013). *Produção de nanofibras alinhadas de polímeros biodegradáveis para crescimento e regeneração de células neurais*. Dissertação para a obtenção de Grau de Mestre, Universidade de São Paulo, Brasil.

Alves, P., Cardoso, R., Correia, T.R., Antunes, B.P., Correia, I.J. & Ferreira, P. (2014). Surface modification of polyurethane films by plasma and ultraviolet light to improve haemocompatibility for artificial heart valves. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* **113**, 25–32.

Asti, A. & Gioglio, L. (2014). Natural and synthetic biodegradable polymers: different scaffolds for cell expansion and tissue formation. *The International journal of artificial organs* **37**, 187–205.

BaoLin, G. & MA, X.P. (2014). Synthetic biodegradable functional polymers for tissue engineering: a brief review. *Science China Chemistry* **4**, 490–500.

Barbanti, S.H., Zavaglia, C.A.C. & Duek, E.A.R. (2005). Polímeros Bioreabsorvíveis na Engenharia de Tecidos. *Ciência e Tecnologia* **15**, 13–21.

Braune, S., Grunze, M., Straub, A. & Jung, F. (2013). Are there sufficient standards for the in vitro hemocompatibility testing of biomaterials?. *Biointerphases* **8**, 33.

Catto, V., Farè, S., Freddi, G. & Tanzi, M.C. (2014). Vascular Tissue Engineering: Recent Advances in Small Diameter Blood Vessel Regeneration. *ISRN Vascular Medicine* **2014**, 1–27.

Chan, B.P. & Leong, K.W. (2008). Scaffolding in tissue engineering: General approaches and tissue-specific considerations. *European Spine Journal* **17**, 67–79.

Chen, Y.C., Lin, R.Z., Qi, H., Yang, Y., Bae, H., Melero-Martin, J.M., Khademhosseini, A. (2012). Functional human vascular network generated in photocrosslinkable gelatin methacrylate hydrogels. *Advanced Functional Materials* **22**, 2027–2039.

Chen, Z., Cao, L., Wang, L., Zhu, H. & Jiang, H. (2013). Effect of fiber structure on the properties of the electrospun hybrid membranes composed of poly(E-caprolactone) and gelatin. *Journal of Applied Polymer Science* **127**, 4225–4232.

Chong, E.J., Phan, T.T., Lim, I.J., Zhang, Y.Z., Bay, B.H., Ramakrishna, S., Lim, C. T. (2007). Evaluation of electrospun PCL/gelatin nanofibrous scaffold for wound healing and layered dermal reconstitution. *Acta Biomaterialia* **3**, 321–330.

Coimbra, P., Gil, M.H. & Figueiredo, M. (2014). Tailoring the properties of gelatin films for drug delivery applications: Influence of the chemical cross-linking method. *International Journal of Biological Macromolecules* **70**, 10–19.

Correia, T.R., Ferreira, P., Vaz, R., Alves, P., Figueiredo, M.M., Correia, I.J., Coimbra, P.

### *Referências Bibliográficas*

- (2016). Development of UV cross-linked gelatin coated electrospun poly(caprolactone) fibrous scaffolds for tissue engineering. *International journal of biological macromolecules*.
- Dhandayuthapani, B., Varghese, S.H., Aswathy, R.G., Yoshida, Y., Maekawa, T. & Sakthikumar, D. (2012). Evaluation of antithrombogenicity and hydrophilicity on Zein-SWCNT electrospun fibrous nanocomposite scaffolds. *International Journal of Biomaterials* **2012**.
- Dhandayuthapani, B., Yoshida, Y., Maekawa, T. & Kumar, D.S. (2011). Polymeric scaffolds in tissue engineering application: A review. *International Journal of Polymer Science* **2011**.
- Drexler, J.W. & Powell, H.M. (2011). Regulation of electrospun scaffold stiffness via coaxial core diameter. *Acta Biomaterialia* **7**, 1133–1139.
- Elnakady, Y.A., Al Rez, M.F., Fouad, H., Abuelreich, S., Albarrag, A.M., Mahmood, A., Fouad, H., Abuelreich, S., Albarrag, A. M., Mahmood, A., Alothman, O. Y., Elsarnagawy, T., Ansari, S. G. (2015). Vascular Tissue Engineering Using Polycaprolactone Nanofibrous Scaffolds Fabricated via Electrospinning. *Science of Advanced Materials* **7**, 407–413.
- Feng, B., Tu, H., Yuan, H., Peng, H. & Zhang, Y. (2012). Acetic-acid-mediated miscibility toward electrospinning homogeneous composite nanofibers of GT/PCL. *Biomacromolecules* **13**, 3917–3925.
- Fisher, J.P., Mikos, A.G. & Bronzino, J.D. (2007). *Tissue engineering*. CRC Press/Taylor & Francis Group. ISBN: 9780849318122
- Fisher, J.P. & Reddi, A.H. (2003). *Topics in Tissue Engineering*. University of Oulu, Finland.
- Fu, W., Liu, Z., Feng, B., Hu, R., He, X., Wang, H., *et al.* (2014). Electrospun gelatin/PCL and collagen/PLCL scaffolds for vascular tissue engineering. *International Journal of Nanomedicine* **9**, 2335-2344.
- Gautam, S., Dinda, A.K. & Mishra, N.C. (2013). Fabrication and characterization of PCL/gelatin composite nanofibrous scaffold for tissue engineering applications by electrospinning method. *Materials Science and Engineering C Elsevier B.V.* **33**, 1228–1235.
- Gualandi, C. (2011). *Porous Polymeric Bioresorbable Scaffolds for Tissue Engineering*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg. ISBN: 978-3-642-19271-5
- Gunatillake, P.A. (2003). Biodegradable Synthetic Polymers for Tissue Engineering. *European Cells and Materials* **5**, 1–16.
- Andrades, J. A. (2013). *Regenerative Medicine and Tissue Engineering*. InTech. ISBN: 978-953-51-1108-5
- Haider, A., Haider, S. & Kang, I.-K. (2015). A comprehensive review summarizing the effect of electrospinning parameters and potential applications of nanofibers in biomedical and biotechnology. *Arabian Journal of Chemistry*.
- Hasan, A., Memic, A., Annabi, N., Hossain, M., Paul, A., Dokmeci, M.R., Dehghani, F., Khademhosseini, A. (2014). Electrospun scaffolds for tissue engineering of vascular grafts. *Acta Biomaterialia* **10**, 11–25.

### *Referências Bibliográficas*

- Hoque, M.E., Nuge, T., Yeow, T.K., Nordin, N. & Prasad, R.G.S. V. (2014). Gelatin Based Scaffolds for Tissue Engineering – a Review. *Polymers Research Journal* **9**, 15-32.
- Ikada, Y. (2006). Challenges in tissue engineering. *Journal of the Royal Society Interface* **3**, 589–601.
- ISO 10993-4:2002 - Biological evaluation of medical devices -- Part 4: Selection of tests for interactions with blood. (1999).
- Jacob, V.P. (2011). *Estudo da influência da idade dos fibroblastos em cultura na resposta ao 17 $\beta$  -estradiol*. Dissertação para a obtenção de Grau de Mestre, Universidade da Beira Interior, Portugal.
- Javerliat, I., Goëau-Brissonnière, O., Sivadon-Tardy, V., Coggia, M. & Gaillard, J.L. (2007). Prevention of Staphylococcus aureus graft infection by a new gelatin-sealed vascular graft prebonded with antibiotics. *Journal of Vascular Surgery* **46**, 1026–1031.
- Ji, W., Sun, Y., Yang, F., Van Den Beucken, J.J.J.P., Fan, M., Chen, Z., Jansen, J.A., (2011). Bioactive electrospun scaffolds delivering growth factors and genes for tissue engineering applications. *Pharmaceutical Research* **28**, 1259–1272.
- Khang, G. (2012). *Handbook of Intelligent Scaffolds for Tissue Engineering and Regenerative Medicine*. Pan Stanford. Korea. ISBN: 13: 978-9-81426-786-1.
- Klotz, B.J., Gawlitta, D., Rosenberg, A.J.W.P., Malda, J. & Melchels, F.P.W. (2016). Gelatin-Methacryloyl Hydrogels: Towards Biofabrication-Based Tissue Repair. *Trends in Biotechnology* Elsevier Ltd **34**, 394–407.
- Kodama, K., Doi, O., Higashiyama, M. & Yokouchi, H. (1997). Pneumostatic effect of gelatin-resorcinol formaldehyde-glutaraldehyde glue on thermal injury of the lung: An experimental study on rats. *European Journal of Cardio-thoracic Surgery* **11**, 333–337.
- Kong, J. & Yu, S. (2007). Fourier Transform Infrared Spectroscopic Analysis of Protein Secondary Structures Protein FTIR Data Analysis and Band Assignment. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica* **39**, 549–559.
- Koombhongse, S., Liu, W. & Reneker, D.H. (2001). Flat polymer ribbons and other shapes by electrospinning. *Journal of Polymer Science Part B*. **39**, 2598–2606.
- Li, W. & Tuan, R.S. (2009). Fabrication and Application of Nanofibrous Scaffolds in Tissue Engineering. *Current Protocols in Cell Biology* **25**, 1–15.
- Lu, T., Li, Y. & Chen, T. (2013). Techniques for fabrication and construction of three-dimensional scaffolds for tissue engineering. *International Journal of Nanomedicine* **8**, 337–350.
- Lu, Y., Huang, J., Yu, G., Cardenas, R., Wei, S., Wujcik, E.K., et al. (2016). Coaxial electrospun fibers: applications in drug delivery and tissue engineering. *Nanomedicine and Nanobiotechnology* **8**, 654–677.
- Maitz, M.F. (2015). Applications of synthetic polymers in clinical medicine. *Biosurface and Biotribology* **1**, 161–176.

### **Referências Bibliográficas**

- Mano, J.F., Silva, G., Azevedo, H.S., Malafaya, P.B., Sousa, R., Silva, S.S., Boesel, L. F., Oliveira, J. M., Santos, T. C., Marques, P., Neves, N. M., Reis, R. L. (2007). Natural origin biodegradable systems in tissue engineering and regenerative medicine: present status and some moving trends. *Journal of the Royal Society Interface* **4**, 999–1030.
- McKenna, K.A., Hinds, M.T., Sarao, R.C., Wu, P.C., Maslen, C.L., Glanville, R.W., Babcock, D., Gregory, K.W. (2012). Mechanical property characterization of electrospun recombinant human tropoelastin for vascular graft biomaterials. *Acta Biomaterialia* **8**, 225–233.
- Mohy, M.S., Soliman, E.A., Hashem, A.I. & Tamer, T.M. (2012). Infrared Spectroscopy - Life and Biomedical Sciences. InTech. ISBN: 978-953-51-0538-1
- Monteiro, G. (2007). Análise de Revestimentos Orgânicos por Espectroscopia de Infravermelho. Dissertação para a obtenção de Grau de Mestre, Universidade Técnica de Lisboa, Portugal.
- Murugesan, S., Xie, J. & Linhardt, R.J. (2008). Immobilization of heparin: Approaches and applications. *Current topics in medicinal chemistry* **8**, 80–100.
- Nair, L.S. & Laurencin, C.T. (2007). Biodegradable polymers as biomaterials. *Progress in Polymer Science (Oxford)* **32**, 762–798.
- O'Brien, F.J. (2011). Biomaterials & scaffolds for tissue engineering. *Materials Today* **14**.
- Papenburg, B.J. (2009). *Design strategies fo tissue engineering scaffolds*. PhD thesis, University of Twente, The Netherlands.
- Qi, P., Yang, Y., Maitz, F.M. & Huang, N. (2013). Current status of research and application in vascular stents. *Chinese Science Bulletin* **58**, 4362–4370.
- Ramakrishna, S. (2005). *An introduction to electrospinning and nanofibers*. World Scientific. ISBN: 9812564152
- Rose, J.B., Pacelli, S., El Haj, A.J., Dua, H.S., Hopkinson, A., White, L.J., *et al.* (2014). Gelatin-based materials in ocular tissue engineering. *Materials* **7**, 3106–3135.
- Ruvinov, E., Shandalov, Y., Levenberg, S. & Cohen, S. (2014). Principles of Cardiovascular Tissue Engineering. *Tissue Engineering* (pp. 627–683). Elsevier.
- Safaeijavan, R., Soleimani, M., Divsalar, A. & Eidi, A. (2014). Biological behavior study of gelatin coated PCL nanofiberous electrospun scaffolds using fibroblasts. *Journal of Paramedical Sciences* **5**, 67–73.
- Sankaran, K.K., Subramanian, A., Krishnan, U.M. & Sethuraman, S. (2015). Nanoarchitecture of scaffolds and endothelial cells in engineering small diameter vascular grafts. *Biotechnology Journal* **10**, 96–108.
- Santos, J.M.C. (2014). *Preparação de Bioadesivos a partir de Ácido Láctico*. Dissertação para a obtenção de Grau de Mestre, Universidade de Coimbra, Portugal.
- Serbo, J. V. & Gerecht, S. (2013). Vascular tissue engineering: biodegradable scaffold platforms to promote angiogenesis. *Stem cell research & therapy* **4**:8.

### **Referências Bibliográficas**

- Sewell-Loftin, M.K., Chun, Y.W., Khademhosseini, A. & Merryman, W.D. (2011). EMT-Inducing Biomaterials for Heart Valve Engineering: Taking Cues from Developmental Biology. *Journal of Cardiovascular Translational Research* **4**, 658–671.
- Shi, D. (2006). *Introduction to biomaterials*. Tsinghua University Press. Beijing. ISBN: 9787302108078
- Shi, X., Zhou, W., Ma, D., Ma, Q., Bridges, D., Ma, Y., *et al.* (2015). Electrospinning of Nanofibers and Their Applications for Energy Devices. *Journal of Nanomaterials* **2015**, 1–20.
- Simão, D., Pinto, C., Serra, M., Brito, C. & Alves, P.M. (2013). Sistemas de cultura 3D para diferenciação neural de células estaminais humanas. *Boletim de Biotecnologia* **4**, 17–20.
- Sravanthi, R. (2009). *Preparation and characterization of poly (  $\epsilon$  -caprolactone ) PCL scaffolds for tissue engineering applications* Preparation and characterization of poly (  $\epsilon$  -caprolactone ) PCL scaffolds for tissue engineering applications. Degree Of Master of Technology, National Institute of Technology, Rourkela.
- Stuart, B. (2004). *Infrared spectroscopy : fundamentals and applications*. J. Wiley. ISBN: 9780470854280
- Tan, W., Bonani, W. & Madhavan, K. (2010). Nanofibrous Materials for Vascular Tissue Engineering and Regeneration. *Nanotechnology in Tissue Engineering and Regenerative Medicine* (pp. 1–26). CRC Press. ISBN: 978-1-4398-0141-3
- Tanaka, A., Nagate, T. & Matsuda, H. (2005). Acceleration of Wound Healing by Gelatin Film Dressings with Epidermal Growth Factor. *Journal of Veterinary Medical Science* **67**, 909–913.
- Tong, X. & Bin-Jie, X. (2016). Preparation and characterization of coaxial electrospun polysulfone amide/polyurethane. *Journal of Industrial Textiles* 1–17.
- van Oeveren, W. (2013). Obstacles in Haemocompatibility Testing. *Scientifica* **2013**, 1–14.
- Vladkova, T.G. (2010). Surface engineered polymeric biomaterials with improved biocontact properties. *International Journal of Polymer Science* **2010**, 1–22.
- Wendorff, J.H., Agarwal, S. & Greiner, A. (2012). *Electrospinning*. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA Germany. Weinheim, Germany. ISBN: 9783527647705
- Yue, K., Trujillo-de Santiago, G., Alvarez, M.M., Tamayol, A., Annabi, N. & Khademhosseini, A. (2015). Synthesis, properties, and biomedical applications of gelatin methacryloyl (GelMA) hydrogels. *Biomaterials* **73**, 254–271.
- Zhang, Y., Ouyang, H., Chwee, T.L., Ramakrishna, S. & Huang, Z.M. (2005). Electrospinning of gelatin fibers and gelatin/PCL composite fibrous scaffolds. *Journal of Biomedical Materials Research - Part B Applied Biomaterials* **72**, 156–165.
- Zhang, Y.Z., Feng, Y., Huang, Z.-M., Ramakrishna, S. & Lim, C.T. (2006). Fabrication of porous electrospun nanofibres. *Nanotechnology* **17**, 901–908.

***Referências Bibliográficas***

Zhao, X., Lang, Q., Yildirimer, L., Lin, Z.Y., Cui, W., Annabi, N., Ng, K. W., Dokmeci, M, R., Ghaemmaghami, A. M., Khademhosseini, A. (2016). Photocrosslinkable Gelatin Hydrogel for Epidermal Tissue Engineering. *Advanced Healthcare Materials* **5**, 108–118.