

Sabrina da Silva Mendes

Desenvolvimento de Membranas Assimétricas Eletrofiadas para Regeneração da Pele

Dissertação do Mestrado Integrado em Engenharia Química orientada pela Doutora Paula Cristina Nunes Ferreira Cavalinho e apresentada ao Departamento de Engenharia Química da Faculdade de Ciências e Tecnologias da Universidade de Coimbra.

Setembro de 2017



Sabrina da Silva Mendes

Desenvolvimento de Membranas Assimétricas Eletrofiadas para Regeneração da Pele

Dissertação do Mestrado Integrado em Engenharia Química, apresentada ao Departamento de Engenharia Química da Faculdade de Ciências e Tecnologias da Universidade de Coimbra

Supervisores

Doutora Paula Cristina Nunes Ferreira Cavalinho

Instituições

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

Coimbra, Setembro de 2017



UNIVERSIDADE DE COIMBRA

*Para além da curva da estrada
Talvez haja um poço, e talvez um castelo,
E talvez apenas a continuação da estrada.
Não sei nem pergunto.
Enquanto vou na estrada antes da curva
Só olho para a estrada antes da curva,
Porque não posso ver senão a estrada antes da curva.
De nada me serviria estar olhando para outro lado
E para aquilo que não vejo.
Importemo-nos apenas com o lugar onde estamos.
Há beleza bastante em estar aqui e não noutra parte qualquer.
Se há alguém para além da curva da estrada,
Esses que se preocupem com o que há para além da curva da
estrada.
Essa é que é a estrada para eles.
Se nós tivermos que chegar lá, quando lá chegarmos saberemos.
Por ora só sabemos que lá não estamos.
Aqui há só a estrada antes da curva, e antes da curva
Há a estrada sem curva nenhuma.*

Alberto Caeiro

Agradecimentos

Na realização deste trabalho tive muitos tipos de ajuda. Todas igualmente importantes.

Gostaria de agradecer em primeiro lugar à Doutora Paula Ferreira, por lançar o tema e me permitir trabalhar nele. Pela paciência, pela ajuda e acima de tudo pela compreensão em momentos que me foram mais difíceis.

À Doutora Patrícia Alves pela ajuda e acompanhamento na realização dos testes de hemocompatibilidade.

À Doutora Patrícia Coimbra pela disponibilidade, simpatia e simplicidade que sempre me demonstrou quando precisei da sua ajuda.

À Sandra pela amizade ao longo dos anos, pela paciência e generosidade. Pelo interesse que sempre demonstrou e por querer dar o seu contributo no que lhe fosse possível.

Um agradecimento a todos os meus amigos, que me ajudaram de tantas maneiras. Pela verdadeira amizade, por insistirem na minha companhia e por compreenderem e aceitarem as minhas muitas ausências. Não os identifico aqui, mas decerto que se reconhecerão.

Queria agradecer em especial à Diana. Minha colega de casa e companheira desta jornada. Obrigada pela amizade, pela companhia em todas as horas de estudo, por sofrer com as minhas derrotas e pela alegria que demonstrou com as minhas vitórias. Um obrigado especial pela compreensão na reta final, por respeitar os meus silêncios, por me dizer muitas vezes o que não queria ouvir, pelo incentivo silencioso, por entender os meus dias menos bons. Por todas as coisas que devíamos e não devíamos ter feito, por todos os momentos que vivemos e pelo caminho que percorremos juntas.

Por último quero agradecer à minha família. À minha avó por sofrer por mim e me desejar o melhor em todos os momentos. Ao meu irmão pelas brincadeiras e conversas de fim-de-semana que me incentivavam e distraíam. Aos meus pais por serem o que são. Por me proporcionarem com tanto esforço esta oportunidade, pelos valores que me transmitiram. Pelo amor incondicional, pela amizade, proximidade, respeito e carinho com que sempre me trataram. Por aceitarem e incentivarem as minhas escolhas sem nunca duvidarem de mim.

Obrigada!

Resumo

A pele cobre toda a extensão do corpo e é um órgão de relativa complexidade, que tem como função principal atuar como uma barreira protetora entre o meio exterior e os órgãos e tecidos internos. É facto que está diariamente exposta e portanto é um alvo relativamente fácil de danificar e a sua integridade pode ser afetada por fatores como disfunções genéticas, traumas agudos, feridas crónicas ou intervenções cirúrgicas, sendo a razão mais comum os traumas térmicos. O tratamento passa portanto por revestir as feridas da forma mais adequada possível para promover a sua cicatrização e alcançar a cura.

Existem já diversos revestimentos de feridas, no entanto há ainda muitos materiais e métodos a explorar, pelo que os cientistas continuam a investigar novos sistemas ou a melhorar os já existentes. Face ao referido, uma solução passa pela Engenharia de Tecidos e pela formulação de membranas que possam ser aplicadas como revestimentos ideais de feridas.

O foco do presente trabalho foi o desenvolvimento de membranas assimétricas eletrofiadas para a regeneração de tecidos, usando materiais que possam fornecer as condições necessárias para fixação e proliferação celular, mimetizando as funções naturais da pele conduzindo à sua regeneração. Foram desenvolvidas membranas assimétricas fibrosas, onde a camada base é composta por policaprolactona (PCL) e poliácido láctico (PLA) e a segunda camada por diferentes formulações de PCL e gelatina funcionalizada com Anidrido Metacrílico (MAA), para torná-la fotoreticulável. Estas foram então produzidas por diferentes abordagens e metodologias da técnica *Electrospinning*. Na primeira abordagem foram produzidas as camadas base por *electrospinning* de mistura e procedeu-se à modificação da gelatina. Na segunda e terceira abordagem foram respetivamente produzidas as membranas assimétricas, por *electrospinning* de mistura e coaxial. Através do *electrospinning* coaxial pretendeu-se produzir fibras com uma estrutura do tipo núcleo e casca, em que o núcleo é constituído por PCL e a casca por GelMA.

As membranas assimétricas desenvolvidas foram então fotoreticuladas por irradiação de luz UV, reticulando a gelatina previamente funcionalizada e posteriormente foram caracterizadas quanto às suas propriedades químicas, morfológicas e biológicas. O recurso ao ATR-FTIR permitiu identificar a presença das bandas típicas da gelatina e da PCL na segunda camada da membrana assimétrica. O teste da perda de massa revelou o sucesso da fotoreticulação, visto que esta foi menos evidente nas

membranas fotoreticuladas do que nas suas precursoras originais. Os ângulos de contacto dinâmicos foram também avaliados e mostraram que a membrana base é marcadamente hidrofóbica, por oposição às restantes que exibem no geral um carácter hidrofílico.

A estrutura da superfície das membranas é, como se esperava, desorganizada devido às técnicas pelas quais foram produzidas, como se comprova pela análise das imagens obtidas por SEM. Esta análise permitiu também avaliar a influência do teor de GelMA nas fibras, pois quanto mais elevada é a quantidade de PCL mais fundido é o aspeto das fibras. Além disso, revelou também que por *electrospinning* de mistura os diâmetros das fibras são menores que os das suas homólogas produzidas por *electrospinning* coaxial.

Os testes de hemocompatibilidade revelaram que todas as membranas induzem a formação de trombos, sendo que esta foi mais notória na membrana com 100 % GelMA. A dissolução da gelatina nesta membrana fez com que a camada base constituída por polímeros hidrofóbicos promovesse a formação desses trombos. Segundo os resultados obtidos, as membranas mais trombogénicas são as produzidas por *electrospinning* coaxial. Quanto ao índice hemolítico, apenas a membrana com 100 % GelMA apresenta um carácter ligeiramente hemolítico, sendo as restantes não hemolíticas.

Finalmente os estudos de biocompatibilidade demonstraram que as membranas assimétricas produzidas promoveram uma boa adesão e proliferação dos fibroblastos da derme. No que toca à atividade antimicrobiana os resultados demonstraram que os materiais por si não apresentam potencial bactericida, visto que as membranas não inibiram a atividade da bactéria à qual tiveram contacto, deixando-a proliferar. Este problema pode ser futuramente contornado com a adição de um antibiótico.

Em suma, ainda que seja necessária uma análise mais aprofundada, os resultados fazem crer que as membranas desenvolvidas neste trabalho são boas candidatas para a aplicação pretendida.

PALAVRAS-CHAVE: *Electrospinning*, membranas assimétricas, policaprolactona, gelatina, fotoreticulação.

Abstract

Skin covers the whole extension of the human body and it's an organ of relative complexity, whose biggest function is to act as a protective barrier between the outer environment and the internal organs and tissues. It is a fact that skin is exposed every day and therefore is easily damaged and that its integrity could be affected by several stress factors like genetic anomalies, acute trauma, chronic wounds or surgical interventions, with the more common one being thermal trauma. The treatment therefore involves coating the wound in the most suitable way to trigger the healing process so that a full recovery can be achieved.

There is already a lot of diversity in wound dressings, however there are still several materials and methods yet to be explored, and scientists are still researching new systems or improving the already existing ones. Due to the described above, one solution may involve Tissue Engineering and the use of membranes which can be applied as ideal wound dressings.

The focus of this work was the development of asymmetrical electrospun membranes for tissue regeneration, using materials that could provide the required conditions for cell attachment and proliferation, mimicking the skin's natural functions leading to its regeneration. Asymmetrical fibrous membranes were developed, in which the base layer is composed of polycaprolactone (PCL) and polylactic acid (PLA), and the second layer is composed of PCL and gelatin functionalized with methacrylic anhydride (MAA), so that it could be photopolymerized. These membranes were produced via distinct approaches and methodologies of the *electrospinning* technique. In the first approach the base layers were synthesized by blending electrospinning and at the same time the gelatin was modified. In the second and third approaches, the asymmetrical membranes were produced respectively by blending and coaxial *electrospinning*. The main goal for the use of coaxial *Electrospinning* was to produce fibers with core and shell structure, in which the core is composed of PCL and the shell of GelMA.

The asymmetrical membranes were then photocrosslinked by UV light irradiation, crosslinking the previously modified gelatin. Afterwards, all the membranes were characterized by their chemical, morphological and biological properties.

The ATR-FTIR analysis made it possible to identify the presence of both polymers used on the second layer of the asymmetrical membrane composition. The weight loss study demonstrated the

success of the photocrosslinking process, evidenced by the fact that it was less obvious in the photocrosslinked membranes when compared to their original precursors. The dynamic water contact angle measurements were also assessed and they evidenced the hydrophobic character of the layer base, as opposed to the others that exhibit a hydrophilic character.

As expected, the SEM analysis showed that the surface structure of the membranes is disorganized, due to the technique used to produce them. Through this analysis the influence of the GelMA ratio on the fibers was appraised as well, showing that the the higher the percentage of PCL the more melted the fibers will appear. Besides that, it was revealed that the fiber diameters are bigger in the membranes produced by blending *electrospinning* than their homologous ones produced by coaxial *electrospinning*.

The hemocompatibility tests revealed that all membranes are thrombogenic, with higher intensity in the membrane with 100% GelMA. The dissolution of the gelatin in this membrane increased thrombogenicity allowing exposure of the base layer of hydrophobic polymer. According to the results, coaxial *electrospinning* produces membranes with higher thrombogenicity. As for the hemolytic index, only the membrane with 100% GelMA revealed a slightly hemolytic character, the remaining ones being non-hemolytic.

Finally, the biocompatibility studies revealed that the asymmetrical membranes promoted a good attachment and proliferation of dermal fibroblasts. With respect to antimicrobial activity, the results showed that the materials were not bactericidal, since the membranes did not inhibit the activity of the bacteria they came in contact with, instead allowing them to proliferate. This problem could be worked around in the future with the addition of an antibiotic.

In summary, even through a more in-depth analysis is required, the results suggest that the membranes developed are potential candidates for the intended application.

KEYWORDS: Electrospinning, asymmetrical membranes, polycaprolactone, gelatin, photocrosslinking.

Índice

AGRADECIMENTOS	I
RESUMO	III
ABSTRACT	V
ÍNDICE	VII
ÍNDICE DE TABELAS	XI
ÍNDICE DE FIGURAS	XIII
ACRÓNIMOS	XVII
1. INTRODUÇÃO	1
1.1. MOTIVAÇÃO	1
1.2. TIPOS DE FERIDAS	2
1.2.1. <i>Classificação de Feridas</i>	3
1.2.2. <i>Avaliação das Feridas</i>	3
1.2.3. <i>Processo de Cicatrização</i>	3
1.3. BIOMATERIAIS E ENGENHARIA DE TECIDOS.....	4
1.3.1. <i>Membranas</i>	7
1.3.2. <i>Materiais Constituintes das Membranas</i>	7
1.3.3. <i>Tipos de Membranas</i>	9
1.3.3.1. Membranas Porosas.....	9
1.3.3.2. Membranas Compostas por Hidrogéis	10
1.3.3.3. Membranas Fibrosas	10
1.3.3.4. Membranas à Base de Microesferas	11
1.3.4. <i>Estratégias de Engenharia de Tecidos</i>	11
1.4. MEMBRANAS ASSIMÉTRICAS PARA REVESTIMENTO DE FERIDAS.....	12
1.4.1. <i>Membranas Assimétricas como Revestimento Ideal para Feridas</i>	14
1.5. POLÍMEROS BIODEGRADÁVEIS DE BASE NATURAL/SINTÉTICA.....	16
1.5.1. <i>Polímeros Naturais</i>	16
1.5.2. <i>Polímeros Sintéticos</i>	18
1.6. MÉTODOS DE PRODUÇÃO DE MEMBRANAS ASSIMÉTRICAS.....	20
1.6.1. <i>Electrospinning</i>	20

1.6.1.1.	Electrospinning Coaxial vs Blending.....	21
1.6.1.2.	Parâmetros do Electrospinning.....	22
1.7.	PROPRIEDADES FUNDAMENTAIS DAS MEMBRANAS ASSIMÉTRICAS PARA REGENERAÇÃO DE TECIDOS	23
1.7.1.	<i>Morfologia e Porosidade das Membranas</i>	24
1.7.2.	<i>Intumescimento e Ângulos de Contacto</i>	24
1.7.3.	<i>Análise das Propriedades Mecânicas</i>	24
1.7.4.	<i>Atividade Antimicrobiana das Membranas</i>	25
1.7.5.	<i>Vascularização</i>	25
2.	OBJETIVOS EXPERIMENTAIS	27
2.1.	OBJETIVOS EXPERIMENTAIS	27
2.1.1.	<i>Abordagem experimental I</i>	27
2.1.2.	<i>Abordagem Experimental II</i>	28
2.1.3.	<i>Abordagem Experimental III</i>	28
3.	MATERIAIS E MÉTODOS.....	31
3.1.	MATERIAIS	31
3.2.	MÉTODOS.....	31
3.2.1.	<i>Modificação da Gelatina com Anidrido Metacrílico (Abordagem I)</i>	31
3.2.2.	<i>Preparação das Membranas Base de PCL/PLA (Abordagem I)</i>	32
3.2.3.	<i>Preparação das Membranas Assimétricas Compósitas de GelMA e PCL</i>	33
3.2.3.1.	Preparação das Membranas por Electrospinning de Mistura (Abordagem II).....	33
3.2.3.2.	Preparação das Membranas por Electrospinning Coaxial (Abordagem III).....	35
3.2.3.3.	Preparação das Membranas por Electrospinning por “blending”	36
3.2.4.	<i>Fotoreticulação das Membranas Assimétricas</i>	37
3.3.	CARACTERIZAÇÃO DAS MEMBRANAS ASSIMÉTRICAS	38
3.3.1.	<i>Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier com Reflexão Total Atenuada (ATR-FTIR)</i> 38	
3.3.2.	<i>Degradação in vitro/Estudos de Perda de Massa</i>	39
3.3.3.	<i>Determinação dos Ângulos de Contacto Dinâmicos</i>	39
3.3.4.	<i>Microscopia Eletrónica de Varrimento (SEM)</i>	39
3.3.5.	<i>Hemocompatibilidade</i>	40
3.3.5.1.	Avaliação da Trombogenicidade.....	40
3.3.5.2.	Determinação do Índice Hemolítico	41
3.3.6.	<i>Biocompatibilidade</i>	42
3.3.6.1.	Viabilidade celular	43

3.3.6.2.	Adesão celular	43
3.3.6.3.	Atividade antibacteriana	43
4.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	45
4.1.	DESENVOLVIMENTO DAS MEMBRANAS ASSIMÉTRICAS	45
4.2.	CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA POR ATR-FTIR	46
4.3.	ESTUDOS DE PERDA DE MASSA	53
4.4.	DETERMINAÇÃO DOS ÂNGULOS DE CONTACTO DINÂMICOS	55
4.5.	CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA POR MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARRIMENTO.....	58
4.6.	HEMOCOMPATIBILIDADE	64
4.6.1.	<i>Avaliação da Trombogenicidade</i>	65
4.6.2.	<i>Determinação do Índice Hemolítico</i>	66
4.7.	BIOCOMPATIBILIDADE	68
4.7.1.	<i>4.7.1 Viabilidade celular</i>	68
4.7.2.	<i>Adesão Celular</i>	69
4.7.3.	<i>Atividade Antimicrobiana</i>	72
5.	CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS FUTURAS	77
5.1.	CONCLUSÕES	77
5.2.	PERSPECTIVAS FUTURAS	80
6.	BIBLIOGRAFIA	81

Índice de Tabelas

Tabela 1.1 Substitutos dérmicos/epidérmicos.....	13
Tabela 3.1 Composição das membranas assimétricas, parâmetros associados e designações por electrospinning de mistura.*	34
Tabela 3.2 Composição das membranas assimétricas, parâmetros associados e designações por electrospinning coaxial.*	36
Tabela 3.3 Composição das membranas assimétricas, parâmetros associados e designações por <i>electrospinning</i> por “ <i>blending</i> ”.*	36
Tabela 4.1 Bandas características do espectro infravermelho das ligações amida.	46
Tabela 4.2 Bandas correspondentes à GelMA antes e depois do processo de fotoreticulação e após incubação em PBS*.....	46
Tabela 4.3 Diâmetros médios das fibras e respetivos desvios padrão.	63
Tabela 4.4 Percentagens médias da formação de coágulo na superfície das membranas, após 40 min em contacto com o sangue*.	65

Índice de Figuras

Figura 1.1 Representação esquemática dos principais estágios do processo de cicatrização.	4
Figura 1.2 Representação esquemática do processo do Electrospinning de mistura.	21
Figura 2.1 Representação esquemática do trabalho experimental.	29
Figura 3.1 Representação da reação da gelatina com Anidrido Metacrílico.....	32
Figura 3.2 Esquema real do processo de electrospinning de mistura.....	34
Figura 3.3 Esquema real do processo de <i>electrospinning</i> coaxial.....	35
Figura 3.4 Representação do processo de separação das membranas para caracterização.	38
Figura 4.1 Espectro de ATR-FTIR das membranas com 100 % GelMA antes e depois da fotoreticulação e após incubação.....	47
Figura 4.2 Espectros obtidos por ATR-FTIR das membranas assimétricas compósitas de controlo, produzidas por electrospinning de mistura, constituídas por 100GelMA e com 70, 50 e 30% GelMA.	48
Figura 4.3 Espectros obtidos por ATR-FTIR das membranas assimétricas compósitas fotoreticuladas, produzidas por electrospinning de mistura, constituídas por 100GelMA e com 70, 50 e 30% GelMA.	48
Figura 4.4 Espectros obtidos por ATR-FTIR das membranas assimétricas compósitas de controlo, produzidas por electrospinning coaxial, constituídas por 100GelMA e com 70, 50 e 30% GelMA.	50
Figura 4.5 Espectros obtidos por ATR-FTIR das membranas assimétricas compósitas fotoreticuladas, produzidas por electrospinning coaxial, constituídas por 100GelMA e com 70, 50 e 30% GelMA.	50
Figura 4.6 Espectros obtidos por ATR-FTIR das membranas assimétricas compósitas de controlo e fotoreticuladas, produzidas por electrospinning de “blending”, constituídas por 100% GelMA e com 50 e 30% GelMA.....	52

Figura 4.7 Perda de massa em solução tampão fosfato (pH = 7,4), das membranas assimétricas produzidas por diferentes metodologias de electrospinning, com diferentes formulações de GelMA/PCL.....	54
Figura 4.8 Representação dos ângulos de contacto iniciais médios (n=5) das membranas analisadas, incluindo a superfície das membranas base (PCL e PLA).....	56
Figura 4.9 Ângulos de contacto dinâmicos das membranas assimétricas desenvolvidas.....	56
Figura 4.10 Fotografias obtidas por SEM da superfície das membranas, produzidas por electrospinning de mistura, fotoreticuladas. A1) A2) morfologia da membrana base (ampliações 1 000x e 10 000x respetivamente); B1) B2) imagens da superfície da membrana com 100 % GelMA na segunda camada (ampliações de 500x e 5 000x); C1) C2) D1) D2) E1) E2) fotografias da superfície das membranas com 30, 50 e 70 % GelMA na segunda camada, respetivamente (ampliações de 1 000x e 10 000x); A3) C3) D3) E3) histogramas correspondentes.....	59
Figura 4.11 Fotografias obtidas por SEM da superfície das membranas, produzidas por <i>electrospinning</i> coaxial, fotoreticuladas. F1) F2) G1) G2) fotografias da superfície das membranas com 30 e 50 % GelMA na segunda camada, respetivamente (ampliações de 1 000x e 10 000x); H1) H2) H3) fotografias da superfície das membranas com 70 % GelMA na segunda camada (ampliações de 1 000x, 2 000x e 5 000x); F3) G3) H4) histogramas correspondentes.	61
Figura 4.12 Fotografias obtidas por SEM da superfície das membranas, produzidas por <i>electrospinning</i> por “ <i>blending</i> ”, fotoreticuladas. I1) I2) J1) J2) fotografias da superfície das membranas com 30 e 50 % GelMA na segunda camada, respetivamente (ampliações de 1 000x e 10 000x); I3) J3) histogramas correspondentes.	63
Figura 4.13 Índices hemolíticos obtidos pelo contacto direto com o sangue, das membranas produzidas por electrospinning de mistura e coaxial.	67
Figura 4.14 Avaliação da atividade celular após 1, 3 e 7 dias de contacto com as membranas assimétricas produzidas por electrospinning de mistura, por “ <i>blending</i> ” e coaxial.....	69
Figura 4.15 Fotografias de SEM da cultura celular de fibroblastos humanos na presença das membranas assimétricas compostas produzidas por <i>electrospinning</i> de mistura, durante períodos de 1, 3 e 7 dias.	70

Figura 4.16 - Fotografias de SEM da cultura celular de fibroblastos humanos na presença das membranas assimétricas compostas produzidas por *electrospinning* coaxial, durante períodos de 1, 3 e 7 dias..... 71

Figura 4.17 Fotografias de SEM da cultura celular de fibroblastos humanos na presença das membranas assimétricas compostas produzidas por *electrospinning* por “*blending*”, durante períodos de 1, 3 e 7 dias..... 71

Figura 4.18 Imagens representativas do contacto com a bactéria *S. aureus* em placas de ágar e respetivas imagens SEM, das membranas produzidas por *electrospinning* de mistura. 73

Figura 4.19 Imagens representativas do contacto com a bactéria *S. aureus* em placas de ágar e respetivas imagens SEM, das membranas produzidas por *electrospinning* coaxial. 74

Figura 4.20 Imagens representativas do contacto com a bactéria *S. aureus* em placas de ágar e respetivas imagens SEM, das membranas produzidas por *electrospinning* por “*blending*” 74

Acrónimos

AAc	Ácido Acético
DMF	Dimetilformamida
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
ATR-FTIR	Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier com Reflexão Total Atenuada
GelMA	Gelatina Metacrilamida
Hb	Hemoglobina
IPN	Instituto Pedro Nunes
MAA	Anidrido Metacrílico
ECM	<i>Extracelullar Matrix</i>
MTS	<i>3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium</i>
PBS	<i>Phosphate Buffer Solution</i>
PCL	Poli (ϵ -caprolactona)
PLA	Poliácido láctico
SEM	Microscopia de Varrimento Eletrónico
TFE	2,2,2 trifluoroetanol
UBI	Universidade da Beira Interior
UV	Radiação Ultravioleta

1. Introdução

1.1. Motivação

A pele é o maior órgão do corpo humano, cobrindo toda a sua extensão (cerca de 2m^2) e representando cerca de 16% da massa corporal [1, 2, 3]. Esta apresenta uma estrutura complexa constituída por células, fibras, veias, nervos e capilares, que se pode dividir em três camadas: epiderme, derme e hipoderme. A pele desempenha uma vasta gama de funções resultantes de reações físicas e químicas dentro destes componentes. A sua principal função é atuar como uma barreira protetora entre o meio exterior e os órgãos e tecidos internos [4], visto que é elástica, pilosa e autorregenerativa. Além disso, tem outras funções de extrema importância tais como prevenir a perda de líquidos essenciais ao corpo, regular a temperatura corporal (pois é irrigada por vasos sanguíneos), manter o sistema nervoso em contato com o meio ambiente (é dotada de recetores sensoriais e, conferir proteção contra os raios UV através da produção e acumulação de um pigmento na pele, a melanina. [2, 4].

A pele é constituída por 3 camadas: a epiderme, a derme e a hipoderme, bem como por diversas células com características e proveniências diferentes entre si. A epiderme tem a função de barreira e os queratinócitos, células que fazem parte desta camada, são responsáveis pela coesão estrutural da epiderme enquanto a derme confere as propriedades mecânicas à pele (Wong & Chang, 2009)

Sendo o maior órgão externo do corpo, a pele está diariamente exposta a diversas substâncias tóxicas e patogénicas, o que a torna um alvo fácil de danificar. A sua integridade pode ser afetada por fatores como disfunções genéticas, traumas agudos, feridas crónicas (venosas, diabéticas e úlceras de pressão) ou até intervenções cirúrgicas. Uma das razões mais comuns para grandes perdas cutâneas são os traumas térmicos. Estes traumas podem afetar áreas de pele significativas e podem até impossibilitar a sua regeneração consoante a gravidade do mesmo. As queimaduras e os escaldões podem resultar em lesões rápidas, extensas, profundas e muitas vezes impossíveis de tratar pelos métodos convencionais, podendo eventualmente levar à morte [5, 6].

Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), ocorrem mais de 300 000 mortes por ano devido a queimaduras relacionadas com o fogo. Fora desta equação estão as mortes devido a queimaduras químicas, elétricas, escaldões e outros tipos de queimaduras. Cerca de 95% destes incidentes têm

lugar em países subdesenvolvidos e de “terceiro mundo”, onde os meios para o tratamento são escassos ou mesmo inexistentes [7, 8].

Embora os pacientes que sofreram queimaduras passem por muitas dificuldades durante o processo de recuperação, as maiores adversidades são a restauração da pele e o resultado final em termos de cicatrização. Estes problemas associados à forma como se lida com a ferida, o tratamento empregado e a cura, talvez sejam desde sempre o maior desafio com que os clínicos e os investigadores se deparam. É por isso de extrema importância que o processo e os problemas relativos à cicatrização de feridas, seja devidamente abordado por todos os profissionais e investigadores envolvidos no tratamento, bem como no desenvolvimento, utilização e aplicação de novos materiais [9].

Ainda que haja diversos revestimentos de feridas disponíveis comercialmente, os cientistas continuam a investigar novos sistemas ou a melhorar os já existentes. O foco neste trabalho foi desenvolver uma membrana assimétrica para revestir feridas, que possa no futuro ser empregue como um sistema de libertação controlada de fármacos. Além disso a sua morfologia é devidamente estudada para ir em direção a um revestimento ideal que se assemelhe á estrutura natural da pele.

1.2. Tipos de Feridas

Por definição, uma ferida é uma interrupção da estrutura e função anatómica. É uma lesão localizada que pode ser causada por qualquer fator externo, podendo envolver qualquer tecido ou órgão [10, 11, 12].

O tratamento das feridas vem evoluindo desde há 3000 anos A.C., onde as feridas hemorrágicas eram tratadas com cauterização. O uso de torniquete é descrito em 400 A.C. Na idade média, com o aparecimento da pólvora, os ferimentos tornaram-se mais graves. O cirurgião francês Ambroise Paré, em 1585 orientou o tratamento das feridas quanto á necessidade de remover tecidos danificados, aproximação das bordas e curativos. Lister, em 1884, introduziu o tratamento anti-séptico. No século XX, vê-se a evolução da terapêutica com o aparecimento da penicilina [12].7

1.2.1. Classificação de Feridas

As feridas não podem ser classificadas de uma forma específica e padronizada. No entanto, há formas de as classificar que são úteis para as descrever tendo em vista o tratamento mais apropriado que se lhes pode conferir. Os fatores de maior importância na avaliação das feridas são a natureza da lesão que as causou, o momento em que aconteceram, se são agudas ou crônicas e a profundidade da lesão na pele e nos tecidos subjacentes. Estes fatores terão um efeito significativo na capacidade de cicatrização da ferida com ou sem intervenção cirúrgica [13]. Podem também ser classificadas conforme a densidade microbiana, a progressão da lesão, apresentação clínico-cirúrgica, causa e estruturas comprometidas [14,15].

1.2.2. Avaliação das Feridas

Os parâmetros que auxiliam na correta avaliação das feridas são o tipo de lesão (por incisão, desgaste, esmagamento, queimadura, contaminação), tempo que decorreu (recente <6h, precoce <24h, tardia> 24h) e ainda a profundidade da ferida (superficial, dérmica profunda ou de espessura completa) [13].

1.2.3. Processo de Cicatrização

A cicatrização de feridas é um processo biológico e específico, relativo ao fenómeno de crescimento e regeneração de tecidos. Esta passa por diversas fases sobrepostas e interdependentes. Em cada uma delas diversos componentes e matrizes celulares agem em conjunto de forma a restabelecer a integridade dos tecidos danificados e substituir os que foram perdidos. Todo o processo envolve cinco fases: hemostase, inflamação, migração, proliferação e maturação [16]. No entanto, os estágios clássicos da cicatrização de feridas podem ser resumidos em apenas três. A hemostase e a inflamação são classificadas em conjunto, sendo apenas um estágio. Segue-se a formação de novos tecidos (proliferação) e por último a remodelação de tecidos, tal como representado na Figura 1.1.

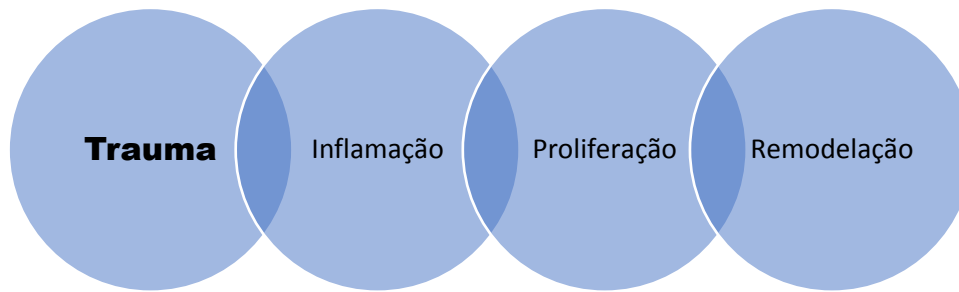


Figura 1.1 Representação esquemática dos principais estágios do processo de cicatrização.

1.3. Biomateriais e Engenharia de Tecidos

A engenharia de tecidos tem vindo a ganhar importância ao longo do tempo, sendo agora considerada uma área no seu todo, na medida em que perdas de pele extensas continuam a ser um desafio para os clínicos. Ainda hoje, biólogos, bioquímicos e engenheiros técnicos continuam a investigar afincadamente para produzir um substituto de pele que possa ser aplicado em grandes quantidades.

Segundo a *National Institutes of Health Consensus Development Conference*, um biomaterial é “qualquer substância ou combinação destas, sintética ou de origem natural, que pode ser usada por um determinado período de tempo, como um todo ou como parte de um sistema que trata, aumenta ou substitui qualquer tecido, órgão ou função do organismo” [17].

O uso de biomateriais era já explorado pelas civilizações antigas. Há referência de narizes, olhos e orelhas artificiais nas múmias egípcias. Os chineses e indianos fizeram uso de colas, ceras e tecidos para reconstruir ou substituir partes defeituosas do corpo. Ao longo dos séculos os avanços nos materiais sintéticos, técnicas cirúrgicas e métodos de esterilização, permitiram o uso de biomateriais em múltiplas formas. Exemplos disso são os implantes (ligamentos, implantes dentários, lentes intraoculares) e dispositivos médicos tais como pacemakers, válvulas cardíacas, corações artificiais, etc.). Estes são amplamente utilizados para repor ou restaurar a função de tecidos ou órgãos danificados e assim melhorar a qualidade de vida dos pacientes [18,19].

Há décadas atrás eram empregues todos os tipos de materiais naturais, tais como madeira, colas, borracha e tecidos de formas vivas. Ainda que em algumas situações a sua utilização fosse tolerada pelo organismo, noutras eram totalmente rejeitados. Nos últimos 30 anos foram alcançados

progressos consideráveis no que respeita às interações entre os tecidos e os materiais que lhes são aplicados [20-23].

Antes de chegar ao ponto da real e efetiva aplicação de um biomaterial num órgão ou tecido, é necessário estudá-lo o melhor e mais aprofundadamente possível, visto que irá estar em contacto direto com o organismo. Para tal, tem que possuir determinadas propriedades, que são de extrema importância, por forma a prolongar a sua utilização no organismo sem que ocorra rejeição por parte deste. As propriedades a considerar são tanto físicas como biológicas e tratando-se de um biomaterial é fundamental que seja biocompatível.

Investigadores associaram as palavras “biomaterial” e “biocompatível para indicar a performance biológica dos materiais. Assim, materiais biocompatíveis são considerados biomateriais e a biocompatibilidade é um termo descritivo que indica a capacidade de um material para obter uma resposta apropriada do hospedeiro, numa aplicação específica. Por outras palavras, biocompatibilidade é a capacidade de interagir com tecidos do corpo humano sem causar um grau de rejeição que seja prejudicial ao organismo. “O paciente está vivo, portanto tem que ser biocompatível” [20]. Salienta-se também a importância da biofuncionalidade do biomaterial. Esta propriedade é definida como a capacidade de funcionamento, tanto física como química do implante relativamente a uma aplicação específica, além de ser esterilizável [22].

Nos tempos que correm, tira-se partido de estratégias que combinam biomateriais, células, fatores de crescimento e técnicas de bioprodução, para obter estruturas que se assemelhem o mais possível á estrutura anatómica da pele e que promovam a regeneração de tecidos saudáveis e vascularizados. No entanto, a pele é um órgão extremamente complexo e por isso, ainda que haja grandes e importantes avanços na área da engenharia de tecidos, mesmo os substitutos de pele ditos “de ponta” desenvolvidos até então, não incorporam as características inatas deste órgão [24, 25].

A procura pelos materiais ideais a aplicar é um trabalho constante de cientistas e investigadores. A seleção dos materiais que visam esta aplicação é limitada, uma vez que tem que ter em conta diversos e importantes aspetos, além da biocompatibilidade e da biofuncionalidade já referidas acima. Deve então considerar-se também:

- A resposta do hospedeiro. Esta define-se como a resposta do organismo hospedeiro (local e sistémica) ao material ou dispositivo implantado [20];

- A estrutura funcional dos tecidos. Os biomateriais incorporados em dispositivos médicos são implantados em tecidos e órgãos [20];
- A toxicidade. Os biomateriais não devem ser tóxicos, nem causar respostas inflamatórias. A toxicologia lida com substâncias que migram para fora dos biomateriais. No caso das aplicações biomédicas é importante que estes não libertem massa, a não ser que sejam projetados especificamente para o fazer, como por exemplo num sistema de libertação controlada de fármaco [20];
- A biodegradabilidade. Deve existir sincronização entre a velocidade de degradação dos materiais e a velocidade de substituição dos mesmos por tecido natural [21];
- A não citotoxicidade. Os produtos resultantes da degradação do material, além de não poderem ser tóxicos para o ser humano, devem ser excretados de forma natural pelo organismo [21];
- As propriedades mecânicas dos biomateriais. A resistência á tração, o limite de elasticidade, o módulo elástico, o acabamento superficial e a dureza. É de salientar que as propriedades físicas também são consideradas aquando da seleção dos materiais. Por exemplo, a membrana de diálise tem uma permeabilidade especificada [20].

Em jeito de conclusão, a engenharia de tecidos combina na mesma abordagem, células, materiais biocompatíveis, fatores bioquímicos e físico-químicos. O intuito é fabricar matrizes que permitam reparar ou substituir tecidos ou órgãos. Uma matriz que tenha por função impelir a regeneração da pele ou outro tecido, deve possuir a capacidade de suportar a adesão, diferenciação e proliferação celular. No que respeita á arquitetura, a matriz deve possuir uma porosidade que permita a vascularização e transporte de nutrientes através da mesma. Tem que haver um equilíbrio entre eficácia/desempenho e durabilidade do material. As propriedades mecânicas e físicas do material deverão ser adequadas à aplicação. Mais ainda, as matrizes fabricadas não deverão causar alergias ou ser carcinogénicas, a sua degradação no organismo deverá ser acordada com o tempo estipulado de tratamento [20-22].

1.3.1. Membranas

A engenharia de tecidos é uma área multidisciplinar, que muito se tem debruçado sobre a procura de uma matriz extracelular ideal (membrana), sendo o elemento comum à maioria das técnicas desta área. Esta matriz é o componente não-celular presente em todos os órgãos e tecidos que providencia um suporte físico para constituintes celulares, assim como sinais bioquímicos e biomecânicos essenciais à morfogênese do tecido, diferenciação e hemóstase. O objetivo das matrizes é proporcionar um ambiente biológico e mecânico, que se adeque o melhor possível à regeneração de tecidos de forma organizada [22, 26-29].

Quando se faz referência à arquitetura da membrana, reporta-se à sua macro e micro estrutura, porosidade ou morfologia da superfície, tamanho dos poros e a sua interligação, ou seja, às suas características físicas. Esta propriedade influencia a biocompatibilidade do suporte, a adesão, proliferação e diferenciação das células semeadas, e no desenvolvimento das funções biológicas do tecido. Os poros e a sua interligação permitem que existam condições nutricionais adequadas, de transporte de nutrientes, oxigénio e a eliminação de resíduos /metabolitos. Por outro lado, tornam possível a migração e proliferação celular, a vascularização e a organização espacial adequada. No que respeita à porosidade, esta confere estabilidade mecânica e tem influência no comportamento das células semeadas [26].

Mais especificamente, a microestrutura é fundamental para que se dê a implementação e regeneração celular. É necessário garantir que as membranas possuam uma área superficial elevada para que seja auxiliada a fixação e o crescimento celular. Uma membrana com porosidade elevada, permite a filtração celular nos espaços vazios, no entanto, a estabilidade e a integridade mecânica dessa membrana pode ser afetada. Portanto, para que haja uma boa performance do material no momento da aplicação, tem que ser garantido um equilíbrio entre a porosidade e a resistência mecânica da membrana. As propriedades químicas, físicas, ou ambas podem ser manipuladas, ou melhoradas através da imobilização de biomoléculas (por exemplo fatores de crescimento) [22].

1.3.2. Materiais Constituintes das Membranas

Nas últimas quatro décadas foram feitos avanços significativos, no que respeita ao uso de membranas para aplicações biomédicas.

Os polímeros têm sido amplamente utilizados como biomateriais para dispositivos médicos e membranas de engenharia de tecidos. Em aplicações biomédicas, os critérios para selecionar os materiais como biomateriais, são baseados na química do material, peso molecular, solubilidade, forma e estrutura, hidrofiliabilidade, hidrofobicidade, lubrificidade, energia de superfície, degradação de absorção de água e mecanismo de erosão. As membranas poliméricas têm sido alvo de destaque devido às suas propriedades únicas, entre as quais a elevada relação superfície-volume, alta porosidade com dimensões de poro muito pequenas, biodegradação e propriedades mecânicas. Este tipo de materiais oferece vantagens distintas de biocompatibilidade, versatilidade química e propriedades biológicas, que são de relativa importância quando da aplicação nos tecidos ou órgãos. Os investigadores da área da Engenharia de tecidos têm tentado promover o crescimento da pele, bem como a substituição de cartilagem, osso, fígado, válvulas cardíacas, artérias, bexiga, pâncreas, nervos, córneas e vários outros tecidos moles. Os materiais de construção podem ser sintéticos ou biológicos, degradáveis ou não degradáveis, dependendo da aplicação final. As propriedades dos polímeros dependem da composição, estrutura e deposição das suas macromoléculas constituintes.

Os polímeros naturais podem ser considerados os primeiros biomateriais utilizados clinicamente. Estes têm melhores interações com as células, devido às propriedades bioativas, que lhes permitem aperfeiçoar o desempenho no sistema biológico. Os polímeros naturais podem ser considerados como proteínas (seda, colagénio, gelatina, elastina, queratina, entre outras), polissacarídeos (celulose, amilose, dextrano, quitina, etc.) ou polinucleótidos (DNA e RNA).

A orientação biomaterial sintética fornecida pelos biomateriais pode auxiliar a restauração da estrutura e função dos tecidos danificados ou doentes. Os polímeros sintéticos são altamente úteis no campo biomédico, uma vez que as suas propriedades (por exemplo, porosidade, tempo de degradação e características mecânicas) podem ser ajustadas para uma aplicação específica. As membranas feitas de polímeros sintéticos são frequentemente mais baratas do que as produzidas a partir de materiais biológicos. Estes polímeros representam o maior grupo de polímeros biodegradáveis e podem ser produzidos sob condições controladas. Em geral apresentam propriedades mecânicas e físicas previsíveis e reproduzíveis tais como a resistência à tração, módulo de elasticidade e taxa de degradação. Os copolímeros PLA, PGA e PLGA estão entre os polímeros sintéticos mais utilizados na engenharia de tecidos.

1.3.3. Tipos de Membranas

Num tempo de decrescente disponibilidade de tecidos para transplante, a par da crescente necessidade de substituições adequadas, o campo emergente da Engenharia de tecidos dá esperança aos pacientes que necessitam desesperadamente de substitutos de tecidos. Foram desenvolvidas técnicas para moldar polímeros em arquiteturas complexas, que exibem as propriedades desejadas para aplicações específicas. Tal como referido anteriormente, estas técnicas resultam em membranas reprodutíveis para a regeneração de tecidos específicos, entre os quais a pele.

As membranas são essenciais para atuar como um modelo tridimensional para o tecido em crescimento. As características chave, também já referidas, podem ser ajustadas à aplicação através de uma seleção cuidadosa dos polímeros, dos componentes adicionais da membrana e das técnicas de produção.

Os modelos típicos das membranas incluem malhas, fibras, esponjas e espumas e outras mais. A técnica de produção das membranas na Engenharia de tecidos, depende quase inteiramente das propriedades de massa e de superfície do material, além da aplicação final. Uma grande parte das técnicas implica que seja fornecido calor e/ou pressão ao polímero, ou dissolve-lo num solvente orgânico para que seja possível de manipular.

Embora cada método apresente vantagens e desvantagens distintas, deve ser selecionada aquela que permita o cumprimento dos requisitos estabelecidos para a membrana, pois a sua estrutura está diretamente relacionada com o método de produção empregado. Para a reparação e regeneração de tecidos irrecuperáveis ou danificados, as membranas tridimensionais devem ser produzidas e concebidas para que o tecido regenerado possua estrutura e função anatómica semelhante ao tecido original.

Existem diversos tipos de membranas, produzidos por diferentes métodos e com finalidades distintas. De seguida, serão descritos alguns exemplos.

1.3.3.1. *Membranas Porosas*

As membranas de espumas ou esponjas porosas têm sido muito utilizadas em aplicações biomédicas, especialmente no caso do crescimento dos tecidos do hospedeiro, ou por exemplo, vascularização de órgãos. A estrutura das espumas poliméricas tem potenciais vantagens, entre as

quais proporcionar o transporte de nutrientes para o centro do dispositivo, através da rede de canais de interligação porosa. Além disso, pode limitar o tamanho do agrupamento ao tamanho do poro da espuma, eliminando assim grupos muito grandes que potencialmente desenvolveriam um centro necrótico. Alguns exemplos de polímeros sintéticos biodegradáveis usados na construção de membranas porosas são o PLLA, PGA e PCL. Atualmente o método mais utilizado para a produção de membranas porosas, compostas por fibras nano e microscópicas biodegradáveis é a Eletrofiação.

1.3.3.2. *Membranas Compostas por Hidrogéis*

A conceção e a aplicação de hidrogéis biodegradáveis, aumentaram drasticamente o potencial impacto destes materiais no campo biomédico. Além disso, permitiu desenvolvimentos consideráveis em sistemas de libertação controlada de fármacos e aplicações de engenharia de tecidos.

Estes materiais assemelham-se estruturalmente aos componentes macromoleculares do corpo e consideram-se biocompatíveis. Os hidrogéis têm como base polímeros naturais ou sintéticos, que são reticulados através de ligações covalentes ou não-covalentes.

Na engenharia de tecidos, eles devem atender a uma série de critérios para funcionar de forma adequada e promover a formação ou regeneração de novos tecidos. O perfil de degradação de todos os hidrogéis deve ser devidamente definido, ajustável e reprodutível via química ou estrutural do hidrogel.

Os hidrogéis biocompatíveis são correntemente utilizados na cicatrização de feridas, no seu revestimento e também como transportadores na administração de fármacos. Alguns exemplos de polímeros naturais base dos hidrogéis são o colagénio, gelatina, fibrina, ácido hialurónico, alginato e quitosano.

1.3.3.3. *Membranas Fibrosas*

Alguns biomateriais tais como o colagénio, gelatina, quitosano, PCL, PLA, fibrinas de seda, entre outros, são usados na Engenharia de tecidos para formar membranas fibrosas, que permitem imitar a arquitetura de tecido humano natural na escala nanométrica. Estas membranas são igualmente constituídas por fibras proteicas adesivas e deste modo a adesão e proliferação celular serão

estimuladas. Atualmente existem algumas técnicas disponíveis para sintetizar nanofibras, sendo a Eletrofição a mais estudada e é também a que parece exibir os resultados mais promissores para aplicações de Engenharia de tecidos.

Os polímeros naturais e sintéticos acima referidos, não possuem quaisquer grupos funcionais específicos, pelo que deve, ser especificamente funcionalizados para as aplicações onde são empregues serem bem-sucedidas. A técnica de *blending* (ou mistura) é uma opção comum para a funcionalização das nanofibras. A polimerização de enxertos de superfície também tem sido utilizada para agregar moléculas ligantes e proteínas adesivas na superfície da nanofibras, para aplicação de estruturas de afinidade e membranas, respetivamente [30, 31].

1.3.3.4. *Membranas à Base de Microesferas*

Nos últimos anos membranas baseadas em microesferas têm recebido alguma atenção. Este tipo de membranas é cada vez mais utilizado como sistema de libertação de fármacos e em aplicações avançadas de engenharia de tecidos, tais como terapia genética, tratamento de ossos infetados com antibiótico e assim por diante. Elas são geralmente uma matriz de polímero, utilizada para encapsulação de fármacos para que a taxa de libertação seja relativamente lenta ao longo de um período de tempo prolongado. Os polímeros de baixo peso molecular são adequados para o desenvolvimento de microesferas porosas para que ocorra uma libertação de fármaco rápida. Já os polímeros de elevado peso molecular, devido à sua natureza densa, permitem o desenvolvimento de microesferas para uma libertação de fármaco mais lenta. A aplicação mais promissora para estas matrizes é a regeneração óssea [30-33].

1.3.4. Estratégias de Engenharia de Tecidos

A Engenharia de tecidos tem como objetivo conjugar as tecnologias de engenharia e princípios das ciências biológicas, para desenvolver estratégias para a reparação e regeneração de tecido perdido ou danificado, podendo ser distribuídas por três categorias [32].

A primeira assenta na colocação isolada de células na zona do tecido lesado. Este procedimento consiste na autorregeneração do tecido danificado através do implante, proveniente de um dador, do próprio paciente ou substituição de células progenitoras, diretamente no tecido lesado. Este processo evita complicações cirúrgicas e permite a expansão de células em cultura. No entanto, é desprovido

de uma estrutura que reproduza as funções da matriz extracelular, o que leva a que muitas vezes o implante falhe devido à rejeição imunológica ou por morte das células transplantadas [32-34].

A segunda estratégia passa por um implante médico na zona de tecido danificado. Consiste no implante direto de uma membrana na zona do tecido a regenerar, sem recorrer a células semeadas, mas geralmente infiltrado com fatores de crescimento. O implante serve de suporte estrutural e utiliza a capacidade de migração das células adjacentes para a regeneração do tecido. Todavia, o sucesso depende do recrutamento e da infiltração das células do corpo, promovendo a sua migração, distribuição e aderência no interior da estrutura tridimensional. O recrutamento e a infiltração das células do corpo dependem fortemente das propriedades químicas, mecânicas e geométricas da estrutura, bem como do seu mecanismo de degradação, tornado o projeto da membrana numa fase de grande importância. Esta fase tem de obedecer a critérios específicos da arquitetura exterior e interior e do material que vai ser utilizado [32-34].

A terceira e última estratégia é a deposição e proliferação de células no implante médico e posterior aplicação do mesmo. As células progenitoras são transplantadas, expandidas em cultura e semeadas numa membrana. Esta é depois implantada no paciente. À medida que a membrana se degrada, as células nela semeadas vão aderir, proliferar e segregar progressivamente a sua matriz extracelular. Das estratégias referidas, esta é a que geralmente conduz a melhores resultados, em particular quando a capacidade de autorregeneração do corpo do paciente foi comprometida por doença ou trauma. Ainda assim, à semelhança da estratégia anterior, a etapa de projeto da membrana requer muitos cuidados, visto ser um dos passos críticos para o sucesso [32-34].

1.4. Membranas Assimétricas para Revestimento de Feridas

Atualmente, as estratégias avançadas de regeneração de tecidos combinam biomateriais, células, fatores de crescimento e técnicas de fabrico avançadas para produzir matrizes capazes de mimetizar a anatomia completa da pele, promovendo a regeneração e vascularização dos tecidos. Apesar dos grandes desenvolvimentos alcançados, há ainda algumas questões que não tiveram resposta, tais como as sensações produzidas pelo maior órgão do corpo [24]. Estudos recentes da Engenharia de tecidos, abordam a combinação de células-tronco com recombinação genética [35]. Também já

foram produzidas malhas poliméricas eletrofiadas, compostas por PLA e PCL, que foram carregadas com plasmídeos codificados para fatores de crescimento de queratinócitos [36].

Mais recentemente têm sido feitos estudos para desenvolver membranas assimétricas que mimetizem feridas de espessura total, uma vez que este tipo de revestimento apresenta uma morfologia semelhante à pele. Além disso, tem propriedades adequadas para o processo de regeneração da pele. Na Tabela 1.1 são apresentados alguns produtos já disponíveis no mercado com este tipo de tecnologia.

Tabela 1.1 Substitutos dérmicos/epidérmicos.

Produto	Descrição	Aplicação	Referência
Integra [®]	Fina camada de silicone; colagénio de tendões bovinos do tipo I e glicosaminoglicano de tubarão	Tratamento de feridas de espessura total ou parcial	[37]
OrCel [®]	Queratinócitos neonatais alogénicos humanos no lado não poroso revestido com gel de esponja; Esponja de colagénio bovino contendo fibroblastos neonatais alogénicos humanos	Tratar feridas dos doadores de pele para enxertos e cirurgias de mão-de-luva para epidermolises bullosa	[38]
Apligraf [®]	Queratinócitos neonatais alogénicos humanos; Colagénio bovino do tipo I contendo fibroblastos neonatais alogénicos humanos	Tratamento de úlceras venosas e diabéticas do pé	[39]
Tissue Tech [®]	Combinação de substitutos dérmicos e epidérmicos, Hyalograft 3D [®] e Laserskin [®]	Tratamento de úlceras crónicas e queimaduras de espessura total ou parcial	[40]

As camadas epidérmicas e dérmicas correspondem à camada densa e às camadas interiores semelhantes às esponjas das membranas assimétricas, respetivamente. Normalmente, as matrizes porosas dos substitutos epidérmicos/dérmicos são compostas por colagénio, ácido hialurónico, fibronectinas e outras proteínas da matriz extracelular. É comum usar um curativo de silicone para formar uma camada fina superior, com o intuito de proteger a ferida da perda de humidade e de infeções. No entanto, é possível produzir um substituto epidérmico/dérmico com uma estrutura integral, sem a necessidade de usar um curativo para “formar” a camada de pele densa. Para melhorar as propriedades do dispositivo, de acordo com a aplicação biomédica, pode ser usada uma

diversidade de polímeros que servem de “gatilho” na cicatrização. Assim, podem ser aplicados mais e diferentes métodos de produção [24,41].

1.4.1. Membranas Assimétricas como Revestimento Ideal para Feridas

A primeira membrana assimétrica de que há conhecimento foi produzida no final de 1950. Foi produzida a partir de acetato de celulose através do método de inversão de fases e foi usada na osmose inversa [24, 42]. Desde então, este tipo de membranas teve aplicações nas mais variadas áreas, tais como micro, nano e ultra filtração, diálise, separação de gás, pervaporação, tratamento de águas residuais e mais recentemente são empregues no revestimento de feridas [24, 43-46].

As pesquisas direcionadas para a medicina regenerativa permitiram o desenvolvimento de curativos oclusivos como Opsite®, Omiderm® ou Spandre®, que são impermeáveis. Esta característica levou a que não ocorresse a absorção do exsudato e conseqüentemente o processo de cicatrização foi tardio. Posteriormente, surgiram alguns curativos macroporosos que permitiram uma drenagem eficaz do exsudato da ferida. Ainda assim, estes não impossibilitaram a penetração de microrganismos, bem como a desidratação da ferida. Mais tarde, os investigadores chegaram à conclusão de que o ideal seria a combinação de ambos os sistemas (estruturas oclusivas e macroporosas) [47, 48]. Desta forma seria possível impedir a penetração das bactérias e, ao mesmo tempo, seria possível permitir a absorção do exsudato e a troca gasosa. Foram então desenvolvidos curativos consistindo numa subcamada macroporosa, ou hidrogel, ligados a uma camada superior microporosa densa ou hidrofóbica. Lyofoam®, Epigard® e Duoderm® são exemplos deste tipo de curativos. Contudo, estes apresentavam ainda algumas desvantagens, tais como capacidade de drenagem limitada, acumulação de exsudato e a necessidade de substituição frequente, que leva a um aumento do risco de infeção da ferida. Por volta de 1990 Loeb and Sourirajan, conceberam pela primeira vez uma membrana assimétrica de poliuretano (PU), para superar as desvantagens referidas [43].

A membrana assimétrica de PU apresentou uma camada superior microporosa (tamanho de poro <0,7 µm) interligada, capaz de prevenir uma rápida desidratação da superfície da ferida, bem como a penetração bacteriana, conforme foi depois demonstrado pelo teste bacteriológico *in vitro* utilizando *Pseudomonas aeruginosa*. Mais ainda, a subcamada tinha uma estrutura tipo esponja altamente porosa contendo micro e macroporos, que conferiram uma elevada capacidade de absorção e aumentaram a regeneração de tecidos. Ambas as camadas atuaram também como sistemas de

libertação de fármaco, ao mesmo tempo que permitiam a troca gasosa controlada, superando as limitações observadas com Lyofoam®, Epigard® e Duoderm®.

Tal como já supradito, a primeira membrana assimétrica foi feita a partir de PU. Este é um material biodegradável totalmente sintético, com segmentos duros uniformes compostos por butanodiol, 1,4-butanodiisocianato, e segmentos moles constituídos por DL-caprolactona e polietileno glicol (PEG). Estas membranas têm sido utilizadas na cicatrização de feridas, visto serem biocompatíveis e pelas suas propriedades mecânicas e hemostáticas. Além de que, a cascata de coagulação é desencadeada pelo carácter hidrofílico do PU, responsável pela atração das plaquetas [49].

Foram também produzidas membranas assimétricas à base de quitosano. Este material é um polímero natural obtido a partir da quitina por desacetilação, que tem sido largamente utilizado na área de revestimento de feridas. A sua vasta utilização deve-se às suas propriedades intrínsecas, como a atividade antimicrobiana, biocompatibilidade, biodegradabilidade e propriedades hemostáticas. O quitosano é reconhecido pelas plaquetas, o que permite que ocorra a cascata de coagulação em poucos segundos. Esta inicia-se com os grupos amina protonados de quitosano, que vão atrair os resíduos negativamente carregados presentes nas membranas dos glóbulos vermelhos. Tal resulta numa aglutinação forte, geração de trombina e síntese da malha da fibrina dentro do microambiente criado por este polissacarídeo [24,49].

Como já foi acima referido, os poros têm um papel fundamental no desempenho da membrana. Eles têm que ser suficientemente grandes para permitir a adesão e passagem de nutrientes, mas por outro lado têm que ser suficientemente pequenos para inibir a passagem de microrganismos e outros componentes não desejáveis. Então, para satisfazer ambos os requisitos, a membrana tem que ser assimétrica e a assimetria pode ser conseguida pela estrutura multicamada e multifásica da membrana. Considerando os parâmetros mecânicos e as possibilidades de processamento, os materiais mais indicados são o poliácido láctico (PLA) e a policaprolactona (PCL). Ambos os materiais pertencem ao grupo de biomateriais reabsorvíveis e são amplamente utilizados para aplicações biomédicas. É possível eletrofiar nanofibras destes materiais e seus compósitos. As membranas resultantes têm áreas de superfície elevadas e redes de poros interligadas, proporcionando um fácil transporte dos nutrientes metabólicos e resíduos através dos poros nanométricos [50].

1.5. Polímeros Biodegradáveis de Base Natural/Sintética

Uma definição possível para polímeros é: macromoléculas que ao longo da sua cadeia têm pelo menos uma unidade de repetição, ligadas covalentemente [51].

A classe de polímeros de mais interesse na área da Engenharia de tecidos é a dos polímeros biodegradáveis. Estes são materiais degradáveis que dão origem a produtos como água, biomassa e dióxido de carbono, por ação de microrganismos vivos ou enzimas ou também por via química. O interesse por estes polímeros tem crescido de forma exponencial ao longo dos anos em todo o mundo, devido às imensas aplicações possíveis nas mais variadas áreas. Os biomateriais utilizados para a conceção das membranas destinadas à Engenharia de tecidos podem ser classificados em duas categorias distintas de acordo com a sua origem: natural ou sintética [31,52,53].

1.5.1. Polímeros Naturais

Os polímeros naturais são obtidos a partir de fontes renováveis e são maioritariamente compostos por derivados de origem proteica ou hidratos de carbono. Além disso, estes podem também ser formados durante o ciclo de crescimento de organismos vivos. A sua síntese envolve, geralmente reações catalisadas por enzimas e reações de crescimento de cadeia a partir de monómeros ativados, que são formados dentro das células por processos metabólicos complexos. Os polímeros naturais podem encontrar-se nos organismos dos vertebrados, como o colagénio, ácido hialurónico e fibrina, muitas vezes considerada como uma matriz provisória da natureza. Esta é de grande importância nos estágios de hemostasia e reparação de feridas [22, 31, 52].

A utilização destes polímeros na Engenharia de tecidos traz vantagens, como o facto de apresentarem uma grande similaridade com os tecidos que se pretende regenerar. Assim, melhora-se o desempenho biológico da membrana a aplicar e é também favorecida a regeneração dos tecidos e o seu crescimento até à substituição dos mesmos. Outro aspeto vantajoso é serem materiais de baixo custo. Mais ainda, muitos deles são biodegradáveis e não suscitam a formação de substâncias que causem respostas inflamatórias no organismo [31, 54].

Os polímeros naturais podem ser agrupados com base no seu método de formação, como adição e condensação. A maioria dos polímeros naturais são condensados, que são formados como sendo o resultado da combinação de unidades de monómeros, para formar uma molécula pequena como

subproduto, normalmente água. Os polímeros adicionais são aqueles formados por combinação direta das unidades de polímero, dando origem ao polímero sem qualquer subproduto [55, 56].

A natureza tem uma ampla oferta de polímeros, podendo estes ser extraídos de plantas e/ou animais. Tal possibilita a obtenção de materiais com custos diminutos associados, geralmente não-tóxicos e biodegradáveis. Importa salientar que a biodegradabilidade é uma das propriedades mais relevantes em aplicações biomédicas.

Polímeros naturais como a fibrina, colagénio e polissacarídeos apresentam as propriedades referidas anteriormente. Contudo, estes materiais sofrem variações de lote para lote, devido a dificuldades na purificação. Além disso, apresentam ainda algumas limitações no que respeita à solubilidade, à resistência mecânica, à possibilidade de transmissão de vírus e reações de hipersensibilidade. Por outro lado, os polímeros sintéticos estão disponíveis numa ampla variedade de composições e propriedades facilmente ajustáveis. Estes fatores têm conduzido à substituição de polímeros naturais por sintéticos, ainda que não na totalidade [57,58].

Gelatina

A gelatina é um polímero natural à base de proteínas solúveis em água, derivado da hidrólise (desnaturação) do colagénio. O colagénio que lhe dá origem é proveniente de peixes, bovinos e suínos. É amplamente empregue em aplicações biomédicas, devido à sua natureza biodegradável e biocompatível em ambientes fisiológicos, além da sua disponibilidade comercial a baixo custo. Foi já demonstrado que a gelatina tem vantagens em relação à proteína progenitora, que incluem uma menor imunogenicidade e melhor solubilidade em meios aquosos. Além disso, ela pode ser reticulada ou modificada com a inclusão de outros materiais para alterar significativamente as suas propriedades bioquímicas e mecânicas [59, 60].

Um fator que tem influência direta na composição química da gelatina é o método de extração. Esta é uma proteína desnaturada obtida por processamento ácido ou alcalino do colagénio [60,61]. A sua qualidade pode ser dependente do pH, da temperatura e do tempo de extração usados no processamento do colagénio. A gelatina pode ser do tipo A (PIE a pH 8-9) ou B (PIE a pH 4-5), consoante seja sujeita a condições de pré-tratamento acídicas ou alcalinas [61].

1.5.2. Polímeros Sintéticos

Os polímeros sintéticos, ao contrário dos naturais, podem ser produzidos em grandes quantidades uniformes e com um tempo de vida útil mais longo. Além disso, podem ser produzidos sob condições controladas e com propriedades semelhantes às dos polímeros não degradáveis. Existe uma grande variedade de polímeros degradáveis e mais são descobertos a cada dia. De uma forma geral, apresentam propriedades mecânicas e físicas previsíveis e reprodutíveis tais como a resistência à tração, módulo de elasticidade e taxa de degradação. Visto que são reproduzidos sinteticamente, há a possibilidade de ajustar as suas propriedades para que possam ser empregues em aplicações específicas com as características desejadas. Na grande maioria, degradam-se por hidrólise química e não são afetados por alguns processos enzimáticos, permitindo que a sua degradação não tenha grandes variações de paciente para paciente [22, 30, 55].

Os polímeros sintéticos têm sido amplamente empregues para aplicações biomédicas, tais como sistemas de libertação controlada de fármacos em organismos vivos, suturas, pinos para ossos e para embalagens especiais. Dentro destes, os mais utilizados são os poliésteres, que podem ser alifáticos, aromáticos e não-aromáticos. Como o próprio nome indica têm na cadeia principal o grupo éster. Os poliésteres alifáticos são os polímeros sintéticos biodegradáveis mais usados na regeneração de tecidos. Exemplos destes são o PLA, PGA e PLGA, cujo grupo éster é facilmente hidrolisado em meio aquoso. Esta característica concede-lhes elevada biodegradabilidade nos fluidos corporais. Para aplicações que exigem taxas de degradação mais lentas são largamente usados e investigados como substitutos ósseos, adesivos e como membranas para regenerar tecidos moles. Além disso, os poliésteres referidos estão entre os poucos aprovados pela *Food and Drug Administration* (FDA) [30,52,62]. No entanto, importa salientar que aquando da sua degradação são formados ácidos, o que a concentrações elevadas pode causar respostas inflamatórias por parte do organismo [30,31].

Poliácido láctico (PLA)

O poli ácido láctico (PLA) é um exemplo de um bioplástico biodegradável que foi descoberto em 1932 pelo grupo Carothers [63]. Surgiu como uma alternativa ao PET e PVC e na altura apenas foi produzido PLA de baixo peso molecular, por aquecimento de ácido láctico sob vácuo enquanto era removida a água condensada. Depois, pela polimerização de abertura do anel cíclico, foi sintetizado PLA de elevado peso molecular. Foi comercializado pela primeira vez sob o nome Vicryl, nos E.U.A em 1974 como material de sutura, combinado com outro poliéster, o PGA [64].

O PLA pode ser produzido com uma ampla gama de propriedades, uma vez que o ácido láctico é quiral com dois centros assimétricos [65]. Este tem três formas isoméricas e degrada-se para formar ácido láctico que está presente no corpo, que depois de entrar no ciclo do ácido tricarbóxico é excretado como água e dióxido de carbono.

No entanto, surge a questão da biocompatibilidade, uma vez que são produzidas soluções tóxicas resultantes da sua degradação. Contudo, se o seu volume for pequeno não ocorrem respostas biológicas adversas [66].

Este polímero pode ser facilmente convertido em filmes e fibras e tem diversas aplicações biomédicas tais como suturas dissolúveis, matrizes para sistemas de libertação controlada de fármacos, fraturas ósseas e dispositivos cirúrgicos de fixação interna [65].

Poli (caprolactona) PCL

A poli(ϵ -caprolactona) (PCL) é um dos membros da família dos poliésteres alifáticos, obtido através da abertura do anel cíclico por polimerização do monómero ϵ -caprolactona, e foi um dos primeiros polímeros a ser sintetizados pelo grupo Carothers no início de 1930 [67,68]. Este polímero é hidrofóbico e semi-cristalino e tem elevada permeabilidade em condições fisiológicas [62]. Condições essas, em que é degradada por hidrólise das suas ligações éster, além disso é um polímero biodegradável, bioreabsorvível e não tóxico [69].

O que torna a PCL um material atrativo é também a sua aprovação pela FDA para uso em humanos, a biodegradabilidade e a compatibilidade com uma ampla gama de outros polímeros, que faz com que seja versátil e possível de adaptar a aplicações específicas, sejam sistemas simples ou complexos [67]. É particularmente interessante para a preparação de dispositivos implantáveis a longo prazo, devido á sua taxa de degradação mais lenta que a do PLA [68]. Mais ainda, pode ser funcionalizada com grupos funcionais específicos para melhorar as suas propriedades químicas, físicas e biológicas.

As excelentes características da PCL, as reações leves indesejáveis do hospedeiro e estruturas porosas tridimensionais e direcionais, fazem com que a sua fibra, cujo diâmetro varia de nanómetro a milímetro seja largamente estudada. Na forma de fibra, a PCL e os seus copolímeros têm sido investigados para utilização em sistemas de administração de fármacos, suturas absorvíveis de “longa duração” [67]. Além disso, as suas propriedades viscoelásticas e reológicas permitem a

construção de membranas para aplicações em Engenharia de tecidos. Membranas estas que são obtidas pela técnica de Eletrofição, que será descrita no presente trabalho.

1.6. Métodos de Produção de Membranas Assimétricas

1.6.1. *Electrospinning*

A técnica de *electrospinning* tem vindo a aumentar a sua popularidade de forma exponencial, em grande parte devido às suas propriedades em nanoescala. Este método permite a produção de matrizes fibrosas, compostas por fibras ultrafinas com uma elevada porosidade e área superficial. Assim, haverá uma melhor adesão, proliferação, migração e diferenciação celular, visto que estas propriedades mimetizam a morfologia natural da matriz extracelular. As fibras poliméricas produzidas pela técnica referida têm diâmetros que variam de algumas dezenas de nanómetros a micrómetros [70]. O *electrospinning* é uma técnica simples e eficiente na produção de matrizes poliméricas, não necessitando de equipamento rebuscado, além de permitir o controlo do diâmetro das fibras produzidas. Um dos adjectivos desta técnica é a versatilidade, uma vez que permite o emprego de uma vasta gama de polímeros, mistura destes, materiais inorgânicos, biomoléculas e células vivas, cumprindo assim os requisitos exigidos numa miríade de aplicações.

A configuração de um processo típico de *electrospinning* é simples. A sua instalação consiste em três componentes principais: uma agulha, de seringa, condutora de diâmetro pequeno com bomba de alimentação, uma fonte de alimentação de alta tensão com polaridade positiva ou negativa e um coletor condutor. Neste processo, as forças electrostáticas são utilizadas para gerar fibras eletrofiadas. A função do coletor, que está ligado à terra, é acolher as fibras resultantes. De forma a iniciar o processo, o polímero sólido é dissolvido numa única mistura de solventes para se obter uma solução de homogénea de polímero [71]. A agulha metálica está ligada a uma seringa, através dum tubo capilar, que contém a solução de polímero. Esta é alimentada através da bomba da seringa para formar uma gota pendente do polímero na ponta da agulha, ligada ao pólo positivo da fonte de alta tensão. Com a utilização de um controlador de caudal, a solução pode assim fluir através da agulha a uma taxa constante, previamente seleccionada [72].

À medida que o potencial elétrico é aplicado à solução polimérica que passa pela agulha, ela fica eletricamente carregada, fazendo com que a gota pendente fica sujeita a forças repulsivas e eletrostáticas. Como resultado, a gota pendente na ponta da agulha metálica alonga-se e deforma-se numa forma cônica, que é vulgarmente denominada de *cone de Taylor*. Na Figura 1.2 está a representação esquemática da técnica aqui referida, bem como da zona de formação do *cone de Taylor*. A distorção da gota pendente no *cone de Taylor* é causada pela força repulsiva entre as cargas semelhantes na solução polimérica e a força de atração entre o líquido carregado e coletor ligado à terra. Quando a força do campo elétrico atinge um valor limite, a força eletrostática supera a tensão superficial da solução polimérica e a solução é ejetada da ponta do cone para o coletor. No percurso entre a ponta da agulha e o coletor, o jato é acelerado e esticado, promovendo a evaporação do solvente e a formação de fibras longas e finas, que vão depois depositar-se no coletor, formando-se assim uma membrana [71].

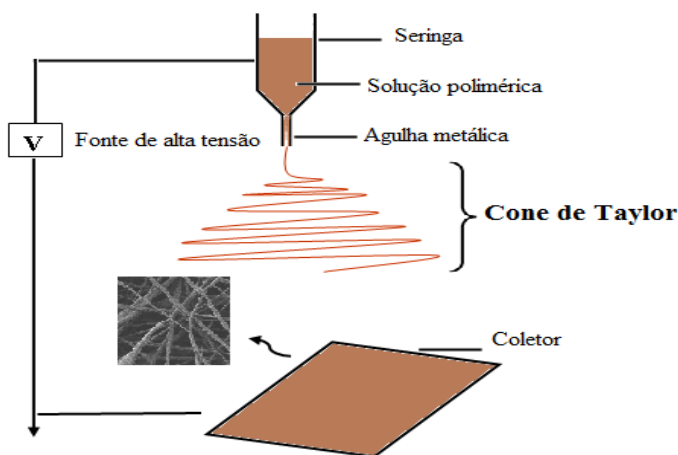


Figura 1.2 Representação esquemática do processo do Electrospinning de mistura.

1.6.1.1. *Electrospinning Coaxial vs Blending*

A versatilidade já referida da técnica de *electrospinning*, estende-se a outros campos, tais como permitir alterações que possibilitam ter controlo da morfologia e estrutura das nanofibras obtidas. Alterações essas que podem ser segmentadas em três grupos:

- Parâmetros que possibilitam o ajustamento das dimensões da fibra e a sua morfologia superficial;

- Método de *electrospinning*, podendo obter-se fibras com estruturas diferentes;
- Tipo de coletor, permitindo adaptar a disposição das fibras

Neste trabalho, foi avaliada a influência do método de *electrospinning*, tendo sido produzidas membranas por *electrospinning* coaxial e de *blending* (mistura). Este último método é o mais comum, no entanto o coaxial tem sido alvo de estudo nos últimos anos e permite a obtenção de diferentes tipos de fibras com propriedades interessantes para aplicações biomédicas. A conformação do equipamento é em tudo semelhante ao adotado para o *electrospinning* de mistura, a diferença é que são coaxialmente e simultaneamente ejetadas duas soluções poliméricas de forma independente, através de diferentes canais capilares de alimentação num único bico para gerarem nanofibras compósitas com uma estrutura núcleo-casca. Ou seja, é inserida uma agulha de menor diâmetro, que encaixa de forma concêntrica, no interior da agulha maior. Desta forma o núcleo das fibras produzidas será de um material diferente do material da casca. O propósito da utilização deste método é a estrutura do núcleo ser por exemplo usada para controlar a rigidez da membrana e por sua vez, o material constituinte da casca poderá promover a adesão e proliferação celular, dependendo dos polímeros usados.

O inconveniente de optar pelo *electrospinning* coaxial, reside na dificuldade de estabelecer parâmetros para uma Eletrofiação estável, a fim de formar uma estrutura fibrosa uniforme devido a diferenças nas condutividades e viscosidades das duas soluções [73]. Na Figura 1.2 é possível verificar que no *electrospinning* de mistura, os polímeros estão numa única solução, enquanto no coaxial são utilizadas duas soluções independentes.

1.6.1.2. Parâmetros do *Electrospinning*

O processo de *electrospinning* de uma solução polimérica, a regularidade e os diâmetros das nanofibras obtidas podem ser influenciados por diversos parâmetros [72]:

- Viscosidade, tensão superficial, condutividade elétrica e taxa de evaporação da solução;
- Variáveis do processo, como tensão aplicada à agulha, caudal da solução, diâmetro da agulha, distância entre a agulha e o coletor, geometria do coletor e a tensão que lhe é aplicada;

- Fatores ambientais, tais como temperatura ambiente e humidade relativa.

O campo elétrico entre a agulha e o coletor é afetado pela variação da tensão aplicada à agulha, variação essa que provoca também alterações na carga da solução polimérica. Um aumento na diferença de potencial aplicado à agulha, conduz a que a intensidade do campo elétrico aumente e conseqüentemente, aumenta a velocidade com que a fibra é ejetada para o coletor. Considerando este fator, a tensão aplicada não deve ter um valor demasiado elevado para que não se verifiquem quebras na fibra. Por outro lado, também não deve ter um valor demasiado baixo para que não exista projeção de gotas de solução para o coletor. No que respeita à carga do polímero, esta vai procurar uma repulsão entre os elementos do fio da solução. Tal torna-se um fator importante e a ter em conta aquando da determinação do diâmetro das fibras, uma vez que mais carga se reflete num maior estiramento do fio e fibras mais finas.

As forças viscoelásticas entre as moléculas do polímero em solução são determinadas pela sua viscosidade, que depende da concentração e do peso molecular do polímero. Estas forças devem ser suficientemente fortes para impedir a interrupção da fibra durante o seu estiramento, não devendo porém inibi-lo.

A quantidade de polímero é dependente do caudal previamente selecionado. Valores baixos dão origem a fibras relativamente mais finas, que as obtidas por caudais mais elevados. No entanto, caudais demasiado baixos levam a que haja quebras na continuidade da fibra. Ao contrário, caudais muito elevados conduzem à acumulação de solução na ponta da agulha originando projeções [71- 72].

1.7. Propriedades Fundamentais das Membranas Assimétricas para Regeneração de Tecidos

Quando se pretende aplicar uma membrana assimétrica para revestimento de feridas, as suas propriedades intrínsecas têm que ser devidamente avaliadas. Entre elas estão a morfologia, a capacidade de absorção de água (intumescimento), hidrofobicidade (análise de ângulos de contacto), resistência mecânica por ensaios de tração, atividade bacteriológica, perfil de libertação de fármaco *in vitro* e citotoxicidade *in vivo* [41, 48]. No presente trabalho serão avaliadas a morfologia, a hidrofobicidade através da medição dos ângulos de contacto e a atividade bacteriológica.

1.7.1. Morfologia e Porosidade das Membranas

O estudo do comportamento celular na presença de biomateriais é de extrema relevância para apurar se a regeneração dos tecidos é ou não melhorada. A morfologia da superfície e a porosidade dos materiais são, regra geral, caracterizadas por microscopia de varrimento eletrônico (SEM) e porosimetria por intrusão de mercúrio, duas das propriedades físicas mais importantes que controlam o comportamento celular. Outro fator importante é a inter-conetividade dos poros, avaliada através de estudos de permeabilidade do fluxo de água, uma vez que permite que as células penetrem através da membrana dos poros e a difusão de nutrientes.

1.7.2. Intumescimento e Ângulos de Contacto

Um curativo ideal deve ter a capacidade de absorver exsudatos da ferida em excesso. Materiais com grande poder de absorção de água e conseqüentemente carácter hidrofílico, permitem a difusão de nutrientes, células, moléculas bioativas e resíduos. No geral, as membranas comercialmente disponíveis apresentam uma baixa capacidade de absorção de fluidos, na gama de 31 a 46%, devido à densidade da estrutura, que limita as suas aplicações a feridas com baixa produção de exsudato. Na realidade, um curativo ideal, apresenta normalmente 100-900% de absorção de água além de um elevado carácter hidrofílico (geralmente os materiais apresentam ângulos de contacto inferiores a 90°) [74,75]. No que respeita às membranas assimétricas, tais características dependem da porosidade apresentada pela subcamada da membrana que normalmente varia de 60 a 90%.

Quanto às membranas obtidas por *electrospinning*, a capacidade de absorção de água depende sobretudo do carácter hidrofílico ou hidrofóbico dos materiais utilizados. Os métodos de *electrospinning*, por proporcionarem o depósito das fibras de forma aleatória, originam membranas com uma elevada área de superfície aberta, exibindo estruturas extremamente porosas [76,77].

1.7.3. Análise das Propriedades Mecânicas

Quando se produz uma membrana para revestimento de feridas, a sua produção deve ser pensada tendo em conta a sua aplicação final, ou seja, se será usada externa (aplicação tópica para protecção de feridas cutâneas) ou internamente, já que terá que ter propriedades mecânicas específicas para ambas as aplicações. Ela deve ser flexível, e no entanto estável e forte o suficiente para proteger a

superfície da ferida ao longo do período de cicatrização. O seu manuseamento tem que ser simples, de forma a garantir o conforto do paciente [78,79].

Uma das propriedades descritas na literatura é o módulo de Young, ou módulo elástico da pele, que está dentro de uma gama de valores para ensaios de torção, extensão e de sucção. Contudo, esses valores são dependentes de diversos fatores tais como idade, cor da pele, lesões prévias e questões genéticas [80]. O módulo de Young para membranas de revestimento é dependente da espessura e porosidade do material e também das técnicas utilizadas para as produzir.

1.7.4. Atividade Antimicrobiana das Membranas

Uma propriedade que também deve ser monitorizada é a capacidade que as membranas possuem de proteger as feridas de infecções, intervindo como uma barreira contra a penetração de microrganismos. Uma morfologia assimétrica é fundamental para evitar tal penetração, visto que o tamanho dos poros disponíveis a camada densa da pele é normalmente menor do que as bactérias. Contudo, algumas bactérias podem formar colônias nas membranas e no tecido saudável circundante, e assim conseguir migrar para a ferida e conseqüentemente desencadear infecções após a lesão. Uma forma de contornar esta questão é a adição de agentes antimicrobianos às membranas, maximizando assim as propriedades antimicrobianas intrínsecas de alguns polímeros [74].

1.7.5. Vascularização

Uma das principais limitações do sucesso das construções de Engenharia de tecidos é a vascularização, condicionando o tamanho e a integração do tecido construído no local. Os tecidos, na sua grande maioria, necessitam que os substitutos, responsáveis pelo fornecimento de nutrientes, oxigênio e pela eliminação de metabolitos e outros componentes desnecessários, estejam a cerca de 200 μm de distância para possibilitar a sua difusão. Durante a construção do tecido os nutrientes podem ser fornecidos através da permanência da cultura em biorreatores. Porém, após a implantação, tal não é possível contando apenas com a capacidade de vascularização dos tecidos hospedeiros circundantes. No entanto, este é um processo muito lento o que pode resultar numa diminuição da funcionalidade e viabilidade do enxerto.

Uma estratégia para contornar este inconveniente é o uso de membranas, sejam derivadas de materiais biológicos ou biomateriais sintéticos. No que respeita à membrana biológica, trata-se de

secções de tecido descelularizado, no qual são mantidas a estrutura tridimensional bem como a rede vascular. Esta estratégia apresenta uma biocompatibilidade e geometria significativa, no entanto é difícil de reproduzir e padronizar. Quanto às membranas sintéticas, estas conferem uma superfície adequada para a adesão celular devendo também promover a vascularização. Assim, é necessária a construção de estruturas tridimensionais apropriadas, como também é necessário considerar os materiais a ser utilizados, as suas características e propriedades e as técnicas a que se vai recorrer. A vascularização e a velocidade com que esta ocorre são dependentes da porosidade e da interligação dos poros. Recorrer ao electrospinning para conceber este tipo de membranas, permite uma construção controlada, padronizada e reproduzível [27].

2. Objetivos Experimentais

2.1. Objetivos Experimentais

O trabalho desenvolvido no presente trabalho visa a preparação de membranas assimétricas compósitas para regeneração da pele. Estas membranas foram obtidas pela técnica de *electrospinning*, utilizando duas metodologias distintas: *electrospinning* de mistura e *electrospinning* coaxial. Tratando-se de membranas assimétricas, elas foram desenvolvidas em duas fases. Em primeiro lugar foram desenvolvidas as membranas que serviriam de base, ou seja, membranas constituídas por uma mistura de igual de percentagem de PCL e PLA. A esta base aderiu uma segunda camada, constituída por uma mistura de PCL e gelatina modificada, GelMA, em diferentes concentrações. Foram assim desenvolvidas as membranas assimétricas, que foram posteriormente sujeitas a diversas técnicas de caracterização. O ponto central desta dissertação foi a avaliação da performance das membranas constituídas por PCL/GelMA e GelMA (tendo sempre por base a membrana de PCL/PLA), na regeneração da pele, bem como o efeito da combinação dos polímeros na mesma matriz. Assim, tornou-se exequível a avaliação do efeito da variação da concentração da GelMA, como também confrontar as características das membranas produzidas pelas abordagens anteriormente referidas.

As técnicas às quais se recorreu para caracterizar as matrizes desenvolvidas foram 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.

De seguida são descritas as fases do trabalho experimental.

2.1.1. Abordagem experimental I

Numa primeira fase procedeu-se à preparação das membranas compósitas que seriam as bases para a segunda camada, também ela compósita. Inicialmente, os polímeros PCL e PLA foram individualmente dissolvidos numa mistura de solventes. Depois de dissolvidos procedeu-se á sua mistura em iguais proporções, até se obter uma mistura homogénea. Esta solução foi então sujeita à técnica de *electrospinning* de mistura, obtendo assim a primeira camada das membranas assimétricas constituída por fibras compósitas.

Nesta fase procedeu-se também à modificação da gelatina, utilizando um agente funcional, anidrido metacrílico, amplamente estudado para aplicações biomédicas. Seguidamente foi purificada e liofilizada para se lhe retirar toda a água existente.

2.1.2. Abordagem Experimental II

Nesta abordagem, desenvolveram-se as membranas assimétricas compósitas através de *electrospinning* de mistura, sendo as matrizes resultantes, depois sujeitas a um processo de fotoreticulação. Para tal, os polímeros necessários para a construção da segunda camada da membrana, PCL e GelMA, foram adicionados a uma mistura de solventes até se atingir a homogeneidade da solução. Esta solução foi depois sujeita ao processo de *electrospinning* para se obterem as membranas fibrosas compósitas assimétricas. Posteriormente, as membranas resultantes foram mergulhadas numa solução de Irgacure 2959[®], com o intuito de serem depois introduzidas numa câmara para sofrerem fotoreticulação, através da irradiação de luz ultra violeta (UV), apenas do lado da segunda camada com GelMA na sua composição. Através desta metodologia obtêm-se radicais livres, provenientes da dissociação das moléculas do fotoiniciador, que vão atuar nas ligações duplas de carbono presentes na gelatina modificada. Assim, inicia-se uma polimerização radicalar dos resíduos metacrílicos suspensos nas cadeias e promove-se a reticulação da gelatina.

2.1.3. Abordagem Experimental III

Esta fase de trabalho experimental é em tudo semelhante à anterior, excepção feita à técnica de produção que foi utilizada para produzir as membranas compósitas assimétricas. A técnica a que se recorreu foi o *electrospinning* coaxial, para dar origem a fibras com uma estrutura núcleo-casca. O que difere nesta técnica é o facto de serem preparadas duas soluções individuais, uma de PCL e outra de GelMA, com solventes diferentes. Depois de submetidas ao *electrospinning* coaxial, formaram-se membranas, cujas fibras possuem uma estrutura do tipo núcleo-casca. O núcleo desta estrutura é constituído por PCL e a casa por gelatina modificada. Estas membranas foram, tais como as anteriores, sujeitas a radiação UV para reticular a gelatina.

Nas últimas duas abordagens foram produzidas fibras com diferentes concentrações de PCL e GelMA, para depois testar a influência dessas variações nas fibras resultantes. Na Figura 2.1 é apresentado o esquema do trabalho experimental.

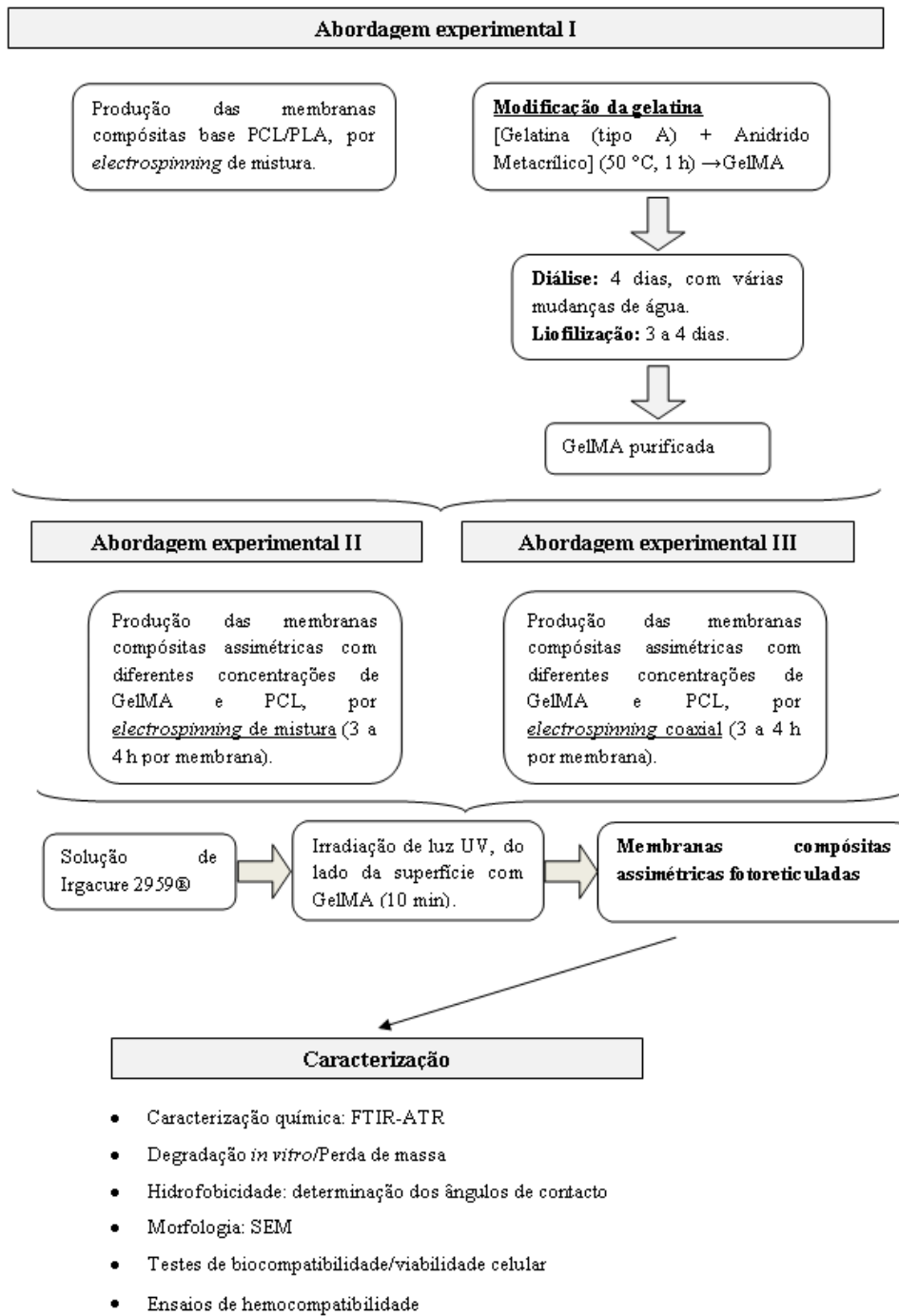


Figura 2.1 Representação esquemática do trabalho experimental.

3. Materiais e Métodos

3.1. Materiais

- Solução de PBS: o dihidrogenofosfato de potássio (KH_2PO_4) e o cloreto de sódio (NaCl) da Panreac; o cloreto de potássio (KCl) da *Sigma Aldrich*®; hidrogenofosfato disódico (Na_2HPO_4) com 99% de pureza da Fluka;
- Solventes: Clorofórmio (99,8% pureza); Dimetilformamida (DMF) com 99,8% de pureza, 2,2,2- trifluoretanol (TFE) com 99% de pureza e Ácido Acético Glacial (AAc) com 99,7% de pureza da Fisher Scientific (EUA);
- O fotoiniciador 2-hidroxi-1 [4- (2- hidroxietoxi) fenil] - 2- metil- 1- propanona (Irgacure ® 2959) com 97-99% de pureza foi adquirido à BASF (Alemanha);
- O monómero Anidrido Metacrílico (MAA) com 94% de pureza foi adquirido à *Sigma Aldrich*® (Sintra, Portugal);
- Produção de membranas: Gelatina tipo A, proveniente da pele de suíno, Policaprolactona (PCL) e Poliácido láctico (PLA) da *Sigma Aldrich*® (Sintra, Portugal);
- Testes de hemocompatibilidade: Meio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM-F12) da *Sigma Aldrich*® (Sintra, Portugal); 3- (4,5-dimethylthiazol- 2- yl) - 5- (3- carboxymethoxyphenyl) - 2- (4- sulfophenyl) - 2Htetrazolium (MTS) da Promega (Canada, EUA); Fibroblastos normais dermais humanos (NHDF) da PromoCell (Labcliclinics, S.A., Barcelona, Espanha); Sangue ACD-A de coelho, fornecido pela PROBIOLÓGICA (Empresa de produtos biológicos, Lda.) (Lisboa, Portugal).

3.2. Métodos

3.2.1. Modificação da Gelatina com Anidrido Metacrílico (Abordagem I)

Uma das etapas da primeira abordagem experimental consistiu na modificação da gelatina, funcionalizando-a com anidrido metacrílico, MAA. Na reação direta destes dois componentes, ilustrada na Figura 3.1 os grupos metacrilatos do MAA vão reagir com os grupos amina laterais da gelatina, formando gelatina metacrilamida, com ligações duplas que lhe conferem a capacidade de

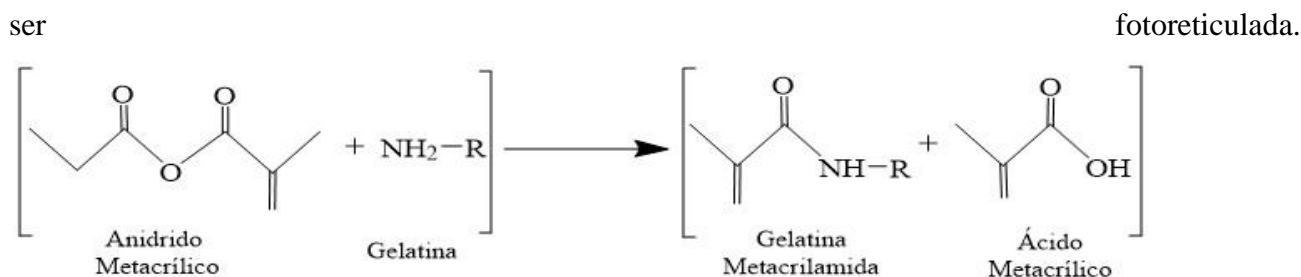
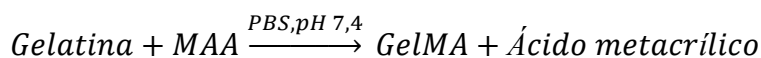


Figura 3.1 Representação da reação da gelatina com Anidrido Metacrílico.



A modificação da gelatina foi feita através da adição de 10 g de gelatina do tipo A a 100 ml de uma solução de PBS (pH=7,4). Esta dissolução foi realizada sob agitação e a uma temperatura de 50 °C. A esta solução foi depois adicionado 1 ml de anidrido metacrílico para funcionalizar a gelatina. Esta reação ocorreu durante 1 h, tempo após o qual o produto resultante foi colocado em membranas de diálise. Desta forma os subprodutos da reação, como o ácido metacrílico e outras impurezas de baixo peso molecular, foram retirados e a gelatina purificada. A purificação é necessária para garantir a segurança do uso de GelMA na regeneração da pele. As membranas com GelMA foram depois introduzidas em água destilada durante 4 dias, com constante agitação, sendo a água renovada 3 vezes ao dia durante este período. Após esta etapa, retiraram-se as membranas e a GelMA foi congelada e posteriormente liofilizada, durante 3 a 4 dias, para retirar toda a água presente.

3.2.2. Preparação das Membranas Base de PCL/PLA (Abordagem I)

Tal como foi referido anteriormente, uma das primeiras etapas do trabalho consistiu na produção de uma membrana, onde depois iria aderir uma segunda camada compósita. Foram então produzidas “em série” as membranas base para serem revestidas pela segunda camada composta por diferentes formulações de GelMA e PCL. Estas membranas fibrosas base eram compostas por 1,5 g de polímero, 50% PCL e 50% PLA. Para tal dissolveu-se individualmente 1,5 g de PCL e 1,5 g de PLA, numa mistura composta por 7 mL de clorofórmio e 3 mL de DMF, sob agitação até à dissolução total dos polímeros. O DMF funciona como condutor, propiciando o aumento da condutividade elétrica da solução polimérica, facilitando o processo de *electrospinning*, visto que maiores condutividades originam fibras mais finas. Quanto ao clorofórmio, a sua utilização é devida

à grande solubilidade de ambos os polímeros neste solvente [85]. Posteriormente, retirou-se metade de cada uma das soluções combinando-as numa única, que foi novamente agitada para obter a homogeneidade da solução com os dois polímeros.

A solução polimérica final foi então submetida ao processo de *electrospinning*, sendo introduzida numa seringa de plástico de 10 mL, que depois se acoplou numa bomba infusora, modelo NE-1000 *Multiphaser* da *New Era Pump Systems*. Para a solução ser empurrada da seringa, foi aplicado um caudal de 2,5 mL/h e para que ocorresse a formação de fibras aplicou-se uma voltagem de cerca de 17 kV provenientes da fonte de alta tensão que se encontra ligada à agulha metálica. Desta forma sucedeu-se a formação de fibras, que se depositaram no coletor plano previamente revestido com alumínio, de forma aleatória.

Este processo foi repetido as vezes necessárias para obter um número suficiente de membranas base, para posterior revestimento com a segunda camada.

3.2.3. Preparação das Membranas Assimétricas Compósitas de GelMA e PCL

A preparação das membranas assimétricas compósitas fotoreticuladas foi feita em duas etapas. Na primeira foram produzidas as membranas assimétricas compósitas de GelMA e PCL, recorrendo à técnica de *electrospinning*. Já na segunda etapa procedeu-se à fotoreticulação das mesmas. Este procedimento foi adotado para duas abordagens distintas, que tal como foi dito anteriormente, o que difere entre elas é o método de *electrospinning* a que se recorreu.

3.2.3.1. *Preparação das Membranas por Electrospinning de Mistura (Abordagem II)*

Na preparação das membranas assimétricas por *electrospinning* de mistura, dissolveram-se na mesma solução GelMA e PCL. Foram preparadas soluções com diferentes concentrações da mistura de polímeros referidos, com o intuito de verificar qual a influência da quantidade de GelMA nas propriedades finais da membrana. Assim, produziram-se várias membranas assimétricas, na qual a segunda camada é constituída por 100, 70, 50 e 30% de GelMA. Os polímeros foram dissolvidos numa mistura de solventes de trifluoretanol (TFE) e ácido acético (AAc), sob agitação e à temperatura ambiente até dissolução total de ambos os polímeros. O ácido acético é utilizado para melhorar a miscibilidade dos dois polímeros empregues, obtendo-se uma solução homogénea e por conseguinte as fibras resultantes apresentam melhores propriedades mecânicas [81]. De seguida,

para formar as fibras adotou-se o método descrito na secção anterior, bem como os mesmos equipamentos. No entanto, tratando-se de membranas assimétricas, as fibras resultantes desta solução foram depositadas sobre a camada base, previamente colocada sobre o coletor. Na Figura 3.2 é possível observar o esquema real do *electrospinning*.

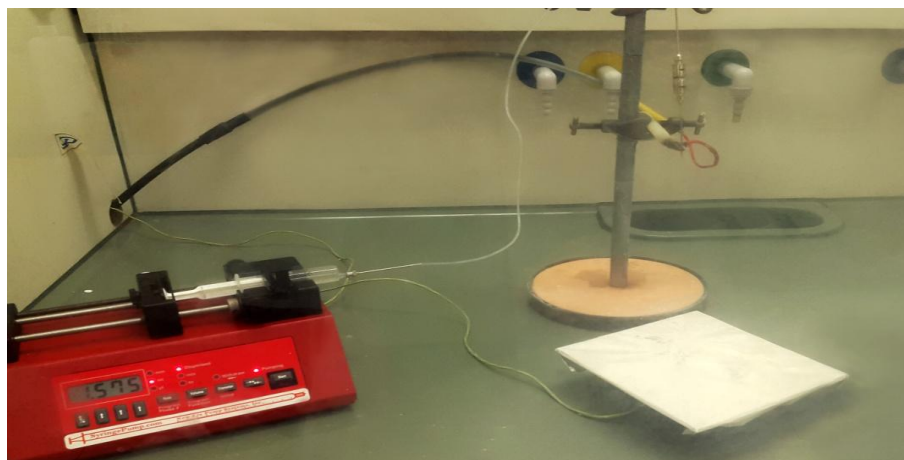


Figura 3.2 Esquema real do processo de electrospinning de mistura.

Na Tabela 3.1 estão resumidas as composições da segunda camada das membranas assimétricas, solventes, caudais e voltagens aplicadas, assim como a designação atribuída a cada membrana.

Tabela 3.1 Composição das membranas assimétricas, parâmetros associados e designações por electrospinning de mistura.*

Designação	Solventes (mL)		Polímero (g)		Parâmetros	
	TFE	Ác. Acético	GelMA	PCL	Caudal (mL/h)	Voltagem (kV)
A: 100 GelMA	8	3	1,5	-	2,5	18
B: 30GelMA-70PCL			0,45	1,05	2	19
C: 50GelMA-50PCL	8	2	0,75	0,75	2	20
D: 70GelMA-30PCL			1,05	0,45	2	19

*A informação da tabela diz respeito apenas à segunda camada da membrana, visto que a composição da primeira camada, acima referida, é constante e comum a todas as membranas.

3.2.3.2. Preparação das Membranas por *Electrospinning* Coaxial (Abordagem III)

Esta etapa do trabalho consistiu, tal como a anterior, na preparação de membranas assimétricas. Contudo, o método de produção das fibras utilizado foi o *electrospinning* coaxial. Com isto, o objetivo foi formar fibras do tipo núcleo-casca, sendo o núcleo composto por PCL e a casca por GelMA.

Foram preparadas duas soluções independentes, cada uma constituída por apenas um polímero e mais uma vez este processo foi repetido com diferentes composições de PCL e GelMA. Para formar as fibras do núcleo, a PCL foi dissolvida em TFE, já a GelMA foi dissolvida em TFE e AAc. As soluções foram dissolvidas à temperatura ambiente e com agitação mecânica. O esquema de montagem do *electrospinning* é semelhante ao descrito na secção anterior, ainda que com ligeiras diferenças. As soluções de PCL e GelMA foram colocadas no interior de duas seringas de plástico distintas, ambas com 10 mL de volume. Cada uma delas foi inserida numa bomba infusora, modelo NE-1000 *Multiphaser* da *New Era Pump Systems*. As soluções foram simultaneamente injetadas por uma agulha coaxial. O processo manteve-se a operar até ao total consumo das soluções.

O esquema de montagem está representado na Figura 3.3.

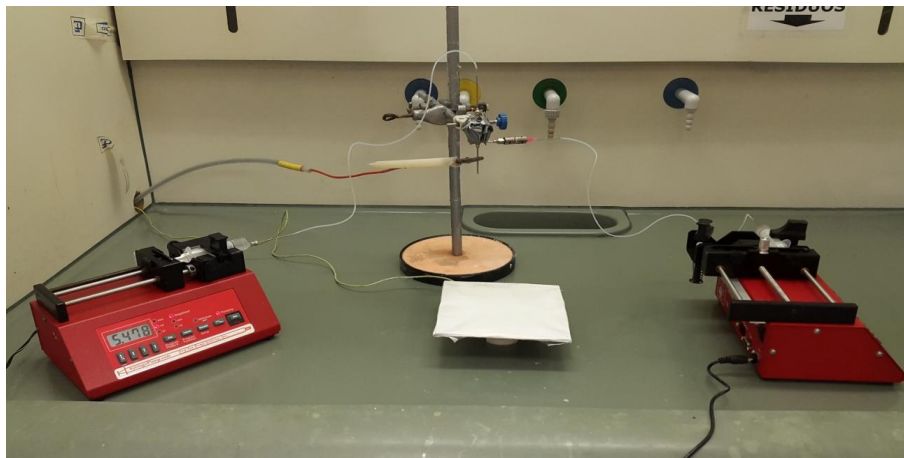


Figura 3.3 Esquema real do processo de *electrospinning* coaxial.

Na Tabela 3.2 apresentada de seguida, encontram-se as composições, caudais e voltagens aplicadas, bem como as designações atribuídas às membranas assimétricas obtidas pelo processo aqui referido.

Tabela 3.2 Composição das membranas assimétricas, parâmetros associados e designações por electrospinning coaxial.*

Designação	Polímero (g)		Solvente (mL)		Caudal (mL/h)		Voltagem (kV)
	Núcleo	Casca	Núcleo	Casca	Núcleo	Casca	
E: 30GelMA_70PCL	1,05 PCL	0,45 GelMA	12 TFE	2,4 TFE+0,6 AAC	2	0,5	18
F: 50GelMA_50PCL	0,75 PCL	0,75 GelMA	8 TFE	4,8 TFE+1,2 AAC	2	1,5	19
G: 70GelMA_30PCL	0,45 PCL	1,05 GelMA	4 TFE	7,2 TFE+1,8 AAC	1	2,5	19

* A informação da tabela diz respeito apenas à segunda camada da membrana, visto que a composição da primeira camada, acima referida, é constante e comum a todas as membranas.

3.2.3.3. Preparação das Membranas por Electrospinning por “blending”

Aquando da preparação das membranas assimétricas, ocorreu um erro na montagem do processo. Foram preparadas as soluções que seriam usadas para produzir as membranas assimétricas coaxiais. No entanto, por lapso, não foi colocada a agulha coaxial, logo as soluções foram misturadas diretamente na agulha, formando as fibras com os mesmos parâmetros do *electrospinning coaxial*. O esquema de montagem do processo é idêntico ao da Figura 3.3 e na Tabela 3.3 estão resumidos os parâmetros associados à produção destas membranas.

Tabela 3.3 Composição das membranas assimétricas, parâmetros associados e designações por *electrospinning* por “blending”.*

Designação	Sol. GelMA		Sol. PCL		Caudal (mL/h)		Voltagem (kV)
	GelMA (g)	Solvente (mL)	PCL (g)	Solvente (mL)	Sol. GelMA	Sol. PCL	
H: 50GelMA_50PCL	0,75 GelMA	4,8 TFE+1,2 AAC	0,75 PCL	8 TFE	1,5	2	19
I: 30GelMA_70PCL	0,45 GelMA	2,4 TFE+0,6 AAC	1,05 PCL	12 TFE	0,5	2	18

* A informação da tabela diz respeito apenas à segunda camada da membrana, visto que a composição da primeira camada, acima referida, é constante e comum a todas as membranas.

No total foram produzidas 9 membranas, sendo que a membrana assimétrica com 100% de GelMA foi produzida para servir de termo de comparação da sua influência nas propriedades finais das fibras. Todas as membranas são diferentes, quer pelas formulações que lhes foram aplicadas, quer pela técnica utilizada para as produzir. Além disso, foram na sua totalidade sujeitas ao processo de fotoreticulação, que será descrito seguidamente.

3.2.4. Fotoreticulação das Membranas Assimétricas

Antes de serem caracterizadas, foi necessário reticular as membranas assimétricas. Com esse intuito, foi preparada uma solução com 250 mg de um fotoiniciador em 250 mL de água miliQ. O fotoiniciador usado foi o Irgacure® 2959 por apresentar baixa toxicidade [82]. Uma vez exposto a luz UV, vai formar radicais que quebram a ligação dupla C=C existente na GelMA, dando início a uma polimerização radicalar dos resíduos metacrilamida existentes na cadeia da gelatina. Desta forma, as várias cadeias ficam ligadas quimicamente.

As membranas resultantes foram recortadas em pequenos quadrados com cerca de 3cm² e posteriormente mergulhadas nesta solução, sendo depois levadas a uma câmara UV para se dar a fotoreticulação da GelMA incorporada nas membranas. O modelo da câmara usada foi UVGL-48, *Multiband UV*, da *Mineral light® Lamp*. As amostras foram irradiadas com luz UV com comprimentos de onda compreendidos entre 254-354 nm, durante 10 min e apenas na superfície com gelatina na sua constituição. Depois de fotoreticuladas, as membranas foram lavadas com água destilada para eliminar quaisquer vestígios do fotoiniciador.

O passo seguinte foi levar as amostras a uma estufa de vácuo, a temperatura ambiente durante 2 dias para ficarem totalmente secas e em condições para serem caracterizadas.

Na Figura 3.4 está ilustrado o processo de fotoreticulação e preparação das membranas para caracterização.

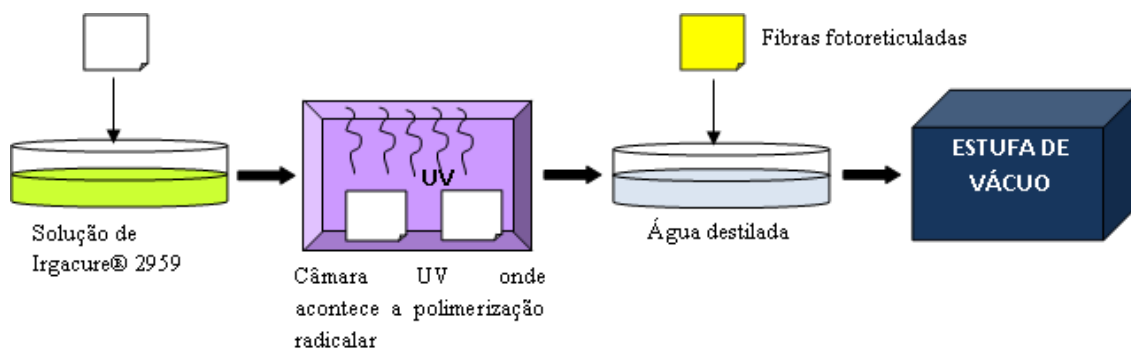


Figura 3.4 Representação do processo de separação das membranas para caracterização.

3.3. Caracterização das Membranas Assimétricas

Após o desenvolvimento das várias membranas assimétricas, procedeu-se à avaliação das suas propriedades. Foram estudadas propriedades morfológicas, estrutura de superfície, entre outras que aqui serão descritas. Para tal recorreu-se a diversas técnicas de caracterização, cujos fundamentos teóricos serão seguidamente enunciados.

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

A técnica ATR-FTIR é uma técnica essencial e largamente utilizada para caracterizar compostos químicos, pois permite identificar a presença de grupos funcionais ou ligações químicas das amostras sujeitas a análise. Tem-se como uma técnica de funcionamento relativamente simples, versátil, rápida e eficaz [58]. A ATR-FTIR dá uso ao fenómeno de reflexão interna total no interior de um cristal, que se encontra em contacto com a amostra a analisar [83]. O seu princípio de funcionamento consiste num feixe de infravermelho (IV), que incide na amostra, e cuja energia é absorvida pelos grupos funcionais que compõe a amostra apenas e só na frequência que lhes é característica. O sinal resultante é depois objeto da Transformada de Fourier, que permite obter o espetro e assim revelar informações da superfície da amostra [58].

Esta análise foi realizada num espectrofotómetro *Jasco FT/IR-4200* equipado com um *Golden Gate Single Reflection Diamond ATR*. Os espectros foram obtidos a 128 scans com uma resolução de 4 cm^{-1} .

3.3.2. Degradação *in vitro*/Estudos de Perda de Massa

Na caracterização das membranas assimétricas foram efetuados estudos de perda de massa. Este estudo é de relativa importância, na medida em que permite verificar a eficácia do processo de reticulação. Por outras palavras, uma baixa perda de massa indica uma reticulação eficaz. Para a realização destes testes foram incubadas amostras de membranas fotoreticuladas e não fotoreticuladas, que serviram de controlo. A incubação foi feita numa solução de PBS (tampão fosfato salino), durante 3 dias numa estufa a 37 °C. Findo este período, as amostras foram lavadas com água destilada e secas à temperatura ambiente sob vácuo.

A perda de massa percentual foi quantificada através da Equação 3.1.

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

em que W_0 representa o peso inicial da amostra e W_t o peso final depois da incubação e secagem.

3.3.3. Determinação dos Ângulos de Contacto Dinâmicos

A determinação dos ângulos de contacto ou molhabilidade da superfície é um elemento importante, uma vez que permite avaliar a hidrofobicidade (ou hidrofiliabilidade) da superfície do material. A importância desta propriedade é importante devido ao facto de poder afetar, por exemplo, a migração e a viabilidade das células.

Na determinação deste parâmetro recorreu-se ao equipamento OCA 20 da *Dataphysics*. Através deste, uma gota de água destilada é deixada cair na superfície da amostra, enquanto ocorre a gravação do seu perfil até que estabilize, ou seja totalmente absorvida. Recorrendo às imagens, o equipamento calcula automaticamente o ângulo de contacto que se forma entre a gota e a superfície da membrana. Mais uma vez, as diferentes percentagens de GelMA permitem avaliar qual a influência da sua incorporação nas membranas.

3.3.4. Microscopia Eletrónica de Varrimento (SEM)

A microscopia eletrónica de varrimento é um método amplamente utilizado para visualizar e estudar a morfologia e composição da superfície de uma amostra. O seu princípio de funcionamento consiste num feixe de eletrões, que se faz incidir numa determinada zona da amostra. O resultado

dessa interação é uma emissão de raios-x que são depois detetados pelo equipamento sendo então obtidas as imagens da superfície. Relativamente à técnica, é de salientar a necessidade de um passo prévio, que é o revestimento da superfície da amostra com uma camada fina de ouro, para que se torne condutora.

Através deste método foram analisadas todas as membranas assimétricas fotoreticuladas, de modo a verificar, mais uma vez, qual a influência da concentração de GelMA.

Os testes foram realizados no Instituto Pedro Nunes (IPN) e as imagens obtidas têm uma ampliação de 250x, 500x, 2000x, 1 000x, 5 000x e 10 000x. Estas ampliações permitiram depois fazer uma estimativa do diâmetro médio das fibras.

3.3.5. Hemocompatibilidade

Tendo em conta que o objetivo final da aplicação das membranas é o revestimento de feridas, é importante avaliar o seu potencial biomédico e realizar estudos *in vitro* quanto à interação destas com o sangue. Com este intuito, procedeu-se à avaliação da trombogenicidade e do índice hemolítico. O primeiro diz respeito à capacidade do material proporcionar a formação de trombos. O segundo é um indicador da hemoglobina (Hb) que se liberta para o plasma, tendo em conta a norma *International Standard Organization (ISSO) 10993-4 Biological Evaluation of Medical Devices* (1999). Os ensaios foram realizados com sangue de coelho (sangue ADC-A), fornecido pela PROBIOLÓGICA.

3.3.5.1. *Avaliação da Trombogenicidade*

A avaliação do potencial trombogénico das membranas sintetizadas foi realizada recorrendo ao método gravimétrico de *Imai e Nose*, que permite contabilizar a massa de coágulos formada na superfície da membrana após entrar em contacto com o sangue. Para tal prepararam-se amostras, com dimensões semelhantes e em triplicado e posteriormente colocaram-se em caixas de Petri de vidro. A cada amostra adicionou-se 250 µL de sangue ACD-A de coelho e a mesma quantidade foi adicionada a caixas de Petri de vidro vazias, para servir de controlo positivo, dada a elevada trombogenicidade do vidro. Atribui-se o valor 100% ao controlo positivo. A coagulação teve início a partir da adição de 25 µL de uma solução de CaCl₂ 0,1M às amostras previamente preparadas. Posto isto, as amostras colocaram-se numa estufa durante 40 min a 37 °C. Terminado esse tempo,

retiraram-se as amostras e adicionaram-se-lhes 5 mL de água destilada para interromper o processo de coagulação. As soluções resultantes foram depois sujeitas a filtração por vácuo e adicionou-se aos coágulos 1 mL de uma solução de formaldeído a 36,5%, fixando assim os trombos no papel de filtro. Posteriormente, esses papéis de filtro foram levados à estufa durante 24h, também a 37 °C. Passado esse tempo, os coágulos foram pesados (o papel de filtro foi previamente pesado e identificado antes da realização dos testes).

A percentagem de massa de coágulos formada foi calculada segundo a Equação 3.2.

$$\text{Massa de coágulo formada (\%)} = \frac{m_{\text{amostra}} - m_{\text{controlo negativo}}}{m_{\text{controlo positivo}} - m_{\text{controlo negativo}}} \times 100 \quad 3.2$$

M_{amostra} é a massa do coágulo formada, que se obtém pela diferença da massa inicial e final do papel de filtro. A $m_{\text{controlo negativo}}$ traduz a média da massa dos coágulos formados nos controlos negativos e $m_{\text{controlo positivo}}$ representa a média da massa de coágulos formados nos controlos positivos.

3.3.5.2. Determinação do Índice Hemolítico

A realização dos testes de hemólise teve como objetivo a determinação da percentagem de hemólise que as membranas incutem nos glóbulos vermelhos quando entram em contacto com o sangue. Permite avaliar a interação das membranas com o sangue provoca a libertação de hemoglobina para o plasma [84]. Os testes foram executados de acordo com a norma *American Society for Testing and Materials* (ASTM) F 756-00. Segundo esta, a percentagem hemolítica é determinada com base na quantidade de hemoglobina (Hb) que se liberta para o plasma quando as amostras da membrana se colocam em contacto com uma solução de sangue diluído. A norma referida classifica os materiais como hemolíticos se o índice hemolítico for superior a 5%, como ligeiramente hemolíticos se o índice estiver entre 2 a 5% e finalmente, os materiais com um índice inferior a 2% são considerados não hemolíticos.

Para a realização dos ensaios colocaram-se as amostras em contacto direto com o sangue de coelho ACD-A. Para tal prepararam-se amostras com 21cm² de área superficial, que foram depois cortados e colocados em tubos de Falcon, onde se adicionaram 7 mL de sangue ACD-A previamente diluído para fazer a incubação. Foi também necessário preparar os controlos positivo e negativo. O controlo

positivo foi preparou-se adicionando 1 mL de sangue ACD-A a 6 mL de água destilada. Já o controlo negativo foi preparado adicionando 1 mL de sangue ACD-A a 6 mL de PBS. Posteriormente, colocaram-se as amostras na estufa a 37 °C por 3h, período durante o qual se inverteu delicadamente os tubos, em intervalos de tempo de 30 min, de modo a garantir o melhor contacto entre os materiais e o sangue.

Após as amostras incubadas, o passo seguinte foi centrifugá-las a 2100 rpm durante 15 min. Com a centrifugação, revelou-se o sobrenadante de cada amostra, que se utilizou para determinar a quantidade de hemoglobina presente, pela medição das absorvâncias a um comprimento de onda 540 nm, fazendo uso do espectrofotómetro *UV-Vis Jasco V-550*.

A percentagem hemolítica foi calculada segundo a Equação 3.3.

$$\%Hemólise = \frac{Hb_{amostra} - Hb_{controlo\ negativo}}{Hb_{controlo\ positivo} - Hb_{controlo\ negativo}} \times 100 \quad 3.3$$

$Hb_{amostra}$ representa a quantidade de hemoglobina presente no sobrenadante da amostra, $Hb_{controlo\ positivo}$ e $Hb_{controlo\ negativo}$, representa, tal como o nome indica, a quantidade de hemoglobina presente nos controlos positivo e negativo.

3.3.6. Biocompatibilidade

Biocompatibilidade entende-se como a capacidade de um material não induzir danos enquanto desempenha a sua função no organismo, não danificando os órgãos ou tecidos envolventes [85]. No que respeita à Engenharia de Tecidos, biocompatibilidade é definida como a capacidade da membrana ter função de substrato, promovendo a migração das células para os locais com tecido danificado.

Para avaliar a biocompatibilidade dos materiais desenvolvidos, foi essencial desenvolver ensaios *in vitro*, de modo a avaliar esta propriedade de uma forma rápida e sem recurso a testes em animais. Então, a biocompatibilidade foi avaliada recorrendo a um teste de viabilidade celular e além disso, foi também determinada a atividade antibacteriana dos materiais. Ambos os testes foram realizados na Universidade da Beira Interior (UBI, Covilhã), sendo que para a realização do teste da

viabilidade celular foi adotado o método do MTS (3- (4, 5- dimethylthiazol- 2- yl)- 5- (3- carboxymethoxyphenyl)-2-(4- sulfophenyl)- 2H- tetrazolium)).

3.3.6.1. Viabilidade celular

Com o intuito de avaliar o perfil citotóxico das membranas assimétricas desenvolvidas, procedeu-se ao teste MTS de acordo com as diretrizes padrão da ISO10993-5. As amostras foram colocadas em placas de 96 poços (n=5) e sujeitas à radiação UV durante 1h para serem esterilizadas. Posteriormente as células foram semeadas com uma densidade de 1×10^4 células por poço em contacto com o material e incubadas por 1, 3 e 7 dias. Depois de terminado cada período de incubação, meio de cultura foi removido e substituído por 100 μ L de novo meio e 20 μ L de MTS/PMS. Em seguida, incubaram-se as células durante 4h a 37 °C numa atmosfera com 5% de CO₂. Finalmente, foram medidas as absorvâncias, num espectrofotómetro de microplacas (Biorad xMark), a um comprimento de onda de 492 nm. As células cultivadas na ausência de membranas foram usadas como controlo negativo (K⁻) e as células em cultura com etanol (90%) foram utilizadas como controlo positivo (K⁺).

3.3.6.2. Adesão celular

A adesão e proliferação dos fibroblastos dermais humanos à superfície dos materiais, foram caracterizadas por SEM. Após a incubação nas condições atrás descritas, fixaram-se as amostras usando 2,5 % (v/v) de glutaraldeído. De seguida, as amostras foram lavadas em PBS, congeladas em azoto líquido e liofilizadas durante 3h. Posteriormente, as amostras foram revestidas cm ouro através de um revestidor por crepitação (*Quorum Q150R ES*). As imagens SEM foram adquiridas a uma tensão elétrica de 20kV, recorrendo a um microscópio eletrónico de varrimento (*Hitachi S-3400N*).

3.3.6.3. Atividade antibacteriana

A atividade bactericida das amostras foi estudada, colocando as amostras em contacto com a bactéria gram-positiva *Staphilococcus Aureus* (*S.Aureus*). Na realização dos ensaios antimicrobianos recorreu-se ao método de Kirby-Bauer modificado. Foram dispersos numa placa de ágar cerca de 200 μ L de meio LB-Broth contendo *S. aureus* (1×10^8 unidades formadoras de colónias/ml).

Posteriormente, foram usadas amostras circulares das membranas (n=3) para colocar em placas de ágar e incubadas durante 24 e 48h a 37 °C.

4. Resultados e Discussão

4.1. Desenvolvimento das Membranas Assimétricas

As diferentes membranas assimétricas desenvolvidas neste trabalho tiveram como principal objetivo a sua utilização como revestimento de feridas para regeneração da pele. Estas foram preparadas em duas fases, como já referido anteriormente. Na primeira combinaram-se os polímeros sintéticos PCL e PLA para produzir a base das membranas, por *electrospinning* de mistura. Na segunda fase foram combinados os polímeros PCL e gelatina do tipo A, que foi previamente modificada para posterior incorporação nas membranas, também por *electrospinning* (de mistura e coaxial), tal como descrito nas abordagens I e II.

A primeira etapa do trabalho consistiu então na produção “em série” das bases e paralelamente, na modificação da gelatina do tipo A. Esta modificação deu-se pela reação desta gelatina com o anidrido metacrílico, obtendo-se a gelatina metacrilamida, ou GelMA. Com este procedimento, garante-se a presença de ligações duplas na gelatina que lhe proporciona a capacidade de ser fotoreticulada.

De seguida, foram então produzidas as diferentes membranas assimétricas por *electrospinning* de mistura e coaxial. Todas as membranas desenvolvidas foram sujeitas ao processo de fotoreticulação, sendo primeiramente mergulhadas numa solução aquosa do fotoiniciador Irgacure 2959® e posteriormente introduzidas numa câmara com luz UV. Assim, a GelMA incorporada nas fibras foi reticulada, impedindo-se a sua solubilização em condições fisiológicas. Imediatamente após terem sido irradiadas com luz UV foi possível observar as alterações no aspeto visual das membranas. Na totalidade, as membranas ficaram com um tom amarelado, mais intenso nas membranas com maior proporção de gelatina e mais ténue nas proporções mais baixas, sendo que a membrana com maior alteração visual foi a constituída por 100% GelMA na segunda camada.

As membranas desenvolvidas pelas diferentes estratégias foram então caracterizadas e os seus resultados analisados, tendo em conta o objetivo da sua aplicação. Nos próximos subcapítulos serão apresentados e comentados esses resultados, pela mesma ordem que foram descritas as técnicas de caracterização.

4.2. Caracterização Química por ATR-FTIR

De forma a verificar se a fotoreticulação das membranas assimétricas desenvolvidas no presente trabalho foi efetuada com sucesso, recorreu-se à técnica ATR-FTIR visto que esta permite a identificação dos grupos químicos presentes nas amostras. É de salientar que todas as membranas têm GelMA na sua composição e por conseguinte, através desta técnica foi possível verificar se a fotoreticulação ocorreu efetivamente, pela identificação dos seus grupos característicos.

A gelatina é um polímero proteico proveniente da pele de suíno, que é constituída por aminoácidos ligada através de ligações amida [87-89]. Estas ligações, mais especificamente amida A e B e amida do tipo I, II e II, possuem bandas de absorção muito características, que se apresentam resumidas na Tabela 4.1.

Tabela 4.1 Bandas características do espectro infravermelho das ligações amida.

Designação	Frequência (cm ⁻¹)	Grupo Funcional
Amida A	3300	Elongação dos grupos O-H
Amida B	3100	Elongação dos grupos C-H
Amida I	1600 – 1690	Elongação C=O
Amida II	1480 - 1575	Elongação C-N Deformação N-H
Amida III	1229 – 1301	Elongação C-N Deformação N-H

Considerando a Tabela 4.1, analisaram-se os espectros obtidos por ATR-FTIR das membranas cuja segunda camada é 100% GelMA em várias fases, antes e depois da fotoreticulação e após a incubação em PBS. Estes espectros estão ilustrados na Figura 4.1 e para uma melhor leitura dos resultados, são também apresentados na Tabela 4.2

Tabela 4.2 Bandas correspondentes à GelMA antes e depois do processo de fotoreticulação e após incubação em PBS*.

Designação	100GelMA [Frequência (cm ⁻¹)]	100GelMA_reticulada [Frequência (cm ⁻¹)]	100GelMA_reticulada e incubada [Frequência (cm ⁻¹)]
Amida A	-	3285	3304
Amida B	2945	2919	3052
Amida I	1725	1651	1627
Amida II	1551	1544	1546
Amida III	1180	1241	1237

*É de referir que após a incubação em PBS as amostras secaram à temperatura ambiente sob vácuo.

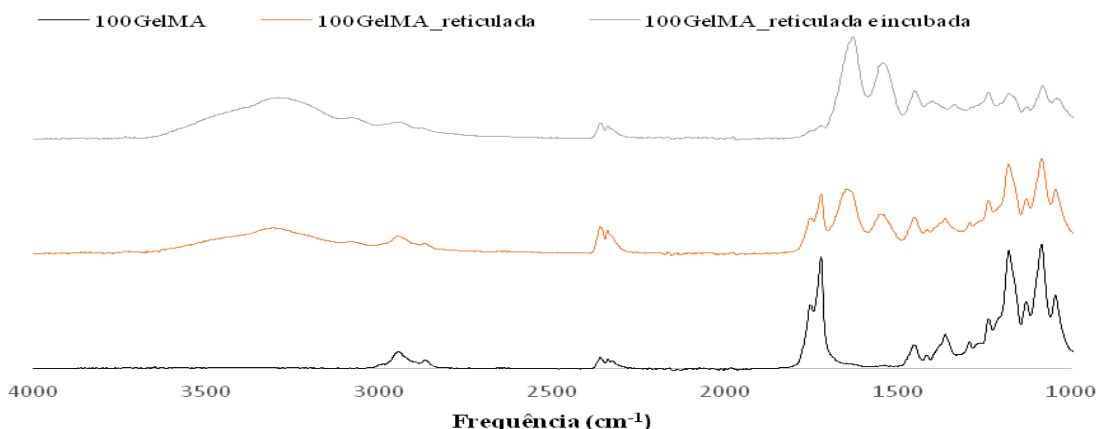


Figura 4.1 Espectro de ATR-FTIR das membranas com 100 % GelMA antes e depois da fotoreticulação e após incubação.

Analisando então a Figura 4.1 e a Tabela 4.2 pode afirmar-se que estão presentes as ligações da gelatina na GelMA e na GelMA fotoreticulada e incubada, logo a modificação da gelatina bem como a fotoreticulação não alterou a sua constituição base.

Verifica-se que a caracterização por ATR-FTIR à membrana original com 100% GelMA não tem a banda característica da Amida A, o que se pode dever ao local que foi sujeito a análise. Ou seja, a membrana pode não ser uniforme, devido à dispersão de fibras que ocorre aquando da deposição das fibras no coletor e pode ter sido analisado um ponto que foi influenciado pela camada base constituída por PCL e PLA. Até porque as amostras desta membrana que foram reticuladas e incubadas, tal como se pode observar possuem esta a banda característica desta amida, 3285 cm⁻¹ e 3304 cm⁻¹ (elongamento O-H) na amostra reticulada e incubada respetivamente.

A banda relativa à Amida B é também observada nas 3 amostras, como se comprova pela Tabela 4.2, todas próximas dos 3100 cm⁻¹ característicos desta banda. O mesmo se verifica para as bandas características das Amidas I, II e III.

A finalidade desta caracterização foi apurar se a GelMA foi de facto reticulada pela irradiação UV. Para tal no espectro da GelMA deveriam constar as ligações C=C, adicionadas pela modificação com Anidrido Metacrílico. Posteriormente à fotoreticulação, era expectável o desaparecimento dessa banda. No entanto não se verificou esse facto, uma vez que não foi possível observar a presença da ligação C=C. A frequência típica desta banda está dentro do intervalo 1600-1640 cm⁻¹, que se

sobrepõe à banda da Amida I e como tal não é possível verificar a sua presença na amostra original 100GelMA nem a sua ausência após fotoreticulação e incubação.

Depois da averiguação do sucesso da fotoreticulação, ainda que tenham sido obtidos resultados que não eram os idealmente esperados, procedeu-se à caracterização das restantes membranas desenvolvidas com várias concentrações de GelMA e PCL.

Na Figura 4.2 estão representados os espectros das membranas assimétricas compósitas, cuja segunda camada é constituída por GelMA e PCL em diferentes proporções, produzidas por electrospinning de mistura e na Figura 4.3 estão os espectros das mesmas após a fotoreticulação.

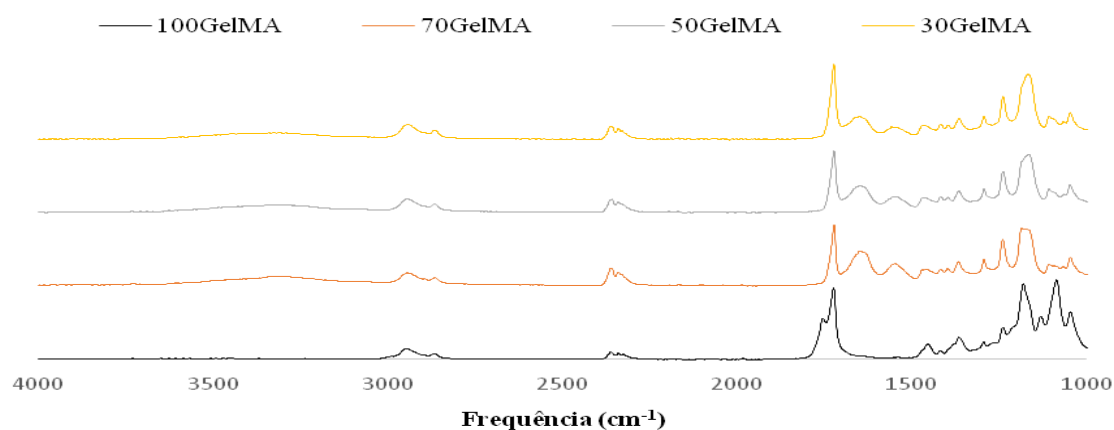


Figura 4.2 Espectros obtidos por ATR-FTIR das membranas assimétricas compósitas de controlo, produzidas por electrospinning de mistura, constituídas por 100GelMA e com 70, 50 e 30% GelMA.

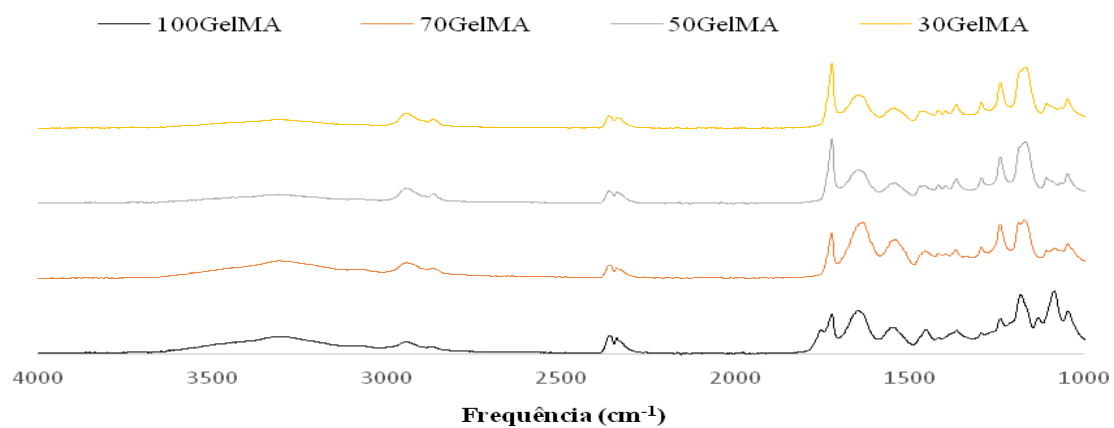


Figura 4.3 Espectros obtidos por ATR-FTIR das membranas assimétricas compósitas fotoreticuladas, produzidas por electrospinning de mistura, constituídas por 100GelMA e com 70, 50 e 30% GelMA.

Comparando os dois gráficos, verifica-se que alguns picos são mais bem definidos antes da fotoreticulação, logo este processo pode ter influenciado a intensidade dessas bandas características.

Olhando agora para os espectros das membranas assimétricas compósitas fotoreticuladas, retira-se que seja qual for a concentração de GelMA, em todos os espectros se verificam as bandas características quer da PCL quer da GelMA. Em todas as membranas acima referidas se encontra a ligação C=O a cerca de 1724 cm^{-1} , o que indica que a PCL está presente nas fibras visto esta ligação ser característica dos ésteres. Duas bandas que corroboram também a presença da PCL são a cerca de 2940 cm^{-1} e 2864 cm^{-1} , correspondendo respetivamente às vibrações de alongamento simétrico e assimétrico dos seus grupos CH_2 , ainda que o pico correspondente ao alongamento assimétrico seja ténue em qualquer uma das amostras.

Relativamente às Amidas A e B não foi possível retirar uma conclusão assertiva, uma vez que apenas se denota uma ligeira curva na frequência dos 3300 cm^{-1} , não se podendo assim afirmar a sua presença nas amostras compósitas. No entanto ainda que ténue, essa curva é mais evidente na membrana com 100% GelMA, o que era de esperar, não fosse esta uma banda típica da gelatina.

Quanto à Amida I, na região dos 1640 cm^{-1} encontra-se o pico característico relativo ao alongamento dos grupos carbonilo. A existência da Amida II é também confirmada pelo pico existente na zona de 1540 cm^{-1} , que resulta do alongamento do grupo C-N e da deformação dos grupos N-H.

Por último, não foi possível confirmar a presença da Amida III, visto que a banda que lhe corresponde se encontra sobreposta à da PCL na zona dos 1235 cm^{-1} .

Fazendo agora referência à influência da proporção de GelMA nos espectros das diferentes amostras, pode concluir-se que quanto maior for a sua concentração mais marcados são os picos das bandas que tipicamente lhes correspondem. Por sua vez, são menos intensos os picos característicos da PCL à medida que aumenta a concentração de GelMA, o que vai de encontro ao esperado.

As membranas assimétricas compósitas produzidas por electrospinning coaxial foram também caracterizadas e na Figura 4.4 e 4.5 encontram-se ilustrados os espectros obtidos - mais uma vez com diferentes proporções de GelMA e PCL - antes e após a fotoreticulação respetivamente. O espectro da membrana 100GelMA é aqui apenas considerado como referência para as bandas da gelatina, visto

que sendo constituída por 100% GelMA na segunda camada apenas foi produzida por electrospinning de mistura.

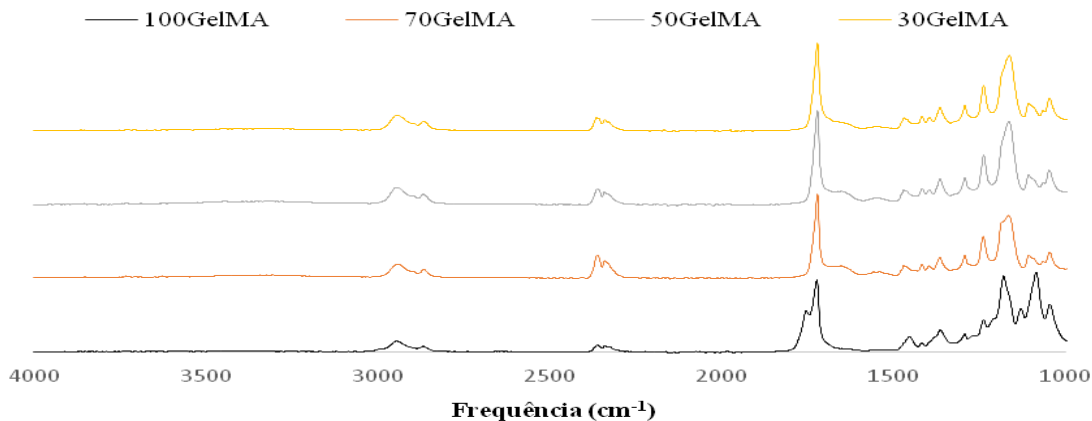


Figura 4.4 Espectros obtidos por ATR-FTIR das membranas assimétricas compósitas de controlo, produzidas por electrospinning coaxial, constituídas por 100GelMA e com 70, 50 e 30% GelMA.

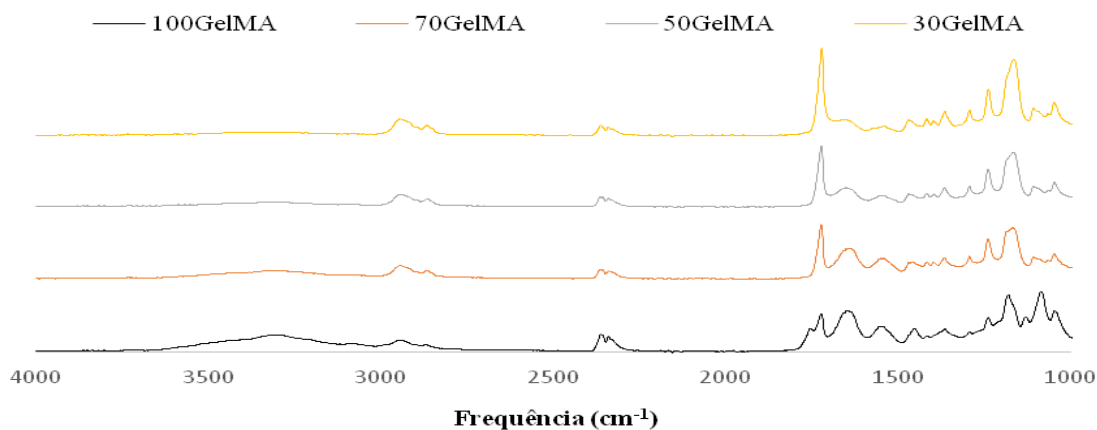


Figura 4.5 Espectros obtidos por ATR-FTIR das membranas assimétricas compósitas fotoreticuladas, produzidas por electrospinning coaxial, constituídas por 100GelMA e com 70, 50 e 30% GelMA.

Observando a Figura 4.4 e a 4.5, à semelhança dos espectros obtidos nas membranas produzidas por electrospinning coaxial, a intensidade das bandas características dos polímeros é superior antes da fotoreticulação.

Mais uma vez se verifica que em todas as membranas assimétricas compósitas, se encontram as bandas características dos dois polímeros utilizados para a conceção da segunda camada das membranas, GelMA e PCL.

A banda característica dos ésteres, inerente ao grupo C=O, é visível a cerca de 1719 cm^{-1} , confirmando assim a presença da PCL. É de salientar também que esta banda é mais intensa à medida que é maior a concentração de PCL nas fibras, o que era expectável. Além disso, são observáveis também na zona dos 2940 cm^{-1} e 2870 cm^{-1} , respetivamente as bandas relativas ao alongamento simétrico e assimétrico dos grupos CH_2 , ainda que com picos pouco acentuados. Por sua vez, a 1163 cm^{-1} e de uma forma relativamente acentuada, encontra-se a banda referente ao alongamento simétrico C-O-C. Então, fica assim comprovada a existência da PCL nas membranas fibrosas coaxiais estudadas. É novamente de salientar que esses picos são mais evidentes à medida que é menor a concentração de GelMA na formulação das membranas.

Prestando agora atenção às bandas características da gelatina, no que às Amidas A e B diz respeito, não foi possível verificar a sua presença em nenhuma das membranas compósitas coaxiais desenvolvidas. Segundo a literatura deveriam existir picos na zona dos 3300 cm^{-1} para a Amida A, bem como na zona dos 3100 cm^{-1} para a Amida B. Apesar destas bandas não terem sido detetadas, tendo em conta a amostra com 100GelMA, este resultado era já esperado. Nesta, como se pode verificar na Figura 4.4, não existem logo à partida estas bandas e o mesmo se verifica na Figura 4.5 (apesar de existir uma ligeira curva nas regiões descritas). Tendo as membranas compósitas uma concentração de gelatina sucessivamente inferior, ainda que não sejam os resultados ideais, previa-se desde logo que as bandas das Amidas A e B não seriam visíveis, o que acaba por ser concordante.

Relativamente às Amida I e II, os seus picos são observados respetivamente na região dos 1630 cm^{-1} e dos 1539 cm^{-1} . Tal como era de esperar, as bandas vão perdendo definição à medida que a proporção de gelatina diminui. É de notar que na membrana 30GelMA_70PCL, a banda relativa à amida II não foi verificada pois apenas se observa uma curva ligeira nessa região.

Quanto à Amida III, a sua banda característica foi detetada na região dos 1241 cm^{-1} .

Tal como foi referido anteriormente, quando se procedeu ao desenvolvimento das membranas assimétricas coaxiais, ocorreu num erro que foi a não colocação da agulha coaxial. Portanto foram produzidas membranas, cujas soluções poliméricas usadas foram misturadas diretamente na agulha de electrospinning, e por isso esta técnica denominou-se por electrospinning por “blending”. Foram produzidas duas membranas por esta “técnica”: 50GelMA_50PCL e 30GelMA_70PCL. Essas

membranas foram também analisadas por FTIR e os resultados da sua caracterização são apresentados na Figura 4.6.

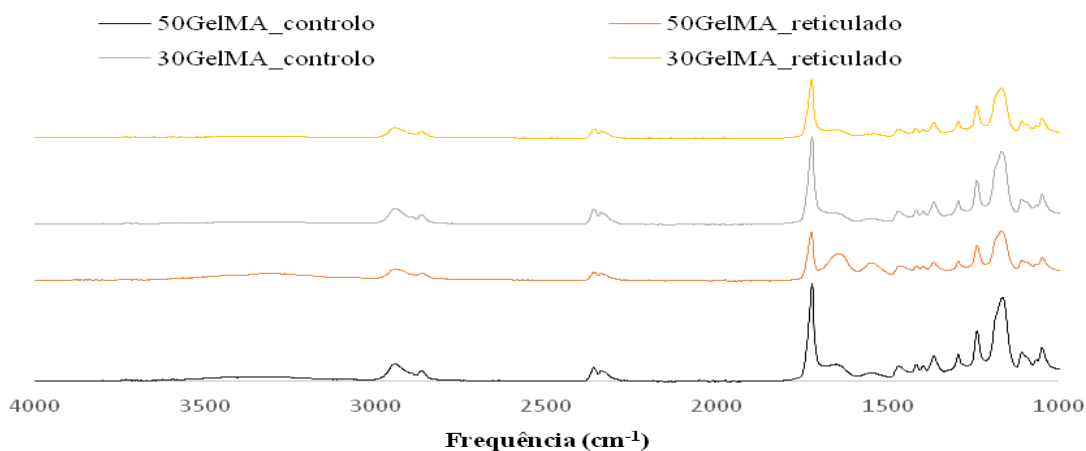


Figura 4.6 Espectros obtidos por ATR-FTIR das membranas assimétricas compósitas de controlo e fotoreticuladas, produzidas por electrospinning de “blending”, constituídas por 100% GelMA e com 50 e 30% GelMA.

Analisando a Figura 4.6, verifica-se novamente que à medida que a concentração de gelatina modificada diminui a intensidade das suas bandas características também diminui. À semelhança das membranas analisadas anteriormente, verifica-se também a existência das bandas características da PCL e da GelMA e que além disso, estas são mais intensas pré-fotoreticulação.

Na região dos 1725 cm^{-1} encontra-se a banda característica dos ésteres (grupo $\text{C}=\text{O}$), mostrando assim que a PCL está efetivamente presente na amostra. Na zona dos 2940 cm^{-1} e dos 2840 cm^{-1} observam-se as bandas típicas do alongamento simétrico e assimétrico dos grupos CH_2 , respetivamente. No entanto estes picos são pouco evidentes e o do alongamento assimétrico não permite tirar conclusões assertivas. Visto estar ser apenas observável um pico muito ligeiro. Quanto ao grupo $\text{C}-\text{O}-\text{C}$, é visível a existência do seu pico a cerca de 1160 cm^{-1} .

Pode-se concluir que a PCL está presente. Contudo, ao contrário do que seria de esperar, os seus picos típicos são mais evidentes na amostra com menor concentração de PCL, ou seja, são mais evidentes na amostra 50GelMA_50PCL.

Relativamente às bandas características da gelatina, a das Amidas A e B também não é visível nestas amostras.

Fazendo agora referência às Amidas I e II, na região dos $1600\text{ a }1690\text{ cm}^{-1}$ e dos $1480\text{ a }1575\text{ cm}^{-1}$, deveriam estar respetivamente as suas bandas típicas. Porém isso não se verifica, tanto nas amostras

de controlo como nas fotoreticuladas. A 1230 cm^{-1} , é visível um ligeiro pico, que mesmo sendo típico da Amida III não é prova da sua existência pois está sobreposto com a banda da PCL.

Relativamente às Amida I e II, os seus picos são observados respetivamente na região dos 1630 cm^{-1} e dos 1539 cm^{-1} . Tal como era de esperar, as bandas vão perdendo definição à medida que a proporção de gelatina diminui. É de notar que na membrana 30GelMA_70PCL, a banda relativa à amida II não foi verificada pois apenas se observa uma curva ligeira nessa região.

Quanto à Amida III, a sua banda foi detetada na região dos 1241 cm^{-1} em todas as amostras analisadas.

Não é possível tirar qualquer conclusão quanto à influência da gelatina modificada. Ainda que o aspeto visual das membranas desenvolvidas desta forma fosse bastante satisfatório, a sua caracterização não é de todo conclusiva. Além disso, aquando do seu processamento as soluções poliméricas não esgotaram em simultâneo, sendo que um deles foi consumido em excesso. Mais ainda, não foi possível retirar ilações acerca da homogeneidade das membranas, nem de como as fibras foram formadas tendo em conta que as soluções foram misturadas diretamente na agulha.

4.3. Estudos de Perda de Massa

Com o intuito de avaliar de forma quantitativa o êxito da fotoreticulação, fez-se um estudo da perda de massa durante 3 dias. Quanto menores os valores obtidos, mais eficaz terá sido a reticulação. Na Figura 4.7 encontra-se a representação gráfica dos resultados da perda de massa das membranas assimétricas fotoreticuladas e das de controlo (não fotoreticuladas). Estes resultados dizem respeito à média das amostras, que foram analisadas em triplicado quer para os controlos quer para os fotoreticulados.

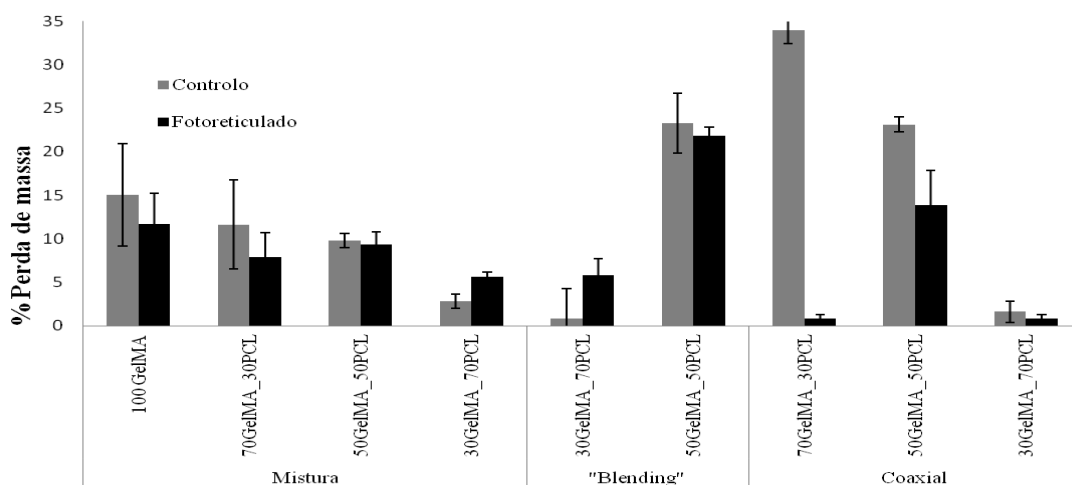


Figura 4.7 Perda de massa em solução tampão fosfato (pH = 7,4), das membranas assimétricas produzidas por diferentes metodologias de *electrospinning*, com diferentes formulações de GelMA/PCL.

Pela análise da Figura 4.7 é possível retirar que as membranas fotoreticuladas, de uma forma geral, sofreram menor perda de massa que as de controlo. Logo, prova-se que o processo de fotoreticulação foi eficiente, bem como a estabilidade dessas fibras em ambiente fisiológico. Além disso, pode ainda afirmar-se que a gelatina foi efetivamente modificada, caso contrário as perdas de massa seriam iguais ou muito próximas em todas as amostras.

Outro fator que salta à vista é a influência da concentração de gelatina na perda de massa, pois da observação dos resultados, facilmente se verifica que as membranas com maiores perdas de massa são as constituídas por maior quantidade de GelMA. Retira-se portanto que a perda de massa diminui com o aumento da concentração de PCL nas membranas, sendo o seu processo de degradação mais lento pelo facto da PCL ser um polímero que se degrada lentamente. Analisando atentamente a tabela, constata-se que a amostra 30GelMA_70PCL sintetizada por *electrospinning* de mistura não segue a norma. Verifica-se nesta amostra maior perda de massa no fotoreticulado, o que se pode dever à zona da amostra que foi utilizada. Visto que aquando da produção da membrana, as fibras se depositam aleatoriamente no coletor, não se pode afirmar que têm exatamente a mesma quantidade de polímero em toda a superfície. Ou por outro lado, pode dever-se apenas a um erro na medição.

Avaliando agora a influência da técnica, verifica-se que nas membranas produzidas por *electrospinning* coaxial, a perda de massa nos controlos é significativamente superior às dos

controles das membranas produzidas por *electrospinning* de mistura. No que respeita às amostras fotoreticuladas, as perdas de massa foram superiores nas amostras produzidas por *electrospinning* de mistura. Recorrendo ao *electrospinning* coaxial, espera-se que a estrutura das fibras seja do tipo núcleo (PCL) e casca (GelMA). Isto é, a GelMA está mais exposta o que pode promover uma reticulação mais eficaz da GelMA e consequentemente a perda de massa nestas amostras é inferior à das membranas produzidas por *electrospinning* de mistura. Nestas últimas, a GelMA encontra-se incorporada nas fibras de PCL, o que poderá dificultar uma reticulação eficaz da gelatina. Contudo, os resultados obtidos para os controlos das membranas coaxiais são os esperados verificando-se maiores perdas de massa nestes que nos controlos produzidos por *electrospinning* de mistura. Mais uma vez, tal pode justificar-se com o pedaço de membrana que foi utilizado, pois no *electrospinning* coaxial as soluções poliméricas são libertadas uma agulha coaxial, logo por dois orifícios diferentes. Não se podendo assim afirmar que a estrutura núcleo e casca se formou efetivamente em toda a superfície. Podem ter sido utilizadas amostras de zonas onde estaria PCL em quantidade mais elevada, obtendo-se então uma perda de massa menor nas membranas coaxiais devido a tal. Além disso, tratando-se de amostras não reticuladas, quando incubadas em PBS é possível que a GelMA se dissolva, o que conduz a perdas de massa superiores às das membranas sintetizadas por *electrospinning* de mistura.

Um fator de extrema importância na regeneração da pele é a velocidade com que a membrana irá degradar-se. Tem que ser garantido um equilíbrio entre a velocidade de degradação da membrana e a velocidade de regeneração do tecido. Caso a degradação da membrana assimétrica seja elevada, as células não terão tempo de proliferar e proceder à construção de uma nova matriz extracelular. Pelo contrário, se for demasiado lenta pode dificultar a formação da matriz e influenciar negativamente as funções biológicas do tecido recém-formado [89]. Então, se a velocidade de regeneração da pele for elevada é preferível usar uma membrana com maior proporção de GelMA, se for mais lenta é aconselhável uma membrana com GelMA em menor proporção.

4.4. Determinação dos Ângulos de Contacto Dinâmicos

A determinação dos ângulos de contacto é um ponto essencial para a avaliação das propriedades dos materiais que serão empregues em aplicações biomédicas. Estes resultados permitem estipular o

grau de hidrofiliicidade/hidrofobicidade da superfície dos materiais. Assim, foi feita a medição dos ângulos de contacto dinâmicos às amostras desenvolvidas no presente trabalho, visto que esta propriedade pode perturbar a migração, proliferação e viabilidade das células.

Na Figura 4.8 estão exibidos os resultados desta caracterização, relativos às membranas assimétricas produzidas por *electrospinning* de mistura, “*blending*” e coaxial. Foi também efetuada a medição dos ângulos de contacto à camada base composta por PCL e PLA. É no entanto de salientar que na figura referida, foram apenas considerados os ângulos de contacto iniciais.

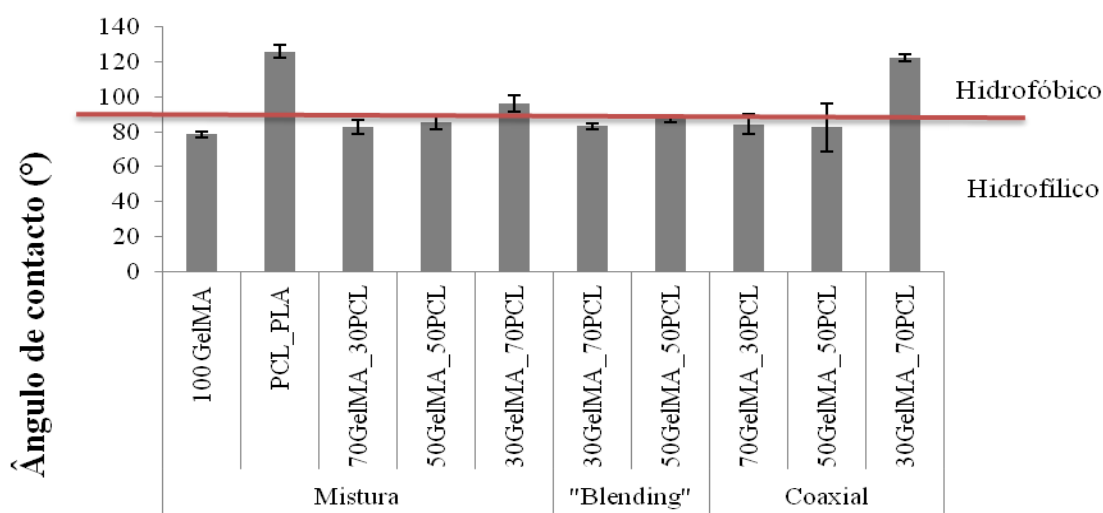


Figura 4.8 Representação dos ângulos de contacto iniciais médios (n=5) das membranas analisadas, incluindo a superfície das membranas base (PCL e PLA).

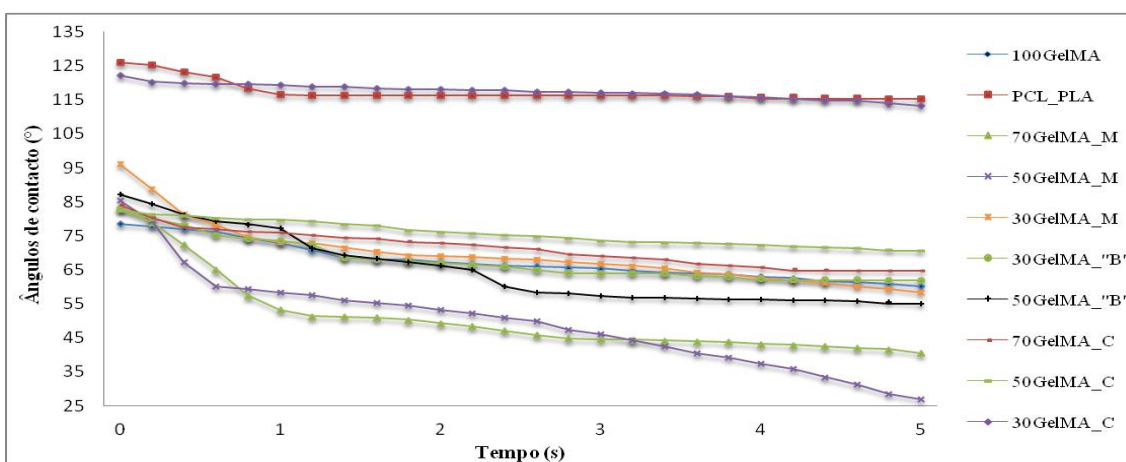


Figura 4.9 Ângulos de contacto dinâmicos das membranas assimétricas desenvolvidas.

Analisando a Figura 4.9 pode constatar-se que a membrana com maior carácter hidrofílico é a membrana cuja segunda camada é composta por 100% GelMA, o que era expectável tendo em conta a elevada molhabilidade da gelatina. O ângulo de contacto inicial foi $78,5^\circ$, que desceu até $60,1^\circ$, ainda que o valor tenha diminuído, não foi uma descida muito significativa devido à gelatina ter sido funcionalizada. Tendo sempre em vista a aplicação final da membrana e também que tem que ser garantido um tempo de degradação da membrana adequado, a gelatina por si só não iria garantir o equilíbrio necessário. Visto ter uma hidrofiliabilidade elevada, a sua degradação seria rápida, o que levou a que fosse complementada com PCL que por ter uma molhabilidade baixa garantirá um tempo de degradação da membrana maior. Assim, há um melhor equilíbrio entre a velocidade de degradação da membrana e o tempo de regeneração do tecido.

Tal como era de esperar, a camada base das membranas, por ser constituída por dois polímeros bastante hidrofóbicos (PCL e PLA), é a superfície com o maior ângulo de contacto, 125° , destacando-se por isso das restantes analisadas. O seu ângulo diminui até alcançar os 118° , sendo uma descida que se deve ao carácter hidrofóbico de ambos os polímeros.

De uma forma geral verifica-se que a hidrofobicidade das membranas, aumenta à medida que é maior a concentração de PCL, o que era também de prever.

Relativamente à influência da técnica, as membranas produzidas por *electrospinning* de mistura apresentam ângulos de contacto menores que as coaxiais, excepção feita à membrana com 50% de GelMA coaxial.

A membrana constituída por 100% GelMA tem um ângulo de contacto médio de 69° aproximadamente. Já as membranas compósitas com 70% GelMA produzidas por *electrospinning* de mistura possuem um ângulo de contacto que varia dos 83° aos 40° , o que era expectável pois dada a elevada concentração de gelatina esperava-se uma hidrofiliabilidade não muito distante da membrana anteriormente referida. No caso das membranas com 70% GelMA coaxiais os valores dos ângulos de contacto são idênticos, estando dentro do mesmo intervalo sensivelmente 84° a 65° . À semelhança do resultado anterior, o que se justifica dada a quantidade de GelMA na casca da fibra.

Relativamente às membranas com 50% GelMA, para qualquer uma das técnicas os resultados iniciais não são muito díspares, sendo cerca de 84° para as membranas produzidas por

electrospinning de mistura e 85° para as coaxiais. Contudo, na primeira vê-se o seu valor reduzido a 27°, enquanto a segunda desce até aos 71° sensivelmente, sendo ainda resultados próximos da membrana com 100% GelMA. Estes resultados podem ser justificados pela concentração de gelatina presente, que é ainda significativa. Por último, as membranas com apenas 30% de GelMA são as que apresentam maiores ângulos de contacto e portanto, as mais hidrófobas.

As variações destes resultados ao longo do tempo são explicadas pela porosidade e morfologia da superfície dos materiais, pois quanto mais porosas forem as membranas maior irá ser a infiltração da gota de água destilada. Este é um fator predominante, que pode em alguns casos ser de igual importância ou até sobrepor-se à composição química do material.

4.5. Caracterização Morfológica por Microscopia Eletrónica de Varrimento

A técnica SEM é um bom instrumento para estudar a morfologia da superfície das membranas, a forma como se depositam no coletor e também a orientação das fibras. As membranas assimétricas compósitas desenvolvidas no presente trabalho foram analisadas pós fotoreticulação exceto a superfície da membrana base, que não tendo GelMA na sua composição não foi sujeita à irradiação UV.

O objetivo de ter recorrido a esta técnica foi avaliar a influência da variação da concentração de GelMA nas propriedades morfológicas das membranas. Além disso, as imagens obtidas permitiram determinar os diâmetros das fibras e a sua distribuição. Estes resultados não são contudo muito exatos, visto ter sido usada uma quantidade pouco significativa de imagens para calcular os diâmetros. As fotografias da superfície das membranas foram tiradas com ampliações que variam de 250x a 10 000x, tendo sido selecionadas apenas as imagens que dariam uma melhor perceção da morfologia da superfície das membranas assimétricas compósitas.

Na Figura 4.10 apresentam-se as imagens obtidas por SEM da camada base composta por PCL e PLA, da membrana com 100 % GelMA na segunda camada e das membranas com diferentes percentagens de GelMA e PCL na segunda camada, com diferentes ampliações.

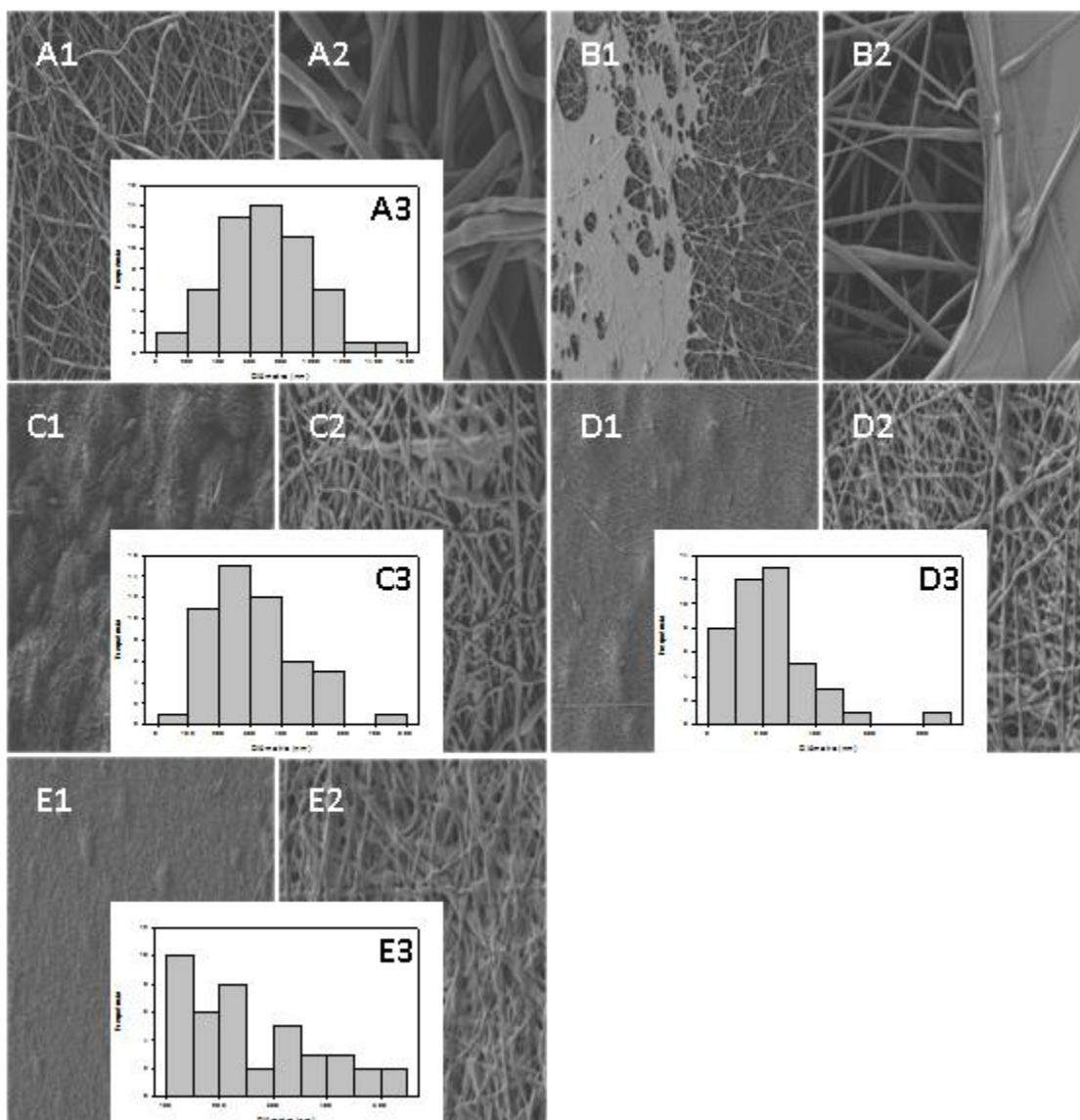


Figura 4.10 Fotografias obtidas por SEM da superfície das membranas, produzidas por electrospinning de mistura, fotoreticuladas. A1) A2) morfologia da membrana base (ampliações 1 000x e 10 000x respetivamente); B1) B2) imagens da superfície da membrana com 100 % GelMA na segunda camada (ampliações de 500x e 5 000x); C1) C2) D1) D2) E1) E2) fotografias da superfície das membranas com 30, 50 e 70 % GelMA na segunda camada, respetivamente (ampliações de 1 000x e 10 000x); A3) C3) D3) E3) histogramas correspondentes.

Observando a Figura 4.10, verifica-se que todas as membranas apresentam uma estrutura desorganizada. Tendo em conta a técnica pela qual foram produzidas isto era já de esperar, pois uma das características do electrospinning é a deposição aleatória de fibras no coletor.

As imagens A1 e A2 dizem respeito à camada base constituída por PCL e PLA, onde é bem visível a forma das fibras. De acordo com o histograma que lhe corresponde (A3), estas fibras apresentam uma distribuição de tamanhos alargada com um diâmetro médio de $691,26 \pm 282,29$ nm.

As imagens B1 e B2 correspondem à membrana com 100% GelMA na segunda camada e como se pode verificar em B1, a gelatina formou como que uma capa, deduzindo-se assim que quando se mergulhou esta membrana na solução com o fotoiniciador, a gelatina tenha dissolvido e formado um filme. Apesar de nestas imagens serem visíveis fibras, é perceptível que estas dizem respeito à camada base. Também por este motivo não foi possível fazer a determinação da distribuição dos diâmetros das fibras desta membrana, pelo que não se podem tirar conclusões quanto a este parâmetro.

Quanto às imagens C1 a E2, estas são relativas às membranas com diferentes proporções de GelMA/PCL na segunda camada e fazendo a analogia destas imagens com as da camada base, desde logo se verificam as diferenças que se devem à presença da gelatina, sendo que as fotografias apresentadas têm as mesmas ampliações.

A distribuição de tamanhos das membranas com diferentes proporções de gelatina, como se pode ver nos histogramas C3, D3 e E3 é bastante díspar. É possível constatar que à medida que aumenta a proporção de gelatina, as fibras vão apresentando diâmetros mais baixos. A membrana com 30 % GelMA tem um diâmetro médio de $312,65 \pm 147$ nm, já a membrana com 70 % GelMA apresenta um diâmetro médio de $255,27 \pm 124,68$ nm.

A morfologia das membranas assimétricas compósitas (C1 a E2) apresenta “*beads*” e as fibras não têm um aspeto tão individualizado quanto as da camada base. Em determinadas zonas, as fibras mostram-se “coladas” ou mais achatadas, o que se pode justificar pelos solventes usados na preparação das soluções poliméricas. O TFE tem uma volatilidade elevada, já o ácido acético é pouco volátil, o que pode ter influenciado a quantidade de solvente nas fibras no momento da sua deposição no coletor. Se a velocidade de evaporação do solvente não for adequada, quando as fibras atingem o coletor o solvente está ainda presente em quantidade suficiente para influenciar a forma e o diâmetro das fibras. Além disso, o facto de as fibras terem humidade quando se depositam no coletor, faz com que se formem as “*beads*” atrás referidas, que se observam em maior quantidade nas membranas com menor proporção de gelatina.

Mais ainda, é importante referir que as membranas foram previamente mergulhadas num meio aquoso para serem depois fotoreticuladas. Isto influencia também a morfologia da superfície, pois a

gelatina dissolve nesse meio o que contribui para o aspeto “colado” das fibras, que se torna mais evidente a medida que aumenta a concentração de gelatina.

Após a análise da morfologia das membranas produzidas por electrospinning de mistura, foram também estudadas as superfícies das membranas sintetizadas por electrospinning coaxial, apresentadas na Figura 4.11. esta diz respeito à morfologia das membranas, mais uma vez, com diferentes concentrações de GelMA e PCL.

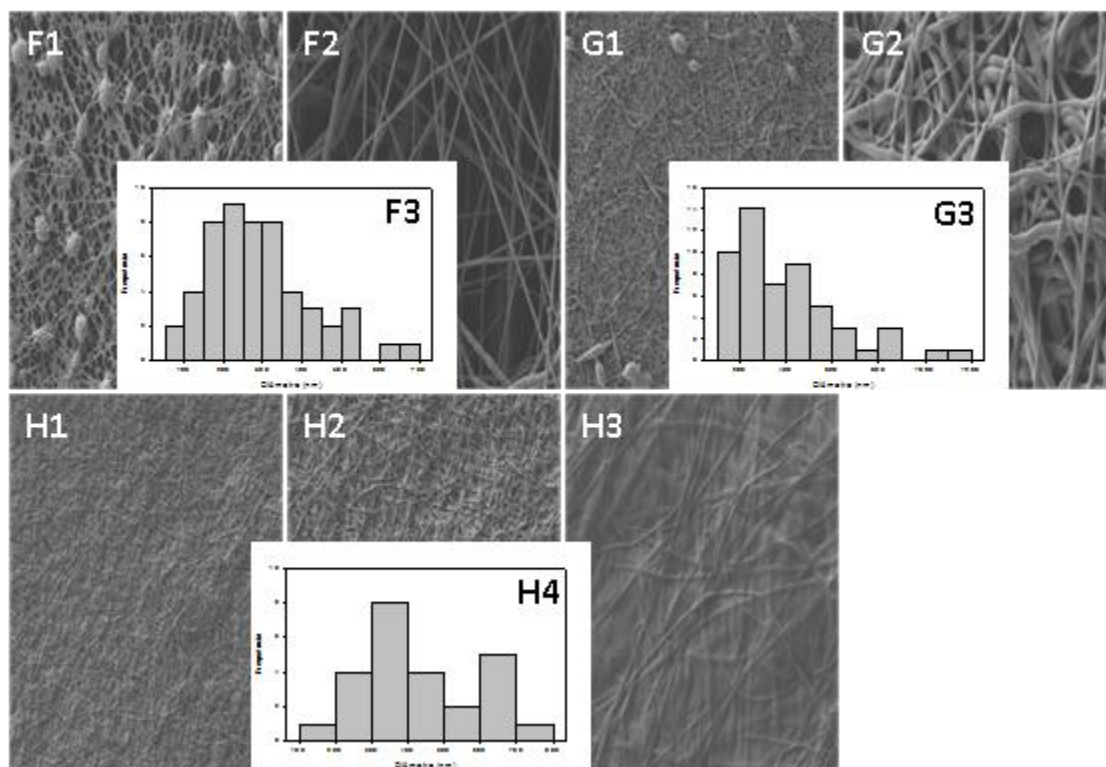


Figura 4.11 Fotografias obtidas por SEM da superfície das membranas, produzidas por *electrospinning* coaxial, fotoreticuladas. F1) F2) G1) G2) fotografias da superfície das membranas com 30 e 50 % GelMA na segunda camada, respetivamente (ampliações de 1 000x e 10 000x); H1) H2) H3) fotografias da superfície das membranas com 70 % GelMA na segunda camada (ampliações de 1 000x, 2 000x e 5 000x); F3) G3) H4) histogramas correspondentes.

Considerando que estas imagens dizem respeito a membranas produzidas por electrospinning coaxial, elas são sintetizadas com o intuito de se obter uma estrutura do tipo núcleo e casca. Contudo não foi possível determinar se efetivamente as fibras ficaram com o tipo de estrutura desejado. Se essa estrutura estivesse presente seria mais fácil visualizá-la na secção transversal da membrana, mas devido às condições em que foram preparadas as amostras para esta análise, as fibras estavam achatadas. Uma forma de contornar este problema seria usar azoto líquido para congelar instantaneamente a membrana e depois parti-la e não cortá-las à temperatura ambiente, que foi a

causa para que ficassem achatadas na secção transversal. Por outro lado, não há nenhuma evidência de que as fibras não tenham a estrutura desejada, pelo que para fazer a devida discussão dos resultados, se considerou que as fibras têm uma estrutura do tipo núcleo e casca.

De acordo com a Figura 4.11, é possível verificar que com concentrações mais baixas de gelatina a incidência de “beads” é maior. Inclusivamente na imagem F1 (ampliação de 1 000x) estas ocupam uma área considerável, o que não é de todo desejável.

É de salientar que para a produção destas membranas são usadas duas soluções independentes, cada uma constituída por apenas um polímero, sendo que uma delas é exclusivamente de gelatina e por isso com uma viscosidade baixa.

É também de notar que o electrospinning apesar de ser uma técnica acessível a nível de processamento, é muito sensível a alguns parâmetros tais como a viscosidade das soluções, a voltagem que lhes é aplicada e também às condições ambientais. A humidade no ambiente em que decorre a técnica tem uma grande influência na morfologia das membranas, pois humidades elevadas levam a que a taxa de evaporação do solvente seja mais lenta e por isso as fibras vão depositar-se no coletor ainda húmidas pela presença de solvente. Estes fatores aliados ao facto das membranas serem primeiramente mergulhadas numa solução aquosa antes da fotoreticulação, explicam a sua morfologia.

Referindo agora os histogramas, verifica-se que à medida que o teor de gelatina aumenta, os diâmetros também aumentam. As fibras com 30 % GelMA têm um diâmetro médio de $390,28 \pm 130,78$ nm, enquanto as fibras com 70 % GelMA apresentam um diâmetro médio de $426,96 \pm 149,48$ nm.

As imagens H1 a H3 dizem respeito à membrana com 70 % GelMA, que pelo seu aspeto se deduz que a gelatina tenha dissolvido e conferido um aspeto fundido às fibras.

Por último, foram analisadas as fotografias SEM das membranas produzidas por electrospinning por “blending”, apresentadas na Figura 4.12.

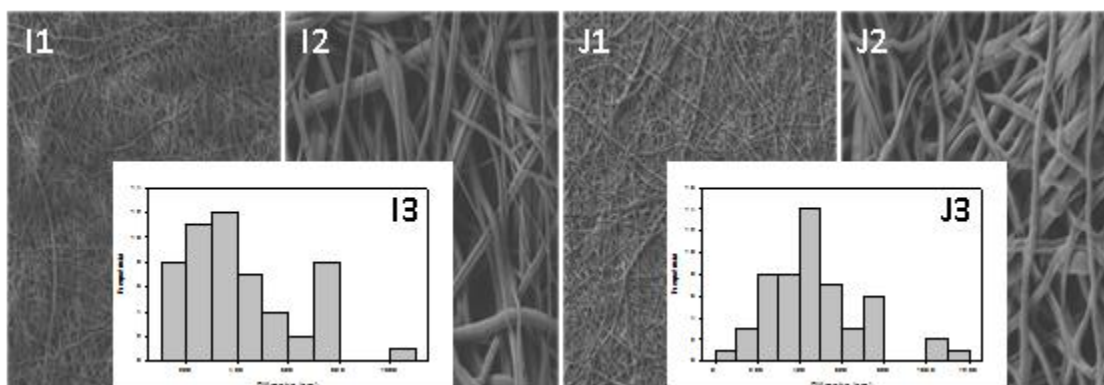


Figura 4.12 Fotografias obtidas por SEM da superfície das membranas, produzidas por *electrospinning* por “blending”, fotoreticuladas. I1) I2) J1) J2) fotografias da superfície das membranas com 30 e 50 % GelMA na segunda camada, respectivamente (ampliações de 1 000x e 10 000x); I3) J3) histogramas correspondentes.

Observando a Figura 4.12, à semelhança das anteriores, a estrutura das fibras é desorganizada. Lembra-se que as soluções poliméricas que lhes deram origem foram misturadas diretamente na agulha de *electrospinning*, não se podendo garantir que a mistura seria homogênea. Ainda assim, fazendo uma comparação entre estas e as membranas produzidas por *electrospinning* de mistura, fazendo nota que as imagens têm também a mesma ampliação, estas fibras têm um aspeto mais individualizado. Além disso, o efeito da possível dissolução da gelatina não é aqui tão evidente na morfologia final das fibras.

Esta técnica conferiu, de um modo geral, as distribuições de diâmetros mais alargados, o que se reflete nos diâmetros médios destas fibras, apresentados na Tabela 4.3, que resume os diâmetros médios das fibras de todas as membranas sintetizadas.

Tabela 4.3 Diâmetros médios das fibras e respetivos desvios padrão.

	Diâmetros (nm)		
	<i>Electrospinning</i> de mistura	<i>Electrospinning</i> “blending”	<i>Electrospinning</i> coaxial
Base	691,26 ± 282,29	-	-
100 GelMA	-	-	-
30GelMA_70PCL	312,65 ± 147,36	404,42 ± 208,43	390,28 ± 130,78
50GelMA_50PCL	240,23 ± 151,11	477,34 ± 228,93	406,82 ± 237,74
70GelMA_30PCL	255,27 ± 124,68	-	426,96 ± 149,48

Atendendo à Tabela 4.3 retira-se que os diâmetros das fibras produzidas por *electrospinning* de mistura são inferiores aos das fibras produzidas por *electrospinning* coaxial. Os maiores diâmetros são atribuídos às fibras produzidas por *electrospinning* de “blending”. Os desvios padrão são devidos à distribuição de diâmetros das fibras, que são mais elevados para a última técnica. Tal como já foi acima referido, estes resultados são apenas uma estimativa feita com base em uma ou duas imagens de SEM de cada membrana. Por conseguinte, podem ter um grande erro associado pois dada a pequena dimensão das fibras, é difícil “manuseá-las” no programa ImageJ o que pode ter levado à baixa fiabilidade dos mesmos.

No que respeita às membranas coaxiais, por exemplo, foram consideradas as fibras com maiores diâmetros no programa mencionado, uma vez que as fibras mais finas eram quase impossíveis de selecionar. Isto pode ter levado a que os resultados fossem influenciados de forma a se tornarem estes diâmetros superiores aos das fibras sintetizadas por *electrospinning* de mistura.

Quanto às membranas de “*blending*”, as suas fibras eram mais achatadas em forma de fita, o que pode também ter levado a que apresentem, segundo o *ImageJ*, os maiores diâmetros.

4.6. Hemocompatibilidade

Tal como já foi referido anteriormente, as membranas assimétricas desenvolvidas no presente trabalho, pretendem ser aplicadas para regenerar a pele. Tratando-se de um material que irá ter contato direto com a pele e vasos sanguíneos danificados, tornou-se essencial avaliar a hemocompatibilidade das membranas. A hemocompatibilidade dos materiais tem sido largamente estudada com a intenção de estabelecer um padrão para as possíveis interações entre estes e o sangue [85].

Neste teste foram avaliados dois parâmetros: a capacidade trombogénica das membranas e a determinação do índice hemolítico, ou percentagem de hemólise que cada material provoca nos glóbulos vermelhos que constituem o sangue.

4.6.1. Avaliação da Trombogenicidade

Quando se concebe um material para estar em contacto com o sangue, há que ter em atenção os efeitos que a sua interação pode provocar nos componentes sanguíneos. É portanto necessário determinar se o sangue tem ou não tolerância ao dispositivo a implementar. A compatibilidade dos materiais com o sangue está relacionada, principalmente com a resposta trombótica induzida por esses materiais ou dispositivos, que quando em contacto com o sangue levará à ativação da cascata de coagulação do sangue [85].

O objetivo maior da realização deste teste foi verificar se as superfícies das membranas levavam à formação de trombos. Tendo em conta que as membranas assimétricas desenvolvidas serão utilizadas para regenerar a pele, seria conveniente essa formação de trombos, visto que estes impedem o fluxo sanguíneo, impedindo hemorragias e melhorando a cicatrização da pele.

Na Tabela 4.4 apresentam-se as percentagens mássicas da formação de coágulos, após as amostras terem contacto com sangue durante 40 min.

Tabela 4.4 Percentagens médias da formação de coágulo na superfície das membranas, após 40 min em contacto com o sangue*.

	% Formação de coágulo	
	<i>Electrospinning de mistura</i>	<i>Electrospinning coaxial</i>
100 GelMA	70,88 ± 7,54	
70GelMA_30PCL	42,03 ± 0,58	57,69 ± 2,91
50GelMA_50PCL	66,35 ± 7,58	45,70 ± 0,00
30GelMA_70PCL	48,01 ± 6,7	49,66 ± 6,11

*Todos os valores apresentados são uma média dos resultados obtidos para as amostras triplicadas sujeitas ao teste.

Examinando a Tabela 4.4, verifica-se que todas as membranas assimétricas promovem a formação de trombos/coágulos quando têm contacto direto com o sangue. Destacando-se a membrana com 100%GelMA na segunda camada com uma percentagem de formação de coágulo bastante superior às restantes.

Quanto às membranas assimétricas compósitas, ainda que haja alguns desvios, a tendência é verificar-se uma maior formação de coágulos com o aumento da concentração de PCL incorporada

nas fibras, quer por *electrospinning* de mistura quer por coaxial. Foi já estudado que quanto maior a hidrofobicidade da superfície maior será a adesão proteica na mesma [85]. Ora, sendo a PCL um polímero com carácter hidrofóbico, era de esperar que fosse maior a incidência de formação de coágulos nas superfícies das membranas que tenham este material em maior concentração. No que respeita à gelatina, esta tem um carácter hidrofílico e por conseguinte eram esperados, para as membranas com maior concentração de gelatina, valores de trombogenicidade significativamente inferiores aos das amostras com PCL em maior quantidade. Porém tal não se verificou, devido ao facto da gelatina ter sido funcionalizada com anidrido metacrílico e fotoreticulada. Os valores da trombogenicidade para as membranas com, por exemplo, 70% de GelMA deveriam ser menores que os das membranas com 70% PCL, no entanto a diferença é inferior ao expectável devido aos factos referidos.

Quanto à membrana com 100% GelMA na segunda camada, a elevada trombogenicidade pode ser devida à modificação da gelatina, tornando-a mais hidrofóbica e promovendo assim maior formação de trombos. No entanto, tal pode também derivar da dissolução da gelatina nos solventes utilizados e resultado obtido ser, na verdade, relativo à camada base composta por PCL e PLA, ambos de carácter hidrofóbico.

Fazendo agora referência à influência das técnicas neste estudo, constata-se que a percentagem de coágulos formados é menor nas membranas obtidas por *electrospinning* de mistura. Este facto vai de encontro aos resultados obtidos na determinação dos ângulos de contacto dinâmicos, onde estas membranas mostraram ser mais hidrofóbicas que as membranas obtidas por *electrospinning* de mistura.

Contudo há uma dificuldade inerente à análise deste estudo, que é o facto dos coágulos por vezes se incorporarem nas malhas das fibras, perdendo-se massa de coágulo quando se procede à sua pesagem. Este facto pode ter influenciado de forma menos positiva os resultados.

4.6.2. Determinação do Índice Hemolítico

A hemólise consiste num processo de destruição da membrana dos glóbulos vermelhos. Tendo em conta que as membranas serão aplicadas em feridas, irão contactar com vasos sanguíneos danificados e por isso, com o sangue. Por este motivo, os ensaios de hemólise são imprescindíveis

no desenvolvimento das membranas em estudo. Este teste permite determinar a quantidade de hemoglobina no plasma sanguíneo em baixos níveis, que não seria possível quantificar *in vivo* [90].

Para a determinação do índice hemolítico (IH) as membranas foram colocadas em contacto direto com o sangue. Os ensaios foram realizados considerando a norma ASTM F 756-00, que divide os materiais em três categorias. Consoante o seu IH, os materiais são classificados como não hemolíticos se $0 < HI \leq 2$, ligeiramente hemolíticos se $2 < HI \leq 5$ e hemolíticos se $HI > 5$.

Neste teste, não foram caracterizadas as amostras desenvolvidas por electrospinning de “blending”. Dada a limitada disponibilidade de sangue para a realização de outros testes, optou-se por não caracterizar essas amostras, visto terem sido à partida produzidas por lapso. Na Figura 4.13 encontra-se a representação dos resultados obtidos.

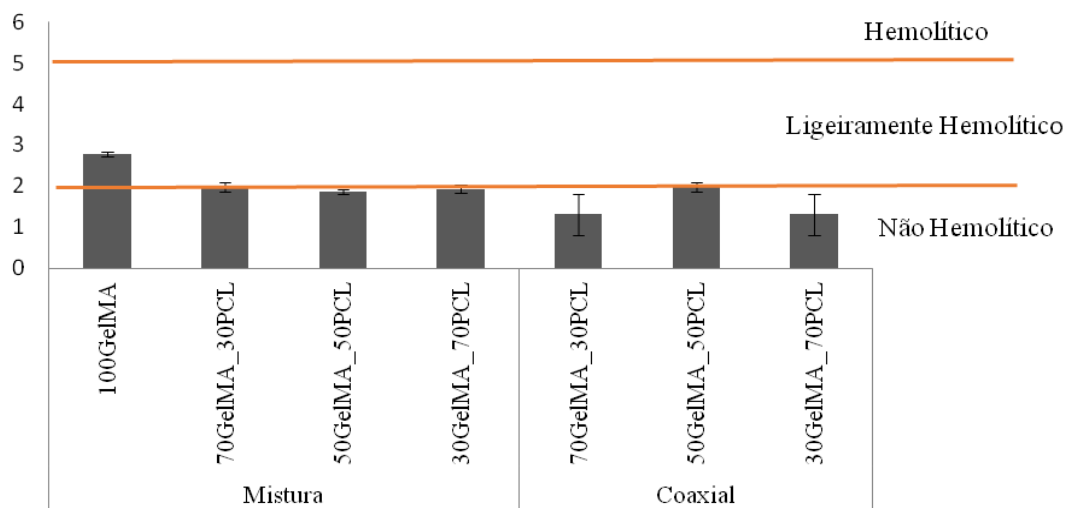


Figura 4.13 Índices hemolíticos obtidos pelo contacto direto com o sangue, das membranas produzidas por electrospinning de mistura e coaxial.

Da análise da Figura 4.13 retira-se que apenas a amostra 100GelMA apresenta carácter ligeiramente hemolítico, cujo índice é $2,78\% \pm 0,07$. Tendo em conta os intervalos de incerteza, as amostras 70GelMA_30PCL e 30GelMA_70PCL (*electrospinning* de mistura) e ainda 50GelMA_50PCL (*electrospinning* coaxial) têm que ser consideradas ligeiramente hemolíticas, cujos índices variam entre $1,93\% \pm 0,10$ e $1,98\% \pm 0,11$. As restantes amostras têm índices que variam entre $1,31\% \pm 0,5$ e $1,86\% \pm 0,05$, sendo portanto não hemolíticas.

Embora não haja um consenso sobre o índice de hemólise que é ou não aceitável para aplicações biomédicas, sabe-se que para um material ser considerado compatível com o sangue, não deve

promover hemólise. Logo, pode-se dizer que é possível aplicar membranas com estas características e diferentes formulações para a aplicação desejada, sem que ocorra a lise dos eritrócitos quando as membranas forem aplicadas em feridas.

Do estudo efetuado conclui-se que as membranas assimétricas desenvolvidas não irão comprometer a integridade dos eritrócitos presentes no sangue.

Outro facto a apontar são as condições em que são conduzidos os ensaios *in vitro*, que apresentam algumas limitações bem como os protocolos estabelecidos pela norma ASTM F 756-00. Ainda assim e considerando o objetivo do desenvolvimento das membranas, os resultados são positivos uma vez que se pode considerar que as membranas são hemocompatíveis.

A finalidade de usar várias concentrações de gelatina modificada, foi testar qual a sua influência nas diferentes propriedades. Contudo, como se pode verificar pela Figura 4.13 não são visíveis diferenças significativas quando se variam as proporções de GelMA e PCL, pelo que não se podem tirar, neste estudo, conclusões acerca da sua influência no índice hemolítico das membranas.

Uma possível explicação para o facto da membrana 100GelMA ser a que tem maior índice hemolítico é a possibilidade de a gelatina ter sido absorvida pela amostra de sangue diluído, sendo o resultado final influenciado pela composição da camada base constituída por PCL e PLA. O mesmo pode ter acontecido nas restantes membranas, o que fez com que os seus índices se encontrem muito próximos, no geral, perto do limite existente entre a definição de não hemolítico e ligeiramente hemolítico. Este é mais um motivo que leva a crer que, ainda que os resultados tenham sido bastante satisfatórios, seriam necessários mais ensaios deste teste para garantir as conclusões aqui retiradas. No entanto, caso os resultados tenham sido influenciados pela camada base, pode concluir-se que a membrana preparada por PCL e o PLA tem potencial para aplicações biomédicas.

4.7. Biocompatibilidade

4.7.1. Viabilidade celular

O estudo da viabilidade celular decorreu na UBI. As superfícies das membranas produzidas foram colocadas em contacto com fibroblastos dermais humanos e através deste estudo foi possível avaliar a viabilidade celular das membranas desenvolvidas.

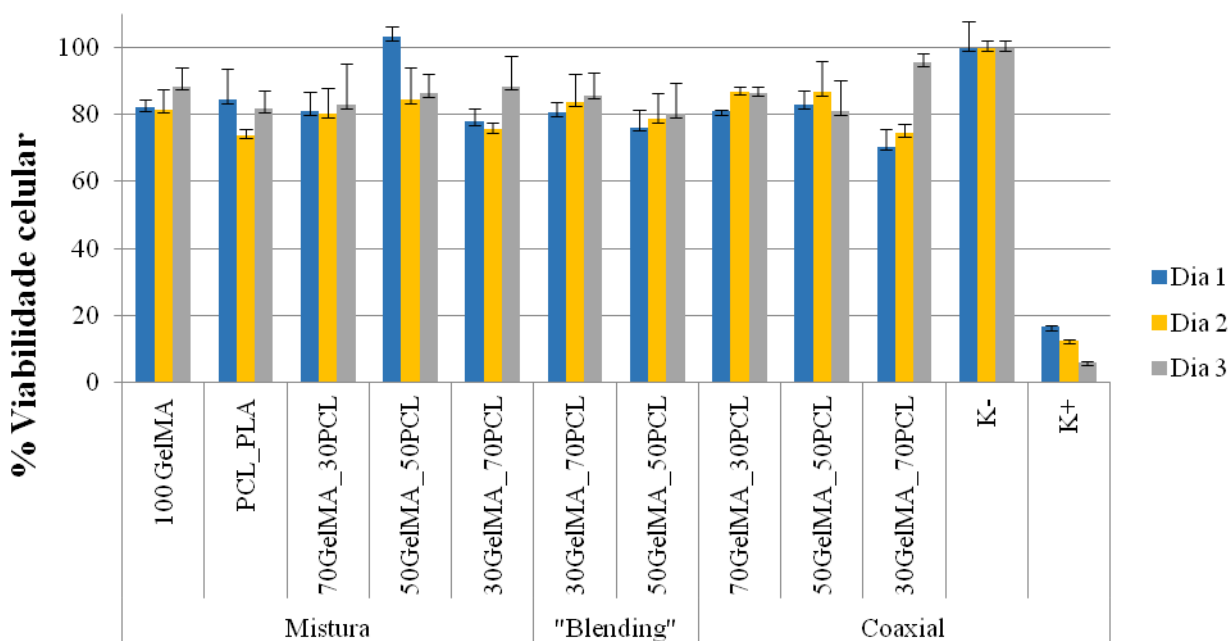


Figura 4.14 Avaliação da atividade celular após 1, 3 e 7 dias de contacto com as membranas assimétricas produzidas por electrospinning de mistura, por “blending” e coaxial.

Pela observação da Figura 4.14 conclui-se que todas as membranas promovem adesão e proliferação celular pois não apresentam problemas de toxicidade. O controlo negativo (K^-) representa a totalidade das células viáveis (100%). Comparando os seus resultados com os das membranas assimétricas constata-se a biocompatibilidade destas, pois não evidenciam quantidades significativas de compostos tóxicos.

Após 7 dias de incubação, verifica-se que na totalidade das membranas a percentagem de células viáveis é superior a 80%, logo têm uma adesão celular significativamente positiva.

Quanto à influência da técnica e da percentagem de GelMA, os resultados mostram que estes parâmetros não causam diferenças significativas, uma vez que estes são relativamente próximos entre si. Retira-se portanto dos resultados obtidos que as membranas desenvolvidas se revelaram ser biocompatíveis, pelo que poderão ser bons candidatos à aplicação proposta.

4.7.2. Adesão Celular

O estudo da adesão celular, à semelhança do anterior teve lugar na UBI. Este estudo permite avaliar a adesão e proliferação das células nas membranas assimétricas sintetizadas. Na Figura 4.15, 4.16 e

4.17 estão apresentados as imagens obtidas por SEM das superfícies das membranas após estarem em contacto com os fibroblastos referidos durante 1, 3 e 7 dias.

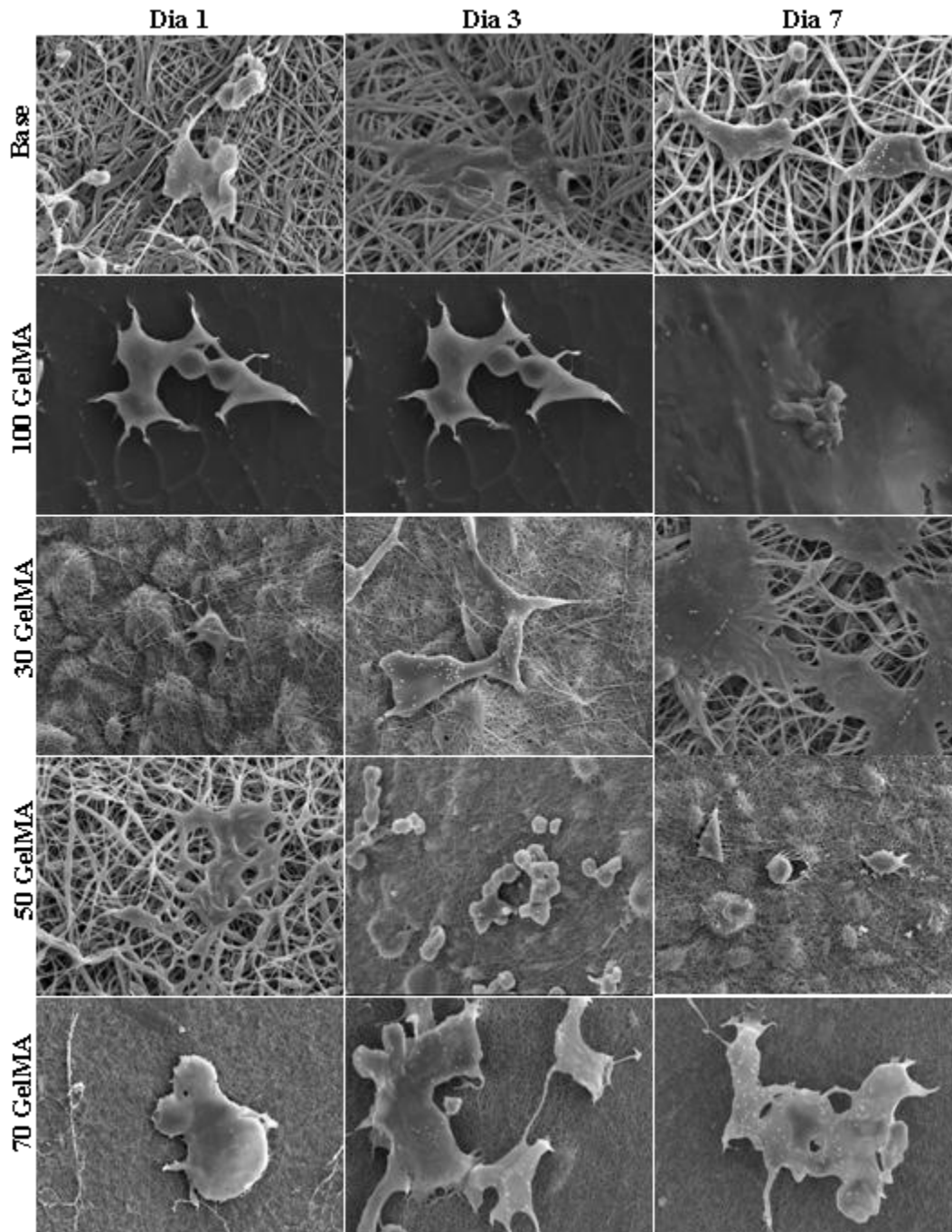


Figura 4.15 Fotografias de SEM da cultura celular de fibroblastos humanos na presença das membranas assimétricas compostas produzidas por *electrospinning* de mistura, durante períodos de 1, 3 e 7 dias.

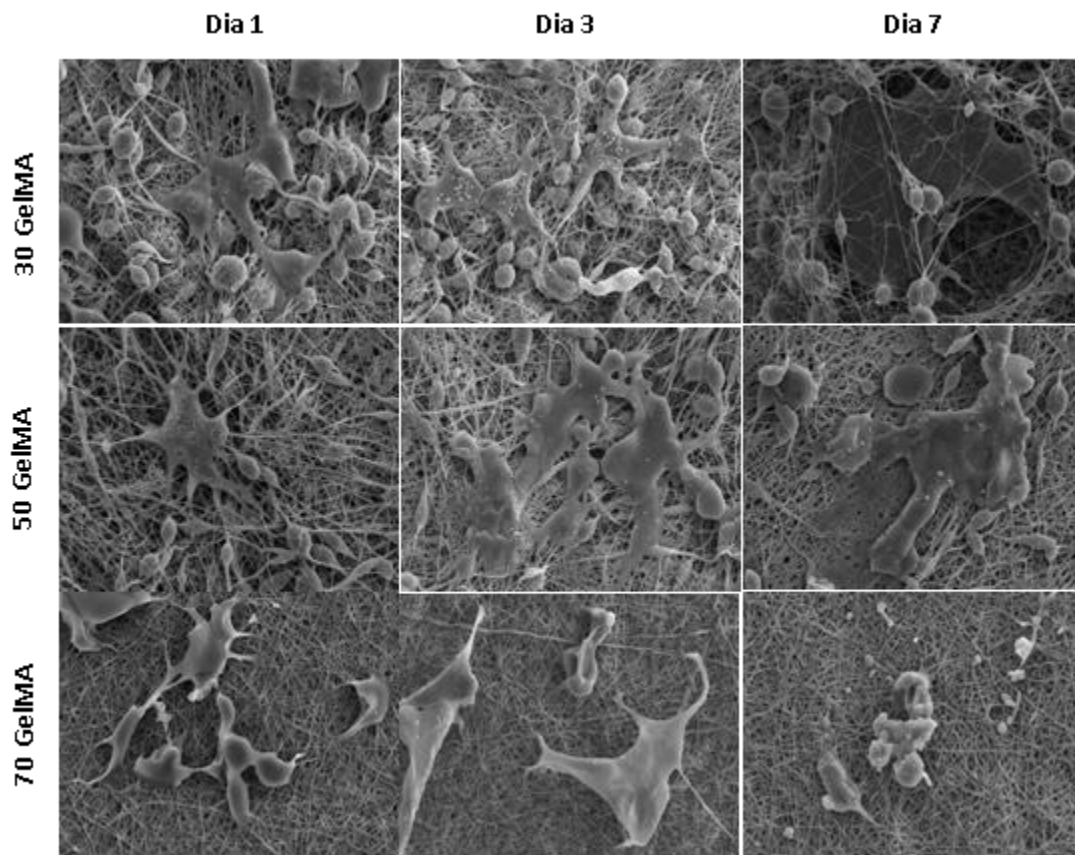


Figura 4.16 - Fotografias de SEM da cultura celular de fibroblastos humanos na presença das membranas assimétricas compostas produzidas por *electrospinning* coaxial, durante períodos de 1, 3 e 7 dias.

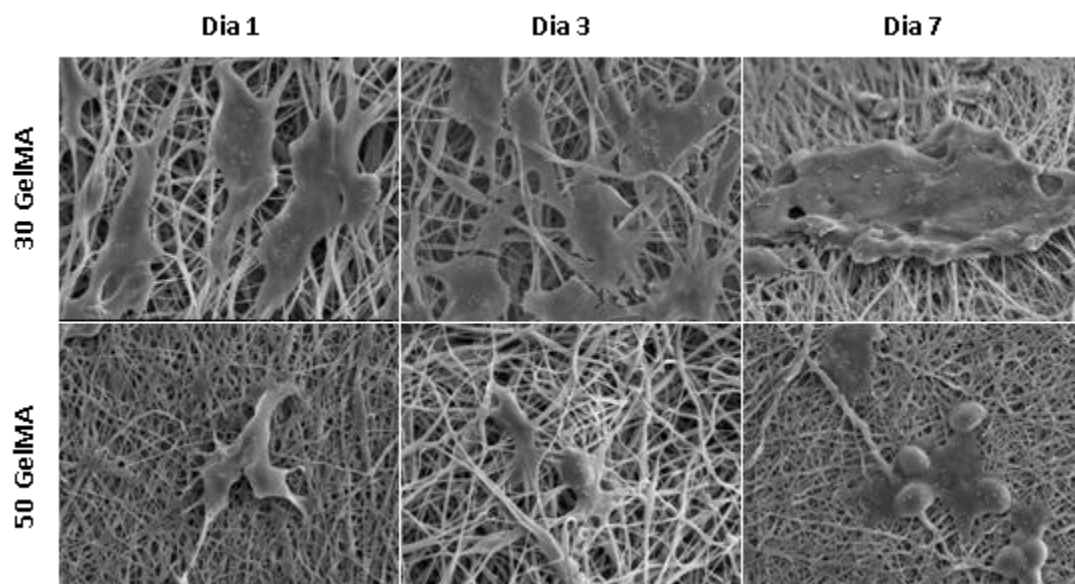


Figura 4.17 Fotografias de SEM da cultura celular de fibroblastos humanos na presença das membranas assimétricas compostas produzidas por *electrospinning* por “*blending*”, durante períodos de 1, 3 e 7 dias

Observando as imagens, verifica-se que os fibroblastos aderiram à superfície das membranas desde o primeiro dia. Em algumas das membranas é possível verificar que, ao final de 7 dias, os fibroblastos penetram na sua rede porosa, o que é um indicativo da sua biocompatibilidade e da sua capacidade de serem povoadas por células, podendo originar novos tecidos.

Pela análise das imagens é possível retirar também que a técnica não influencia a adesão celular, pois esta aconteceu em todas as amostras.

4.7.3. Atividade Antimicrobiana

Sabendo que o objetivo do desenvolvimento das membranas em estudo é a aplicação em pele danificada, um órgão que se encontra exposto tornou-se necessário fazer um estudo de atividade antimicrobiana. Com esta avaliação, pretendeu-se determinar o potencial bactericida dos materiais preparados. Então as membranas foram submetidas ao contacto com a bactéria *Stafilococcus aureus* (*S.aureus*) durante 48h. Na Figura 4.18, 4.19 e 4.20 encontram-se as imagens das membranas em contacto com a dita bactéria em placas de ágar após 24h e 48h, bem como as respectivas imagens obtidas por SEM. Todas as membranas desenvolvidas foram sujeitas a este estudo.

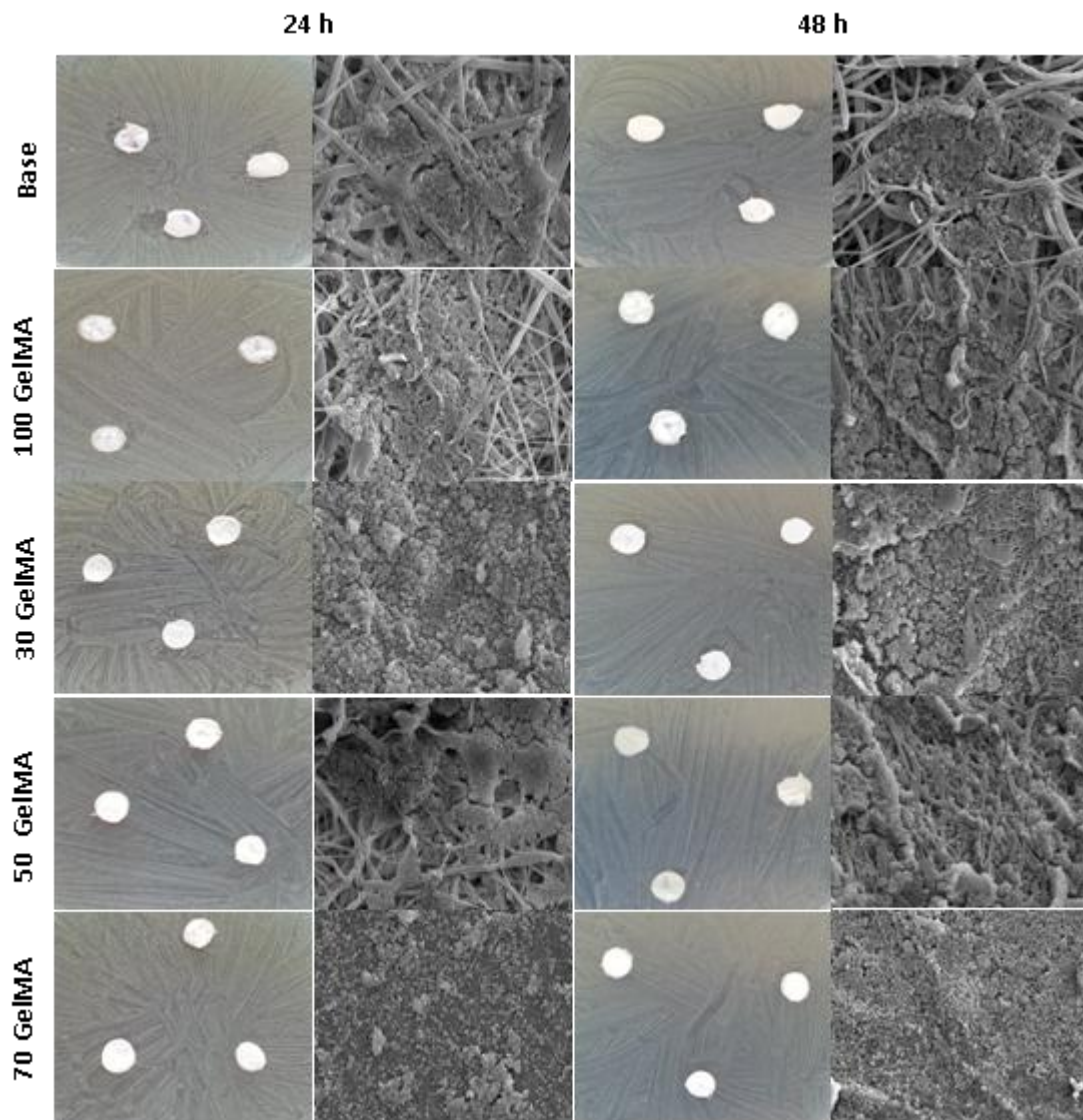


Figura 4.18 Imagens representativas do contacto com a bactéria *S. aureus* em placas de ágar e respetivas imagens SEM, das membranas produzidas por *electrospinning* de mistura.

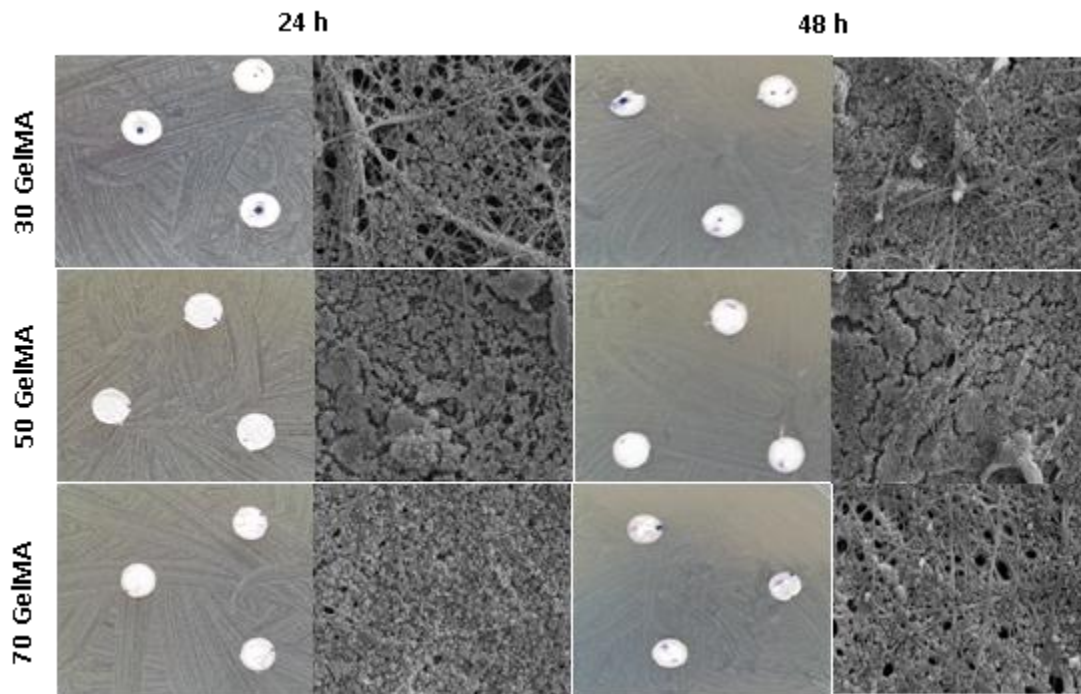


Figura 4.19 Imagens representativas do contacto com a bactéria *S. aureus* em placas de ágar e respetivas imagens SEM, das membranas produzidas por *electrospinning* coaxial.

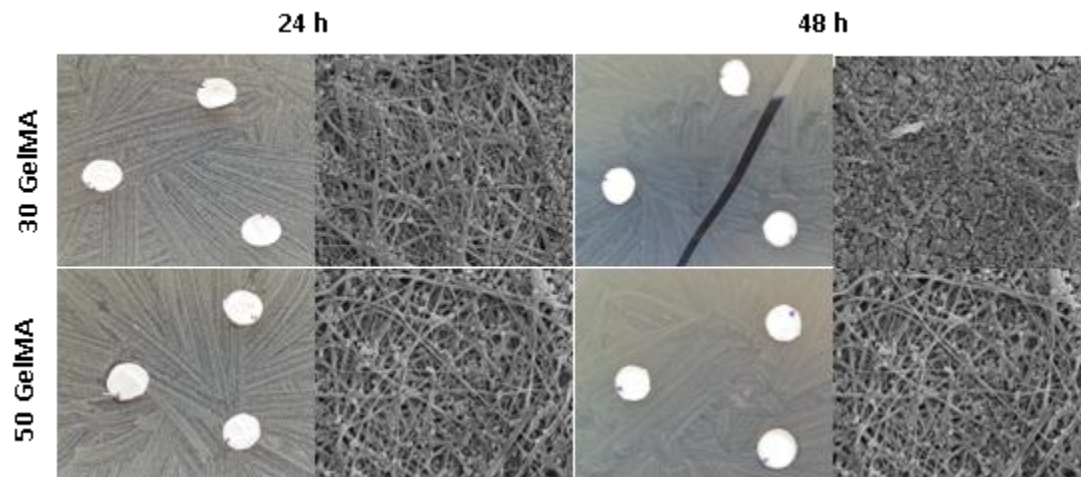


Figura 4.20 Imagens representativas do contacto com a bactéria *S. aureus* em placas de ágar e respetivas imagens SEM, das membranas produzidas por *electrospinning* por “blending”.

Observando a Figura 4.18, 4.19 e 4.2, verifica-se que nenhuma das membranas possui atividade antimicrobiana. Não existe em nenhuma das membranas, qualquer vestígio da morte das bactérias. Se houvesse potencial antibacteriano, na zona circundante às amostras depositadas na placa de ágar

iria ser visível um halo inibitório, o que não acontece. As bactérias estão depositadas e vivas em toda a área envolvente das amostras. Além disso, como se pode verificar pelas imagens de SEM dessas mesmas amostras, é mais do que evidente que as bactérias tiveram uma grande proliferação ocupando uma grande área da superfície das membranas, o que não é de todo recomendável para a aplicação em vista. Portanto, é recomendável que seja adicionada um fármaco à composição das membranas para que a atividade das bactérias não ocorra na superfície das membranas.

5. Conclusões e Perspetivas Futuras

5.1. Conclusões

O principal objetivo do trabalho foi a preparação de membranas assimétricas, sendo por isso constituídas por duas camadas. A primeira, que serviu de base, constituída por PCL e PLA. A segunda por diferentes formulações de GelMA e PCL. Na preparação destas membranas o trabalho foi dividido em diferentes abordagens experimentais.

A primeira abordagem experimental consistiu na modificação da gelatina com MAA. Esta modificação conferiu ligações duplas à gelatina, tornando-a por isso fotoreticulável. Ainda nesta fase procedeu-se à síntese da camada base composta por PCL e PLA, sendo ambos os polímeros individualmente dissolvidos numa solução de DMF e clorofórmio. Posteriormente foram sujeitos ao processo de *electrospinning* de mistura dando origem às membranas fibrosas base. Estas bases foram produzidas em quantidade suficiente para serem depois revestidas com as diferentes formulações de GelMA e PCL.

A segunda abordagem experimental consistiu na produção das membranas assimétricas, pelas técnicas de *electrospinning* de mistura. Os polímeros foram combinados numa única solução e posteriormente eletrofiados, com diferentes formulações de GelMA e PCL.

Na terceira abordagem experimental foram sintetizadas membranas pela técnica de *electrospinning* coaxial, mais uma vez com diferentes proporções de GelMA e PCL. Para tal os polímeros foram dissolvidos individualmente e assim foram incorporados no processo, para dar origem a fibras com uma estrutura do tipo núcleo (PCL) e casca (GelMA). Ainda nesta abordagem foram desenvolvidas membranas segundo uma técnica, que se dominou por *electrospinning* por “*blending*”. Denominou-se desta forma uma vez que o esquema da técnica foi o idêntico ao do coaxial, no entanto as soluções foram misturadas diretamente na agulha, visto que por lapso não foi colocada a agulha coaxial.

No final destas abordagens as 9 membranas obtidas foram mergulhadas numa solução com o fotoiniciador Irgacure® 2959, seguidamente foram levadas a uma câmara UV para serem fotoreticuladas. Após a fotoreticulação, foi visível o efeito da concentração da gelatina no aspeto final das membranas, que apresentaram um tom mais amarelado nas superfícies onde era maior a

concentração da GelMA, podendo constatar-se que o processo de fotoreticulação foi efetuado com sucesso.

As membranas produzidas por *electrospinning* têm inúmeras aplicações biomédicas. Neste trabalho o intuito foi estudar o seu potencial para aplicação como revestimento de feridas para regenerar a pele.

A análise das membranas por ATR-FTIR permitiu afirmar que estavam presentes as ligações características de cada um dos polímeros constituintes da segunda camada das membranas.

Pelo estudo da perda de massa, retirou-se que no geral os fotoreticulados apresentaram menores perdas de massa que os controlos correspondentes, o que evidenciou o sucesso da fotoreticulação. Além disso, foi mais uma vez visível o efeito da concentração da gelatina, pois quanto maior a concentração deste polímero nas membranas mais elevada se mostrou a perda de massa. Ainda assim surgiram algumas incongruências neste estudo. Eram esperadas maiores perdas de massa nas membranas fotoreticuladas por *electrospinning* coaxial que nas produzidas por *electrospinning* de mistura, visto que nas membranas coaxiais as fibras têm, teoricamente, uma estrutura do tipo núcleo e casca. Sendo esta casca constituída por GelMA, era esperado que as perdas de massa fossem superiores devido a este facto, o que acabou por não se verificar. No entanto, os resultados podem dever-se às amostras utilizadas para o estudo, uma vez que as amostras de controlo destas membranas tiveram os resultados esperados. Ou seja, maiores perdas de massa que os controlos das membranas produzidas por *electrospinning* de mistura.

Foram também determinados os ângulos de contacto dinâmicos. Este estudo permitiu desde logo verificar que a membrana base apresenta um carácter significativamente hidrofóbico, assim como a membrana coaxial com 30% GelMA. Além disso, constatou-se que a técnica que confere menores ângulos de contacto, logo maior hidrofiliabilidade, é o *electrospinning* de mistura. Contudo, exceto a membrana coaxial já referida, todas as membranas se mostraram hidrofílicas o que leva a concluir que a técnica não tem uma influência significativa nesta propriedade.

Pelo recurso à técnica SEM (Microscopia de Varrimento Eletrónico) foi avaliada a morfologia da superfície das membranas assimétricas fotoreticuladas e também da camada base que constitui todas elas. A primeira constatação é a estrutura aleatoriamente desorganizada de todas as membranas. Pela análise das imagens obtidas, é visível a influência da concentração de gelatina que confere um

aspecto mais fundido às fibras, sendo que na membrana com 100 % GelMA se observa como que um filme de gelatina na superfície da membrana. Conclui-se também que o aspecto fundido das membranas se deve ao processo de fotoreticulação a que são previamente sujeitas, não tendo por isso as fibras um aspecto individualizado e bem definido.

Ainda quanto à concentração de gelatina, verificou-se que quanto menor ela for, maior é a formação de “beads” na superfície das membranas e que foram mais evidentes nas membranas coaxiais.

As imagens obtidas permitiram ainda determinar os diâmetros médios das fibras, que se verificou serem maiores nas membranas coaxiais relativamente às restantes. Importa referir que foi também maior a dificuldade do seu cálculo, o que certamente influenciou os resultados.

Quanto à hemocompatibilidade, este estudo desvendou que todas as membranas induzem a formação de trombos, sendo esta mais evidente na membrana com 100 % GelMA. Este resultado é justificado pelo facto de a gelatina ter dissolvido, como foi possível observar nas imagens de SEM, e portanto a formação dos trombos foi promovida pelo carácter hidrofóbico dos polímeros constituintes da camada base. Por sua vez, as membranas coaxiais apresentam uma trombogenicidade inferior à das membranas produzidas por *electrospinning* de mistura. Quanto à influência da gelatina nesta propriedade, ela é maior quanto menor for a concentração de gelatina ainda que não seja um efeito significativo. Assim pode-se retirar que a GelMA promove a formação de trombos por ter sido funcionalizada e fotoreticulada. Quanto ao índice hemolítico, apenas a membrana com 100 % GelMA apresenta um carácter ligeiramente hemolítico, sendo as restantes não hemolíticas. Visto que a grande maioria das membranas tem um índice hemolítico menor que 2%, constata-se que são boas candidatas para a aplicação pretendida.

Por último, foi avaliada a biocompatibilidade dos materiais, recorrendo a estudos de viabilidade celular com fibroblastos dermais. Estes revelaram que todas as membranas apresentam na generalidade mais de 80% de células viáveis, logo uma boa adesão celular, comprovando-se pelas imagens SEM a adesão e a proliferação das células à superfície das membranas. Quanto à atividade antimicrobiana, os resultados não se mostraram tão positivos. Não foi observado o halo inibitório na área circundante às amostras e além disso, pelas imagens SEM é facilmente verificada a proliferação das bactérias, o que sugere que as membranas deverão ter um fármaco incorporado para inibir a atividade bacteriana

5.2. Perspectivas Futuras

Tendo em conta o trabalho desenvolvido e os resultados obtidos, não esquecendo a aplicação que motivou o presente trabalho, há ainda algumas questões a melhorar. No trabalho futuro poderiam ser considerados os seguintes aspetos:

- Processar o *electrospinning* num ambiente de humidade e temperatura controlados;
- Não há uma prova efetiva de que as membranas produzidas por *electrospinning* coaxial têm de facto uma estrutura do tipo núcleo e casca, sendo apenas uma suposição teórica. Neste sentido, as amostras a serem analisadas por SEM poderiam ser tratadas com azoto líquido. Desta forma as amostras iriam ser quebradas e assim seria possível verificar a estrutura das fibras na secção transversal, pois sendo cortadas as fibras ficam achatadas nesta secção;
- Testar a potencialidade como sistemas de transporte e libertação controlada de fármaco. Introduzindo um fármaco adequado a atividade bacteriana seria controlada, mas mais ainda poderia acelerar e controlar a regeneração dos tecidos;
- Realização de testes de hemocompatibilidade em série para garantir a fiabilidade dos resultados;
- Realização de testes de biocompatibilidade *in vivo* para testar o comportamento das membranas quanto ao real efeito na regeneração de tecidos.

6. Bibliografia

- [1] Karp, J., M., Dalton, P., D., Shoichet, M. S., Scaffolds for Tissue Engineering, *MRS BULLETIN*, 2003.
- [2] Schardosim, J., M., Adaptação transcultural e validação clínica do instrumento *Neonatal skin condition score* para uso no Brasil, Tese de Mestrado, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre 2012.
- [3] Elizabeth, A., Segre, J., The skin microbiome, *Nat.Rev. Microbial* Vol 9 (2011) 244-253.
- [4] Igarashi, T., Nishino, K., Nayar, S., K., The Appearance of Human Skin, Technical Report CUCS- 024-05, Department of Computer Science of Columbia University, 2005.
- [5] Velnar, T., Bailey, T., Smrkolj, V., The Wound Healing Process: an Overview of the Cellular and Molecular Mechanisms, *The Journal of International Medical Reserch*, 37 (2009) 1528-1542.
- [6] Shevchenko, R., V., James, S., L., James, S. E., A review of tissue-engineered skin bioconstructs available for skin reconstruction, *J. R. Soc. Interface*, 7 (2008) 229-258.
- [7] Mendes, J., Síntese de hidrogéis de base acrílica recorrendo a técnicas de polimerização radicalar viva. Potencial aplicação como fármacos poliméricos, Tese de Mestrado, Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade de Coimbra (2011).
- [8] Caló, E., Khutoryanskiy, V. V., Biomedical applications of hydrogels: A review of patents and commercial products, *European Polymer Journal*, Vol. 65, 525-267 (2015).
- [9] Kumar, A., Hydrogel scaffold for tissue engineering, US 20130236971 A1

(2013).

- [10] Gibas, I., Janik, H., Review: Synthetic Polymer hydrogels for biomedical applications, *Chemistry Chemical Technology*, Vol. 4, 297-304 (2010).
- [11] Lazarus, G., S., Cooper, D. M., Knighton, D. R., Margolis, D. J., Percoraro, R. E., Rodeheaver, G., Robson, M. C., Definitions and guidelines for assessment of wounds and evaluation of healing, *Wound Rep. and Reg.*, Vol 2 (1994) 165-170.
- [12] Araraquara 2011.
- [13] Percival, N. J., Classification of Wounds and their Management, The Medicine Publishing Company Ltd., (2002) 114-117.
- [14] Schnell, E., Klinkhammer, K., et al., Guidance of glial cell migration and axonal growth on electrospun nanofibers of poly ϵ -caprolactone and a collagen/poly ϵ -caprolactone blend, *Biomaterials*, Vol.28, 3012–25 (2007).
- [15] Xu, C., Inai, R., Kotaki, M., and Ramakrishna, S. Electrospun nanofiber fabrication assynthetic extracellular matrix and its potential for vascular tissue engineering, *Tissue Eng.*, Vol.10, 1160 (2004).
- [16] Boateng, J., Mathews, K., Stevens, H., Eccleston, G., Wound healing dressings and drug delivery systems: A review, *J. Pharm. Sci.*, 97 (2008) 2892-2923.
- [17] Gurtner, G., Warner, S., Barrandon, Y., Longaker, M., Wound repair and regeneration, *Nature*, 453 (2008) 314-321.
- [18] Young, A., McNaught, C.-E., *The Physiology of wound healing*, Elsevier Ltd., 2011.
- [19] Auger, F., Lacroix, D., Germain, L., Skin substitutes and wound healing, *Skin Pharmacol. Physi.*, 22 (2009) 94-102.
- [20] Patel, N., R., Gohil, P. P., A Review on Biomaterials: Scope, Applications and

- human Anatomy Significance, The International Journal of Emerging Tecchology and Advanced Engineering, Vol 2 (20212) 2250-2459.
- [21] Martins, L. M. D., Produção e caractwrização de uma matriz dérmica à base de nanofibras de policaprolactona, Tese de Mestrado, Facukdade de Ciências e Tecnologia da Universidade Nova de Lisboa, 2012.
- [22] Vaz, R., I., L., Preparação de *scaffolds* por combinação das técnicas de *electrospinning* e fotoreticulação para engenharia de tecidos, Tese de Mestrado, Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade de Coimbra 2016.
- [23] Catalano, E., Cochis, A., Varoni, E., Rimondini, L., Azzimonti, B., Tissue-engineered skin substitutes: na overview, J.Art: Org., 16 (2013) 397-403
- [24] Ferreira, P., I., C., M., Hydrogel-based asymmetrical membranes for wound dressing application: manufacture, drig delivery and wound-healing effects, Tese de Doutoramento, Faculdade de Ciência e Tecnologia da Universidade Nova de Lisboa, 2016.
- [25] Huang, S., Fu, X., Tissue-engineered skin: bottleneck or breakthrough, Int. J. Burn Trauma, Vol 1 (2011) 1-10.
- [26] Branco, A., C., M., Engenharia dos tecidos e órgãos – sucessos e desafios, Instituto Superior de Ciências da Saúde Egas Moniz, 2014.
- [27] Ikada, Y., Tsuji, H., Biodegradable polyesters for medical and ecological applications, Macromol. Rapid Commun., Vol 22 (2000) 1022-1336.
- [28] Fu, W., Liu, Z., Feng, B., Hu, R., He, X., Wong, H., Yin, M., Huang, H., Zhang, H., Wang, W., Electrospun gelatin/PCL and collagen/PCL scaffolds for vascular tissue engineering, Int. J. of Nanomedicine, 9 (2014) 2335-2344.
- [29] Chan, B., P., Leong, K., W., Scaffolding in tissue engineering: general approaches and tissue-specific comsiderations, Eur Spine J, (2008) S467- S479.

- [30] Dhandayuthapani, B., Yoshida, Y., Maekawa, T., Kumar, D., S., Polymeric Scaffolds in Tissue Engineering Application: A Review, *International Journal of Polymer Science* (2011) 1-9.
- [31] Sousa, J., C., M., C., Impacto dos novos sistemas terapêuticos na regeneração tecidual, Tese de Mestrado, Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade Fernando Pessoa, Porto 2011.
- [32] Langer, R., Vacanti, J., P., *Tissue Engineering, Sci*, Vol 260 (1993) 920-926.
- [33] Fontes, R., A., M., Fabrico e Caracterização de Scaffolds à Base de Fosfatos de Cálcio, Tese de Mestrado, Universidade Técnica de Lisboa, 2010.
- [34] Fleming, J., E., Cornell, C., N., Muschler, G., F., *Bone Cells and Matrices in Orthopedic Tissue Engineering in Orthopedic Surgery* Vol 31 (2000) 357-371.
- [35] Gauglitz, G.G., Jeschke, M.G., Combined gene and stem cell therapy for cutaneous wound healing, *Mol. Pharm.*, 8 (2011) 1471-1479.
- [36] Kobsa, S., Kristofik, N.J., Sawyer, A.J., Bothwell, A.L., Kyriakides, T.R., Saltzman, W.M., An electrospun scaffold integrating nucleic acid delivery for treatment of full-thickness wounds, *Biomaterials*, 34 (2013) 3891-3901.
- [37] Moimen, N.S., Vlachou, E., Staiano, J.J., Thawy, Y., Frame, J.D., Reconstructive surgery with Integra dermal regeneration template: histologic study, clinical evaluation, and current practice, *Plast.Reconstr. Surg.*, 117 (2006) 160S-174S.
- [38] Eisenberg, M., Llewelyn, D., Surgical management of hands in children with recessive dystrophic epidermolysis bullosa: use of allogenic composite cultured skin grafts, *Brit. J. Plast. Surg.*, 51 (1998) 608-613.
- [39] Bello, Y., Falabella, A., The role of graftskin (Apligraf) in difficult-to-heal venous leg ulcers, *J. Wound Care*, 11 (2002) 182-183

- [40] Uccioli, L., Clinical results related to the use of the TissueTech Autograf System in the treatment of diabetic foot ulceration, *Wounds*, 15 (2003) 279-288.
- [41] Mi, F.L., Shyu, S.S., Wu, Y.B., Lee, S.T., Shyong, J.Y., Huang, R.N., Fabrication and characterization of a sponge-like asymmetric chitosan membrane as wound dressing, *Biomaterials*, 22 (2001) 165-173.
- [42] Loeb, S., Sourirajan, S., Sea Water Demineralization by Means of an Osmotic Membrane, *Adv Chem Ser*, 38 (1963) 117-132.
- [43] Mohammadi, T., Saljoughi, E., effect of production conditions on morphology and permeability of asymmetric cellulose acetate membranes, *Desalination*, 243 (2009)1-7.
- [44] Liu, F., Hashim, N.A., Liu, Y., Abed, M.M., Li, K., Progress in the production and modification of PVDF membranes, *J. Membrane Sci.*, 375 (2011) 1-27.
- [45] Hachisuka, H., Ohara, T., Ikeda, K., New type asymmetric membranes having almost defect free hyper-thin skin layer and sponge-like porous matrix, *J. Membrane Sci.*, 116 (1996) 265-272.
- [46] Jayakumar, R., Prabakaran, M., Kumar, P., T. S., Nair, S., V., Tamura, H., Biomaterials based on chitin and chitosan in wound dressing applications, *Biotechnology Advances Vol 29* (2011) 322-337.
- [47] Hinrichs, W., Lommen, E., Wildevuur, C.R., Feijen, J., Fabrication and characterization of an asymmetric polyurethane membrane for use as a wound dressing, *J. Appl. Biomater.*, 3 (1992) 287-303.
- [48] Mi, F. L., Wu, Y. B., Shyu, S. S., Chao A. C., Lay, J. Y., Su, C. C., Asymmetric chitosan membranes prepared by dry/wet phase separation: a new type of wound dressing for controlled antibacterial release, *J. Membr. Sci.*, 212 (2003) 237-254.
- [49] Broekema, F. I., van Oeveren, W., Zuidema, J., Visscher, S. H., Bos, R. R., *In*

- vitro* analysis of polyurethane foam as a topical hemostatic agent, *J. Mater. Sci. Mater. M.*, 22 (2011) 1081-1086.
- [50] Domalik-Pyzik, P., Morawska-Chochol, A., Chlopek, J., Rajzer, I., Wrona, A., Menaszek, E., Ambroziak, M., Polylactide/Polycaprolactone asymmetric membranes for guided bone regeneration, *e-Polymers Vol 16* (2016) 351-358.
- [51] *Polímeros e Materiais Poliméricos, Manual para o Professor.*
- [52] Franchetti, S., M., M., Marconato, J., C., Polímeros biodegradáveis- Uma solução parcial para diminuir a quantidade dos resíduos plásticos, *Quim. Nova Vol 29* (2006) 811-816.
- [53] Zohara, F., T., Azim, A., Y., M., A., Biomaterials as porous scaffolds for tissue engineering applications: a review, *Eur. Sci. J. Vol 10* (2014) 186-206.
- [54] Sell, S., A., Wolfe, P., S., Gorg, K., McCool, J., M., Rodriguez, I., A., Bowlin, G., L., The Use of Natural Polymers in Tissue Engineering: A Focus on Electrospun Extracellular Matrix Analogues, *Polymers Vol 2* (2010) 522-553.
- [55] Bosworth, L., A., Downes, S., *Electrospinning for tissue regeneration*, Woodhead Publishing Limited, 2011.
- [56] Olatunji, O., *Classification of Natural Polymers*, Springer International Publishing Switzerland 2016.
- [57] Oillai, O., Panchagnula, R., *Polymers in drug delivery*, *Current Opinion in Chemical Biology Vol 5*, 2011.
- [58] Morgado, S. P., *Preparação de adesivos cirúrgicos com ação farmacológica*, Tese de Mestrado, Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade de Coimbra, 2015.
- [59] Malafaya, P., B., Silva, G., A., Reis, R., L., Natural – origin polymers as carriers and scaffold for biomolecules and cell delivery tissue engineering applications,

Advanced Drug Delivery Reviews Vol 59 (2007) 207-233.

- [60] Rose, J., B., Pacelli, S., El Haj, A., J., Dua, H., S., Hopkinson, A., White, L., J., Rose, F., R., A., Gelatin-Based Materials in Ocular Tissue Engineering, *Materials* vol 7 (2014) 3106-3135.
- [61] Aguirre-Álvarez, G., Foster, T., Hill, S., E., Modelling of isotherms and their hysteresis analysis in gelatin from different sources, *CYTA-Journal of food* Vol 11 (2013) 68-74.
- [62] Boolin, G., Ma, P., X., Synthetic biodegradable functional polymers for tissue engineering: a brief review, *International Institute of Health* 2014.
- [63] Jahno, V., D., Síntese e Caracterização do Poli(L-ácido Láctico) para uso como biomaterial, Tese de Mestrado, Escola de Engenharia da UFRGS, Porto alegre, 2005.
- [64] Jamashidian, M., Tehrony, E., A., Imran, M., Jacquat, M., Desobry, S., Poly-lactic Acid: Production, Applications, Nanocomposites and Release Studies Vol 9 (2010) 552-571.
- [65] Gunatillake, P., A., Adhikan, R., Biodegradable synthetic polymers for tissue engineering, *Europeans cells and Materials* Vol 5 (2003) 1-16.
- [66] Mehto, R., Kumar, V., Bhunia, H., Upadhyay, S., N., Synthesis of Poly (Lactic Acid): A Review, *Journal of Macromolecular Science, Part C: Polymer Reviews* Vol 45 (2005) 325-349.
- [67] Azimi, B., Nourpanah, P., Rabiee, M., Arbab, S., Poly (ϵ -caprolactone) Fiber: Na Overview, *Journal of Engineered Fibers and Fabrics* Vol 9 (2014) 74-90.
- [68] Woodruf, M., A., Hutmacher, D., W., The return of a forgotten polymer – Polycaprolactone in the 21st century, *Institute of health and Biomedical Innovation, Queensland University of Technology, Australia, 2010.*

- [69] Amoabediny, C., Sahali-Nik, N., Heli, B., The Role of Biodegradable Engineered Scaffold in Tissue Engineering, Biomaterials Science and Engineering, 2011.
- [70] Pham, Q., P., Sharma, U., Mikos, A., G., Electrospinning of Polymeric Nanofibers for Tissue Engineering Applications: A Review, Tissue Engineering Vol 12 (2006) 1197-1211.
- [71] Khoo, W., Koh, C., T., A Review of Electrospinning and microstructure morphology control, AR PN Journal of Engineering and Applied Sciences Vol 11 (2011) 7774-7781.
- [72] Aires, A., M., M., Biodispositivos Eletrónicos implantáveis e biodegradáveis: nano/microfibras de poli (ϵ -caprolactona) (PCL), Tese de Mestrado, Faculdade de Ciências e Tecnologias da Universidade Nova de Lisboa, 2012.
- [73] Ji, W., Yang, F., van den Beucken, J., J., J., P., Bian, Z., Fan, M., Chen, Z., Jansen, J., A., Fibrous scaffolds loaded with protein prepared by blend or coaxial electrospinning, Acta Biomaterials Vol 6 (2010) 4199-4207.
- [74] Chen, Y., Yan, L., Yuan, T., Zhang, Q., Fan, H., Asymmetric polyurethane membrane with *in situ* generated nano-TiO₂ as wound dressing, J. Appl. Polym. Sci Vol 119 (2011) 1532-1541.
- [75] Yuan, Y., Lu, T., R., Contact angle and wetting properties, Surface Science techniques, Springer (2013) 3-34.
- [76] Tancheva, M., Spasova, M., Paneva, D., Manolova, N., Rashkov, I., Polylactide (PLA)- based electrospun fibrous materials containing ionic drugs as wound dressing materials: A review, Int. J. Polym. Mater. Vol 63 (2014) 657-671.
- [77] Augustine, R., Dominic, E., A., Reju, I., Kaimal, B., Kalarikkal, N., Thomas, S., Electrospun poly (ϵ -caprolactone)-based skin substitutes: *In vivo* evaluation of wound healing and the mechanism of cell proliferation, J. Biomed. Mater. Res. B,

2014.

- [78] Liu, L., Hu, D., Xu, G., Shou, L., Yao, J., Fabrication and evaluation of polyurethane-based asymmetric membranes, *J. Mater. Sci.* Vol 49 (2013) 1902-1910.
- [79] Elsner, J., J., Zilberman, M., Novel, Antibiotic-eluting wound dressings: An *in vivo* study and engineering aspects in the dressing's design, *J. issue Viab.* Vol 19 (2010) 54-66.
- [80] Zahouani, H., Paillet-Mattei, C., Sohm, B., Vargiolu, R., Cerizo, V., Debret, R., Characterization of the mechanical properties of a dermal equivalent compared with human skin *in vivo* by indentation and static friction tests, *Skin Res. Technol.* Vol 15 (2009) 68-76.
- [81] Zargarian, S., S., Haddadi-Asl, V., Nanofibrous Composite Scaffolds of PCL/Hidroxyapatite-chitosan/PVA Prepared by Electrospinning, *Iranian Polymer Journal* Vol 19 (2010) 457-468.
- [82] Feng, B., Tu, H., Yuan, H., Peng, H., Zhang, Y., Acetic-Acid-Mediated Miscibility toward Electrospinning Homogeneous Composite Nanofibers of GT/PCL, *Biomacromolecules* Vol 13 (2012) 3917-3925.
- [83] Klotz, B., J., Gawlitta, D., Rosenberg, A., J., W., P., Malda, J., Melchels, F., P., W., Gelatin_Methacryloyl Hydrogels: Towards Biofabrication – Based Tissue Repair, *Trends in Biotechnology* (2016) 1-14.
- [84] Stuart, B., *Infrared Spectroscopy: Fundamentals and Applications*, John Wiley and sons, Ltd 2004.
- [85] Balon, V., Verestiuc, L., Strategies to improve chitosan hemocompatibility: A Review, *European Polymer Journal* Vol 53 (2014) 171-188.
- [86] Valdkova, T., G., *Surface Engineered Polymeric Biomaterials with Improved*

Biocontact Properties, International Journal of Polymer Science, 2010.

- [87] Kong, J., Yu, S., Fourier Transformed Infrared Spectroscopy Analysis of Protein Secondary Structures, *Acta Biochimica et Biophysica Sinica* Vol 39 (20093) 549-559.
- [88] Hanani, Z., A., N., Roos, Y., H., Kerry, J., P., Fourier Transform Infrared (FTIR) Spectroscopic Analysis of Biodegradable Gelatin Films Immersed in Water, School of Food and Nutritional Sciences, University College Cork (UCC), Cork, Ireland.
- [89] De Wael, K., Verstraete, A., Van Vlierberghe, S., Dejonghe, W., dubruel, P., Adriaens, A., The Electrochemistry of Gelatin Modified Gold Electrode, *Int. J. Electrochem. Sci.* Vol 6 (2011) 1810-1819.
- [90] Alves, P., Cardoso, R., Correia, T., R., Antunes, B., P., Correia, I., J., Ferreira, P., Surface modification of polyurethane films by plasma and ultraviolet light to improve haemocompatibility for artificial heart valves, *Colloids and Surfaces B: Biomaterials*, 2013.