

UNIVERSIDADE NOVA DE LISBOA
Faculdade de Ciências e Tecnologia
Departamento de Física

*Caracterização de matrizes de Quitosano para a regeneração de
tecidos produzidas pela técnica de TIPS*

Autor: Nelson dos Santos Monteiro

Orientadores:

Professor Doutor João Paulo Borges

Professor Doutor Eduardo Pires

**Dissertação apresentada na Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade
Nova de Lisboa para obtenção do grau de Mestre em Engenharia Biomédica**

Lisboa

2008

"Deus nos fez perfeitos e não escolhe os capacitados, mas capacita os escolhidos. Fazer ou não fazer algo só depende de nossa vontade e perseverança."

Albert Einstein

Agradecimentos

A Deus por tudo.

Queria agradecer minha mãe Maria Ana, meu pai Eugénio Monteiro, minha tia Domingas Santos, todos os meus irmãos e toda a minha família, pela paciência e apoio total que me deram ao longo destes anos.

Ao pensar nas pessoas que estiveram comigo e que me apoiaram, lembrei-me do meu primeiro ano da faculdade, e muitos foram aqueles que me ajudaram a chegar até aqui. Obrigado Gisela Luz, Carla Cardoso, Ana Sardinha, Katelene Lima, Diogo, Adérito... Falo de todos os meus colegas e amigos da universidade que estão escritos dentro do meu coração, ainda que não haja aqui lugar para todos mencionados.

Agradeço aos meus irmãos de fé que de uma forma ou de outra me ajudaram com as suas orações.

Queria agradecer o Professor Doutor João Paulo Borges, meu orientador, bem como ao Doutor Eduardo Pires (CERAMED) e todos os meus amigos e colegas da empresa CERAMED, pelo apoio e ajuda prestados durante a realização desse projecto.

Agradeço também à minha querida amiga Elisabete Lima Alves, pela força, carinho, compreensão e amor que me tem mostrado ao longo deste tempo.

Listas de Abreviaturas e Acrónimos

Abreviatura	Nome completo
3D	Tridimensional
A	Área
AcA	Ácido Acético
AcL	Ácido Láctico
ASTM	American Society for Testing and Materials
CS	Quitosano
DA	Grau de acetilação
DD	Grau de desacetilação
DMAc	Dimetilacetamida
DMEM	Meio Eagle Modificado por Dulbecco
DP	Desvio padrão
E	Módulo de Young
ECM	Matriz extracelular
ET	Engenharia de Tecido
F	Força
FDM	Tipo de Prototipagem rápida (Fused deposition modeling)
FTIR	Espectroscopia de Infravermelhos por Transformada de Fourier.
GPC/SEC	Gel permeation chromatography / Size exclusion chromatography – cromatografia de exdução molecular.
CS _H	Quitosano de elevado peso molecular.
HCA	Hidroxiapatite carbonatada
I&D	Investigação e Desenvolvimento
ISO	International Standardization Organization
L	Comprimento do material
LH	Penso hemostático (não coagulado)
LiCl	Cloreto de lítio
LP	Penso coagulado.
m	Massa das soluções nos moldes em grama (g)
M _n	Peso molecular numérico médio
M _p	Massa Molar no pico médio
MTT	3- (4,5-dimetiltiazol-2-il) -2,5-difenil tetrazolium brometo
M _w	Peso molecular médio em peso

P	Pressão
PD	Grau de polidispersão
PDLLA	Poli (DL- ácidoláctico)
PF	Pré congelamento
RP	Prototipagem rápida
S	Quitosano de baixo peso molecular.
SBF	Soro Fisiológico simulado (simulated body fluid)
SEM	Microscopia Electrónica de Varrimento
SF	Soro Fisiológico
SFF	Solid Freeform Fabrication
ST	Solução Tampão (pH=5)
ST2	Solução Tampão (pH=9,8)
T	Temperatura
TIPS	Separação de fase Induzida Termicamente (Thermal Induced Phase Separation)
ϵ	Extensão à ruptura
σ	Tensão à ruptura
τ	Torque
$\dot{\gamma}$	Taxa de corte

Unidades

cp	centipoise (mPa·s)
h	Horas
rpm	Rotações por minuto

Lista de Figuras

Figura 1- Representação esquemática das principais estratégias de renovação de um novo tecido (Langer R., 1999):.....	17
Figura 2 - Representação da estrutura do CS onde X representa o grau de acetilação. 20	
Figura 3 - Etapas de processamento da técnica de TIPS	27
Figura 4 -Diagrama de fases (Enciclopédia(b), 2008)	28
Figura 5 – Ciclo de Liofilização, (ver Controlo automático em anexo), (Labconco, 2007).	33
Figura 6 - Espectro de infravermelhos típico de quitina/quitosano (Khor & Lim, 2003) 35	
Figura 7 – Refracção da luz, Lei de Snell.....	37
Figura 8 – Viscosímetro.....	40
Figura 9 – Curva de tensão à ruptura / extensão à ruptura.	44
Figura 10 – Espectro de FTIR da Cognis S e da Sigma H	51
Figura 11 – Curva típico de GPC/SEC obtida para o CS (neste caso apresenta-se a curva obtida com o CS da Cognis)	52
Figura 12 – Gráfico de viscosidade em função da concentração de AcA com 1,5% CS (p/p) de Sigma H.....	55
Figura 13 - Gráfico da viscosidade em função da concentração CS.....	55
Figura 14 - Aparência das soluções variando a concentração do CS da Sigma H.....	57
Figura 15 – Câmara de amónia	58
Figura 16 - Gráfico da taxa de inchamento em função do tempo de imersão.....	59
Figura 17- Gráfico da taxa de inchamento em função do tempo de imersão.	60
Figura 18- Gráfico taxa de perda de massa em função do tempo de imersão.	60
Figura 19 - Parâmetros do ciclo de liofilização dos LH	62
Figura 20 – Representação gráfica do ciclo de liofilização.....	62
Figura 21 – Penso hemostáticos após o primeiro ciclo de liofilização (5%CS Cognis S 2%AcA)	63
Figura 22 - LH liofilizados com 3 horas de secagem.....	63
Figura 23 - Parâmetros do ciclo de liofilização, dos pensos curativos, otimizado	64

Figura 24 – Representação gráfica do ciclo de liofilização otimizado	64
Figura 25 – Câmara de Liofilização e o desenho da segunda prateleira	65
Figura 26- Pensos curativos obtidos com a segunda prateleira	65
Figura 27 – Penso com defeito depois do ciclo de liofilização com a segunda prateleira.	66
Figura 28 – Teste de degradação dos LH, evidenciando (seta) a falta de integridade estrutural da amostra não prensada (B).	67
Figura 29 – LH esterilizado: 5%CS Cognis S 2% AcA m=30g	67
Figura 30 – Diferentes zonas de um LH, de onde foram retiradas amostras para SEM. 69	
Figura 31 – Imagem de SEM do LH 5% CS Cognis S e 2%AcA m=30g:.....	69
Figura 32 – Imagem de SEM dos LH 1,5% CS Sigma H 1%AcA e 2%CS Sigma H 0,5% AcA:	70
Figura 33 – Imagem de SEM dos LH, 2%CS Sigma H 0,5% AcA:.....	71
Figura 34 - Tracção de um LH até a ruptura (5% CS Cognis S 2%AcA m=40g).....	72
Figura 35- Gráfico da resistência à tracção e extensão à ruptura em função da concentração de CS.	73
Figura 37- Parâmetros do ciclo de liofilização dos LP otimizados	74
Figura 36 – LP coagulados com NaOH.....	74
Figura 38 – Representação gráfica do ciclo de liofilização dos LP.....	75
Figura 39- LP após o segundo ciclo de liofilização (5%CS Cognis, 2%AcA)	75
Figura 40- Gráfico da taxa de inchamento em função do tempo de imersão.	76
Figura 41- Gráfico da taxa de perda de massa em função do tempo de imersão.	77
Figura 42- Gráfico da tensão à ruptura e extensão à ruptura em função da concentração de CS dos LP.....	78
Figura 43 – Diagrama de preparação das matrizes para ET.....	79
Figura 44 - Coagulação das matrizes variando a concentração de AcA com 1,5% CS da Sigma H e uma solução da Cognis S (1,5%).	81
Figura 45 – Matrizes para a ET variando a concentração de CS.....	82
Figura 46 – Coagulação das matrizes com fibras para ET.....	83
Figura 47 – Parâmetros de liofilização das matrizes 3D para ET.....	84
Figura 48 - Representação gráfica do ciclo de liofilização das matrizes.	84
Figura 49 – Matrizes depois de liofilizadas.....	84

Figura 50 – Aspectos visíveis das matrizes depois de liofilizadas.....	85
Figura 51 – Matrizes com fibras depois de liofilizadas.....	86
Figura 52 – Gráfico da taxa de inchamento das matrizes com fibras	87
Figura 53 – Matrizes depois de esterilizadas.....	87
Figura 54 – Imagens de SEM das matrizes, sem fibras (2%CS Sigma H 0.5% AcA)	88
Figura 55 – Imagem de SEM das matrizes (com fibras 2%CS Sigma H 0.5% AcA).....	88
Figura 56 – Aplicação do LH na pata traseira do gato com uma ferida grave.....	91
Figura 57 – O Liofilizador e a bomba de vácuo usadas neste trabalho.	100
Figura 58 – Painel de controlo do liofilizador	101
Figura 59 - Limpeza e remoção de impurezas	104
Figura 60 - Tubo drenagem do colector.	104
Figura 61 - <i>Stoppering Control</i>	104

Lista de Tabelas

Tabela 1 - Principais propriedades do quitosano e as suas aplicações Biomédicas.....	22
Tabela 2 - Processos de fabricação de matrizes porosos	25
Tabela 3- CS utilizado na preparação das soluções.....	49
Tabela 4 – Reagentes utilizados.....	49
Tabela 5 - Grau de acetilação do CS da Cognis S e Sigma H.....	51
Tabela 6- Massa molecular do CS da Cognis S e Sigma H.....	52
Tabela 7 - Viscosidade das soluções do CS da Cognis S.....	53
Tabela 8 - Valores de viscosidade variando a concentração de ACA e do CS Sigma H. .	54
Tabela 9 – Tensão à ruptura e extensão à ruptura dos LH.....	72
Tabela 10 – Propriedades mecânicas dos LP.....	78
Tabela 11 – Soluções usadas na preparação das matrizes.....	80
Tabela 12 – Reagentes utilizados nos testes de citotoxicidade	89
Tabela 13 – Resultados obtidos para os testes MTT	90

Resumo

Entre as principais aplicações biomédicas do quitosano (CS), encontra-se a produção de matrizes para Engenharia de Tecidos (ET). Este polissacarídeo apresenta diversas características de interesse, tais como a actividade antimicrobiana e a capacidade de cicatrização de lesões provenientes de agressões, como por exemplo, ferimentos ou queimaduras. Além disso, o CS estimula a proliferação celular, é biodegradável, biocompatível e confere excelente resistência mecânica aos biomateriais em si baseados.

Neste trabalho foram produzidos e caracterizados hidrogéis, pensos curativos coagulados e não coagulados e matrizes 3D para a ET, produzidos a partir de soluções de CS.

Foram estudados diferentes parâmetros da produção de hidrogéis: o tempo de exposição necessária para a sua coagulação dentro de uma câmara de amónia e o seu comportamento quando colocados em soluções aquosas de diferente pH.

Diferentes matrizes foram produzidas pela técnica de TIPS, a saber: pensos curativos (coagulados e não coagulados) e matrizes 3D para a ET.

As condições de liofilização foram optimizadas para cada um destes materiais, tendo-se verificado que é possível obter materiais com elevada anisotropia.

As características físico-químicas e mecânicas destes materiais dependem das soluções precursoras, bem como do processamento.

Todos os materiais foram testados à citotoxicidade e os pensos curativos não coagulados foram usados para testes “*in vivo*”, tendo-se verificado que este promove a cicatrização de feridas.

O presente trabalho representa, assim, uma contribuição para o desenvolvimento dos nossos materiais à base de CS, para aplicações médicas.

Abstract

The production of scaffolds for Tissue Engineering (TE) is one of the most important applications of chitosan (CS) in the biomedical field.

This polysaccharide presents several characteristics of interest such as: antibacterial activity, improves the cicatrization process of lesions such as wounds and burns. Furthermore, CS stimulates the cellular proliferation and it is biodegradable, biocompatible and provides excellent mechanical resistance to materials.

In this work, hidrogel, wound dressings, coagulated and not coagulated, and matrices 3D for TE were produced and characterized using as a starting point CS solutions.

Several parameters of hydrogel production were studied, for example: the exposure time necessary for the coagulation in an ammonia chamber, and the behavior of the hydrogels when placed in aqueous solution of different pH.

Different matrices were produced by the technique of TIPS, namely: wound dressing (coagulated and not coagulated) and 3D matrices for TE.

The conditions of lyophilization were optimized for each of these materials, having verified that it is possible to obtain materials with high anisotropy.

The physico-chemical and mechanical characteristics of these materials depend on the solutions precursor, as well as on processing.

All the materials were tested in terms of cytotoxicity and, wound dressings (not coagulated) were tested "in vivo", it was found that they promote the wound healing (cicatrization).

This work represents, therefore, a contribution to the development of our CS-based material, for medical applications.

Enquadramento e Objectivo

O presente trabalho enquadra-se no Mestrado Integrado em Engenharia Biomédica da Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade Nova de Lisboa, centrando-se, principalmente, na produção e caracterização de hidrogéis, pensos curativos e matrizes 3D produzidos a partir do CS e desenvolvidos para a aplicação em ET, em particular à regeneração de tecidos cutâneos.

Múltiplas estratégias na área da Engenharia de Tecidos (ET) fazem uso de matrizes tridimensionais (3D) designadas por “*scaffolds*”. Estes materiais funcionam como uma matriz extracelular (ECM), organizando as células tridimensionalmente e estimulando o crescimento e formação do tecido desejado. Podem ser utilizados para transportar células antes da sua implantação “*in vivo*”, ou, tão-somente, servir de material bioactivo atraindo células do tecido onde é implantado.

Apesar da diversidade de materiais destinados ao tratamento de ferimentos e queimaduras disponíveis no mercado, normalmente o custo do tratamento é bastante elevado, principalmente devido ao custo dos curativos ou à necessidade da sua troca frequente. Assim, um dos grandes desafios dos investigadores na área de regeneração da pele consiste no desenvolvimento de biomateriais, a partir de matérias-primas de baixo custo, fácil acesso e com características adequadas para a função destinada, como o CS.

Este trabalho foi realizado na empresa de acolhimento CERAMED, tendo sido o trabalho experimental dividido entre as instalações desta última, a Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade Nova de Lisboa, o ISQ (Instituto de Soldadura e Qualidade), Departamento de Biotecnologia no campus do INETI e o Hospital Veterinário de São Bento em Lisboa, e pretende ser uma contribuição para a actividade de I&D na área de regeneração da pele.

Os objectivos deste trabalho são:

- Produção e caracterização de hidrogéis, pensos curativos coagulados e não coagulados e matrizes para a ET.
- Determinação dos parâmetros óptimos de liofilização.

Índice

Agradecimentos.....	3
Listas de Abreviaturas e Acrónimos.....	4
Unidades.....	5
Lista de Figuras.....	6
Lista de Tabelas.....	8
Resumo.....	9
Abstract.....	10
Enquadramento e Objectivo.....	11
1. Introdução.....	15
1.1. Engenharia de tecidos (ET).....	16
1.2. <i>Scaffolds</i> – Matrizes temporários para o crescimento de tecidos.....	17
1.3. Biomateriais.....	19
1.4. Qitosano.....	20
1.5. Curativos em geral.....	22
1.5.1 Hidrogéis.....	22
1.5.2 Pensos curativos.....	23
1.6. Métodos de Processamento.....	24
1.7. Processamento de matrizes 3D por TIPS.....	26
1.7.1. O processo de TIPS.....	27
2. Métodos de Caracterização.....	34
2.1. Caracterização física, química e mecânica.....	34
2.1.1. Espectroscopia de Infravermelhos por Transformada de Fourier (FTIR).....	34
2.1.2. Cromatografia líquida de exclusão molecular (GPC / SEC).....	36
2.1.3. Viscosimetria Rotacional.....	38
2.1.4. Microscopia Electrónica de Varrimento (SEM).....	41
2.1.5. Testes de inchamento e perda de massa.....	42
2.1.6. Testes mecânicos.....	43
2.2. Esterilização.....	45
2.2.1. Esterilização por radiação.....	45
2.3. Caracterização Biológica.....	47
2.3.1. Testes “ <i>in vitro</i> ”.....	47
2.3.2. Testes “ <i>in vivo</i> ”.....	48

3.	Materiais	49
4.	Características do quitosano e das suas soluções.....	50
4.1.	Caracterização do CS.....	50
4.1.1.	Grau de Acetilação (DA).....	50
4.1.2.	Massa molecular.....	51
4.2.	Preparação das soluções.....	53
4.3.	Características reológica das soluções.....	54
4.3.1.	Variação da concentração de solvente (AcA).....	54
4.3.2.	Variação da concentração de Solute (CS).....	55
5.	Hidrogéis	57
5.1.	Preparação dos hidrogéis.....	57
5.2.	Caracterização dos hidrogéis.....	58
5.2.1.	Tempo de coagulação e processo de lavagem.....	58
5.2.2.	Testes de Inchamento e perda de massa	59
6.	Pensos curativos	61
6.2.	Preparação dos pensos curativos.....	61
6.3.	Caracterização dos pensos curativos.....	62
6.3.1.	Pensos curativos não coagulados (LH)	62
6.3.1.1.	Liofilização.....	62
6.3.1.2.	Optimização do ciclo de liofilização.....	63
6.3.1.3.	Teste de degradação	66
6.3.1.4.	Esterilização.....	67
6.3.1.6.	Microscopia Electrónica de Varrimento – SEM.....	68
6.3.1.7.	Testes mecânicos.....	71
6.3.2.	Pensos curativos coagulados (LP)	74
6.3.2.1.	Liofilização.....	74
6.3.2.2.	Testes de inchamento e perda de massa.....	76
6.3.2.3.	Testes mecânicos.....	78
7.	Matrizes 3D para ET.....	79
7.2.	Preparação das matrizes.....	79
7.3.	Coagulação matrizes com e sem fibras.....	81
7.3.1.	Coagulação das matrizes sem fibras.....	81
7.3.2.	Coagulação de matrizes com fibras	82
7.4.	Liofilização das matrizes.....	83

7.5.	Testes de Inchamento.....	86
7.6.	Esterilização.....	87
7.7.	Microscopia electrónica de varrimento - SEM.....	88
8.	Testes “ <i>in vitro</i> ” e “ <i>in vivo</i> ”	89
8.1.	Teste “ <i>in vitro</i> ” - Teste de citotoxicidade.....	89
8.1.1.	Procedimento Experimental	89
8.1.2.	Apresentação e Discussão dos Resultados	90
8.2.	Teste “ <i>in vivo</i> ”.....	91
9.	Conclusão e sugestões para trabalhos futuros.....	93
9.1.	Conclusão	93
9.2.	Sugestões para trabalhos futuros	95
	Bibliografia.....	96
	Anexos.....	100
	Utilização do liofilizador.....	100
	Painel de Controlo do liofilizador.....	101
	Controlo automático.....	102
	Protocolo.....	103

1. Introdução

Actualmente, assiste-se a um aumento da esperança de vida do Homem, como consequência dos avanços da medicina, da maior preocupação com a alimentação e do conforto gerado pela denominada “vida moderna”. Como resultado directo, verifica-se o aumento da população de idosos e, conseqüentemente, das doenças relacionadas com a idade. Entre os diversos males que afectam o corpo, a perda ou degeneração de tecidos tem sido intensamente estudada, devido aos seus efeitos devastadores na qualidade de vida das pessoas ([Hence, 1991](#)).

O corpo humano é coberto por aproximadamente dois metros quadrados de pele, que além de desempenhar o papel de barreira aos ataques externos, ainda é responsável pela regulação da temperatura corporal e pela remoção de impurezas. Assim sendo, qualquer lesão cutânea, além de causar danos físicos, mecânicos e térmicos superficiais, pode também afectar as funções fisiológicas de tecidos internos. De entre as causas mais comuns de lesões cutâneas, encontram-se as queimaduras ([Yong & Khor, 2001](#); [Geeson & Berg, 1991](#)).

Nos últimos anos, o estudo de lesões cutâneas tem sido intensificado, principalmente porque as mesmas ocupam o terceiro lugar entre os acidentes que mais ocorrem no mundo e por serem debilitantes, trazem conseqüências devastadoras à vítima e a sua família ([Rossi, et al., 2003](#)).

O transplante de tecidos cutâneos continua a ser a prática mais corrente para resolver estes problemas. Embora estas terapias tenham salvo e melhorado milhões de vidas, elas representam ainda hoje soluções bastante limitadas, devido aos problemas associados aos auto-enxertos.

Muitos dos implantes são preparados a partir de materiais duráveis e não biodegradáveis. Entretanto, os polímeros biodegradáveis são preferíveis, pois permanecem estáveis por um período de tempo no organismo, sendo depois degradada metabolicamente ([Mano, et al., 2004](#)).

Contudo, ainda estão por encontrar novas soluções necessárias para a recuperação rápida dos pacientes.

O projecto de tese intitulado “Caracterização de matrizes de Quitosano para a regeneração de tecidos produzidas pela técnica de TIPS” envolve o conhecimento de princípios da engenharia e das ciências da vida. Assim sendo, para sua melhor

compreensão, foi feita uma revisão da literatura sobre alguns itens considerados importantes, os quais se encontram descritos a seguir.

1.1. Engenharia de tecidos (ET)

Como foi definido por [Langer e Vacanti](#) (1993) a ET é “*um campo interdisciplinar de investigação que aplica os princípios da engenharia e de ciências da vida para o desenvolvimento de substitutos biológicos que restauram, mantêm ou melhoram a função dos tecidos*”.

A ET emergiu como uma potencial alternativa ao transplante de tecidos ou órgãos. Existem três estratégias principais em ET. A primeira, corresponde à implantação de células cultivadas “*in vitro*” (Terapia Celular), na presença ou ausência de uma matriz tridimensional, com o potencial de serem integradas e de formar tecido funcional após a implantação. A segunda, prende-se com a implantação de tecidos funcionais formados em laboratório pela junção de células, provenientes do paciente ou de um dador e uma matriz (por exemplo pele artificial). A terceira, corresponde à regeneração dos tecidos “*in situ*”, utilizando uma matriz que promove a migração e adesão de populações específicas de células, as quais levarão à reparação ou substituição do tecido danificado.

Na figura 1, estão representadas as estratégias adoptadas para a criação de um novo tecido.

Durante a década de 90 do século XX, os progressos nesta área levaram à comercialização dos primeiros produtos tais como pele (Apligraf da Organogenesis e TranCyte da Advanced Tissue Science) e cartilagem (Carticel da Genzyme Tissue Repairs) bioartificiais ([Fabiani, et al., 1995](#)).

A vantagem da ET é o número reduzido de operações, resultando num curto período de tempo de recuperação do paciente. No entanto, as exigências dos materiais para a ET são múltiplas ([Langer, 1999](#)).

Numa perspectiva biológica precisamos de células, matriz extracelular, comunicação intercelular, interações células -matriz, e factores de crescimento. Para obter um bom resultado final, todas estas exigências têm que ser combinadas de uma forma coordenada ([Mano, et al., 2004](#)).

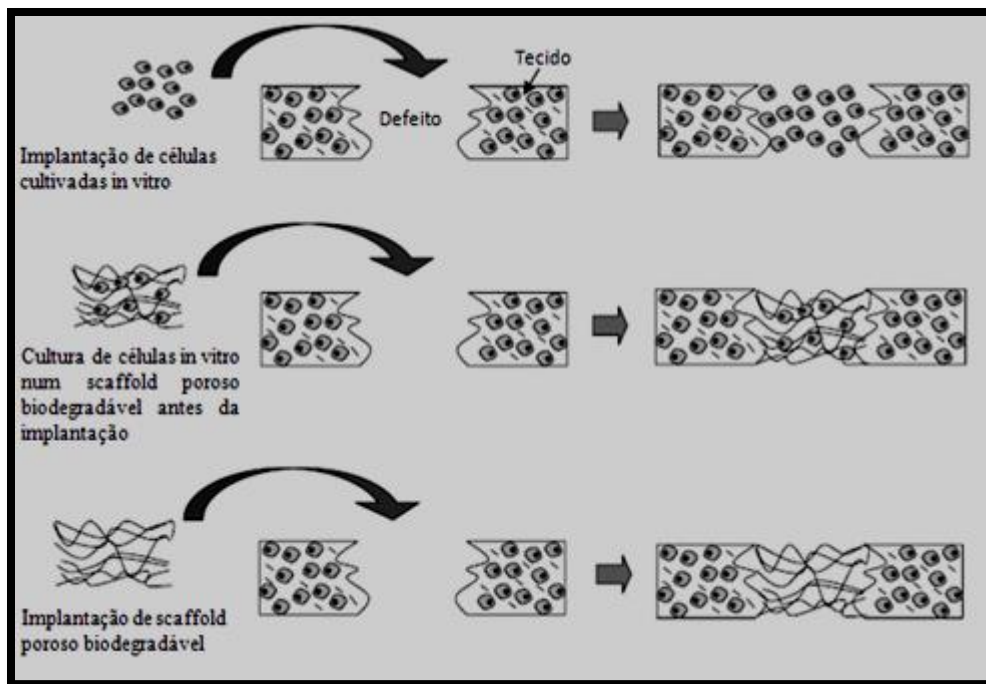


Figura 1- Representação esquemática das principais estratégias de renovação de um novo tecido (Langer R., 1999):

- a) Implantação de células “in vitro”.
- b) Cultura de células “in vitro” num *scaffold* poroso biodegradável antes da implantação.
- c) Implantação do *scaffold* poroso biodegradável.

1.2 *Scaffolds* – Matrizes temporários para o crescimento de tecidos

Qualquer tecido consiste numa matriz com um ou, normalmente, vários tipos de células. A matriz é um *scaffold* 3D para células que lhes fornece um tecido envolvente específico e uma arquitectura (Kneser, et al., 2002). Além disso, serve de reservatório de água, nutrientes e factores de crescimento. Nesta lógica, e para restaurar a função ou regenerar os tecidos, a matriz actuará como uma estrutura temporária para a proliferação celular e deposição da ECM, com consequente crescimento do tecido até que o novo tecido seja totalmente restaurado ou regenerado (Kneser, et al., 2002). Também, pode actuar como suporte para a vascularização desse novo tecido (Agrawal & Ray, 2001).

É então lógico dizer que uma matriz 3D apropriada é uma componente essencial para a ET. Entretanto, é importante entender que a matriz deve ter uma

série de propriedades que a tornem satisfatória. Além da escolha do material adequado, as propriedades macro e microestruturais dos materiais são de extrema importância. Estas podem afectar propriedades de sobrevivência das células tais como, crescimento, propagação e reorganização ([Boccaccini, et al., 2002](#)).

Assim, resumem-se as seguintes exigências de uma matriz para a ET ([Hutmacher, 2000](#); [Maquet & Jerome, 1997](#); [Leong, et al., 2003](#)):

- Biocompatibilidade e biodegradabilidade;
- Elevada porosidade e rede 3D de poros interconectados;
- Bioactividade satisfatória para explorar o processo de reparação natural do corpo;
- Superfície química óptima para a adesão e diferenciação das células;
- Integridade mecânica;
- Facilidade do processo de fabricação;

1.3 Biomateriais

Biomateriais são materiais que, de modo contínuo ou intermitente entram em contacto com fluidos corpóreos, mesmo quando localizados fora do corpo. Tais materiais são projectados para reparar e/ou reconstituir partes ou restaurar as funções do corpo humano ([Legeros, 2002](#)).

A selecção dos materiais para produzir um scaffold para ser utilizado nas aplicações de ET é uma das etapas mais importantes. Assim, as suas propriedades determinam, em grande parte, as propriedades das matrizes. Até agora têm sido propostos vários materiais tais como metais, polímeros de origem natural ou de origem sintética e materiais cerâmicos. No entanto, metais e muitos dos materiais cerâmicos não são biodegradáveis, deixando aos investigadores poucas escolhas uma vez que existe um número bastante reduzido de polímeros e materiais cerâmicos biodegradáveis.

Os polímeros biodegradáveis são considerados os materiais ideais para a produção de matrizes para a ET. Estes podem ser divididos em dois grupos: naturais e sintéticos ([Agrawal & Ray, 2001](#); [Leong, et al., 2003](#)).

Os Polímeros biodegradáveis naturais são obtidos de fontes naturais, animais ou vegetais. Dessa natureza podemos encontrar, entre outros, o colagénio ([Ignatius, et al., 2005](#)), o fibrinogénio ([Hojo, et al., 2003](#)), o quitosano (CS) ([Tolaimate, et al., 2003](#); [Zhao, et al., 2002](#)), o amido ([Reis & Cunha, 1995](#); [Gomes, et al., 2001](#)), o ácido hialurónico ([Liu, et al., 1999](#); [Kostopoulos & Karring, 1994](#)) e polihidroxibutirato ([Chen & Wang, 2002](#)). As principais vantagens destes materiais são: o baixo potencial imunogénico, o comportamento bioactivo, a capacidade de interagir com o tecido anfitrião, a versatilidade química e, nesse caso, o facto de serem provenientes de fontes renováveis e abundantes.

Os Polímeros biodegradáveis sintéticos são, normalmente, os mais usados dentro do campo de engenharia biomédica. Os mais usados são os poli (α -hidroxiácidos) ([Mooney, et al., 1996](#); [IshaughRiley, et al., 1997](#)), a poli (ϵ -caprolactona) ([Washburn & Simon, 2002](#); [Shantz, et al, 2002](#)), os poli (carbonatos) ([Li & Khon, 1989](#); [Pulapuram, et al, 1990](#)) e os poli (anidridos) ([Uhrich, et al., 1998](#); [Levenberg & Langer, 2004](#)).

Além disso, tem sido feitos esforços no sentido de desenvolver matrizes com incorporação de moléculas, tais como factores de crescimento ou fármacos. Estas matrizes podem libertar localmente os factores de crescimento ou fármaco (como um antibiótico) e potenciar a regeneração do tecido lesado ([Boccaccini, et al., 2005](#); [Yao, et al., 2005](#)).

1.4 Quitosano

O quitosano é um co-polímero linear de unidades de glucosamina e de N-acetilglucosamina ligado por ligações glicosídicas [β -1 \rightarrow 4]. O quitosano é obtido por desacetilação parcial da quitina, um polissacarídeo natural abundante. O CS diferencia-se da quitina, apenas pela quantidade de grupos amina presentes ([Rinaudo, 2006](#)).

Quando a fracção molar do grupo amina (representado por 1-X da figura 2) é superior a 0,5 o polímero designa-se por quitosano (CS). E, caso contrário, designa-se por quitina.

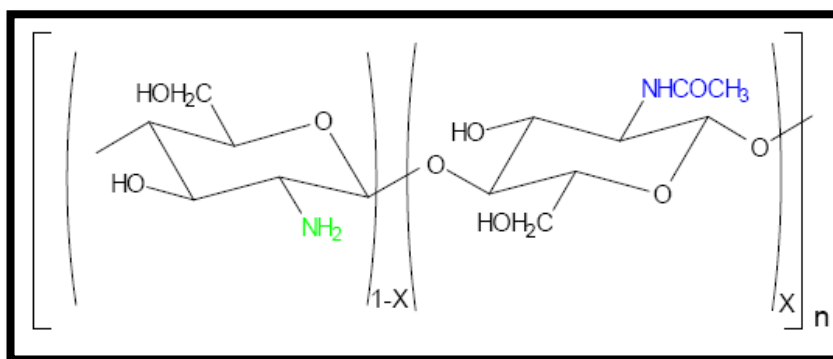


Figura 2 - Representação da estrutura do CS onde X representa o grau de acetilação ([Rinaudo, 2006](#)).

A fracção de grupos amina, também designada por grau de desacetilação* influencia a solubilidade do CS, bem como a viscosidade das soluções onde está presente.

As propriedades químicas do CS são determinadas não só pelo seu peso molecular (entre 300 e 1000 kDa), mas também pelo seu grau de desacetilação (entre 30% e 95%) ([Dornish, et al., 2001](#); [VandeVord, et al., 2002](#)). Na sua forma cristalina, o CS é insolúvel em soluções aquosas com pH acima de 7, entretanto, em ácidos diluídos (pH <6,0) como o ácido clorídrico e o ácido acético, onde os grupos

amina livres estão protonados a molécula é mais solúvel ([Madihally & Matthew, 1999](#)).

No domínio dos biomateriais, o CS e seus derivados aparecem como materiais para filmes ou películas de revestimento e tratamento de queimaduras e feridas. Podem também ser utilizados como biomateriais em suturas absorvíveis pelo organismo, como agentes anticoagulantes e como agentes hemostáticos. Estes polímeros são também usados em sistemas de libertação controlada de fármacos e em tecnologia genética ([Khor, 2001](#); [Rinaudo, 2006](#); [Henrique, 2007](#)).

Desde 1950, que se conhece a aptidão dos policatiões de se ligarem às células vermelhas do sangue. Muitos estudos têm demonstrado a sua eficácia como agentes aglutinantes de células. Em meados dos anos 60, estudos demonstraram a capacidade do CS, em baixas concentrações, de promover a aglutinação das células vermelhas do sangue, sendo essa capacidade dependente da estrutura e da massa molar do polímero ([Malette, 1983](#)).

Sabe-se que a força repulsiva existente entre as células vermelhas do sangue deve-se à rede de cargas negativas das membranas celulares e a formação do gel, sobre as células vermelhas do sangue, é devido à interacção entre o CS, positivamente carregado, e os receptores presentes na superfície da célula ([Malette, 1983](#)).

Também o CS tem sido combinado com outros materiais tais como a gelatina, alginato, polilactato, colagénio, fosfatos de cálcio, e hidroxiapatite, para produzir matrizes e reparar tecidos, tais como osso, cartilagem e pele ([Hideki, 1994](#)).

Devido ao interesse que estes biopolímeros têm despertado, todos os anos emergem novas e espantosas aplicações, para os derivados do quitosano. Todas estas aplicações referidas nos parágrafos anteriores são apenas uma pequena e generalizada amostra das aplicações já existentes para estes polímeros ([Khor, 2001](#); [Henrique, 2007](#)).

A tabela 1 mostra as principais propriedades do CS nas aplicações biomédicas:

Tabela 1 - Principais propriedades do quitosano e as suas aplicações Biomédicas
([Rinaudo, 2006](#))

Aplicações Biomédicas	Características Principais
Suturas cirúrgicas	Biocompatível
Implantes dentários	Biodegradável
Pele artificial	Produto de fonte renovável
Reconstrução do osso	Facilidade de formação de filme
Lentes de contacto de córnea	Agente hidratante
Libertação de fármacos	Não é tóxico, tolerado biologicamente
Encapsulação de materiais	Hidrolisado por lizosimas
	Potencia a regeneração do tecido lesado
	Eficácia contra bactérias, fungos e vírus

1.5 Curativos em geral

O tratamento de um ferimento tem como principais objectivos a prevenção / redução de riscos de infecções e a eliminação de factores que possam retardar o processo de cicatrização. Os curativos actualmente disponíveis no mercado podem ser classificados como: convencionais, hidrogéis, hidrocolóides, polímeros bioactivos, enzimas proteolíticas, curativos antiodor e filmes adesivos ([Candido, 2001](#)).

De especial interesse, para este trabalho encontram-se os hidrogéis e os pensos hemostáticos e, por isso, é nestes que será dada ênfase.

1.5.1 Hidrogéis

Os hidrogéis são redes poliméricas tridimensionais de polímeros que podem inchar em meio aquoso ou num fluido biológico e reter uma grande quantidade de água na sua estrutura sem se dissolver. Devido ao facto de serem insolúveis em água, absorvem a secreção da região lesada e libertam água na sua superfície. Ou seja, retêm a secreção da região lesada ao mesmo tempo que a mantêm hidratada ([Peppas, 1991](#)).

A vantagem da sua utilização deve-se à hidratação que proporcionam e à sensação refrescante que causam, uma vez que ocorre redução da dor inerente aos

ferimentos secos. Na presença de certos grupos funcionais ao longo das cadeias do polímero, os hidrogéis são sensíveis a temperatura, ao pH e a composição do solvente ([Peppas, 1991](#)).

Uma grande variedade de polímeros hidrofílicos é utilizada para preparar hidrogéis para aplicação nos campos farmacêutico, da medicina e da biotecnologia, particularmente para o tratamento de feridas e preparação de suportes para libertação de fármacos. Essas aplicações são possíveis devido ao facto dos hidrogéis apresentarem características como o grau de inchamento, cinética de absorção, permeabilidade ao soluto e desempenhos “*in vivo*” favoráveis ([Khurma, et al., 2006](#)).

A integridade estrutural dos hidrogéis depende das ligações formadas entre as cadeias poliméricas, físicas (pontes de hidrogénio) ou químicas. Para a preparação de hidrogéis tanto materiais sintéticos como naturais podem ser utilizados ([Peppas, 1991](#)).

De entre os polímeros naturais mais comumente estudados para serem utilizados na obtenção de hidrogéis destinados à regeneração de pele e outros tecidos, destaca-se o CS.

1.5.2 Pensos Hemostáticos

Uma preocupação a nível mundial é a falta de dispositivos para controlo de hemorragias. A hemorragia é a causa principal de morte nos campos de batalha, correspondendo aproximadamente a 50 % de tais mortes. É estimado que um terço das mortes possa ser evitado com pensos hemostáticos. Também é útil na população civil onde as hemorragias de origem traumática são a segunda causa principal de morte ([McCaryhy, et al., 2008](#)).

Actualmente, os pensos hemostáticos disponíveis, restritos ao uso em cirurgias, como o penso de colagénio, não são suficientemente resistentes e não têm propriedades adesivas para parar as hemorragias com grandes fluxos de sangue. No entanto o CS pode ser empregue na forma líquida ou em pó, para aglutinar o sangue em quantidades de microgramas/ml sendo utilizado directamente nos vasos sanguíneos ([Malette, 1983](#)).

O CS é utilizado em produtos hemostáticos granulares, tal como o Celox, feito pela Medtrade (Inglaterra), e em pensos hemostáticos feitos pela HemCon (EUA).

Os testes feitos pelos Fuzileiros navais do EUA, mostraram a capacidade do produto Celox de parar as hemorragias, em casos de feridas arteriais letais. O produto HemCon reduz a perda de sangue, quando comparado com gaze e aumenta a probabilidade de sobrevivência do paciente. Dadas essas características, esses pensos curativos da HemCon foram utilizados pelo Exército dos EUA nos campos de batalha no Iraque ([Enciclopédia\(a\), 2008](#)).

Um penso hemostático deve ter as seguintes propriedades ([McCaryhy, et al., 2008](#)):

- Fácil e rápida aplicação;
- Rápida coagulação do sangue;
- Rápida e forte adesão ao tecido;
- Impermeável.

1.6 Métodos de Processamento

A próxima etapa depois de escolher um polímero biodegradável é desenvolver ou escolher uma técnica de processamento adequado. Assim, e para não ter dúvidas de que todas as características das matrizes são cumpridas, a técnica de processamento escolhida deve obedecer, em termos gerais, aos seguintes critérios ([Boccaccini, et al., 2002](#)):

- O processo ou produção não deve afectar as propriedades dos materiais, isto é, a sua biocompatibilidade ou propriedades físico-químicas;
- A técnica deve permitir um controlo de porosidade, tamanho de poros, a sua distribuição e interconectividade;
- Grupos diferentes de matrizes devem exibir variações mínimas nas suas propriedades, quando processadas nas mesmas condições.

As técnicas mais utilizadas para a produção de matrizes, incluindo as suas vantagens e desvantagens estão resumidas na tabela 2.

Tabela 2 - Processos de fabricação de matrizes porosas

Processos de fabricação de matrizes/scaffolds			
Processos de fabricação	Vantagens	Desvantagens	Ref.
TIPS (separação de fases induzida térmicamente)	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Alta porosidade. ✓ Poros altamente interconectados. ✓ Possibilidade de obter poros anisotrópicos e tubulares. ✓ Controlo da estrutura e tamanho dos poros, variando as condições de preparação. 	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Longo tempo para sublimação do solvente (48h). ✓ Problemas de contração ✓ Produção em grande escala ✓ Uso de solventes orgânicos 	(Hideki, 1994)
Moldação por compressão / libertação de partículas	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Porosidade controlada ✓ Possível classificação da porosidade das estruturas ✓ Não usa solventes orgânicos 	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Pobre interconectividade e baixa porosidade ✓ Dificuldade em gerar grandes estruturas (espessura > 3mm) ✓ Nem todas as partículas são dissolvidas ✓ O calor pode danificar a encapsulação de moléculas ou células. 	(Lu, et al., 2003)
Evaporação de solvente/ libertação de partículas	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Porosidade e Interconectividade controladas 	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Estruturas geralmente isotrópicas ✓ Uso de solventes orgânicos 	(Taboas, et al., 2003)
Sinterização de microesferas	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Porosidade controlada ✓ Pode ser fabricado em formas complexas 	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Problema de interconectividade ✓ Uso de solventes orgânicos 	(Gross & Rodriguez, 2004)
Prototipagem rápida	<ul style="list-style-type: none"> ✓ As estruturas porosas podem ser feitas sob medida do tecido anfitrião ✓ Possível encapsulação de proteínas e células. 	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Necessidade de resolução para melhorar a escala ✓ Alguns métodos usam solventes orgânicos. 	(Xiong, et al., 2002)

Neste trabalho foi seleccionada a técnica de TIPS, pelo que a mesma será detalhada a seguir.

1.7. Processamento de matrizes 3D por TIPS

Matrizes poliméricas 3D com alta porosidade ($\sim 97\%$) podem ser produzidos usando a técnica de TIPS. É possível controlar as macro e microestruturas das matrizes para aplicação em regeneração de tecidos tais como nervos, músculos, tendões, ligamentos, intestinos, ossos e dentes ([Ma & Zhang, 2001](#)).

As matrizes obtidas são altamente porosas com morfologias tubulares anisotrópicas e extensa interconectividade dos poros. A microporosidade das matrizes produzidas pela técnica de TIPS, a morfologia dos poros, as propriedades mecânicas, a bioactividade e a taxa de degradação podem ser controladas variando a concentração do polímero na solução, fracção volúmica da fase secundária, bem como a temperatura de arrefecimento do sistema polímero/solvente ([Ma & Zhang, 2001](#)).

O método TIPS foi intensivamente estudado durante os últimos 20 anos. Em 1981, [Castro](#) foi o primeiro a usar o método TIPS para preparar membranas microporosas. Nos anos 1990, [Lloyd](#) e colegas estudaram sistematicamente o mecanismo de separação de fase, alterando os factores da técnica TIPS.

Os polímeros mais usados para o fabrico de matrizes pela técnica TIPS, são os polímeros biodegradáveis, em particular, os poli (α - hidroxilácidos) ([Hua, et al., 2002](#)).

Espumas de PDLLA fabricados pela técnica TIPS, com e sem adição de biovidros, mostram anisotropia mecânica concomitante com a arquitectura do poro induzido por TIPS ([Xu, et al., 2004](#)).

A figura 3 apresenta um diagrama descrevendo o processo TIPS para fabricação de matrizes:

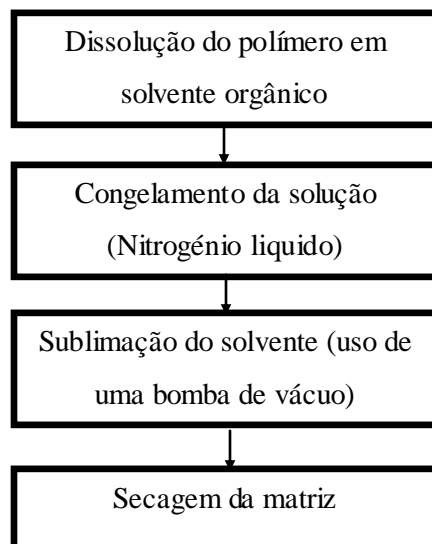


Figura 3 - Etapas de processamento da técnica de TIPS

1.7.1. O processo de TIPS

Na sua essência o processo de TIPS não é mais do que uma liofilização.

É um processo segundo o qual a água, ou outro solvente, é removido do material congelado, convertendo o gelo directamente em vapor sem a formação imediata de água líquida. A base deste processo de sublimação envolve:

- A absorção de calor pela amostra congelada de forma a vaporizar o gelo;
- O uso de uma bomba vácuo para aumentar a remoção do vapor de água da superfície da amostra (aumenta a taxa de sublimação);
- A transferência do vapor de água para o colectador, e a remoção de calor pelo colectador de forma a condensar o vapor de água. O colectador deve estar mais frio que a superfície do material que está a ser seco, caso contrário, o vapor de água não migrará para o colectador.

As soluções liofilizadas deixam poros microscópicos na estrutura resultante. Os poros são criados pelos cristais de gelo que sublimam, deixando aberturas (ou poros) no seu lugar.

A figura 4 mostra o diagrama de fases de uma substância que contrai quando congela, onde se evidencia a fronteira entre o gás e o líquido, desde o ponto triplo ao ponto crítico.

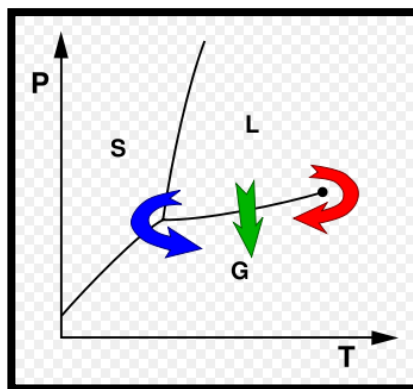


Figura 4 -Diagrama de fases ([Enciclopédia\(b\), 2008](#))

A liofilização (seta azul) traz o sistema ao redor do ponto triplo, evitando a transição directa do estado líquido para o estado gasoso, ou seja, evita a formação da fase líquida e sua evaporação (seta verde).

Podemos definir três etapas no processo de liofilização:

- Congelamento da amostra
- Secagem primária (sublimação)
- Secagem secundária

Congelamento da amostra / Efeito da temperatura

Consiste em congelar o material, o que pode ser feito com uma máquina de refrigeração ou por imersão em nitrogénio líquido. Nesta etapa é importante congelar o material a temperatura abaixo do seu ponto triplo. É a fase mais crítica para a obtenção de matrizes com boas características morfológicas.

A formação de uma matriz polimérica de CS começa com a separação da água e o CS à temperatura de congelamento. Com a solução congelada, ocorre a separação de fases, a fase do solvente começa a cristalizar e a fase polimérica começa a concentrar. Quando concentrado suficientemente, o CS “precipitará” ao redor do cristal de gelo, o qual, se sublimado sob vácuo, dará origem a um poro ([Gu, et al., 2001](#); [Roh & Kwon, 2002](#); [Matthew & Madihally, 1999](#)).

A estrutura porosa resultante, em termos de diâmetro dos poros, distribuição e grau de interconectividade, está directamente relacionada com a forma final e distribuição dos cristais de gelo. Por sua vez, a maneira pela qual os cristais de gelo crescem é controlada pelo processo de separação de fases ([Michael, 2007](#)).

A temperatura de arrefecimento tem um impacto directo no processo de separação de fase, e este pode ocorrer por transferência de calor ou, por transferência de massa ([Roh & Kwon, 2002](#)).

Segundo [Roh e Kwon](#) (2002), a transição entre transferência de massa e de calor, ocorre à temperatura de -50°C (CS dissolvido em solvente orgânico), ocorrendo a transferência de massa à temperatura de congelamento entre 0 e -50°C , e a transferência de calor à temperatura de congelamento abaixo de -50°C . Este valor é uma aproximação, dado que a taxa de congelamento depende da geometria da matriz e do volume de solução.

Quando ocorre a transferência de massa, o gradiente térmico aplicado é baixo, e o crescimento dos cristais de gelo dá-se pelo processo difusional (i.e. difusão das moléculas de água à superfície dos cristais de gelo dá-se em todas as direcções). Sob estas condições o crescimento dos cristais de gelo é aproximadamente equivalente em todas as direcções (isotrópica). E estes darão origem a poros aproximadamente esféricos ([Michael, 2007](#)).

Quando ocorre a transferência de calor, o gradiente térmico aplicado é maior. Se o gradiente térmico aplicado é direccionado, o crescimento dos cristais de gelo fica limitado à interface cinética e os cristais de gelo crescerão na direcção do gradiente térmico aplicado (i. e., na direcção do fluxo de calor do sistema). O resultado são poros estendidos e alinhados na direcção do gradiente térmico aplicado ([Michael, 2007](#)).

No caso dos pensos, duas ou mais fases distintas são formadas no processo de congelamento (congelamento da água em gelo e diferenciação do CS), e na etapa seguinte, o solvente congelado (tipicamente gelo) é removido e produz-se um penso, sem perturbar a estrutura do CS congelado ([McCaryhy, et al., 2008](#)).

O processo de congelamento é feito baixando a temperatura da solução de CS, da temperatura ambiente até à temperatura de congelamento. A temperatura de congelamento pode estar entre -15°C e -45°C , durante um período de tempo de 1 a 3h (pré-congelamento) ([McCaryhy, et al., 2008](#)).

Sublimação - Secagem primária

Nesta fase, a pressão é reduzida (milibares) e o solvente é sublimado. Cerca de 95% da água do material é sublimada nesta fase.

Assim, o CS congelado sofre remoção da água dentro dos interstícios da estrutura congelada sem a danificar. Ou seja, o solvente passa de uma fase sólida para uma fase gasosa sem a formação da fase intermédia líquida ([McCaryhy, et al., 2008](#)).

Nesta fase, a pressão é reduzida através da aplicação de um vácuo parcial que acelera o processo de sublimação. O colector é activado, arrefecendo a bobina para temperaturas inferiores à temperatura da amostra (penso) e a água (ou solvente) é solidificada na bobina. O colector impede o vapor de água de alcançar a bomba de vácuo, promovendo o seu bom funcionamento ([Enciclopédia\(b\), 2008](#)).

A temperatura do colector pode estar entre -45°C e -85°C e a pressão entre 150 e 50 mTorr. A solução de CS, sob vácuo, pode ser arrefecida a temperaturas entre -10 e -25°C , durante um período de tempo entre 1h e 10h ([McCaryhy, et al., 2008](#)).

Secagem secundária

Esta fase tem como objectivo sublimar as moléculas de água que não foram sublimadas na primeira fase de secagem. A temperatura é mais elevada nesta fase, do que na primeira fase de secagem (sublimação), com objectivo de quebrar as ligações físico-químico que se formaram entre as moléculas de água e o material congelado (CS).

A temperatura pode estar entre 10°C e 20°C , e o tempo de secagem entre 36h e 48h, mantendo o vácuo constante ([McCaryhy, et al., 2008](#)).

Taxa de liofilização

O processo de liofilização depende da área de superfície da amostra, da espessura da amostra, da temperatura do colectador, do vácuo parcial, do ponto triplo e da concentração de soluto. É importante relembrar estes factores quando se tenta obter uma utilização eficiente do liofilizador.

A área de superfície e a espessura da amostra podem ser ignoradas, quando a amostra tem dimensões reduzidas (milímetros). Mas para grandes volumes, esses factores não podem ser ignoradas, uma vez que, quanto maior a área de superfície da amostra mais rápida é a taxa de liofilização. Mas, para uma determinada área de superfície, quanto maior a espessura da amostra mais lenta é a taxa de liofilização, ([Labconco, 2007](#)).

Para que ocorra liofilização, o gelo tem de ser removido da amostra via sublimação, sendo esta tarefa realizada pelo colectador (transforma o vapor em gelo) e pela bomba de vácuo. Assim, a pressão de água no colectador é mais baixa que o da amostra e o fluxo de vapor de água é da amostra para o colectador. O processo de sublimação ocorre muito lentamente nas condições atmosféricas normais, sendo um bom vácuo essencial para obter uma taxa liofilização eficiente.

A taxa de liofilização é directamente proporcional à pressão de vapor, que por sua vez é dependente da temperatura do ponto triplo e da concentração de solvente na amostra. Por exemplo, a solução do cloreto de sódio e água, liofiliza a uma taxa mais lenta que a água pura. Isto porque, quanto maior a concentração de soluto, menor é a área de superfície da amostra congelada que é ocupado pela água.

O volume de amostra que pode ser liofilizado está relacionado com os factores discutidos nos parágrafos anteriores e também com o tamanho e o design do sistema de liofilização ([Labconco, 2007](#)).

Amostras contendo substâncias voláteis

Em certos casos, o solvente da amostra a ser liofilizada pode conter componentes voláteis tais como metanol, ácido acético ou ácido fórmico, etc., que é o caso das amostras liofilizadas neste trabalho. Além dessas substâncias terem um efeito sobre a temperatura do ponto triplo, elas podem aumentar a pressão de

vapor à superfície da amostra. Comparando com a água, estas requererão temperaturas mais baixas para que a sublimação possa ocorrer ([Labconco, 2007](#)).

As amostras que contêm substâncias voláteis tendem a evaporar quando colocadas em frascos ou expostas à temperatura ambiente. Se a solução contendo a substância volátil tende a evaporar quando colocado no liofilizador, a diluição da amostra com mais água ajudará a manter a solução congelada. Por exemplo, uma solução de 0,2M de ácido acético é mais fácil de liofilizar que uma de 0,5M ([Labconco, 2007](#)).

Nível de operação do vácuo

O nível de vácuo deve ser ajustado manualmente, para otimizar o processo de liofilização. O acerto do nível de vácuo deve ser feito de acordo com as condições de liofilização, e os factores que devem ser considerados quando se faz o ajuste de vácuo no liofilizador são ([Labconco, 2007](#)):

- A posição da amostra (se a amostra é liofilizada sobre prateleiras ou em frascos de vidro, usando as válvulas);
- A volatilidade do solvente;
- O volume da amostra e a temperatura do ponto triplo.

Para se obter uma boa liofilização deve-se seguir um protocolo, ou seja, para cada amostra tem de se determinar a temperatura do ponto triplo, o tempo de pré-congelamento, temperatura de sublimação e o acerto do vácuo.

O processo de liofilização exige também um conjunto de procedimentos e conhecimentos do equipamento utilizado (ver Utilização do liofilizador em anexo) de modo a manter um bom funcionamento ao nível da programação e protecção, não só das amostras a serem liofilizadas como do próprio liofilizador, (ver o protocolo em anexo) ([Labconco, 2007](#)).

O equipamento utilizado para liofilizar as matrizes foi o “FreeZone Triad Freeze Dry System”, modelo 7400030/40.

A figura 5 mostra o esquema de um ciclo de liofilização com três segmentos:

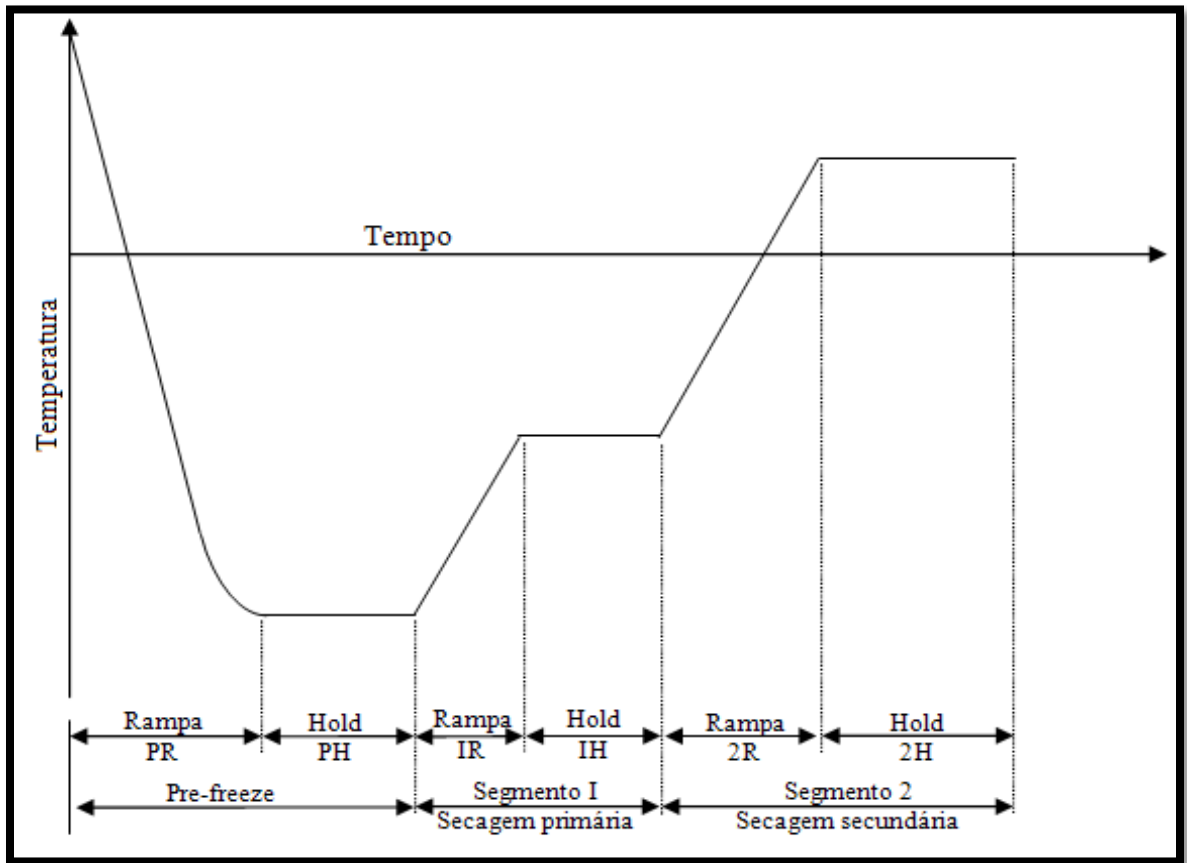


Figura 5 – Ciclo de Liofilização, (ver Controlo automático em anexo), ([Labconco, 2007](#)).

2. Métodos de Caracterização

A caracterização física, química, mecânica e biológica das matrizes de CS utilizadas em ET, actuando como biomateriais, permite avaliar as propriedades intrínsecas do material em si e as implicações decorrentes do seu uso.

Neste capítulo são discutidas as técnicas usadas na caracterização do CS e das matrizes produzidas neste trabalho.

2.1 Caracterização física, química e mecânica

As propriedades do CS dependem fortemente do DD e do seu peso molecular, estando directamente relacionados com o seu comportamento físico-químico e a sua actividade biológica. Assim, é pertinente uma análise aos valores obtidos para os polímeros utilizados, com o intuito de prever o seu comportamento aquando da sua aplicação ([Lamarque, et al., 2004](#)).

2.1.1. Espectroscopia de Infravermelhos por Transformada de Fourier (FTIR)

O espectro vibracional de uma molécula é considerado uma propriedade física única e característica dessa molécula. O espectro de infravermelhos é usado como uma característica de identificação onde se compara o espectro conhecido com outros de referência. Na ausência de uma referência utilizável na identificação é possível realizar uma interpretação básica do espectro, levando à caracterização e à possível identificação da amostra desconhecida ([Coates, 2000](#); [Henrique, 2007](#)).

O primeiro princípio é baseado no facto das estruturas características da molécula, sejam elas a cadeia principal ou os seus grupos funcionais, produzirem absorção característica e reprodutível no espectro. Com esta informação consegue-se perceber se a cadeia é linear ou ramificada e ainda se existem anéis aromáticos na estrutura. É possível deduzir se grupos funcionais específicos estão presentes na molécula, determinar a sua orientação e a sua localização na estrutura ([Coates, 2000](#); [Henrique, 2007](#)).

Os aspectos qualitativos da espectroscopia de infravermelhos são um dos principais atributos desta versátil técnica analítica. A interpretação espectral pode ser aplicada a compostos orgânicos e inorgânicos. O espectro de infravermelhos

forma-se a partir da absorção de radiação electromagnética em frequências correlacionadas com a vibração específica de conjuntos de ligações químicas numa molécula ([Coates, 2000](#); [Henrique, 2007](#)).

Um espectro típico de uma amostra de quitina/quitosano encontra-se representado na Figura 6.

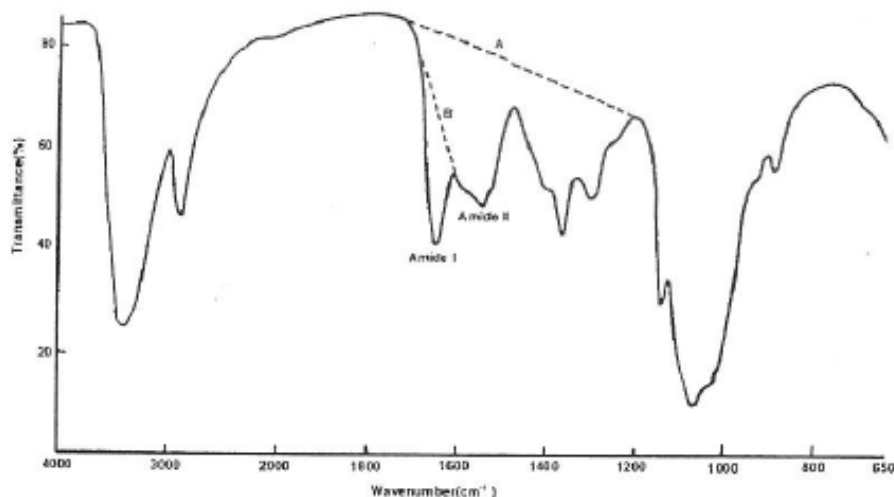


Figura 6 - Espectro de infravermelhos típico de quitina/quitosano ([Khor & Lim, 2003](#))

A espectroscopia de infravermelhos oferece inúmeras vantagens para a determinação do DD (ou DA), uma vez que é relativamente rápida e simples, não requer o tratamento das amostras (pode trabalhar-se com amostras solúveis e insolúveis) e é uma técnica não destrutiva.

Neste trabalho, utilizou-se a espectroscopia de infravermelhos por transformada de Fourier para a determinação do grau de acetilação das amostras de CS em estudo. Antes da aquisição dos espectros de FTIR as amostras foram secas à temperatura ambiente e colocadas no excicador sob vácuo, por um período de 24 horas. Os espectros de FTIR das diferentes amostras de quitosano foram adquiridos na gama de números de onda entre 4000 e 500 cm^{-1} num espectrómetro FTIR Mid-IR ABB Bomem, FTA2000.

Após obtenção do espectro foi possível identificar o CS através do reconhecimento das suas bandas de absorção específicas: 1655 cm^{-1} → amida I; 1630 cm^{-1} → amida I; 1560 cm^{-1} → amida II; 3450 cm^{-1} → grupo hidróxilo; 2878

cm^{-1} → ligação C-H; 1070 cm^{-1} → ligação C-O; 1030 cm^{-1} → ligação C-O; 897 cm^{-1} → ligação C-O.

As bandas de absorção permitem a determinação do conteúdo em grupos N-acetilo, fazendo-se um rácio entre uma destas bandas e outra de referência interna. Quando se está a determinar o DD para polímeros com previsível alto grau de desacetilação, é sugerida a utilização da banda de absorção da amida I a 1655 cm^{-1} (amida Ia). Esta escolha deve-se ao facto de que para um baixo grau de acetilação, a banda de -NH_2 (1590 cm^{-1}) predomina e faz com que a banda da amida II fique mascarada, sendo difícil a sua utilização para o fim desejado. A banda do grupo hidróxilo a 3450 cm^{-1} é bastante visível e fácil de utilizar, sendo por isso a mais utilizada como banda de referência ([Domard & Rinaudo, 1983](#); [Henrique, 2007](#)).

O rácio A_{1655}/A_{3450} é até à data, o mais utilizado para a determinação da percentagem de N - acetilação. A equação para o cálculo do DD é a equação (1) ([Khor, 2001](#)):

$$DD = 100 - DA = 100 - \left(\frac{A_{1655}}{A_{3450}} \times 115 \right) \quad (1)$$

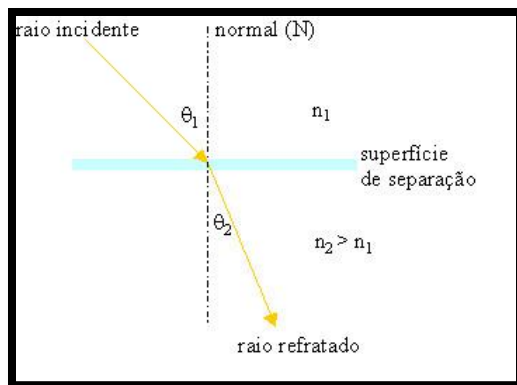
2.1.2. Cromatografia líquida de exclusão molecular (GPC / SEC)

A cromatografia é um método físico de separação, em que os componentes a serem separados são distribuídos em duas fases, uma estacionária e outra móvel. Esta separação depende da diferença entre a fase móvel e a fase estacionária. A interacção dos componentes da mistura, com estas duas fases é influenciada pelas forças intermoleculares, incluindo a força iónica, bipolar e apolar. A distinção entre os principais métodos de cromatografia é feita em termos das propriedades da fase móvel ([Enciclopédia\(c\), 2008](#)).

Na cromatografia líquida a fase móvel é um líquido de baixa viscosidade. Se a fase estacionária for um adsorvente sólido através do qual passa a fase estacionária e a amostra, temos a cromatografia líquida de alta precisão (HPLC), se a fase estacionária for um sólido iónico temos a cromatografia de permuta iónica (IEC), se a fase estacionária for um sólido poroso fazendo-se a separação em função do tamanho molecular temos a cromatografia de exclusão molecular (SEC) ([Knauer, 2007](#)).

O GPC /SEC possui um detector cujo princípio básico é a Lei de Snell.

$$\frac{\sin \theta_1}{\sin \theta_2} = \frac{n_2}{n_1} = \frac{c_1}{c_2} = n_{12} \quad (2)$$



θ_1 : ângulo de incidência
 θ_2 : ângulo de refração
 c_1 : velocidade da luz no meio 1
 c_2 : velocidade da luz no meio 2
 n_1 : índice de refração no meio 1
 n_2 : índice de refração no meio 2
 n_{12} : índice de refração relativo

Figura 7 – Refracção da luz, Lei de Snell.

Segundo a Lei de Snell, quando há uma transição da luz de um meio para outro, ela é refractada com um ângulo que depende da velocidade da luz nos dois meios e do ângulo de incidência da luz na superfície de separação.

A velocidade da luz no meio depende do comprimento de onda da luz e da densidade do meio. Normalmente, os detectores utilizados usam luz com um comprimento de onda constante e a densidade depende da temperatura e da composição do meio ([Knauer, 2007](#)).

Os detectores funcionam da seguinte maneira: os raios de luz são emitidos dum LED (fonte de luz) que cruza duas vezes a amostra e a célula de referência do detector. Quando ambas as células contêm um solvente puro, o sistema é calibrado a zero por meio do “zeroplate” que posiciona os raios de luz sobre os dois detectores 1 e 2 de tal maneira que é medido a intensidade da luz (I_1 e I_2). Quando a célula da amostra contém uma solução com um índice de refração diferente, o raio de luz é desviado.

Os resultados na mudança da intensidade da luz são proporcionais à concentração e ao índice de refração da solução da amostra. A partir destas intensidades é calculado o valor do sinal ([Knauer, 2007](#)).

A informação obtida do cromatográfico é dada num cromatograma, isto é, um registo da concentração ou da massa dos componentes da amostra em função do tempo ou do volume de fase móvel. A informação obtida de um cromatograma

inclui uma indicação da complexidade da amostra com base no número de picos, informação qualitativa com base na posição dos picos, no valor do integral da variação da concentração do componente em função do tempo (área do pico) e ainda uma indicação do estado de conservação do sistema ([Knauer, 2007](#)).

Assim, o GPC/SEC é uma das técnicas poderosas usadas para a determinação da massa molecular dos polímeros, sendo esta uma característica importante do CS. Uma das principais dificuldades na determinação deste parâmetro está relacionada com a solubilidade das amostras e a não dissociação de agregados, usualmente presentes em soluções onde intervêm polissacáridos ([Rinaudo, 2006](#); [Kurita, 2001](#); [Henrique, 2007](#)).

Segundo [Kurita](#) (2001), no caso da quitina/quitosano, para além destes problemas de solubilidade, encontram-se ambiguidades estruturais em conjunto com a distribuição e o conteúdo em grupos acetil, sendo estes os principais obstáculos para a determinação quantitativa dos valores do peso molecular.

Outras razões para a dificuldade da determinação do peso molecular da quitina e do CS é a sua associação com as proteínas e outras substâncias. Só é possível a obtenção do valor do peso molecular depois desta sofrer tratamento de desproteínização ([Rinaudo, 2006](#); [Kurita, 2001](#); [Henrique, 2007](#)).

Neste trabalho utilizou-se a técnica de permeação de gel (GPC/SEC) para determinar o peso molecular dos CS utilizados. O sistema de GPC/SEC básico é constituído por uma Bomba HPLC, Knauer, SmartLine Pump 1000.

2.1.3. Viscosimetria Rotacional

A viscosidade é um termo comumente conhecido que descreve as propriedades de escoamento de um fluido. O entendimento e o controle das propriedades dos fluidos é importante na fabricação e no manuseio de materiais. A viscosimetria é utilizada para determinar o comportamento reológico das soluções.

Isaac Newton, em 1687, definiu a viscosidade de um fluido como a resistência ao deslizamento de suas moléculas devido à fricção interna e, quanto maior o grau de fricção interna de um fluido, maior é a sua viscosidade.

Em sua abordagem matemática, Newton utilizou o modelo de duas placas de áreas A , separadas por uma distância h , movimentadas através da aplicação de uma força F . De acordo com esse modelo, a força requerida por unidade de área (F/A) para manter uma diferença de velocidade entre as placas (dv) é proporcional ao gradiente de velocidade através do líquido (dv/dx). Assim, o coeficiente de proporcionalidade é igual à viscosidade (η). A força por unidade de área é conhecida como tensão de corte (σ) e o gradiente de velocidade é conhecido como taxa de corte ($\dot{\gamma}$) (Barnes, et al., 1989).

$$\frac{F}{A} = \eta \frac{dv}{dx} \quad (3)$$

$$\eta = \frac{\sigma}{\dot{\gamma}} \quad (4)$$

Os fluidos podem ser classificados como fluidos newtonianos e não newtonianos.

Um fluido newtoniano apresenta uma relação linear entre a taxa de corte e a tensão de corte, como mostra a equação de Newton (equação 3), ou seja, a viscosidade mantém-se constante com a variação da taxa de corte.

Muitos fluidos, como a água ou a maioria dos gases, satisfazem os critérios de Newton e por isso são conhecidos como fluidos newtonianos.

Ao contrário dos fluidos newtonianos, os fluidos não-newtonianos não apresentam uma relação linear entre a tensão de corte e a taxa de corte, isto é, os valores da viscosidade alteram-se com a variação dos valores da taxa de corte. Esses valores de viscosidade são considerados como viscosidade aparente, podendo aumentar ou diminuir, de acordo com as características de cada fluido.

Podem ser classificados em dois subgrupos: independente do tempo e dependente do tempo.

Independente do tempo: fluidos pseudoplásticos (a viscosidade decresce com o aumento da taxa de corte), fluidos dilatantes (a viscosidade aumenta com o aumento da taxa de corte) e plásticos (esses fluidos necessitam de uma tensão finita, conhecida como tensão de escoamento ou “yield stress”, para que ocorra movimento das partículas).

Dependente de tempo: Alguns fluidos apresentam mudança na viscosidade em função do tempo sob condições constantes da taxa de corte. Há duas categorias, os fluidos tixotrópicos (a viscosidade diminui com o tempo para uma taxa de corte

constante) e Reopéticos (a viscosidade aumenta com o tempo a uma taxa de corte constante).

Neste trabalho, a viscosidade das soluções foi determinada com o viscosímetro rotacional (digital), tipo BrookField, Myr, mod. V1R, utilizando um conjunto de "spindles" de diferentes diâmetros (figura 8).

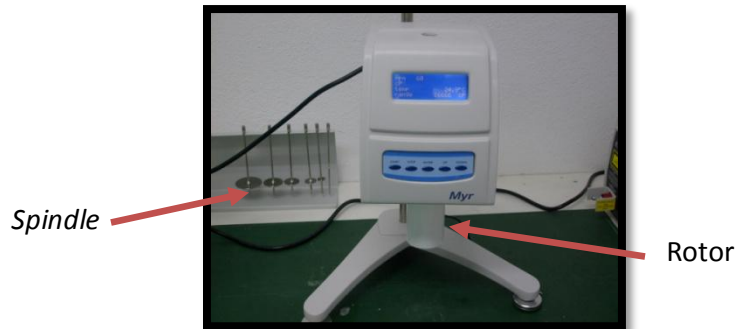


Figura 8 – Viscosímetro

Antes de medir o valor da viscosidade, o "spindle" é encaixado no rotor e inserido no recipiente que contém a solução que se pretende determinar a viscosidade.

2.1.4. Microscopia Electrónica de Varrimento (SEM)

A Microscopia Electrónica de Varrimento permite obter imagens de alta resolução da superfície de uma amostra. Devido a maneira como são criadas, as imagens do SEM tem uma aparência tridimensional e são úteis para avaliar a estrutura superficial de uma amostra ([Ji & Marquis, 1993](#))

Microscopia electrónica de varrimento consiste basicamente numa coluna óptica, câmara de amostra, sistema de vácuo, sistema electrónico (fotomultiplicador, detector) e num sistema de imagem ([Enciclopédia\(d\), 2008](#)).

Os electrões são emitidos através do efeito termiónico a partir de um cátodo de tungsténio e acelerados através de um ânodo, sendo também possível obter electrões por efeito de emissão de campo. O tungsténio é usado por ser o metal com mais elevado ponto de fusão e baixa pressão de vapor, permitindo que seja aquecido para a emissão de electrões ([Enciclopédia\(d\), 2008](#)).

O feixe de electrões, o qual normalmente têm uma energia que vai de algumas centenas de eV até 100keV, é focalizado por lentes condensadoras, num feixe com um ponto focal muito fino, com tamanho variando de 0,4 a 5 nm. Este feixe passa através de pares de bobinas e pares de placas de deflexão na coluna do microscópio.

As lentes objectivas, as quais deflectem o feixe, permitem seleccionar uma área rectangular da superfície da amostra que é varrida. Quanto o feixe primário interage com a amostra, os electrões perdem energia por dispersão e absorção em um volume, conhecido como volume de interacção, o qual se estende de 100 nm até 5 μm , dentro da superfície da amostra. O tamanho do volume de interacção depende da energia dos electrões, do número atómico da amostra e da densidade da amostra. A troca de energia entre o feixe de electrões e a amostra resulta na emissão de electrões e radiação electromagnética, a qual pode ser detectada e produzindo uma imagem ([Enciclopédia\(d\), 2008](#)).

Amostras de metal não exigem nenhuma preparação, a não ser cortes para dimensionar as amostras de acordo com a câmara de amostras. Amostras sólidas não condutivas devem ser cobertas com uma camada de material condutor. Uma cobertura fina de material electricamente condutor é depositada para prevenir a formação de campos eléctricos estáticos na amostra devido a irradiação eléctrica

durante a produção da imagem. Tais coberturas podem ser de ouro, platina, tungsténio, grafite, etc. ([Enciclopédia\(d\), 2008](#)).

Neste trabalho, as amostras foram cortadas de acordo com a dimensão dos suportes e cobertas com uma pequena camada de ouro, num evaporador Polaron SC502, e analisadas com um microscópio electrónico ZEISS DSM 962.

2.1.5. Testes de inchamento e perda de massa

Estes testes visam obter a capacidade de absorção de água dos hidrogéis, dos pensos hemostáticos coagulados e das matrizes 3D. Não foi possível fazer estes testes para os pensos hemostáticos não coagulados, visto que se dissolvem quando colocados em soluções aquosas.

Foram preparadas duas soluções tampão, a ST de ácido acético e acetato de sódio pH=5 e ST2 de hidróxido de amónia e cloreto de amónia pH = 9,8 *. As amostras foram cortadas (22mm×24mm), pesadas (m_s) e inseridas nas referidas soluções.

Foram cortadas 30 amostras de hidrogéis, 40 amostras de pensos curativos coagulados (TA, TB, TC e TD) em grupo de 10. As amostras foram colocadas em recipientes fechados e colocadas na estufa à temperatura de 37°C.

As amostras foram removidas diariamente durante os primeiros sete dias e depois semanalmente até um máximo de 28 dias. Após estes períodos de tempo retirava-se cada amostra, removia-se o excesso de solução e determinava-se a respectiva massa molhada (m_M). As amostras eram posteriormente secas na estufa à temperatura de 37°C sendo o seu peso seco determinado (m_{S1}) depois de aproximadamente 24h. As soluções foram substituídas semanalmente. Os pensos curativos, por sua vez, sofreram um processo de lavagem depois de removidos das soluções, para eliminar o excesso de sal. Para as matrizes 3D, foram cortadas 4 amostras e colocadas em SF.

As expressões (5) e (6) mostram as equações utilizadas para determinar a taxa de inchamento, e perda de massa:

$$\text{Taxa de Inchamento} = \frac{m_M - m_S}{m_S} \times 100 \quad (5)$$

$$\textit{Perda de massa} = \frac{m_s - m_{s1}}{m_s} \times 100 \quad (6)$$

A massa das amostras foi obtida com uma balança analítica com quatro algarismos significativos.

2.1.6. Testes mecânicos

As propriedades mecânicas dos biopolímeros traduzem o comportamento destes materiais quando sujeitos a uma solicitação mecânica, sendo por isso de grande importância para muitas das suas aplicações.

Usualmente a solicitação consiste numa deformação aplicada a uma velocidade constante.

A tensão (σ) aplicada define-se como a força (F) por unidade de área da secção recta do material (A). A extensão à ruptura de um material (ε) é definida como a variação relativa do comprimento do material, i.e., $\Delta L/L_0$, onde L_0 é o comprimento inicial e ΔL é a variação de comprimento ($L-L_0$). A percentagem de deformação (extensão) que o material suporta até sofrer ruptura está relacionada com a ductilidade do material.

A lei básica para sólidos ideais assume que estes ao serem submetidos a uma força irão sofrer uma deformação elástica e que após a remoção dessa força retomam a sua forma original. A lei de Hooke, para sólidos ideais, traduz-se pela seguinte equação:

$$\sigma = \frac{F}{A} = E \times \varepsilon \quad (7)$$

Em que σ é a tensão, F é a força aplicada, A é a área inicial da secção transversal do provete, ε é a extensão do provete, e E é o módulo de Young ou módulo de elasticidade do material.

A relação anterior representa uma relação linear, portanto, é válida apenas na região onde o material tem um comportamento elástico, ou seja, na região inicial da curva de tracção.

A figura 9 representa uma curva de tracção típica de tensão/ deformação pensos produzidos neste trabalho, verificando que estes materiais apresentam um carácter elástico até à ruptura.

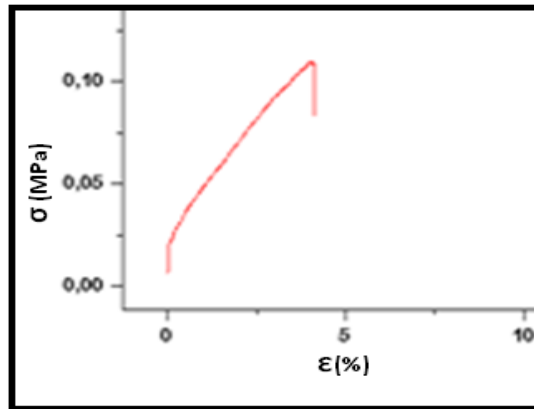


Figura 9 – Curva de tensão à ruptura / extensão à ruptura.

Neste trabalho, utilizou-se o instrumento Instron Series IX Automated Materials Testing System, com uma célula de carga de 1000N. É equipado com um sistema de pressão de ar para agarrar as amostras e um extensómetro para medir a extensão.

O comportamento mecânico dos pensos durante o ensaio de tensão à ruptura versus extensão à ruptura foi determinado com base no método ASTM D 882-95A (1995), usando amostras com dimensões 11cm× 1,5cm e espessura variável (medida para cada provete). Os ensaios foram realizados a uma velocidade de 5 mm/minuto.

2.2 Esterilização

Os materiais utilizados como biomateriais devem ser esterilizados a fim de se prevenir infecções subsequentes que podem acarretar problemas de natureza simples ou complexa, podendo até mesmo levar à morte do paciente ([Ratner, et al., 1996](#)).

A esterilização é uma etapa fundamental no processamento de biomateriais, e a funcionalidade de qualquer sistema de esterilização deve ser determinada através da sua eficácia em exterminar organismos, além da sua habilidade em não prejudicar ou de não afectar de forma negativa as propriedades funcionais dos dispositivos médicos. Os principais agentes de esterilização de biomateriais são os vapores seco e húmido, o óxido de etileno e a radiação ([Sanders, 2007](#)).

2.2.1. Esterilização por radiação

A esterilização por radiação ionizante é uma técnica altamente eficiente, económica e segura, que teve um rápido crescimento na indústria médica nos últimos quinze anos. Duas fontes de radiação podem ser utilizadas neste processo: raios gama de uma fonte de ^{60}Co ou feixes de electrões, produzidos em aceleradores de alta energia. A radiação ionizante actua quebrando cadeias moleculares e induzindo reacções dos fragmentos com o oxigénio atmosférico ou com compostos oxigenados, destruindo, portanto, os microrganismos e prevenindo a sua reprodução ([Marcelo, 2008](#)).

Neste método, a dose de radiação geralmente validada para esterilizar produtos médicos é de 25 kGy. O decaimento da quantidade de ^{60}Co contida na amostra (meia-vida de 5,3 anos) resulta na formação do ^{60}Ni e emissão de um electrão e de raios gama ([Hutchinson, 1961](#)).

A técnica de esterilização utilizando a radiação gama aproxima-se bastante da técnica ideal de esterilização. De entre as inúmeras vantagens do uso da radiação gama como agente de esterilização podem ser destacadas: a fiabilidade do processo; o fácil monitoramento, onde a única variável de controlo do processo é o tempo; a viabilidade económica, para pequenos e grandes volumes; a possibilidade de validação dos processos segundo as normas internacionais ISO 11137 e EN 552; a ausência do período de quarentena, pois não há resíduos; a ausência de manuseio durante o processamento, pois a radiação penetra em todas as porções do produto.

As suas principais desvantagens são o custo relacionado com à manutenção de uma sala de esterilização e à incompatibilidade de alguns materiais. Outra desvantagem refere-se ao contínuo decaimento do isótopo que resulta em longos períodos de processamento e adição periódica de cargas adicionais deste isótopo ([Chip ITN, 2006](#)).

Para a realização do estudo do efeito de esterilização foram seleccionadas diferentes composições de matrizes 3D e de pensos curativos. No entanto, não se fez o estudo dos hidrogéis visto que experiências anteriores mostraram que a radiação gama danifica a estrutura dos hidrogéis, acelerando o processo de degradação.

A esterilização foi realizada no ITN, Instituto Tecnológico Nuclear, através da exposição das amostras à radiação gama por 5 horas (taxa constante de 5 kGy/h), totalizando uma dose de 25 kGy. Previamente à esterilização, as amostras foram colocadas em embalagens plásticas que foram seladas a quente e sob vácuo.

2.3 Caracterização Biológica

2.3.1. Testes “*in vitro*”

A cultura de células em biomateriais constitui uma ferramenta muito útil para a sua avaliação biológica, seja na determinação de possíveis efeitos citotóxicos ou da influência destes no processo de adesão, crescimento e diferenciação celular, sempre com o objectivo de promover a melhoria do seu desempenho. ([Santos, 2001](#)).

Os testes “*in vitro*” são usados para efectuar uma pré-selecção de materiais, os quais serão posteriormente avaliados através dos testes “*in vivo*”. Assim, é feita uma pré-selecção para verificar se o material promove a morte das células ou outros efeitos negativos nas funções celulares.

Para que um biomaterial seja considerado não citotóxico, este, necessariamente, não deve causar a morte de células e nem mesmo afectar as suas funções. Desta maneira, a avaliação da citotoxicidade pode ser realizada através da análise da morfologia celular, da integridade da membrana celular (pelo uso de métodos com corantes que indiquem ou não actividade metabólica), da proliferação celular e da actividade biossintética, entre outras ([Freshney, 1989](#)).

Um resultado negativo de citotoxicidade indica que o material está livre de componentes danosos ou que os tem em quantidade insuficiente para causar efeitos agudos em células isoladas, sob condições extremas. Entretanto, deve-se considerar que o teste de citotoxicidade é apenas o primeiro passo. Por outro lado, um resultado positivo indica que o material contém uma ou mais substâncias que são libertadas e que podem ter importância clínica. Nestes casos, outros estudos são necessários para a determinação da utilidade do material.

Os testes de citotoxicidade foram realizados de acordo com a norma ISO 1099-5 (1999), no Departamento de Biotecnologia, no campus do INETI.

A viabilidade foi testada através do método MTT (3- (4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5 diphenyl tetrazolium bromide). O sal tetrazolium 3- (4,5-dimethylthiazol-2-yl) -2,5 diphenyl tetrazolium bromide é reduzido nas células viáveis e funciona como um indicador colorimétrico da viabilidade celular. Foram realizados testes de citotoxicidade das matrizes 3D, dos pensos curativos e dos hidrogéis.

2.3.2. Testes “*in vivo*”

As cobaias (animais usados nos testes “*in vivo*”) apresentam melhor habilidade regenerativa que os humanos. Diferentes abordagens experimentais têm sido usadas para testar a capacidade de diferentes materiais em melhorar a regeneração dos tecidos. Vários factores devem ser levados em consideração quando se avaliam os resultados das experiências. A quantidade e qualidade do tecido que se forma num defeito são influenciadas pela espécie e tipo de animal usado em cada teste, idade do animal, estabilidade do defeito, localização anatómica, tipo de tecido ([Sirola, 1980](#)).

Neste trabalho, fez-se uma experiência, não profunda, dos pensos curativos quando aplicados numa ferida. Os testes ocorreram no Hospital Veterinário de São Bento em Lisboa, feitos pelo Dr. Henrique Armes, Director Clínico do Hospital, num gato que sofreu um acidente grave, onde perdeu pele nas duas patas traseiras.

3. Materiais

Foram utilizados dois tipos diferentes de CS:

Tabela 3- CS utilizado na preparação das soluções

Amostras comerciais	Fonte	Características descritas pelo fornecedor
CS da Sigma High (Sigma-Aldrich Química SA)	Casca de camarão	DD \cong 75%
CS da Cognis Small	Casca de camarão	DD \cong 83%

Os reagentes utilizados na produção das soluções de CS e na realização dos testes de inchamento e de perda massa são as que se encontram na tabela 4:

Tabela 4 – Reagentes utilizados

Fornecedores	Nome do produto
António M.S. Cruz, Lda	Cloreto de sódio
António M.S. Cruz, Lda	Hidróxido de sódio
António M.S. Cruz, Lda	Solução de hidróxido de amónia
Ceramed	Água destilada
Riedel-de Haen	Acetato de sódio
Fisher Scientific	Acido acético glacial
Fisher Scientific	Acido láctico
Fresenius	Soro fisiológico
Panreac	Cloreto de amónia

Todos os reagentes utilizados possuem qualidade analítica certificada.

4. Características do quitosano e das suas soluções

Este capítulo apresenta o estudo reológico das soluções e a caracterização dos CS utilizados.

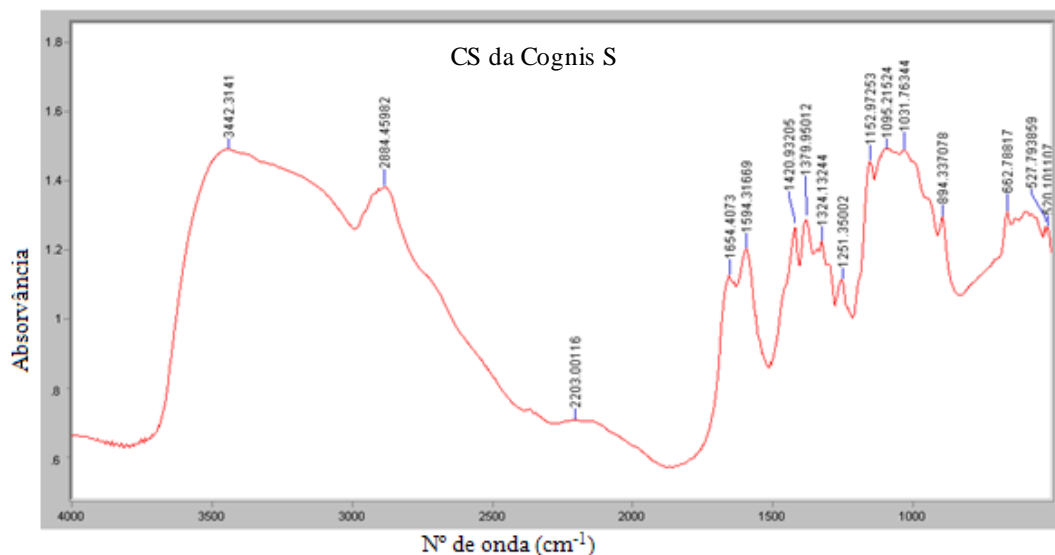
4.1. Caracterização do CS

Para a caracterização do CS da Cognis S e da Sigma H utilizaram-se dois métodos de caracterização: o FTIR, para determinar o grau de acetilação (DA) e o GPS/SEC, para determinar o peso molecular médio dos polímeros (M_w).

4.1.1. Grau de Acetilação (DA)

Apesar das designações químicas específicas, o CS, corresponde a uma família de polímeros em que varia o conteúdo de grupos acetilo, sendo este quantificado pelo denominado grau de *N*-acetilação (DA). O DA influencia grandemente o comportamento destes polímeros, nomeadamente a reactividade e a solubilidade. A determinação do grau de acetilação é uma das análises de rotina realizadas no controlo da produção do CS ([Lapasin, 1995](#)).

As ilustrações da figura 10 apresentam os espectros de FTIR do CS da Cognis S e da Sigma H, identificando os picos dos espectros:



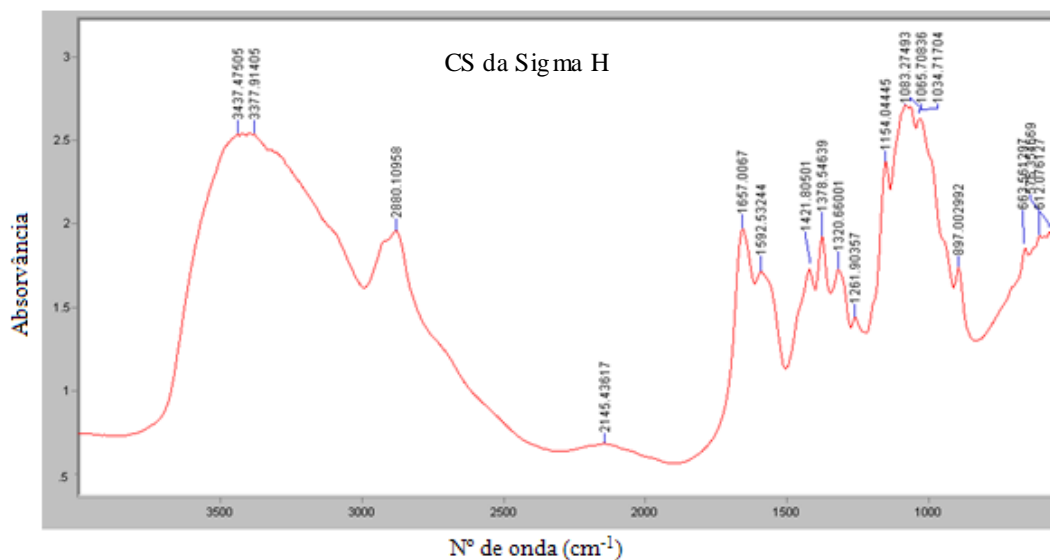


Figura 10 – Espectro de FTIR da Cognis S e da Sigma H

A tabela 5 mostra os valores do DD e DA determinada a partir dos espectros de FTIR:

Tabela 5 - Grau de acetilação do CS da Cognis S e Sigma H

CS	A3450	A1655	DA	DD
Cognis S	859,0	107,0	14,3	85,7
Sigma H	1463,0	172,0	13,5	86,5

Como se pode ver na tabela os DA (DD) são muito semelhantes, sendo relativamente concordantes com os apresentados pelo fornecedor.

Segundo [Lapasin \(1995\)](#), a diminuição do grau de acetilação e o aumento da quantidade de grupos amina livres, fazem com que o CS seja solúvel em soluções ácidas diluídas de pH <6. Quando o grau de acetilação aumenta, a gama de solubilidade aumenta por duas razões. Primeiro, pelo aumento do impedimento estereoquímico devido ao aumento dos grupos acetilo, e segundo pelo aumento do valor do pK intrínseco.

4.1.2. Massa molecular

Muitas das propriedades físicas do CS são afectadas pela massa molecular do polissacarídeo. O CS com elevada massa molecular provoca um aumento mais pronunciado da viscosidade. No entanto, em determinadas aplicações, nem sempre uma massa molecular elevada é desejável. Uma das desvantagens associadas a uma

massa molecular elevada é a menor solubilidade da amostra, se considerarmos DA semelhantes (Kumar, et al., 2004).

Na figura 11 apresenta-se a curva típica de GPC/SEC obtida.

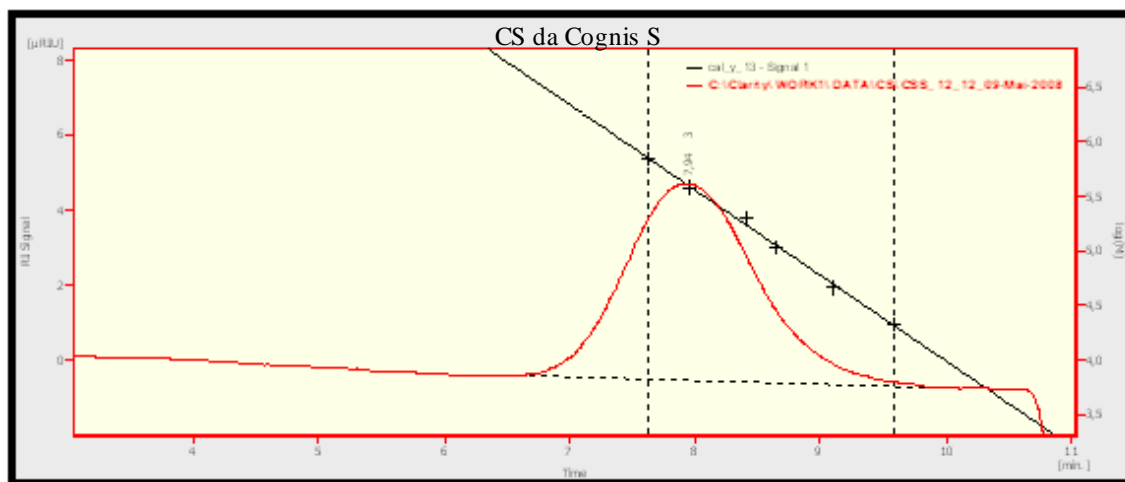


Figura 11 – Curva típica de GPC/SEC obtida para o CS (neste caso apresenta-se a curva obtida com o CS da Cognis)

A tabela 6 mostra os valores do peso molecular determinado a partir das curvas de GPC/SEC:

Tabela 6- Massa molecular do CS da Cognis S e Sigma H.

CS	M_n	M_w	PD
Cognis S	268118	540301	2,02
Sigma H	311364	815504	2,62

A tabela acima mostra que a massa molecular média (M_w) do CS da Sigma H é maior que a massa molecular do CS da Cognis S e apresenta um menor grau de polidispersão.

4.2. Preparação das soluções

As soluções preparadas correspondem as soluções utilizadas para fazer os hidrogéis, os pensos curativos e as matrizes 3D. O solvente usado, consiste numa solução aquosa ácida.

Soluções com o CS (p/p) da Cognis S em AcA e AcL (v/v)

Na tabela 7, apresentam-se as viscosidades da solução preparadas:

Tabela 7 - Viscosidade das soluções do CS da Cognis S.

Soluções	η (cp)
1,5% CS Cognis S 0,5% AcA	286
2% CS Cognis S 0,5% AcA	943
3% CS Cognis S 0,5% AcA	2745
1,5% CS Cognis S 1% AcA	324
2% CS Cognis S 1% AcA	803
3% CS Cognis S 1% AcA	3457
4% CS Cognis S 2% AcA	8020
5% CS Cognis S 2% AcA	19530
4% CS Cognis S 2% AcL	*
5% CS Cognis S 2% AcL	*

*valores não determinados

Para a solução de 3% CS (p/p) Cognis S com 0,5% de AcA (v/v), verificou-se que o CS não dissolveu totalmente, depois de 24 horas à temperatura ambiente. Isso mostra que para 3% de CS da Cognis S a solução atingiu o limite de solubilidade para esta concentração de AcA. Para poder obter soluções totalmente dissolvidas para as mesmas concentrações de CS, aumentou-se a concentração de AcA para 1% (v/v).

Soluções com o CS (p/p) da Sigma H em AcA (v/v)

Na tabela 8, apresentam-se as viscosidades das soluções preparadas:

Tabela 8 - Valores de viscosidade variando a concentração de AcA e do CS Sigma H.

Soluções	η (cp)
1,5% CS Sigma H 0,5% AcA	1540
1,5% CS Sigma H 1% AcA	1434
1,5% CS Sigma H 2% AcA	1742
1,5% CS Sigma H 3% AcA	2109
1,5% CS Sigma H 4% AcA	2358
1,5% CS Sigma H 5% AcA	2485
1% CS Sigma H 0,5% AcA	673
1,5% CS Sigma H 0,5% AcA	4573
2% CS Sigma H 0,5% AcA	18100
2,5% CS Sigma H 0,5% AcA	9000**
1,5% CS Sigma H 0,5% AcA*	893

*Adição de NaCl, ** Valor desprezado

4.3. Características reológica das soluções

Neste trabalho, foi feito um estudo reológico das soluções com os dois tipos de CS, Cognis S e Sigma H, alterando a concentração de soluto (CS) e solvente (AcA).

4.3.1. Variação da concentração de solvente (AcA)

A figura 12 mostra o comportamento da viscosidade das soluções em função da concentração de AcA.

O aumento da concentração de AcA implica o aumento da solubilidade do polímero de CS na solução.

Comparando as soluções de CS 1,5 % (p/p) de Sigma H (tabela 8) com CS 1,5 % (p/p) de Cognis S (tabela 7), ambos com 0,5% de AcA (v/v), pode-se concluir que o CS da Cognis produz soluções menos viscosas que o da Sigma para a mesma concentração de solvente e de CS. Tal deve-se ao facto da massa molecular do CS da

Cognis S ser menor que a do CS da Sigma H e o DA do CS da Cognis S ser maior que o DA do CS da Sigma H.

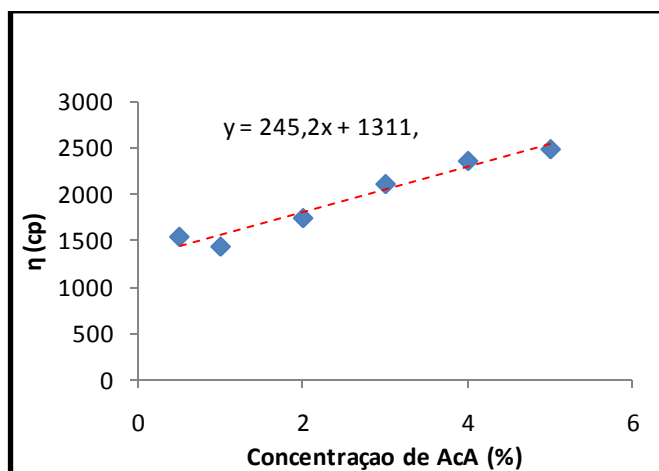


Figura 12 – Gráfico de viscosidade em função da concentração de AcA com 1,5% CS (p/p) de Sigma H

4.3.2. Variação da concentração de Solute (CS)

A figura 13 mostra o gráfico da variação da viscosidade variando a concentração do CS da Cognis S e da Sigma H.

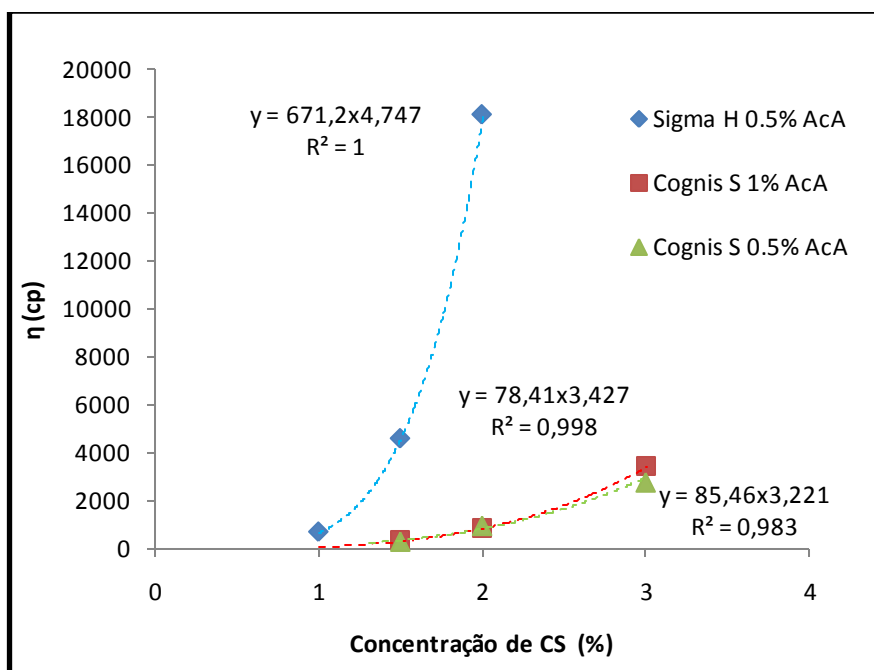


Figura 13 - Gráfico da viscosidade em função da concentração CS

No regime diluído as interligações entre as cadeias do polímero são limitadas e a viscosidade da solução aumenta linearmente com o aumento da concentração do polímero. À medida que a concentração do polímero aumenta, a sobreposição das cadeias macromoleculares torna-se importante e a viscosidade relativa da solução aumenta significativamente com o aumento da concentração, até uma concentração crítica. Esta região designa-se por regime semi-diluído. Acima da concentração crítica, as interligações entre as cadeias do polímero aumentam grandemente, assim como a viscosidade. A lei de potência representada pela equação (8) permite evidenciar a transição entre os dois regimes através do parâmetro b , ou seja, diferentes valores de b traduzem diferentes regimes ([Lapasin, 1995](#)).

$$\eta = aC^b \quad (8)$$

Segundo [Lapasin \(1995\)](#), no regime diluído b varia entre 1 e 1,4. No entanto, mais recentemente, [Lai e Chiang \(2002\)](#), descreveram valores de b na gama dos 0,78-0,80 no regime diluído. No regime concentrado a literatura descreve valores de b na gama dos 1,9 a 5,6 ([Lapasin, 1995](#)).

Pelos resultados apresentados no gráfico conclui-se que as soluções encontravam-se no regime concentrado, uma vez que $b=4,75$ para o CS da Sigma H, $b=3,43$ para o CS da Cognis S em 1% (v/v) de AcA e $b=3,02$ para a solução de CS da Cognis S em 0,5% (v/v) de AcA.

Verifica-se também que, para qualquer dos CS usados, o aumento da concentração na solução provoca um aumento da viscosidade da mesma. Entretanto, o aumento da viscosidade é maior no CS da Sigma H, para a mesma concentração de CS. Isto é devido ao facto do CS da Sigma H ter uma massa molecular maior que a do CS da Cognis S.

Com a solução de 2,5% (v/v) CS da Sigma H houve dificuldade em medir o valor da viscosidade com o viscosímetro rotacional, por isso, este valor foi desprezado, tabela 8 (** Valor desprezado).

A figura 14 mostra a aparência das soluções. As soluções de 2 e 2,5% (p/p) de CS têm aparência de géis.

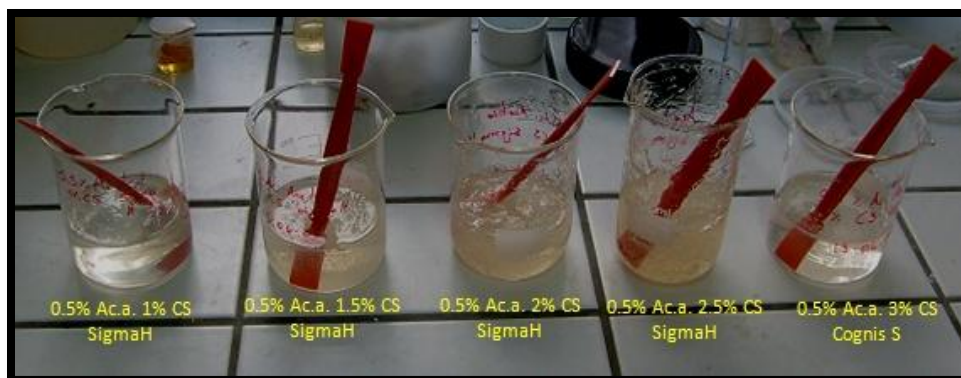


Figura 14 - Aparência das soluções variando a concentração do CS da Sigma H

Tal como se pode observar na tabela 8 a solução de 1,5% CS (p/p) Sigma H 0.5% (v/v) AcA*, onde foi acrescentado NaCl (10% v/v) possui menor viscosidade.

Para explicar este facto é necessário considerar os factores: o grau de acetilação e a influência da força iónica. A incorporação de NaCl no solvente tem como objectivo a redução do efeito polielectrólito, uma vez que as cargas positivas do grupo amina passam a estar contra-balançadas com as cargas negativas do átomo de cloro.

Dependendo do grau de acetilação devem-se considerar alterações na expansão e rigidez das cadeias e/ou a tendência para formar agregados. O maior conteúdo em grupos acetilo pode aumentar a rigidez das cadeias, por razões estereoquímicas. Por outro lado, o baixo grau de acetilação significa que temos um maior número de grupos amina livres, os quais se encontram protonados na solução ácida, produzindo o estiramento da cadeia e alguma rigidez devido à repulsão electrostática ([Kumar, et al., 2004](#)).

5. Hidrogéis

5.1. Preparação dos hidrogéis

Foram preparadas soluções de 4 e 5% (p/p) de CS da Cognis S em 2% (v/v) de AcL. A mistura foi deixada em agitação à temperatura ambiente, durante 24 h. As soluções foram pesadas nos moldes com $m=30g$ cada e ajustadas de forma a ocupar todo o espaço. Seguidamente, introduziram-se as amostras dentro de uma câmara de amónia (4l a 2,5% (v/v)). A câmara encontra-se fechada de forma a manter uma atmosfera saturada de amónia (figura 15). Deixaram-se as amostras

na câmara de amónia por um período de tempo de 2 dias para a formação dos hidrogéis. No fim desse período de tempo os moldes foram removidos e os hidrogéis foram lavados até um $\text{pH} \leq 8$. Depois foram embalados sob vácuo.



Figura 15 – Câmara de amónia

5.2 Caracterização dos hidrogéis

5.2.1. Tempo de coagulação e processo de lavagem

Inicialmente, as soluções eram deixadas na câmara saturada de amónia durante um período de 48 horas. Visto que este tempo era muito longo para um processo de produção, estudou-se o tempo de exposição. Para isso foram feitos alguns testes.

Foram utilizados cinco recipientes idênticos, onde foi colocado o mesmo volume de solução de CS ($m=10\text{g}$) e o mesmo volume da solução de amónia (100ml). As amostras foram retiradas ao fim de 1,2,3,6,12 e 24 horas.

Durante este teste verificou-se que, a solução que antes era transparente se tornou num hidrogel de cor azul claro. Ou seja, à medida que o vapor de amónia penetra na solução, ela vai coagulando formando o hidrogel. A coagulação inicia-se na superfície em contacto com a atmosfera saturada de amónia e continua até ao interior da solução.

Estes testes mostraram que a partir de um período de tempo de 3h as soluções de CS coagulavam.

O processo de lavagem é fundamental para os hidrogéis, dado que ao serem coagulados numa solução de amónia saturada o pH final é elevado. Por isso deve passar por um processo de lavagem, em água destilada, para diminuir o pH.

Os hidrogéis, depois de removidos da câmara de amónia, foram retirados dos moldes e lavados com água destilada. Depois, foram colocados novamente no referido molde e mergulhados em água destilada. A água foi removida de duas em duas horas durante o dia. O tempo aproximado para baixar o pH de 13,8 até 7 foi de aproximadamente 48h. Ou seja, o processo de lavagem por requerer lavagens frequentes e pelo facto de ser um processo manual, é bastante demorado. Também se fez uma tentativa de utilizar agitadores, mas os hidrogéis foram danificados.

5.2.2. Testes de Inchamento e perda de massa

O estudo da forma como os hidrogéis interagem com a água reveste-se de grande importância face à sua aplicação posterior.

Os gráficos da figura 16, 17 e 18 apresentam o comportamento dos hidrogéis com 5% (p/p) de CS da Cognis S e 2% (v/v) de AcL:

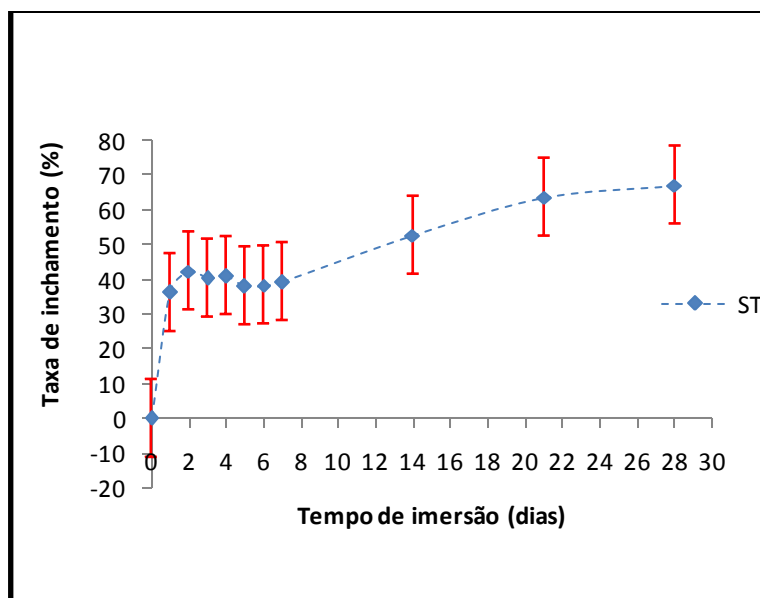


Figura 16 - Gráfico da taxa de inchamento em função do tempo de imersão.
ST → pH=5;

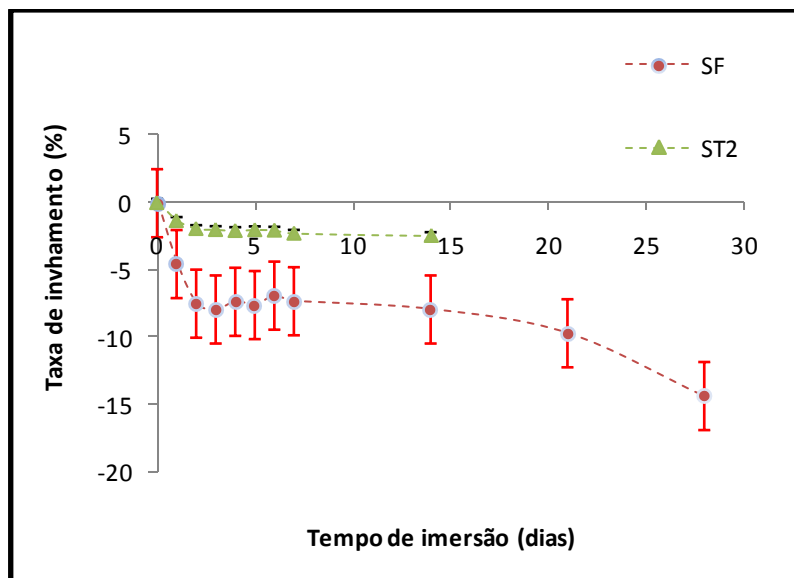


Figura 17- Gráfico da taxa de inchamento em função do tempo de imersão.
SF →pH= 7.4; ST2 →pH=9.8

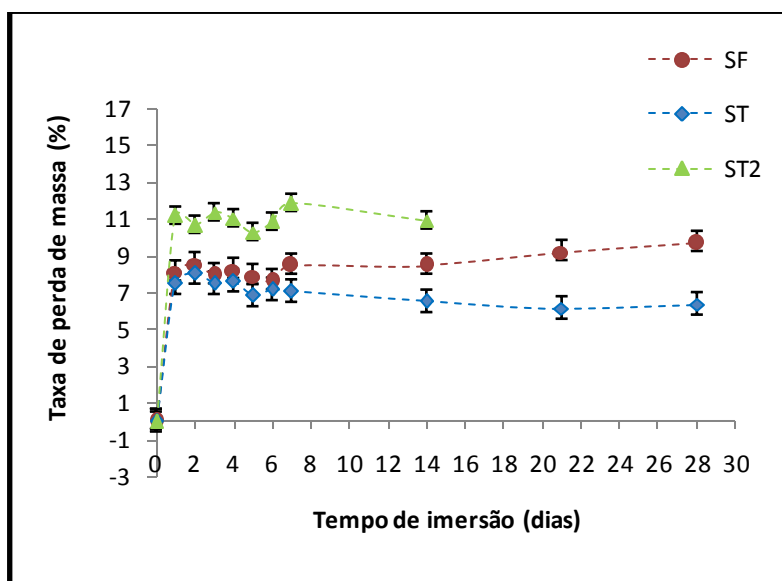


Figura 18- Gráfico taxa de perda de massa em função do tempo de imersão.
ST →pH=5; SF →pH= 7.4; ST2 →pH=9.8

Os testes de inchamento demonstram que os hidrogéis têm tendência a inchar quando colocados a pH ácido e a contrair quando o pH é neutro ou básico.

As diferentes taxas de inchamento podem ser entendidas como resultado da intensidade das interações iónicas que ocorrem nestas soluções. As moléculas de água são polares e a solução tampão (ST), constituída por acetato de sódio e ácido acético, desestabiliza as cadeias de CS tornando-as mais solúveis. Isso verificou-se durante os testes. Também, tem de se considerar a força iónica das soluções que

está directamente relacionada com as interacções iónicas que ocorrem nas soluções. No entanto este parâmetro não foi estudado neste trabalho.

6. Pensos curativos

6.2. Preparação dos pensos curativos

Pensos Hemostáticos (LP)

Foram preparadas soluções de 1 a 5% (p/p) de CS da Cognis S em 0,5 a 2% (v/v) de AcA. As soluções foram deixadas em agitação à temperatura ambiente durante 24 h. Os moldes foram cheios com 30 e 40g de solução, e seguidamente foram colocados no liofilizador, num ciclo de, aproximadamente, 24h. No fim da liofilização, as amostras foram removidas dos moldes e colocadas ao ar livre. Depois foram seladas em vácuo e etiquetadas.

Pensos coagulados (LP)

Utilizaram-se as mesmas soluções que na preparação dos pensos curativos não coagulados. Contudo, depois do 1º ciclo de liofilização os pensos foram coagulados/neutralizados em amónia (soluções pH = 8,7; 9; 9,8 e 13,8), por aproximadamente 2 minutos e lavados até um pH \leq 8. Depois foram colocados no liofilizador para a remoção do solvente (segundo ciclo de liofilização). No fim deste ciclo os pensos coagulados foram selados e etiquetados.

Foi também testada a coagulação com hidróxido de sódio (NaOH). Foi preparada uma solução de NaOH a 2,5% (p/v). Soluções de 5% (p/p) de CS foram congeladas (passo efectuado para manter a forma do penso), e depois foi-lhes adicionada a solução de NaOH até a amostra ficar totalmente submersa (para a neutralização do AcA). Este processo durou cerca de 12 horas. Seguidamente, as amostras foram removidas e lavadas em água destilada, até um pH \leq 8. Depois de atingir o pH pretendido, os pensos foram liofilizados.

6.3. Caracterização dos pensos curativos

6.3.1. Pensos curativos não coagulados (LH)

6.3.1.1. Liofilização

O primeiro ciclo de liofilização efectuada foi feito com os seguintes parâmetros de liofilização ($P = 0.110\text{mbar}$):

PF	Tempo = 3h
Sublimação	Rampa = $5^{\circ}\text{C}/\text{min}$
	T = -25°C
	Tempo = 10h
Secagem	Rampa = $0,5^{\circ}\text{C}/\text{min}$
	T = 15°C
	Tempo = 30h

Figura 19 - Parâmetros do ciclo de liofilização dos LH

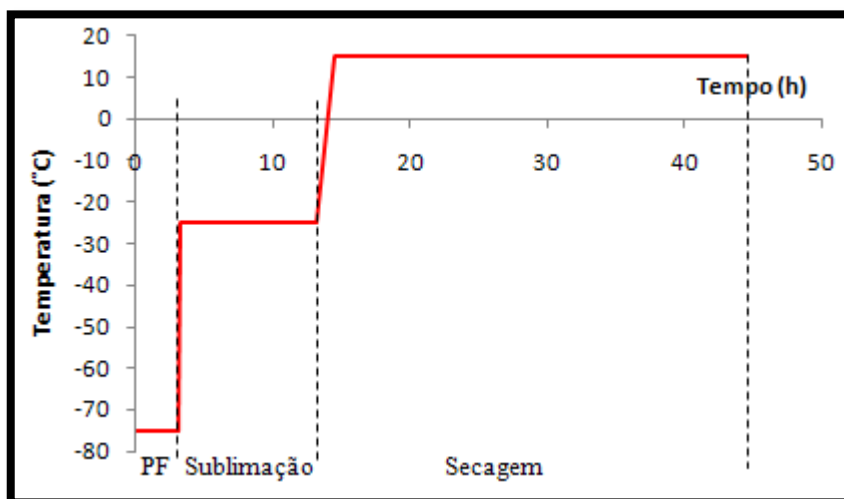


Figura 20 – Representação gráfica do ciclo de liofilização

Este ciclo foi programado com base na patente ([McCaryhy, et al., 2008](#)).

As amostras ficaram bem liofilizadas (secas), tal como se observa na figura 21 ($80,59\text{mm} \times 113,88\text{mm}$).



Figura 21 – Pensos hemostáticos após o primeiro ciclo de liofilização (5%CS Cognis S 2% AcA)

Foram feitos vários testes na tentativa de otimizar o processo de liofilização variando a temperatura e o tempo de secagem.

6.3.1.2. Otimização do ciclo de liofilização

Tempo de secagem

Inicialmente, fez-se um ciclo de duração aproximada de 46h com amostras de 5%CS da Cognis S e 2% de AcA. Dado que este tempo é muito grande para um processo de produção, tentou-se reduzi-lo. Assim, começou-se por diminuir o tempo de secagem de 30h para 15, 10, 7 e 3 horas. Até 7h de secagem as amostras ficaram bem liofilizadas, em moldes de m=40g e m=30g de solução de CS. As amostras com tempo de secagem de 3 horas não ficaram bem liofilizadas, como se pode ver pela figura 22.

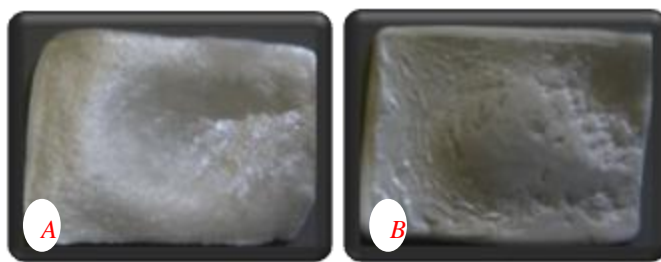


Figura 22 - LH liofilizados com 3 horas de secagem

Embora parecessem liofilizados na parte superior (figura 22 A), quando foram removidos do molde apresentaram solvente na parte inferior que estava em contacto com o molde (figura 22 B). Isto mostra que o solvente não foi totalmente removido da amostra na primeira fase de liofilização. Ou seja, a fase de secagem é crucial para garantir que todo o solvente é removido da amostra. Assim, para

garantir que as amostras ficassem completamente liofilizadas, escolheu-se o período de 10 horas de secagem como o tempo ideal.

Foram, também, feitos alguns testes variando o tempo de liofilização (5h, 10h e 15h) durante a fase de sublimação, e todas as amostras ficaram bem liofilizadas. Escolheu-se as 10h de sublimação, para garantir que maior parte da água fosse removida, ainda nesta etapa.

Assim, em todos os ciclos de liofilização dos LH utilizou-se o programa otimizado:

PF	Tempo = 3h
Sublimação	Rampa = 5°C/min
	T = -25°C Tempo = 10h
Secagem	Rampa = 0,5°C/min
	T = 15 °C Tempo = 10h

Figura 23 - Parâmetros do ciclo de liofilização, dos pensos curativos, otimizado

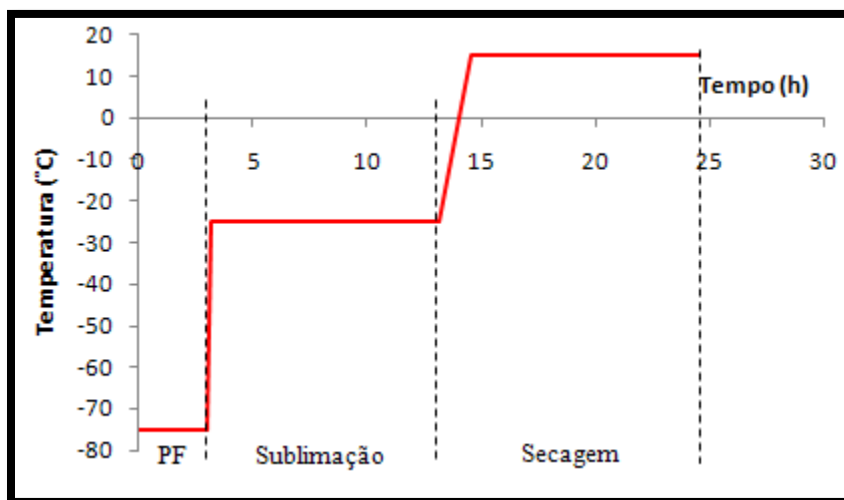


Figura 24 – Representação gráfica do ciclo de liofilização otimizado

Um outro problema encontrado depois do processo de liofilização foi o cheiro de ácido acético nas amostras. Embora as amostras estivessem secas, após algum tempo de exposição ao ar livre, o odor a AcA era ainda muito forte. O que mostra que o processo não remove todo o solvente. Foram feitas várias tentativas de remoção do odor a AcA sem neutralizar as amostras:

- Deixaram-se as amostras mais tempo no liofilizador (~3h) sob vácuo, depois de terminado o ciclo;

- Diminuiu-se a temperatura de liofilização ($-25^{\circ}\text{C} \rightarrow -55^{\circ}\text{C}$);
- Diminuiu-se a pressão dentro da câmara ($0,110 \rightarrow 0,060\text{mbar}$);
- Diminuiu-se da concentração de AcA na solução ($2\% \rightarrow 0,5\%$);

Depois de feitos todos estes testes, as amostras ainda cheiravam a AcA. Salienta-se contudo, que os pensos hemostáticos que estão actualmente disponíveis no mercado também têm o odor a AcA.

Experiência com uma segunda prateleira

A experiência com uma segunda prateleira foi uma tentativa de aumentar o processo de produção e explorar a capacidade do liofilizador, mas não funcionou por várias razões. Construiu-se uma prateleira de alumínio que foi colocada no liofilizador, como mostra a figura 25.

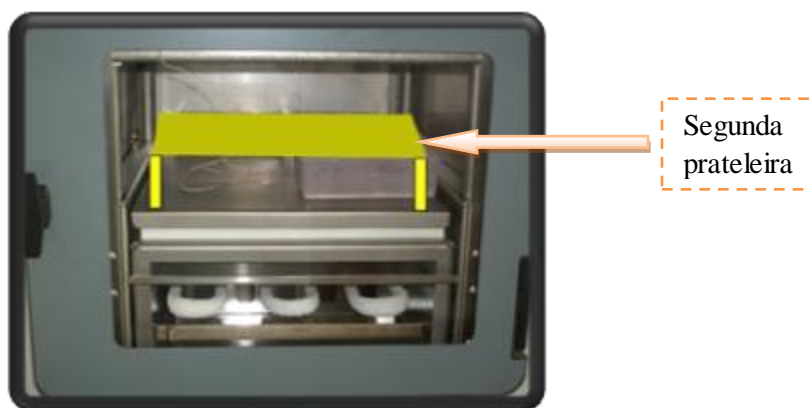


Figura 25 – Câmara de Liofilização e o desenho da segunda prateleira

A figura 26 mostra os resultados da primeira tentativa de liofilização com a segunda prateleira:

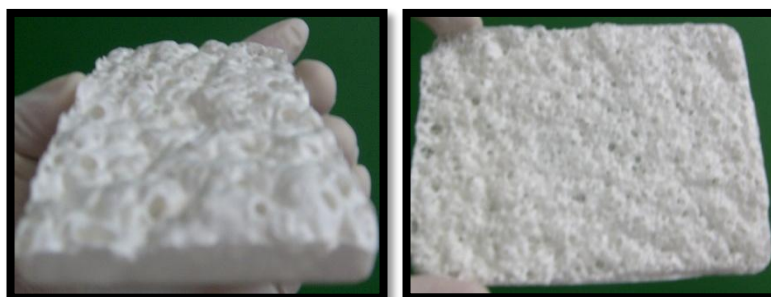


Figura 26- Pensos curativos obtidos com a segunda prateleira

Como se pode ver, as amostras ficaram heterogéneas e porosas com presença de macroporos. Este não era o resultado esperado e o facto de isso ter acontecido está relacionado com o processo de congelamento. A segunda prateleira não arrefeceu o suficiente para congelar as amostras, ou seja, a temperatura não é homogénea dentro da câmara do liofilizador. Só as amostras em contacto com a primeira prateleira arrefecem como programado. Notou-se que a temperatura na primeira prateleira era de -75°C e que a temperatura do sensor na segunda prateleira era de -10°C .

Depois testou-se o congelamento das amostras antes de as colocar na segunda prateleira, e quase todos ficaram bem liofilizados, no entanto, uma amostra de $m=40\text{g}$ não ficou totalmente liofilizada (figura 27).



Figura 27 – Penso com defeito depois do ciclo de liofilização com a segunda prateleira.

6.3.1.3. Teste de degradação

Esse teste foi feito com o objectivo de saber qual era a capacidade de degradação de um LH normal e de um LH prensado.

Foram cortadas duas amostras de LH de 1,5% (p/p) de CS e 0,5% (v/v) de AcA, (2cm×2cm) e foram colocadas em água destilada. Uma das amostras foi prensada a quente ($\sim 200^{\circ}\text{C}$, figura 28 A) e a outra foi utilizada no estado normal depois de liofilizada (figura 28 B).

O comportamento das duas amostras foi diferente: a amostra B dissolveu em menos tempo que a amostra A. A amostra B, ao contrario da amostra A, perde a integridade estrutural ao fim de 30 minutos de imersão em água destilada.

Isto deve-se ao facto da amostra A ser mais compacta que a amostra B, portanto a água tem maior facilidade em entrar na estrutura porosa da amostra B. Também o facto de ser prensada a elevadas temperaturas pode fazer com que o

AcA evapora da amostra o que obviamente, diminuirá a solubilidade em água. Este pode ser o motivo pelo qual os LH disponíveis no mercado são prensados.

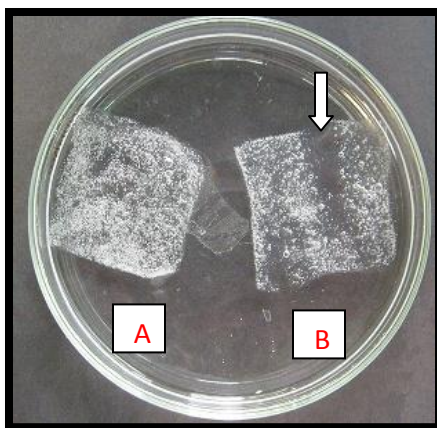


Figura 28 – Teste de degradação dos LH, evidenciando (seta) a falta de integridade estrutural da amostra não prensada (B).

6.3.1.4. Esterilização

A figura 29 apresenta um LH esterilizado com a radiação gama:



Figura 29 – LH esterilizado: 5% CS Cognis S 2% AcA m=30g

Após a esterilização, as amostras apresentaram uma coloração diferente. As amostras, que antes eram brancas, tornaram-se amarelas. De acordo com [Skiens \(1980\)](#), o amarelecimento de materiais poliméricos, associado ao uso da radiação gama, pode ser devido ao aparecimento de insaturações ou a formação de complexos coloridos durante a irradiação. Isso, eventualmente, pode alterar as características dos pensos e causar a deterioração progressiva de suas

propriedades, incluindo o seu aspecto visual e as suas propriedades mecânicas (módulo elástico, resistência e ductilidade).

Os dois principais mecanismos de degradação ou alteração da estrutura polimérica quando um polímero é exposto à radiação gama são a cisão da cadeia e o aparecimento de reticulações ([Skiens, 1980](#)).

A cisão da cadeia ocorre quando há uma ruptura aleatória de ligações que reduzem a massa molecular média do polímero. As reticulações resultam na formação de redes tridimensionais no polímero, aumentando assim a sua massa molecular.

Com o aumento da dose de irradiação, o grau de reticulação do polímero pode aumentar. Frequentemente, ambos os mecanismos ocorrem quando um material polimérico é exposto à radiação gama, porém, a natureza do polímero bem como as condições em que a exposição à radiação é realizada podem fazer com que um destes mecanismos predomine ([Skiens, 1980](#)).

Foram feitas algumas experiências com as amostras no sentido de verificar a alteração estrutural provocada pela radiação, nos pensos produzidos.

Teste de dissolução

Foram colocadas duas amostras em água destilada, uma esterilizada e outra não esterilizada, e reparou-se que a amostra irradiada dissolvia muito mais rápido que a amostra não irradiada. Este leva a conclusão que o fenómeno de degradação predominante é a cisão da cadeia e não a reticulação.

6.3.1.6. Microscopia Electrónica de Varrimento – SEM

Para fazer o SEM dos pensos definiram-se duas zonas, periférica e central, e diferenciaram-se as partes em contacto com o molde e as partes em contacto com o ar. Estas duas partes do penso são visivelmente diferentes. A figura 30 mostra um LH identificando as diferentes zonas onde foram cortadas as amostras analisadas.

A figura 31 mostra as imagens de SEM das superfícies de corte dos LH produzidas a diferentes temperaturas de sublimação. Todas as imagens representam um corte longitudinal da amostra e na zona periférica (P).

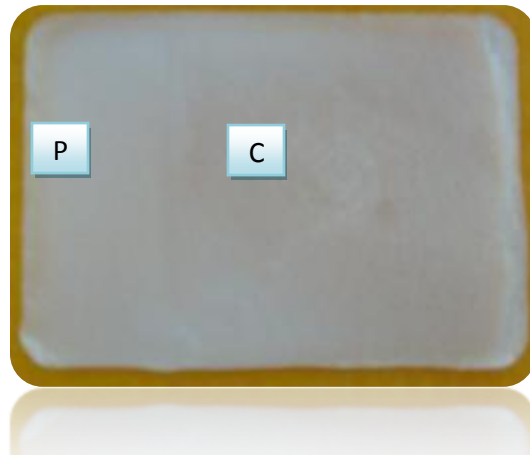


Figura 30 – Diferentes zonas de um LH, de onde foram retiradas amostras para SEM. P- zona periférica; C- zona central;

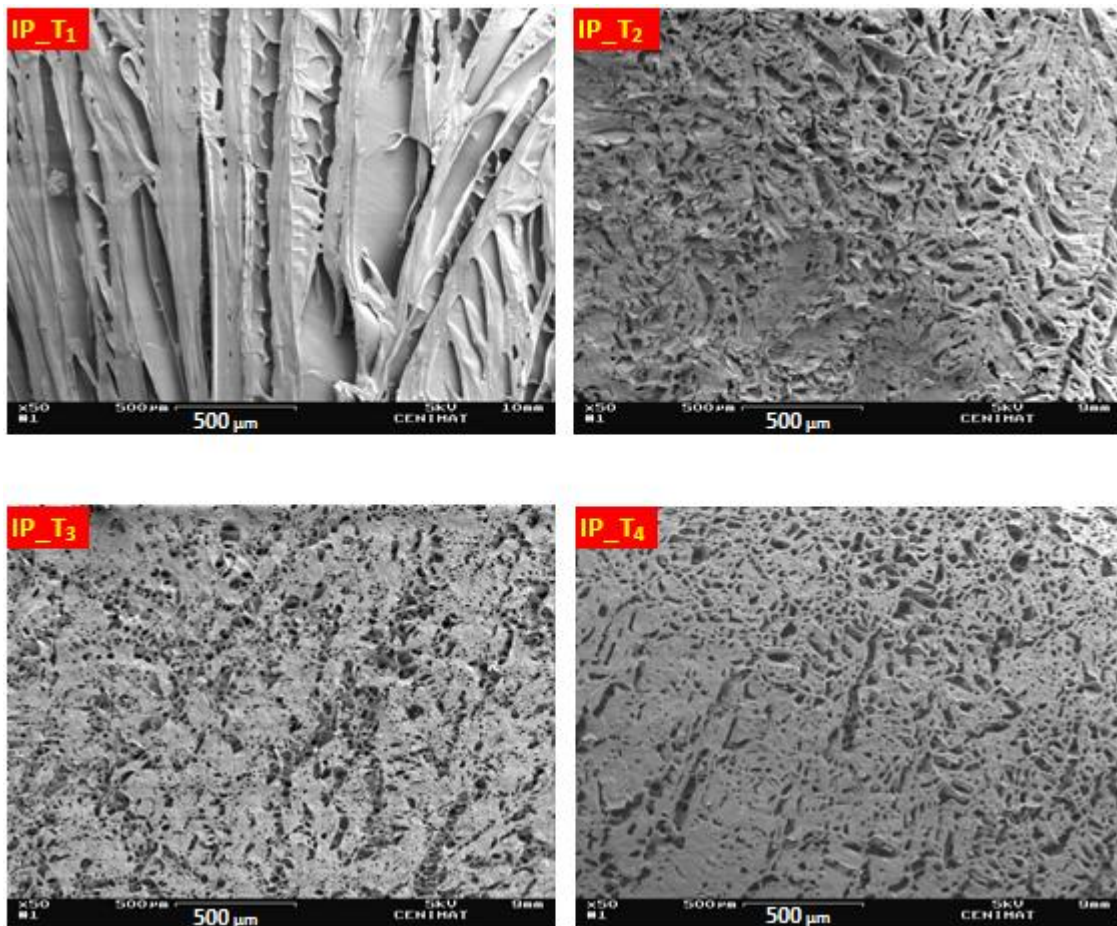


Figura 31 – Imagem de SEM do LH 5% CS Cognis S e 2% AcA m=30g: IP_T₁=-55°C; IP_T₂=-45°C; IP_T₃=-25°C; IP_T₄=-10°C

Tal como se pode verificar, o tamanho dos poros varia quando diminuimos a temperatura de liofilização. Podemos ver que para a gama de temperatura entre -

10°C e -45°C (figura 31 T₄, T₃, T₂), os pensos são porosos (poros interconectados e aproximadamente esféricos). Entretanto, quando diminuimos a temperatura para -55°C, a forma dos poros altera-se, os poros tornam-se maiores e alongados (figura 31 T₁). Este facto está relacionado com o processo de separação de fases.

Tal como foi referido, a transição entre transferência de massa e de calor para o CS, ocorre à temperatura de -50°C, ocorrendo a transferência de massa à temperatura de congelamento entre 0 e -50°C, e a transferência de calor à temperatura de congelamento abaixo de -50°C (Roh & Kwon, 2002).

Para uma amostra não coagulada abaixo dos -50°C (tal como em IP_T₁) o gradiente térmico é responsável por uma sublimação anisotrópica dos cristais de gelo, conduzindo ao aparecimento dos poros alongados que se observa na figura 31 (IP_T₁).

A figura 32 mostra as imagens de SEM da superfície dos LH feitos com o CS da Sigma H, com concentrações de 1,5 e 2% de CS, produzidas com uma temperatura de -25°C, durante o ciclo de liofilização. Todas as imagens representam a face das amostras que fica em contacto com o ar (S).

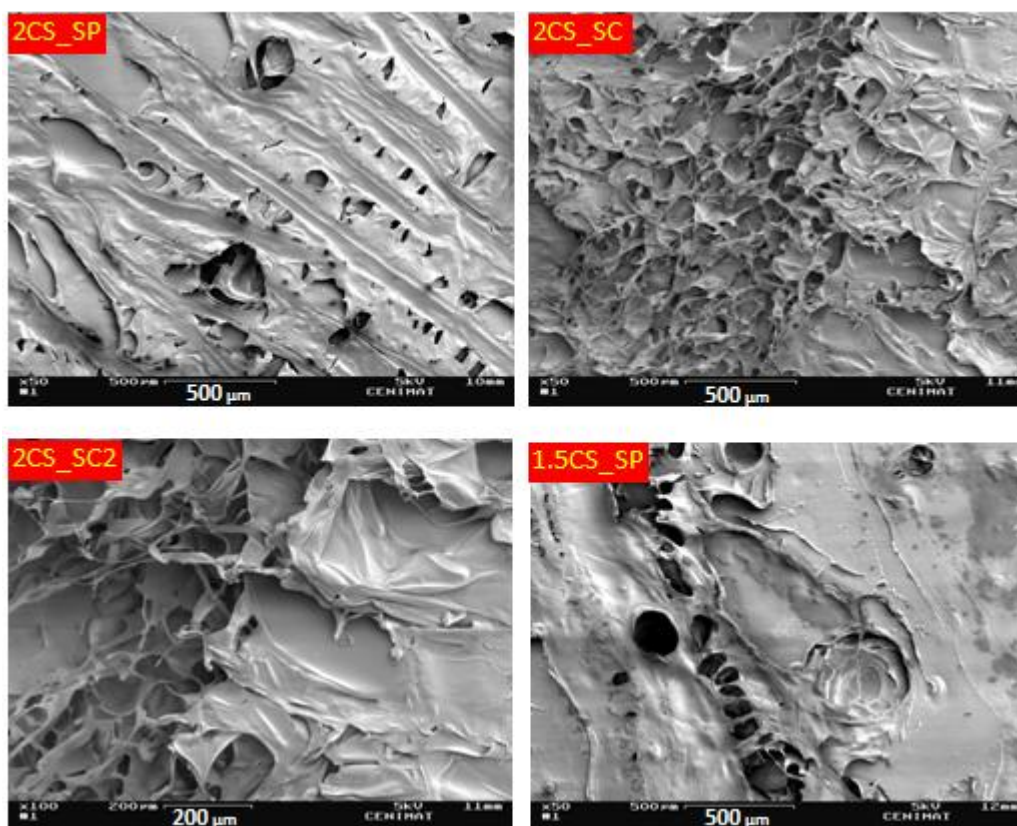


Figura 32 – Imagem de SEM dos LH 1,5% CS Sigma H 1% AcA e 2% CS Sigma H 0,5% AcA:
 SP – zona periférica em contacto com o ar
 SC – zona central em contacto com o ar

As imagens da figura 32, permitem concluir que os LH não são homogéneos. As zonas em contacto com o ar são pouco porosas e mais rugosas no centro do que na zona periférica. Essa heterogeneidade na superfície é devido ao processo de congelamento. O congelamento do LH não é imediato, a solução de CS começa a congelar da parte periférica em direcção a parte central.

Na figura 33 apresentam-se as imagens de SEM da superfície destes LH que ficam em contacto com o molde.

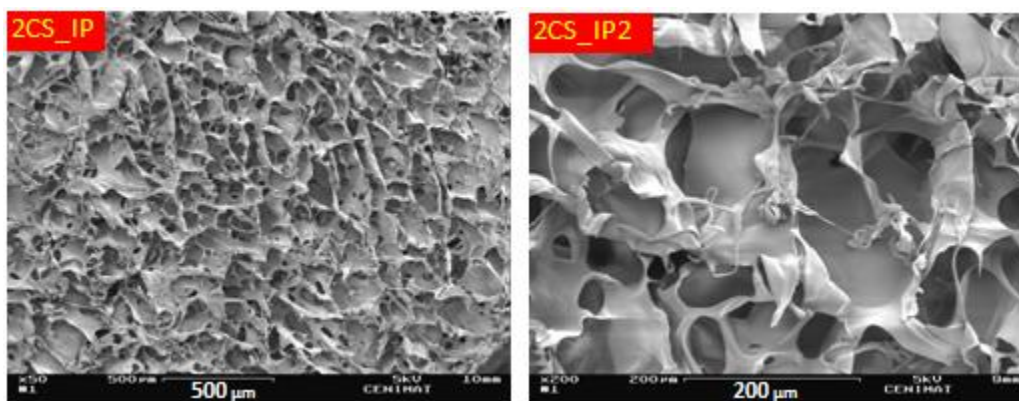


Figura 33 – Imagem de SEM dos LH, 2% CS Sigma H 0,5% AcA:
IP – zona periférica em contacto com o molde.

As imagens da figura 33 levam a concluir que a parte em contacto com o molde é mais porosa. Esta zona é mais suave e a sua elevada porosidade deverá permitir uma maior absorção de água, quando comparada com a superfície em contacto com o ar.

Em termos de aplicação, esta heterogeneidade dos LH pode ser proveitosa. A zona mais porosa ficaria em contacto com a ferida, permitindo uma melhor absorção, e a zona menos porosa ficaria em contacto com o ar (funcionava como uma barreira à passagem de microorganismos).

6.3.1.7. Testes mecânicos

A figura 34 mostra um provete colocado na máquina de tracção antes e depois da ruptura.

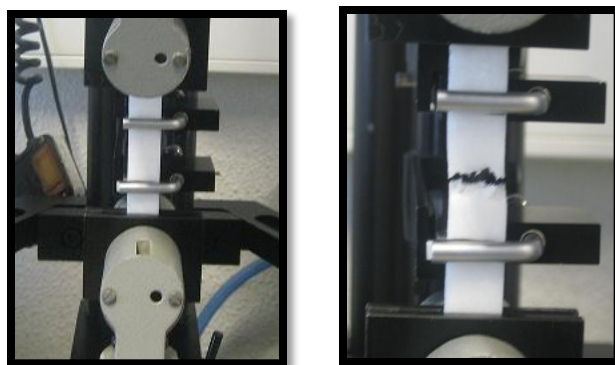


Figura 34 - Tracção de um LH até a ruptura (5% CS Cognis S 2% AcA m=40g)

Como se pode ver, a ruptura deu-se entre as garras do extensómetro. No entanto, isso não aconteceu para todos os provetes, porque as amostras não eram homogéneas. Todas as amostras apresentam comportamento elástico até a ruptura, tal como foi referido (ver página 44, figura 9)

A tabela 9 mostra os valores médios da tensão à ruptura (σ) e da extensão à ruptura destes materiais:

Tabela 9 – Tensão à ruptura e extensão à ruptura dos LH.

Amostras LH		Extensão à ruptura (ϵ) (%)	DP	Tensão à ruptura (σ) (MPa)	DP
1,5% CS Cognis S 1% AcA m = 40g	A	8,34	2,9	0,09	0,0
2 % CS Cognis S 1% AcA m = 40g	B	6,12	1,6	0,14	0,1
3 % CS Cognis S 1% AcA m = 40g	C	5,61	3,6	0,16	0,1
2% CS Sigma H 1% AcA m = 30g	D	5,97	1,1	0,12	0,1
5% CS Cognis S 2% AcA m = 40g	E	8,74	1,5	0,74	0,1
5% CS Cognis S 2% AcA m = 30g	F	6,78	1,9	0,24	0,1
5% CS Cognis S 2% AcA m = 30g Esterilizado	G	4,84	1,1	0,14	0,1

A partir da tabela 9 pode-se fazer um estudo do comportamento mecânico dos LH quando se varia a concentração de CS.

As imagens da figura 35, mostram os gráficos da tensão à ruptura e extensão à ruptura dos LH em função da concentração de CS, correspondente as amostras A = 1,5%, B = 2% e C = 3% de CS:

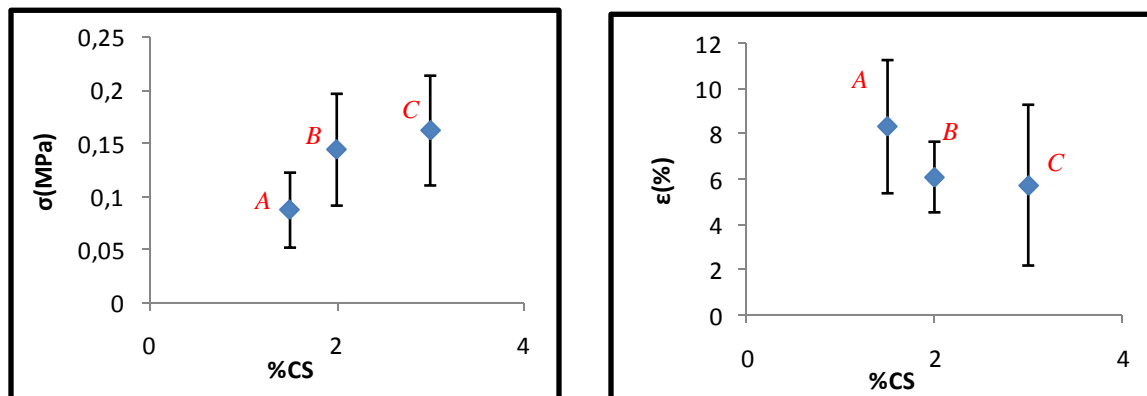


Figura 35- Gráfico da resistência à tracção e extensão à ruptura em função da concentração de CS.

Pelos gráficos podemos ver que quando aumentamos a concentração de CS a tensão à ruptura dos LH também aumenta, enquanto que a extensão à ruptura diminui.

Também podemos ver pela tabela 9 que as amostras E e F apresentam valores de tensão à ruptura diferentes, porém, a única diferença entre estas amostras é a massa da solução de CS que foi colocada no molde, $m_E = 40g$ e $m_F = 30g$. Ou seja, a diferença de 10g pode resultar em estruturas com propriedades diferentes.

Também podemos ver que embora as amostras F e G, sejam semelhantes, com a única diferença da amostra G ser esterilizada, apresentam propriedades mecânicas diferentes. O LH depois de esterilizado perde as suas propriedades mecânicas, dado que diminui a tensão à ruptura e extensão à ruptura. Este facto é consequência da cisão das cadeias poliméricas do CS durante o processo de esterilização com radiação gama.

6.3.2. Pensos coagulados (LP)

6.3.2.1. Liofilização

A primeira tentativa de fazer pensos curativos que não se dissolvem em água não foi bem sucedido, visto que os pensos ficaram muito rígidos e estaladiços, com uma cor branca na superfície, sem condições de aplicação. A figura 36 mostra o primeiro penso insolúvel produzido, neutralizado com NaOH. Estes foram liofilizados a partir dos parâmetros de liofilização otimizados (página 64, figura 23).



Figura 36 – LP coagulado com NaOH

Depois de várias tentativas conseguiu-se fazer um penso curativo que não se dissolvesse em água, com boas características e aparência, considerado como ideal. Este foi obtido a partir de um penso LH, por coagulação numa solução de amónia 2,5% (v/v). Depois de coagulado, o penso foi lavado até um pH <8 e colocado de novo no liofilizador.

Para o segundo ciclo de liofilização utilizou-se o programa (P = 0,110mbar):

PF	Tempo = 3h
Sublimação	Rampa = 5°C/min
	T = -25°C
	Tempo = 5h
Secagem	Rampa = 0,5°C/min
	T = 15 °C
	Tempo = 5h

Figura 37- Parâmetros do ciclo de liofilização dos LP otimizados

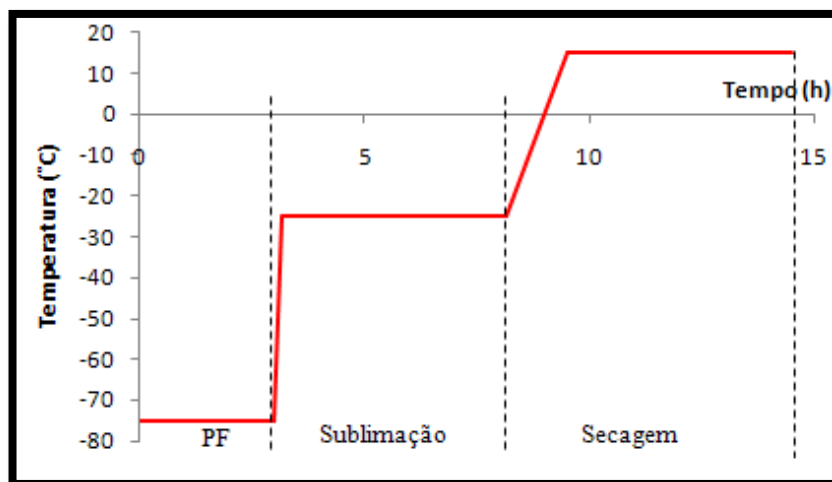


Figura 38 – Representação gráfica do ciclo de liofilização dos LP.

Neste ciclo diminui-se o tempo de sublimação e de secagem, dado que o solvente é apenas água. A figura 39 mostra um penso coagulado (insolúvel) com 5% de CS Cognis S ($80,59 \times 113,88mm$).



Figura 39- LP após o segundo ciclo de liofilização (5% CS Cognis, 2% AcA)

Este penso é pouco maleável quando comparado com os outros tipos de pensos com menor concentração de CS (1,5; 2 e 3%).

Experimentou-se coagular os pensos LH em soluções tampão de amónia com pH 8,7; 9 e 9,8, e todas as amostras inseridas nas soluções tampão coagularam. Verificou-se que a coagulação dos pensos é imediata, quando inseridas nas soluções tampão. Isto permite diminuir o tempo de lavagem, dado que se pode efectuar a coagulação em soluções tampão de pH 8,7.

Assim, a vantagem de utilizar a amónia em vez de hidróxido de sódio é que o processo de lavagem é mais rápido e também não se corre o risco dos LP apresentarem aspecto branco (devido a presença do acetato de sódio).

6.3.2.2. Testes de inchamento e perda de massa

O gráfico da figura 40 mostra o comportamento dos pensos curativos coagulados, quando imersos em soluções com diferente pH.

Pelo gráfico pode-se concluir que a taxa de inchamento é constante para todos os pensos curativos após, aproximadamente, 3 dia de imersão.

A capacidade de absorção de água varia de acordo com a concentração de CS. Os pensos A e D apresentam menos capacidade de absorção de água, tendo ambos 5 % de CS. Os resultados mostram que o pH do meio não influencia a taxa de inchamento.

Os pensos B e C têm concentração de CS 1,5 e 3% (p/p) respectivamente e apresentam, aproximadamente, a mesma capacidade de absorção de água, podendo absorver água até 40 vezes o seu peso seco. Esta característica é importante, visto que podem ser inseridos em soluções aquosas antes de ser aplicado no ferimento, o que permite refrescar o ferimento e simultaneamente limpá-lo.

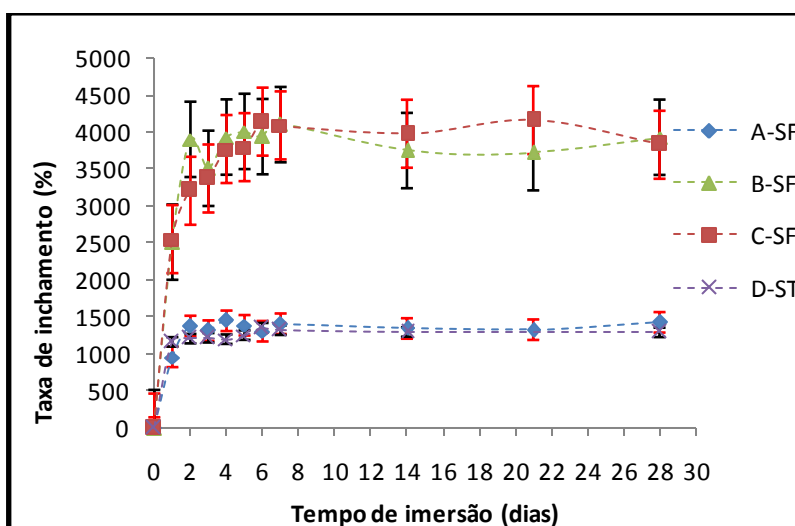


Figura 40- Gráfico da taxa de inchamento em função do tempo de imersão.

SF →pH= 7,4; ST →pH=5;

A →5% CS Cognis S 2% AcA; B →3% CS Cognis S 0,5% AcA;

C →1,5% CS Cognis S 0,5% AcA; D →5% CS Cognis S 2% AcA;

O gráfico da figura 41 mostra a variação da taxa de perda de massa, com o tempo de imersão, dos pensos coagulados, em soluções com diferente pH.

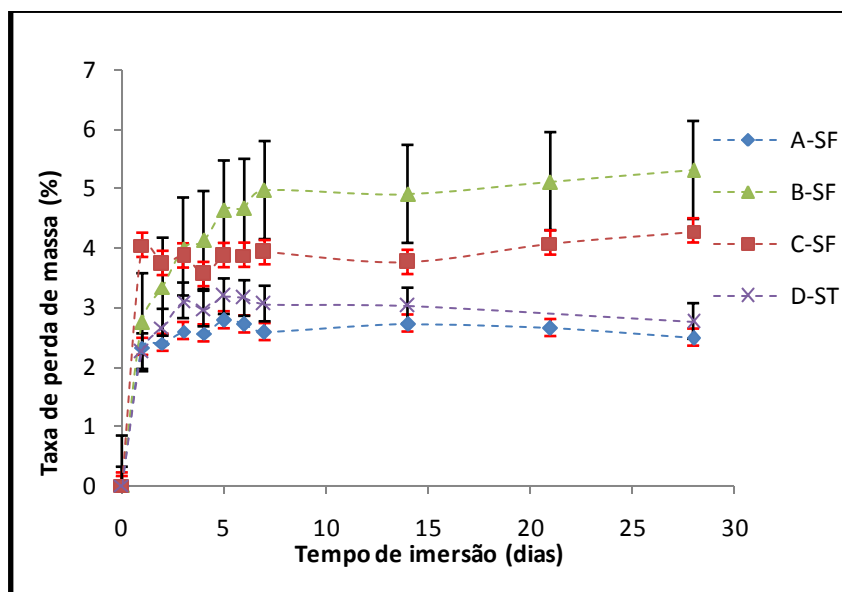


Figura 41- Gráfico da taxa de perda de massa em função do tempo de imersão.

SF →pH= 7,4; ST →pH=5;

A →5% CS Cognis S 2% AcA; B →3% CS Cognis S 0,5% AcA;

C →1,5% CS Cognis S 0,5% AcA; D →5% CS Cognis S 2% AcA;

Através do gráfico verifica-se que a perda de massa é constante a partir de cinco dias de imersão, aproximadamente, embora o pensos B mostre uma variação diferente. A pequena quantidade de material perdida inicialmente, após imersão nas soluções tampão, deve-se, provavelmente, à presença de algum ácido nos pensos que promoverá a dissolução de algum CS.

Outra característica importante desse tipo de pensos é a capacidade de adquirir a forma original quando colocado em água na segunda imersão (memória de forma). As amostras depois de enroladas foram colocadas em água, e imediatamente encheram-se de água e desdobraram-se adquirindo a forma original. No entanto, esta característica é mais evidente nas amostras com 1,5 e 3% de CS, visto serem mais flexíveis e menos densas.

Um facto importante observado durante os testes é a capacidade da água permanecer no interior da estrutura e ser libertada de forma controlada quando pressionada.

6.3.2.3. Testes mecânicos

A tabela 10 mostra os valores da tensão à ruptura e extensão à ruptura dos LP.

Tabela 10 – Propriedades mecânicas dos LP.

Amostras LP		Extensão à ruptura (ϵ) (%)	DP	Tensão à ruptura (σ) (MPa)	DP
1,5% CS Cognis S 1% AcA m =40g	A	4,22	3,3	0,11	0,0
2 % CS Cognis S 1% AcA m = 40g	B	4,82	2,9	0,12	0,0
3 % CS Cognis S 1% AcA m = 40g	C	11,10	4,2	0,20	0,1

Os gráficos da figura 42, mostram a variação da tensão à ruptura e extensão à ruptura em função da concentração de CS, correspondente as amostras A = 1,5%, B = 2% e C = 3% de CS.

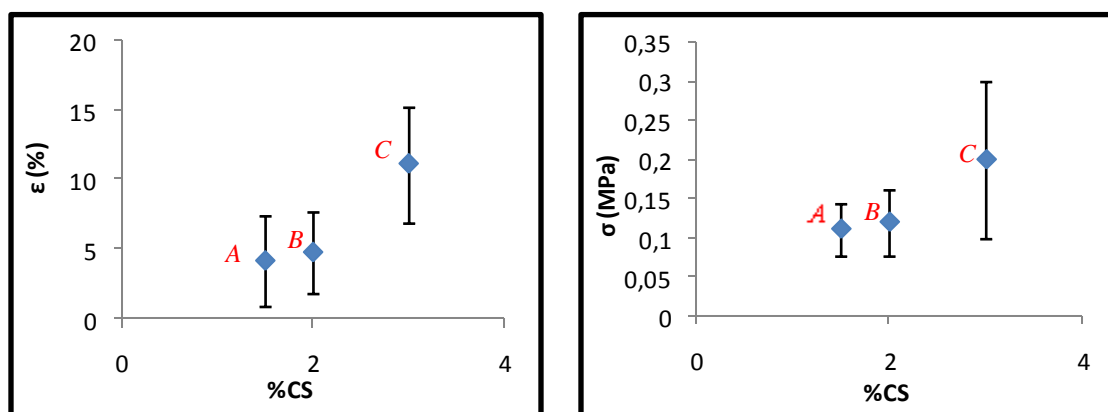


Figura 42- Gráfico da tensão à ruptura e extensão à ruptura em função da concentração de CS dos LP.

Pelos gráficos pode-se ver que, quando aumentamos a concentração de CS, tanto a tensão à ruptura como a extensão à ruptura aumentam. Isto não aconteceu com os LH no caso da extensão à ruptura, pois pode-se ver que este diminuiu com o aumento da concentração de CS (pagina 72, figura 35). Este comportamento deve-se, provavelmente, a alterações estruturais promovidas pelo processo de coagulação.

Contudo, comparando os valores obtidos para as propriedades mecânicas (média e desvio padrão) dos LH e dos LP, com a mesma concentração de CS, verifica-se que, estatisticamente, os resultados são semelhantes.

Verificou-se também, durante a realização dos testes que se as amostras forem humedecidas tornam-se mais deformáveis.

7. Matrizes 3D para ET

Neste trabalho, fez-se também o estudo de matrizes 3D com e sem fibras para a regeneração de tecidos, variando a concentração de solvente (AcA) e a concentração de soluto (CS). A adição de fibras às matrizes 3D teve como objectivo a melhoria das propriedades mecânicas.

7.2. Preparação das matrizes

No diagrama da figura 43 apresenta-se o método de preparação das matrizes:

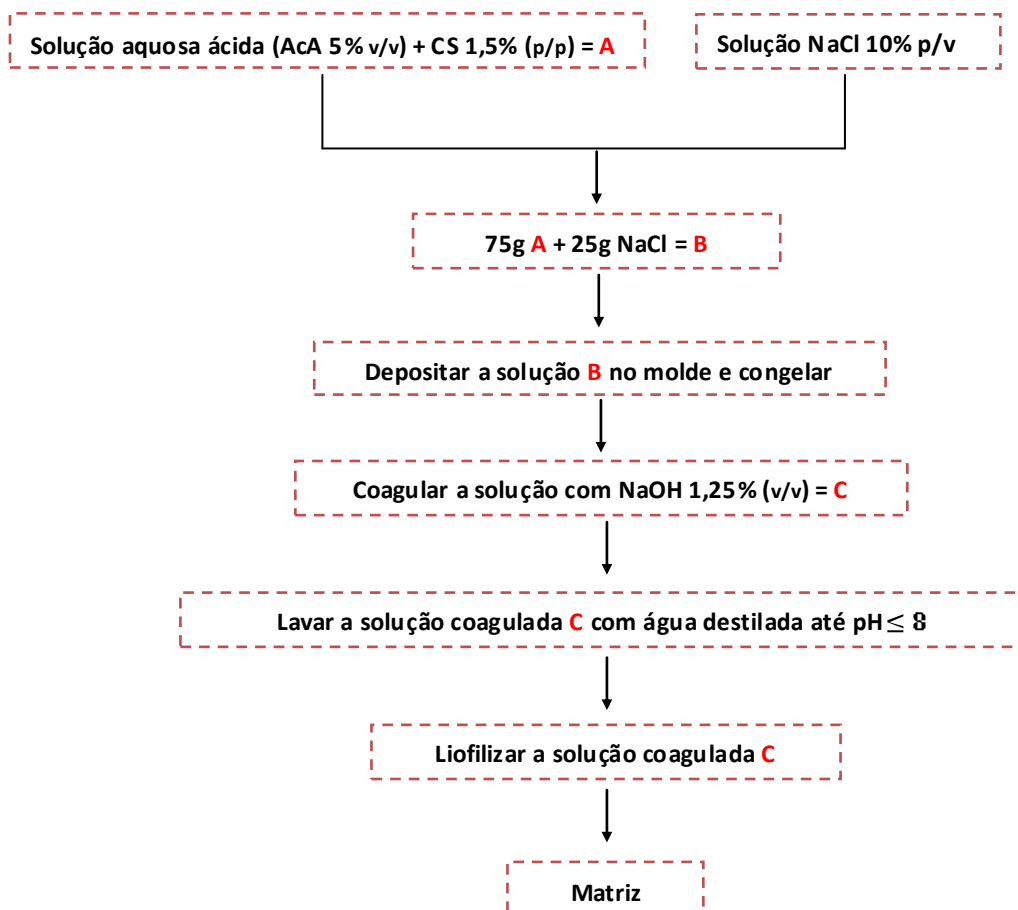


Figura 43 – Diagrama de preparação das matrizes para ET.

Foram preparadas várias soluções (diagrama da figura 43) cuja composição se apresenta na tabela 11.

Tabela 11 – Soluções usadas na preparação das matrizes.

Soluções	
AcA (v/v)	CS (p/p)
0,5	1,5
	2
	2.5
	3
1	1,5
2	1,5
3	1,5
4	1,5
5	1,5

Depois da preparação das soluções adicionou-se cloreto de sódio (NaCl 10 % p/v) na proporção de 75g de solução de CS e 25g de solução de NaCl. A solução final foi agitada até ficar homogénea, seguidamente foram colocadas em moldes e coaguladas. Fez-se um pré-congelamento no liofilizador de cerca de 1 hora e meia. Depois de congeladas, as amostras foram tratadas com uma solução de NaOH de 1,25% (v/v), ficando totalmente submersas na solução. Foram mantidas o tempo suficiente para a coagulação (~24h). Depois de coaguladas, as amostras foram lavadas com água destilada até um $\text{pH} \leq 8$. Depois de atingir o pH pretendido as amostras foram liofilizadas, embaladas e etiquetadas.

7.3. Coagulação matrizes com e sem fibras

7.3.1. Coagulação das matrizes sem fibras

Após congelamento no liofilizador, com o programa de pré-congelamento, as soluções foram coaguladas com NaOH a 1,25% (v/v). Após 24 h, observou-se que as amostras com 0,5% de AcA, tanto do CS da Sigma H como o da Cognis S, tinham formado uma estrutura coagulada. A figura 44 mostra as amostras depois do tratamento com NaOH.

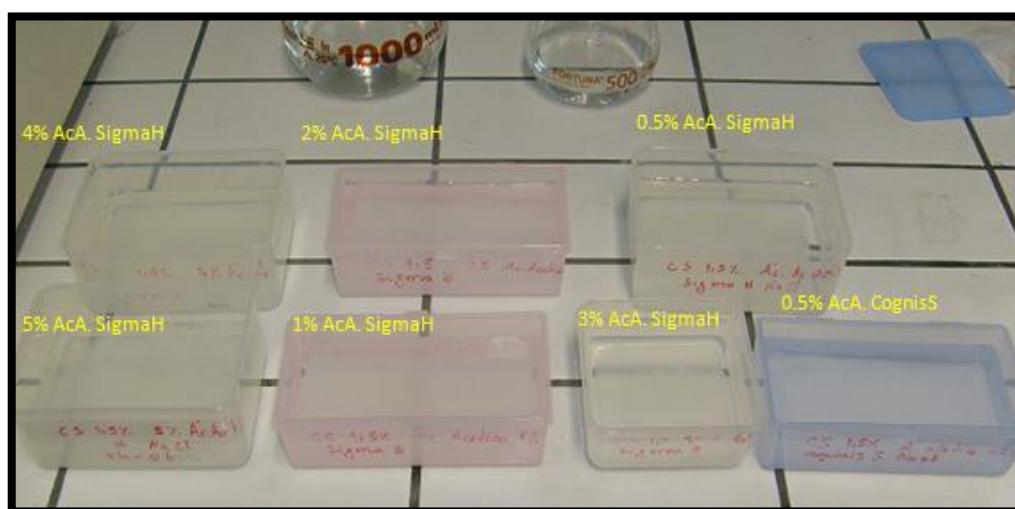


Figura 44 - Coagulação das matrizes variando a concentração de AcA com 1,5% CS da Sigma H e uma solução da Cognis S (1,5%).

As amostras com 3, 4 e 5% (v/v) de AcA não coagularam, apenas formaram uma pequena camada na superfície parecida com um hidrogel, mas na parte inferior a solução não estava coagulada, por isso, foram desprezadas.

As amostras de 1 e 2% (v/v) de AcA formaram uma estrutura mais ou menos rígida, mas não apresentaram fissuras à superfície, como se verificou na amostra de 0,5% (v/v) de AcA. No fim apenas ficaram as amostras de 0,5 e 1% (v/v) de AcA, dado que a amostra de 2% (v/v) de AcA acabou por se dissolver, à medida que se fazia o processo de lavagem para baixar o pH. A amostra com o CS da Cognis S formou uma estrutura rígida, mas não tão rígida como a amostras do CS da Sigma H.

Na figura 45 mostra-se o aspectos das soluções de CS / AcA (0,5% v/v) após o tratamento com NaOH.

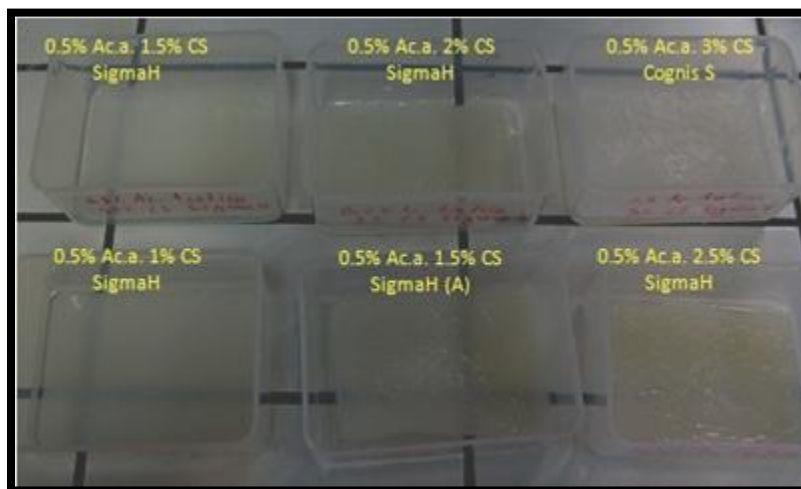


Figura 45 – Matrizes para a ET variando a concentração de CS

Todas as soluções coagularam e notou-se que as amostras iam ficando cada vez mais claras e com tendência a flutuar ao longo do processo de lavagem.

Um parâmetro que influencia o processo de coagulação é a temperatura de congelamento das amostras. É preciso que as amostras estejam congeladas para que o processo de coagulação possa ocorrer de forma eficiente e para manter a forma das matrizes no molde. As amostras ficaram totalmente congeladas no liofilizador depois de uma hora e meia de pré-congelamento.

Verificou-se, também, que a concentração de CS influencia a formação das estruturas. Tomando como ponto de referência uma concentração de 1,5% (p/p) de CS, pode-se concluir que concentrações inferiores dão origem a estruturas menos compactas e menos resistentes com tendência a desfazer-se.

À medida que a concentração de polímero aumenta, a sobreposição das cadeias poliméricas torna-se importante e a viscosidade relativa da solução aumenta significativamente, por isso, as estruturas são mais resistentes.

7.3.2. Coagulação de matrizes com fibras

As fibras de CS utilizadas provêm da empresa Alemã, *MEDOVENT*, e possuem diâmetros de 0,025 e 0,035 mm.

Foram preparadas duas soluções, uma de 2% (p/p) de CS e a outra de 2,5% (p/p) de CS da Sigma (0,5% (v/v) de AcA), às quais foram adicionadas fibras de forma aleatória.

As imagens da figura 46 mostram a deposição da solução com as fibras e as estruturas finais, obtidas depois de coaguladas e lavadas.

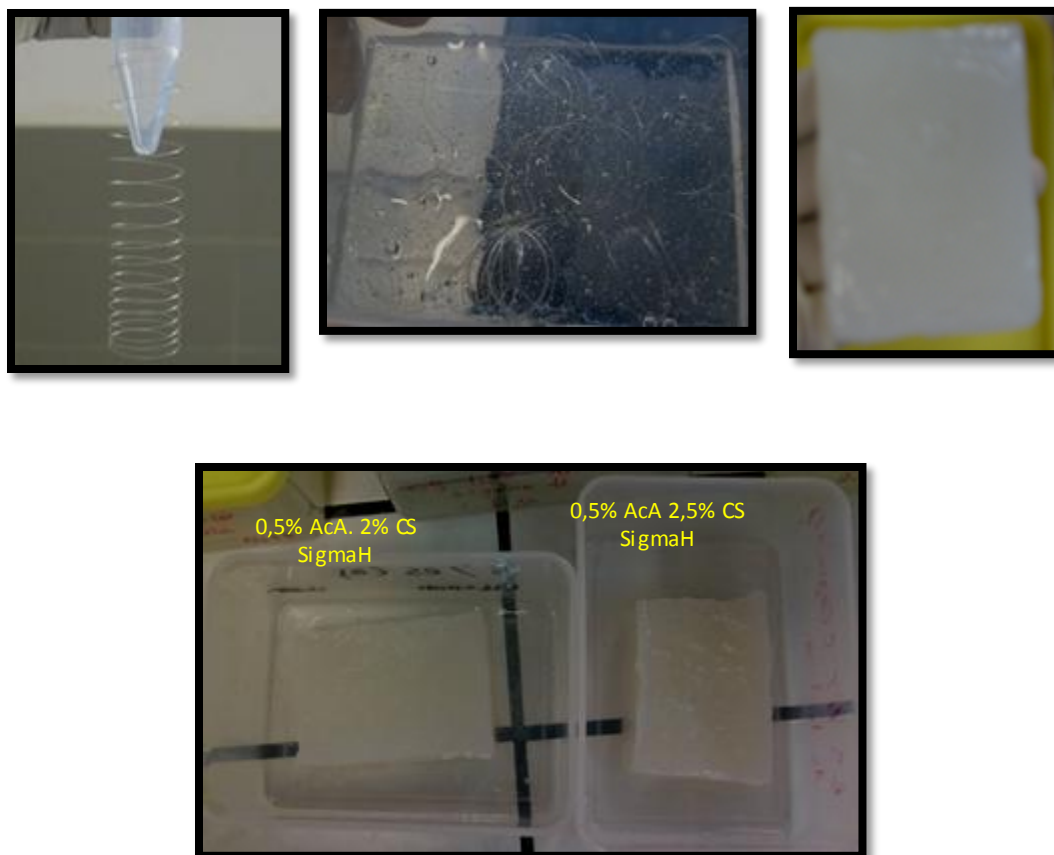


Figura 46 – Coagulação das matrizes com fibras para ET

As amostras ficaram totalmente coaguladas, rígidas e que não se dissolveram.

7.4. Liofilização das matrizes

Matrizes sem fibras

O ciclo de liofilização utilizado para as matrizes foi diferente do ciclo de liofilização utilizado para os pensos curativos, visto que, a espessura das amostras e a quantidade de solução de CS eram diferentes. As amostras foram liofilizadas com os seguintes parâmetros:

PF	Tempo = 3h
Sublimação	Rampa = 5°C/min T = -45°C
	Tempo = 0,5h
	Rampa = 0,5°C/min T = -25°C Tempo = 10h
Secagem	Rampa = 0,5°C/min T = 15 °C Tempo = 36h

Figura 47 – Parâmetros de liofilização das matrizes 3D para ET

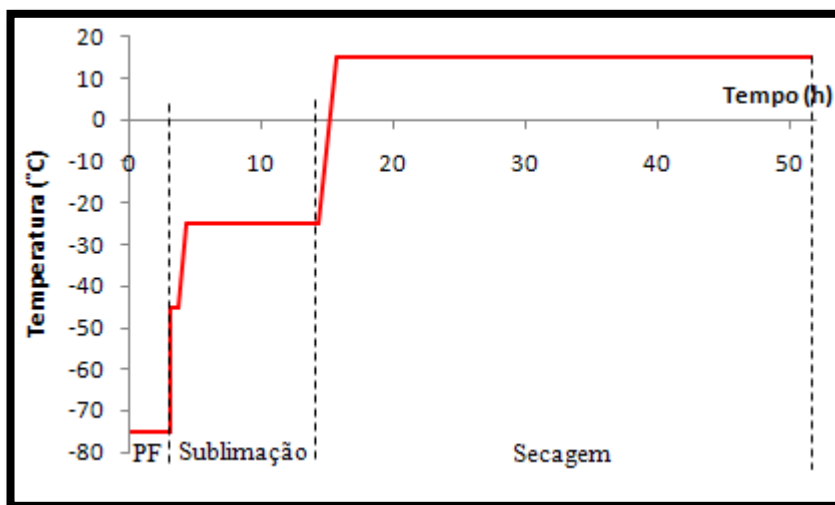


Figura 48 - Representação gráfica do ciclo de liofilização das matrizes.

Depois de terminado o ciclo da figura 48 todas as amostras ficaram bem liofilizadas, tal como se pode observar pelas imagens da figura 49.

As amostras apresentam um aspecto branco na superfície. A aparência branca em algumas partes da superfície é identificada como acetato de sódio, o que mostra que o processo de lavagem não foi eficiente para remover todo o sal.

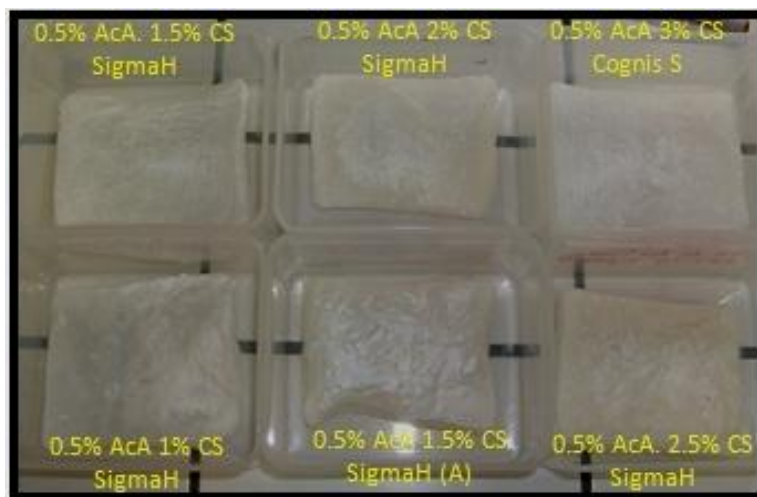
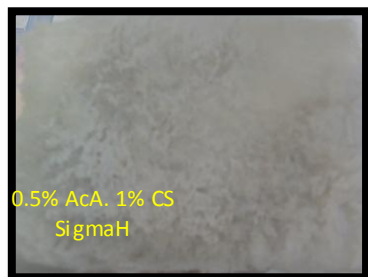
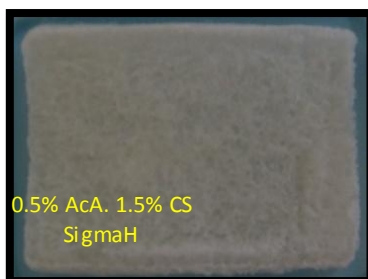


Figura 49 – Matrizes depois de liofilizadas

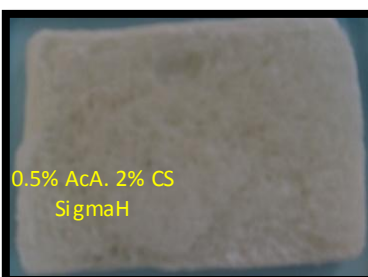
As imagens da figura 50 apresentam a parte em contacto com o molde, das matrizes sem fibras, e uma pequena descrição de aspectos visíveis:



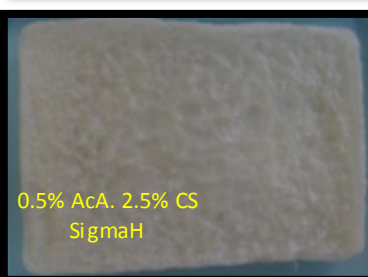
Depois de liofilizada, a amostra apresentou uma estrutura rígida e estaladiça à superfície, mas o seu interior ficou praticamente vazio. Esta amostra apresentava tendência a dissolver durante o processo de lavagem, o que deve estar relacionado com a baixa quantidade de CS na amostra.



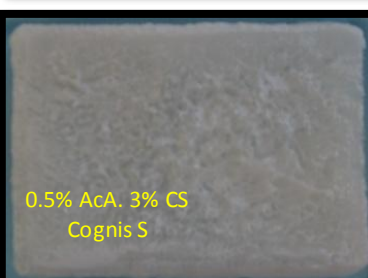
Esta matriz apresentou uma estrutura estaladiça, mas mais resistente que a amostra anterior. Em algumas partes apresentou espaços livres, o que se deverá ao processo de liofilização. A água ao ser congelada e removida deixou um espaço vazio no interior da estrutura.



Esta matriz é menos estaladiça. A olho nú apresenta-se com poros.



Matriz resistente e mais compacta que a matriz anterior



Matriz com aspecto poroso, não uniforme e de cor clara.

Figura 50 – Aspectos visíveis das matrizes depois de liofilizadas

A baixas concentrações de CS a estrutura é porosa e sem resistência mecânica. Pode-se dizer que o aumento de concentração de CS na solução torna as estruturas mais compactas. Isso porque, para o mesmo volume a quantidade de solvente é quase igual e só varia a concentração de soluto na solução, assim há mais probabilidade de encontrar CS em toda a estrutura.

Pode-se notar a diferença entre os dois tipos de CS. A matriz feita com o CS da Cognis S é mais porosa que as matrizes feitas com o CS da Sigma H.

Matrizes com fibras

Estas matrizes sofreram o mesmo ciclo de liofilização que as matrizes anteriores. No entanto, não apresentaram a cor branca à superfície (acetato de sódio) com a mesma intensidade das amostras anteriores. Isto deve-se ao facto do processo de lavagem ter sido eficiente (mais tempo de lavagem). Essas matrizes são macias e verificou-se que as fibras se depositam, presencialmente, junto a superfície do molde. Os aspectos aqui referidos estão evidenciados na figura 51.

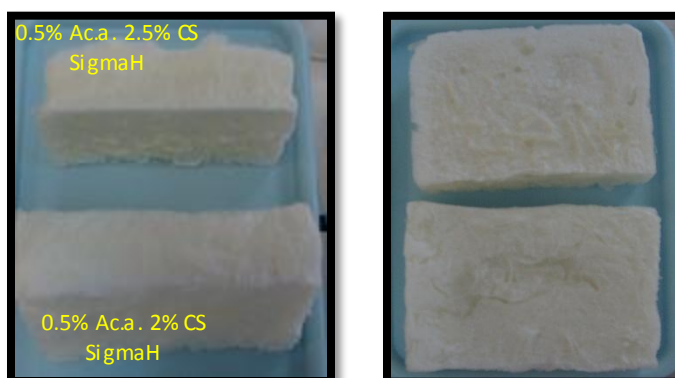


Figura 51 – Matrizes com fibras depois de liofilizadas

7.5. Testes de Inchamento

A figura 52 mostra o gráfico da variação de absorção de água com o tempo, das matrizes com fibras.

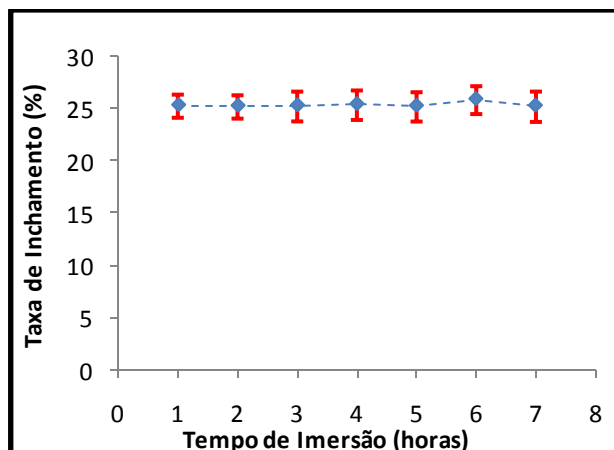


Figura 52 – Gráfico da taxa de inchamento das matrizes com fibras

Pelo gráfico pode-se ver que a taxa de inchamento máxima de, aproximadamente, 25% é atingida após 1h de imersão em água.

7.6. Esterilização

A figura 53 mostra as matrizes depois de esterilizadas.



Figura 53 – Matrizes depois de esterilizadas

Após a esterilização, a coloração das amostras alterou-se. As amostras que antes eram brancas tornaram-se amarelas. Tal facto é explicado na secção 6.3.1.4. De notar que, igualmente, se verificou a presença de acetato de sódio à superfície das amostras.

7.7. Microscopia electrónica de varrimento - SEM

As figuras 54 e 55 apresentam as imagens de SEM das matrizes sem fibras e com fibras:

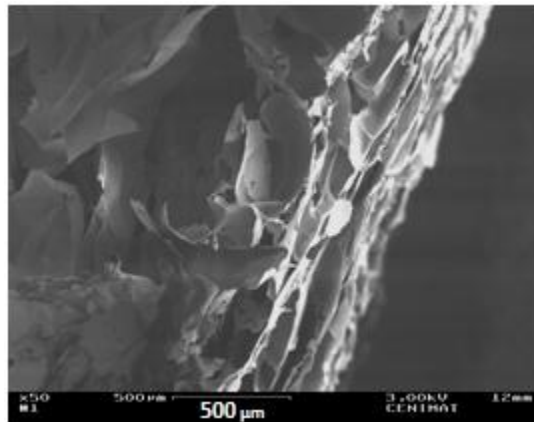


Figura 54 – Imagens de SEM das matrizes, sem fibras (2% CS Sigma H 0.5% AcA)

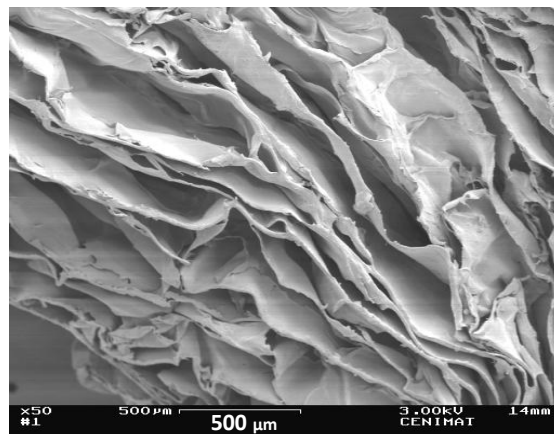


Figura 55 – Imagem de SEM das matrizes (com fibras 2%CS Sigma H 0.5% AcA)

Através das figuras 54 e 55, pode-se ver que tanto as matrizes sem fibras como as matrizes com fibras apresentam um arranjo estratificada de poros de forma tubular. O carácter direccional destes poros confere uma elevada anisotropia a estas matrizes.

8. Testes “*in vitro*” e “*in vivo*”

8.1. Teste “*in vitro*” - Teste de citotoxicidade

8.1.1. Procedimento Experimental

Na tabela 12 apresenta-se os reagentes usados nos testes “*in vitro*”.

Reagentes	
Ácido clorídrico 37% (HCl)	Fluka
Álcool isopropílico ((CH ₃) ₂ CHOH)	Labsolve
RPMI-1640 s/ fenol vermelho Solução MTT	Promega

Tabela 12 – Reagentes utilizados nos testes de citotoxicidade

Todas as amostras produzidas no âmbito deste trabalho, foram alvo dos testes “*in vivo*”, foram, igualmente, efectuadas testes em um penso não coagulado comercial (HemCon), para comparar com os resultados obtidos com os pensos LH aqui produzidos.

De acordo com a norma ISO 10993-5, a razão entre o peso da amostra e o volume de meio a utilizar é de 0,2g/ml. As amostras, por serem super absorventes, foram colocadas previamente em contacto com o meio para evitar absorção do meio de extracção durante o ensaio, de acordo com a norma ISO 10993-5.

Para os ensaios com MTT, as células da linhagem CCL 81 (células Vero) foram semeadas em meio DMEM com 5% de soro fetal bovino em placas de cultura de 96 poços. Foram semeadas 9×10^4 células por poço e incubadas a 37 °C em atmosfera húmida com 5% de CO₂ durante 24 horas. Após este período, com a monocamada confluenta de células já formada, o meio da cultura foi desprezado e adicionado o extracto que esteve em contacto com as amostras durante 24 horas a 37°C.

Foram aplicadas cinco réplicas dos extractos em testes e do controlo de células (controlo negativo: meio completo sem aditivos). No controlo positivo o número de réplicas foi de 3.

Os extractos obtidos estiveram em contacto com as células durante 24 horas a 37°C com atmosfera húmida de 5% CO₂. Foi adicionado o corante MTT, que, em presença de células viáveis, é reduzido a um produto de cor púrpura. O corante precipitado foi diluído em isopropanol e ácido clorídrico e a leitura da absorvância

foi feita a 570nm com filtro de referência de 655nm. A percentagem de viabilidade celular foi obtida com base nas leituras de absorvância e através da comparação com o controlo de células.

8.1.2. Apresentação e Discussão dos Resultados

Para o teste MTT foram obtidos os valores da Tabela 13.

Os valores de percentagem de células viáveis a negrito correspondem a cada uma das amostras e foram obtidos através da comparação com o valor do controlo negativo. Assim, para cada uma das amostras, quanto maior for a percentagem, melhor é o resultado relativamente à viabilidade celular, ou seja, estão mais próximos do valor ideal (controlo negativo).

Para a classificação atribuiu-se a letra N no caso de negativo, material não citotóxico, e P no caso de positivo, material citotóxico.

A tabela mostra os valores da percentagem de células viáveis:

Tabela 13 – Resultados obtidos para os testes MTT

Nº	Material	Percentagem de células viáveis	Classificação
1	Hidrogéis	88,11	N
2	Pensos curativos não coagulados (LH)	6,33	P
3	Pensos curativos coagulados (LP)	126,62	N
4	Matrizes 3D para ET	53,41	P
5	Penso da HemCon (LH ₂)	3,8	P

Pode-se considerar, perante os resultados obtidos, que o Hidrogel H, com alta percentagem de viabilidade, não é citotóxico.

O LH e o LH₂ (HemCon) apresentam baixas percentagens de viabilidade, logo podem ser considerados como citotóxicos. Tal facto é devido a presença de AcA nas amostras, que provoca a morte das células. Foi igualmente observado que ambas as amostras, LH e LH₂, dissolvem-se totalmente quando em contacto com o meio.

Ao contrário do LH, o LP tem uma percentagem elevada de viabilidade, ou seja não é tóxico. Isso mostra que, o AcA é totalmente neutralizado quando coagulado na solução de amónia.

A matriz com uma percentagem de viabilidade média foi considerada citotóxica. Entretanto, a citotoxicidade da amostra não é devido ao AcA, mas sim devido ao pH, dado que o AcA foi neutralizado no processo de coagulação das

matrizes com NaOH. Isso mostra, que as matrizes devem ser bem lavadas, de modo a baixar mais o pH.

8.2. Teste “*in vivo*”

Os testes decorreram no Hospital Veterinário de São Bento em Lisboa e foram realizados pelo Dr. Henrique Armes, Director Clínico do Hospital, num gato que sofreu um acidente grave, onde perdeu pele nas duas patas traseiras.

A experiência decorreu durante cerca de 15 dias e os objectivos foram fundamentalmente dois: em primeiro lugar proteger a ferida e em segundo lugar promover a cicatrização dessa ferida, nomeadamente, através de um processo designado por granulação da ferida. Os objectivos iniciais foram esses, e evidentemente, depois observou-se que sendo um penso liofilizado também poderia veicular antibiótico e portanto, aproveitou-se esse facto para concentrar naquele local uma maior quantidade de antibiótico.

A figura 56 mostra as imagens da aplicação dos pensos curativos no gato. Foram utilizados dois tipos de LH com diferentes concentrações de CS e AcA: 5% (p/p) de CS da Cognis S 2% (v/v) de AcA; 1,5% (p/p) de CS da Cognis S 0,5% (v/v) de AcA. Foram separadas duas partes, uma sem LH e outro com LH para poder comparar a evolução da cicatrização da ferida.

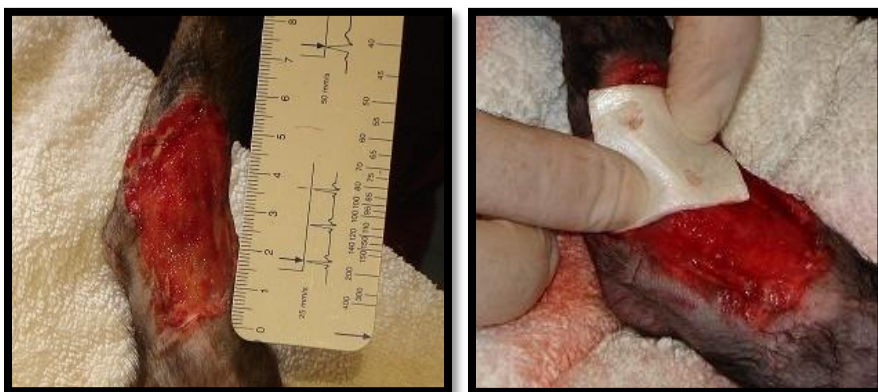


Figura 56 – Aplicação do LH na pata traseira do gato com uma ferida grave

Depois de alguns dias verificou-se que a zona onde se aplicou o penso curativo já estava em fase de granulação e apresentava maior vascularização, relativamente, à zona de controlo, o que demonstra que o processo de cicatrização foi mais célere.

Entre os LH utilizados, verificou-se que o de 1,5% (p/p) de CS Cognis S dissolveu-se mais rapidamente, pelo que, também, apresentou melhor aderência à ferida.

Nestes ensaios não foi testada a capacidade hemostática destes pensos, só é possível afirmar que os pensos aceleram os mecanismos de cicatrização das feridas e que permitem veicular e libertar o antibiótico de forma localizada e controlada.

9. Conclusão e sugestões para trabalhos futuros

9.1. Conclusão

Na caracterização do CS, surgem algumas dificuldades, nomeadamente nos resultados obtidos para o DD aquando da utilização do FTIR. Isso é devido a problemas inerentes à técnica de FTIR, tais como o traçar das linhas de base da maneira mais adequada, a influência da humidade e a sobreposição de picos importantes ([Brugnerotto, et al., 2001](#); [Henrique, 2007](#)). No futuro, tentar-se-á usar a técnica de RMN para a determinação do DD, com os inconvenientes do seu custo e disponibilidade mas com a certeza de que o resultado obtido é o mais fidedigno ([Brugnerotto, et al., 2001](#); [Rinaudo, 2006](#); [Khor, et al., 2001](#); [Henrique, 2007](#)).

Pelos resultados obtidos com o FTIR, conclui-se que o grau de desacetilação do CS da Cognis S é semelhante as do CS da Sigma H, tendo sido obtido o valor médio de 86%.

Foi utilizada a técnica mais poderosa e precisa cientificamente para determinar o peso molecular, a técnica de GPC/SEC. Esta, apesar de todos os problemas associados com o custo, disponibilidade e preparação de amostras, é aquela que é mais adequada para um resultado final fiável ([Henrique, 2007](#)).

Os resultados demonstram que o CS da Sigma H tem um peso molecular maior que o CS da Cognis S e também maior polidispersão.

O estudo reológico das soluções, feitas com o viscosímetro rotacional digital, demonstrou que o aumento da concentração do polímero provoca um aumento de viscosidade das soluções, sendo que esta foi descrita por uma lei de potência ([Lapasin, 1995](#)), as soluções se encontravam em regime concentrado.

Relativamente à caracterização dos hidrogéis conclui-se que a partir de um período de tempo de 3h as soluções de CS coagulam dentro da câmara de amónia.

Os testes de inchamento demonstraram que os hidrogéis têm tendência a inchar em soluções ácidas e a contrair em meio neutro ou básico.

O estudo dos pensos curativos, coagulados (LP) e não coagulados (LH), permitiu otimizar os parâmetros de liofilização (processo de produção), sendo

possível liofilizar os LH e os LP num período de tempo de aproximadamente 25h e 15h, respectivamente.

As imagens de SEM permitiram concluir que o tamanho dos poros varia com a variação da temperatura de liofilização. Este facto está relacionado com o processo de separação de fases ([Roh & Kwon, 2002](#)). Também se verificou que os pensos curativos não são homogéneos, no entanto, esta heterogeneidade dos LH pode ser proveitosa. Actuando como um penso, a zona mais porosa ficaria em contacto com a ferida, permitindo uma melhor absorção, e a zona menos porosa ficaria em contacto com o ar (barreira à passagem de microorganismos).

A radiação gama, apesar de ser um dos agentes utilizados para a esterilização de materiais à base de CS, apresentou influência negativa na morfologia e propriedades mecânicas dos pensos. Sendo a cisão das cadeias o fenómeno predominante, os pensos perdem resistência mecânica e tendem a dissolver-se mais, depois de esterilizados.

Os testes mecânicos demonstram que a tensão à ruptura dos LH e dos LP aumentam com a concentração de CS. Entretanto, ao contrário dos LH, a extensão à ruptura dos LP aumenta com a concentração de CS.

Os testes de inchamento, demonstraram que os LP têm grande capacidade de armazenar água na sua estrutura, e esta depende da concentração de CS. Ao contrário dos LP, os LH dissolvem quando colocadas em ambientes aquosos, sendo a sua perda de massa praticamente desprezável.

Os testes de citotoxicidade mostram que o LH é citotóxico, enquanto que o LP não é citotóxico. No entanto, apesar da sua citotoxicidade o penso curativo não coagulado (LH) foi utilizado num caso real, tendo demonstrado características benéficas para a cicatrização.

Verificou-se que o processo de liofilização pode ser usado para a produção de matrizes para a ET, cuja estrutura depende da concentração de AcA e de CS presentes nas soluções precursoras.

As imagens de SEM demonstraram que tanto as matrizes sem fibras como as matrizes com fibras apresentam um arranjo estratificada de poros de forma tubular e o carácter direccional destes poros confere uma elevada anisotropia a

estas matrizes. Estas características são essenciais na cultura de células para formação de novos tecidos ([Hideki, 1994](#)).

Embora não tenham sido feitos testes intensos das matrizes 3D com e sem fibras, abre-se uma porta para novos estudos.

9.2 Sugestões para trabalhos futuros

Face aos resultados obtidos sugerem-se como resultados futuros:

- Análise comparativa das características físicas, mecânicas e biológicas aquando do uso de diferentes tipos de CS (massa molar e grau de desacetilação), bem como do uso conjunto com outros compostos visando uma melhoria das características destes materiais;

- Estudo de minimização dos efeitos negativos aquando do uso da radiação gama como agente de esterilização em matrizes à base de CS;

- Realização de ensaios “*in vivo*” com maior número de amostras e cobaias, principalmente para os hidrogéis e os pensos curativos, determinando a capacidade de coagulação do sangue;

- Lavagem dos hidrogéis em contínuo para otimizar o processo de produção;

- Realização de testes mecânicos e testes “*in vivo*” para as matrizes 3D para

ET.

Bibliografia

- Agrawal, C. M., & Ray, R. B. (2001). *J. Biomed. Mater. Res.* 55, 141 .
- Barnes, H. A., Hutton, J. F., & Walters, K. (1989). *An introduction to rheology*. New York: Elsevier: 199.
- Boccaccini, A., Blaker, J., Maquet, V., Day, R., & Jerome, R. (2005). *Mater Sci Eng C.* 25:23–31.
- Boccaccini, A., Roether, J., L.L., H., Maquet, V., & Jerome, R. (2002). *Ceram. Eng. Sci. Proc.* 23(4) , pp. 805-816.
- Brugnerotto, J., Lizardi, J., Goycoolea, F. M., Argüelles-Monal, W., Desbrières, J., & Rinaudo, M. (2001). *Polymer*, 42, pp. 3569-3580.
- Candido, L. (2001). *Nova abordagem no tratamento de feridas*. São Paulo: Editora Senac.
- Castro, A. J. (1981). *Patente N.º 4,247,498* . U.S.
- Chen, L. J., & Wang, M. (2002). *Biomaterials* 23, 2631.
- Chip ITN. (2006). *ChipKompendium* . Portugal.
- Coates, J. (2000). *Encyclopedia of analytical chemistry* , pp. 10815-10837.
- Domard, A., & Rinaudo, M. (1983). *International J. Biological Macromolecules*, 5 , pp. 49-52.
- Dornish, M., Kaplan, D., & Skaugrud, O. (2001). *Ann NYAcad Sci.* 944:388.
- Enciclopédia(a). (2 de Agosto de 2008). Obtido em 10 de Setembro de 2008, de <http://en.wikipedia.org/wiki/Chitosan>
- Enciclopédia(b). (5 de Maio de 2008). Obtido em 27 de Maio de 2008, de http://en.wikipedia.org/wiki/Freeze_drying
- Enciclopédia(c). (2 de Outubro de 2008). Obtido em 19 de Outubro de 2008, de <http://pt.wikipedia.org/wiki/Cromatografia>
- Enciclopédia(d). (13 de Março de 2008). Obtido em 18 de Maio de 2008, de http://en.wikipedia.org/wiki/Scanning_electron_microscope
- Fabiani, J., Dreyfus, G. M., Jourdan, J., Aupart, M., Latremouille, C., Chardigny, C., et al. (1995). *The autologous tissue cardiac valve*. Elsevier B.V. , pp. 60:189 –194.
- Freshney, R. (1989). *Animal cell culture – A practical approach*. IRL Press, p. 329.
- Geeson, J., & Berg, R. (1991). *Biochemistry of skin, bone and cartilage*. In: Gasgold, A.I. e Silver, F.H.: CRC Press, Boca Raton, FL.
- Gomes, M. E., Ribeiro, A. S., Malafaya, P. B., Reis, R. L., & Cunha, A. M. (2001). *Biomaterials*. 22, 883 .
- Gross, K., & Rodriguez, L. L. (2004). *Biomaterials* 25, 4995-4962 .

- Gu, Z. Y., Xue, P. H., & Li, W. J. (2001). *Polym. Adv. Technol.*, 12 , pp. 665–669.
- Hence, L. (1991). *Bioceramics: From concept to clinic. J. Am. Ceram. Soc.*, 74 n^o7 , pp. 1487-1510.
- Henrique, M. M. (2007). *Grau de Mestrado em Eng. de Materiais* , p. 69.
- Hideki, A. (1994). *Medical applications of hydroxyapatite. Ishiyaku Euroamerica. Inc. Tokyo, St Louis.*
- Hojo, M., Inokuchi, S., Kidokoro, M., Fukuyama, N., Tanaka, E., Tsuji, C., et al. (2003). *Plast. Reconstr. Surg.* 111, 1638.
- Hua, F. J., Kim, G. E., Lee, J. D., Son, Y. K., & Lee, D. S. (2002). *Biomed Mater Res (Appl Biomater)*, 63, 161 .
- Hutchinson, F. (1961). *Science*, v.134 , p. 533.
- Hutmacher, D. (2000). *Biomaterials*,21, 2259.
- Ignatius, A., Blessing, H., Liedert, A., Schmidt, C., Neidlinger-Wilke, C., & Kaspar, D. (2005). *Biomaterials*, 26:311–8 .
- IshaughRiley, S. L., Crane, G. M., Gurlek, A., Miller, M. J., Yasko, A. W., Yaszemski, M. J., et al. (1997). *J. Biomed. Mater. Res.* 36, 1.
- Ji, H., & Marquis, P. (1993). *Jornal of Bone and Joint Surgery-American.* pp. 68:912-919.
- Khor, E. (2001). *Chitin: fulfilling a biomaterials promise. London: Elsevier* , pp. 6, 313-317.
- Khor, E., & Lim, L. (2003). *Biomaterials*, 24 , pp. 2339-2349.
- Khurma, J. R., Rohindra, D. R., & Nand, A. V. (2006). *Jornal of Macromolecular Science, Part A: Pure and Applied Chemistry*, v. 43, , pp. 749-758.
- Knauer, H. (2007). *Smartline RI Detector Manual. Germany.*
- Kneser, D. J., Munder, B, Klemt, C., Andree, C., & Stark G. B. (2002). *Min. Invas. Ther. Allied Technol*, 11,107 .
- Kostopoulos, L., & Karring, T. (1994). *Oral Implants Res.* 5, 75.
- Kumar, A., Varadaj, M., Lalitha, R., & Tharanathan, R. (2004). *Biochimica et Biophysica Acta*,1670:137-146 .
- Kurita, K. (2001). *Prog. Polym. Sci.*, 26, 1921-1971.
- Labconco. (2007). *User's Manual of Freeze Dry System.*
- Lai, L., & Chiang, H. (2002). *Rheology of decolorized hsian-tsaο leaf gum in the dilute domain* , pp. 16:427-440.
- Lamarque, G., Viton, C., & Domard, A. (2004). *Biomacromolecules*, 5 , pp. 992-1001.

- Langer R. (1999). *J Control Release* , 62:7-11.
- Langer, R., & Vacanti, J. P. (1993). *Science* 260, 920 .
- Lapasin, R. P. (1995). In *Rheology of industrial polysaccharides theory and applications*, Blackie Academic.
- Legeros, R. Z. (2002). *Clin. Orthop. Relat. Res.* 395, 81.
- Leong, K. F., Cheah, C. M., & Chua, C. K. (2003). *Biomaterials*, 24, 3262.
- Levenberg, S., & Langer, R. (2004). vol. 61. New York: Academic Press; pp. 113–134.
- Li, C., & Khon, J. (1989). *Macromolecules* 22, 2029.
- Liu, L. S., Thompson, A. Y., Heidaran, M. A., Poser, J. W., & Spiro, R. C. (1999). *Biomaterials*. 20, 1097.
- Lloyd, D. R., Kim, S. S., & Kinzer, K. E. (1991). *J Membr Sci* 64, 1.
- Lu, H., Amin, S., Scott, K., & Laurencin, C. (2003). *J. Biomed. Mater. Res.* 64A(3), 465-474 .
- Ma, P., & Zhang, R. (2001). *J Biomed Mater Res* 56:469–77.
- Madhally, S., & Matthew, H. (1999). *Biomaterials* 20:1133–42.
- Malette, W. (1983). *Annals of Thoracic Surgery*, v.36 , p. 55.
- Mano, J., Sousa, R., Boesel, L., Neves, N., & Reis, R. (2004). *Bioinert, biodegradable and injectable polymeric matrix composites for hard tissue replacement. Compos Sci Technol* , pp. 64:789–817.
- Maquet, V., & Jerome, R. (1997). *Sci. Forum*, 250, 15.
- Marcelo, O. (21 de Setembro de 2008). Obtido em 18 de 10 de 2008, de http://www.tecnologiaradiologica.com/materia_radioesterilizacao.htm
- Matthew, S. V., & Madhally, H. W. (1999). *Biomaterials*, 20, 1133– 1142 .
- McCaryhy, J., Gregory, W. K., Wiesmann, P., & Campbell, D. (2008). Patente N.º US007371403B2. US.
- Michael, J. C. (2007). *Journal of Materials Chemistry* , pp. 667-674.
- Mooney, D. J., Baldwin, D. F., Suh, N. P., Vacanti, J. P., & Langer, R. (1996). *Biomaterials*, 17, 1417.
- Peppas, N. (1991). *Jornal of bioactive and Compatible Polymers*, v. 6 , pp. 241-246.
- Pulapuram, S., Li, C., & Khon, J. (1990). *Biomaterials* 11, 666.
- Ratner, B., Hoffman, A., Schoen, F., & Lemons, J. (1996). *An introduction to materials in medicine. Biomaterials science*, Academic Press, London, p. 484.

- Reis, R. L., & Cunha, A. M. (1995). *J. Mater. Sci.: Mater. Med.* 6, 786.
- Rinaudo, M. (2006). *Prog. Polym. Sci.*, 31, 603-632.
- Roh, I. J., & Kwon, I. C. (2002). *J. Biomater. Sci., Polym. Ed.*, 13, 769– 782.
- Rossi, L. F., Costa, E., Bergamasco, E., & Camargo, C. (2003). *Prevenção de queimaduras. Revista Latino Americana de Enfermagem v.11, n.1* , pp. 36-42.
- Sanders, S. (14 de Novembro de 2007). *Obtido em 18 de 10 de 2008, de http://www.cenat.com.br/conteudo_informes.html*
- Santos, J. (2001). *Tese de Doutorado –Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas* , p. 150.
- Shantz, J. T., Hutmacher, D., Ng, K., Khor, H. L., Lim, T. C., & Teoh, S. H. (2002). *Int. J. Oral Maxillof. Implant.* 17, 161.
- Sirola, K. (1980). *Ann Med Exp Biol Fenn.* , pp. 38: 1-87.
- Skiers, W. (1980). *Radiation Physics and Chemistry*, v.15 , pp. 47-57.
- Taboas, J., Maddox, R., Krebsbach, P., & Hollister, S. (2003). *Biomaterials* 24(1), 181-194 .
- Tolaimate, A., Desbrieres, J., Rhazi, M., & Alagui, A. (2003). *Polymer*, 44, 7939.
- Uhrich, K. E., Ibim, S. E., Larrier, D. R., Langer, R., & Laurencin, C. T. (1998). *Biomaterials* 19, 2045.
- VandeVord, P., Matthew, H., DeSilva, S., Mayton, L., & Wu, B. (2002). *J Biomed Mater Res.* p. 59:58.
- Washburn, N. R., & Simon, C. G. (2002). *J. Biomed. Mater. Res.* 60, 20.
- Xiong, Z., Yan, Y., Wang, S., Zhang, R., & Zhang, C. (2002). *Scripta Materials* 46(11), 771 -776.
- Xu, H., Quinn, J., Takagi, S., & Chow, L. (2004). *Biomaterials.* 25:1029–37 .
- Yao, J., Radin, S., Leboy, P., & Ducheyne, P. (2005). *Biomaterials* 26:1935–43.
- Yong, L., & Khor, E. (2001). *Development of Chitin/Chitosan based wound dressings. Departamento de Farmácia e Química, Universidade de Singapura.*
- Zhao, F., Yin, Y., Lu, W., Leong, J. C., Zhang, W., Zhang, J., (2002). *Biomaterials*, 23, 3227.

Anexos

Utilização do liofilizador

A figura 57 mostra a posição do liofilizador e da bomba de vácuo. É importante que a montagem do sistema esteja bem-feita, desde a conexão dos tubos, para evitar a fuga e entrada de ar, à ligação dos fios. O liofilizador é equipado com um microprocessador que permite programar manual, ou automaticamente a temperatura.



Figura 57 – O Liofilizador e a bomba de vácuo usadas neste trabalho.

Painel de Controlo do liofilizador



Figura 58 – Painel de controlo do liofilizador

1. LCD
2. Botão do LCD
3. Indicadores do LCD
4. Indicador do alarme
5. Defrost
6. Vácuo
7. Botão para baixar
8. Botão para subir
9. Botão *Enter*
10. Botão de selecção do Modo Automático ou Manual
11. Indicador do Modo
12. Botão de Início / Paragem
13. Indicador de Início / Paragem
14. *Stoppering*
15. Libertação do vácuo
16. Back Fill

Controlo automático

O liofilizador é equipado com um microprocessador que permite programar temperaturas, usando seis segmentos. O primeiro segmento é o pré-freeze com acerto automático em “Max Cold” e um tempo ajustável de 3 horas a 99,9 horas ou indefinido. Os outros cinco segmentos consistem em uma função da temperatura rampa (Rampa) e uma função de temperatura de estabilização (Hold).

Existem cinco programas, com seis segmentos cada, que podem guardar os dados. A rampa permite aumentar ou diminuir a temperatura da amostra a qualquer taxa desejada dentro da capacidade de aquecimento e resfriamento do sistema.

O liofilizador sem amostras é capaz de arrefecer a uma taxa de aproximadamente $0.5^{\circ}\text{C}/\text{minuto}$ desde 50°C a 0°C a $0.25^{\circ}\text{C}/\text{minuto}$ desde 0 a -55°C , e pode aquecer $3^{\circ}\text{C}/\text{minuto}$ aproximadamente. A temperatura *Hold* pode ser ajustada de qualquer forma desde $+50^{\circ}\text{C}$ a -50°C com 1°C de incremento. O tempo *Hold* é ajustado em horas. Quando a temperatura desejada é alcançada, a função *Hold* manterá a temperatura durante o tempo programado. O microprocessador tem na sua memória o último programa introduzido para permitir o protocolo idêntico para ser repetido sempre que se inicia um novo ciclo.

Protocolo

Este protocolo (ou, instruções de trabalho) corresponde a um conjunto de operações que devem ser feitas antes e depois do ciclo de liofilização:

- ✓ Ligar o interruptor do sistema colocando-o na posição “ON”.
- ✓ Pressionar o botão “DISPLAY” até o indicador “AUTO” acender.
- ✓ Escolher um dos cinco programas (P1 a P5) pressionando os botões ↑ e ↓.
- ✓ Pressiona “ENTER” para alterar o parâmetro.

P1	SEG 1	RAMP	0.0°C/min
HOLD	-25°C	TIME	00.0
- ✓ Pressionar o botão “MODE” e seleccionar “AUTO”.
- ✓ Colocar as amostras dentro da câmara.
- ✓ Fechar a porta da câmara.
- ✓ Verificar se o botão “Stoppering Control” encontra-se na posição “RAISED” e o botão “Vacuum Release” na posição “CLOSED”.
- ✓ Verificar o nível do óleo na bomba de vácuo.
- ✓ Verificar se as válvulas de amostras estão fechadas.
- ✓ Pressionar o botão “RUN/STOP” para iniciar o ciclo.
- ✓ No fim do ciclo o programa pára automaticamente
- ✓ Colocar o botão “Vacuum Release” na posição “OPEN” para libertar o vácuo.
- ✓ Pressionar o botão “VAC” para desactivar a bomba de vácuo.
- ✓ Abrir a porta do liofilizador quando a pressão na câmara estiver alta, “VAC=hi”.
- ✓ Remover os frascos com as amostras da prateleira.
- ✓ Pressionar o botão “DEFROST” para remover o gelo acumulado no colector.
- ✓ Pressionar o botão “RUN/STOP” ou “DEFROST” para parar o programa depois de o gelo estar removido do colector.
- ✓ Pressionar o interruptor para fechar o sistema, “OFF”.
- ✓ Limpar o interior da câmara com um pano macio para remover qualquer humidade ou fragmentos.

- ✓ Verificar o tubo de drenagem do colector e assegurar que o tubo está sem humidade.
- ✓ Usando um pano macio limpar a porta para remover qualquer contaminação ou impureza que poderá causar fuga de ar.



Figura 60 - Tubo drenagem do colector.



Figura 59 - Limpeza e remoção de impurezas

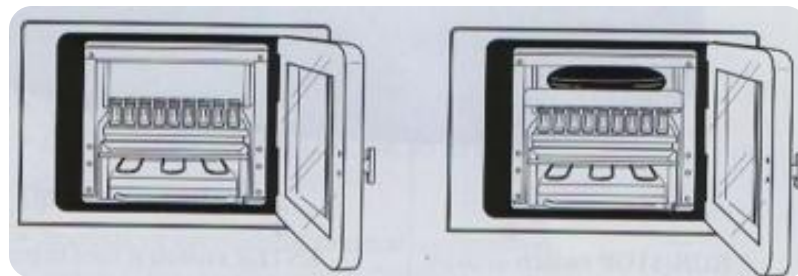


Figura 61 - *Stoppering Control*