



**Valdir Alexandre Câncio David Braga Tavares**

Licenciatura em Ciências de Engenharia Biomédica

**Matrizes de Policaprolactona e Quitosano para  
aplicação em Engenharia de Tecidos**

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em  
Engenharia Biomédica

Orientador: José Luís Ferreira, Professor Auxiliar, FCT-UNL  
Co-orientador: Jorge Carvalho e Silva, Professor Auxiliar, FCT-UNL  
Co-orientador: Célia Reis Henriques, Professora Auxiliar, FCT-UNL  
Co-orientador: João Paulo Borges, Professor Auxiliar, FCT-UNL

Júri:

Presidente: Professor Doutor Mário António Basto Forjaz Secca  
Arguente: Professora Doutora Maria Marise Simões de Almeida  
Vogal: Professor Doutor José Luís Constantino Ferreira  
Vogal: Professor Doutor Jorge Alexandre Monteiro Carvalho Silva



FACULDADE DE  
CIÊNCIAS E TECNOLOGIA  
UNIVERSIDADE NOVA DE LISBOA

Setembro de 2011

# **Matrizes de Policaprolactona e Quitosano para aplicação em Engenharia de Tecidos**

©2011 - Todos os direitos reservados. Valdir Alexandre Câncio David Braga Tavares.  
Faculdade de Ciências e Tecnologia. Universidade Nova de Lisboa.

A Faculdade de Ciências e Tecnologia e a Universidade Nova de Lisboa têm o direito, perpétuo e sem limites geográficos, de arquivar e publicar esta dissertação através de exemplares impressos reproduzidos em papel ou de forma digital, ou por qualquer outro meio conhecido ou que venha a ser inventado, e de a divulgar através de repositórios científicos e de admitir a sua cópia e distribuição com objectivos educacionais ou de investigação, não comerciais, desde que seja dado crédito ao autor e editor.

## Agradecimentos

Quero expressar, ainda que seja por poucas palavras, a minha gratidão às pessoas que me ajudaram a concluir esta fase da minha vida.

Aos meus orientadores, Professor José Luís Ferreira, Professor Jorge Carvalho Silva, Professora Célia Henriques e Professor João Paulo Borges quero agradecer a oportunidade de realizar este projecto e à constante disponibilidade demonstrada. Um agradecimento especial ao Professor Jorge Carvalho Silva pela sua atitude didáctica comigo ao longo destes anos e ao Professor José Luís Ferreira, porque não podia ter tido melhor orientador. Ser-me-ão sempre exemplos do que devem ser Professores.

Ao Instituto Tecnológico e Nuclear, ao Professor João Sottomayor e ao senhor José Carlos Mesquita da Faculdade de Ciências e Tecnologia, à Professora Alexandra Fernandes e a Mestre Ana Silva da Universidade Lusófona, muito obrigado pela contribuição. Ao Professor Paulo Limão-Vieira, estou agradecido pela permanente disponibilidade. Ao Professor Mário Secca agradeço a amizade e compreensão. Aos Professores que me marcaram durante o curso, obrigado pela formação académica e humana.

Aos meus colegas do Grupo de Tecidos, obrigado por me receberem bem e terem ajudado (um abraço especial ao João Martins, um verdadeiro companheiro).

Aos meus amigos: o vosso constante interesse e incentivo não serão esquecidos. Ao “meu pessoal da garagem”, melhor amiga, Pedro e André, este trabalho também é vosso.

Aos “BBS: Francisco, Louis, Dário, Vidinha, David, Vítor, Pedro, Henrique” e ao Daniel que abraçou outro projecto académico mas que também pertence a esta família, quero dizer-vos que é com orgulho que estudei ao vosso lado. A todos os meus outros colegas de curso: não me esqueço destes anos maravilhosos e partilhados.

A ti... não tenho de agradecer... nem tenho palavras pois não são precisas. És a minha razão e estou contigo. Para sempre.

Quero que a vossa força seja a minha. Graças a vocês eu estou aqui. Deram a vossa vida, e continuam a dar, por mim e pelos meus irmãos: Obrigado Pai e Mãe. Aos meus irmãos, Helder e Valter, obrigado por tudo, estaremos sempre juntos! Primos Cecília e Júlio, a minha profunda estima e gratidão. O vosso altruísmo e dedicação não têm preço. À minha avó, que está longe, um beijo de eterna saudade e amor para quem ajudou a criar-me.

Obrigado!

## Resumo

A engenharia de tecidos dedica-se ao desenvolvimento de estruturas biocompatíveis e biodegradáveis que substituem tecidos humanos de forma temporária e que suportem a regeneração celular necessária à reconstrução natural do tecido.

As membranas de biopolímeros têm-se revelado promissoras na produção de substitutos de pele humana, dado haver a possibilidade de controlo da sua composição e consequentemente das suas características de biocompatibilidade, biodegradação e de apetência para se constituírem como base para a adesão e proliferação celular.

Este trabalho visou a produção de membranas de policaprolactona (PCL) e quitosano (CS) e avaliar a proliferação celular nestas membranas. O PCL é um polímero sintético elástico e o CS é um polímero natural que favorece a adesão celular. A combinação destes dois polímeros permite obter membranas que possuem simultaneamente estas características.

A produção das membranas de PCL e CS foi realizada através da incorporação do CS em pó nas membranas de PCL obtidas por electrofiação (*electrospinning*). Neste processo, a acumulação aleatória das fibras sobre um colector permite obter uma estrutura tridimensional muito semelhante à da matriz extracelular natural dos tecidos humanos.

Foram efectuadas experiências que permitiram aferir as condições adequadas para a produção das fibras de PCL por electrofiação. Foram produzidas membranas com CS de diferente granulometria e com várias proporções entre o PCL e o CS que foram sujeitas a testes mecânicos, determinação do ângulo de contacto e porosidade com vista à caracterização das suas propriedades físico-químicas.

Os testes de cultura celular revelaram alguma dificuldade na adesão das células às matrizes. Para promover uma maior adesão e proliferação celular há que optimizar o método de incorporação de CS, aumentando a sua densidade na superfície das membranas ou tratando a superfície de modo a torná-las hidrofílicas.

O trabalho realizado durante esta dissertação constitui mais um contributo para o desenvolvimento de substitutos de pele humana.

**Palavras-chave:** regeneração de tecidos; matrizes biodegradáveis e biocompatíveis; policaprolactona e quitosano; electrofiação.

# Abstract

Tissue engineering concerns the development of bio-compatible and bio-degradable structures which will temporarily replace human tissue and at the same time support the needed cellular regeneration for the natural tissue reconstruction.

The membranes of bio-polymers have been revealing promising regarding the production of human skin substitutes, furthermore because there is the possibility of not only controlling this composition but also its bio-compatible, bio-degradable and capacity features to constitute themselves a basis of adhesion and cellular proliferation as well.

The aim of this project was to produce polycaprolactone (PCL) and chitosan (CS) membranes and to assess the cellular proliferation in them. While PCL is an elastic synthetic polymer, CS is a natural polymer that helps the cellular adhesion. When these two polymers are combined together, the resulting membranes possess these features simultaneously.

The production of PCL and CS membranes was accomplished by the embedding of CS particles in PCL membranes obtained by electrospinning. In this procedure, the random accumulation of fibers over a collector allows us to obtain a rather similar three-dimensional structure to the natural extra-cellular matrix of human tissue.

Experiments were accomplished in order to gauge the ideal conditions to produce PCL fibers by electrospinning (namely: the PCL concentration; the amount of polymeric solution, the electric tension to be applied to the polymeric solution and the due distance to collect the fibers). Membranes with CS of different granulometry and with various proportions between PCL and CS were produced. These membranes were submitted to several experiments in order to characterize their physical and chemical properties.

The cell culture tests revealed sedimentation of cells in the peripheral part of the membranes, which confirmed its hydrophobicity. To promote a greater cell proliferation it is necessary to optimize the method of CS incorporation, increasing its density at the surface of the membranes or to increase the hidrofilycity of the fibers by treating their surfaces.

The work performed during this dissertation constitutes a further contribute to the development of human skin substitutes.

**Keywords:** Tissue regeneration; bio-degradable and bio-compatible matrix; polycaprolactone and chitosan; electrospinning.

# Índices

<b>AGRADECIMENTOS</b>	<b>II</b>
<b>RESUMO</b>	<b>III</b>
<b>ABSTRACT</b>	<b>IV</b>
<b>ÍNDICE DE MATÉRIAS</b>	<b>VI</b>
<b>ÍNDICE DE FIGURAS</b>	<b>VIII</b>
<b>ÍNDICE DE TABELAS</b>	<b>XI</b>

## Índice de matérias

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	<b>1</b>
1.1	OBJECTIVOS .....	1
1.2	Sumário .....	3
<b>2</b>	<b>FUNDAMENTOS</b> .....	<b>4</b>
2.1	POLÍMEROS .....	4
2.1.1	Policaprolactona .....	5
2.1.2	Quitina e Quitosano.....	6
2.2	Métodos de mistura PCL/CS e aplicações .....	7
2.3	Técnicas de produção de matrizes: <i>electrospinning</i> .....	8
2.4	Parâmetros de controlo no <i>electrospinning</i> .....	9
2.4.1	Parâmetros associados à solução polimérica.....	10
2.4.2	Parâmetros de produção .....	11
2.4.3	Parâmetros ambientais.....	12
<b>3</b>	<b>MATERIAIS E METODOLOGIA</b> .....	<b>13</b>
3.1	Montagem para produção de substratos de PCL .....	13
3.2	Preparação das soluções poliméricas e do quitosano .....	14
3.2.1	Policaprolactona.....	14
3.2.2	Quitosano .....	14
3.3	Ensaio de tracção .....	15
3.4	Hidrofilicidade .....	17
3.5	Porosidade .....	18
3.6	Testes de cultura celular .....	19
<b>4</b>	<b>Resultados e discussão</b> .....	<b>21</b>
4.1	Parametrização da produção de membranas de PCL .....	21
4.1.1	Variação da distância entre agulha e colector .....	21

4.1.2	Varição do caudal, tensão e concentração .....	22
4.2	Proporção de policaprolactona e quitosano nas membranas .....	28
4.3	Membranas de policaprolactona e quitosano .....	29
4.3.1	Morfologia.....	30
4.3.2	Caracterização mecânica - ensaios de tracção.....	33
4.3.3	Caracterização físico-química - hidrofiliçidade .....	37
4.3.4	Caracterização morfológica - porosidade.....	39
4.4	Testes de cultura celular .....	40
<b>5</b>	<b>Conclusões e Perspectivas.....</b>	<b>44</b>
	<b>Bibliografia .....</b>	<b>46</b>

## Índice de figuras

Figura 1.1- (a) Imagem SEM de uma matriz de PCL, com CS incorporado, produzidas por electrofiação; (b) Fibroblastos envoltos por uma rede de fibras de colagénio [1]. ....	2
Figura 2.1- Cadeia principal da policaprolactona. ....	5
Figura 2.2- Esquema de hidrólise do Poliéster. ....	6
Figura 2.3- Copolímero de quitina/quitosano: (a) Fração da unidade N-glucosamina; (b) Fração da unidade N-acetil-glucosamina. ....	7
Figura 2.4- Esquema simbólico de um sistema de electrofiação. ....	9
Figura 3.1- Esquema da montagem do sistema de electrofiação: 1) Bomba dispensadora; 2) Fonte de alta tensão; 3) Colector; 4) Seringa e ligação eléctrica. ....	13
Figura 3.2- Gráfico da tensão em função da deformação de um material polimérico. ....	16
Figura 3.3- (a) Equipamento dos testes de tracção; (b) tracção de uma amostra; ....	16
Figura 3.4- (a) Esquema da formação do ângulo de contacto; (b) Sistema CAM 100; (c) <i>software</i> do sistema: manipulação de imagem e medição do ângulo. ....	17
Figura 4.1- Concentração de PCL: 15 %. Tensão aplicada: 12 kV. Caudal: 0,6 mL/h. Ampliação 10x. Distância entre agulha e colector: (a) 15 cm; (b) 20 cm; (c) 25 cm. ....	22
Figura 4.2- Concentração de PCL: 7 %. Tensão aplicada: 10 kV. Ampliação 10x. Caudal: (a) 0,4 mL/h; (b) 0,6 mL/h. ....	23
Figura 4.3- Concentração de PCL: 7 %. Tensão aplicada: 12 kV. Ampliação 10x. Caudal: (a): 0,4 mL/h; (b) 0,6 mL/h. ....	24
Figura 4.4- Concentração de PCL: 7 %. Tensão aplicada: 14 kV. Ampliação 10x. Caudal: (a) 0,4 mL/h; (b) 0,6 mL/h. ....	24
Figura 4.5- Concentração de PCL: 10 %. Tensão aplicada: 10 kV. Ampliação 10x. Caudal: (a) 0,4 mL/h; (b) 0,6 mL/h. ....	25
Figura 4.6- Concentração de PCL: 10 %. Tensão aplicada: 12 kV. Ampliação 10x. Caudal: (a) 0,4 mL/h; (b) 0,6 mL/h. ....	25
Figura 4.7- Concentração de PCL: 10 %. Tensão aplicada: 14 kV. Ampliação 10x. Caudal: (a) 0,4 mL/h; (b) 0,6 mL/h. ....	26
Figura 4.8- Concentração de PCL: 15 %. Tensão aplicada: 10 kV. Ampliação 10x. Caudal: (a) 0,4 mL/h; (b) 0,6 mL/h. ....	26
Figura 4.9- Concentração de PCL: 15 %. Tensão aplicada: 12 kV. Ampliação 10x. Caudal: (a) 0,4 mL/h; (b) 0,6 mL/h. ....	27

Figura 4.10- Concentração de PCL: 15%. Tensão aplicada: 14kV. Ampliação 10x. Caudal: (a) 0,4 mL/h; (b) 0,6 mL/h. ....	27
Figura 4.11- Matrizes de PCL com grãos de CS incorporado.....	31
Figura 4.12- Imagens SEM de grãos de quitosano incorporados em diferentes proporções numa matriz de nanofibras de policaprolactona: (a) Amostra 1, ampliação x200; (b) Amostra 2, ampliação x500; (c) Amostra 3, ampliação x200; (d) Amostra 4, ampliação x100; (e) Amostra 5, ampliação x200; (f) Amostra 6, ampliação x100; (g) Amostra 7, ampliação x100.....	32
Figura 4.13- Gráfico da tensão em função da deformação; Amostra 1- PCL:CS 1:1, peneira 100.....	33
Figura 4.14- Gráfico da tensão em função da deformação; Amostra 2- PCL:CS 1:0, peneira 200.....	34
Figura 4.15- Gráfico da tensão em função da deformação; Amostra 3- PCL:CS 3:1, peneira 200.....	34
Figura 4.16- Gráfico da tensão em função da deformação; Amostra 4- PCL:CS 3:2, peneira 200.....	34
Figura 4.17- Gráfico da tensão em função da deformação; Amostra 5- PCL:CS 1:1, peneira 200.....	35
Figura 4.18- Gráfico da tensão em função da deformação; Amostra 6- PCL:CS 1:3, peneira 200.....	35
Figura 4.19- Gráfico da tensão em função da deformação; Amostra 7- PCL:CS 1:1, peneira 300.....	35
Figura 4.20- Gráfico dos módulos de Young das membranas de PCL e CS com granulometria de 200 $\mu\text{m}$ e com concentrações de CS crescentes em relação ao PCL (Amostras 2 a 6, respectivamente).....	36
Figura 4.21-Gráfico dos módulos de Young das membranas de PCL e CS na proporção de 1:1 com granulometrias de 100, 200 e 300 $\mu\text{m}$ (Amostras 1, 5 e 7, respectivamente). ....	37
Figura 4.22- Gráfico dos ângulos de contacto das matrizes de PCL e CS com granulometria de 200 $\mu\text{m}$ e com concentrações de CS crescentes em relação ao PCL.....	38
Figura 4.23- Gráfico dos ângulos de contacto das matrizes de PCL e CS na proporção de 1:1 com granulometrias de 100, 200 e 300 $\mu\text{m}$ (Amostras 1, 5 e 7, respectivamente). ....	39
Figura 4.24- Microscopia confocal de cultura celular: a) controlo positivo; b) Matriz PCL:CS 3:1. ....	41
Figura 4.25- Microscopia confocal composta, Granulometria 200 $\mu\text{m}$ : a) Matriz PCL: CS 1:0; b) Matriz PCL: CS 3:1; (c) Matriz PCL: CS 1:3.....	42

Figura 4.26- Microscopia confocal composta: a) Matriz PCL: CS 1:1, granulometria 100  $\mu\text{m}$ ; b) Matriz PCL: CS 1:3, granulometria 200  $\mu\text{m}$ ; c) PCL: CS 1:1, granulometria 300  $\mu\text{m}$ ..... 43

## Índice de tabelas

Tabela 4.1- Concentrações de PCL na solução polimérica. ....	23
Tabela 4.2-Massa de PCL na membrana em função do tempo de deposição .....	28
Tabela 4.3- Massa de CS dispensada em função da área da peneira.....	29
Tabela 4.4- Proporções PCL: CS. ....	29
Tabela 4.5- Condições de obtenção das membranas e correspondente espessura.....	30
Tabela 4.6- Diâmetro das membranas.....	33
Tabela 4.7- Módulos de Young das membranas de PCL e CS com granulometria de 200 µm e com concentrações de CS crescentes em relação ao PCL (Amostras 2 a 6, respectivamente). ....	36
Tabela 4.8- Módulos de Young das membranas de PCL e CS na proporção de 1:1 com granulometrias de 100, 200 e 300 µm (Amostras 1, 5 e 7, respectivamente). ....	36
Tabela 4.9- Ângulo de contacto das matrizes de PCL e CS com granulometria de 200 µm e com concentrações de CS crescentes em relação ao PCL.....	38
Tabela 4.10- Ângulo de contacto das matrizes de PCL e CS na proporção de 1:1 com granulometrias de 100, 200 e 300 µm (Amostras 1, 5 e 7, respectivamente). ....	38
Tabela 4.11- Porosidade das Matrizes de PCL e CS.....	40

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 OBJECTIVOS

A engenharia de tecidos dedica-se ao desenvolvimento de soluções que facilitem a recuperação terapêutica de tecidos lesados e que possam vir a substituir, com vantagens, os implantes, as próteses e os enxertos ou auto-enxertos usados na medicina regenerativa.

Os biopolímeros são actualmente um promissor objecto de estudo da engenharia de tecidos por exibirem uma boa compatibilidade com os tecidos biológicos e existirem já várias técnicas para produzir membranas com características físicas capazes de substituir os enxertos ou auto-enxertos.

Uma das técnicas usadas na obtenção de membranas poliméricas é a electrofiação. Na electrofiação é utilizada uma solução líquida polimérica para produzir uma fibra de diâmetro reduzido, na ordem das centenas de nanómetros, que é dispersa quase aleatoriamente pelo ar e recolhida por um colector. Este processo permite obter membranas com uma estrutura matricial a três dimensões (figura 1.1 (a)) bastante semelhante à matriz existente entre as células de um tecido biológico (figura 1.1 (b)).

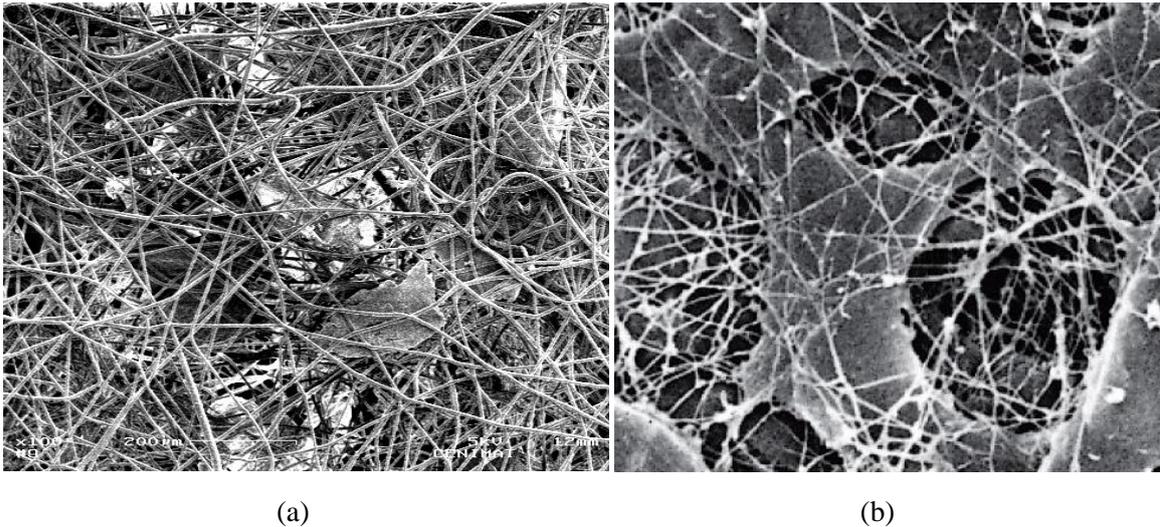


Figura 1.1- (a) Imagem SEM de uma matriz de PCL, com CS incorporado, produzidas por electrofiação;  
(b) Fibroblastos envolvidos por uma rede de fibras de colagénio [1].

Neste trabalho foram usados dois polímeros, a policaprolactona (PCL) e o quitosano (CS), ambos biocompatíveis e biodegradáveis. O PCL permite obter membranas com características mecânicas semelhantes às dos enxertos naturais mas que não são favoráveis à adesão celular. Por outro lado as membranas de CS têm características mecânicas pouco adequadas mas verifica-se que possuem características que promovem uma boa adesão celular.

Têm sido experimentadas soluções poliméricas dos dois polímeros com o objectivo de reunir numa única membrana as características do PCL e do CS. Porém as soluções são difíceis de homogeneizar fazendo com que a solução seja difícil de electrofiar.

Este trabalho pretendeu obviar a dificuldade da electrofiação de uma solução polimérica de PCL e CS através de uma nova abordagem, que consistiu na incorporação de grãos de CS em matrizes de PCL obtidas por electrofiação. A estratégia a utilizar alicerçou-se basicamente na construção de uma montagem que permitiu a deposição vertical de uma solução polimérica de PCL. Foram depositadas, com ajuda da gravidade, fibras electrofiadas, constituídas por este polímero sintético. Entre cada deposição o processo foi interrompido e peneirou-se o quitosano sobre a matriz entretanto criada. Assim, o problema da homogeneização dos polímeros foi evitado pois na verdade existiu apenas electrofiação do PCL.

Os testes e ensaios subsequentes permitiram verificar de que forma as características individuais de cada polímero se revelaram na membrana obtida através deste novo processo.

Ao adoptar uma estratégia que permitiu trabalhar estes dois componentes, através da optimização dos parâmetros de experimentação, foi necessário avaliar o seu comportamento como suporte para a proliferação celular.

## 1.2 Sumário

Com a nova abordagem à produção de membranas com a incorporação de CS houve necessidade de desenvolver um novo conjunto de procedimentos.

No Capítulo 2 são apresentados alguns fundamentos que permitiram a tomada de decisões durante o desenvolvimento do trabalho. No Capítulo 3 são descritos os materiais e métodos que foram usados durante a execução do trabalho, nomeadamente na montagem vertical do sistema de electrofiação e na aferição dos cálculos inerentes às medições e estabelecimento das proporções das quantidades dos polímeros utilizados. No Capítulo 4 são apresentados e discutidos os resultados obtidos para as propriedades físico-químicas das membranas bem como os respectivos testes de cultura celular. No Capítulo 5 referem-se perspectivas futuras e possíveis melhoramentos deste trabalho.

## 2 FUNDAMENTOS

### 2.1 POLÍMEROS

Pretendeu-se neste trabalho, em primeiro lugar, conciliar as vantagens dos dois polímeros utilizados, a policaprolactona e o quitosano, através de uma nova abordagem, para produzir membranas de nanofibras com aplicação em Engenharia de Tecidos. O PCL e o CS são polímeros biodegradáveis e biocompatíveis que pertencem, respectivamente, à classe dos poliésteres e dos polissacarídeos [2].

Os polímeros são macromoléculas de elevada massa molecular constituídos por monómeros. A repetição destes elementos estabelece o denominado grau de polimerização [2]. Quanto à sua origem podem ser classificados como naturais ou sintéticos.

A formação dos polímeros naturais implica o crescimento das cadeias poliméricas, com o aumento do grau de polimerização, e a catálise enzimática, fenómenos ocorridos nos ciclos de crescimento dos seres vivos. A celulose e a quitina são exemplo de polissacarídeos [2] que fazem parte deste tipo de polímeros.

Os polímeros sintéticos são produzidos através de reacções de polimerização em cadeia ou reacções de polimerização por passos. Nas primeiras, moléculas de baixo peso molecular iguais (homopolímeros) ou diferentes (copolímeros) ligam-se covalentemente, sem libertação de outras moléculas (ie, a massa dos reagentes é igual à massa de polímero formado). Um exemplo de um homopolímero deste tipo é o polietileno.

Nas reacções de polimerização por passos, monómeros com grupos reactivos diferentes reagem entre si formando novas ligações, com libertação de pequenas moléculas (tipicamente água, mas não exclusivamente). Um exemplo deste tipo de polímeros são as poliamidas (conhecidos comercialmente por nylon).

No que concerne aos biopolímeros, que são polímeros com aplicações médicas, podem ser designados por não degradáveis ou biodegradáveis, dependendo do seu comportamento na presença de tecidos biológicos.

Os polímeros não degradáveis apresentam uma estabilização das suas propriedades químicas aquando da sua aplicação biomédica graças às ligações estáveis da estrutura polimérica (através de ligações carbono-carbono). Entre muitos outros, referencia-se o polietileno (UHMWPE) usado em ortopedia, nomeadamente nas articulações da anca.

Os polímeros biodegradáveis, tais como o PCL, têm uma taxa de degradação que possibilita a eliminação do implante e assim não existe a necessidade de intervir cirurgicamente para a sua remoção. A degradação do polímero também estimula a regeneração dos tecidos.

A biodegradação envolve o ataque das cadeias poliméricas pela água, com ou sem o auxílio de enzimas (hidrólise enzimática e hidrólise simples). Desta forma, a degradação pressupõe sempre a quebra de ligações ao longo da cadeia polimérica e, portanto, a perda de peso molecular. Esta degradação pode ocorrer por dois mecanismos de erosão distintos: erosão superficial e erosão volúmica [3].

### 2.1.1 Policaprolactona

A policaprolactona é um poliéster alifático e linear com carácter semicristalino. É, igualmente, dos polímeros sintéticos mais investigados do mundo e a FDA- Food and Drug Administration aprovou-o para aplicações médicas nos Estados Unidos da América. A figura seguinte representa parte da cadeia principal do PCL.

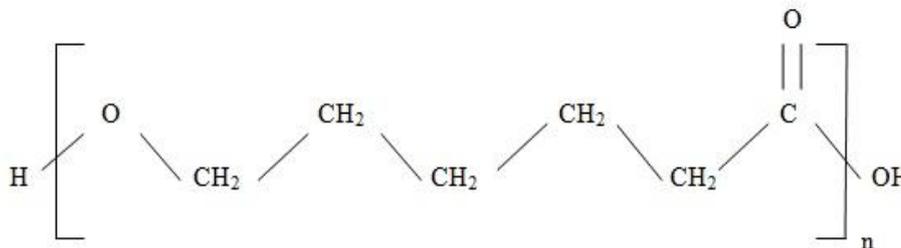


Figura 2.1- Cadeia principal da policaprolactona.

A degradação do PCL é muito lenta, podendo chegar aos 3 anos [3], devido às suas cristalinidade e hidrofobicidade, e por isso é indicada para implantes de longa duração [4]. A degradação do PCL compreende três etapas: a primeira etapa consiste na quebra da cadeia polimérica por hidrólise (figura 2.2), que ocorre nas ligações ésteres num processo que não envolve enzimas (no entanto a hidrólise pode dar-se também devido à actuação de enzimas catalisadoras tais como a esterase e a lipase); seguidamente, na segunda etapa, formam-se cadeias curtas de oligómeros, o que resulta numa perda de massa molecular do PCL; a terceira etapa implica a fagocitose do PCL pelos macrófagos. Os resultados metabólicos destas várias

fases de degradação são eliminados pela excreção renal ou podem ser metabolizados no ácido tricarbóxico [5, 6].

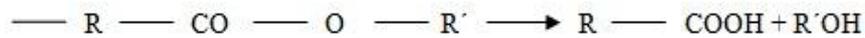


Figura 2.2- Esquema de hidrólise do Poliéster.

Do ponto de vista das suas características físico-químicas o PCL tem uma temperatura de transição vítrea,  $T_g$ , de  $-60\text{ }^\circ\text{C}$  e uma temperatura de fusão,  $T_m$ , de  $55\text{ }^\circ\text{C}$ . Estas propriedades devem-se ao facto de possuir cadeias de carbono muito extensas e de pouca mobilidade, o que confere ao PCL propriedades mecânicas que lhe permite ser um bom copolímero, possuindo uma enorme elasticidade. Esta elasticidade adequa-se ao tipo de aplicações que se pretende desenvolver neste trabalho [3].

### 2.1.2 Quitina e Quitosano

A quitina é o polímero natural mais abundante a seguir à celulose e pertence à classe dos polissacarídeos. Na natureza representa um importante constituinte: no exosqueleto dos crustáceos, dos insectos, nas paredes celulares dos fungos, entre outros. As suas propriedades de biodegradabilidade e de acelerador da cicatrização fazem com que este polímero encontre utilizações na área biomédica, nomeadamente em suturas, revestimentos para feridas e matrizes para engenharia de tecidos.

Quimicamente a quitina é um composto constituído por duas fracções: a fracção de N-acetil-glucosamina e, em quantidade menor, a fracção de N-glucosamina (figura 2.3) [3].

Relativamente ao quitosano, a sua composição é semelhante à quitina embora as proporções relativas às unidades referidas sejam inversas, isto é, o CS tem mais unidades N-glucosamina do que N-acetil-glucosamina [4]. Tanto a quitina como o quitosano são copolímeros e é aceite que se o grau de desacetilação for superior a 0,5 é designado quitosano. Se for ao contrário o composto é designado quitina [7].

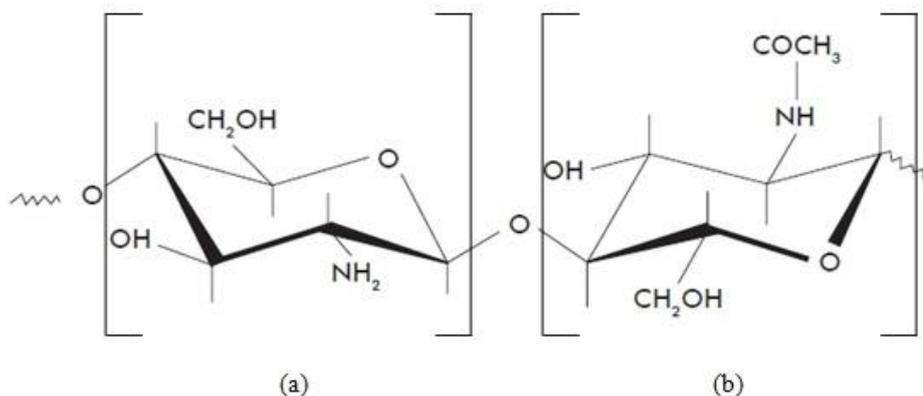


Figura 2.3- Copolímero de quitina/quitosano: (a) Fração da unidade N-glucosamina; (b) Fração da unidade N-acetil-glucosamina.

O quitosano tem carácter catiónico e como tal tem a capacidade de interagir com moléculas de cargas negativas tais como glicosaminoglicanos presentes na matriz extracelular. Soluções com um pH inferiores a 6.3 (ácidos fracos) dissolvem o CS com facilidade [4, 5].

A degradação do quitosano pode ser feita naturalmente por enzimas presentes no corpo humano tais como a lisozima. A taxa de degradação depende do grau de desacetilação: quanto maior for esse grau, mais rapidamente se degrada [5].

A existência de grupos polares, como o NH<sub>2</sub>, habilitam o quitosano a estabelecer ligações secundárias (ligações de hidrogénio) com outros polímeros, tornando-o reactivo.

Outras características importantes do quitosano são a massa molecular, a distribuição dos grupos acetil ao longo da cadeia, a viscosidade e a cristalinidade. Estes são parâmetros que podem influenciar a solubilidade do composto [7].

A solubilidade do quitosano é maior que a do seu precursor e como tem um baixo custo de produção e é fácil de obter, tem sido mais utilizado e mais estudado do que a quitina. As suas propriedades atóxicas, biocompatíveis, biodegradáveis (originam açúcares amino que são absorvidos pelo corpo), bioaderência, bem como a sua actividade antimicrobiana fazem do quitosano um importante biopolímero nas aplicações biomédicas [6].

## 2.2 Métodos de mistura PCL/CS e aplicações

A combinação das propriedades físico-químicas da policaprolactona e do quitosano é muito pertinente no campo da engenharia de tecidos. No entanto, como se pode inferir das suas propriedades químicas, indicadas no subcapítulo anterior, a dificuldade em misturar estes dois polímeros deve-se ao facto de a solvência comum não ser de fácil obtenção [8]. Este

constrangimento abre espaço ao melhoramento de técnicas que os combinem de maneiras cada vez mais eficazes, e os estudos sobre eles são tema actual no ramo das ciências biomédicas.

O quitosano é um polímero biodegradável que favorece o reconhecimento celular. No entanto, possui uma elevada rigidez devido à sua natureza cristalina. A policaprolactona possui propriedades mecânicas (é bastante elástica) favoráveis a um material com potencial biomédico mas tem a desvantagem de ser hidrofóbico.

A electrofiação de membranas à base de misturas de PCL e CS tem sido experimentada em trabalhos anteriores. Para que o PCL e o CS se misturem é indispensável um solvente comum. O HFIP (Hexafluoro-2-Propanol) é um solvente possível, mas tem o senão de ser extremamente caro e tóxico. Como tal, outros solventes estão a ser estudados, tais como o ácido acético e o ácido acético glacial para a dissolução do CS e PCL, respectivamente [8].

A obtenção de matrizes tridimensionais, que estimulam o crescimento celular, pode ser feita à custa de várias técnicas que utilizam misturas de PCL e CS. A liofilização (*freeze drying*) é um método que permite a criação destas estruturas porosas, mas não possuem a devida integridade estrutural necessária devido ao solvente utilizado (ácido acético)[8].

Outras técnicas permitem a criação de matrizes porosas tais como a separação de fase induzida termicamente (TIPS), a fiação húmida (*wet spinning*) e a fiação de polímeros termoplásticos (*melt spinning*), com a utilização do PCL e do CS a ser combinada ou, também, utilizada na presença de outros polímeros.

Estas matrizes têm aplicações cada vez mais expressivas no campo médico e permitem criar: membranas; esponjas; fibras; microsferas e hidrogéis [9].

A modificação dos grupos da cadeia principal e a alteração do grau de deacetilação do CS possibilita um manuseamento de propriedades físicas dos substratos criados, podendo assim diferenciarem-se as estruturas consoante as especificidades que se pretendem atingir, como por exemplo: osso, tendão, ligamentos, cartilagem, pele, nervos e tecido vascular [9].

### 2.3 Técnicas de produção de matrizes: *electrospinning*

As técnicas referenciadas no subcapítulo anterior permitem criar substratos que podem ser usadas na regeneração de vários tecidos ou até órgãos humanos. Todas estas técnicas apresentam vantagens e certas especificidades que as tornam úteis. No entanto, apenas a electrofiação permite criar, de uma forma sistemática e contínua, fibras com diâmetros que variam entre os micrómetros e os nanómetros.

As fibras electrofiadas permitem obter estruturas tridimensionais que mimetizam a matriz extracelular e por isso são designadas de matrizes (*scaffold*). A biocompatibilidade, a biodegradabilidade, a porosidade e as propriedades mecânicas, entre outras características,

destas matrizes artificiais, são condições óptimas à adesão e proliferação celular e, portanto, à regeneração celular.

A electrofiacção ou fiacção electrostática (*electrospinning*) é uma técnica bastante simples. Uma bomba injectora impulsiona uma solução polimérica que está contida numa seringa. A agulha da seringa está electricamente ligada ao pólo positivo de uma fonte de alta tensão. O colector, ligado à terra, atrai a solução ejectada pela agulha e recolhe a fibra criada electrostaticamente. A figura seguinte ilustra simbolicamente os componentes do sistema.

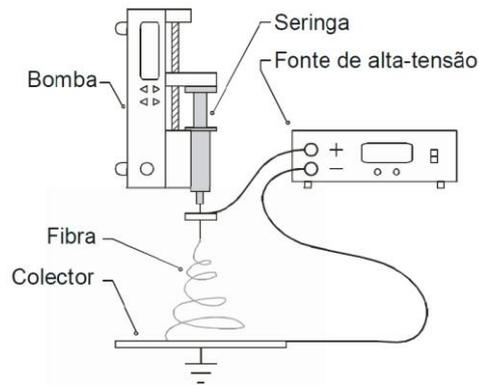


Figura 2.4- Esquema simbólico de um sistema de electrofiacção.

Na electrofiacção, quando o potencial eléctrico é aplicado à agulha, o polímero no seu interior fica electricamente carregado e, à medida que vai sendo ejectado da seringa, vão-se acumulando cargas eléctricas na superfície da gota que se forma na ponta da agulha. Para além da força gravítica a gota também é sujeita às forças colombianas geradas pelo campo eléctrico que se cria entre a agulha e o colector. As cargas que se acumulam desestabilizam o formato esférico da gota e, a partir de um certo valor da tensão aplicada, adquire uma configuração cónica conhecida por Cone de Taylor. A partir de um valor crítico da tensão eléctrica dá-se a ejeção da solução no Cone de Taylor, que será guiada até ao colector devido ao campo eléctrico externo. Durante este trajecto as fibras são estiradas devido à repulsão entre as cargas transportadas. Por outro lado, à medida que as fibras se deslocam pelo ar o solvente vai-se evaporando, solidificando-as. Estes dois efeitos resultam na criação de fibras finas que são depositadas, de uma forma quase aleatória, no colector [10].

## 2.4 Parâmetros de controlo no *electrospinning*

Apesar do processo de electrofiacção ser conceptualmente simples, na prática apresentam-se inúmeras condições que precisam de se verificar para que se possa obter a fiacção da solução polimérica. Nem sempre é fácil identificar essas condições necessárias no processo de

electrofiação de uma dada solução polimérica. No entanto, há parâmetros de controlo do processo que se sabe serem fundamentais, tais como os parâmetros associados às características da solução polimérica, os de produção e os ambientais.

#### 2.4.1 Parâmetros associados à solução polimérica

Os principais parâmetros associados à solução polimérica a ter em conta no processo de electrofiação são: a viscosidade, a condutividade eléctrica, a tensão superficial e a volatilidade do solvente.

A viscosidade é a propriedade física que define a resistência do material ao escoamento [11] e é determinada pela massa molecular (dependente do comprimento das cadeias poliméricas) e pela concentração do polímero. Quanto maiores forem estas características do polímero maior será a sua viscosidade. A viscosidade não é um parâmetro independente pois correlaciona-se com outros factores (à medida que o solvente se evapora a viscosidade das fibras aumenta e as forças viscoelásticas inerentes às fibras resistem ao alongamento, aumentando assim o diâmetro).

A viscosidade tem a particularidade de afectar fortemente a capacidade de fiação de uma solução polimérica: a elevada viscosidade dificulta o estiramento do jacto e favorece a formação de fibras de maiores diâmetros.

Viscosidades reduzidas permitem uma grande mobilidade das cadeias poliméricas e conduzem a uma elevada instabilidade durante o processo, uma vez que as forças electrostáticas não precisam de ser muito fortes para que provoquem uma interrupção na formação da fibra. As fibras criadas nestas condições têm geralmente diâmetros pequenos o que pode ser útil em várias aplicações [12, 13].

A condutividade expressa a maior ou a menor facilidade que um material tem em conduzir corrente eléctrica e é determinante na forma como as cargas se distribuem na solução polimérica que se forma no Cone de Taylor, influenciando o jacto formado. Um aumento do número de cargas transportadas induz ao estiramento das fibras, devido à repulsão, e a um menor diâmetro das fibras. Este efeito foi já observado em trabalhos anteriores em que foi possível correlacionar a diminuição do diâmetro das fibras com o aumento de iões positivos adicionados à solução polimérica [14].

Uma tensão superficial elevada dificulta a formação de um jacto, uma vez que exige uma maior força de repulsão electrostática para provocar a ejeção da solução que se encontra na ponta da agulha, e favorece a formação de contas, zonas das fibras onde a razão superfície/volume é minimizada através da acumulação de polímero devido à acção das forças associadas à tensão superficial. Uma tensão superficial baixa facilita o processo de electrofiação e a obtenção de fibras de boa qualidade, com diâmetro regular.

Finalmente, a volatilidade é uma grandeza que expressa a maior ou menor capacidade das substâncias passarem do estado líquido ao estado gasoso. A pressão de vapor do solvente determina a taxa de evaporação. O estiramento das fibras é influenciado directa ou indirectamente pela volatilidade dos solventes: à medida que evaporam, as forças viscoelásticas contrariam o estiramento das fibras. Assim, quando o solvente se evapora completamente o alongamento cessa, pois a viscosidade atinge o seu máximo [12, 14].

Apesar de estes serem considerados os principais parâmetros do processo de electrofiação, associados à solução polimérica há outros parâmetros que influenciam a electrofiação, a permitividade eléctrica e o tempo de relaxação (que caracteriza propriedades viscoelásticas) [15]. Por outro lado verifica-se que os vários parâmetros se podem afectar mutuamente e até variar com o tempo de vida das soluções, aumentando deste modo a dificuldade de controlo do processo de electrofiação.

#### 2.4.2 Parâmetros de produção

Num sistema de electrofiação há um conjunto de parâmetros de produção que caracterizam a montagem, nomeadamente: a tensão eléctrica aplicada entre a agulha e o colector; o caudal de solução polimérica que se faz chegar à agulha; e a distância a que é colocado o colector. Destes, a tensão aplicada é dos factores mais importantes em todo o processo de electrofiação pois além de ter implicações directas, influencia determinantemente outros restantes parâmetros. A tensão aplicada é responsável pelas cargas eléctricas que a solução polimérica transporta. Juntamente com a distância, a tensão é responsável pela força e aceleração que o campo eléctrico imprime às fibras.

Tensões elevadas conduzem a uma maior força de repulsão electrostática, devido ao maior número de cargas transportadas, que por sua vez provocam alongamentos superiores nas fibras e portanto fibras mais finas. Por outro lado, um aumento do potencial aplicado tem como consequência um menor tempo de voo da fibra, entre a agulha e colector, e portanto conduz à formação de fibras mais curtas e com diâmetros maiores[12, 13].

Para que o processo de electrofiação aconteça é necessário que a bomba injectora provoque a ejeção da solução polimérica na quantidade necessária para compensar aquela que abandona a ponta da agulha sob a forma de fibra. O caudal, ou seja, a quantidade de solução ejectada pela bomba por unidade de tempo, depende da velocidade com que esta actua no êmbolo da seringa e do seu diâmetro interno.

Existe uma relação linear entre o diâmetro da fibra produzida e o caudal: quanto maior for o caudal maior será o diâmetro da fibra. O caudal pode influenciar também a porosidade associada às fibras criadas, verificando-se que quanto maior for o caudal maiores serão os poros [12, 14].

A estrutura das fibras é afectada pela distância entre a agulha e o colector. Existem muitos factores que são dependentes deste parâmetro. Já foi referenciado que a distância determina, também, a intensidade do campo eléctrico. Além disso, o tempo de voo e a evaporação são factores que são influenciados directamente pela distância.

Tal como com a tensão aplicada, existem efeitos contrários quando a distância varia. Ao aumentar a distância a intensidade do campo eléctrico diminui (fazendo diminuir as forças de repulsão electrostática), logo existe uma diminuição no alongamento das fibras. Por outro lado, para distâncias maiores existe um tempo de voo maior, o que permite um alongamento das fibras pelo facto de as forças de repulsão electrostática actuarem durante mais tempo. Mais uma vez se verifica que os parâmetros não são independentes uns dos outros, dificultando por vezes o controlo do processo de electrofiação [12].

O diâmetro da agulha é um exemplo de outros parâmetros que podem influenciar o processo de electrofiação [12, 14].

### 2.4.3 Parâmetros ambientais

Os principais parâmetros ambientais que têm influência no processo de electrofiação são a humidade relativa e a temperatura. De facto, estes parâmetros podem influenciar desde logo alguns parâmetros associados à solução polimérica.

Dependendo do polímero em estudo, a temperatura pode afectar de forma determinante tanto a viscosidade como a conductividade. O aumento da temperatura provoca um aumento da taxa de evaporação e um aumento da viscosidade.

Taxas de evaporação baixas devido a níveis de humidade relativa elevados poderão fazer com que a solução polimérica, ainda com o solvente, atinja o colector, provocando dessa forma a dissolução e fusão do polímero entretanto depositado [16, 17].

## 3 MATERIAIS E METODOLOGIA

### 3.1 Montagem para produção de substratos de PCL

O sistema que permitiu a realização deste trabalho consistiu na montagem vertical da bomba dispensadora, na qual se inseriu uma seringa que continha uma solução polimérica. Estabeleceu-se a ligação eléctrica entre a fonte de alta-tensão e a agulha da seringa e aplicou-se uma tensão permitindo a fiação da solução polimérica. As fibras produzidas foram depositadas num colector que estava ligado à terra e que tinha um movimento rotativo que permitiu uma distribuição homogénea das fibras. Este movimento foi possível graças à acção de um motor associado ao colector. A figura seguinte ilustra bem este processo.

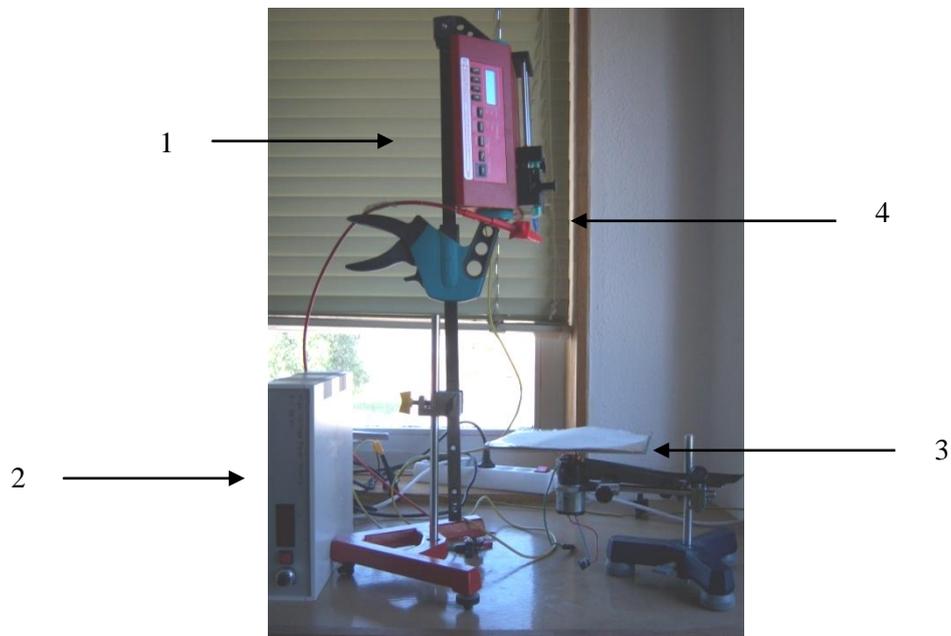


Figura 3.1- Esquema da montagem do sistema de electrofiação: 1) Bomba dispensadora; 2) Fonte de alta tensão; 3) Colector; 4) Seringa e ligação eléctrica.

**Características dos materiais/ equipamento:**

- Bomba injectora da New Era Pump Systems;
- Seringa Injekt 5 mL da B|Braun;
- Agulha calibre 22 (diâmetro externo de 0,7176mm);
- Prato colector de alumínio;
- Motor DC 24V, 8RPM (RS 440- 363);
- Fonte de alta tensão;

Este sistema permitiu, pois, a variação da distância agulha-colector, a variação do caudal e a da tensão, o que irá permitir por sua vez o estudo dos parâmetros iniciais inerentes à produção das nanofibras.

## 3.2 Preparação das soluções poliméricas e do quitosano

### 3.2.1 Policaprolactona

Na preparação da solução polimérica utilizou-se o polímero policaprolactona da Aldrich Chemistry (massa molecular  $M_n = 70,000 - 90,000$  g/mol); e o solvente Triclorometano (Clorofórmio) da Panreac (massa molar: 119,38g/mol). Para se garantir a homogeneização recorreu-se a um agitador magnético. As várias concentrações de PCL estudadas inicialmente foram feitas através da percentagem mássica, obtidas pela pesagem na balança. A tabela seguinte expressa a relação entre as quantidades a serem utilizadas.

$$\text{concentração da solução polimérica (\%)} = \frac{M_{\text{polímero}}}{M(\text{polímero} + \text{solvente})} \times 100$$

No que diz respeito ao processo de electrofiação propriamente dito, para um determinado caudal foi possível saber, controlando o tempo, a quantidade de massa da solução polimérica usada na produção de uma membrana e, conseqüentemente, a quantidade de PCL electrofiada.

### 3.2.2 Quitosano

Para se proceder convenientemente à incorporação de CS nas membranas foi necessário proceder a acções que possibilitem a existência de CS em várias granulometrias.

Foi usado quitosano da Cognis Chitopharm S, em que os grãos tinham dimensões, principalmente, entre os 200 e os 300  $\mu\text{m}$ . Assim, foi fulcral proceder à sua separação e proceder a um tratamento que viabilizou a existência de grãos menores, nomeadamente, inferiores a 100  $\mu\text{m}$ .

Através de uma máquina de lâminas rotativas cortaram-se os grãos que foram recolhidos em três recipientes de acordo com a sua granulometria: inferior a 100  $\mu\text{m}$ ; entre 100 e 200  $\mu\text{m}$ ; e mais de 200  $\mu\text{m}$ .

Garantido a existência de vários tamanhos de grãos, tornou-se necessário quantificar a massa filtrada por uma peneira para conseguir calcular devidamente as proporções entre o PCL e CS.

A medição testada consistiu na pesagem de CS obtido numa agitação única e lateral da peneira, através da mão, num movimento firme. Repetindo este processo várias vezes obteve-se, de uma forma sistemática, uma distribuição de massas e a sua média, de forma a prever, futuramente, a porção de quitosano a dispensar através deste processo.

### 3.3 Ensaios de tracção

A caracterização mecânica das membranas neste trabalho foi feita através dos ensaios de tracção a que as amostras produzidas foram sujeitas.

O ensaio de tracção consistiu na aplicação de uma força num corpo de prova, provocando-lhe um estiramento. A carga aplicada bem como a respectiva extensão do material foram registadas, construindo-se depois um gráfico da tensão em função da extensão, do qual será extraído o Módulo de Young [17, 18].

A figura 3.2 representa um gráfico típico da tensão em função da extensão das amostras. A região 1 é a zona elástica e a região 2 é a zona plástica. Na zona elástica, onde o material assume o formato inicial ao remover a carga aplicada, a lei de Hooke é válida:

$$\sigma = E \times \varepsilon$$

em que  $\sigma$  é a tensão,  $E$  o módulo de Young e  $\varepsilon$  a deformação.

O módulo de Young é a tensão aplicada por unidade de área a dividir pela deformação que o material sofre devido a essa força. O módulo de Young é um parâmetro indicativo da resistência de um material à deformação elástica e portanto dá uma indicação da rigidez do material. A unidade normalmente usada é o Pascal.

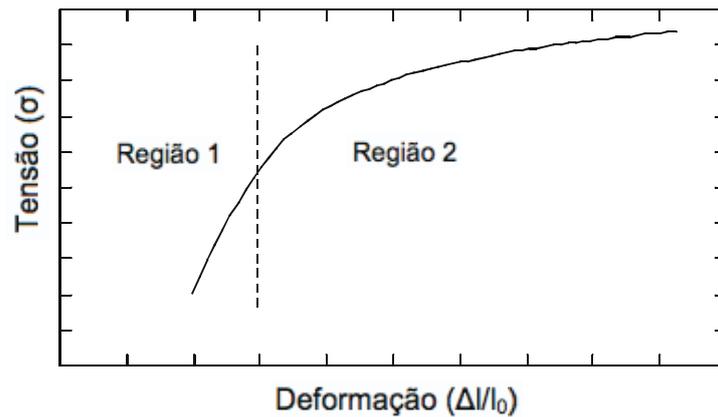


Figura 3.2- Gráfico da tensão em função da deformação de um material polimérico.

A tensão é determinada pela força,  $F$ , dividida pela secção da amostra,  $S$ . A deformação obteve-se dividindo o alongamento ( $\Delta l$ ) da amostra pelo comprimento inicial,  $l_0$ , pelo que o módulo de Young pode assim ser determinado através da seguinte equação.

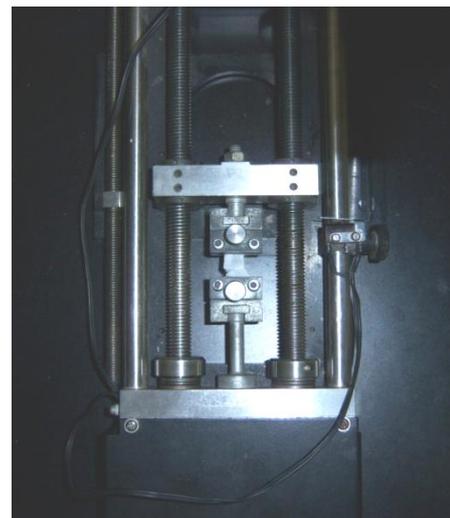
$$E = \frac{\sigma}{\varepsilon} = \frac{\frac{F}{S}}{\frac{\Delta l}{l_0}}$$

As dez amostras utilizadas nos testes de tracção são rectangulares com dimensões de três por um centímetro. Mediram-se, com a craveira, as espessuras das amostras, e seguidamente estas foram submetidas aos ensaios mecânicos, como se ilustra na figura 3.3.

O equipamento de testes incluía o controlo por computador feito através da aplicação informática Minimat Control Software, da Reometric Scientific (Version 1.60) (ver figura 3.3).



(a)

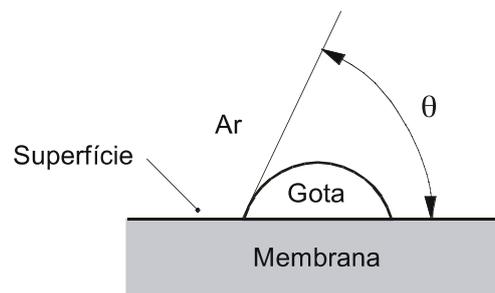


(b)

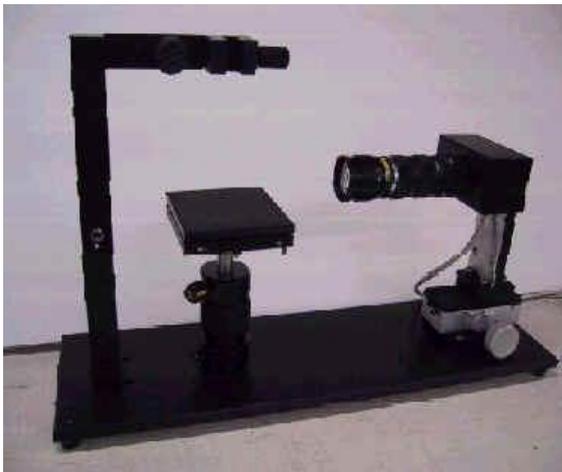
Figura 3.3- (a) Equipamento dos testes de tracção; (b) tracção de uma amostra;

### 3.4 Hidrofilicidade

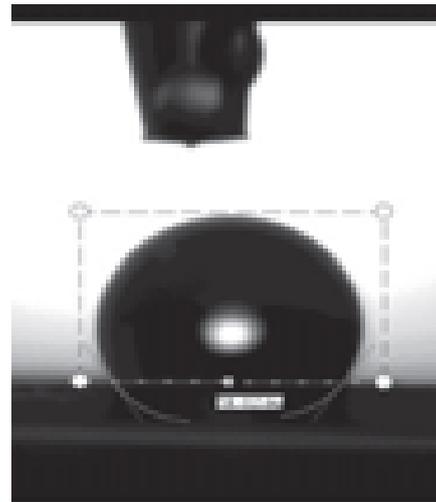
A caracterização da hidrofilicidade das membranas foi feita através da medida do ângulo de contacto entre uma gota de água e a membrana sobre a qual foi depositada, usando o equipamento CAM 100 da KSV (ver figura 3.4 (b)). O ângulo de interesse foi formado pelo plano horizontal da membrana e pela tangente ao perfil da gota na zona de contacto (ver figura 3.4 (a)). O ângulo expressa o carácter hidrofóbico se o seu valor for superior a  $90^\circ$  e hidrofílico se for inferior [19].



(a)



(b)



(c)

Figura 3.4-(a) Esquema da formação do ângulo de contacto; (b) Sistema CAM 100; (c) *software* do sistema: manipulação de imagem e medição do ângulo.

A medida foi feita através de um sistema óptico e de uma aplicação informática que processa imagens adquiridas com recurso a uma câmara de vídeo digital. Dispôs-se uma seringa com água destilada sobre uma amostra no sistema referenciado e depositou-se uma gota de água sobre a membrana. Introduziu-se o intervalo de tempo entre as fotografias e o número total de fotografias a tirar, o que permitiu controlar o tempo de aquisição. Na figura 3.4.c), o rectângulo delimita parte do contorno da gota (fazendo o contraste claro/escuro) e a aplicação determina,

com esses dados, as dimensões da gota num formato mais ou menos circular. Seguidamente definiu-se a linha base (onde se considerava estar a fronteira entre o líquido e a parte superior da amostra). O ângulo de contacto é formado entre a linha tangente ao contorno da gota e a linha base. Foram medidos dois ângulos: um do lado esquerdo e outro do lado direito. A aplicação calcula a média destas duas medidas.

### 3.5 Porosidade

A porosidade das membranas produzidas depende da densidade do quitosano que se utilizou nas deposições. Como esta não é conhecida foi também necessário determiná-la. Assim, procedeu-se à preparação de uma solução de CS em ácido acético. Depois de homogeneizada, a preparação foi colocada sobre uma folha de acetato e deixada a secar de um dia para o outro. Após a evaporação do ácido obteve-se um filme de quitosano sobre a folha de acetato. Do filme de quitosano, depois de ter sido separado da folha de acetato, foi cortado um quadrado de 2×2 cm. Com a medida da espessura desta amostra obteve-se o volume. Medido o peso da amostra calculou-se então a densidade do quitosano, tendo-se obtido o valor de 1,27 g/cm<sup>3</sup>.

A porosidade foi calculada através da seguinte expressão [20]:

$$Porosidade = 1 - \frac{\rho_{aparente}}{\rho_{material}}$$

Para a densidade aparente ( $\rho_{aparente}$ ), e para cada deposição estudada, cortou-se um quadrado de 2×2 cm e foi repetido o procedimento relativo ao filme de quitosano descrito anteriormente.

Para a densidade do material ( $\rho_{material}$ ) recorreu-se à expressão:

$$\rho_{material} = \frac{m_{pcl} + m_{CS}}{V_{pcl} + V_{CS}} = \frac{m_{pcl} + m_{CS}}{\frac{m_{pcl}}{\rho_{pcl}} + \frac{m_{CS}}{\rho_{CS}}}$$

### 3.6 Testes de cultura celular

Os ensaios com as culturas celulares, cujo método se descreve a seguir, foram realizados no laboratório de culturas celulares da Faculdade de Engenharia e Ciências Naturais da Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias.

As membranas produzidas foram colocadas em lamelas de 12 mm, devidamente esterilizadas no ITN - Instituto Tecnológico e Nuclear durante um período de 11h20, em que foram sujeitas a raios gama com uma dose total de 25,05 kGy, a partir de uma fonte de Cobalto de sessenta unidas de massa atómica ( $^{60}\text{Co}$ ). Utilizou-se a linha celular de cancro de mama MCF-7 com expressão de GFP (*Green Fluorescent Protein*), constituída por células epiteliais aderentes.

As células MCF-7/GFP foram cultivadas em meio DMEM (Invitrogen) suplementado com 10% (v/v) de soro fetal bovino (FBS, Invitrogen), 1% (v/v) de antibiótico/antimicótico (*Pen-Step+Antimycotic*, Invitrogen) e 1% (v/v) de solução de aminoácidos *MEM Non Essential Amino Acids* 100x (Invitrogen) - meio completo. Os crescimentos foram efectuados em frascos de cultura celular de 75 cm<sup>2</sup> (BD Biosciences) com incubação numa estufa *HERA Cell 150i* (Thermo Scientific) a 37 °C e com 5 % (v/v) de CO<sub>2</sub> e 99 % de humidade relativa.

No que diz respeito à renovação das linhas celulares, o meio de cultura do frasco que continha as células foi aspirado, adicionando-se de seguida, numa distribuição uniforme, 5 mL de tripsina — uma enzima que destrói as ligações das células às paredes do frasco, soltando-as. Após um período de 5 minutos de incubação (37 °C e 5 % CO<sub>2</sub>) na estufa adicionou-se 5 mL de meio completo para neutralizar a tripsina. Foi aspirado o volume total, através de uma pipeta, para um tubo de centrifugadora de 50 mL e centrifugou-se durante 5 minutos a 500 g (sendo g a aceleração da gravidade). Seguidamente desprezou-se o sobrenadante, aspirando-o, e adicionou-se 2 mL de meio completo ao *pellet*. Ressuspendeu-se com a pipeta P1000 para evitar os aglomerados de células e incubou-se nas mesmas condições. Para manutenção das culturas, adicionaram-se aos frascos de cultura 20 mL de meio completo, 50 µL de suspensão celular ressuspensa e incubaram-se a 37 °C, com 5 % (v/v) de CO<sub>2</sub>.

Para se proceder à contagem de células viáveis adicionou-se 50 µL de suspensão celular, 100 µL do corante de exclusão azul *trypan* (penetra através de poros formados nas paredes celulares de células inviáveis) e 350 µL de PBS (solução tampão que mantém o pH estável e pode actuar como um agente purificador das células) num microtubo com tampa, de 1,5 mL de capacidade. A contagem de células foi estabelecida por uma média de células vivas aferida na câmara de um hemocítmetro. A profundidade da câmara é de 0,1 mm e portanto o volume é 0,1mm<sup>3</sup>, que corresponde a 10<sup>-4</sup> mL. A concentração foi obtida a partir de uma média de células vivas representada por  $x$  na equação seguinte. O  $x$  é multiplicado por 10<sup>4</sup>, que expressa o factor

de conversão do volume, e pelo factor de diluição 10, pois no microtubo existem 50µL de suspensão celular em 500µL de solução.

$$C = x \times 10^4 \times 10$$

O  $C$  é assim uma concentração que expressa o número de células em 1mL da suspensão do frasco de cultura de onde se retiraram as células. A partir desta concentração obteve-se o volume de suspensão celular que é necessário diluir em meio completo para obter uma solução contendo 50000 células/mL.

As membranas foram colocadas nas placas de 24 poços e mergulhadas, durante 15 minutos, em meio completo para as tornar mais hidrofílicas e propensas à adesão. As placas eram constituídas, além das membranas, pelo controlo positivo e negativo, formados somente pelas células tumorais e meio celular. O positivo continha aminoácidos essenciais mas o negativo não. Assim, podia-se controlar se as células necessitavam realmente dos aminoácidos permitindo também a detecção de fluorescência residual. Findo este tempo aspiraram-se os poços e a cada um adicionou-se um mililitro da suspensão celular anteriormente preparada. As placas foram incubadas a 37 °C com 5 % de CO<sub>2</sub>, e o meio renovado a cada 24 horas. As placas foram observadas ao microscópio de fluorescência e ao microscópio confocal.

#### **Características dos materiais/equipamento:**

- Estufa HERA *Cell* 150i (Thermo Scientific);
- Hemocitómetro (Hirschmann);
- Microscópio de fluorescência Olympus BX51;
- Microscópio confocal de fluorescência Zeiss LSM 710;

## 4 Resultados e discussão

### 4.1 Parametrização da produção de membranas de PCL

Os parâmetros de controlo do sistema de electrofiação foram ajustados, e deste ajuste resultaram membranas com diferentes características.

Considerou-se um bom resultado a obtenção de matrizes poliméricas que mimetizassem as matrizes extracelulares (ver figura 1.1 (b)), nomeadamente em termos de uniformidade dos diâmetros das fibras e a sua dispersão aleatória nas membranas. Nesse sentido foram efectuados ensaios variando os parâmetros de produção do sistema de electrofiação com o objectivo de escolher os mais adequados.

Uma vez escolhidos os parâmetros de produção das membranas de PCL estes foram mantidos fixos no processo de produção de membranas com incorporação de CS.

#### 4.1.1 Variação da distância entre agulha e colector

Foram estabelecidas as gamas de variação dos parâmetros de produção com base em trabalhos realizados anteriormente. Nestas gamas foram escolhidos valores intermédios para proceder aos ensaios de variação da distância entre a agulha e o colector. A solução polimérica electrofiada tinha 15 % de PCL em clorofórmio, tendo sido dispensada pela seringa com um caudal de 0.6 mL/h. A tensão aplicada entre a agulha e o colector foi de 12 kV. Foram efectuados ensaios para as distâncias de 15, 20 e 25 cm. As membranas foram obtidas ao fim de cerca de quinze minutos de deposição.

Na figura 4.1 apresentam-se algumas imagens representativas dos resultados obtidos com a variação da distância entre a agulha e o colector. A distância a que se obteve melhor uniformidade das fibras foi de 25 cm. Com efeito, pode observar-se na imagem da figura 4.1 (c) que cada fibra presente tem um diâmetro que é mais uniforme do que aqueles exibidos pelas fibras das outras imagens (figuras 4.1 (a) e (b)).

Pretendeu-se também que as fibras, ao serem atraídas para o colector, tivessem uma deposição completamente aleatória. Observou-se que ao encurtar a distância, as fibras electrofiadas tiveram uma deposição mais centrada no colector e com formato circular, comprometendo assim a aleatoriedade do processo, que é um factor importante para uma maior uniformidade no diâmetro das fibras. Assim, as fibras que mais se dispersaram pelo colector foram as que se obtiveram com uma distância de 25 cm entre a agulha e o colector (figura 4.1(c)).

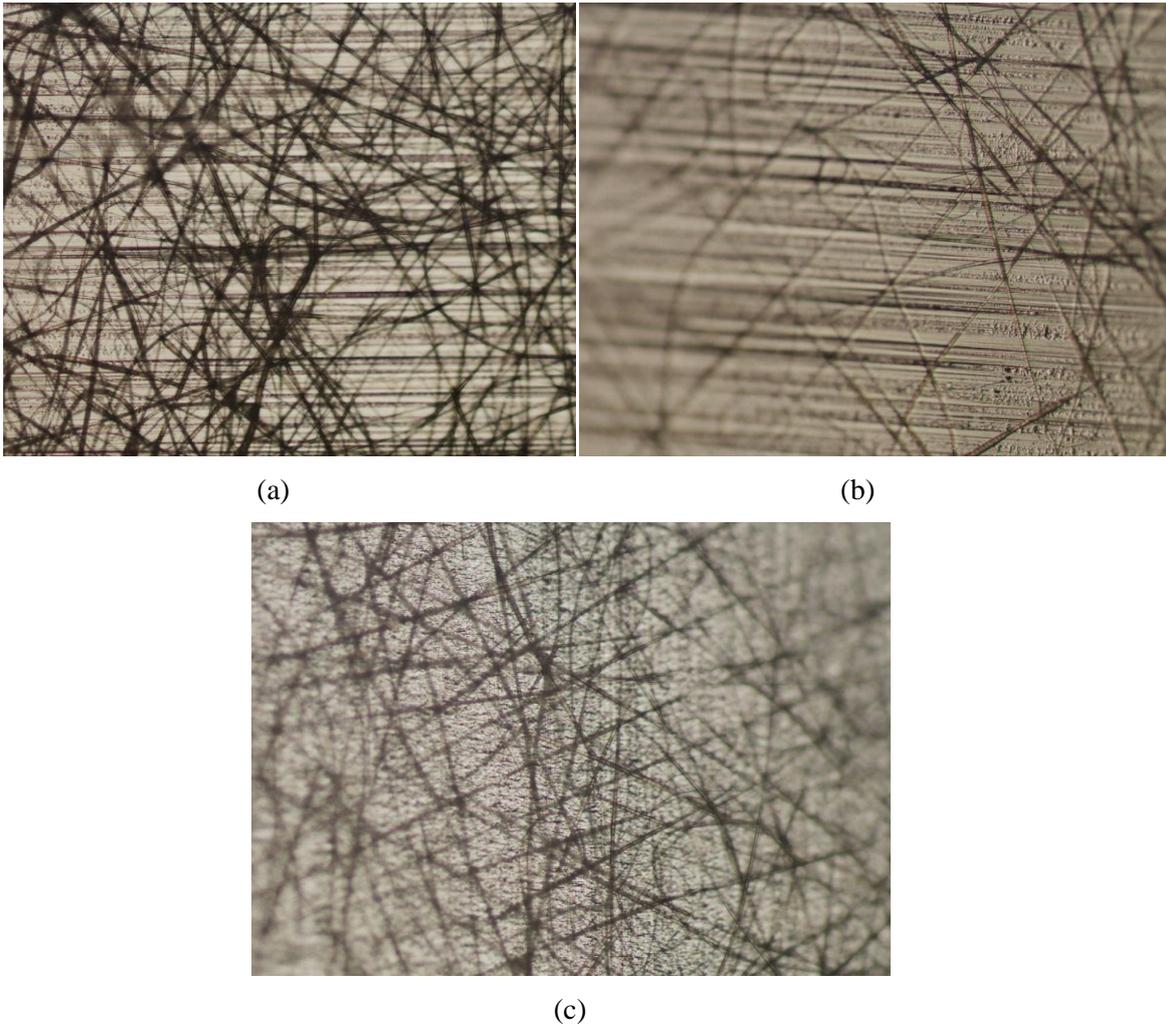


Figura 4.1-Concentração de PCL: 15 %. Tensão aplicada: 12 kV. Caudal: 0,6 mL/h. Ampliação 10x.  
Distância entre agulha e colector: (a) 15 cm; (b) 20 cm; (c) 25 cm.

#### 4.1.2 Variação do caudal, tensão e concentração

Fixada a distância entre a agulha e o colector nos 25 cm, variou-se o caudal, a tensão e a concentração, para analisar os resultados obtidos do ponto de vista da melhor uniformidade dos diâmetros das fibras e da deposição. Foi analisada, para cada concentração considerada (7, 10 e 15% — ver tabela 4.1), o efeito no diâmetro das fibras ao variar o caudal e as tensões. As

imagens seguintes foram obtidas ao microscópio óptico (ampliação de 100x) e são representativas dos resultados obtidos.

Tabela 4.1- Concentrações de PCL na solução polimérica.

Massa de PCL (g)	Massa de Clorofórmio (g)	Concentração da solução (%)
0,702	9,292	7
0,498	4,486	10
1,497	8,495	15

As figuras 4.2, 4.3 e 4.4 dizem respeito a deposições com concentrações de 7 % em solução de clorofórmio, com tensões aplicadas de 10, 12 e 14 kV, respectivamente. Independentemente de todos os outros parâmetros de produção, em todas as matrizes obtidas com 7 % de PCL se verificou a existência de aglomerados de PCL com o formato de contas, como por exemplo na figura 4.4 (b), ou gotículas achatadas, como é visível na figura 4.2. Considerou-se portanto que esta concentração não é a desejada para obter as matrizes que se pretendiam estudar.

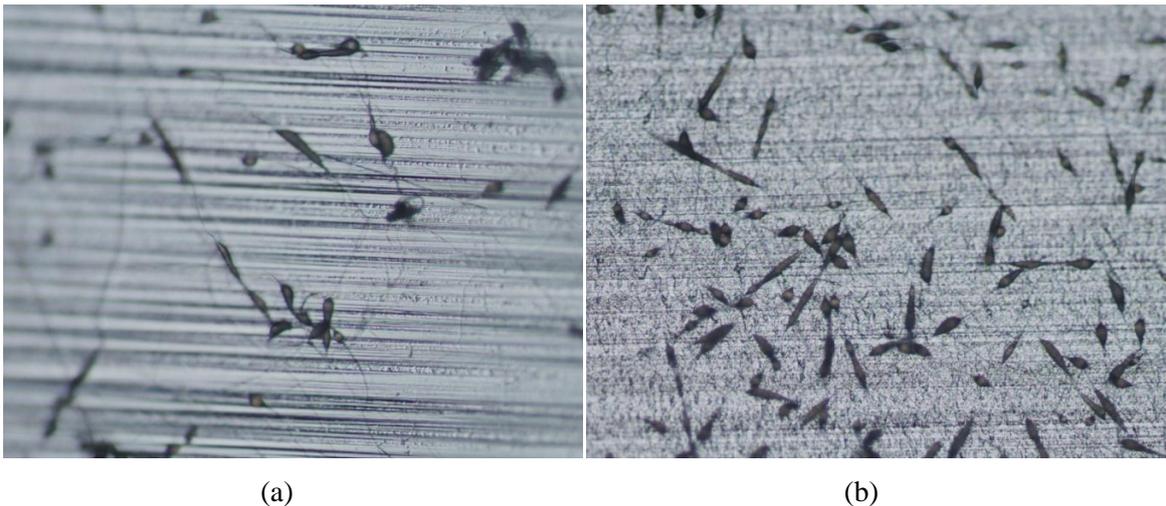


Figura 4.2- Concentração de PCL: 7 %. Tensão aplicada: 10 kV. Ampliação 10x. Caudal: (a) 0,4 mL/h;  
(b) 0,6 mL/h.

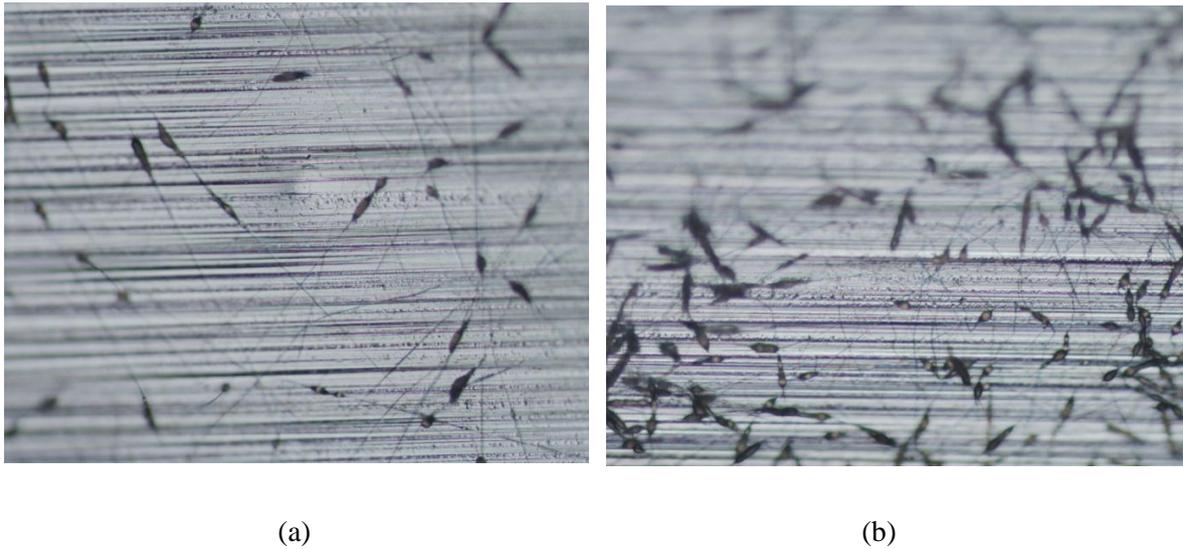


Figura 4.3- Concentração de PCL: 7 %. Tensão aplicada: 12 kV. Ampliação 10x. Caudal: (a): 0,4 mL/h; (b) 0,6 mL/h.

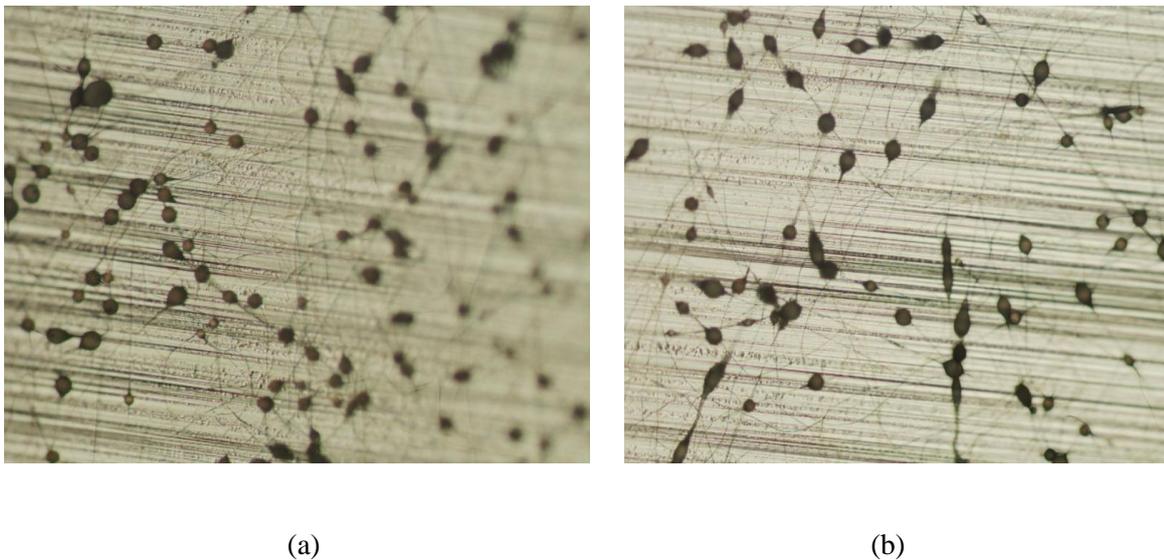


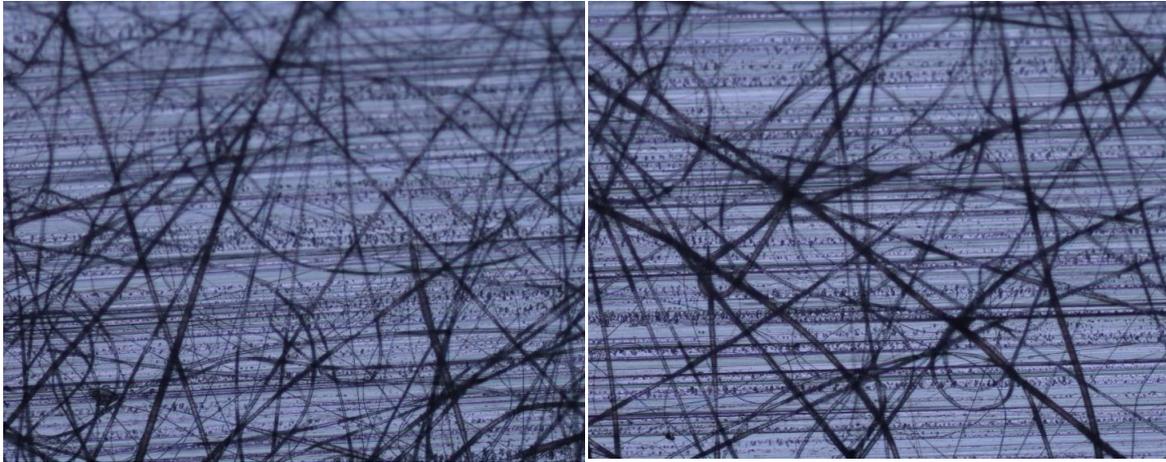
Figura 4.4- Concentração de PCL: 7 %. Tensão aplicada: 14 kV. Ampliação 10x. Caudal: (a) 0,4 mL/h; (b) 0,6 mL/h.

As imagens seguintes são correspondentes a deposições com concentrações de 10 %, em solução de clorofórmio, com uma tensão aplicada respectivamente de 10, 12 e 14 kV.

Relativamente à experiência feita aos 10 kV (figura 4.5 (a)), as fibras obtidas com um caudal de 0.4mL/h apresentaram melhor uniformidade do que as da figura 4.4 (b), que corresponde à deposição com caudal de 0.6 mL/h. Quando aplicados os 12 kV, (figura 4.6), as deposições apresentaram bons resultados no que diz respeito à uniformidade do diâmetro das fibras. A figura 4.7, respeitante à deposição com uma tensão aplicada de 14 kV, de todas as experiências foi a que exibiu as melhores características: boa rede de fibras e uma maior

uniformidade dos diâmetros. Os jactos de solução produzidos por electrofiação apresentaram-se mais estáveis quando se usam caudais de 0,6 mL/h do que com caudais de 0,4 mL/h.

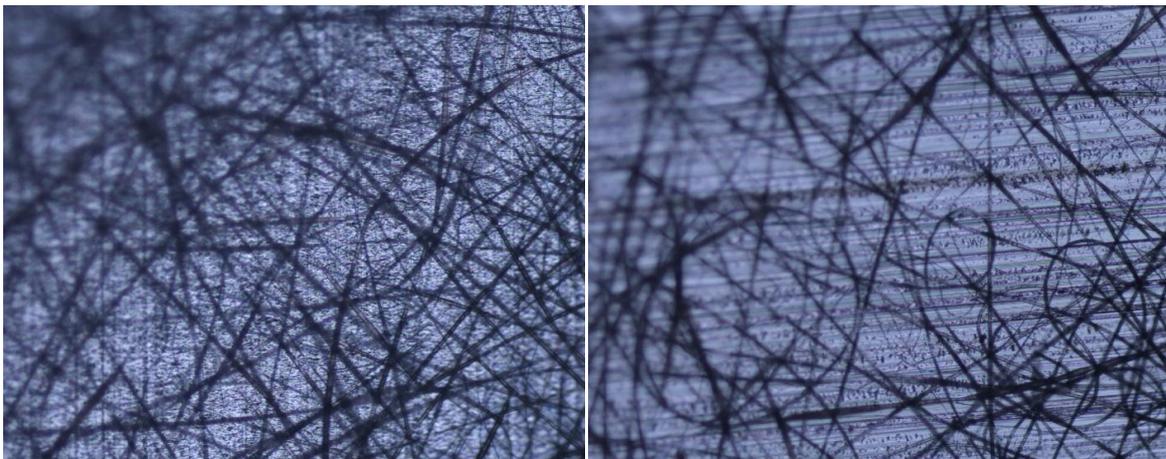
Conclui-se portanto que a 10 % de PCL, em deposições com duração média de quinze minutos, os melhores parâmetros foram: caudal de 0,6 mL/h e voltagem aplicada de 14 kV.



(a)

(b)

Figura 4.5- Concentração de PCL: 10 %. Tensão aplicada: 10 kV. Ampliação 10x. Caudal: (a) 0,4 mL/h; (b) 0,6 mL/h.



(a)

(b)

Figura 4.6- Concentração de PCL: 10 %. Tensão aplicada: 12 kV. Ampliação 10x. Caudal: (a) 0,4 mL/h; (b) 0,6 mL/h.

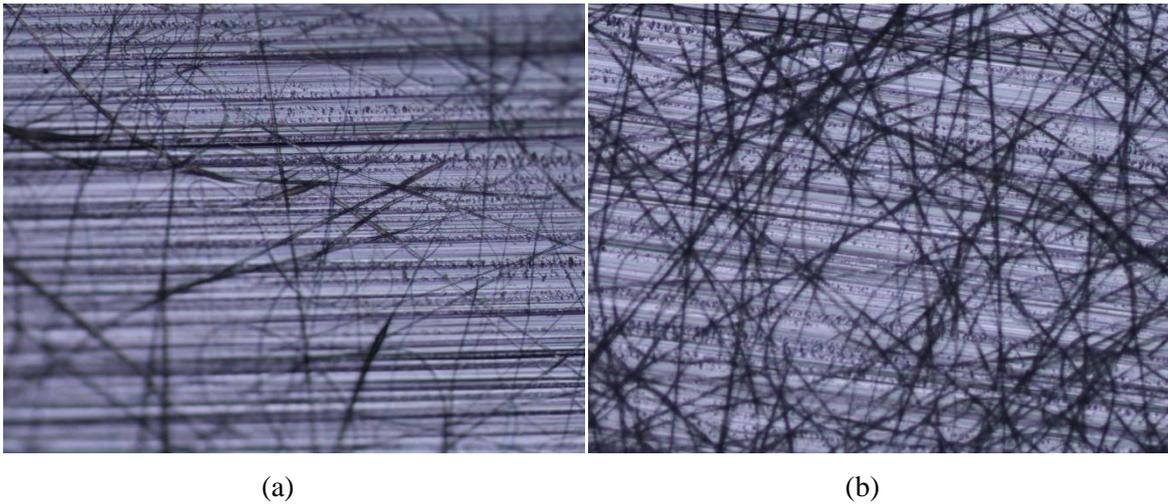


Figura 4.7- Concentração de PCL: 10 %. Tensão aplicada: 14 kV. Ampliação 10x. Caudal: (a) 0,4 mL/h; (b) 0,6 mL/h.

As imagens seguintes correspondem a deposições com concentrações de 15%, com uma tensão aplicada de 10, 12 e 14 kV, respectivamente. Variando o caudal pretendeu-se avaliar quais as condições que mais contribuem para a uniformidade do diâmetro das fibras.

As amostras obtidas com um caudal de 0.4 mL/h apresentaram um bom volume de fibras electrofiadas, embora exibissem uma grande variação no seu diâmetro. As deposições obtidas com um caudal de 0.6 mL/h e tensões de 10 ou 12 kV exibiram uma uniformidade do diâmetro das fibras melhor do que as obtidas com um caudal de 0.4 mL/h. A deposição da figura 4.9 (b) destaca-se, relativamente a todas as outras analisadas, por ter a maior uniformidade no diâmetro das fibras.

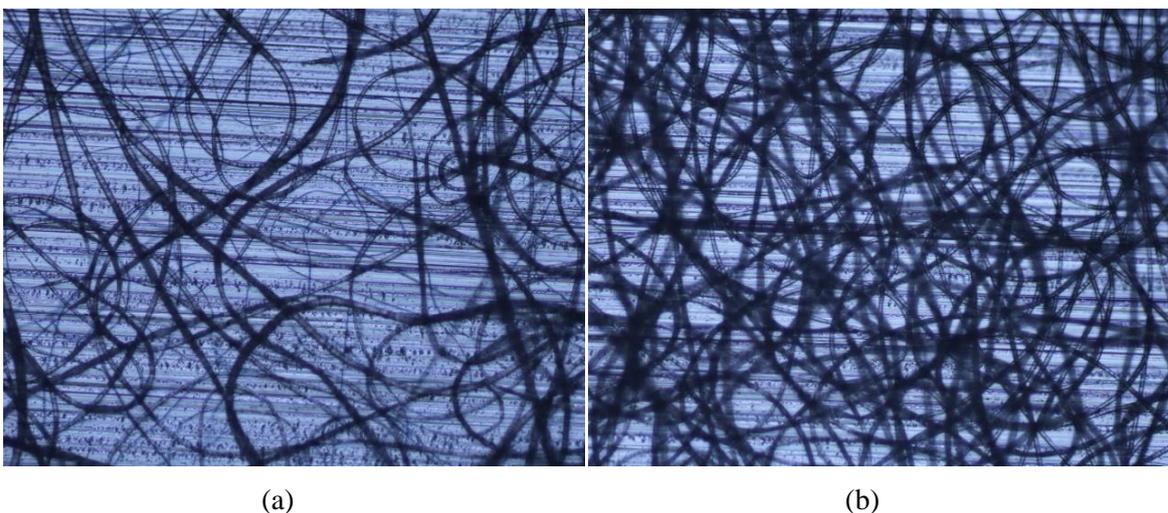


Figura 4.8- Concentração de PCL: 15 %. Tensão aplicada: 10 kV. Ampliação 10x. Caudal: (a) 0,4 mL/h; (b) 0,6mL/h.

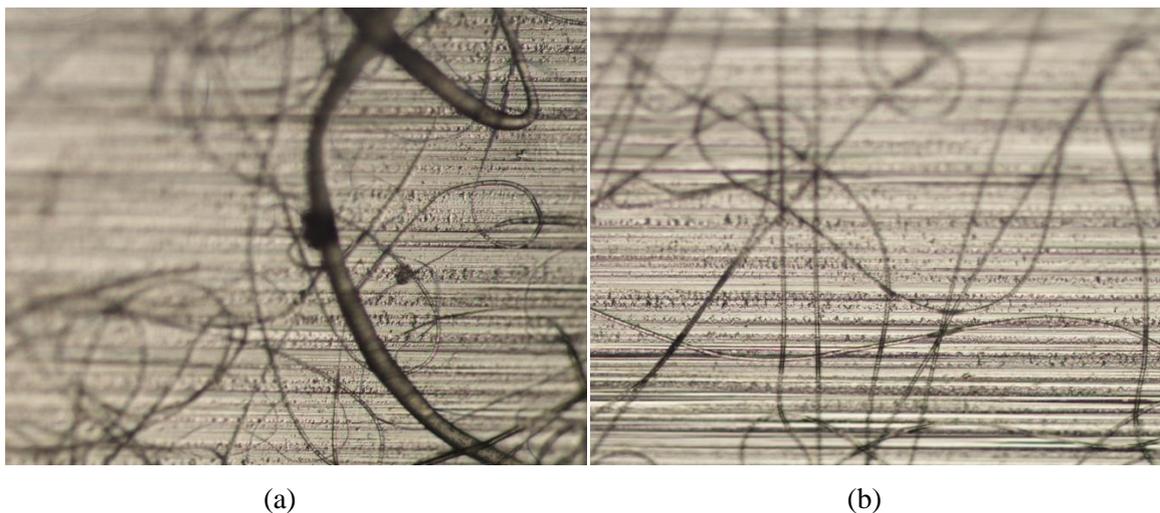


Figura 4.9- Concentração de PCL: 15 %. Tensão aplicada: 12 kV. Ampliação 10x. Caudal: (a) 0,4 mL/h; (b) 0,6mL/h.

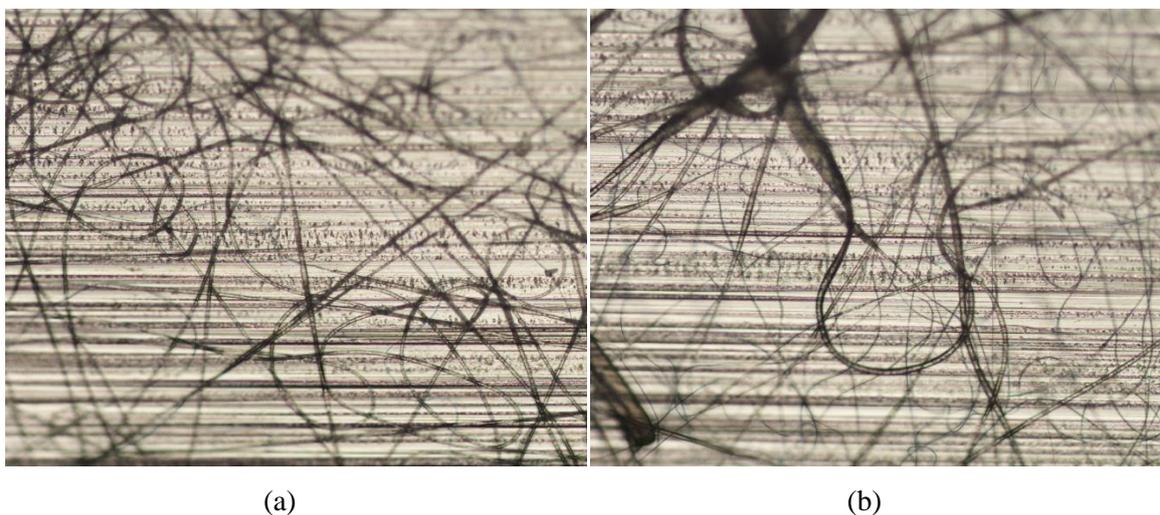


Figura 4.10- Concentração de PCL: 15%. Tensão aplicada: 14kV. Ampliação 10x. Caudal: (a) 0,4 mL/h; (b) 0,6 mL/h.

A análise sistemática destes parâmetros visou inferir quais as condições ideais para a produção das nanofibras tendo em conta a avaliação referente ao diâmetro (e à sua uniformidade) bem como a distribuição das fibras no colector. Nesse sentido, conclui-se que as condições que se apresentam como mais favoráveis à produção são as deposições com 15 % de PCL, com 25 cm de distância agulha-colector, tensão de 12 kV e caudal de 0,6 mL/h.

## 4.2 Proporção de policaprolactona e quitosano nas membranas

Para estabelecer a proporção de PCL e CS estabeleceu-se dez minutos de deposição de PCL como unidade de tempo. Os parâmetros de produção da electrofiação foram sempre mantidos constantes.

A densidade de solução polimérica é de  $1,40 \text{ g/cm}^3$  e o caudal da bomba ejetora é de  $0,6 \text{ mL/h}$  de PCL a 15%, conforme estabelecido anteriormente. Com base nestes dados seleccionou-se um tempo de deposição e calculou-se a quantidade de PCL depositada no colector.

O caudal de  $0,6 \text{ mL/h}$ , significa que em 60 minutos existem  $0,6 \text{ mL}$  de solução polimérica disponibilizada para electrofiação. Então, em 10 minutos há  $0,10 \text{ mL}$  de solução polimérica disponível. Os  $0,10 \text{ mL}$  expressam o volume da solução ejetada nesse intervalo de tempo. Através da densidade obteve-se a massa da solução.

$$\rho = \frac{M \text{ solução}}{V \text{ solução}} \leftrightarrow 1,40 \text{ g/mL} = \frac{M \text{ solução}}{0,10 \text{ mL}} \leftrightarrow M \text{ solução polimérica} = 0,14 \text{ g}$$

Foi necessário saber a quantidade de PCL presente naquela quantidade da solução, tendo em conta que havia 15% de PCL na solução polimérica inicial. Procedendo a um raciocínio análogo, se em  $0,14 \text{ g}$  de solução existem 15% de PCL, então o valor correspondente em massa será de  $0,021 \text{ g}$ .

Tabela 4.2-Massa de PCL na membrana em função do tempo de deposição

Tempo de deposição (min)	Volume de solução (mL)	Massa da solução (g)	Massa de PCL (g)
10	0,10	0,14	0,021

Pretendia-se colocar o CS sobre a matriz de PCL através do uso de uma peneira. Assim, foram realizadas vinte aplicações da peneira e determinou-se que cada uma corresponde a dispensar a massa de  $0,06 \text{ g}$  de CS. Esta quantidade é cerca de três vezes superior à quantidade de PCL dispensada em 10 minutos, pelo que se optou por reduzi-la através do uso de uma máscara que tapa cerca de dois terços da área da peneira. Desta forma a quantidade dispensada seria reduzida para cerca de um terço.

Com uma máscara a tapar parcialmente a peneira, deixando apenas uma área central descoberta com um raio de cerca de  $9 \text{ cm}$ , fizeram-se vinte novas medições na balança para se

poder comprovar a redução esperada de um terço da massa de CS peneirado. A pesagem média foi de 0,027 g, o que permite dispensar esta quantidade de CS por cada aplicação (ver tabela 4.3).

Tabela 4.3- Massa de CS dispensada em função da área da peneira

Modo de aplicação	Massa de CS depositada (g)
Sem máscara	0,06
Com “máscara”	0,027

As várias proporções de PCL e CS utilizadas foram obtidas variando o tempo da deposição e o número de vezes que foi utilizada a peneira (apetrechada com a máscara). Sabendo que em 10 minutos é depositado no colector 0,021 g de PCL, o tempo de deposição determina a quantidade de PCL depositada. Determinou-se assim, em termos relativos e aproximados, as proporções explicitadas na tabela 4.4. De referir que na última proporção entre cada deposição procederam-se a três utilizações da peneira consecutivas o que fez 111 aplicações: 37 (aplicações) x 3 (vezes cada utilização), isto é, entre duas camadas de deposição de PCL, foram depositadas 0,081 g de CS ( $3 \times 0,06 = 0,081$  g).

Tabela 4.4- Proporções PCL: CS.

Proporções PCL: CS	Deposição (minutos)	Massa PCL (g)	Aplicações com Peneira	Massa CS peneirado (g)
(1:1)	430	0,903	41	1,107
(1:0)	480	1,008	0	0
(3:1)	450	0,945	8	0,216
(3:2)	420	0,882	21	0,567
(1:3)	380	0,798	111	2,997

Nas diferentes proporções escolhidas para serem usadas foi tido em conta o provável enfraquecimento mecânico que a incorporação de CS poderia trazer às membranas, e por outro lado se considerar necessária uma quantidade não desprezável de CS em cada membrana.

### 4.3 Membranas de policaprolactona e quitosano

Após se terem estabelecido os valores dos parâmetros a usar, procedeu-se à produção das membranas de PCL e CS. A tabela que se segue resume as condições em que cada amostra foi obtida bem como a correspondente espessura.

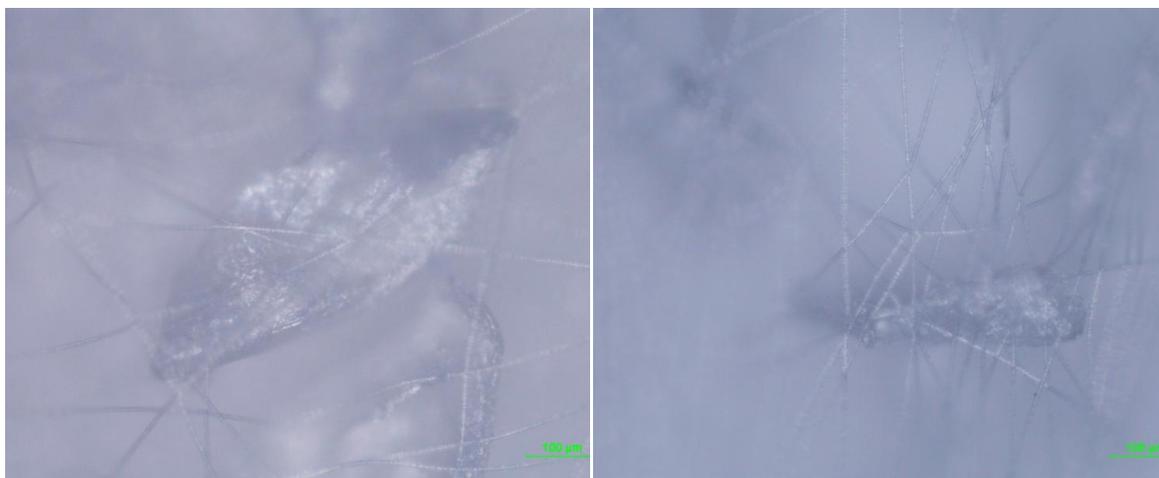
Tabela 4.5- Condições de obtenção das membranas e correspondente espessura.

Amostra	Proporções PCL:CS	Granulometria ( $\mu\text{m}$ )	Tempo de deposição (min.)	Massa PCL (g)	Massa CS (g)	Espessura média (mm)
1	1:1	100	420	0,882	1,107	0,227
2	1:0	200	480	1,008	0	0,149
3	3:1	200	450	0,945	0,216	0,115
4	3:2	200	420	0,882	0,567	0,131
5	1:1	200	430	0,903	1,107	0,243
6	1:3	200	380	0,798	2,997	0,379
7	1:1	300	380	0,798	0,999	0,266

Optou-se por efectuar um estudo mais dirigido para a granulometria de 200  $\mu\text{m}$  de CS, no entanto foram usadas também as granulometrias de 100 e 300  $\mu\text{m}$  correspondentes respectivamente às Amostras 1 e 7. As Amostras 2 a 6 têm uma proporção crescente de CS em relação ao PCL.

#### 4.3.1 Morfologia

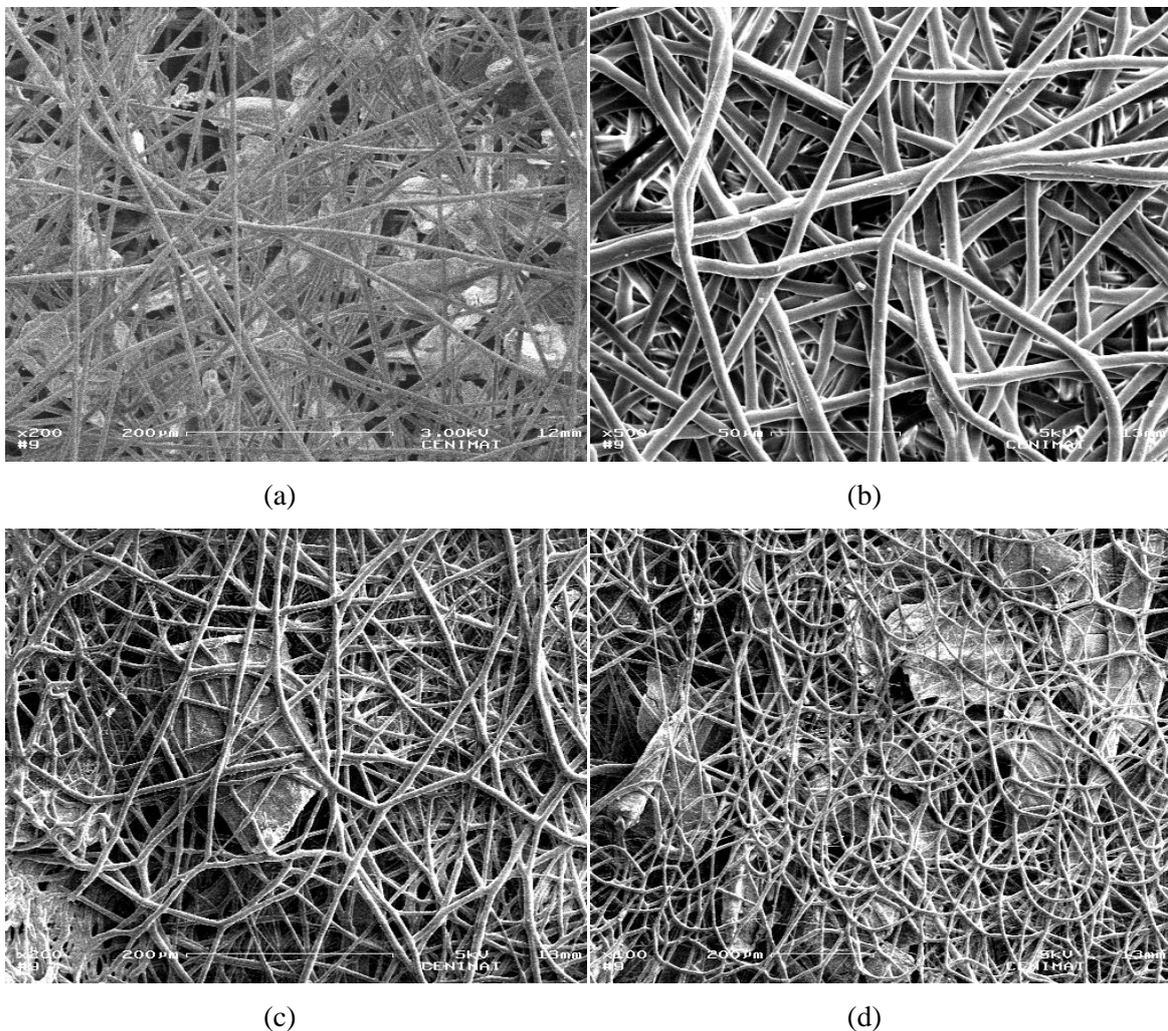
As observações das membranas ao microscópio óptico permitiram verificar a incorporação do CS nas matrizes de PCL. Na Figura 4.11 estão duas imagens representativas das membranas obtidas. Estas imagens obtidas com microscópio óptico (ampliação de 10x) pertencem a uma deposição com os parâmetros escolhidos para a realização do trabalho, nomeadamente: 15 % de concentração de PCL na solução polimérica, 12 kV de tensão aplicada e um caudal de 0,6 mL/h. Nas Figura 4.11 (a) e (b) pode observar-se um grão de CS na matriz formada pelas nanofibras de PCL.



(a) (b)  
Figura 4.11- Matrizes de PCL com grãos de CS incorporado.

A incorporação do CS nas matrizes foi melhor observada através de imagens obtidas por SEM (*Scanning Electron Microscope*). A figura 4.12 apresenta as imagens SEM de todas as membranas produzidas com diferentes proporções de CS, que se passam a referir pelo nome atribuído na tabela 4.5.

Do ponto de vista morfológico observou-se que o método utilizado foi eficaz na produção de matrizes de PCL em que o CS ficou incorporado numa estrutura tridimensional. De facto, os grãos de CS estavam intactos e envoltos nas fibras de PCL, tal como as imagens de microscopia óptica indicavam.



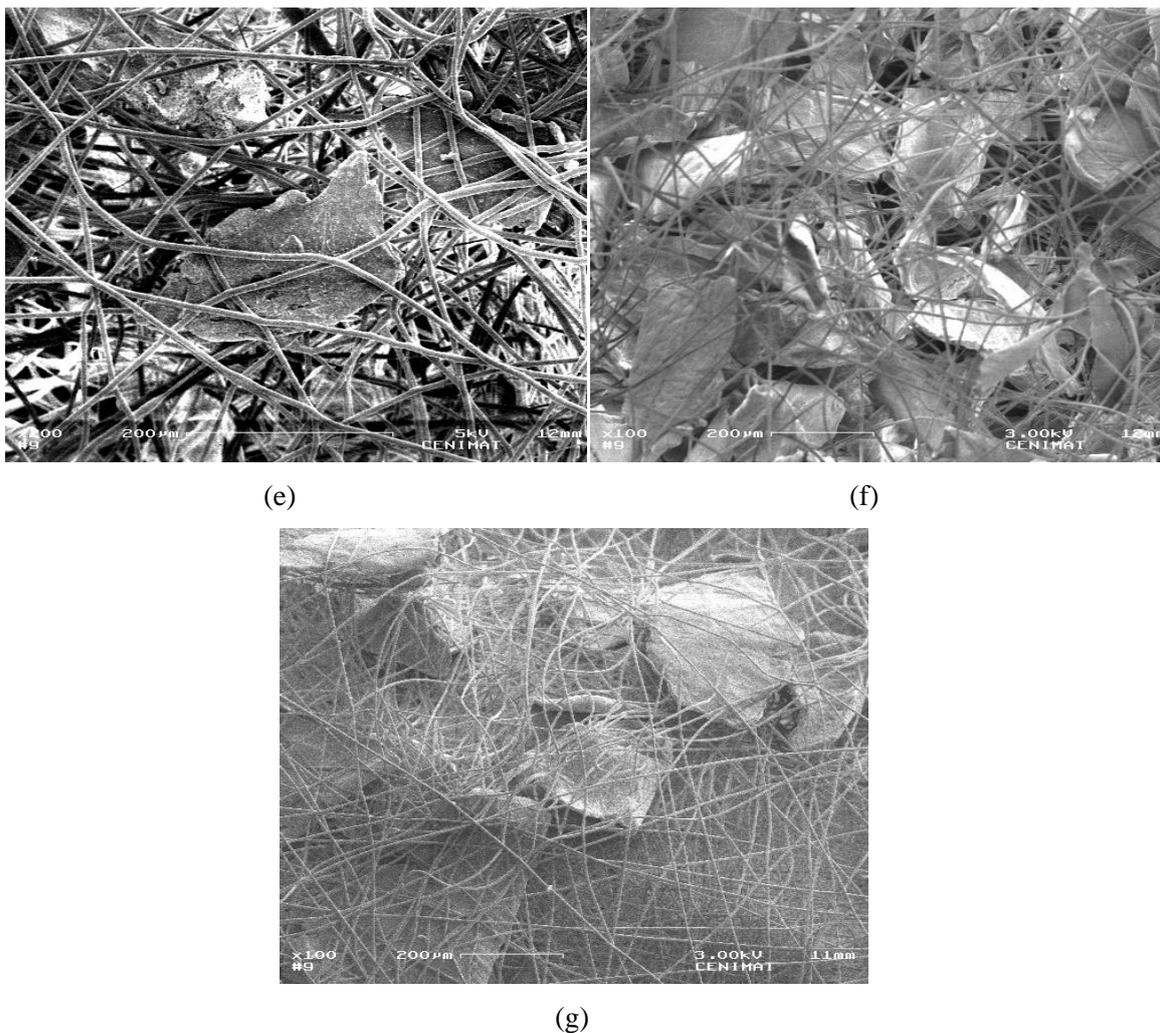


Figura 4.12- Imagens SEM de grãos de quitosano incorporados em diferentes proporções numa matriz de nanofibras de policaprolactona: (a) Amostra 1, ampliação x200; (b) Amostra 2, ampliação x500; (c) Amostra 3, ampliação x200; (d) Amostra 4, ampliação x100; (e) Amostra 5, ampliação x200; (f) Amostra 6, ampliação x100; (g) Amostra 7, ampliação x100.

O diâmetro das fibras foi calculado com recurso à aplicação informática ImageJ, estabelecendo um factor de conversão dos diâmetros das fibras medidas em pixéis nas imagens SEM. Foi considerado, para cada membrana, o valor médio de dez medições do diâmetro das fibras (ver tabela 4.6).

Ao analisar os valores obtidos para os diâmetros das fibras verificou-se que não variavam muito entre si, o que implica que as diferentes proporções e granulometrias de CS não influenciam este aspecto morfológico. De facto, o mais importante para a caracterização do diâmetro da fibra será a electrofiação da solução polimérica e os seus parâmetros que, ao serem constantes, contribuem assim para a pouca discrepância nestas medições.

Tabela 4.6- Diâmetro das membranas.

Amostra	Diâmetro médio ( $\mu\text{m}$ )	Desvio-padrão ( $\mu\text{m}$ )
1	5,5	0,9
2	7,2	0,9
3	7,4	1,6
4	7,5	0,9
5	7,2	1,2
6	7,5	1,2
7	6,1	0,9

#### 4.3.2 Caracterização mecânica - ensaios de tracção.

De cada membrana produzida foram retiradas amostras de 3x1 cm, que foram utilizadas para determinar o módulo de Young através de ensaios de tracção. Nas figuras seguintes (da 4.13 à 4.19) estão indicados gráficos representativos da deformação das membranas em função da força aplicada das 7 membranas produzidas.

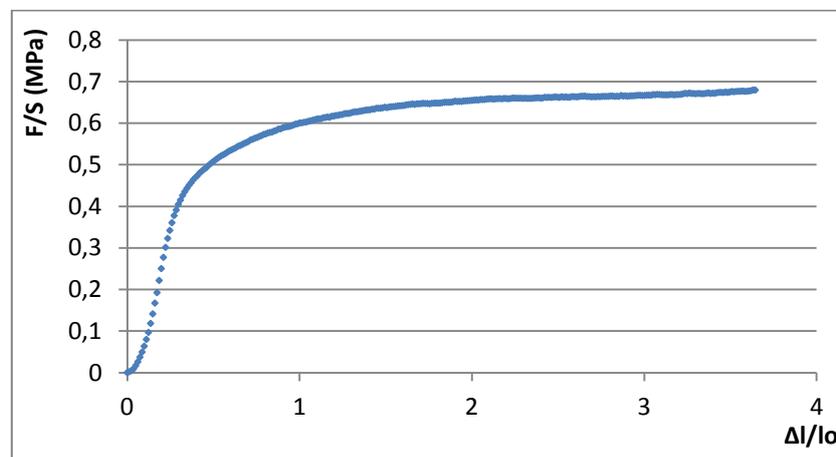


Figura 4.13- Gráfico da tensão em função da deformação; Amostra 1- PCL:CS 1:1, peneira 100.

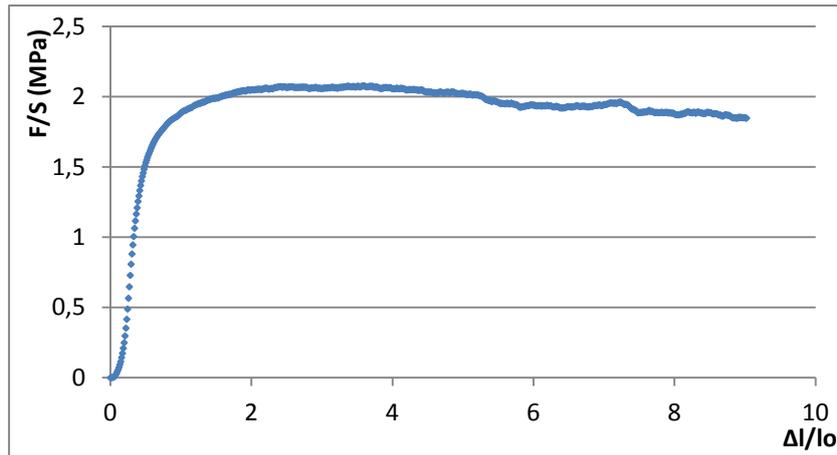


Figura 4.14- Gráfico da tensão em função da deformação; Amostra 2- PCL:CS 1:0, peneira 200.

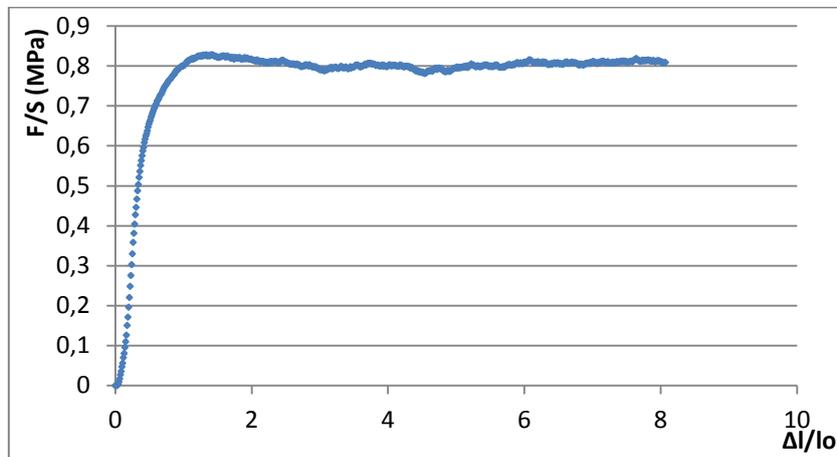


Figura 4.15- Gráfico da tensão em função da deformação; Amostra 3- PCL:CS 3:1, peneira 200.

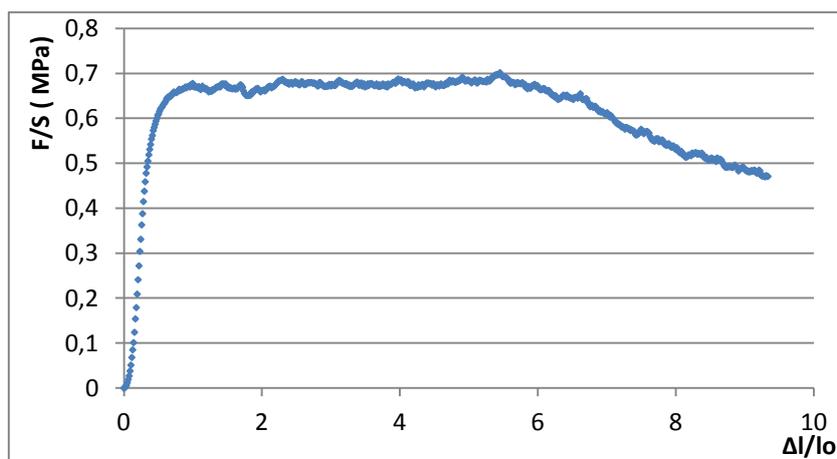


Figura 4.16- Gráfico da tensão em função da deformação; Amostra 4- PCL:CS 3:2, peneira 200.

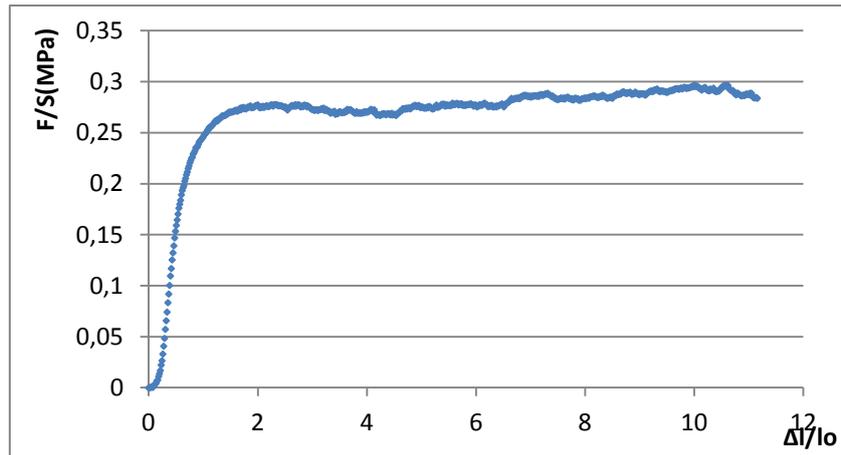


Figura 4.17- Gráfico da tensão em função da deformação; Amostra 5- PCL:CS 1:1, peneira 200.

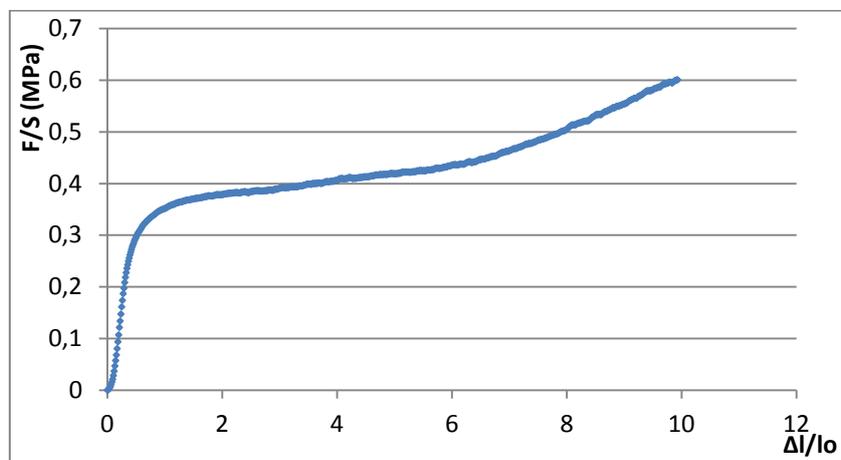


Figura 4.18- Gráfico da tensão em função da deformação; Amostra 6- PCL:CS 1:3, peneira 200.

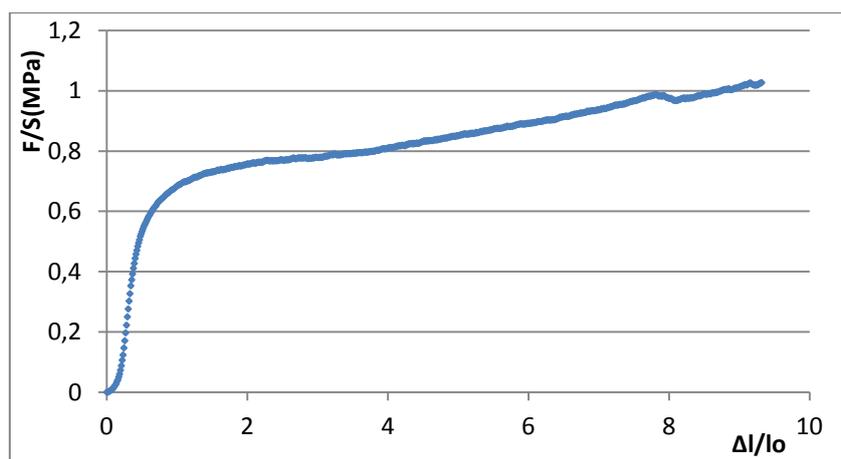


Figura 4.19- Gráfico da tensão em função da deformação; Amostra 7- PCL:CS 1:1, peneira 300.

Verificou-se que as amostras não atingiram a ruptura ainda que tenham sido deformadas a toda a extensão que o equipamento permitia (cerca de 10 cm). Isto por si só indicava uma boa flexibilidade e resistência ao manuseamento.

O módulo de Young foi determinado a partir da relação linear da região elástica identificada em cada gráfico da tensão em função da deformação. Os valores do módulo de Young de cada membrana foram determinados e são os que constam nas tabelas 4.7 e 4.8.

Tabela 4.7- Módulos de Young das membranas de PCL e CS com granulometria de 200  $\mu\text{m}$  e com concentrações de CS crescentes em relação ao PCL (Amostras 2 a 6, respectivamente).

Amostras	Módulos de Young (MPa)	Desvio-Padrão
2	7,12	2,54
3	1,98	0,88
4	2,7	1,6
5	0,78	0,25
6	0,86	0,16

Tabela 4.8- Módulos de Young das membranas de PCL e CS na proporção de 1:1 com granulometrias de 100, 200 e 300  $\mu\text{m}$  (Amostras 1, 5 e 7, respectivamente).

Amostras	Módulos de Young (MPa)	Desvio-Padrão
1	2,46	0,44
5	0,78	0,25
7	1,6	0,42

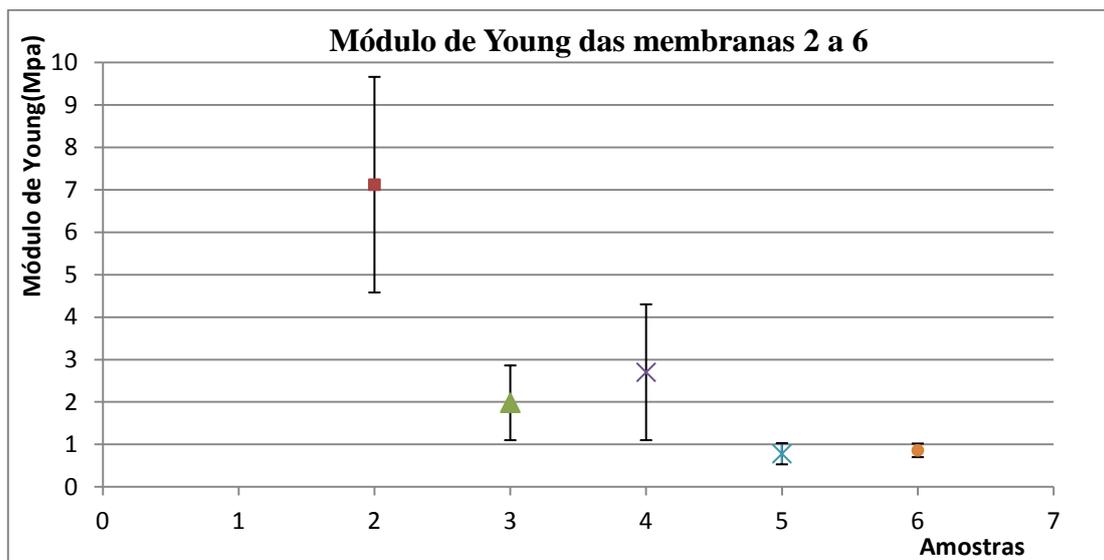


Figura 4.20- Gráfico dos módulos de Young das membranas de PCL e CS com granulometria de 200  $\mu\text{m}$  e com concentrações de CS crescentes em relação ao PCL (Amostras 2 a 6, respectivamente).

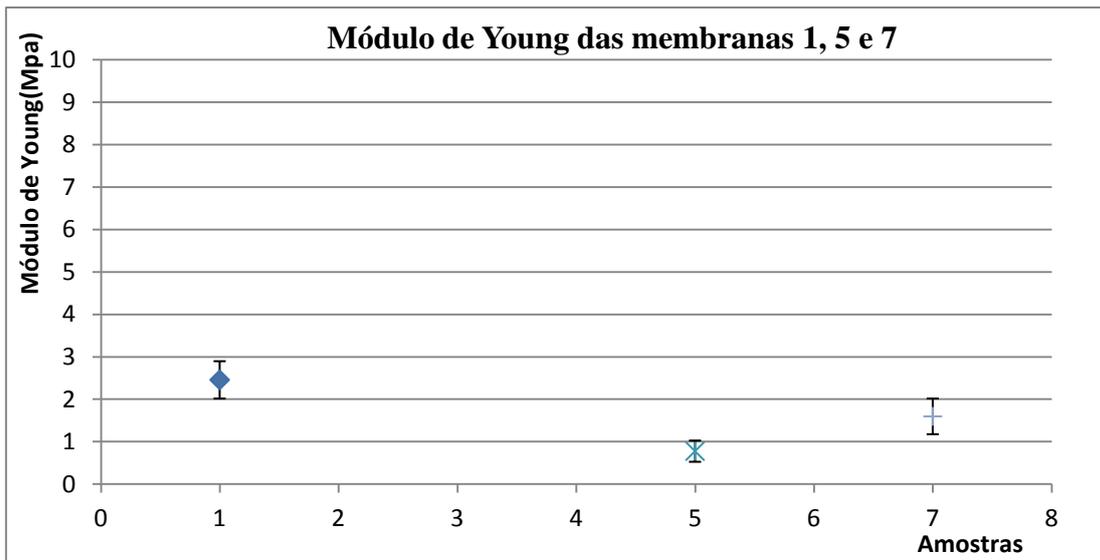


Figura 4.21-Gráfico dos módulos de Young das membranas de PCL e CS na proporção de 1:1 com granulometrias de 100, 200 e 300  $\mu\text{m}$  (Amostras 1, 5 e 7, respectivamente).

No que diz respeito aos valores obtidos para o módulo de Young, a incorporação de CS teve uma influência directa, pois a sua contribuição não modificou as propriedades químicas nem a formação dos poros aquando do processo de electrofiação mas, devido ao seu tamanho, que é maior do que o das fibras de PCL, fez com que a espessura das amostras aumentasse, para a mesma quantidade de PCL. Assim o módulo de Young diminuiu com o aumento da concentração do CS. Esta diminuição do módulo de Young comparativamente à deposição correspondente à amostra 2, que foi a que teve, confirmando o previsto, o maior módulo de Young, deve-se ao facto de o CS, na forma de grânulo, não contribuir para a resistência à tracção das membranas. As outras deposições tiveram um módulo de Young mais baixo confirmando a tendência de diminuição deste valor sempre que se integrou CS nas membranas.

Os resultados obtidos para o módulo de Young nas amostras com a mesma proporção entre CS e PCL não foram conclusivos. No entanto verificou-se, por observação das tabelas 4.7 e 4.8, que os valores obtidos são da mesma ordem de grandeza.

### 4.3.3 Caracterização físico-química - hidrofiliçidade

A hidrofiliçidade estudada baseia-se na medição dos ângulos de contactos entre uma gota de água e as amostras das matrizes produzidas.

Para cada membrana foram feitas doze medições de ângulos de contacto obtidos através da aplicação CAM100. Os dados apresentados nas tabelas seguintes dizem respeito às médias dessas doze medições.

Tabela 4.9- Ângulo de contacto das matrizes de PCL e CS com granulometria de 200  $\mu\text{m}$  e com concentrações de CS crescentes em relação ao PCL.

Amostras	Ângulos de contacto (°)	Desvio-padrão (°)
2	120,1	1,9
3	121,5	1,9
4	121,7	0,8
5	121,0	2,3
6	122,7	1,6

Tabela 4.10- Ângulo de contacto das matrizes de PCL e CS na proporção de 1:1 com granulometrias de 100, 200 e 300  $\mu\text{m}$  (Amostras 1, 5 e 7, respectivamente).

Amostras	Ângulos de contacto (°)	Desvio-padrão (°)
1	124,3	1,3
5	121,0	2,3
7	121,0	2,3

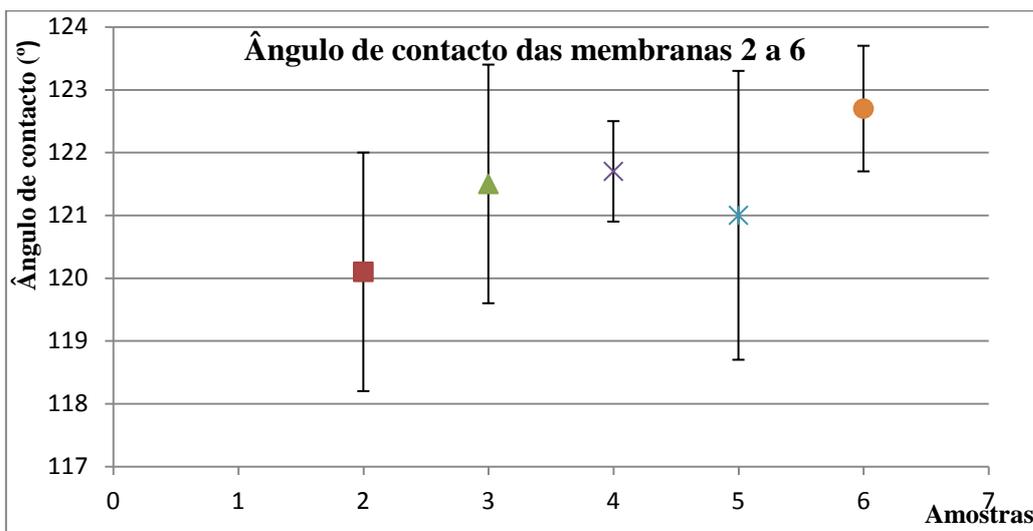


Figura 4.22- Gráfico dos ângulos de contacto das matrizes de PCL e CS com granulometria de 200  $\mu\text{m}$  e com concentrações de CS crescentes em relação ao PCL.

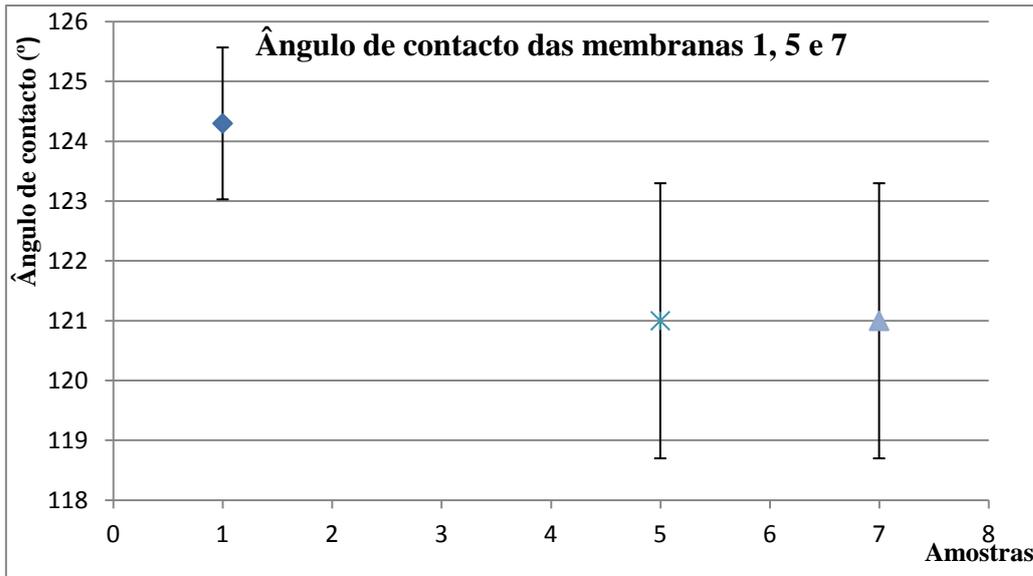


Figura 4.23- Gráfico dos ângulos de contacto das matrizes de PCL e CS na proporção de 1:1 com granulometrias de 100, 200 e 300  $\mu\text{m}$  (Amostras 1, 5 e 7, respectivamente).

Verifica-se, por observação das tabelas 4.9 e 4.10 e das figuras 4.22 e 4.23, que a incorporação do quitosano no PCL e a variação da proporção de incorporação não influenciaram o carácter hidrofóbico das matrizes, pois os ângulos de contacto variaram entre os 121° e os 125°.

#### 4.3.4 Caracterização morfológica - porosidade

A porosidade é uma característica importante das nanofibras. De seguida pretende-se estudá-la e saber se a variação das proporções entre o PCL e o CS influencia os valores obtidos. Para obter a porosidade foi necessário calcular a densidade aparente, que se obteve através da medição do volume e do peso de uma amostra de 2x2 cm de cada deposição. A densidade do material depende da massa do PCL e do CS, e do volume do PCL e do CS, característicos de cada deposição.

As porosidades das amostras revelaram valores elevados, na ordem dos 80 %, que estão de acordo com este tipo de matriz [10]. A variação das proporções de quitosano não influenciou estes valores pois os resultados não diferiram significativamente.

Tabela 4.11- Porosidade das Matrizes de PCL e CS.

Amostras	Porosidade
1	83,5
2	80,8
3	79,4
4	81,5
5	82,7
6	82,3
7	86,0

Os valores obtidos foram bastante satisfatórios pois a porosidade é uma característica essencial para a proliferação celular.

#### 4.4 Testes de cultura celular

Foram efectuados testes de cultura celular nas sete membranas em estudo, com o objectivo de estabelecer o método de sementeira, observação e análise da adesão e proliferação celular.

As membranas, dispostas sobre lamelas circulares de 12 mm de diâmetro, foram introduzidas em poços numa placa de cultura com um total de vinte e quatro poços. Antes da sementeira as membranas estiveram mergulhadas em meio de cultura cerca de quinze minutos com o objectivo de aumentar a sua hidrofiliçidade. Após a sementeira as células foram cultivadas por um período de 48 horas em que o meio foi substituído a cada vinte e quatro horas. Foram ainda usados dois poços para cultivar células de controlo. No final, as lamelas foram retiradas e observadas ao microscópio de fluorescência e ao microscópio confocal.

As observações com o microscópio de fluorescência permitiram verificar a existência de um número de células bastante superior ao inicial, evidenciando assim a proliferação que existiu durante o tempo de cultura. Apesar de ser evidente a existência de células em vários planos focais, não foi possível identificar o material a que aderiram e assim verificar a capacidade das membranas em favorecer a adesão. Com a utilização do microscópio confocal de fluorescência foi possível observar com mais detalhe a cultura celular nas membranas.

Na figura 4.24 (a) apresenta-se uma imagem obtida por microscopia confocal da cultura de controlo, onde se podem observar as células marcadas com a cor verde. A quantidade de

células observadas permitiu concluir que, nos poços de controlo, a cultura foi viável e que as células tiveram uma boa adesão e proliferação.

A figura 4.24 (b) corresponde a uma imagem obtida por microscopia confocal da lamela com a membrana correspondente a uma proporção entre PCL e CS de 3:1. Nela podem-se observar as células e os grãos de CS, respectivamente em cor verde e azul.

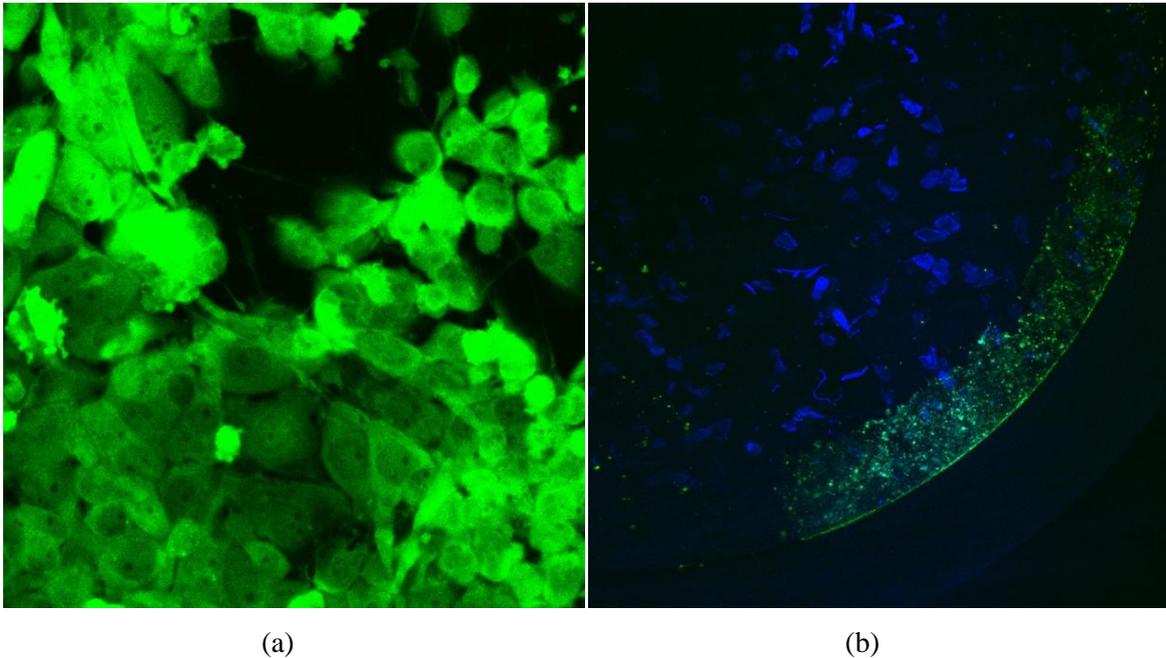


Figura 4.24- Microscopia confocal de cultura celular: a) controlo positivo; b) Matriz PCL:CS 3:1.

Foram então preparadas novas membranas que estiveram imersas em meio de cultura durante três dias antes da sementeira para as tornar mais hidrofílicas. As restantes condições de cultura foram mantidas constantes.

Ao fim de 48 horas de cultura as membranas foram retiradas dos poços, colocadas sobre lâminas e observadas ao microscópio. Desta forma eliminou-se a possibilidade de observação de células em suspensão ou aderentes aos próprios poços.

As imagens das figuras 4.25 e 4.26 foram construídas através da composição de imagens de microscopia de fluorescência confocal e de contraste de fase, e permitem observar a existência efectiva de células (a verde) aderentes às fibras.

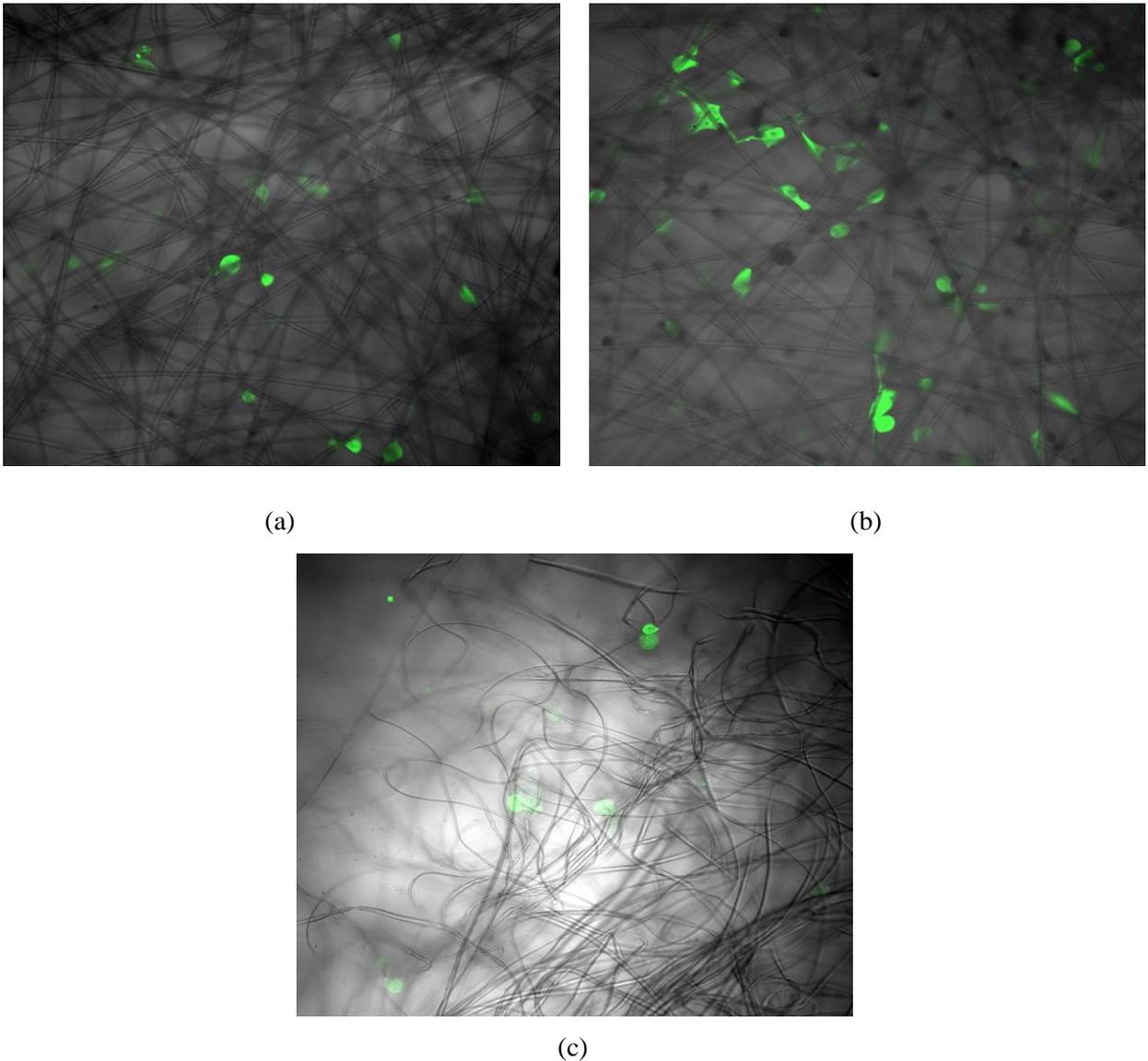


Figura 4.25- Microscopia confocal composta, Granulometria 200  $\mu\text{m}$ : a) Matriz PCL: CS 1:0; b) Matriz PCL: CS 3:1; (c) Matriz PCL: CS 1:3

As imagens da figura 4.25 correspondem às membranas constituídas pela mesma granulometria mas com diferentes proporções de quitosano (proporções crescentes de (a) para (c)). Verifica-se que o número insuficiente de células identificadas em cada imagem e a não identificação de grãos de quitosano dificultam o estabelecimento de uma relação entre a proporção de quitosano nas membranas e a adesão e proliferação celular.

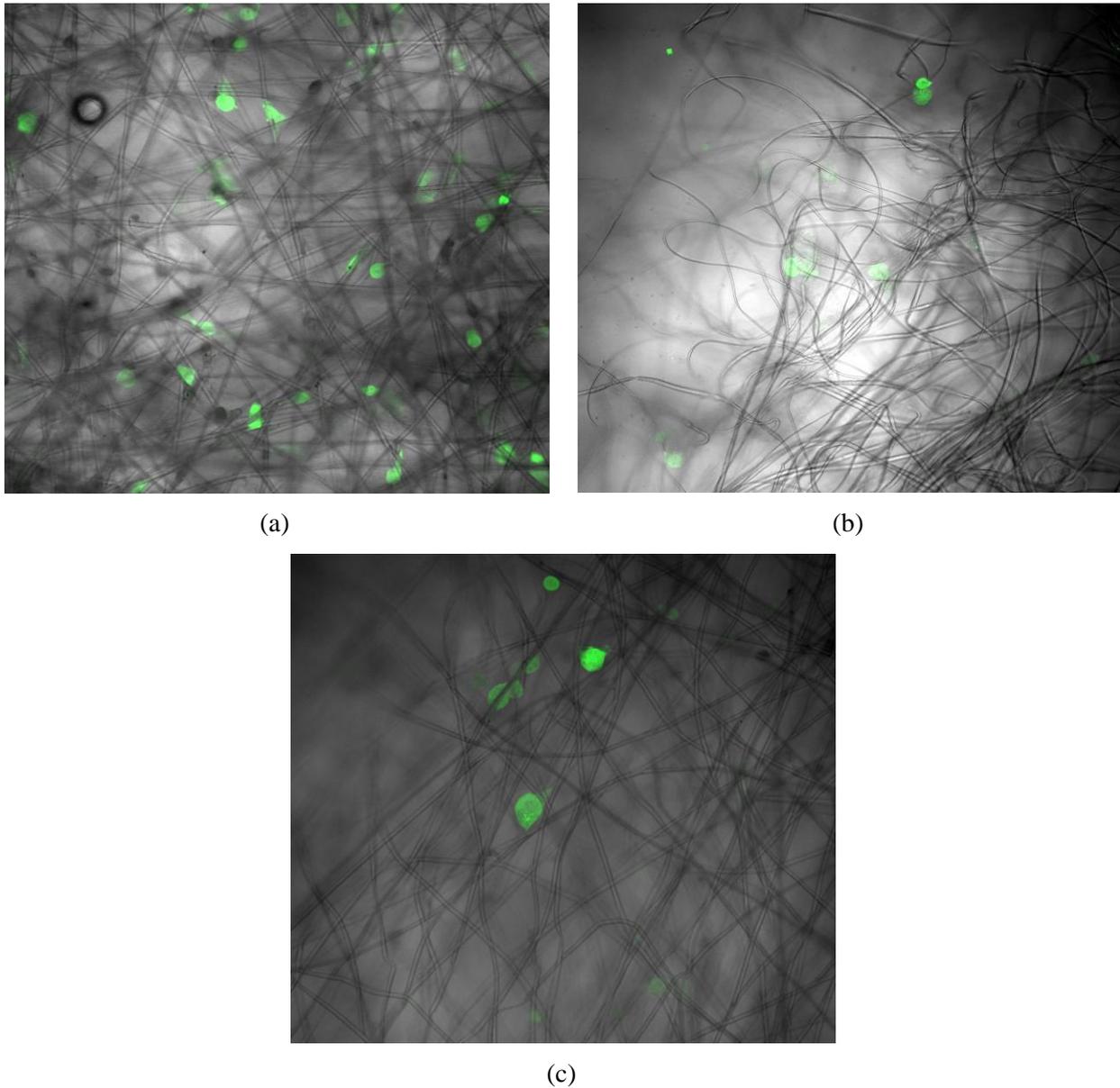


Figura 4.26- Microscopia confocal composta: a) Matriz PCL: CS 1:1, granulometria 100  $\mu\text{m}$ ; b) Matriz PCL: CS 1:3, granulometria 200  $\mu\text{m}$ ; c) PCL: CS 1:1, granulometria 300  $\mu\text{m}$

Nas membranas representadas na Figura 4.26 a proporção de quitosano e PCL é de 1:1 e a granulometria do quitosano varia (aumenta de (a) para (c)). Também nestas imagens não foram observados grãos de quitosano, pelo que são inconclusivas quanto à influência da granulometria na adesão e proliferação celular.

## 5 Conclusões e Perspectivas

Dadas as dificuldades em electrofiar uma solução polimérica constituída por policaprolactona (PCL) e quitosano (CS), neste trabalho utilizou-se uma abordagem diferente para se obter uma membrana com os dois polímeros. Assim, o principal objectivo deste trabalho consistiu no desenvolvimento duma metodologia em que os grãos de CS fossem incorporados na matriz produzida durante o processo de electrofiação de uma solução polimérica apenas constituída por PCL.

Numa fase inicial foram efectuadas experiências que permitiram aferir as melhores condições de produção das matrizes de PCL, tendo como critérios a maior aleatoriedade na distribuição das fibras na matriz, bem como a uniformidade do seu diâmetro. Nessa fase concluiu-se que os valores dos parâmetros de produção com que se obtiveram matrizes com melhor qualidade foram: distância entre a agulha do sistema de electrofiação e o colector de 25 cm; tensão a aplicar entre a agulha e o colector de 12 kV; e o caudal de solução polimérica de PCL a usar de 0.6 mL/h.

Depois de escolhidos os parâmetros de produção das matrizes desenvolveu-se um método para incorporar grãos de CS, de diferentes dimensões, durante o processo de electrofiação do PCL. O método permitiu obter membranas com várias proporções de CS em PCL e com diferentes granulometrias de CS para a mesma proporção (1:1), que foram testadas quanto às suas propriedades mecânicas, físico-químicas e morfológicas. Através das imagens SEM pôde observar-se a envolvimento dos grãos do CS nas fibras electrofiadas de PCL, corroborando esta técnica de produção como meio eficaz e sistemático de produção de membranas de PCL com a incorporação de CS.

Relativamente às propriedades mecânicas, os testes efectuados mostraram que todas as membranas produzidas apresentaram uma boa flexibilidade e resistência mecânica, pois em nenhum dos testes de tracção houve ruptura.

No que diz respeito à hidrofobicidade, foram realizados testes que revelaram o carácter hidrofóbico das membranas. Tanto a incorporação do CS em diferentes proporções como a utilização de CS de diferentes granulometrias conduziram a valores de ângulo de contacto

semelhantes aos obtidos nas membranas com apenas PCL. Este é um aspecto negativo que deverá ser tido em conta no processo de sementeira celular.

Nas experiências para determinar a porosidade das membranas obtiveram-se valores elevados, naturalmente uma constatação importante na criação de condições para potenciar a proliferação celular.

Do ponto de vista das propriedades mecânicas verificou-se que as membranas produzidas mantiveram as mesmas boas características das membranas de PCL. Ao manterem a sua integridade e flexibilidade as membranas revelaram-se assim adequadas para resistirem à manipulação inerente à sua utilização como substitutos de pele.

O actual método, manual, de dispensar o CS a incorporar, revelou-se capaz de produzir bons resultados. No entanto haverá grandes vantagens, no futuro, em ter um sistema que permita, de forma mais controlada e até eventualmente automática, dispensar o CS a incorporar.

Nos testes de cultura celular verificou-se uma boa viabilidade nas células cultivadas nos poços de controlo, evidenciando uma adequada manipulação e esterilização das membranas e dos meios de cultura, validando assim o método utilizado.

O carácter hidrofóbico das membranas foi evidente nas primeiras observações das culturas, que foram feitas por microscopia confocal com as membranas no interior dos poços de cultura. Posteriormente a composição de imagens obtidas por microscopia confocal e de contraste de fase das membranas já fora dos poços permitiu verificar que as células aderiram às fibras de PCL, mas não foi possível observar se o mesmo aconteceu em relação aos grãos de CS.

A hidrofiliabilidade das membranas pode ser aumentada diminuindo a espessura da última camada de PCL por forma a que os grãos de CS fiquem mais próximos da superfície. A diminuição da espessura obtém-se reduzindo o tempo de electrofiação do PCL, devendo haver o cuidado de estabelecer uma espessura mínima que garanta a necessária contenção dos grãos de CS no interior da membrana.

As técnicas microscópicas utilizadas revelaram-se pouco adequadas à observação quantitativa da adesão e da proliferação celular. Uma das técnicas que se poderá utilizar no futuro é o ensaio colorimétrico do tipo MTS ou MTT, que permite a quantificação do número de células vivas nas membranas.

Com a realização deste trabalho foram desenvolvidos métodos para a produção de membranas de PCL por electrofiação com incorporação de CS. Os resultados dos testes e ensaios feitos às membranas permitem antever que a abordagem usada possa contribuir de forma positiva para a aplicação destes biopolímeros como substitutos de pele no âmbito da Engenharia de Tecidos.

## Bibliografia

1. Alberts, B., et al., *Cell Junctions, Cell Adhesion and the Extracellular Matrix*, in *Molecular Biology of the Cell*. 2008, Garland Science, Taylor & Francis Group: New York.
2. Morrison, R. and R. Boyd, *Macromoléculas. Polímeros e Polimerização*, in *Química Orgânica*, F.C. Gulbenkian, Editor. 1996: Lisboa. p. 1207-1237.
3. Fambri, L., et al., *Biodegradable Polymers*, in *Integrated Biomaterials Science*, R. Barbucci, Editor. 2002, Kluwer Academic Publishers Siena. p. 119-187.
4. Puppi, D., et al., *Polymeric materials for bone and cartilage repair*. *Progress in Polymer Science*, 2010. **35**(4): p. 403–440.
5. Salgado, C.L., et al., *Characterization of chitosan and polycaprolactone membranes designed for wound repair application*. *Journal of Materials Science*, 2011.
6. Wan, Y., et al., *Development of polycaprolactone/chitosan blend porous scaffolds*. *Journal of Materials Science*, 2008. **20**: p. 719-724.
7. Rinaudo, M., *Characterization and Properties of Some Polysaccharides Used as Biomaterials*. *Macromolecular Symposia*, 2006. **245-246**(1): p. 549-557.
8. Malheiro, V.N., et al., *New poly( $\epsilon$ -caprolactone)/chitosan blend fibers for tissue engineering applications*. *Acta Biomaterialia*, 2010. **6**: p. 418-428.
9. Ulery, B.D., L.S. Nair, and C.T. Laurencin, *Biomedical Applications of Biodegradable Polymers*. *JOURNAL OF POLYMER SCIENCE PART B: POLYMER PHYSICS*, 2011. **49**: p. 832-864.
10. Wutticharoenmongkol, P., et al., *Novel Bone Scaffolds of Electrospun Polycaprolactone Fibers Filled with Nanoparticles*. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*, 2006. **6**: p. 514-522.
11. Ramakrishna, S., et al., *Basics Relevant to Electrospinning*, in *An Introduction to Electrospinning and Nanofibers*. 2005, World Scientific Publishing Co. Pte. Ltd.: Singapore. p. 69-73.
12. Henriques, C., et al., *A Systematic Study of Solution and Processing Parameters on Nanofiber Morphology Using a New Electrospinning Apparatus*. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*, 2008. **8**: p. 1-11.

13. Heikkilä, P. and A. Harlin, *Parameter study of electrospinning of polyamide-6*. European Polymer Journal, 2008. **44**: p. 3067–3079.
14. Subbiah, T., et al., *Electrospinning of Nanofibers*. Journal of Applied Polymer Science, 2005. **96**: p. 557–569.
15. Theron, S.A., E. Zussman, and A.L. Yarin, *Experimental investigation of the governing parameters in the electrospinning of polymer solutions*. Polymer, 2004. **45**: p. 2017–2030.
16. Vidinha, R.J.F., *Misturas poliméricas ternárias para a produção de nanofibras destinadas a aplicações cutâneas*. 2008, FCT/UNL: Lisboa.
17. Botequim, D.J.R., *Matrizes de nanofibras de quitosano para aplicação como substituto da pele*. 2009, FCT/UNL: Lisboa.
18. Wikipédia. *Módulo de Young*. 2011; Available from: [http://pt.wikipedia.org/wiki/M%C3%B3dulo\\_de\\_elasticidade](http://pt.wikipedia.org/wiki/M%C3%B3dulo_de_elasticidade).
19. Correia, N., et al., *PAPEL INTERACTIVO – PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE DISPOSITIVOS ELECTROCRÓMICOS EM PAPEL*. Ciência & Tecnologia dos Materiais, 2009. **21**.
20. Chong, E.J., et al., *Evaluation of electrospun PCL/gelatin nanofibrous scaffold for wound healing and layered dermal reconstitution*. Acta Biomaterialia, 2007. **3**: p. 321–330.