



**Ana Espiga Machado**

Licenciada em Engenharia Biológica

## **Produção de Matrizes à Base de Quitosano para o Tratamento de Feridas**

Dissertação para obtenção do Grau de Doutor em  
Ciência e Engenharia de Materiais

Orientador: Professor Doutor João Paulo Borges,  
FCT/UNL

Co-orientador: Professor Doutor Jorge Carvalho Silva,  
FCT/UNL

Co-orientador: Doutor Eduardo Ascenso Pires,  
CERAMED

Júri:

Presidente: Professor Doutor Fernando Manuel dos Anjos Henriques

Arguentes: Professora Doutora Maria Helena Mendes Gil  
Doutor Pedro Lopes Granja

Vogais: Professora Doutora Maia Teresa Varanda Cidade  
Professor Doutor Jorge Alexandre Monteiro Carvalho Silva  
Professor Doutor João Paulo Miranda Ribeiro Borges  
Professor Doutor António Alfredo Coelho Jacinto  
Doutor Carlos Manuel Mendes Novo



**FACULDADE DE  
CIÊNCIAS E TECNOLOGIA  
UNIVERSIDADE NOVA DE LISBOA**

**Junho de 2014**





**Ana Espiga Machado**

Licenciada em Engenharia Biológica

## **Produção de matrizes à base de quitosano para o Tratamento de Feridas**

Dissertação para obtenção do Grau de Doutor em  
Ciência e Engenharia de Materiais

Orientador: Professor Doutor João Paulo Borges,  
FCT/UNL

Co-orientador: Professor Doutor Jorge Carvalho Silva,  
FCT/UNL

Co-orientador: Doutor Eduardo Ascenso Pires,  
CERAMED

**FCT** FACULDADE DE  
CIÊNCIAS E TECNOLOGIA  
UNIVERSIDADE NOVA DE LISBOA

**Junho de 2014**







Produção de Matrizes à Base de Quitosano para o Tratamento de Feridas

"Copyright" em nome de Ana Espiga Machado, da FCT/UNL e da UNL.

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.



*Science may be described as the art of systematic over-simplification - the art of discerning what we may with advantage omit.*

Karl Popper



## Agradecimentos

Esta dissertação é o resultado de uma etapa importante da minha vida pessoal e profissional. Aqui quero agradecer a todos os que deram o seu contributo para que esta trabalho fosse agora concluído.

Agradeço ao Professor João Paulo Borges e ao Professor Jorge Carvalho Silva pelo acompanhamento e por tudo o que aprendi com as suas orientações ao longo destes anos. Agradeço também ao Doutor Eduardo Ascenso Pires não só pela oportunidade de realizar este trabalho na Ceramed, com todo o enriquecimento que isso trouxe a esta experiência, como também pelo apoio pessoal que me deu ao longo deste tempo.

Agradeço a todos os meus colegas da Ceramed e da FCT/UNL pela amizade, companheirismo e ensinamentos diários durante este trabalho.

Agradeço à Doutora Angélica Roberto por todo o apoio e trabalho com os ensaios *in vivo*, à Doutora Manuela Mafra pelo trabalho de histologia, essencial para este estudo, à Professora Gabriela Rodrigues e ao Professor Gabriel Martins pelo apoio e ensinamentos com a experimentação *in vitro*. Agradeço ainda ao Professor Ilídio Correia pela colaboração no teste de desempenho do hidrogel e ao Doutor Carlos Novo pelas facilidades concedidas na utilização das instalações e recursos do LNEG. Todos estes apoios foram essenciais no enriquecimento e crescimento não só desta dissertação, como também nas minhas próprias qualidades.

À minha família e amigos o meu simples e infinito obrigada. Cada hora deste trabalho só foi possível por estarem comigo incondicionalmente.



## Resumo

A pele é o maior órgão do corpo humano cuja função é comprometida pela ocorrência de feridas. O tratamento de feridas representa uma fracção considerável dos gastos em saúde, sendo o desenvolvimento de novos métodos de tratamento alvo de grande interesse. Uma das vertentes desta investigação é a utilização de novas matérias-primas na produção de dispositivos médicos (DM) para o tratamento de feridas. O quitosano é um derivado da quitina, o segundo biopolímero mais abundante. As propriedades biológicas do quitosano tornam-no um bom candidato à produção de dispositivos médicos.

Este trabalho teve como objectivo o desenvolvimento de DM para o tratamento de feridas à base de quitosano. Foram desenvolvidos três dispositivos: um hidrogel obtido a partir da coagulação de uma solução de quitosano, uma matriz porosa por liofilização, e uma matriz combinada de microfibras e nanofibras por fiação húmida e electrofiação, respectivamente.

Verificou-se que o quitosano acelera o processo de cicatrização de feridas, levando a uma diminuição mais rápida do seu tamanho quando comparado com o tratamento tradicional e uma reepitelização compatível com um processo de regeneração adequado. O melhor desempenho no tratamento de feridas foi obtido com a utilização da matriz combinada pela conjugação das propriedades biológicas do quitosano com a elevada área superficial das nanofibras.

Neste trabalho foram comparados pela primeira vez em paralelo três produtos à base de quitosano com características distintas como DM para o tratamento de feridas. O sucesso da concepção e desenvolvimento do hidrogel e da matriz porosa de quitosano permitiu a sua certificação e industrialização com os nomes comerciais HidroKi<sup>®</sup> e AbsorKi<sup>®</sup>, respectivamente.

Concluiu-se que o quitosano é um material adequado à produção de DM inovadores e que pode ser manipulável em estruturas para diferentes aplicações.

Palavras-chave: quitosano, feridas, pensos, hidrogel, matriz porosa, nanofibras



## Abstract

The skin is the largest organ in the human body, whose function is compromised by the occurrence of wounds. Wound treatment represents a large portion of medical care expenses, where the development of innovative wound treatment procedures is of significant interest. New raw materials for the production of medical devices is one of the research areas in wound treatment. Chitosan is a chitin derivative, the second most common biopolymer. Chitosan is among the materials used for the development of new medical devices due to its biological properties.

The objective of this work was to develop medical devices employing chitosan for wound treatment. Three medical devices were developed: hydrogel from coagulation of a chitosan solution, porous matrix using freeze drying and a combined matrix of microfibers and nanofibers obtained through wet-spinning and electrospinning, respectively.

It was possible to conclude that the use of chitosan accelerates the wound healing process leading to reduced wound closure time, when compared with a standard treatment and an epithelialization characteristic of an adequate wound healing process. The best performance in wound healing was obtained using the combined matrix by allying the biological properties of chitosan with the large surface area of nanofibers.

In this work these three different medical devices from chitosan are evaluated in parallel and for the first time for wound treatment. The success of the research and development of both the hydrogel and the porous matrix made it possible to obtain the certification and industrialize the production processes of these products with commercial names HidroKi<sup>®</sup> and Absorki<sup>®</sup>, respectively.

It was concluded that chitosan is an adequate material for the production of innovative medical devices which can be easily manipulated into structures of different characteristics according to its intended use.

Keywords: chitosan, wound, wound dressing, hydrogel, porous matrix, nanofibers



## Enquadramento

Este projecto foi desenvolvido em ambiente empresarial numa colaboração entre a Universidade Nova de Lisboa e a Ceramed. O desenvolvimento de produtos para o tratamento de feridas está inserido na estratégia da Ceramed que aposta na produção de quitosano, obtido a partir de um desperdício da indústria alimentar, como matéria-prima para dispositivos médicos e na concepção e desenvolvimento de dispositivos médicos à base de quitosano. No âmbito deste projecto foi igualmente realizado um período de investigação em Mainz, Alemanha, em colaboração com a empresa Medovent.

Através do trabalho desenvolvido no âmbito deste projecto, em 2010, a Ceramed obteve a certificação para a produção de pensos para o tratamento de feridas, tendo sido criada uma nova área de produção de dispositivos médicos na empresa.

Foi realizado todo o trabalho desde a concepção, desenvolvimento e marcação CE de dois pensos para feridas à base de quitosano: HidroKi<sup>®</sup> e AbsorKi<sup>®</sup>. Estes dois pensos primários têm aplicações distintas e, com a marcação CE estão prontos para ser inseridos no mercado. O HidroKi<sup>®</sup>, devido ao seu alto conteúdo em água, é um hidrogel destinado a feridas desidratadas que precisem ser humidificadas. O AbsorKi<sup>®</sup>, por outro lado, é um penso altamente poroso e com uma capacidade de absorção muito elevada, tornando-o indicado para o tratamento de feridas com produção elevada de exsudado.

O facto de a matéria-prima dos dispositivos médicos desenvolvidos ser quitosano de origem animal aumenta a exigência e complexidade do processo de certificação dos produtos. Em termos de classificação de dispositivos médicos, estes recaem na classe de maior exigência – Classe III - que inclui os dispositivos mais críticos e nos quais a aprovação prévia, através da marcação CE, é obrigatória.

Em paralelo foi também desenvolvida uma matriz combinada de microfibras e nanofibras de quitosano. Este trabalho surgiu do objectivo de desenvolver uma matriz de quitosano para aplicação de Engenharia de Tecidos para regeneração da pele.



# Índice de Matérias

## Capítulo I - Introdução Geral

1.	A pele.....	1
1.1.	A organização da pele .....	1
1.1.1.	Matriz extracelular - a sua importância e função nos tecidos .....	1
1.1.2.	A pele – estrutura e função .....	3
2.	Cicatrização e tratamento de feridas.....	7
2.1.	Tipos de feridas .....	8
2.2.	Processo de cicatrização de uma ferida.....	8
2.2.1.	Fase hemostática .....	11
2.2.2.	Fase inflamatória .....	11
2.2.3.	Fase proliferativa .....	12
2.2.4.	Fase de remodelação.....	14
2.3.	Tecido de cicatriz.....	15
2.4.	Factores que podem afectar a cicatrização de uma ferida .....	15
3.	Procedimentos para o tratamento de feridas .....	16
3.1.	Pensos para o tratamento de feridas .....	16
3.1.1.	Classificação de pensos .....	17
3.1.2.	O papel dos pensos no controlo da humidade no leito da ferida .....	19
3.2.	Substitutos de pele .....	20
3.2.1.	Enxertos de pele para o tratamento de feridas .....	20
3.2.2.	Substitutos artificiais de pele .....	21
4.	Os biomateriais e a sua utilização na produção de dispositivos médicos .....	21
4.1.	Os biomateriais e a medicina .....	21
4.2.	Quitosano: biomaterial utilizado na medicina.....	22
4.2.1.	Quitosano: estrutura química, obtenção e manipulação .....	23
4.2.2.	Estruturas à base de quitosano.....	24

## Capítulo II - Materiais e Métodos

1.	Materiais .....	25
2.	Métodos de caracterização físico-química .....	25
2.1.	Cromatografia de Permeação em Gel (GPC) .....	25
2.2.	Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR) .....	25
2.3.	Ressonância Magnética Nuclear (H-RMN) .....	26
2.4.	Microscopia Electrónica de Varrimento (SEM).....	27
2.5.	Testes de tracção .....	28
3.	Métodos de caracterização biológica .....	28
3.1.	Linhas celulares utilizadas.....	28
3.2.	Teste de citotoxicidade <i>in vitro</i> .....	28
3.2.1.	Método directo .....	30

3.2.2.	Método por extracto .....	30
3.3.	Testes de proliferação celular <i>in vitro</i> .....	31
3.4.	Método para observação confocal .....	31
3.5.	Testes <i>in vivo</i> – Avaliação do tamanho da ferida .....	31

### Capítulo III - Hidrogéis de Quitosano para o Tratamento de Feridas

1.	Introdução .....	33
1.1.	Hidrogéis como materiais.....	33
1.2.	Hidrogéis no tratamento de feridas.....	34
1.3.	Hidrogéis de quitosano: o mercado .....	35
1.4.	Produção de um hidrogel de quitosano .....	36
2.	Materiais e Métodos.....	38
2.1.	Materiais.....	38
2.2.	Métodos.....	39
2.2.1.	Métodos de produção .....	39
2.2.2.	Métodos de caracterização .....	39
2.2.3.	Testes de citotoxicidade e proliferação celular – Testes <i>in vitro</i> .....	41
2.2.4.	Testes de irritação.....	42
2.2.5.	Teste de hipersensibilidade retardada .....	45
2.2.6.	Teste de biocompatibilidade por implante subcutâneo.....	48
2.2.7.	Estudo do desempenho do hidrogel em queimaduras induzidas <i>in vivo</i> .....	50
3.	Resultados e Discussão.....	51
3.1.	Morfologia do hidrogel.....	51
3.2.	Caracterização dos hidrogéis por reologia .....	54
3.3.	Citotoxicidade do hidrogel.....	57
3.4.	Teste de Irritação .....	59
3.5.	Teste de sensibilização.....	61
3.6.	Biocompatibilidade por implantação subcutânea.....	63
3.6.1.	Ensaio de biocompatibilidade em ratos Wistar .....	63
3.6.2.	Ensaio de biocompatibilidade em coelhos New Zealand.....	66
3.6.3.	Avaliação do desempenho do hidrogel de quitosano na cicatrização de feridas ..	68
3.7.	Concepção e desenvolvimento empresarial .....	71
3.7.1.	Fluxo e condições de produção .....	72
4.	Conclusão .....	75

### Capítulo IV - Matrizes Porosas de Quitosano para o Tratamento de Feridas

1.	Introdução .....	77
1.1.	Matrizes porosas como materiais .....	77
1.2.	Pensos porosos de quitosano.....	79
1.3.	Produção de uma matriz porosa de quitosano .....	80
1.3.1.	Método de liofilização.....	82

2.	Materiais e métodos .....	84
2.1.	Materiais .....	84
2.2.	Métodos .....	84
2.2.1.	Alteração do grau de desacetilação do quitosano .....	84
2.2.2.	Métodos de produção da matriz porosa .....	85
2.2.3.	Métodos de caracterização .....	87
2.2.4.	Métodos de caracterização biológica .....	88
3.	Resultados e discussão.....	91
3.1.	Quitosanos utilizados nos estudos de comparação de graus de desacetilação diferentes .....	91
3.2.	Caracterização macroscópica das matrizes porosas para o tratamento de feridas .....	92
3.2.1.	Análise macroscópica.....	92
3.2.2.	Análise microscópica: porosidade, tamanho de poro médio e distribuição de tamanho de poro.....	93
3.2.3.	Caracterização química das matrizes porosas e influência do processo de esterilização .....	98
3.2.4.	Propriedades mecânicas das matrizes porosas.....	99
3.2.5.	Taxa de absorção das matrizes liofilizadas.....	101
3.3.	Caracterização <i>in vitro</i> das matrizes porosas para o tratamento de feridas .....	102
3.3.1.	Citotoxicidade de matrizes liofilizadas (24h, 3T3) e proliferação (72h, 3T3) .....	102
3.3.2.	Morfologia celular em matrizes liofilizadas .....	106
3.4.	Caracterização das matrizes porosas para o tratamento de feridas <i>in vivo</i> .....	107
3.4.1.	Procedimento de indução de ferida e tratamento .....	107
3.4.2.	Evolução da cicatrização de uma ferida de excisão total ao longo de 21 dias ....	107
3.4.3.	Influência das características das matrizes liofilizadas de quitosano no tratamento de feridas	108
3.4.4.	Análise histológica dos resultados da experimentação <i>in vivo</i> .....	114
3.5.	Concepção e desenvolvimento empresarial .....	117
3.5.1.	Fluxo e condições de produção.....	119
4.	Conclusão.....	121

## **Capítulo V - Matrizes Combinadas de Microfibras e Nanofibras para o Tratamento de Feridas**

1.	Introdução.....	123
1.1.	Aplicações de fibras em pensos.....	124
1.2.	Engenharia de Tecidos.....	125
1.3.	Processos de produção de fibras .....	126
1.4.	Fiação húmida .....	127
1.5.	Electrofiação .....	128
1.6.	Matrizes combinadas de fibras.....	129
2.	Materiais e métodos .....	130
2.1.	Materiais .....	130
2.1.1.	Quitosano .....	130

2.1.2.	Óxido de polietileno (PEO).....	130
2.2.	Métodos.....	131
2.2.1.	Métodos de produção de fibras.....	131
2.2.2.	Produção de matrizes combinadas.....	134
2.3.	Métodos de caracterização.....	134
2.3.1.	Caracterização morfológica das fibras e matriz.....	134
2.3.2.	Reologia.....	135
2.3.3.	Testes de tracção.....	135
2.3.4.	Testes <i>in vitro</i> .....	135
2.3.5.	Testes <i>in vivo</i> .....	135
3.	Resultados e discussão.....	136
3.1.	Estudo das condições de produção de microfibras.....	136
3.1.1.	Caracterização das soluções de quitosano.....	136
3.1.2.	Caracterização das fibras obtidas a partir de diferentes soluções de quitosano.....	138
3.2.	Morfologia das matrizes combinadas.....	140
3.3.	Experimentação <i>in vitro</i> com matrizes combinadas de microfibras e nanofibras.....	144
3.4.	Experimentação <i>in vivo</i> com matrizes combinadas de microfibras e nanofibras.....	146
3.4.1.	Análise histológica dos resultados.....	148
4.	Conclusão.....	151
<b>Capítulo VI - Certificação de Dispositivos Médicos</b>		
1.	Dispositivo Médico e marcação CE.....	153
1.1.	Processo de marcação CE.....	154
1.1.1.	Classificação dos dispositivos médicos.....	154
1.1.2.	Sistema de Gestão da Qualidade.....	155
1.1.3.	Requisitos Essenciais.....	155
1.1.4.	Dossier Técnico.....	156
1.1.5.	Auditoria de certificação.....	157
1.1.6.	Colocação no mercado do DM.....	157
2.	Certificação dos pensos desenvolvidos no âmbito deste trabalho.....	158
<b>Capítulo VII - Conclusão Final.....</b>		
<b>159</b>		
<b>Bibliografia.....</b>		
<b>161</b>		

## Índice de Figuras

Figura 1.1 - Esquema da rede dos vários componentes da matriz extracelular na interface com a célula <sup>(5)</sup> .....	2
Figura 1.2 - Esquema da estrutura da pele normal com identificação das várias camadas e componentes <sup>(8)</sup> .....	3
Figura 1.3 - Esquema das diferentes camadas da epiderme e membrana basal da pele <sup>(12)</sup> .....	4
Figura 1.4 - Imagem de histologia com as diferentes camadas da pele identificadas <sup>(13)</sup> .....	5
Figura 1.5 - Imagem de histologia da pele com a derme e algumas estruturas identificadas <sup>(15)</sup> .....	6
Figura 1.6 – Resumo de processo de cicatrização de uma ferida <sup>(21)</sup> .....	10
Figura 1.7 – Duração típica de cada fase do processo de cicatrização <sup>(22)</sup> .....	11
Figura 1.8 - Esquema representativo das unidades de N-acetil-D-glucosamina (Y - fracção molar destas unidades) e glucosamina (X - fracção molar destas unidades) <sup>(50)</sup> .....	23
Figura 3.1 - Esquema do processo de precipitação do quitosano em solução por variação do pH <sup>(40)</sup> .....	0..37
Figura 3.2 - Esquema da formação de um hidrogel físico <sup>(30)</sup> .....	37
Figura 3.3 - Esquema de zona (a cinzento) do hidrogel para realização do ensaio de Análise de Textura. ....	40
Figura 3.4- Esquema da aplicação da amostra de teste e do controlo negativo no dorso do coelho. ....	43
Figura 3.5- Animal no decorrer do teste com o colar isabelino colocado. ....	43
Figura 3.6 - Esquema de injeções administradas e a sua posição relativa no dorso do animal. ....	46
Figura 3.7 - Penso aplicado à volta do torso do animal na fase de indução tópica (imagem exemplificativa). ....	47
Figura 3.8 – Força máxima aplicada para cada tipo de hidrogel; sonda com diâmetro de 1 cm; valor médio de 5 ensaios. ....	52
Figura 3.9 - Hidrogel de quitosano, demonstrando as suas propriedades de maleabilidade e cor. ....	53
Figura 3.10- Imagem de SEM da superfície do hidrogel; a - ampliação de 3000 vezes, barra de escala 5 µm; b - ampliação de 10000 vezes, barra de escala 1 µm. ....	54
Figura 3.11 - Variação do módulo dissipativo (G''), e do módulo de armazenamento (G') em função da frequência angular, para hidrogéis obtidos a partir de soluções com diferentes concentrações de quitosano. ....	55
Figura 3.12 - Variação do módulo dissipativo (G''), e do módulo de armazenamento (G') em função da frequência angular, para hidrogéis obtidos a partir das soluções de quitosano a 3% (m/m) em ácido acético (AA) e ácido láctico (AL). ....	56
Figura 3.13 - Tangente de perdas em função da frequência angular, para os hidrogéis de quitosano analisados. ....	56
Figura 3.14 – Resultados de viabilidade celular relativa pelo teste de MTT do hidrogel de quitosano (CS) com linha celular primária de fibroblastos obtidos a partir da pele de rato Wistar; C-, controlo de células; C+, controlo positivo. ....	57
Figura 3.15- Microfotografias dos fibroblastos no teste de citotoxicidade após 24 h (A) e 3 dias (B) na presença do hidrogel de quitosano; controlo de células (C) e controlo positivo (D); ampliação de 100x; escala 100 µm. ....	58
Figura 3.16 - Imagens de SEM de fibroblastos sobre hidrogel de quitosano; a - ampliação de 1000x, escala 1 µm, b - ampliação 1500x, escala 10 µm; c- ampliação 4500x, escala 1 µm. ....	59
Figura 3.17- Amostras aplicadas no dorso do animal após marcação do local a aplicar o material de teste. ....	60
Figura 3.18- Penso aplicado sobre as amostras para garantir a sua permanência nos locais designados .....	60
Figura 3.19- Fotografias exemplificativas recolhidas ao longo do Teste de Irritação. Não se observou qualquer reacção de eritema ou edema nos locais de controlo e de colocação de amostras e foi atribuído 0 aos 3 coelhos, em todos os locais de aplicação, para todos os tempos. ....	61

Figura 3.20- Dorso dos porquinhos-da-índia 7 dias após a fase de indução intradérmica do grupo de controlo (A) e do grupo teste (B). .....	62
Figura 3.21 - Rato 5 dias após operação com alto visível na zona da incisão.....	63
Figura 3.22 - Cicatriz da primeira incisão realizada para a colocação do implante subcutâneo no dia 43 após operação. ....	63
Figura 3.23 - Microfotografias recolhidas durante a incisão no dia 43 para recolha de amostra nos dois ratos; A e B: Rato I; C:Rato II.....	64
Figura 3.24 - Microfotografias recolhidas durante o dia 84. Não foi possível identificar o implante colocado; a - Rato I; b - Rato II.....	66
Figura 3.25 – A: hidrogel preparado para implante; B: incisão realizada no dorso do coelho com bolsa já preparada para implantação. ....	66
Figura 3.26 – Cortes histológicos do implante subcutâneo realizado num coelho apresentando a fase densa (cor-de-rosa) e o tecido adjacente (lilás) .....	67
Figura 3.27 - Imagens da ferida no grupo tratado com o hidrogel (A) e no grupo controlo (B).....	69
Figura 3.28 - Evolução do tamanho da ferida face ao tamanho inicial no grupo tratado com o hidrogel de quitosano (♦) e no grupo controlo (■).....	69
Figura 3.29 – Secções de biopsia coradas com hematoxilina e eosina para avaliação morfológica das lesões induzidas na pele do animal. Feridas tratadas com o hidrogel no dia 7, barra de escala 500 µm (A), dia 14, barra de escala 500 µm (C), e dia 21, barra de escala 200 µm (E). Ferida de controlo no dia 7, barra de escala 500 µm (B), dia 14, barra de escala 500 µm (D), e dia 21, barra de escala 500 µm (F). CH, hidrogel de quitosano; EP, camada epitelial; GT, tecido de granulação; NE, camada epitelial neo formada; WL, comprimento da ferida. ....	70
Figura 3.30- Esquema da câmara de amónia utilizada para a produção de hidrogéis de quitosano .....	71
Figura 3.31 - Esquema da produção dos hidrogéis de quitosano, explicitando as quatro fases de produção, as actividades que as compreendem, e se é realizada dentro ou fora da sala-limpa.....	74
Figura 4.1 - Representação gráfica do ciclo de liofilização utilizado na produção das matrizes porosas de quitosano.....	86
Figura 4.2 - Esquema dos períodos de teste dos vários grupos em estudo nos testes <i>in vivo</i> . ...	90
Figura 4.3 – Fotografia de uma matriz de quitosano liofilizada produzida a partir de uma solução de concentração 3% (m/v) em ácido acético.....	92
Figura 4.4– Imagens de SEM da superfície superior (em contacto com o ar) de matrizes porosas produzidas a partir de soluções de quitosano a 0,5% (m/m) (A), 2% (m/m) (B), e 3% (m/m) (C) em ácido acético a 2% (v/v); ampliação de 200x; escala de 200 µm.....	94
Figura 4.5 - Esquema de distribuição de imagens recolhidas na secção de uma matriz liofilizada a partir de uma solução de quitosano com concentração de 3% (m/m). ....	96
Figura 4.6- Gráfico de caracterização por FTIR de quitosano ( – ), matriz liofilizada antes de irradiada ( – ) e matriz liofilizada após irradiação ( – ).....	99
Figura 4.7 - Valores de tensão máxima ( $T_{max}$ ) obtidos para 30 amostras de matrizes liofilizadas a partir de uma solução de quitosano a 3% (m/v) .....	100
Figura 4.8 - Comparação de tensão de pensos porosos antes e após irradiação a 25 kGy em 2 lotes de produção diferentes, L1 e L2; (♦) – pré irradiação; (■) – pós irradiação. ....	101
Figura 4.9 - Gráfico da evolução do número de células ao longo do teste de proliferação com células 3T3 por contacto directo para 24h, 48h e 72h, sobre as matrizes em estudo e sem material adicionado (controlo de células). ....	103
Figura 4.10 - Dependência da taxa de proliferação com a porosidade das matrizes liofilizadas, para um mesmo grau de desacetilação de quitosano.....	104
Figura 4.11 - Dependência da taxa de proliferação com o grau de desacetilação das matrizes liofilizadas. ....	105
Figura 4.12 - Morfologia dos fibroblastos proliferados por 72 horas na matriz D3P2, avaliada por microscopia confocal; o núcleo e a membrana celular foram marcados e apresentam um tom roxo e verde respectivamente. ....	106

Figura 4.13 – Operação do animal para colocação de penso de controlo e penso poroso de teste P2; (A) penso poroso colocado na ferida de teste; (B) realização de pontos de sutura nos extremos do penso para fixação; (C) penso atado na ferida de teste, sobre o penso poroso, e gaze gorda colocada na ferida de controlo .....	107
Figura 4.14 – Evolução da percentagem de área média da ferida para o grupo de controlo (♦) e para o grupo de teste (■) em que foi aplicado um penso P2D2 ao longo de 21 dias.....	108
Figura 4.15 – Fotografias de ratos representativos dos grupos tratados com matriz de porosidade e grau de desacetilação intermédios (P2D2) ao fim de 7 (A), 14 (B) e 21 (C) dias após operação; M: ferida teste, com matriz; C: ferida controlo. ....	109
Figura 4.16 – Área das feridas ao final de 21 dias para o controlo (■) e teste (■) em todos os animais; ausência de informação para os animais que foram excluídos do estudo.....	109
Figura 4.17 – Variação da percentagem de RAFC em função da porosidade da matriz de quitosano para o grau de desacetilação médio (D2) ao fim de 21 dias de teste. ....	110
Figura 4.18 – Variação da % RAFC em função do grau de desacetilação do quitosano da matriz para a porosidade média (P2) ao fim de 21 dias de teste. ....	111
Figura 4.19 – Fotografia de um rato tratado durante 14 dias em que é possível observar que (a) o penso estava levantado nas bordas, mas aderido no centro (b) correspondendo à zona da ferida ainda por cicatrizar. ....	112
Figura 4.20 - Imagens de histologia ao longo do tempo para animais tratados com matrizes D2P2; a - 7 dias, b - 14 dias, c - 21 dias; i - zona ulcerada não reepitelizada, ii - zona vascularizada, iii - zona de reepitelização, iv - crosta, v - vestígios de matriz.....	115
Figura 4.21 - Corte histológico de uma ferida de controlo ao fim de 21 dias de teste; i - zona de úlcera não reepitelizada, ii - zona de reepitelização. ....	116
Figura 4.22 - Imagem de rato ao fim de 21 dias de teste com ferida tratada com matriz porosa de quitosano (a) e ferida de controlo (b); setas indicam zona de reepitelização.....	117
Figura 4.23 - Esquema da produção das matrizes porosas de quitosano, explicitando as quatro fases de produção, as atividades que as compreendem, e se é realizada dentro ou fora da sala-limpa. ....	120
Figura 5.1 - Estrutura da unidade repetitiva do PEO. ....	131
Figura 5.2 - Esquema do sistema de fiação húmida utilizado.....	132
Figura 5.3 - Representação do sistema de electrofiação adoptado; A - seringa; B - agulha; C - fonte de alta tensão; D - projecção de fibras; E - alvo de deposição com ligação à terra <sup>(175)</sup> . ....	133
Figura 5.4 - Construção do tapete de microfibras sobre o qual são depositadas as nanofibras. ....	134
Figura 5.5– Curvas de fluxo para soluções de quitosano a 3% (m/m) com os diferentes pesos moleculares. ....	137
Figura 5.6 – Curvas de fluxo para soluções de quitosano de peso molecular médio a diferentes concentrações (m/m).....	137
Figura 5.7 – Influência dos parâmetros de produção no diâmetro das microfibras; (a) peso molecular baixo; (b) peso molecular médio; (c) peso molecular alto; (○) Q=10 ml·h <sup>-1</sup> ; (■)Q=50 ml·h <sup>-1</sup> .....	138
Figura 5.8 – Influência dos parâmetros de produção no módulo de Young das microfibras; (a) peso molecular baixo; (b) peso molecular médio; (c) peso molecular alto; (○) Q=10 ml·h <sup>-1</sup> ; (■)Q=50 ml·h <sup>-1</sup> .....	139
Figura 5.9 - Matriz de microfibras e nanofibras sobre o suporte em que foi produzida (A), a ser destacada (B e C) e o produto final já destacado (D). ....	141
Figura 5.10 - Imagem de microscopia óptica da matriz de nanofibras de quitosano e PEO; escala 20µm; ampliação 50x. ....	141
Figura 5.11 - Imagem obtida por SEM de nanofibras de quitosano e PEO; escala 10µm; ampliação 3000x.....	142
Figura 5.12 - Fotografias obtidas por microscopia óptica de uma matriz combinada de micro e nanofibras a várias profundidades sobre a mesma zona; escala 20µm, ampliação 50x. ....	142
Figura 5.13 - Imagem de uma matriz combinada de microfibras e nanofibras obtida por microscopia electrónica; escala 20 µm, ampliação 1000x. ....	143
Figura 5.14 - Imagens de microscopia de uma matriz combinada de microfibras e nanofibras num plano mais superficial (A) e outro mais profundo (B); escala 100 µm; ampliação 10x. ....	143

Figura 5.15 - Imagens de microscopia confocal de células 3T3 cultivadas sobre uma matriz combinada de microfibras e nanofibras durante 72 horas, em diferentes zonas e profundidades. ....	145
Figura 5.16 - Matriz combinada de micro e nanofibras aplicada numa ferida induzida de espessura total num rato Wistar. ....	146
Figura 5.17 - Fotografias com diferentes ampliações da matriz combinada de micro e nanofibras numa ferida de espessura total induzida no dorso de uma rato Wistar. ....	147
Figura 5.18 - Fotografia de zona da ferida tratada com matriz combinada ao fim de 21 dias; i - cura de ferida por contracção; ii - zona reepitelizada. ....	148
Figura 5.19 - Corte histológico de um animal tratado com uma matriz combinada; a - zona da úlcera ao final de 21 dias; b - pormenor da zona sub-cutânea; i - microfibras de quitosano; ii - crosta; iii -epitelização; iv - vascularização. ....	149
Figura 5.20 - Corte histológico de um animal do grupo tratado com matriz porosa (a) e com matriz combinada (b) .....	150
Figura 5.21 - Pormenor do corte histológico da zona central da ferida cicatrizada do animal com fecho de ferida 100%. ....	151

## Índice de Tabelas

Tabela 3.1 - Tabela de produtos comerciais e as respectivas características. ....	36
Tabela 3.2 - Parâmetros utilizados nos ensaios de análise de textura dos hidrogéis. ....	40
Tabela 3.3 - Sistema de classificação da reacção primária de irritação com as pontuações referentes ao eritema e edema observados .....	44
Tabela 3.4 - Categoria de Resposta de Irritação, segundo a norma ISO 10993-10 <sup>(86)</sup> .....	45
Tabela 3.5 - Injecções intradérmicas administradas no Grupo de Teste.....	47
Tabela 3.6 - Injecções intradérmicas administradas no Grupo de Controlo .....	47
Tabela 3.7 - Escala de Magnusson e Kligman, ISO 10993-10 .....	48
Tabela 3.8 - Composição das soluções de quitosano capazes de produzir hidrogéis para serem testados; na última coluna encontra-se a designação das soluções utilizada na Figura 3.9. ....	52
Tabela 4.1 - Pesquisa de mercado de produtos equivalentes ao produto poroso para o tratamento de feridas proposto para desenvolvimento neste trabalho.....	80
Tabela 4.2 - Factores associados à produção de matrizes porosas de quitosano pelo método de liofilização e características do produto final relacionadas <sup>(119)</sup> .....	84
Tabela 4.3 - Descrição do ciclo de liofilização utilizado para a preparação das matrizes liofilizadas. ....	86
Tabela 4.4 - Combinações de características das matrizes porosas utilizadas nos testes <i>in vivo</i> ; <b>D</b> – grau de desacetilação, em que D1 é o mais baixo e D3 o mais alto; <b>P</b> – porosidade da matriz, em que P1 é a mais porosa e P3 a menos porosa; ( <b>X</b> ) combinação de propriedades utilizadas.....	89
Tabela 4.5 - Graus de desacetilação dos três quitosanos utilizados nos estudos das matrizes porosas.....	92
Tabela 4.6 - Espessura média das matrizes em função da densidade desta, sendo P1 a densidade mais baixa estudada, P2 a intermédia e P3 a mais alta .....	93
Tabela 4.7 - Valores de porosidade relativa para as várias matrizes utilizadas; média±desvio padrão. ....	97
Tabela 4.8 - Capacidade de absorção das matrizes liofilizadas em número de vezes em relação ao seu peso seco, calculado segundo a Equação 4.1; média±desvio padrão. ....	101
Tabela 4.9 - Valores de viabilidade celular relativa (calculado segundo a Equação 2. 2) para as diferentes matrizes porosas sob estudo; a viabilidade celular de controlo de células 100%. ....	102
Tabela 4.10 - Taxa global de proliferação celular, em células·h <sup>-1</sup> , para as diferentes matrizes sob estudo utilizando a linha celular 3T3, para 72 horas; controlo de células com valor de 60,9 cél·h <sup>-1</sup> .....	103
Tabela 4.11 - Valores médios de percentagem de RAFC (± desvio padrão) ao fim de 21 dias de teste para os 5 grupos testados. ....	110
Tabela 4.12 – Matriz de significância estatística (valor-P) para avaliação de diferenças entre os 5 grupos quanto aos valores de % RAFC; (■) valores estatisticamente significativos com um grau de confiança de 95%.....	111
Tabela 4.13 – Dados qualitativos dos grupos obtidos por observações ao longo da experiência .....	112
Tabela 5.1 - Fibras e polímeros geralmente usados em pensos para feridas (135; 136). 123	
Tabela 5.2 - Peso molecular médio e grau de desacetilação de 3 tipos de quitosano. ....	130
Tabela 5.3 - Resumo das condições de produção optimizadas para o processo de electrofiação. ....	134
Tabela 5.4 - Valores de área de zona não epitelizada e de percentagem de cura de ferida da ferida nos testes <i>in vivo</i> ao fim de 21 dias no caso da matriz combinada e da matriz porosa D2P2; média±desvio padrão. ....	147



## Lista de Abreviaturas

ADN - ácido desoxirribonucleico  
CCK-8 - "Cell Counting Kit-8"  
CS - quitosano  
CS L - quitosano *Cognis, Chitopharm® L*, peso molecular alto  
CS M - quitosano *Cognis, Chitopharm® M*, peso molecular médio  
CS S - quitosano *Cognis, Chitopharm® S*, peso molecular baixo  
CV - coeficiente de variação do teste  
DD - grau de desacetilação  
DM - Dispositivo Médico  
DMEM - meio de cultura Eagle modificado por Dulbecco  
DT - *Dossier Técnico*  
E - Módulo de Young  
ET - Engenharia de Tecidos  
FBS - soro bovino fetal inativado ("Fetal bovine serum")  
FCA - "Freund's Complete Adjuvant"  
FTIR - "Fourier Transform Infrared Spectroscopy"  
G" - módulo dissipativo  
G' - módulo de armazenamento  
GPC - Cromatografia de Permeação em Gel  
H<sub>0</sub> - hipótese nula  
H-RMN - Ressonância Magnética Nuclear  
MEC - matriz extracelular  
m/m - fracção massa/massa  
MTT - teste de brometo de 3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il]-2,5-difenil-tetrazólio  
m/v - fracção massa/volume  
M<sub>w</sub> - peso molecular médio em peso  
ON - Organismo Notificado  
PBS - tampão fosfato-salino ("Phosphate Buffered Saline")  
PEO - poli(óxido de etileno)  
PII - Índice de Irritação Primária ("Primary Irritation Index")  
PVA - álcool polivinílico  
RAFC - Redução de Área da Ferida em relação ao Controlo  
RNase - enzima de ácido ribonucleico  
SDS - dodecil sulfato de sódio  
SEM - Microscopia Electrónica de Varrimento  
SGQ - Sistema de Gestão da Qualidade  
T<sub>max</sub> - tensão máxima  
tanδ - tangente de perdas

UV - ultravioleta

valor P - significância estatística

v/v - fração volume/volume

WST-8 - [sal 2-(2-metoxi-4-nitrofenil)-3-(4-nitrofenil)-5-(2,4-disulfofenil)-2H-tetrazólio,monosódico]

$\alpha$  - probabilidade de ocorrência de erro do Tipo I

$\delta$  - ângulo de fases

$\pi$  - *power* do teste estatístico

$\sigma$  - coeficiente de variância

## Capítulo I - Introdução Geral

### 1. A pele

Um tecido é um conjunto de células isoladas ou de células e uma matriz extracelular. Por sua vez, um órgão é a reunião de tecidos anatomicamente distintos, com uma estrutura complexa e uma função específica<sup>(1)</sup>.

A pele é o maior órgão do corpo humano, representando 15% do peso total de um adulto e com uma área de 1,5 a 2 m<sup>2</sup>. A sua espessura pode variar entre 0,5 mm (nas pálpebras) e 6 mm (entre as omoplatas), no entanto a espessura da pele na maior parte do corpo é de 1 a 2 mm<sup>(2)</sup>.

#### 1.1. A organização da pele

A pele tem uma estrutura definida, mas ao nível histológico apresenta diferentes características de acordo com a sua localização no corpo. Apesar de a sua função principal ser a de protecção, a pele desempenha outras funções adicionais essenciais.

##### 1.1.1. Matriz extracelular - a sua importância e função nos tecidos

Num tecido, as células ocorrem combinadas em grupos de acordo com a sua especialização. À volta da maioria das células animais encontra-se uma rede, denominada de matriz extracelular (MEC), de polissacáridos, proteínas fibrosas e proteínas adesivas segregadas pelas células. Com excepção do sangue, a MEC tem uma componente solúvel (os glicosaminoglicanos, os proteoglicanos e as glicoproteínas) e uma componente insolúvel (as proteínas fibrosas e adesivas - colagénico, elastina, fibronectina, laminina)<sup>(3)</sup>. Esta matriz serve de suporte estrutural em tecidos e pode afectar o desenvolvimento e o funcionamento bioquímico das células. A MEC ajuda a ligar as células umas às outras e é um reservatório de várias hormonas que controlam a expressão genética destas, e assim o seu crescimento celular e diferenciação<sup>(4)</sup>.

Tanto na pele como em qualquer outro tecido, a MEC tem três componentes principais: proteoglicanos, que dada a sua viscosidade amparam as células; fibras de colagénico insolúveis, que dão resistência e resiliência à estrutura; e proteínas aderidas à matriz, que ligam estes componentes aos receptores na superfície da célula e de que faz parte a integrina. Todos estes componentes formam uma rede complexa, tal como esquematizado na Figura 1.1<sup>(4)</sup>.

## Produção de Matrizes à Base de Quitosano para o Tratamento de Feridas

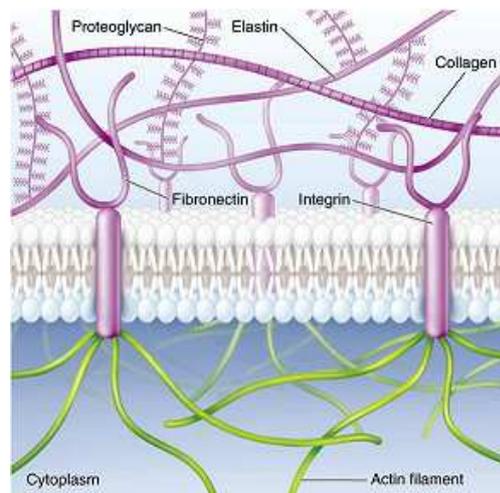


Figura 1.1 - Esquema da rede dos vários componentes da matriz extracelular na interface com a célula<sup>(5)</sup>

O papel da MEC nos tecidos é crucial: é a estrutura que serve de base à organização das células em tecidos, e dos tecidos em órgãos. A MEC tem um papel dinâmico na modulação do comportamento celular através da interação com receptores específicos ou não específicos. São vários os mecanismos que condicionam a forma como a célula percebe e reage à MEC, incluindo as interações integrina-ligando (sendo a integrina da família de glicoproteínas transmembranares) e interações devido à influência da composição química da superfície e a topografia da própria matriz. Através deste sistema de sinalização celular a MEC comunica directa e indirectamente com a célula direccionando-a a desempenhar funções específicas<sup>(4,6)</sup>.

A arquitectura de um tecido depende não só das interações célula-célula, mas também das interações célula-matriz. A MEC serve de canal para a migração celular e para as moléculas envolvidas nos sistemas de sinalização celular activados pela matriz que induzem o crescimento e a proliferação celular e a expressão de genes<sup>(4)</sup>. Ao nível celular a estrutura e composição da MEC regulam a morfologia da célula, organização do citoesqueleto, sinalização intracelular, progressão do ciclo celular e taxas de migração celular<sup>(6)</sup>.

A ligação entre a actina (proteína do citoesqueleto que permite os movimentos da célula) e a MEC leva a que as integrinas proporcionem a transmissão de sinais bidireccionalmente entre a MEC e o citoplasma<sup>(4,6)</sup>.

A organização molecular da MEC varia consoante o tipo de tecido, o estágio de desenvolvimento e em resposta a processos patológicos. Estas alterações regulam a interação célula-matriz e são muito importantes na embriogénese, cicatrização de feridas, crescimento de tumores e na homeostase normal do tecido<sup>(6)</sup>.

Ao nível celular, a estrutura e composição da MEC regulam a morfologia celular, a organização do citoesqueleto, a sinalização intracelular, a progressão do ciclo celular e as taxas de migração celular<sup>(6)</sup>.

A MEC na pele apresenta diversas características de acordo com a camada na qual se encontra, sendo indispensável para a função protectora da pele.

### 1.1.2. A pele – estrutura e função

A pele possui duas camadas principais: a epiderme, a camada mais externa, e a derme, a estrutura mais interna da pele. Entre estas duas camadas encontra-se a membrana basal e sob a derme o tecido subcutâneo (ou hipoderme). A espessura da pele varia de acordo com a zona do corpo onde se encontra, devendo-se as variações de espessura principalmente a variações da espessura da derme. A pele está ligada ao resto do organismo por 3 sistemas: sistema linfático, sistema circulatório e sistema nervoso. Estes sistemas são responsáveis pelo fornecimento de nutrientes e oxigénio, pela remoção de substâncias tóxicas, pelo equilíbrio de fluidos, sensibilidade e pela resposta imunitária da pele<sup>(2,7)</sup>.

A Figura 1.2 apresenta esquematicamente a estrutura da pele, com as suas várias camadas e componentes.

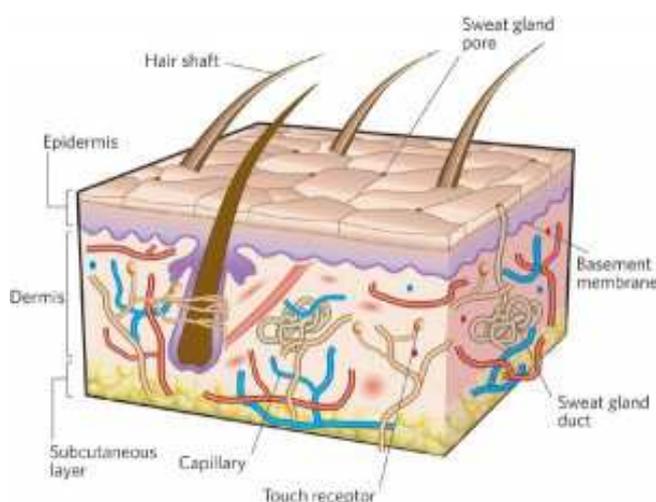


Figura 1.2 - Esquema da estrutura da pele normal com identificação das várias camadas e componentes<sup>(8)</sup>

As várias camadas da pele e a forma como estão estruturadas são essenciais ao desempenho das suas funções. Estas incluem a protecção contra agentes externos como radiação UV e radicais livres (que podem danificar o DNA) traumas mecânicos, agentes infecciosos, toxinas e agentes químicos irritantes.

A função da pele como barreira à invasão de microrganismos passa pela sua estrutura, como por exemplo a presença de queratina que muito poucos agentes patogénicos são capazes de penetrar, mas também por substâncias que se encontram à sua superfície e que impedem o crescimento ou provocam a morte de microrganismos<sup>(2,7)</sup>. A superfície da pele tem um teor em água baixo e é pobre em nutrientes, constituindo assim um habitat desfavorável à multiplicação de microrganismos. O sebo (óleo presente na pele) contém substâncias bactericidas tais como

## Produção de Matrizes à Base de Quitosano para o Tratamento de Feridas

a defensina e a catelicidina, ambos peptídios que matam microrganismos ao penetrarem na sua membrana e formarem um poro. Estas substâncias são produzidas pelos queratinócitos, neutrófilos e outras células, e o suor em si forma um filme fino de ácido láctico, com pH entre 4 e 6, que é desfavorável ao crescimento de microrganismos. Se acontecer um microrganismo penetrar a barreira da pele, os macrófagos e os leucócitos são capazes de montar uma defesa e evitar uma infecção<sup>(2,9,10)</sup>.

A pele deve apresentar características mecânicas que mantenham a protecção contra agentes externos, mas ao mesmo tempo deverão ser tais que permitam o crescimento e movimento do organismo<sup>(7)</sup>.

### 1.1.2.1. Epiderme

A epiderme constitui a interface directa do corpo com o ambiente externo. Tem funções extremamente importantes de protecção contra desidratação, invasão por microrganismos, radiação UV e outras agressões externas químicas.

É uma estrutura celular avascularizada de várias camadas de células epiteliais. A epiderme é bastante fina, com uma espessura de cerca de 0,1-0,2 mm apresentando um mínimo de 0,05 mm nas pálpebras, até 1,5 mm na planta dos pés. É composta maioritariamente por queratinócitos, com uma população menor de melanócitos responsáveis pela produção de melanina, células de Langerhans (células do sistema imunitário) e células de Merkel com função neuroendócrina<sup>(2,11)</sup>.

Este tecido é caracterizado como sendo epitélio escamoso estratificado, ou seja, é constituído por várias camadas de células sobrepostas, em que apenas as da camada mais profunda é que estão em contacto com a membrana basal. A morfologia das camadas varia ao longo da profundidade do tecido, tal como se pode ver no esquema da Figura 1.3 e na Figura 1.4<sup>(2,11)</sup>.

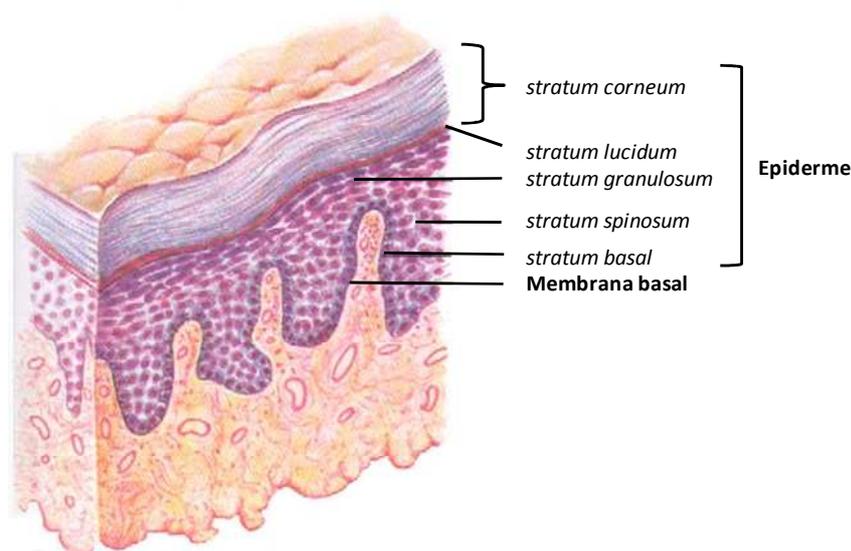


Figura 1.3 - Esquema das diferentes camadas da epiderme e membrana basal da pele<sup>(12)</sup>.

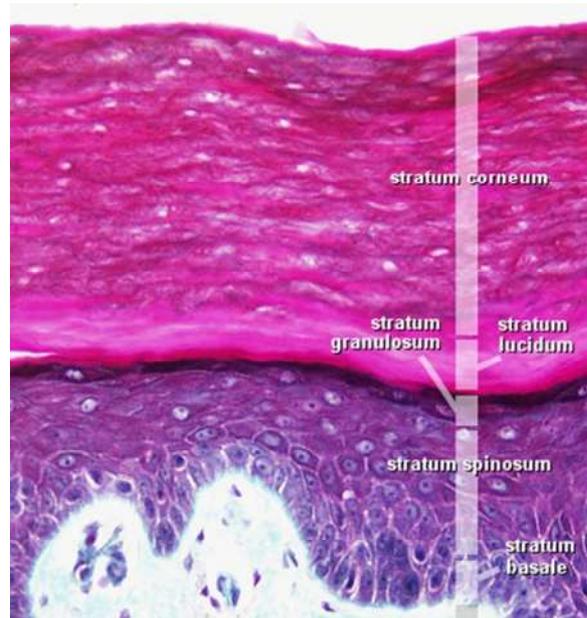


Figura 1.4 - Imagem de histologia com as diferentes camadas da pele identificadas<sup>(13)</sup>.

Os queratinócitos são renovados continuamente a partir da camada basal (*stratum basale*). Sobre esta camada encontra-se o *stratum spinosum* constituído por camadas de queratinócitos que à medida que se deslocam para o exterior param a sua divisão e produzem cada vez mais filamentos de queratina tornando a células mais achatadas. Sobre esta camada encontra-se o *stratum granulosum* constituído por duas a cinco camadas de queratinócitos achatados. Sobre esta encontra-se o *stratum lucidum*, apenas visível nas zonas em que a pele é mais espessa, e que consiste numa zona translúcida com grande densidade de queratinócitos juntamente com eleidina (estádio intermédio da queratina); nesta camada as células estão desprovidas de núcleo e organelos. Por fim, na camada mais externa da epiderme distingue-se o *stratum corneum*, composto por no máximo 30 camadas estratificadas de células mortas sem núcleo ou organelos citoplasmáticos com uma quantidade de água muito reduzida (corneócitos). Estas células têm uma grande quantidade de filamentos de queratina que formam uma matriz amorfa de proteínas que encaixa firmemente os corneócitos. Esta camada mais externa da epiderme é semipermeável e hidrofóbica. É a espessura desta camada que dá a sensação do que correntemente se chama de “pele grossa”, como por exemplo na planta dos pés, ou de “pele fina”. Estas células estão constantemente a descamar e a ser substituídas por novas células que se deslocam da zona mais interior para o exterior<sup>(1,2,7,11,14)</sup>.

### 1.1.2.2. Membrana basal

A membrana basal é a estrutura que liga a epiderme à derme, e que se encontra assinalada no esquema da Figura 1.3. Esta membrana é gerada pelos queratinócitos da epiderme e pelos fibroblastos da derme e é uma especialização da matriz extracelular que permite a fixação das células, com uma arquitetura e composição bastante complexas. É composta por colagénio tipo IV e VII, laminina e glicosaminoglicanos, proteoglicanos e outras glicoproteínas. A laminina é a

principal glicoproteína das membranas basais e forma uma rede que se intercala com a rede de colagénio<sup>(6,7)</sup>.

A sua estrutura ondulada, que acompanha as evaginações e invaginações da epiderme, permite desempenhar com maior eficiência e eficácia o seu papel de interface entre a derme e a epiderme. É a zona de fixação da epiderme e permite o pleno acesso de nutrientes, oxigénio, anticorpos e células do sistema imunitário, como macrófagos e mastócitos provenientes da derme, à camada mais externa da pele. É ainda responsável por duas das propriedades mecânicas mais importantes da pele: a sua flexibilidade e elasticidade, devido à forma ondulada que lhe dá maleabilidade e que evita que seja uma estrutura rígida. Além da função de suporte, a membrana basal também desempenha a função de reservatório de componentes citoactivos, tais como factores de crescimento<sup>(2,6,7)</sup>.

### 1.1.2.3. Derme

A espessura da derme é 10 vezes superior à da epiderme, variando entre 0,2 mm (nas pálpebras) até cerca de 4 mm (na planta dos pés) e é essencialmente esta camada que dita a espessura total da pele. A derme está em contacto directo com a membrana basal e, juntamente com esta, desempenha a função de suporte mecânico à epiderme, acompanhando a topologia ondulada da fronteira da epiderme com a membrana basal com as invaginações de uma estrutura na outra, o que impede que estas duas se separem ou deslizem uma sobre a outra. A Figura 1.5 apresenta uma imagem de um corte histológico da pele, com foco sobre a derme<sup>(2)</sup>.

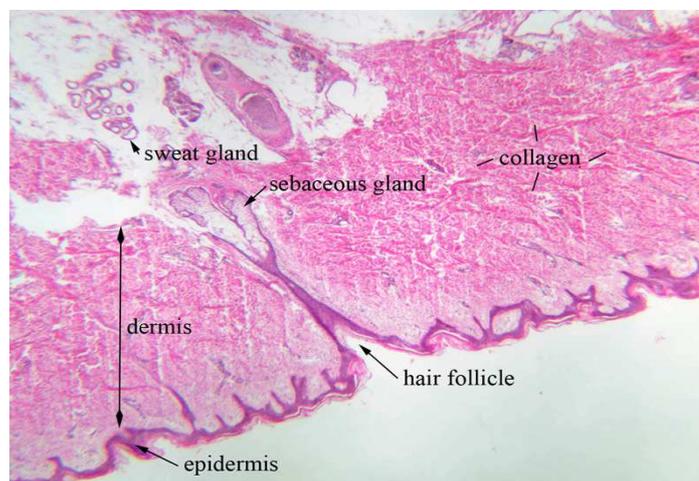


Figura 1.5 - Imagem de histologia da pele com a derme e algumas estruturas identificadas<sup>(15)</sup>.

De uma forma geral, a derme é composta principalmente por colagénio, fibras elásticas e reticulares, fibroblastos, vasos sanguíneos, glândulas sebáceas e sudoríparas, folículos pilosos e raízes de unhas, terminações nervosas e tecido muscular. É uma estrutura densamente populada e bem hidratada. É graças à sua composição à base de fibras elásticas interligadas em forma de matriz, que a derme é a estrutura responsável pela elasticidade e resistência à tracção mecânica da pele<sup>(1,2,7,14,16)</sup>.

A derme tem dois tipos de vascularização muito densos e interconectados: um no limite junto à epiderme, e o outro junto ao tecido subcutâneo. A grande vascularização da derme permite que esta forneça metabolitos à epiderme através da membrana basal por simples difusão. A vascularização é ainda complementada por um sistema linfático cujo funcionamento é essencial ao equilíbrio da derme; a deficiência no seu funcionamento provoca o edema da pele. O conjunto destes dois sistemas garante a presença na derme de células do sistema imunitário, como macrófagos e mastócitos, nutrientes e oxigénio. A presença de células do sistema imunitário é crucial no combate a microrganismos e outros agentes nocivos quando estes são capazes de passar através da epiderme e chegar à derme.

A derme contribui ainda para a termoregulação do corpo humano através da vasodilatação e vasoconstrição dos vasos sanguíneos e pelas glândulas sudoríparas, derivadas de invaginações da epiderme<sup>(1,2,7,14,16)</sup>.

#### **1.1.2.4. Tecido subcutâneo**

A última camada da pele, a mais interna, é o tecido subcutâneo. Alguns autores consideram o tecido subcutâneo, ou fáscia superficial, uma estrutura à parte da pele.

A fronteira entre a derme e o tecido subcutâneo é indistinguível nos humanos devido à sua semelhança, sendo o tecido subcutâneo mais rico em tecido conjuntivo areolar e adiposo do que a derme. O tecido conjuntivo areolar caracteriza-se por uma rede aberta e lassa de fibras, uma alta vascularização e espaços intersticiais. O tecido adiposo é predominantemente populado por adipócitos, células capazes de sintetizar e armazenar lípidos, e cuja função mais importante é a termoregulação. Quando o tecido adiposo predomina em relação ao areolar, passa a denominar-se por gordura subcutânea, constituída principalmente por células mesenquimais, especializadas no armazenamento de gordura<sup>(2,7,17)</sup>.

A constituição descrita do tecido subcutâneo permite-lhe o desempenho de funções cruciais que incluem o isolamento térmico, o armazenamento de energia, o amortecimento de impactos, e de ligação e protecção dos órgãos e tecidos subjacentes<sup>(2,7)</sup>.

## **2. Cicatrização e tratamento de feridas**

A pele tem um papel crucial na nossa sobrevivência de tal forma que a perda de 20% da pele pode conduzir à morte na ausência de tratamento. Podem ocorrer vários tipos de danos na pele, incluindo feridas. Uma ferida na pele é uma descontinuidade anormal desta em resultado de morte celular ou dano do tecido<sup>(7,18)</sup>.

## 2.1. Tipos de feridas

A lesão de um tecido pode afectar as células que o constituem na sua morfologia, na sua função e no seu fenótipo. Consequentemente a função de barreira da pele pode ser perdida, e os pacientes ficam susceptíveis a infecções bacterianas, desidratação, desequilíbrio térmico e à invasão por agentes nocivos<sup>(14,18-20)</sup>.

A caracterização e classificação do tipo de ferida é um dos primeiros passos e dos mais importantes para a definição do tratamento a implementar, sendo assim essencial a sistematização deste processo.

A classificação de feridas toma em conta o tipo de ferida, a extensão da perda de tecido, a presença de infecção, corpos estranhos e danos internos. A existência de vários critérios de análise de uma ferida justifica o aparecimento de várias classificações.

Uma das classificações propostas tem em conta o tipo de ferida, podendo ser<sup>(20)</sup>:

- a) Feridas sem perda de tecido (ex.: cortes)
- b) Feridas com perda de tecido
  - a. Causada por queimadura, trauma ou abrasão
  - b. Resultante de doenças crónicas (ex.: úlceras diabéticas e úlceras de pressão)
  - c. Resultantes do tratamento da própria ferida (ex.: provocada pela recolha de tecido para enxerto ou resultante de abrasão cutânea ou desbridamento)

Quanto à extensão da ferida, estas podem ser classificadas como<sup>(19)</sup>:

- a) Ferida superficial, envolvendo apenas a epiderme;
- b) Ferida de espessura parcial, que envolve a epiderme e derme;
- c) Ferida de profundidade total, que envolve além da epiderme e derme, a gordura subcutânea e outros tecidos mais internos.

## 2.2. Processo de cicatrização de uma ferida

O processo de cura de um tecido que foi submetido a um dano pode ocorrer por dois processos diferentes: por reparação (ou fibrose), ou por regeneração.

No primeiro processo há a substituição do tecido original por tecido de cicatriz, formado principalmente por colagénio produzido pelos fibroblastos. Neste processo a interrupção do tecido é eliminada, no entanto nem o tecido nem a sua função são restaurados. Este processo é verificado em cortes mais profundos e queimaduras extensas.

No processo por regeneração é sintetizado tecido com a mesma estrutura e função do original. A maior parte das pequenas feridas que ocorrem na pele, tais como cortes, abrasões ou pequenas queimaduras, curam por regeneração<sup>(1,2)</sup>.

Além destes dois processos, pode ainda ocorrer cicatrização da ferida por contracção das bordas da pele, levando ao fecho da ferida por união destas. Este processo também pode ocorrer em paralelo com os outros<sup>(1)</sup>.

Em termos de cicatrização, a derme e a epiderme apresentam processos bastante distintos. A epiderme é um tecido com capacidade regenerativa e, portanto, numa ferida sem lesão da derme a epiderme recupera a sua estrutura totalmente. Por outro lado, a derme é um tecido não regenerativo: no caso de excisão da epiderme e da derme, as bordas da ferida contraem fechando a ferida com formação de cicatriz<sup>(1,19)</sup>.

Todo o processo de cicatrização de uma ferida é regulado pela acção conjunta de factores de crescimento, como as citocinas, proteases e ainda outros componentes não identificados até ao momento. As alterações histológicas que resultam desta acção constituem as várias fases subsequentes que levam à formação de neotecido e assim ao fecho da ferida<sup>(19)</sup>.

O processo de cicatrização de uma ferida envolve várias fases, cuja divisão varia consoante os autores<sup>(1,2,19,21)</sup>. A Figura 1.6 esquematiza, de uma forma sucinta, o processo típico de cicatrização de uma ferida.

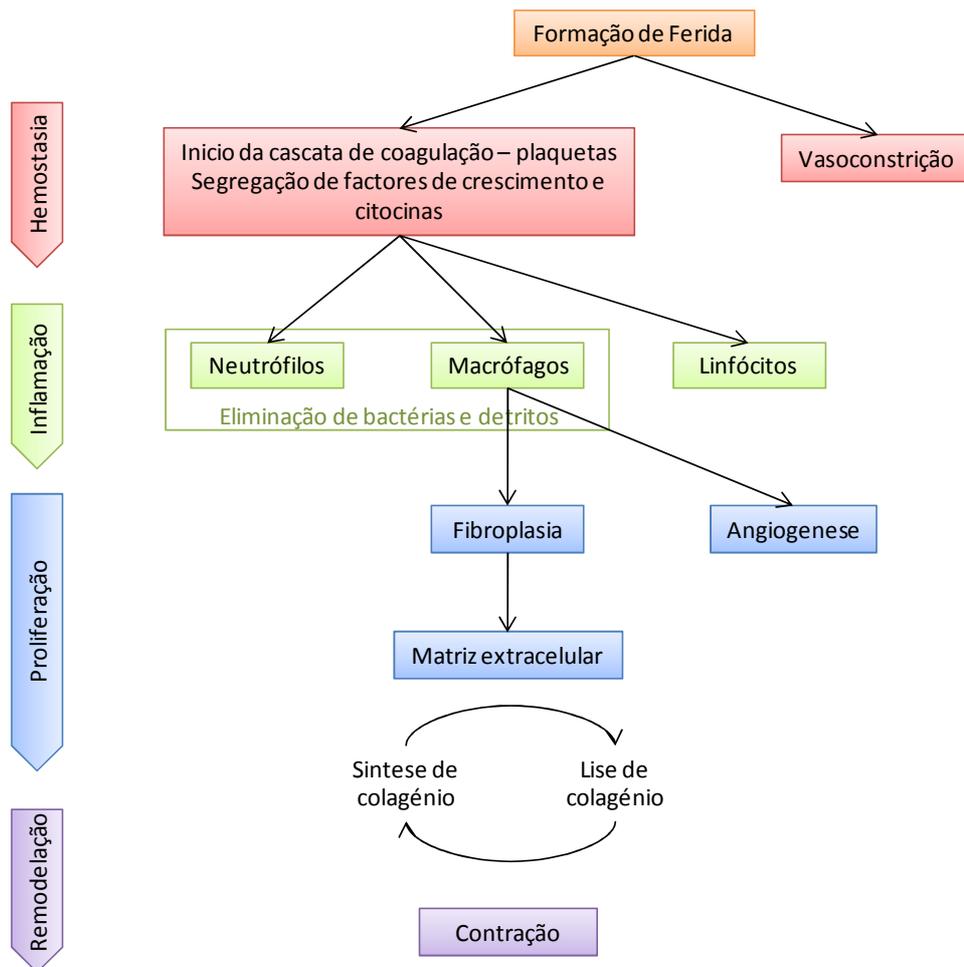


Figura 1.6 – Resumo de processo de cicatrização de uma ferida<sup>(21)</sup>.

A divisão do processo de cicatrização em fases simplifica a sua descrição. No entanto, no decorrer deste processo, verifica-se que o início de uma fase não coincide com o termo da anterior, mas ocorre uma sobreposição das diferentes fases.

A duração de cada fase de cicatrização é variável, dependendo de vários factores tais como o tipo de ferida e a sua localização. A sucessão das fases de cura da ferida é crucial para o sucesso do processo de cicatrização. Tanto as fases individualmente como o processo num todo podem durar períodos de tempo diferentes, consoante o tipo e a extensão da ferida ou outros factores clínicos<sup>(19)</sup>. A Figura 1.7 apresenta a duração típica das várias fases.

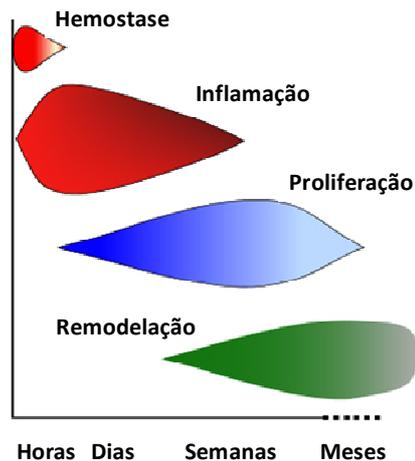


Figura 1.7 – Duração típica de cada fase do processo de cicatrização<sup>(22)</sup>.

As fases de cicatrização de feridas aqui descritas poderão não ser distinguíveis durante o processo de cura. Mas no caso de uma ferida extensa pode ser possível observar as várias fases ao mesmo tempo em zonas distintas<sup>(19)</sup>.

### 2.2.1. Fase hemostática

Quando um tecido vascularizado, tal como a pele, é danificado os vasos sanguíneos atingidos sangram para o interior da ferida. Nesta fase ocorre a vasoconstrição e a coagulação, de forma a parar a hemorragia resultante da ferida. Segue-se um processo designado por cascata de coagulação que é iniciada pela activação das plaquetas quando expostas ao colagénio extravascular, tal como o colagénio tipo I. Quando em contacto com o colagénio libertam citocinas e factores de crescimento. Nesta fase aumenta a afluência de sangue à zona<sup>(19,21,23)</sup>.

Forma-se assim um coágulo cuja superfície seca e endurece. Este coágulo cria uma superfície que está em contacto com a borda da ferida, formando uma solução de continuidade e barreira, impedindo a invasão dos tecidos sãos por agentes patogénicos. Sob esta crosta os macrófagos que afluíram à zona iniciam o processo de limpeza, digerindo os detritos do tecido danificado<sup>(2)</sup>.

### 2.2.2. Fase inflamatória

A fase inflamatória é desencadeada pelo início da cascata de coagulação da fase anterior. Durante a fase inflamatória ocorre uma afluência de células inflamatórias (neutrófilos, macrófagos e linfócitos) à área da ferida. Durante esta fase são ainda libertados factores de crescimento que preparam o local da ferida e criam as condições necessárias para a próxima fase de proliferação celular.

Os neutrófilos são as primeiras células inflamatórias a responder ao início da cascata de coagulação. Estes migram para a zona da ferida através do tecido conjuntivo circundante e têm como função a eliminação de corpos estranhos e a libertação de citocinas pró-inflamatórias, que

por sua vez activam as células do tecido conectivo local. A eliminação de tecido morto é facilitada pela libertação de enzimas, neste caso proteases, armazenadas nos grânulos citoplasmáticos. Os neutrófilos não têm função na regulação do processo de cicatrização da ferida e a sua contagem na zona desce após a ocorrência da ferida, excepto quando se verifica uma infecção ou continuação do trauma em que se prolongará a requisição deste tipo de células<sup>(19,21,23)</sup>.

Os macrófagos são derivados dos monócitos do sangue. Tal como os neutrófilos, os macrófagos fagocitam e assim removem células de tecido não viável, detritos da matriz extracelular e corpos estranhos (como por exemplo bactérias). Os macrófagos libertam factores de crescimento incluindo os factores de crescimento de fibroblastos, de derivados das plaquetas e do endotélio vascular. Este conjunto de factores de crescimento é necessário para a estimulação da fibroplasia e angiogénese, e assim regular a formação da matriz extracelular provisória, que serve de base à reabilitação da derme e proliferação da epiderme. Os macrófagos são cruciais no processo de cicatrização da ferida e medeiam a transição para a fase de proliferação<sup>(19,21,23)</sup>.

No final desta fase, a quantidade de neutrófilos decresce. A ausência de neutrófilos e a diminuição do número de macrófagos é uma indicação de que a fase seguinte pode ser iniciada.

Assim, após a lesão, os neutrófilos surgem rapidamente na zona da ferida, predominando durante 1 a 2 dias. A migração de monócitos e a acumulação de macrófagos pode durar alguns dias até semanas e, como já foi referido, são estes que ditam o início da fase proliferativa<sup>(18)</sup>.

### **2.2.3. Fase proliferativa**

O objectivo desta fase na cicatrização é a substituição da matriz provisória de fibrina por uma matriz de fibras de colagénico, proteoglicanos e fibronectina para restaurar a estrutura e função do tecido. A fase proliferativa engloba a migração de fibroblastos, formação da MEC e produção de colagénico, angiogénese e reepitelização. Um evento importante durante a fase proliferativa é a reconstrução da circulação sanguínea na zona da ferida, substituindo os vasos danificados por vasos competentes. Por fim, a formação do tecido granuloso e a epitelização são dois dos eventos mais importantes desta fase, sendo os fibroblastos as células com maior relevância nesta fase<sup>(23)</sup>.

A migração de fibroblastos para a zona da ferida ocorre como resposta de vários mediadores libertados inicialmente pelas plaquetas e depois pelos macrófagos. Os fibroblastos que ocorrem na matriz provisória da ferida e no tecido granuloso são mais activos e abundantes do que os que se encontram na derme normal. A migração e acumulação dos fibroblastos na ferida exige que estes alterem a sua morfologia e produzam proteases, segregando-as para desimpedir o caminho através da MEC até à zona da ferida. A direcção do movimento de migração dos fibroblastos é condicionada pela orientação das fibrilhas na MEC e da matriz provisória e pelo gradiente de factores de crescimento, citocinas e quimiocinas<sup>(23)</sup>.

Durante a fibroplasia (formação da MEC) os fibroblastos libertam proteoglicanos e glicosaminoglicanos, colagéneo e outros componentes importantes da MEC. O factor de crescimento derivado de plaquetas (PDGF) e o factor de crescimento transformador (TGF)- $\beta$  são dois dos factores de crescimento mais importantes que regulam a actividade dos fibroblastos. Ambos são segregados principalmente pelas plaquetas e pelos macrófagos. O PDGF estimula a proliferação, a quimiotaxia, e a expressão de colagéneo. Por outro lado o TGF- $\beta$  regula a deposição da matriz extracelular. Assim, simultaneamente com a migração e proliferação dos fibroblastos, são sintetizadas as proteínas da MEC, que são depositadas desde a periferia da ferida para o interior, formando uma matriz extracelular provisória. A duração da fibroplasia varia consoante se trate de uma ferida crónica ou com a quantidade de MEC necessária (que diminui com a extensão do processo de contracção do tecido)<sup>(2,19,21,23)</sup>.

A formação de novos vasos sanguíneos, angiogénese, é essencial para a sustentabilidade do neo-tecido. A angiogénese é um processo complexo que depende da presença de matriz extracelular no leito da ferida e da estimulação da migração e mitogénese das células endoteliais. O processo de angiogénese é estimulado por vários factores micro-ambientais locais, tais como, a baixa tensão de oxigénio, pH baixo, e níveis de lactato altos. Este processo depende ainda de factores de crescimento segregados por células epidérmicas, fibroblastos, células endoteliais vasculares e macrófagos, tais como factores de crescimento de epiderme, factores de crescimento insulina-*like*, factores de crescimento de fibroblastos e factores de crescimento endotelial vascular. Assim, o conjunto de todos estes factores estimula o crescimento de novos capilares no tecido formado, fornecendo o oxigénio e nutrientes presentes no sangue e necessários à viabilidade do tecido. A angiogénese termina quando a zona da ferida está totalmente preenchida com tecido novo e a oxigenação do tecido e as necessidades metabólicas estão satisfeitas<sup>(19,21,23)</sup>.

Quando a ferida está fechada, este processo retrocede através da apoptose, levando à desintegração de uma parte dos vasos formados que não são necessários para o funcionamento normal dos tecidos<sup>(19,21,23)</sup>.

Este novo tecido vascularizado formado constitui o tecido granuloso. O tecido granuloso é caracterizado pela grande densidade de vasos e capilares sanguíneos, pela elevada densidade celular de fibroblastos e macrófagos e por fibras de colagéneo organizadas de uma forma aleatória. É a presença destes conjuntos de capilares que dão ao tecido granuloso a sua aparência irregular, granular, avermelhada, delicada e que sangra facilmente se danificada. A presença deste tecido na zona da ferida é um indicador da resolução pelo processo normal da fase inflamatória<sup>(19,21,23)</sup>.

Todas as feridas dérmicas curam por três processos básicos: contracção, deposição de matriz de tecido conectivo e epitelização em si.

A epitelização é um processo que por si só envolve várias fases: separação de células epiteliais e alterações da sua estrutura interna, migração, proliferação e diferenciação. A epitelização inicia-se poucas horas após a ocorrência da ferida e o processo depende da profundidade da ferida formada.

No caso de feridas de profundidade parcial as células epidérmicas dos apêndices da pele, que neste tipo de ferida não são afectadas (como por exemplo folículos pilosos ou glândulas sebáceas), cobrem rapidamente o tecido exposto por migração. Ao mesmo tempo, as células da membrana basal começam a proliferar para fornecer células epiteliais adicionais.

Se a ferida for de profundidade total a epitelização só se poderá dar a partir das bordas da ferida, o que torna o processo mais demorado. A migração de queratinócitos ao longo dos planos do tecido é facilitada pela produção de proteínases (ou enzimas proteolíticas) e pela expressão de integrinas, e continua até as células epiteliais encontrarem outras células epiteliais em migração, formando assim uma camada confluenta. Uma vez formada esta camada confluenta, as células entram no processo de proliferação para restabelecer as várias camadas da epiderme, e depois no processo de maturação, para restaurar a sua função de barreira. Após a restituição da continuidade do epitélio à superfície, uma nova membrana basal irá formar-se, cuja maturação pode demorar vários meses. Este processo decorre sob a crosta formada; eventualmente, a crosta solta-se e o epitélio cresce em espessura. A epitelização é o ponto-chave da cicatrização de uma ferida, mais especificamente da fase proliferativa, mas não é o evento final<sup>(2,6,19,21,23)</sup>.

Em termos cronológicos, tipicamente, o tecido granuloso surge ao fim de 3 a 5 dias após a lesão, a par da angiogénese, que se inicia tipicamente 3 a 7 dias após a lesão. No total a fase proliferativa dura várias semanas<sup>(19)</sup>.

### **2.2.4. Fase de remodelação**

A fase de remodelação é a última fase do processo de cicatrização. É caracterizada pela maturação do tecido granuloso e pelo aumento da resistência do novo tecido.

A maturação do tecido granuloso é caracterizada principalmente pela redução da actividade metabólica das células, redução da densidade celular, e redução do número de capilares por agregação em vasos sanguíneos maiores e apoptose.

Durante esta fase as propriedades mecânicas, especialmente a resistência à tracção do tecido, melhoram devido às alterações do tipo, quantidade e organização do colagénico. A resistência à tracção de um tecido recém-formado é apenas 25% da do tecido normal. No início do processo de cicatrização são sintetizadas grandes quantidades de colagénico tipo III, mas na fase de maturação este colagénico é substituído por colagénico tipo I, o tipo predominante na pele. No entanto, o aumento da resistência à tracção do tecido nesta fase deve-se principalmente à reorganização das fibras de colagénico, que foram depositadas inicialmente de uma forma

aleatória durante a formação do tecido granuloso, e ao aumento de pontos de reticulação cruzada covalente das moléculas de colagénio por acção de enzimas libertadas pelos fibroblastos para a matriz extracelular. O processo de remodelação pode demorar vários meses, ao longo dos quais vai decorrendo a reorganização das fibras de colagénio, aumentando a resistência à tensão do tecido até 70% a 80% da de um tecido não danificado<sup>(19,21,23)</sup>.

A zona da ferida, que no início pode apresentar uma depressão, vai sendo preenchida com a evolução da fibrose e da remodelação do interior da ferida para o exterior, até esta se tornar praticamente imperceptível. Este processo de maturação pode durar vários anos<sup>(2,19)</sup>.

Mesmo na ausência de complicações durante esta última fase, não é garantida a constituição de um neotecido com características funcionais, químicas, estruturais e propriedades mecânicas iguais às do tecido original, ficando a ferida preenchida por tecido de cicatriz.

### **2.3. Tecido de cicatriz**

Devido às alterações da quantidade, tipo e estrutura do colagénio presente num tecido de cicatriz, a sua composição e estrutura também são diferentes das de um tecido normal e as características mecânicas inferiores. Neste tipo de tecido o colagénio está organizado em aglomerados paralelos, ao contrário do que é verificado num tecido normal, em que o colagénio da matriz extracelular está organizado em forma de rede. O tecido de cicatriz tem uma predisposição superior à de um tecido não afectado para voltar a sofrer uma lesão, dadas as suas características mecânicas inferiores<sup>(19)</sup>.

Assim, no final do processo de cicatrização a ferida poderá estar preenchida por tecido semelhante ao da pele antes da lesão, com tecido de cicatriz ou, como é mais comum, por um tecido que engloba estes dois.

### **2.4. Factores que podem afectar a cicatrização de uma ferida**

O progresso e o resultado do processo de cura da ferida dependem de vários factores tais como a capacidade proliferativa do tecido circundante, a severidade e a extensão da destruição do tecido, o tipo de ferida, e as condições de saúde e idade do indivíduo<sup>(19)</sup>.

Como já foi visto na secção anterior, a vascularização da derme é essencial no mecanismo normal de regeneração da pele, sendo que se esta estiver comprometida o processo de cicatrização não seguirá o decurso normal. O último caso é especialmente evidente em pacientes diabéticos ou de idade avançada, nos quais a vascularização é deficiente, levando a uma cicatrização de feridas muito lenta ou até incompleta. Actualmente, devido ao aumento do número de diabéticos e da esperança média de vida, este problema tem vindo a crescer e a ganhar importância. As úlceras em diabéticos são um exemplo de complicações na cicatrização de feridas devido a problemas no sistema vascular. Apenas 2/3 destas úlceras irão cicatrizar.

Segundo o Relatório Anual do Observatório Nacional de Diabetes Português, só em 2009 foram registadas 1876 altas de internamentos hospitalares de pacientes com pé diabético (ocorrência de úlceras na zona dos pés de pacientes com diabetes) no Sistema Nacional de Saúde<sup>(14,24,25)</sup>.

A profundidade e a extensão de uma ferida são outros dois factores determinantes para o processo de cicatrização e a necessidade de intervenção. Se a queimadura levar à perda tanto da epiderme como da derme, numa zona com mais do que 4 cm de diâmetro, é necessária uma intervenção cirúrgica pois os tecidos não irão regenerar por si só<sup>(14)</sup>.

### **3. Procedimentos para o tratamento de feridas**

Os procedimentos de tratamento de feridas têm como finalidade melhorar as condições da área da ferida para a regeneração e melhorar o bem-estar do paciente.

Ao longo dos anos e do avanço do conhecimento estes procedimentos têm evoluído, desde a aplicação de preparações à base de plantas, até à aplicação mais recente de pensos activos, com medicamentos incorporados que estimulam o processo de cicatrização.

Em muitos casos, quando a danificação do tecido é significativa, é necessário proceder à preparação do leito da ferida antes da aplicação de um penso ou outro agente. Por exemplo, no caso de queimaduras, poder-se-á proceder a excisões tangenciais finas sucessivas, até se observar sangramento. Nos casos em que é evidente que não resta derme viável procede-se à excisão da espessura total, restando apenas o tecido são. Em ambos os casos o objectivo é a remoção do tecido necrótico e/ou comprometido, resultando numa ferida com uma superfície vascularizada viável<sup>(23)</sup>.

O tratamento de feridas pode dividir-se em duas áreas totalmente distintas: os pensos de feridas, e os substitutos de pele (que inclui os enxertos). Este trabalho foca-se tanto nos pensos para o tratamento de feridas quanto nos substitutos de pele.

#### **3.1. Pensos para o tratamento de feridas**

Um penso é, por definição, um produto que é aplicado sobre uma ferida para a isolar e proteger de agressões externas. A função ideal de um penso é a cobertura total e imediata da ferida, evitando a perda de fluidos e infecções, aliviando a dor e promovendo a sua cura<sup>(16,19)</sup>.

As lesões da pele são processos traumáticos que desencadeiam uma série de processos biológicos com o objectivo de cicatrizar essa abertura da pele. Estes processos de cicatrização podem, no entanto, não repor a estrutura original da pele. Durante o processo de cicatrização há ainda o risco de infecção, especialmente em vítimas de queimaduras. O melhoramento deste processo de cura das feridas passa pela aplicação de materiais biocompatíveis que promovam a migração, adesão e proliferação celular e diminuam o risco de infecção<sup>(26-29)</sup>.

Actualmente, existe uma grande variedade de pensos, com características e propriedades distintas, indicados para o tratamento de diferentes tipos de feridas, capazes de promover o desbridamento ou regular a humidade no leito da ferida. No entanto, não existe nenhum penso “universal”, indicado para qualquer ferida em qualquer ponto do processo de cicatrização. Assim, um penso deve ser escolhido consoante o caso a tratar. Os pensos para o tratamento de feridas não curam, no entanto, quando devidamente seleccionados, promovem a regeneração celular e previnem que o estado da ferida se deteriore<sup>(18,20,21,30)</sup>.

Alguns dos requisitos mais relevantes na escolha de um penso são<sup>(18,20,21,30)</sup>:

- capacidade de absorver exsudado e componentes tóxicos da superfície da ferida
- manter a interface, entre o penso e a superfície da ferida, húmida
- permitir trocas gasosas
- permitir isolamento térmico (no caso de feridas extensas)
- proteger a ferida de agressões externas, tais como invasão por microrganismos e agressões mecânicas
- renovação fácil, pouco frequente e que não interfira com o processo de cicatrização
- não-alérgico
- esterilizável
- confortável, maleável e moldável
- utilização fácil
- económico e esteticamente aceitável
- estimulador de factores de crescimento
- biocompatível

### 3.1.1. Classificação de pensos

Os pensos podem ser classificados a partir de vários critérios como a sua função, o tipo de material utilizado para a produção do penso ou a forma física do penso<sup>(31)</sup>.

Quanto à sua função, os pensos para feridas podem ser divididos em três categorias<sup>(20,31,32)</sup>:

- **Pensos passivos**, como a gaze e a compressa, os quais constituem a maior parte do mercado.
- **Pensos interactivos**, compostos por polímeros, são normalmente transparentes, permeáveis ao oxigénio e vapor de água, mas impermeáveis a bactérias e são recomendados para feridas com pouco exsudado.
- **Pensos bioactivos**, caracterizados pela libertação de substâncias capazes de influenciar o processo de cura da ferida activamente. Estes pensos actuam tanto por libertação de compostos introduzidos no penso como pela sua composição, que pode ser de material com actividade endógena. Entre tais materiais incluem-se o colagénio, o alginato, o ácido hialurónico e o quitosano. Entre os compostos que podem ser

introduzidos nos pensos encontram-se os fármacos, factores de crescimento e partículas de prata.

Além desta classificação, são sugeridas por outros autores outras classificações que variam no parâmetro considerado para classificação. Gupta *et al.*<sup>(30)</sup> sugerem uma classificação baseada na origem do material, dividindo-os assim em convencionais, biológicos e sintéticos.

### **3.1.1.1. Pensos modernos**

Como uma evolução a partir dos pensos tradicionais, tipicamente pensos passivos, surgiram pensos com a capacidade de manter um ambiente húmido na ferida e que promovem a sua cicatrização. Usualmente estes pensos são interactivos ou activos e são classificados quanto à sua constituição<sup>(31)</sup>.

Entre os vários pensos disponíveis é possível dividi-los, de uma forma geral, em filmes, espumas, hidrogéis, hidrocolóides, alginatos, hidrofibras e pensos contendo medicamentos<sup>(21,33)</sup>.

- **Filmes**

Caracteristicamente, estes pensos são películas finas, transparentes e semi-permeáveis. São fixados às bordas da ferida por adesivos. No entanto, este tipo de pensos tem-se revelado limitados em termos de aplicações. As suas características variam bastante conforme a marca quanto à sua permeabilidade ao vapor, adesividade, conforto e extensão<sup>(21,31)</sup>.

- **Espumas**

Está disponível uma alargada variedade de espumas sólidas para o tratamento de feridas com diferentes capacidades de absorção de fluidos. Além da espuma em si, o penso pode ter um adesivo para garantir a sua adesão à ferida. São facilmente adaptáveis à ferida e podem ser cortadas à medida da ferida (tanto em termos de tamanho como de forma). Como função adicional estas espumas permitem o isolamento térmico da ferida<sup>(21,31)</sup>.

- **Hidrogéis**

Esta classe de pensos é bastante abrangente, com uma composição que engloba uma ampla variedade de polímeros hidratados, como por exemplo carboximetilcelulose. A água, por sua vez, pode representar entre 75% e 90% do peso destes pensos. Têm a capacidade de promover o desbridamento autolítico (digestão das células e tecidos mortos por enzimas) da ferida e a sua re-epitelização. Consoante a formulação do penso, este poderá ser capaz de fornecer água à ferida, ou até absorver excesso de fluidos presentes no leito da ferida. Tipicamente são não aderentes e/ou impermeáveis. A sua apresentação pode variar desde placas com diferentes dimensões até géis fluidos<sup>(31,33)</sup>.

- **Hidrocolóides**

Os hidrocolóides constituem a família de pensos composta por colóides (agentes que formam géis), como por exemplo carboximetilcelulose, pectina ou gelatina, combinados com outros materiais, como por exemplo filmes de poliuretano. Estes pensos são moderadamente absorventes, semipermeáveis e aderentes à pele sã, mas não ao leito da ferida, e podem ser moldados às irregularidades da ferida. São indicados para feridas com pouco exsudado, e promovem a granulação na zona da ferida. São apresentados sob a forma de gel ou de placas adesivas de diferentes dimensões<sup>(31,33)</sup>.

- **Pensos de alginato**

Os pensos de alginato são produzidos a partir de sais de cálcio ou alginato de sódio. Este tipo de pensos pode ser apresentado sob duas formas: fibras ou matrizes liofilizadas. São extremamente hidrófilos, permitindo-lhes absorver o excesso de humidade formando um gel<sup>(31)</sup>.

### **3.1.2. O papel dos pensos no controlo da humidade no leito da ferida**

Como já referido, um dos requisitos de um bom penso é manter a ferida húmida. Apesar de tradicionalmente se considerar que uma ferida deve ser mantida seca e que a formação de crosta na ferida era indicação de que estava a cicatrizar convenientemente, actualmente sabe-se que manter a superfície da ferida húmida é vantajoso para a sua cicatrização.

Estudos demonstraram que feridas mantidas húmidas curam mais depressa do que quando secas. Quando uma ferida não é coberta e é deixada ao ar, ocorre a formação de crosta na ferida, resultante da desidratação. Forma-se assim uma barreira mecânica que impede a migração de células epidérmicas, retardando o processo de cicatrização. Quando a ferida é mantida húmida a formação de crosta é evitada e assim as células poderão migrar. No entanto, se há presença de exsudado, este deve ser absorvido pelo penso a aplicar, evitando que se acumule e solidifique na ferida<sup>(1,20,30)</sup>.

Tendo em conta a gestão da humidade durante a aplicação do penso é possível dividir os pensos em três categorias<sup>(18)</sup>:

a) Pensos que absorvem o exsudado

Estes pensos possuem uma grande capacidade de absorção de fluidos pelo que estão indicados para feridas com grande produção de exsudado, pois minimizam a necessidade de troca de penso.

b) Pensos que mantêm a hidratação

À medida que a ferida vai curando, a produção de exsudado diminui, começa a ocorrer a formação de tecido granuloso e formação de tecido conectivo. Nestes

casos não é indicado utilizar um penso absorvente, pois poderá levar à desidratação da ferida, mas sim um penso que mantenha o nível de hidratação.

c) Pensos que aumentam a humidade da ferida

Quando as feridas estão totalmente secas forma-se uma camada de tecido morto que deve ser removido. A remoção pode ser efectuada pelo próprio organismo, ou seja, por desbridamento autolítico. A presença de humidade na superfície da ferida favorece este processo, pelo que a adição activa de humidade à superfície da ferida favorece o processo de cicatrização.

### 3.2. Substitutos de pele

No caso de feridas com complicações que dificultam significativamente o processo de cicatrização da ferida, como por exemplo reduzida vascularização, é necessário utilizar tratamentos à base de substitutos de pele. Os substitutos de pele constituem um grupo de produtos bastante heterogéneo que têm a finalidade de fechar temporariamente ou permanentemente a ferida. Tal como no caso dos pensos, não existe o substituto de pele ideal, mas os produtos existentes hoje em dia permitem obter resultados bastante satisfatórios<sup>(34)</sup>.

#### 3.2.1. Enxertos de pele para o tratamento de feridas

Os enxertos de pele têm por objectivo a cobertura de uma ferida e podem ser classificados quanto à sua origem:

- Autoenxerto: o dador e receptor são o mesmo indivíduo
- Aloenxerto: o dador e o receptor são indivíduos diferentes, mas da mesma espécie
- Xenoenxerto: o dador e o receptor são de espécies diferentes

O autoenxerto é permanente, enquanto tanto o aloenxerto como o xenoenxerto são temporários e têm por finalidade proteger a zona da ferida enquanto esta regenera.

O autoenxerto é um processo de se obter a cobertura permanente da ferida, mas este procedimento tem vários pré-requisitos, tais como a disponibilidade de pele suficiente para recolha.

O aloenxerto é pele recolhida de cadáveres, que passa pelo mesmo processo de selecção que outros órgãos para transplante. O aloenxerto é vascularizado durante algumas semanas, até ser rejeitado pelo sistema imunitário do hospedeiro, tendo idealmente a este ponto servido o seu propósito. Este enxerto tem ainda a capacidade de proteger contra microrganismos invasores.

Por último, os xenoenxertos não chegam a ser vascularizados como os aloenxertos, mas retêm a humidade e calor como os aloenxertos.

Quanto à espessura, os enxertos podem ser de espessura parcial, em que é recolhida epiderme e parte da derme, ou de espessura total, em que a totalidade da epiderme e derme são recolhidas<sup>(23)</sup>.

### 3.2.2. Substitutos artificiais de pele

Em alternativa ao autoenxerto foram desenvolvidos diversos substitutos artificiais de pele. O objectivo destes substitutos é permitir, tal como com o autoenxerto, o fecho da ferida com um material com a mesma função que este, mas evitando a criação de uma nova ferida para a colheita do tecido. Um substituto artificial viável precisa de atingir os mesmos objectivos de um auto-enxerto: fecho imediato da ferida, vascularização permanente do enxerto e regeneração das camadas de derme e epiderme, sem formação de fibrose, cicatriz ou contracção<sup>(23)</sup>.

Estão disponíveis no mercado diversas alternativas de tratamento com enxertos, como por exemplo:

- **AlloDerm**<sup>®</sup> é um aloenxerto de pele de cadáver, preparado para ser totalmente acelular, restando apenas a matriz do tecido conectivo. Ao ser aplicado na zona da ferida, crescerá nessa matriz um novo tecido<sup>(23,35)</sup>;
- **Integra**<sup>®</sup> é uma matriz porosa de colagénio de tendão bovino e glucosaminoglicanos ligados covalentemente com uma camada semi-permeável de silicone. A camada de silicone serve de epiderme temporária e a formação de novo tecido ocorre a partir do leito da ferida sob a camada de silicone<sup>(23,36)</sup>;
- **Epicel**<sup>®</sup> é um tipo de autoenxerto produzido a partir das células do próprio paciente que são recolhidas e cultivadas em laboratório, até formarem grandes folhas de pele. Estes enxertos de epiderme de cultura estão indicados para queimaduras que comprometam em profundidade a derme ou mesmo em caso de espessura total<sup>(23,37)</sup>.

## 4. Os biomateriais e a sua utilização na produção de dispositivos médicos

### 4.1. Os biomateriais e a medicina

Têm sido sugeridas diferentes definições para o termo “biomaterial” ao longo dos anos mas, de uma forma simples, um biomaterial pode ser definido como qualquer substância, natural ou sintética, destinada a interagir com um sistema biológico sem o afectar adversamente<sup>(38)</sup>.

Os primeiros biomateriais a serem utilizados na medicina foram aplicados no tratamento de fracturas no início do século XX. No entanto, a utilização de polímeros como biomateriais só ocorre a partir da 2ª Grande Guerra, com a utilização de polimetacrilato de metilo como cimento ósseo<sup>(38)</sup>.

A variedade de polímeros utilizados como biomateriais aumentou desde então e, hoje em dia, inclui materiais sintéticos, tal como os poliuretanos ou o polietileno glicol, ou polímeros naturais, como a seda ou a celulose. A manipulação de biopolímeros, tanto sintéticos como naturais, tem muitas vezes por objectivo melhorar as funcionalidades dos materiais que são já à partida biocompatíveis<sup>(6)</sup>. Por estas características, e apesar de ser mais fácil manipular polímeros sintéticos, os polímeros naturais continuam a ter uma grande importância nas aplicações biomédicas<sup>(39)</sup>.

A selecção de um determinado biomaterial para a produção de um dispositivo médico deve ter em conta uma série de factores de diferentes ordens: biológica, físico-química e mecânica. Ao nível biológico o material seleccionado tem de ser, acima de tudo, biocompatível, enquanto os factores de ordem mecânica e físico-química pretendidos dependem da função e propósito do dispositivo médico<sup>(19)</sup>.

### **4.2. Quitosano: biomaterial utilizado na medicina**

A história do quitosano tem início no século XIX quando, em 1859, Rouget referiu a desacetilação da quitina. No entanto, foi só nos anos 50 do século passado que a investigação sobre o quitosano, a par com a da quitina, teve o seu verdadeiro início. Esta investigação revelou o quitosano como um polímero com aplicações em variadas áreas tais como a alimentar, o tratamento de efluentes, ciências farmacêuticas, sistemas de filtração e a agricultura. No entanto, a área chave em que o quitosano se revelou muito promissor durante a investigação desenvolvida foi a área biomédica. A importância do quitosano neste sector prende-se com as suas características biológicas como a sua biocompatibilidade, biodegradabilidade, actividade antibacteriana, baixa toxicidade e baixa imunogenicidade<sup>(40-44)</sup>.

A aplicação de quitosano no tratamento de feridas prende-se essencialmente com as suas características biológicas já descritas e ainda, nalguns casos, com as propriedades físicas e mecânicas. A aplicação de quitosano em feridas acelera a regeneração do tecido, quando comparado com outros métodos convencionais de tratamento. O quitosano é descrito na literatura como tendo a capacidade de melhorar a neovascularização e a formação de tecido granuloso, dois passos importantes do processo de cicatrização das feridas. A actividade do quitosano no tratamento de feridas consiste na aceleração da primeira fase de cicatrização da ferida, ao aumentar a taxa de infiltração de fibroblastos e células inflamatórias, na estimulação da produção de colagénio pelos fibroblastos e na activação da produção de citocinas por parte das células. Este conjunto de actividades acelera no geral o processo de cicatrização da ferida<sup>(45-48)</sup>.

Um dos efeitos mais interessantes do quitosano no tratamento de feridas é a formação de tecido granuloso com angiogénese; o quitosano induz os fibroblastos a libertar interleucinas (proteínas com capacidade de indução da divisão celular de outras células), que por sua vez estão envolvidas na migração e proliferação dos fibroblastos<sup>(49)</sup>.

A facilidade de manipulação e de criação de diferentes estruturas a partir de quitosano são duas vantagens que o tornam ainda mais desejável no desenvolvimento de dispositivos médicos.

#### 4.2.1. Quitosano: estrutura química, obtenção e manipulação

O quitosano é um co-polímero natural linear de glucosamina e N-acetil-D-glucosamina com ligação  $\beta(1\rightarrow4)$ , tal como representado na Figura 1.8. Este polímero é um derivado da quitina e é obtido por desacetilação parcial da mesma.

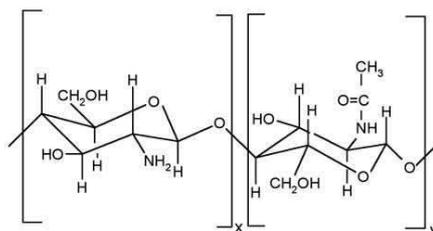


Figura 1.8 - Esquema representativo das unidades de N-acetil-D-glucosamina (Y - fracção molar destas unidades) e glucosamina (X - fracção molar destas unidades)<sup>(50)</sup>

A proporção entre os monómeros de glucosamina e N-acetil-D-glucosamina é o que distingue o quitosano da quitina. Considera-se quitosano a partir do ponto em que o polímero é solúvel em soluções ácidas diluídas. Isto corresponde a uma percentagem de unidades N-acetil-D-glucosamina no polímero abaixo de 50% a 60%. O grau de desacetilação do polímero é a fracção molar de unidades desacetiladas (glucosamina)<sup>(42,43,51,52)</sup>.

A quitina é um biopolímero sintetizado por muitos organismos e é o segundo polímero natural mais abundante, precedido pela celulose. É um dos principais constituintes da casca dos crustáceos e da parede celular dos fungos. Assim, um dos processos de obtenção de quitosano a partir da quitina é também um processo de aproveitamento de um desperdício alimentar ao nível mundial: a casca de camarão<sup>(42,43)</sup>.

O processo de isolamento da quitina a partir da casca de camarão, a fonte mais utilizada, inclui um primeiro passo de despigmentação da casca, seguido pela desmineralização e desproteínização. Para se obter finalmente quitosano é necessário proceder à desacetilação da quitina em condições alcalinas<sup>(43,53)</sup>.

A dissolução do quitosano em soluções ácidas (pH inferior a 6,0) dá-se pela protonação do grupo -NH<sub>2</sub> da posição C-2. O quitosano em solução é, assim, um biopolímero policatiónico. A dissolução de quitosano depende de vários factores, sendo os mais relevantes o grau de desacetilação e o peso molecular, que também irão influenciar a viscosidade da solução final. Os ácidos tipicamente utilizados para a dissolução do quitosano incluem: ácido glutâmico, ácido clorídrico, ácido láctico, ácido acético, ácido fórmico, e ácido butírico<sup>(42,43)</sup>.

## Produção de Matrizes à Base de Quitosano para o Tratamento de Feridas

Devido às suas características químicas e físicas, nomeadamente a sua solubilidade em soluções aquosas ácidas, o quitosano é um biopolímero de manipulação relativamente fácil<sup>(52)</sup>. Vários tipos de estruturas já foram desenvolvidos para a aplicação no tratamento de feridas, tais como: fibras, filmes densos, estruturas porosas, hidrogéis, e microesferas.

### **4.2.2. Estruturas à base de quitosano**

Na área do tratamento de feridas a produção de uma matriz é um dos passos essenciais, quer o seu destino seja a produção de um penso ou uma matriz para a Engenharia de Tecidos (ET).

As características dos pensos são ditadas pelo propósito a que é destinado. Se o objectivo é obter um penso capaz de humidificar a ferida, então, é necessário uma matriz com alto teor em água e que seja capaz de hidratar a superfície da ferida. Por outro lado, se o objectivo é regular o excesso de exsudado de uma ferida, será necessário desenvolver um penso com uma taxa de absorção considerável<sup>(14,16,28,45,54)</sup>.

O desenvolvimento de um penso ou de uma matriz para ET passa hoje em dia pela combinação de vários tipos de estruturas. Ao serem conjugados vários tipos de estruturas, mais ou menos complexas, é possível tirar o maior partido das suas propriedades, ao mesmo tempo que se contornam as desvantagens de cada uma. A utilização do quitosano nestes casos é uma mais-valia não só pelas suas propriedades biológicas como também pelo facto, já referido, de ser de fácil manipulação e permitir a produção de estruturas variadas, capazes de desempenhar diferentes funções e acompanhar os avanços e exigências da medicina.

## CAPITULO II - Materiais e Métodos

### 1. Materiais

O quitosano utilizado foi de origem comercial, *Cognis*, (Monheim am Rhein, Alemanha). O produto fornecido por esta empresa denomina-se *Chitopharm*<sup>®</sup> e apresenta-se com três pesos moleculares diferentes: baixo (S), médio (M) ou alto (L). Nalguns casos, o quitosano foi transformado a partir destes, conforme descrito nos capítulos respectivos. Os métodos de produção são característicos de cada produto e serão igualmente descritos nos capítulos respectivos.

Os restantes materiais utilizados na produção e análise de cada produto específico encontram-se descritos no capítulo correspondente.

### 2. Métodos de caracterização físico-química

Os métodos aqui apresentados correspondem aos utilizados transversalmente no desenvolvimento deste trabalho para os diferentes produtos descritos. Os métodos que foram utilizados apenas no desenvolvimento de um produto isoladamente serão descritos nesse capítulo, na secção de materiais e métodos.

#### 2.1. Cromatografia de Permeação em Gel (GPC)

A técnica de Cromatografia de Permeação em Gel (*Gel Permeation Chromatography* – GPC) é uma técnica analítica cromatográfica na qual a separação dos analitos é feita com base no volume hidrodinâmico da molécula. Isto é conseguido através da injeção de uma amostra em solução numa coluna porosa (gel), onde se dá a separação. As moléculas maiores, tendo menor probabilidade de ficar retidas nos poros, atravessam a coluna rapidamente, enquanto as moléculas mais pequenas tendem a ficar retidas na coluna mais tempo.

O GPC é tipicamente aplicado na análise de polímeros. Esta técnica permite obter o peso molecular médio em peso ( $M_w$ ) e a polidispersão. Neste trabalho quando se refere o peso molecular médio será sempre o  $M_w$ .

#### 2.2. Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR)

A espectroscopia vibracional é uma técnica utilizada para analisar a estrutura das moléculas através do fenómeno de absorção de radiação pela excitação vibracional das ligações moleculares. As frequências de vibração das ligações moleculares são específicas das ligações

entre os átomos que as constituem, sofrendo ligeiras alterações condicionadas pelo ambiente molecular em torno dessa ligação. É a absorção de energia a um determinado comprimento de onda que permite identificar a ligação química presente na molécula e, através do cruzamento da informação obtida com os valores de referência conhecidos, identificar a molécula<sup>(55)</sup>.

O FTIR é a técnica de espectroscopia vibracional mais utilizada. A fonte de luz fornece radiação infravermelha em toda a gama de comprimento de onda. Esta luz atravessa um interferómetro, à saída do qual são combinados os dois feixes formados: um feixe óptico fixo e outro com uma combinação de comprimentos de onda que variam ao longo do tempo. No entanto, a informação necessária para a análise da amostra é o espectro para toda a gama de comprimentos de onda, em que a cada comprimento de onda corresponde uma determinada absorção. Assim, a intensidade de luz que atinge o detector é sujeita a uma transformada de Fourier para obter a absorvância a cada comprimento de onda. Esta técnica permite obter informação como se a amostra fosse iluminada por luz monocromática, apesar de ser sempre iluminada por luz policromática<sup>(55)</sup>.

Esta técnica de caracterização química foi utilizada para caracterizar e identificar as amostras em análise. O equipamento utilizado foi um espectrómetro *Perkin-Elmer Spectrum 1000 FT-IR*.

Todas as amostras analisadas estavam no estado sólido, pelo que foram preparadas em pastilhas de brometo de potássio. As amostras analisadas, assim como o KBr, foram secos pelo menos durante um dia sob vácuo para garantir que a água e outros eventuais solventes seriam removidos. As pastilhas de amostra e KBr foram preparadas numa proporção de peso de 1:10, respectivamente, para uma massa total de 100 mg. Após mistura e trituração num almofariz, a mistura foi transferida para uma prensa para compactação. A amostra foi montada num porta-amostras para pastilhas de KBr. O espectro foi obtido em absorvância num varrimento de 4000 a 400  $\text{cm}^{-1}$ .

### **2.3. Ressonância Magnética Nuclear (H-RMN)**

A espectroscopia H-RMN baseia-se na detecção dos desvios químicos dos átomos de hidrogénio de uma amostra exposta a um campo magnético. Quando o campo externo é nulo os dois estados rotacionais de um átomo têm a mesma energia, mas à medida que o campo aumenta a energia dos dois estados rotacionais diverge. A alteração da frequência da radiação que é absorvida e reemitida pelo núcleo quando transita entre dois estados rotacionais depende do ambiente em torno do átomo: os outros átomos aos quais está ligado e a distribuição espacial das nuvens electrónicas. O desvio químico é característico das ligações de um átomo portanto, determinando a que frequência as moléculas absorvem radiação é possível identificar o ambiente químico dos átomos de hidrogénio, e assim identificar as ligações e a estrutura da molécula em torno destes.

A espectroscopia H-RMN pode ser utilizada para obter o grau de desacetilação do quitosano através da área do resíduo CH<sub>3</sub> do grupo N-acetil e da área dos restantes átomos de hidrogénio na molécula. O grau de desacetilação, DD, é obtido pela Equação 2.1<sup>(56)</sup>.

$$DD = \left\{ 1 - \left( \frac{\frac{1}{3}I_{CH_3}}{\frac{1}{6}I_{H2-H6}} \right) \right\} \quad \text{Equação 2.1}$$

Em que:

$I_{CH_3}$  – integral da intensidade da banda do CH<sub>3</sub>

$\frac{1}{3}I_{H2-H6}$  – soma dos integrais das intensidade das bandas correspondentes aos protões H2, H3, H4, H5, H6 e H6'

Os espectros de H-RMN foram adquiridos num espectrómetro *Bruker 400 (400MHz)*.

Esta técnica foi utilizada para a determinação do grau de desacetilação do quitosano (DD). A amostra de quitosano foi dissolvida numa solução a 2% (v/v) de ácido clorídrico deuterado em água deuterada, a 70°C.

#### 2.4. Microscopia Electrónica de Varrimento (SEM)

A microscopia electrónica de varrimento permite examinar a superfície de um material com uma grande resolução e com uma grande profundidade de campo. A superfície do material é varrida por um feixe de electrões que aí depositam energia, excitando os átomos do material. No modo mais habitual de construção da imagem topográfica da superfície, os electrões secundários emitidos são detectados e a corrente medida é convertida numa intensidade de um pixel da imagem. A grande profundidade de campo que caracteriza a microscopia electrónica permite ter uma noção da estrutura tridimensional da amostra<sup>(55)</sup>.

Este método foi utilizado para observar a superfície das várias estruturas produzidas. A preparação das amostras para esta técnica passa por garantir que estas se encontram totalmente secas. Para as estruturas em que o resultado final de produção era seco, como as fibras e as matrizes liofilizadas, não foi necessário tratamento adicional. Para o caso de amostras hidratadas ou biológicas foi necessário fixar e desidratar as amostras.

O procedimento adoptado para amostras hidratadas ou biológicas foi a reticulação com glutaraldeído a 2,5% (v/v) em PBS a 4°C durante a noite. As amostras foram depois enxaguadas 3 vezes com PBS durante 2 minutos e depois desidratadas em gradiente em soluções de etanol a 70, 80, 90 e 100%, durante 10 minutos em cada uma.

As amostras foram montadas numa placa de alumínio usando fita adesiva condutora dupla face e revestidas a ouro por pulverização catódica. O equipamento utilizado, a não ser quando indicado o contrário, foi um *Zeiss DSM962*.

## 2.5. Testes de tracção

Os testes de caracterização mecânica foram realizados no equipamento *Minimat (Firmware Vsn 3.1)*. Este equipamento permite realizar testes de tracção a diferentes materiais com a utilização do seu acessório de garras.

Todos os testes de tracção dos materiais desenvolvidos foram realizados a uma velocidade de tracção de  $5 \text{ mm}\cdot\text{min}^{-1}$ . Para todos os testes foram determinadas as dimensões da amostra utilizada, recorrendo a uma craveira no caso de amostras de liofilizados, cuja secção é um rectângulo, ou com a utilização de um micrómetro para o caso de fibras, com secção circular. As dimensões das amostras foram definidas consoante o tipo de produto, e são mencionadas no respectivo capítulo. Para cada ensaio também foi registado o afastamento inicial entre as garras. Estes testes foram realizados nas condições ambientais do laboratório.

A partir dos dados obtidos por este teste foram adquiridas várias informações consoante o produto em causa, e que serão descritos no capítulo correspondente.

## 3. Métodos de caracterização biológica

### 3.1. Linhas celulares utilizadas

Para a realização destes testes foram utilizadas linhas celulares de fibroblastos: L929, células obtidas a partir da pele do rato Wistar (descrito adiante) e 3T3.

Foram utilizadas células fibroblásticas da linhagem L929 em meio de cultura Eagle modificado por Dulbecco (DMEM), suplementado com soro bovino fetal inactivado (FBS) (5%).

As células fibroblásticas obtidas a partir da pele do rato Wistar foram cultivadas em meio DMEM-F12 (1:1 v/v), suplementado com FBS inactivado (10% (v/v)), L-glutamina (2 mM), penicilina G ( $100 \text{ U}\cdot\text{ml}^{-1}$ ), estreptomina ( $100 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ ), e anfotericina B ( $0,25 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ ).

As células fibroblásticas 3T3 foram cultivadas em meio de cultura Eagle modificado por Dulbecco (DMEM)-Glutamax, suplementado com FBS inactivado (10%) e  $100 \text{ U}\cdot\text{ml}^{-1}$  de estreptomina e penicilina (*Invitrogen*).

### 3.2. Teste de citotoxicidade *in vitro*

Os testes de citotoxicidade *in vitro* têm por fim identificar o efeito do dispositivo nas células cultivadas em contacto com este ou com o seu extracto. As alterações que indicam um efeito adverso do dispositivo sobre as células podem ser de diferentes ordens como a lise celular, inibição do crescimento celular e de formação de colónias ou outros. A norma ISO 10993-5<sup>(57)</sup> propõe vários métodos de determinação da citotoxicidade de um dispositivo médico, sendo

deixado ao critério do utilizador escolher o mais indicado tendo em conta a natureza e propósito do dispositivo. A norma define ainda que o teste deverá ser realizado na amostra directamente e/ou num extracto da amostra, sendo analisado para cada caso a preparação de amostra mais indicada.

Neste trabalho foram seleccionados dois testes idênticos em protocolo, mas utilizando sais diferentes. Os resultados dos testes com os diferentes sais são comparáveis dado que são uma quantificação das células viáveis.

O teste de brometo de 3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il-]-2,5-difenil-tetrazólio (MTT) permite a medição da viabilidade celular através da sua actividade metabólica. O MTT é uma substância solúvel em água com um tom amarelo quando em solução. O MTT é reduzido metabolicamente nas células viáveis, resultando na produção de cristais de formazano violetas, insolúveis em água. O número de células viáveis está assim directamente ligado à intensidade de cor, quantificável por espectroscopia após a dissolução dos cristais em álcool. A absorvância da solução é medida ao comprimento de onda de 570 nm com um filtro de referência de 655 nm.

O outro teste para contagem de células viáveis foi o *Cell Counting Kit-8 (CCK-8)*, BioChemika, Fluka. Este teste, ao contrário do anterior, utiliza um sal solúvel em água, o WST-8 [sal 2-(2-metoxi-4-nitrofenil)-3-(4-nitrofenil)-5-(2,4-disulfófenil)-2H-tetrazólio,monosódico]. Este sal forma um corante de formazano, amarelado, quando reduzido pela actividade das hidrogenases nas células, numa proporção directa ao número de células viáveis. A sensibilidade de detecção deste método é superior à de outros métodos como o MTT, XTT, MTS ou WST-1<sup>(58)</sup>. O valor de absorvância do meio é lido a 460 nm e com filtro de referência de 650 nm. Uma outra vantagem deste método é que, por ser solúvel no próprio meio de cultura, não é necessária a separação dos cristais do sal e a sua dissolução<sup>(59)</sup>.

A viabilidade celular relativa é dada pela razão entre a absorvância da solução dos cristais correspondentes à amostra ( $OD_A$ ) pela do controlo de células ( $OD_{CC}$ ), segundo a Equação 2.2<sup>(57)</sup>.

$$Viab. = \frac{OD_A}{OD_{CC}} \quad \text{Equação 2.2}$$

Para o controlo positivo foi utilizado etanol, substância citotóxica. O controlo de células consistiu na cultura de células sem as submeter a contacto com outra substância que não o material do poço de cultura. O controlo positivo do teste de citotoxicidade foi realizado numa placa de poços separada da do controlo de células e de amostra, para evitar contaminação destas últimas com o álcool utilizado no controlo positivo.

## Produção de Matrizes à Base de Quitosano para o Tratamento de Feridas

Foi utilizado um mínimo de 5 réplicas para cada teste, excepto no controlo positivo em que foram utilizadas apenas 3. Ao longo dos testes foram feitas observações ao microscópio para análise da morfologia das células.

### **3.2.1. Método directo**

No teste de citotoxicidade por contacto directo é utilizado o produto final e as células são cultivadas em contacto directo com o produto.

O protocolo seguido encontra-se descrito na norma ISO 10993-5<sup>(57)</sup>. Resumidamente, foi colocado em cada poço uma porção do produto a ser testado de forma a cobrir pelo menos 1/3 do fundo do poço. Sobre as amostras foi colocada uma suspensão celular para uma determinada quantidade de células por poço. O mesmo foi feito para os poços do controlo de células e controlo positivo. As células foram incubadas durante 24 horas a 37°C em atmosfera húmida de 5% CO<sub>2</sub>.

Após este período foi adicionado a todas as réplicas o sal utilizado no teste, que ficou em contacto com as células durante o período de tempo indicado pelo fabricante, a 37°C. Neste ponto, no caso do teste com MTT, o sobrenadante foi removido e foi adicionado a cada poço uma solução de isopropanol e ácido clorídrico para dissolução dos eventuais cristais formados, depositados no fundo dos poços. No caso de os cristais não ficarem totalmente depositados no fundo do poço foi necessário fazer uma separação destes por centrifugação. A absorvância da solução foi medida com um espectrofotómetro.

Quando foi utilizado o sal WST-8, o procedimento foi semelhante, excepto a fase de dissolução dos sais, desnecessária neste caso.

### **3.2.2. Método por extracto**

O teste de citotoxicidade pelo método de extracto consiste na cultura de células à qual é adicionado o extracto do produto preparado, seguido de incubação. O extracto é preparado colocando o produto em contacto com meio completo durante 24 horas a 37°C, numa proporção de 0,2 g por cada 1 ml de meio.

As células foram cultivadas numa placa de poços em meio completo. A cada poço foi adicionado um número conhecido de células e incubadas 24 horas a 37°C em atmosfera húmida de 5% CO<sub>2</sub>. Após incubação a confluência foi observada ao microscópio. O meio de cultura foi rejeitado e foi adicionado o extracto do produto preparado. As células foram incubadas durante 24 horas e após este período foi adicionado o sal e o protocolo seguido foi igual ao descrito para o contacto directo.

### 3.3. Testes de proliferação celular *in vitro*

A fim de compreender o comportamento e a evolução da viabilidade celular ao longo do tempo foram realizados testes de proliferação celular, determinando a viabilidade celular para diferentes pontos no tempo. No caso dos testes realizados com MTT foi necessário preparar diferentes conjuntos de amostras por ser um método destrutivo. No entanto, dado que o teste com WST-8 não é destrutivo, foi possível utilizar sempre as mesmas amostras ao longo do tempo.

### 3.4. Método para observação confocal

Este método de observação permite o estudo em profundidade de amostras assim como imagens tridimensionais. É especialmente utilizado em amostras biológicas. Esta técnica requer uma preparação da amostra que passa pela sua fixação e marcação. A fixação foi realizada com paraformaldeído a 4% (v/v) durante 1h. De seguida as amostras foram lavadas com PBS e foi adicionado Triton-X 100 a 0,5% (v/v) durante 20 minutos seguido de nova lavagem com PBS. A marcação das amostras foi realizada utilizando ToPro3 numa diluição de 1:500, faloidina a 1:100 e RNase a 1:50. Isto permite a observação do núcleo das células e da actina constituinte do citoesqueleto das células.

As imagens foram recolhidas com um microscópio confocal *Leica SPE* usando as objectivas 10x 0.3NA e 20x 0.7NA.

### 3.5. Testes *in vivo*

Todos os testes de experimentação animal aqui apresentados respeitaram o bem-estar do animal. Todos os animais foram mantidos em caixas individuais e alimentados com água e comida própria *ad libitum*.

O protocolo de realização das experiências variou com o produto em questão, pelo que será descrito pormenorizadamente no capítulo apropriado.



## Capítulo III – Hidrogéis de Quitosano para o Tratamento de Feridas

### 1. Introdução

#### 1.1. Hidrogéis como materiais

Os hidrogéis são estruturas poliméricas hidrófilicas, nas quais os polímeros podem estar ligados por diferentes vias. As ligações podem ser covalentes, resultantes da reacção entre um ou mais monómeros, por reticulação física, resultante de ligações entre as cadeias por pontes de hidrogénio ou interacções de van der Waals fortes. Os hidrogéis são insolúveis e capazes de conter até 98% de soluções aquosas ou fluidos biológicos na sua estrutura<sup>(60-62)</sup>.

Os hidrogéis podem ser obtidos a partir de homopolímeros ou copolímeros e são classificados consoante vários parâmetros como a carga total do hidrogel -neutros, aniónicos ou catiónicos - e as suas características mecânicas e estruturais - amorfos, semicristalinos, com ligação por pontes de hidrogénio, supramoleculares ou hidrocolóidais<sup>(62)</sup>.

Os hidrogéis também variam na sua forma. É possível obter hidrogéis com diferentes estruturas como<sup>(63)</sup>:

- formas sólidas moldadas, por exemplo, lentes de contacto maleáveis;
- matrizes de pó comprimido, aplicado por exemplo em cápsulas e comprimidos para ingestão oral;
- micropartículas, para o tratamento de feridas ou veículos de substâncias bioadesivas;
- revestimento, por exemplo, de cateteres e implantes ou do interior de capilares;
- membranas ou folhas, simples ou como reservatório de fármacos ou até como membranas para electroforese;
- em forma líquida, que se transforma em gel quando aquecido ou arrefecido.

Os hidrogéis têm aplicação em diferentes áreas na actualidade. Além das já referidas a sua aplicação passa também por implantes mamários, grânulos para conter humidade em zonas áridas, pensos para tratamento de queimaduras, como reservatórios para fármacos em sistemas de libertação controlada, biosensores, fraldas descartáveis e eléctrodos médicos<sup>(30)</sup>. Entre todas estas aplicações é de destacar a sua utilização na área farmacêutica e na área de dispositivos médicos<sup>(62)</sup>. Ainda, a área de Engenharia de Tecidos tem-se revelado forte e inovadora na aplicação dos hidrogéis devido às suas características, sendo a afinidade de determinadas proteínas com certos componentes do hidrogel uma propriedade bastante importante nesta aplicação<sup>(30,60,62,64)</sup>.

## Produção de Matrizes à Base de Quitosano para o Tratamento de Feridas

A produção destes hidrogéis é feita a partir da reticulação de variados polímeros, por exemplo, quitosano, poli(óxido de etileno), polietileno glicol ou álcool polivinílico<sup>(30,65)</sup>. As estruturas obtidas a partir de polímeros podem ter características variáveis, consoante a sua finalidade; por exemplo a sua forma, porosidade, solubilidade, ou a introdução de células na estrutura<sup>(66)</sup>. Os hidrogéis são sistemas compostos por um polímero hidrófilo, insolúvel em água, e água, e podem ser quimicamente estáveis ou instáveis (levando à sua desintegração ou dissolução).

No entanto, os hidrogéis são estruturas que apresentam algumas fragilidades ao nível da resistência mecânica. São apresentadas várias hipóteses para contornar estas desvantagens, uma das quais é a adição de um outro composto como por exemplo um reticulante (glutaraldeído ou genipina) ou de um segundo polímero com melhores características mecânicas (como a adição de álcool polivinílico para melhorar um hidrogel de alginato)<sup>(60,61)</sup>.

Estão descritos na literatura diferentes métodos de obtenção de hidrogéis a partir de diferentes polímeros, incluindo quitosano em conjugação com outros polímeros<sup>(67)</sup>. Neste trabalho o foco é a obtenção de um hidrogel contendo exclusivamente quitosano.

Hoffman<sup>(63)</sup> refere algumas desvantagens dos hidrogéis na aplicação para Engenharia de Tecidos que são coincidentes com as identificadas durante o processo de concepção e desenvolvimento do produto, das quais são de destacar:

- dificuldade de manuseamento;
- fracas propriedades mecânicas;
- dificuldade de desenvolvimento de método de esterilização.

Todas estas desvantagens estão interligadas, sendo desencadeadas pela baixa resistência mecânica destes materiais<sup>(30)</sup>.

Os principais polissacáridos utilizados para a produção de hidrogéis são: sulfato de condroitina, ácido hialurónico, quitosano, derivados de celulose e alginato. Em termos de proteínas o principal destaque recai sobre o colagénio, a gelatina, a elastina e a fibroína<sup>(62)</sup>.

A utilização de um hidrogel composto unicamente por quitosano apresenta diversas vantagens, nomeadamente em termos de segurança, evitando a utilização de matérias-primas de origem bovina, mas também em termos de produção em larga escala devido à simplificação do processo.

### **1.2. Hidrogéis no tratamento de feridas**

Como já foi referido, o processo de cicatrização de uma ferida é favorecido por um ambiente húmido no seu leito. Isto pode ser atingido pela aplicação de um penso de hidrogel, que é capaz de humedecer a superfície da ferida. Os hidrogéis são estruturas com um conteúdo em água bastante elevado, até 99%. Criam um ambiente húmido na superfície da ferida por libertação de

água, o que ajuda o desbridamento da ferida por hidratação e promove a autólise do tecido. No caso específico de uma queimadura a perda de líquido do corpo, por evaporação e exsudação, leva ao aumento da temperatura do corpo e da taxa de metabolismo, agravando o estado clínico do paciente. No entanto, como a sua capacidade de absorção é reduzida ou inexistente, pode ocorrer maceração da ferida<sup>(20,33)</sup>. Assim, uma das aplicações dos hidrogéis é o tratamento de queimaduras: reduzem a perda de líquido e mantêm a humidade alta na superfície da ferida<sup>(30)</sup>.

Entre os vários avanços na utilização de hidrogéis é de referir a obtenção de matrizes a partir de polímeros com agentes antimicrobianos incorporados, como nano-partículas de prata, para o tratamento de feridas<sup>(68,69)</sup>. Na área da Engenharia de Tecidos, a possibilidade de encapsulamento de células num hidrogel de colagénio permite a produção de uma matriz equivalente à derme para posterior utilização como enxerto<sup>(70)</sup>. Os hidrogéis podem ainda ser usados para a aplicação de células estaminais<sup>(71; 72; 73)</sup> ou de factores de crescimento<sup>(74)</sup> na ferida. Estas aplicações representam a utilização dos hidrogéis numa das áreas em maior desenvolvimento no tratamento de feridas de difícil regeneração. Assim, podem ser retiradas vantagens das diversas propriedades dos hidrogéis ao mesmo tempo, como por exemplo a promoção da adesão celular e a actividade antimicrobiana<sup>(75,76)</sup>.

Em estudos recentes o quitosano tem sido usado para a libertação de biomoléculas: foram encapsulados em quitosano factores de crescimento de fibroblastos<sup>(77)</sup> e factores de crescimento da epiderme humana<sup>(78)</sup>; pensos de quitosano incorporando procoagulante (polifosfato) e agentes antimicrobianos (prata) para melhorar as propriedades hemostáticas e antibacterianas<sup>(79)</sup>; e pensos de acetato de quitosano foram usados como pensos antimicrobianos para feridas infectadas<sup>(26)</sup>.

O hidrogel de quitosano, além de ser de fácil preparação, alia as propriedades do hidrogel às propriedades deste polímero para a regeneração das feridas.

#### **1.3. Hidrogéis de quitosano: o mercado**

Existem já no mercado produtos para o tratamento de feridas sob a forma de hidrogel. São, tipicamente, compostos por polímeros de celulose, como a carboximetilcelulose, e normalmente requerem a aplicação de um penso secundário<sup>(20,33)</sup>.

Nenhum destes produtos é composto exclusivamente por quitosano. A maior parte destes produtos são comercializados em estado seco, tendo depois a capacidade de absorver fluidos antes da aplicação, ao serem embebidos em soro fisiológico, ou aplicados directamente secos, utilizando a sua capacidade de absorção para absorver o exsudado da ferida. A Tabela 3.1 apresenta os produtos no mercado e as suas características mais relevantes.

## Produção de Matrizes à Base de Quitosano para o Tratamento de Feridas

Tabela 3.1 - Tabela de produtos comerciais e as respectivas características

CARACTERÍSTICA	PRODUTO		
	MedTrade Products, AQUANOVA, Super-Absorbent Dressing	Convatecs, Aquacel, Hydrofibre Wound dressing	Medline, XCell, Cellulose Wound Dressing
<b>Composição química</b>	Quitosano, derivados de quitosano e material de suporte	À base de carboximetilcelulose de sódio	Celulose, água e 0,085% de gluconato de clorohexidina
<b>Composição física</b>	Matriz absorvente suave	Matriz absorvente suave	Matriz suave e maleável
<b>Indicações de uso</b>	Sob a supervisão de um profissional de saúde Aquanova poderá ser usado em feridas tal como úlceras nas pernas, úlceras em diabéticos, feridas cirúrgicas, queimaduras, e no tratamento de feridas traumáticas ou de cirurgia que foram deixadas a sarar por intenções secundárias. Aquanova também pode ser usado no tratamento de feridas com tendência de hemorragia, tal como feridas a que foram mecanicamente ou cirurgicamente, removido o tecido morto, local de doação e feridas traumáticas.. Aquanova pode ser usado no controlo de pequenas hemorragias. É também indicado para pequenas queimaduras, cortes superficiais, feridas resultantes de lacerações e abrasões, e pequena irritação da pele.	Sob a supervisão de um profissional de saúde pode ser usado para feridas tais como úlceras nas pernas, feridas cirúrgicas, queimaduras, e tratamento de feridas por segunda intenção. Aquacel também pode ser usado no tratamento local de feridas com tendência de hemorragia, como feridas a que foi mecanicamente ou cirurgicamente, removido o tecido morto, local de doação e feridas traumáticas. Aquacel pode ser usado no controlo de pequenas hemorragias. Aquacel e indicado no controlo do exsudado de feridas por abrasão, laceração, pequenos cortes e pequenas queimaduras.	XCell é um penso primário, para cobrir a ferida ou queimadura na pele do paciente, para absorver o exsudado da ferida e manter a ferida num ambiente húmido que permite a natural remoção do organismo de tecido necrótico. O penso também protege contra abrasões, fricções, perda de água e contaminações externas. O ambiente húmido tem um efeito refrescante que pode reduzir a dor. O penso é não-aderente e não afecta o tecido granuloso na ferida. O XCell está também indicado como penso externo no tratamento de cortes superficiais, queimaduras por líquidos ou gases, queimaduras de primeiro e segundo grau, pequenas irritações da pele, feridas resultantes de lacerações ou fricções.

### 1.4. Produção de um hidrogel de quitosano

Estão descritos na literatura diferentes métodos de promover a formação de um gel a partir do quitosano. Entre eles, é de destacar o método desenvolvido por Domard *et al.*<sup>(67)</sup>, em que é obtido um hidrogel final de quitosano com água sem alteração química do polímero, por reacção numa solução de ácido acético e propanodiol em água, sendo possível obter o hidrogel final por um balanço hidrofóbico e hidrófilo específico. O mesmo grupo publicou um trabalho em que foi desenvolvido um hidrogel que, tal como o anterior, não envolve nenhum agente de reticulação nem nenhum solvente que não a água. Para tal, Domard *et al.* definiram três parâmetros como sendo os essenciais para a obtenção deste tipo de hidrogéis: a concentração inicial de quitosano tem que ser superior à concentração crítica necessária para a formação de ligações entre as cadeias, o balanço hidrofóbico e hidrófilo tem que atingir um valor mínimo para a formação do hidrogel, e a interface bidimensional de transição sol-gel tem que ser formada uniformemente. Tal foi atingido nesse trabalho por simples contacto da solução de polímero com gás de amónia<sup>(80)</sup>.

Este foi o método de produção de hidrogéis de quitosano adoptado neste trabalho, por não envolver nenhuma transformação química do quitosano nem nenhuma adição de agentes reticulantes. Isto permite obter um produto final composto apenas por quitosano, simplificando e reduzindo os custos do processo de produção.

O quitosano é um polímero solúvel em soluções ácidas ( $\text{pH} < 6,2$ ), nas quais se dissolve por protonação dos grupos  $-\text{NH}_2$ . Quando o pH se torna básico ocorre uma precipitação do polímero hidratado tipo gel por neutralização dos grupos amina<sup>(62)</sup>, tal como representado na Figura 3.1. A alteração do pH da solução de quitosano promovida por gás de amónia permite obter uma matriz com a superfície regular e uniforme. O gás de amónia dissolve-se na solução de quitosano progressivamente conduzindo à neutralização dos grupos amina<sup>(80)</sup>.

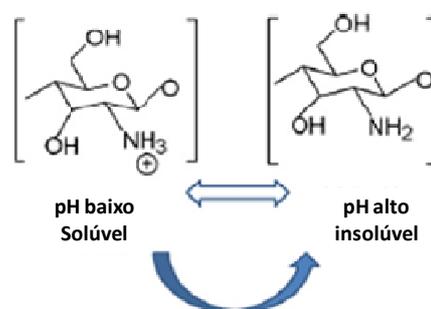


Figura 3.1 - Esquema do processo de precipitação do quitosano em solução por variação do pH<sup>(40)</sup>

Assim, o processo de formação de um hidrogel físico de quitosano envolve um equilíbrio de cargas do polímero; este processo encontra-se representado na Figura 3.2.

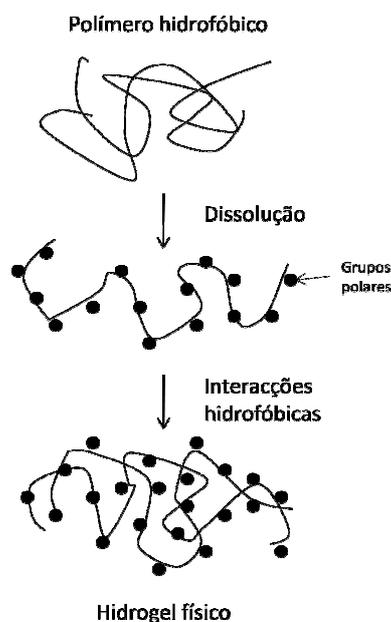


Figura 3.2 - Esquema da formação de um hidrogel físico<sup>(30)</sup>

## Produção de Matrizes à Base de Quitosano para o Tratamento de Feridas

Quando o vapor de amónia penetra na solução de quitosano reage com o ácido da solução e depois com o quitosano na sua forma protonada<sup>(81)</sup>.

A cinética desta reacção é bastante rápida, dado que é uma reacção ácido/base envolvendo apenas a troca de um protão entre a macromolécula de quitosano protonada e a amónia<sup>(82)</sup>. O processo de gelificação envolve três mecanismos de transferência de massa<sup>(81)</sup>:

- transferência de massa externa desde a interface entre a solução de amónia e o vapor de amónia até ao sistema polimérico;
- as reacções químicas que induzem a gelificação;
- a difusão interna da amónia e da água através da matriz polimérica.

Entre estes fenómenos, a difusão interna é o maior passo limitante do processo de gelificação do quitosano<sup>(81)</sup>. A cinética do processo de produção de um hidrogel de quitosano por contacto com vapor de amónia foi estudada aprofundadamente por Venault, *et al.*<sup>(81)</sup>. Neste seu trabalho procederam ainda à modelação do mecanismo de transferência de massa neste processo, validado pelos resultados experimentais obtidos.

É proposto um sistema de classificação<sup>(30,83)</sup> em duas categorias para os hidrogéis de quitosano mais adequado ao seu caso específico:

- a) Reversíveis ou físicos: a sua estrutura é mantida por ligações moleculares e/ou por forças secundárias entre as cadeias de quitosano ou com outros compostos (ex.: PVA), incluindo forças iónicas e pontes de hidrogénio reversíveis;
- b) Permanentes ou químicos: a sua estrutura é formada por ligações covalentes irreversíveis.

Neste caso, pelo processo escolhido na concepção e desenvolvimento, o hidrogel obtido será classificado como reversível ou físico. Os hidrogéis físicos não são homogéneos. Durante a sua produção podem formar-se aglomerados de polímero ou zonas hidrofóbicas ou iónicas. Neste processo, a homogeneidade dos hidrogéis pode ser maximizada pelo repouso adequado da solução e pela homogeneidade da solução após deposição nos moldes.

Por outro lado, as terminações das cadeias ou “loops” da cadeia do polímero também criam irregularidades no produto<sup>(63)</sup>. Estas irregularidades, no entanto, não apresentam à partida desvantagens na utilização dos hidrogéis como pensos para o tratamento de feridas.

## 2. Materiais e Métodos

### 2.1. Materiais

Para a produção dos hidrogéis otimizados foi utilizado quitosano da *Cognis, Chitopharm® M*, Alemanha, com um peso molecular médio de 650.000 e grau de desacetilação de 74,0%. O

ácido láctico (grau de pureza >99,0%) foi fornecido pela *HiMedia*, Índia, e a solução de hidróxido de amónia a 25% (puriss. p.a.) pela *Fluka*, Suíça.

Para os ensaios de caracterização foi utilizado quitosano *Chitopharm*<sup>®</sup> L com um peso molecular médio de 745.000 e grau de desacetilação de 70,3% e *Chitopharm*<sup>®</sup> S de 415.000 e 75,5% respectivamente, ambos fornecidos pela *Cognis*. As soluções de quitosano a partir das quais foram produzidos os hidrogéis apresentavam duas concentrações: 2 e 3% (m/m).

## **2.2. Métodos**

Os métodos gerais de observações por SEM, testes de citotoxicidade e de proliferação celular *in vitro*, e testes *in vivo* foram descritos no Capítulo II.

### **2.2.1. Métodos de produção**

O hidrogel de quitosano foi obtido através de um processo de coagulação do quitosano por exposição da solução a vapor de amónia.

O processo otimizado de obtenção dos hidrogéis consiste, em primeiro lugar, na dissolução de quitosano numa solução aquosa de ácido láctico a 2% (v/v). Após dissolução completa, a solução fica em repouso durante a noite para libertação das bolhas de ar formadas durante a dissolução. Esta solução é posteriormente depositada em moldes (12x10 cm), cerca de 30 g por molde, que são colocados dentro de uma câmara hermeticamente fechada, juntamente com uma solução de hidróxido de amónia a 2,5% (v/v). Este sistema permanece fechado durante a noite, para garantir a difusão da amónia na espessura total da solução de quitosano. Os hidrogéis formados são enxaguados com água para remover o excesso de amónia. Ainda no molde, os hidrogéis são deixados a arejar para a evaporação da amónia remanescente. Quando o teste em causa assim o justifica cada hidrogel é colocado individualmente em sacos de plástico (PA/PE) transparentes e selados. As amostras são identificadas e esterilizadas por radiação UV durante 30 minutos de cada lado. Os hidrogéis esterilizados ficam armazenados à temperatura ambiente, num local seco e limpo, até uso.

### **2.2.2. Métodos de caracterização**

#### **2.2.2.1. Caracterização mecânica por análise de textura**

Neste teste foi feita uma comparação entre hidrogéis obtidos a partir de três tipos de quitosano (os referidos nos Materiais deste capítulo) com diferentes pesos moleculares e graus de desacetilação.

O Analisador de Textura é um equipamento utilizado principalmente na indústria farmacêutica e alimentar. Dada a sua sensibilidade e método de análise, especialmente em termos de

## Produção de Matrizes à Base de Quitosano para o Tratamento de Feridas

montagem da amostra), este método foi seleccionado para caracterizar mecanicamente diferentes hidrogéis.

Foi utilizado um Analisador de Textura *TA.HDPlus Texture Analyzer*. Foi seleccionada uma sonda cilíndrica de fundo plano, por se ter revelado a mais indicada para estes ensaios.

Cada um dos hidrogéis foi colocado no equipamento e testado sob as mesmas condições, sumariadas na Tabela 3.2. Foi ainda definida a área de cada amostra passível de ser analisada, de forma a uniformizar as condições do teste, como a área central do hidrogel a partir de uma margem de 1 cm da borda, tal como esquematizado na Figura 3.3.

Tabela 3.2 - Parâmetros utilizados nos ensaios de análise de textura dos hidrogéis

<b>Compressão máxima</b>	95%
<b>Carga mínima para accionar o teste</b>	20 g
<b>Sonda</b>	Cilindro de fundo plano (diâmetro de 1 cm)
<b>Velocidade da sonda</b>	0,5 mm·s <sup>-1</sup>

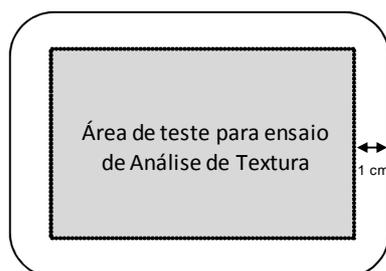


Figura 3.3 - Esquema de zona (a cinzento) do hidrogel para realização do ensaio de Análise de Textura

### 2.2.2.2. Reologia

Para a caracterização reológica dos hidrogéis de quitosano os testes foram realizados num sistema prato-prato, tal como proposto por Montembault *et al.*<sup>(80)</sup>. As medidas foram efectuadas em estado oscilatório num reómetro rotacional *Bohlin Gemini HR<sup>nano</sup>* utilizando uma geometria de pratos paralelos de 20 mm a uma distância de 1000 µm. Foram utilizadas três réplicas.

A razão entre o módulo dissipativo e de armazenamento ( $\tan \delta$ ) foi calculada pela Equação 3.1<sup>(84)</sup>.

$$\tan \delta = \frac{G''}{G'} \quad \text{Equação 3.1}$$

Em que:

G'' - módulo dissipativo;

G' - módulo armazenamento.

### **2.2.2.3. Observação da morfologia por SEM**

A morfologia dos hidrogéis com e sem células cultivadas foi caracterizada por microscopia electrónica de varrimento. As amostras foram revestidas a ouro por pulverização utilizando um *Emitech K550* e com um microscópio electrónico de varrimento *Hitachi S-2700*, a uma voltagem de 20 kV e a diferentes ampliações.

### **2.2.2.4. Caracterização de composição**

Várias amostras de hidrogel foram pesadas após produção. Essas amostras foram secas até peso constante, a 40°C. O seu peso final foi registado, a fim de definir a percentagem de água que representa a composição dos hidrogéis.

## **2.2.3. Testes de citotoxicidade e proliferação celular – Testes *in vitro***

### **2.2.3.1. Obtenção e multiplicação de células**

As células fibroblásticas foram obtidas a partir da pele do rato Wistar, como descrito por Blansinska *et al.*<sup>(85)</sup>. A zona a operar foi tosquiada e desinfectada com etanol a 70%. Foram retiradas amostras de pele do rato e mantidas em meio de RPMI-1640 (*Gibco*) com penicilina G (100 U·ml<sup>-1</sup>), estreptomicina (100 µl·ml<sup>-1</sup>), e anfotericina B (0,25 µg·ml<sup>-1</sup>). Depois, as amostras foram trituradas e incubadas durante 3 horas em solução de colagenase a 0,1% (37°C, 5% CO<sub>2</sub>). Após incubação, as amostras foram centrifugadas (5 min, 1000 rpm), o sobrenadante foi rejeitado, e o aglomerado formado foi lavado com meio de cultura Eagle modificado por Dulbecco (DMEM)-F12 suplementado com soro bovino fetal inactivado (10% (v/v)). As células isoladas foram semeadas em frascos-T com meio DMEM-F12 (1:1, v:v), suplementado com FBS inactivado (10% (v/v)), L-glutamina (2 mM), penicilina G (100 U·ml<sup>-1</sup>), estreptomicina (100µg·ml<sup>-1</sup>), e anfotericina B (0,25 µg·ml<sup>-1</sup>).

Após 2 horas, as células não-aderentes foram descartadas. As células foram mantidas em cultura a 37°C, em atmosfera húmida, a 5% CO<sub>2</sub>. Após se ter obtido confluência, as células foram sub-cultivadas por incubação por 5 minutos em tripsina (1:250) e 5 mM EDTA. As células em suspensão foram adicionadas a um volume igual de meio de cultura. Após centrifugação, as células foram suspensas em meio de cultura suficiente.

### **2.2.3.2. Teste de citotoxicidade**

O teste de citotoxicidade foi realizado utilizando o método de MTT por contacto directo, tal como descrito no Capítulo II.

Foram colocadas amostras de hidrogel de quitosano numa placa de poços. Esta placa com as amostras colocadas foi irradiada com UV durante 30 minutos (método de esterilização utilizado

## Produção de Matrizes à Base de Quitosano para o Tratamento de Feridas

na preparação de todas as amostras utilizadas na caracterização biológica), antes de as células serem semeadas.

A densidade celular foi de  $6 \times 10^4$  células por poço numa placa de 96 poços (*Nunc*) (n=6).

### 2.2.3.3. Teste de proliferação de fibroblastos

Para examinar a proliferação celular, os fibroblastos obtidos a partir da pele do rato foram cultivados em placas de 24 poços a  $1 \times 10^5$  células·ml<sup>-1</sup> durante 24 horas. O crescimento celular foi monitorizado utilizando um microscópio de luz invertida *Olympus CX41*, equipado com uma câmara digital *Olympus SP-500UZ*. Foram também adquiridas imagens de SEM para análise de morfologia segundo o procedimento já descrito.

### 2.2.4. Testes de irritação

O teste de irritação foi realizado apenas para este produto pois foi considerado representativo de todos os outros estudados, que também são compostos exclusivamente por quitosano.

O objectivo deste teste de irritação é analisar o potencial do produto de induzir uma reacção de irritação. O protocolo utilizado para a realização deste teste é descrito na ISO 10993 - "Biological evaluation of medical devices- Part 10: Tests for irritation and delayed-type hypersensitivity"<sup>(86)</sup>, que propõe a realização do teste de irritação na pele de coelhos albinos. Foram utilizados 3 coelhos albinos, machos com 3 meses de idade, fornecidos pelo laboratório *Charles River Laboratoires*, juntamente com o devido certificado. Estes animais foram mantidos no Biotério do Laboratório Nacional de Engenharia e Geologia (ex-INETI) com todas as condições exigidas. Foi-lhes fornecida água e comida *ad libitum*.

A norma propõe a utilização do material final ou de um extracto deste; foi seleccionado para este estudo a utilização do material final. É aplicada na pele do animal uma amostra do produto em estudo e um controlo negativo (substância que não causa reacção de irritação na pele). Os resultados são obtidos por análise visual da reacção de acordo com uma escala.

Como não era esperada nenhuma reacção de irritação ao produto, dado que a composição do produto sob teste é quitosano e água, o teste foi realizado em apenas 3 animais, com peso de  $(2,19 \pm 0,06)$  kg, tal como é especificado na ISO 10993-10<sup>(86)</sup>.

Como controlo negativo foi seleccionada a aplicação de gaze embebida em soro fisiológico. O material sob estudo foi aplicado directamente, sem modificação em amostras com cerca de 2,5x2,5 cm.

O primeiro passo foi a tricotomia do dorso do animal com uma tosquiadora para animais. Foi dado um período de espera de pelo menos 4h antes de se proceder à aplicação dos pensos, para que não houvesse influência de eventual irritação da pele pela tosquia nos resultados. O

local de aplicação do material foi marcado com uma caneta de marcação cirúrgica. O material de teste e o controlo negativo foram aplicados conforme o esquema da Figura 3.4.

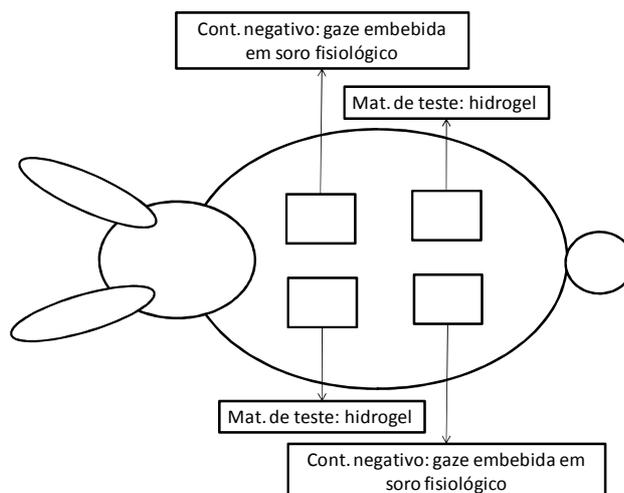


Figura 3.4- Esquema da aplicação da amostra de teste e do controlo negativo no dorso do coelho

Sobre o material de teste e do controlo foi colocado um penso semi-oclusivo e um segundo adesivo em todo o perímetro do animal para garantir que as amostras não saíam do local. Para evitar que o animal tentasse remover o penso ou morder a zona de teste, podendo alterar os resultados, foi colocado um colar isabelino no animal, tal como apresentado na Figura 3.5.



Figura 3.5- Animal no decorrer do teste com o colar isabelino colocado

4 h após a aplicação do penso, as amostras e o controlo foram removidos. A zona foi limpa com compressas com água tépida e devidamente seco, sem provocar esta acção nenhuma irritação.

Os animais foram observados 1h, 24h, 48h e 72h após a remoção das amostras. Foi feito o registo das pontuações da reacção de acordo com a tabela "Scoring system for skin reaction". Esta tabela é a indicada pela norma ISO 10993-10 como sistema para avaliação da reacção de irritação, e é apresentada na Tabela 3.3.

## Produção de Matrizes à Base de Quitosano para o Tratamento de Feridas

Tabela 3.3 - Sistema de classificação da reacção primária de irritação com as pontuações referentes ao eritema e edema observados

Reacção	Classificação de Irritação Primária
<b>Eritema e formação de escara</b>	
Ausência de eritema	0
Ligeiro eritema (quase imperceptível)	1
Eritema bem definido	2
Eritema moderado	3
Eritema grave a formação de escara	4
<b>Formação de edema</b>	
Ausência de edema	0
Ligeiro edema (quase imperceptível)	1
Edema bem definido (bordas da área bem definidas por elevação notória)	2
Edema moderado (elevação aproximadamente de 1 mm)	3
Edema grave (elevação superior a 1 mm, estendendo-se mais do que a área de exposição)	4
<b>Pontuação total possível para irritação</b>	<b>8</b>

Além da pontuação da reacção através desta tabela foram também registadas todas as outras eventuais reacções adversas. Foram ainda recolhidas fotografias dos animais para registo dos resultados.

A determinação do Índice de Irritação Primária foi feita como descrito na ISO 10993-10<sup>(86)</sup>. Assim, foram utilizadas apenas as pontuações para 24h, 48h e 72h após remoção das amostras e controlos. Para o cálculo de PII ("Primary Irritation Index", Índice de Irritação Primária) são utilizadas as Equação 3.2, Equação 3.3 e Equação 3.4.

$$(PIS)_{AnX} = \frac{(ES + OS)_{24h} + (ES + OS)_{48h} + (ES + OS)_{72h}}{3} \quad \text{Equação 3.2}$$

$$(PIS)_{AnX,C} = (PIS)_{AnX} - (PIS)_C \quad \text{Equação 3.3}$$

$$PII = \frac{(PIS)_{An1,C} + (PIS)_{An2,C} + (PIS)_{An3,C}}{3} \quad \text{Equação 3.4}$$

Em que:

PIS - pontuação de irritação primária, calculada para cada animal (AnX) com material de teste e para o controlo (C);

ES - pontuação de eritema observado;

OS - pontuação de edema observado.

Com o resultado do Índice de Irritação Primária define-se a Categoria de Resposta de Irritação em coelhos segundo a Tabela 3.4.

Tabela 3.4 - Categoria de Resposta de Irritação, segundo a norma ISO 10993-10<sup>(86)</sup>

Pontuação média (PII)	Categoria de resposta (descrição)
0 a 0,4	Insignificante
0,5 a 1,9	Ligeira
2 a 4,9	Moderada
5 a 8	Severa

### 2.2.5. Teste de hipersensibilidade retardada

O teste de sensibilização realizado foi do tipo hipersensibilização retardada. Este tipo de teste consiste na indução da memória imunológica de células T específicas mediadas para um determinado agente alérgico ao qual um indivíduo é exposto, resultando numa reacção de hipersensibilização do tipo retardada após um segundo contacto com o tal agente<sup>(86)</sup>.

O teste de hipersensibilidade retardada é descrito na norma ISO 10993-10<sup>(86)</sup>. O seu objectivo é a análise da potencial actividade do material em produzir uma reacção de sensibilização em porquinhos-da-índia. De uma forma resumida, os porquinhos-da-índia (*Cavia porcellus*) são expostos ao extracto por duas vezes num período de 2 semanas (fase de indução intradérmica e fase de indução tópica). Os animais voltam a ser expostos (fase de desafio) 14 dias após a fase de indução tópica através da aplicação de extracto fresco em contacto com pele previamente exposta. Após um período de 72 horas os animais são observados quanto a sinais de resposta alérgica retardada, quando comparado com o grupo controlo.

Tal como explicado para o teste de irritação, também este teste foi realizado apenas com os hidrogéis por estes serem representativos dos restantes produtos aqui estudados.

Foram utilizados 15 porquinhos-da-índia albinos, machos, com peso inicial de (423±24) g, fornecidos pelo laboratório *Charles River Laboratoires*. Estes animais foram mantidos no Biotério do Laboratório Nacional de Engenharia e Geologia sob todas as condições exigidas. Foi-lhes fornecida água e comida *ad libitum*.

### 2.2.5.1. Preparação do extracto do hidrogel

Para ser possível a injeção intradérmica para teste do material, foi necessário optar pela preparação de um extracto do material sob teste. Para a preparação do extracto de hidrogel para o teste de sensibilização retardada seguiu-se o descrito na norma<sup>(86)</sup>. O solvente seleccionado para a preparação do extracto é soro fisiológico, de acordo com a norma ISO 10993-12 (87).

O hidrogel previamente cortado e pesado foi esterilizado por UV, 30 minutos de cada lado do hidrogel. Esta amostra de hidrogel foi colocada em 15 ml de solução de soro fisiológico, previamente filtrada utilizando num filtro de 0,45 µm para esterilização. Esta tarefa foi realizada dentro de uma câmara de fluxo laminar para garantir esterilidade.

A amostra e o meio de extracto foram colocados numa estufa a 37°C dentro de um tubo de policarbonato de 50 ml durante 72 horas, tal como indicado pela norma ISO 10993-10. Após este tempo o hidrogel foi retirado do tubo e o extracto foi utilizado para teste.

Foi seguido o mesmo protocolo para a preparação do extracto de hidrogel em soro fisiológico e "Freund's Complete Adjuvant" (FCA) como solvente. O solvente da preparação do extracto é soro fisiológico e FCA (usado directamente da embalagem) numa proporção de 1:1 em volume. O FCA é um potenciador da reacção imunológica do sistema composto por antigenes emulsionados num óleo mineral e micobactérias secas e inactivadas (*Sigma-Aldrich*).

Nesta experiência foram utilizados 15 animais, sendo 10 para teste e 5 para controlo do solvente utilizado na preparação dos diferentes extractos.

### 2.2.5.2. Fase de indução intradérmica

Após ter sido rapado o pelo na zona de administração das injeções com uma tosquiadora, cada animal foi injectado intradérmicamente dos dois lados da coluna, segundo o esquema da Figura 3.6. A legenda das injeções administradas encontra-se na Tabela 3.5 e Tabela 3.6.

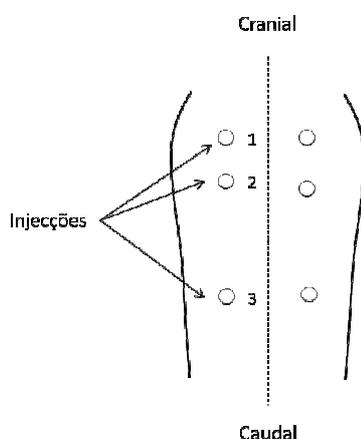


Figura 3.6 - Esquema de injeções administradas e a sua posição relativa no dorso do animal

Tabela 3.5 - Injecções intradérmicas administradas no Grupo de Teste

<b>Injecção 1</b>	1:1 (volume) FCA: soro fisiológico
<b>Injecção 2</b>	Extracto preparado com soro fisiológico
<b>Injecção 3</b>	Extracto preparado com soro fisiológico e FCA

Tabela 3.6 - Injecções intradérmicas administradas no Grupo de Controlo

<b>Injecção 1</b>	50:50 (volume) FCA: soro fisiológico
<b>Injecção 2</b>	Soro fisiológico
<b>Injecção 3</b>	50:50 FCA: soro fisiológico

O volume injectado em cada ponto foi 0,1 ml da solução correspondente.

### 2.2.5.3. Fase de indução tópica

4 dias após as injecções intradérmicas o pelo da zona do dorso foi rapado. Dado que não era esperada nenhuma reacção de sensibilização ao produto optou-se por realizar o pré-tratamento da zona dorsal de teste com dodecil sulfato de sódio (SDS) para aumentar a sensibilização nessa zona, e assim potenciar o efeito do teste com um risco mínimo de induzir sofrimento no animal. Assim, com a ajuda de uma gaze foi esfregado um agente irritante, o SDS, para criar uma reacção de irritação local. O SDS tem sido usado extensivamente como um modelo de agente irritante para testes de irritação na pele<sup>(88)</sup>. O SDS foi dissolvido em água destilada a 10% (m/v) e filtrado para esterilidade. Após aplicação, o excesso foi removido com a ajuda de uma compressa.

24 horas após a aplicação do SDS, foi colocado no dorso de cada animal do grupo de controlo papel de filtro, 2x4 cm, saturado apenas no meio de extracto. Em cada animal do grupo de teste foi aplicado o hidrogel com as mesmas dimensões no local correspondente. O material foi mantido no local com adesivo semi-oclusivo, e com uma segunda camada de penso semi-oclusivo à volta do animal, como exemplificado na Figura 3.7.



Figura 3.7 - Penso aplicado à volta do dorso do animal na fase de indução tópica (imagem exemplificativa)

Após 48 horas os pensos e o material foram removidos.

#### 2.2.5.4. Fase de desafio

A zona seleccionada para a aplicação das amostras nos dois grupos foi a zona lateral do animal. Assim, 14 dias após a conclusão da fase anterior o pelo da zona lateral esquerda (zona não tratada na fase de indução) de cada animal foi rapado com uma tosquiadora.

Nessa zona foi aplicado em todos os animais papel de filtro (4x2,5 cm) saturado no extracto do material de teste preparado como já descrito, apenas com o soro fisiológico. O papel de filtro foi mantido na zona de teste com adesivo semi-oclusivo e com uma segunda camada de adesivo à volta do animal.

Após 24 horas o material foi removido.

#### 2.2.5.5. Observação dos animais

Os animais foram observados 24 e 48 horas após a remoção do material. Foi feito um registo fotográfico da zona sob teste. A reacção observada foi avaliada segundo a tabela indicada na ISO 10993-10, Escala de Magnusson e Kligman, e apresentada aqui na Tabela 3.7.

Tabela 3.7 - Escala de Magnusson e Kligman, ISO 10993-10

Reacção ao fragmento de teste	Escala de classificação
Sem mudança visível	0
Eritema discreto ou desigual	1
Eritema moderado e confluyente	2
Eritema intenso e inchado	3

Todos os animais dos dois grupos foram classificados. A classificação do grupo de teste foi depois comparada com a do grupo controlo, sendo que só é considerada reacção de sensibilização se a classificação do grupo de teste for superior à do grupo de controlo.

#### 2.2.6. Teste de biocompatibilidade por implante subcutâneo

Os dispositivos médicos e os seus componentes têm que ser testados quanto à sua biocompatibilidade e segurança, tendo em conta que estes podem libertar ou ter características na sua superfície que induzam efeitos indesejáveis durante a sua utilização clínica.

Este tipo de teste estuda os efeitos locais do produto no tecido vivo. Após o período de tempo determinado para o teste, o tecido local ou outros considerados susceptíveis de reacção são avaliados quanto a alterações significativas, nomeadamente através da realização de histopatologia. Estes estudos ajudam a determinar se as características do dispositivo induzem respostas tais como inflamação, invaginações de outros tecidos, vascularização anormal ou fibroplasia.

Para esta avaliação foram realizados testes de implante subcutâneo. Assim, poder-se-á estudar a biocompatibilidade do dispositivo, ou seja, a capacidade de não induzir nenhum efeito não desejado no sistema biológico.

Estes testes foram realizados em dois modelos animais diferentes: no rato e no coelho. Os dois modelos são indicados para este tipo de estudo, no entanto o primeiro é mais económico e de maior facilidade de acesso do que o coelho.

Este teste consiste, resumidamente, na anestesia dos animais (por diazepam e cetamina no caso dos ratos e por isoflurano no caso do coelho), tricotomia e desinfeção da zona dorsal. Depois, na realização de uma incisão na pele do animal até à membrana subcutânea, com o auxílio de uma pinça e uma tesoura a membrana é cortada à volta da incisão para a criação de espaço para a amostra nessa área. Por fim, a amostra é colocada nessa bolsa formada e a incisão é suturada. Passado um período de tempo determinado, foi recolhida uma amostra do produto e dos tecidos adjacentes, os quais foram analisados histologicamente.

#### **2.2.6.1. Ensaio de biocompatibilidade subcutânea em ratos Wistar**

Foram realizados testes de biocompatibilidade em 2 ratos Wistar, fêmeas, com 9 meses de idade à data da experiência, com peso médio de 360 g. Os animais foram mantidos em caixas individuais e alimentados com água e ração comercial para rato *ad libitum*. Estes testes foram realizados no Biotério da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Nova de Lisboa.

As amostras foram esterilizadas já com as dimensões finais para implantação, de 2cmx2cm, tendo uma espessura de cerca de 2 mm.

A colocação do implante subcutâneo nos ratos é relativamente fácil, comparando por exemplo com o caso humano, dado que a identificação do tecido subcutâneo, zona onde é realizado o implante subcutâneo é directa. Assim, foi necessária apenas uma pequena incisão e a abertura de uma bolsa (espaço sob a pele) com tesoura cirúrgica romba curva e a colocação da amostra do produto. A incisão foi suturada com agrafos. O grupo de teste foi constituído por dois ratos Wistar nos quais foi realizado exactamente o mesmo procedimento, e identificados como Rato I e Rato II. O peso inicial dos animais utilizados foi (402±6) g.

Foram realizadas observações regulares para averiguar a ocorrência de reacções adversas visíveis. Ao fim de cerca de 10 semanas (43 dias) e 19 semanas (84 dias) após operação os dois ratos foram anestesiados, utilizando o mesmo processo que para a primeira operação. Foi feita uma nova incisão microcirúrgica no local do implante e foi recolhida uma amostra para análise histológica. As novas incisões foram suturadas com agrafos.

### **2.2.6.2. Ensaio de biocompatibilidade subcutânea em coelhos New Zealand**

A biocompatibilidade também foi avaliada em coelhos New Zealand. A utilização do coelho para a repetição do teste é justificada pela maior sensibilidade destes animais neste tipo de testes.

Nesta experiência foram utilizados dois coelhos albinos New Zealand, fêmeas, com peso de  $(2,8 \pm 0,1)$  kg, a fim de estudar a biocompatibilidade do produto através do teste de implante subcutâneo. A amostra utilizada para implante foi um quarto de um círculo com  $14 \text{ cm}^2$  de área, com cerca de 2 mm de espessura. Os animais foram mantidos em caixas individuais com acesso a água e ração comercial para coelho *ad libitum*. Os testes foram realizados no Biotério do LNEG.

O procedimento cirúrgico para colocação do implante foi feito tal como o descrito anteriormente para os ratos Wistar. Neste caso a incisão foi suturada com sutura de seda.

3 meses e 20 dias após a operação, os dois animais foram eutanasiados e foram recolhidas amostras para análise histológica.

### **2.2.7. Estudo do desempenho do hidrogel em queimaduras induzidas *in vivo***

Foram utilizados 18 ratos Wistar fêmeas no total, com idades compreendidas entre as 8 e 10 semanas, e peso entre 200 e 250 g no momento da experiência. O protocolo desta experiência foi aprovado pela Comissão de Ética do Centro Hospitalar Cova da Beira e foi realizada segundo as directrizes do Guia do Instituto Nacional de Saúde para o cuidado e uso de animais de laboratório.

Os ratos foram anestesiados com uma injeção intraperitoneal de  $40 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$  cetamina e  $5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$  de xilazina. A zona a operar foi tosquiada e desinfectada utilizando etanol. A pele dorsal foi exposta a água a  $(95 \pm 1) \text{ }^\circ\text{C}$  durante 10 s. Após 2 horas, o tecido danificado (epiderme e derme) foi removido com material cirúrgico. Foram criadas assim feridas com um diâmetro de 2 cm sem hemorragia visível. Os animais foram divididos em 2 grupos: no grupo 1 as feridas foram preenchidas com o hidrogel de quitosano e fixado com gaze elástica; o grupo 2 foi utilizado como controlo no qual as feridas foram lavadas com PBS e cobertas com gaze elástica.

Após a cirurgia, os animais foram mantidos em caixas individuais e alimentados com ração de rato comercial e água *ad libitum*. Todos os animais apresentaram uma boa condição de saúde no geral durante o estudo, confirmado pelo seu aumento de peso. Os animais foram eutanasiados ao fim de 7, 14 e 21 dias.

### 2.2.7.1. Estudo histológico

Na avaliação morfológica das lesões da pele foram observados 3 parâmetros: diâmetro da superfície da ferida, espessura do tecido granuloso e espessura da camada epitelial. Como controlo foi utilizado o material recolhido dos animais sem tratamento com o hidrogel.

Foi obtido material das lesões da pele e órgãos (cérebro, coração, fígado, pulmão, baço e rim) por necrópsia. A análise por histologia dos órgãos recolhidos foi feita pela identificação de eventuais alterações morfológicas dos órgãos.

### 2.2.7.2. Avaliação do tamanho da ferida

Foram recolhidas imagens da área da ferida, juntamente com uma escala, com uma câmara digital e foram analisadas com o *software* de análise de imagem *ImageJ*. Os limites da ferida foram definidos pela presença de epitelização. O tamanho da ferida (WZ) foi calculado através da Equação 3.5.

$$WZ = \frac{D_N}{D_0} \quad \text{Equação 3.5}$$

Em que:

$D_0$  - dimensão da área da ferida no dia 0, neste caso 2 cm de diâmetro;

$D_N$  - dimensão da área da ferida no dia especificado.

### 2.2.7.3. Análise estatística

Em cada medida da superfície da ferida foi utilizado um mínimo de 3 animais. Os resultados obtidos foram expressos como média  $\pm$  desvio padrão da média. As diferenças entre grupos foram testadas por “one-way” ANOVA com “Dunnet’s post hoc test”.

## 3. Resultados e Discussão

Dado que o hidrogel de quitosano foi o primeiro produto desenvolvido neste trabalho para aplicação como dispositivo médico, foram efectuados todos os testes necessários para estudar a resposta biológica a este polímero, incluindo citotoxicidade, irritação, sensibilidade e biocompatibilidade.

### 3.1. Morfologia do hidrogel

Os hidrogéis produzidos a partir das soluções com o quitosano de peso molecular médio mais baixo (nas duas concentrações testadas) e médio na concentração mais baixa não

## Produção de Matrizes à Base de Quitosano para o Tratamento de Feridas

apresentavam resistência mecânica que permitisse realizar o ensaio. A Tabela 3.8 resume as composições das soluções de quitosano que originaram os hidrogéis testados.

Tabela 3.8 - Composição das soluções de quitosano capazes de produzir hidrogéis para serem testados; na última coluna encontra-se a designação das soluções utilizada na Figura 3.8

Quitosano	Concentração (% (m/m))	Identificação do ensaio
Cognis M	3	3M
Cognis L	2	2L
Cognis L	3	3L

Para cada tipo de hidrogel produzido foram realizados ensaios de carga máxima. Os dados recolhidos e tratados estão representados no gráfico da Figura 3.8.

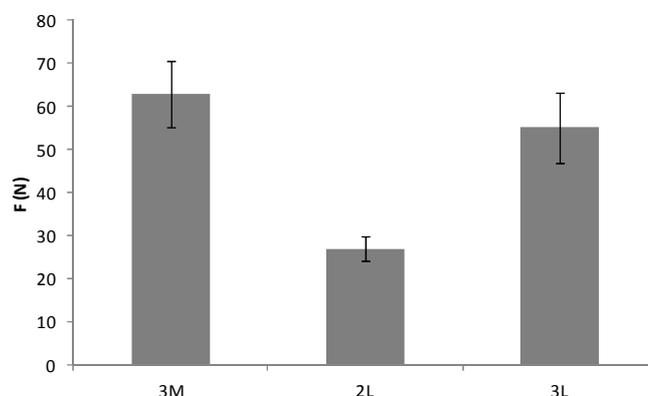


Figura 3.8 – Força máxima aplicada para cada tipo de hidrogel; sonda com diâmetro de 1 cm; valor médio de 5 ensaios

A impossibilidade de produzir hidrogéis a partir de determinadas soluções prende-se com as duas variáveis aqui implicadas: o tamanho médio da cadeia de quitosano e a concentração de polímero inicial.

No caso de se utilizar quitosano com um tamanho de cadeia menor o número de interações entre as cadeias diminui, levando à diminuição da resistência do hidrogel, o que foi verificado no caso do quitosano de baixo peso molecular. O mesmo fenómeno levou a que, para a concentração de 2% (m/m), o aumento do peso molecular médio do quitosano para alto (L) já permitisse a produção de hidrogéis.

É igualmente a probabilidade de um maior número de interações entre cadeias, e assim um maior grau de enovelamento, que leva a que o aumento da concentração dê origem a um aumento da resistência mecânica, como foi possível verificar no caso do quitosano médio em que a concentração de 2% (m/m) não produziu um hidrogel com as características necessárias, ao passo que o aumento da concentração de polímero levou a que o hidrogel adquirisse resistência mecânica suficiente para os dois pesos moleculares testados.

Para a concentração de 3% (m/m) de quitosano parece ocorrer um decréscimo do valor de carga máxima do ensaio realizado. Tal poderá ser explicado pelo aumento do tamanho da cadeia. O aumento do tamanho da cadeia de polímero e o aumento de resistência mecânica não são directamente proporcionais quando a extensão da molécula interfere no processo de dissolução, levando a que este não seja completo. Durante a dissolução do quitosano ocorre o desenredamento de cada uma das cadeias de quitosano por quebra das interacções intramoleculares, levando-as a estar disponíveis para o estabelecimento de interacções intermoleculares com outras cadeias vizinhas. Se a cadeia for demasiado longa, este processo de desenredamento poderá não ser completo, havendo um número de interacções intramoleculares demasiado elevado para que o enredamento entre as várias moléculas ocorra em número suficiente para levar ao aumento da resistência mecânica do produto final.

O grau de desacetilação da molécula de quitosano é uma variável a ser considerada nas interacções intermoleculares. No caso de graus de desacetilação altos a molécula de quitosano apresenta uma densidade de carga elevada, responsável por repulsões electrostáticas fortes, as quais não favorecem a formação de interacções entre as cadeias durante a formação do hidrogel físico<sup>(80)</sup>. No entanto, nesta discussão esse parâmetro não foi considerado dado que para os três tipos de quitosano testados o grau de desacetilação médio é  $(73,3 \pm 2,7)\%$ , e portanto uma diferença entre eles muito baixa e não relevante para este caso.

Dos resultados obtidos por este teste considerou-se que os hidrogéis deveriam ser produzidos a partir do quitosano de peso molecular médio com uma concentração de 3% (m/m).

Este teste permitiu quantificar o que era possível observar em termos de optimização de composição das soluções para produção dos hidrogéis.

O aspecto macroscópico do hidrogel pode ser descrito como uma folha maleável, branca e densa. Estas três características podem ser observadas na Figura 3.9.



Figura 3.9 - Hidrogel de quitosano, demonstrando as suas propriedades de maleabilidade e cor

## Produção de Matrizes à Base de Quitosano para o Tratamento de Feridas

O hidrogel é resistente a um manuseamento cuidadoso, tendo uma maleabilidade que permite, tal como se pode observar na Figura 3.9, uma adaptação ao contorno anatómico do leito da ferida, cobrindo-a totalmente sem criar vazios entre o leito da ferida e o penso onde pode ocorrer uma indesejável acumulação de exsudado que pode facilitar a proliferação de microrganismos no local.

A quantidade de água presente nos hidrogéis foi determinada por secagem até peso constante. Estes hidrogéis contêm  $(94,8 \pm 0,1)\%$  de água. Esta percentagem de água está dentro dos parâmetros sob os quais se definem pensos de polímeros como hidrogéis para o tratamento de feridas<sup>(33)</sup>.

Para uma observação ao nível microscópico da superfície do hidrogel foi utilizada a técnica de SEM. O resultado dessa observação é a Figura 3.10.

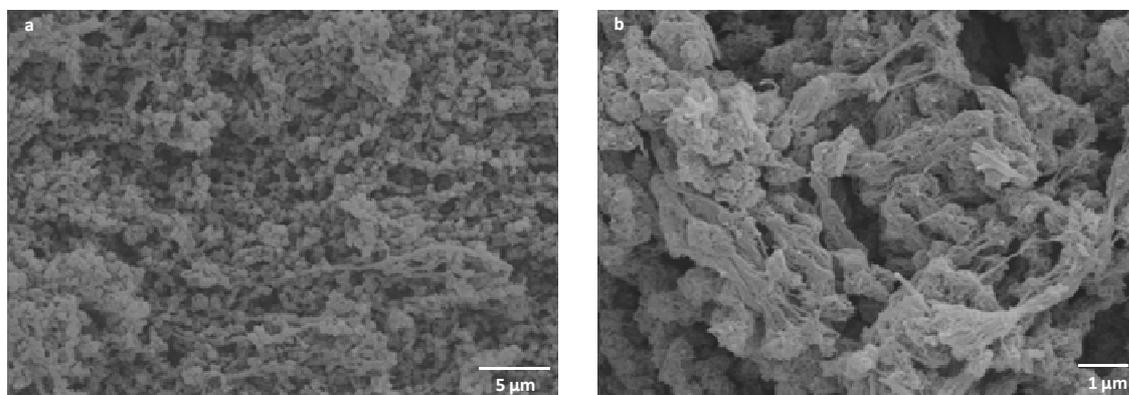


Figura 3.10- Imagem de SEM da superfície do hidrogel; a - ampliação de 3000 vezes, barra de escala 5 µm; b - ampliação de 10000 vezes, barra de escala 1 µm

A observação por SEM da superfície do hidrogel mostra que esta apresenta irregularidades com aparentes espaços intersticiais. A estrutura aqui observada pode não ser uma transcrição exacta da superfície do hidrogel quando produzido. Um dos passos envolvidos na preparação das amostras para SEM é a sua desidratação, o que poderá alterar a estrutura do hidrogel dado que este é um produto com uma taxa de hidratação elevada. No entanto este ensaio permite observar a rede de quitosano estabelecida durante a coagulação da solução de quitosano e que dá estrutura ao hidrogel.

A estrutura química e física do hidrogel influenciam os fenómenos de adesão e proliferação celulares, o que se torna bastante significativo no desenvolvimento de um hidrogel para o tratamento de um tecido como a pele<sup>(89)</sup>.

### 3.2. Caracterização dos hidrogéis por reologia

Foram efectuadas medidas oscilatórias, que permitiram a determinação dos módulos de armazenamento ( $G'$ ) e dissipativo ( $G''$ ) em função da frequência angular. Os ensaios foram realizados a 25 °C, com uma deformação de 10%.

Os resultados obtidos para os hidrogéis produzidos a partir de soluções com diferentes concentrações de quitosano são apresentados na Figura 3.11.

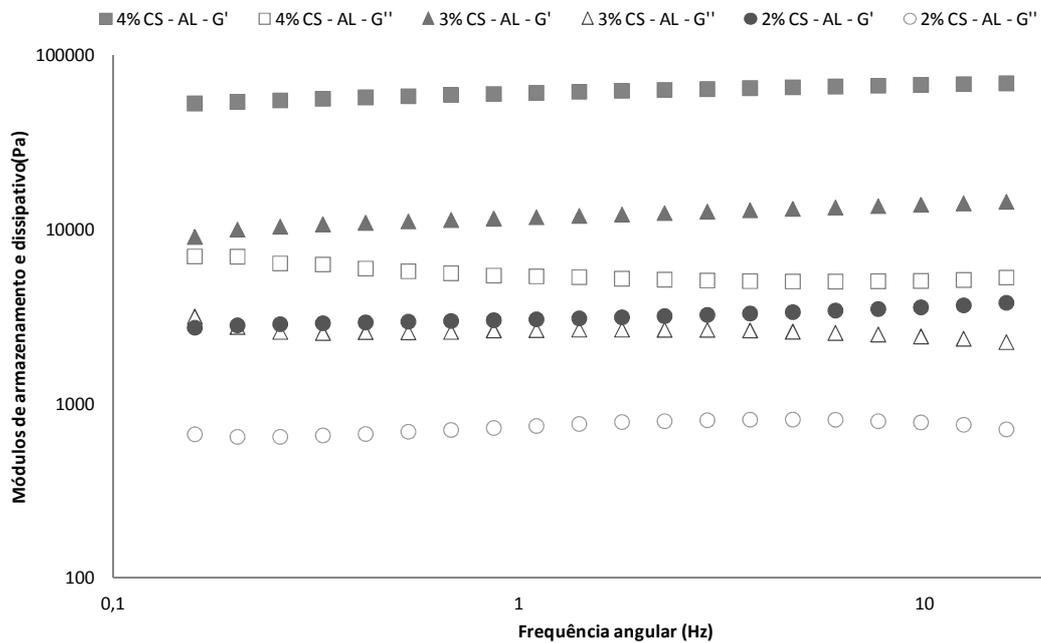


Figura 3.11 - Variação do módulo dissipativo ( $G''$ ), e do módulo de armazenamento ( $G'$ ) em função da frequência angular, para hidrogéis obtidos a partir de soluções com diferentes concentrações de quitosano

Pela observação da Figura 3.11 é possível verificar que o módulo de armazenamento ( $G'$ ) é superior ao módulo dissipativo ( $G''$ ), característica de um comportamento próximo do de um sólido viscoelástico (neste caso um gel). O aumento do módulo de armazenamento com a concentração de quitosano traduz-se numa maior consistência do gel, observada na prática pela manipulação do mesmo.

Foi comparado o comportamento reológico de um hidrogel obtido a partir de uma solução de quitosano a 3% (m/m) em ácido acético 2% (v/v) e em ácido láctico a 2% (v/v). Os resultados estão apresentados na Figura 3.12.

## Produção de Matrizes à Base de Quitosano para o Tratamento de Feridas

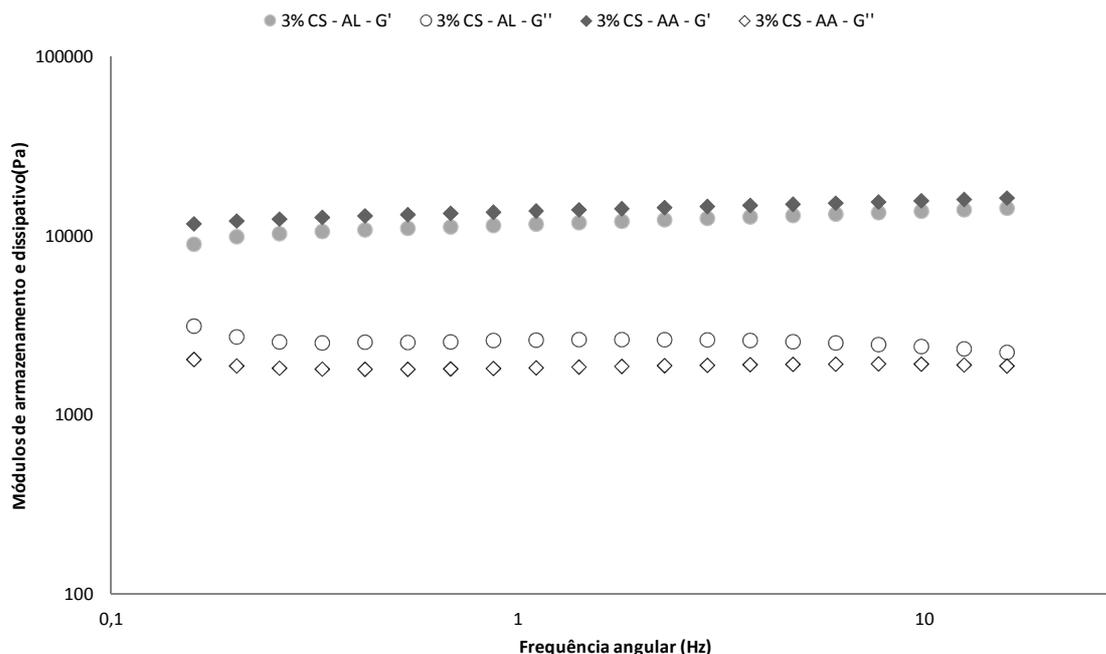


Figura 3.12 - Variação do módulo dissipativo ( $G''$ ), e do módulo de armazenamento ( $G'$ ) em função da frequência angular, para hidrogéis obtidos a partir das soluções de quitosano a 3% (m/m) em ácido acético (AA) e ácido láctico (AL)

O facto de se usar ácido láctico ou ácido acético para dissolver o quitosano não altera o comportamento reológico dos hidrogéis obtidos. Tal como se verificou anteriormente (Figura 3.11) o módulo de armazenamento é superior ao módulo dissipativo

Este comportamento foi também confirmado pela curva da tangente de perdas ( $\tan \delta^\circ = G''/G'$ , onde  $\delta$  é o ângulo de fases) que, nos casos estudados, se situou sempre abaixo do valor 1, característica de comportamento próximo do de um sólido viscoelástico

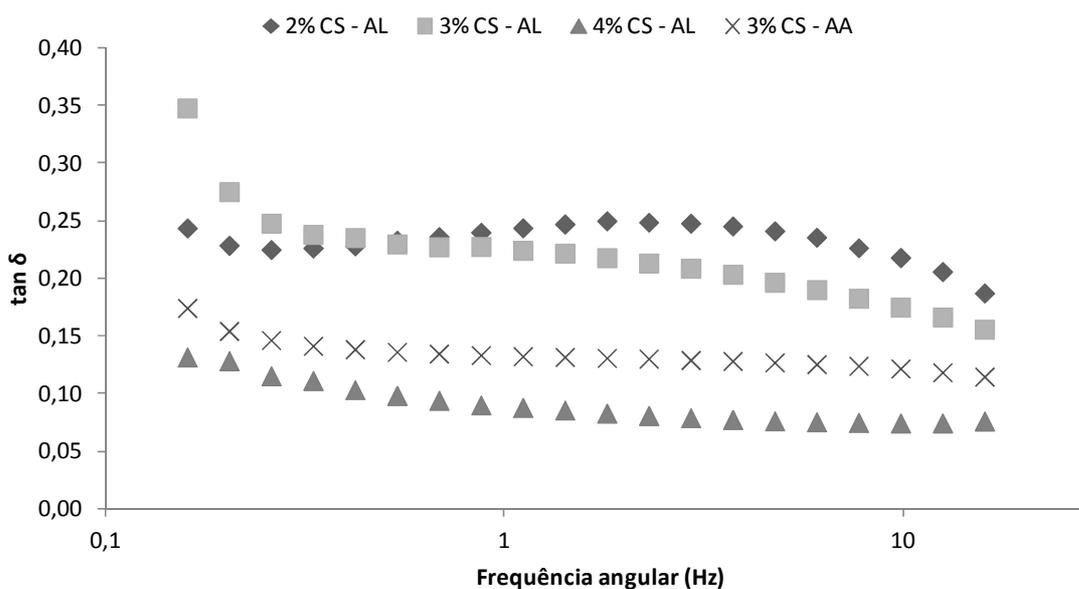


Figura 3. 13 - Tangente de perdas em função da frequência angular, para os hidrogéis de quitosano analisados

### 3.3. Citotoxicidade do hidrogel

Uma das primeiras etapas de teste de um produto para aplicação médica deste tipo é o teste de citotoxicidade, realizado *in vitro* com linhas celulares específicas. Este teste permite despistar a possível toxicidade do material em contacto com células. Na Figura 3.14 são apresentados os resultados de viabilidade celular relativa do hidrogel de quitosano face ao controlo de células utilizando linha primária de fibroblastos recolhidos a partir da pele do rato Wistar.

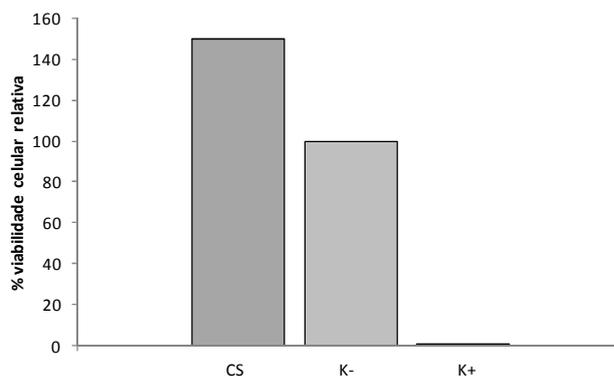


Figura 3.14 – Resultados de viabilidade celular relativa pelo teste de MTT do hidrogel de quitosano (CS) com linha celular primária de fibroblastos obtidos a partir da pele de rato Wistar; C-, controlo de células; C+, controlo positivo

A eficiência do procedimento adoptado para o estudo da citotoxicidade do hidrogel é comprovada pela ausência de células viáveis no controlo positivo. Segundo o método seleccionado para o teste, o controlo de células terá sempre uma viabilidade celular de 100%, e é relativamente a este valor que se obteve uma viabilidade celular relativa de 150%. Os resultados comprovam que o hidrogel de quitosano não é citotóxico.

Estes resultados estão de acordo com os vários resultados apresentados na literatura relativos à citotoxicidade do quitosano. Estes resultados são comparáveis com base no facto de o hidrogel, produto sob teste, ser composto por quitosano e água, e o processo a que o quitosano é submetido para a produção do hidrogel não provocar modificações químicas passíveis de alterar a não citotoxicidade do quitosano.

A Figura 3.15 apresenta microfotografias dos fibroblastos de linha primária cultivados sobre o hidrogel de quitosano, no controlo de células (sem hidrogel) e do controlo positivo, em que foi adicionado etanol.

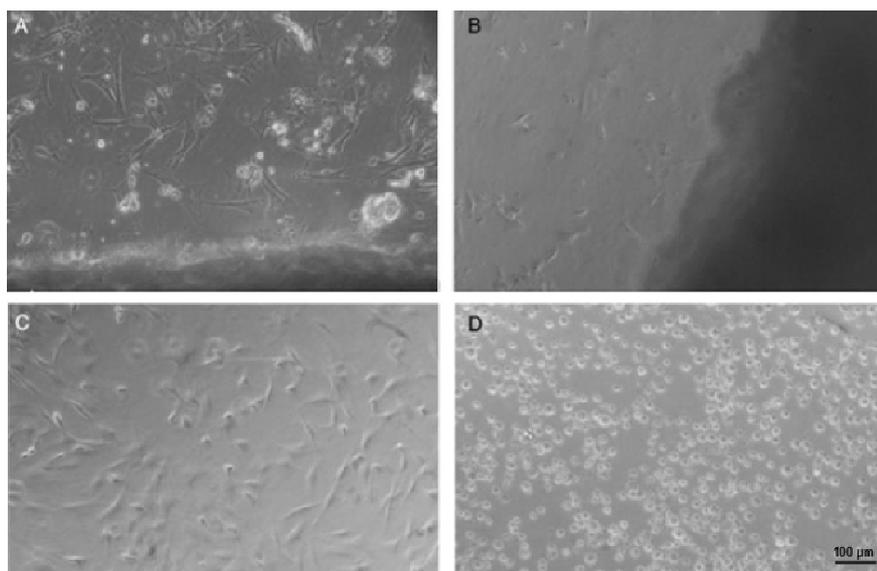


Figura 3.15- Microfotografias dos fibroblastos no teste de citotoxicidade após 24 h (A) e 3 dias (B) na presença do hidrogel de quitosano; controlo de células (C) e controlo positivo (D); ampliação de 100x; escala 100 µm

Dada a opacidade do produto não é possível obter microfotografias das células sobre o hidrogel. É sim possível obter imagens das células aderidas ao fundo do poço da placa de cultura. A Figura 3.15-A mostra fibroblastos na borda do produto (zona mais densa). Ao fim de 24 horas já existem células aderidas ao fundo do poço, com uma confluência ainda baixa, mas com uma morfologia característica de fibroblastos e semelhante ao controlo negativo: forma alongada com pseudópodes. É também possível observar alguns detritos, provavelmente provenientes do próprio hidrogel. Ao fim de 72 horas, e mais uma vez na borda do material, é possível observar a confluência acima de 90% dos fibroblastos, apontando para uma boa proliferação celular ao fim de 72 horas de cultura, enquanto na Figura 3.15-A as células aparentam uma confluência inferior. Para o mesmo período de tempo de cultura, mas na ausência de produto (controlo negativo do teste), a confluência celular dos fibroblastos é semelhante à observada na presença do produto. Nos três casos apresentados os fibroblastos apresentam-se viáveis, com uma morfologia característica destas células. A Figura 3.15-D, controlo positivo, apresenta fibroblastos não aderidos, e portanto não viáveis, com a sua forma esférica típica de células não viáveis. Estes resultados são concordantes com o método de quantificação através da utilização do sal MTT.

Para uma observação mais detalhada da morfologia dos fibroblastos de linha primária sobre o hidrogel foram recolhidas imagens em SEM, apresentadas na Figura 3.16.

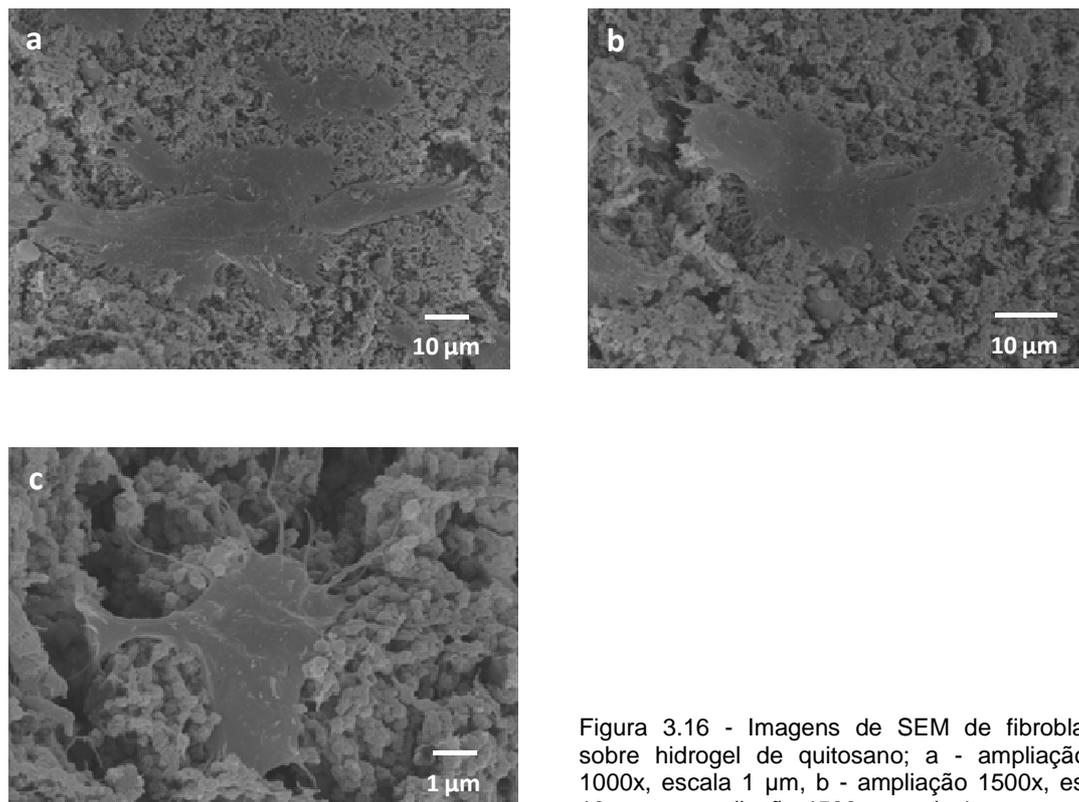


Figura 3.16 - Imagens de SEM de fibroblastos sobre hidrogel de quitosano; a - ampliação de 1000x, escala 10 µm, b - ampliação 1500x, escala 10 µm; c- ampliação 4500x, escala 1 µm

As imagens a e b da Figura 3.16 apresentam vários fibroblastos agrupados. A presença de pseudópodes, indica que as células estão aderidas e distendidas na superfície do hidrogel. Na imagem c é possível observar um fibroblasto isolado, no qual todas estas estruturas são mais facilmente identificáveis. Assim, fica demonstrada a possibilidade de crescimento celular sobre a estrutura do hidrogel de quitosano e a afinidade dos fibroblastos.

Os vários testes efectuados ao nível celular confirmam a não citotoxicidade do hidrogel de quitosano validando assim o avanço dos testes biológicos com o produto.

#### 3.4. Teste de Irritação

A irritação da pele é a produção de danos reversíveis na pele seguidos à aplicação de uma substância teste durante 4 horas<sup>(90)</sup>. Isto consiste numa reacção inflamatória não-específica a uma aplicação única, repetida ou contínua de uma substância ou material<sup>(86)</sup>.

O procedimento seleccionado teve em consideração os factores mencionados na norma ISO 10993:10 quanto ao produto sob teste tal como a natureza do material, a forma de aplicação e a dose. Este teste foi realizado em três coelhos New Zealand.

Dado que não era esperada nenhuma reacção de irritação não se procedeu a nenhum pré-teste com um número mais reduzido de animais.

## Produção de Matrizes à Base de Quitosano para o Tratamento de Feridas

A tricotomia dos animais foi realizada no dia anterior ao início do teste para que a possível irritação da pele devida a este processo não interferisse com os resultados do teste. Após esse período de tempo foi possível observar que a pele deste estava saudável, sendo assim possível proceder com o teste.

A reacção dos animais à colocação das amostras teste e controlo foi considerada normal. Sobre estas amostras foi aplicado um penso semioclusivo. Foi ainda necessário colocar um colar isabelino para que os animais não mexessem ou removessem os materiais colocados. A Figura 3.17 e Figura 3.18 demonstram o procedimento utilizado.



Figura 3.17- Amostras aplicadas no dorso do animal após marcação do local a aplicar o material de teste



Figura 3.18- Penso aplicado sobre as amostras para garantir a sua permanência nos locais designados

Os pensos mantiveram-se no local durante as 4 horas do teste.

A avaliação da reacção de irritação foi realizada pela análise de ocorrência de eritema e edema. Eritema é definido na ISO 10993:5 como o aparecimento de vermelhidão na pele e edema é o inchaço devido a uma anormal infiltração de fluidos nos tecidos.

Na Figura 3.19 são apresentados os resultados do teste de irritação de exposição única: exemplos de fotografias dos coelhos após a remoção dos materiais e a pontuação da avaliação de eritema e edema segundo o método descrito.

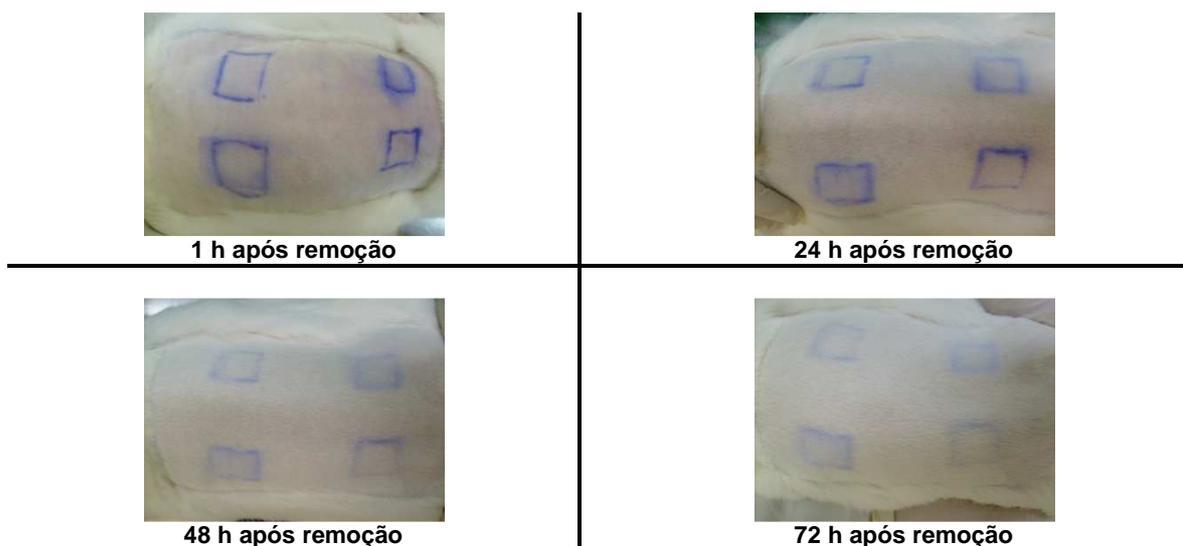


Figura 3.19- Fotografias exemplificativas recolhidas ao longo do Teste de Irritação. Não se observou qualquer reacção de eritema ou edema nos locais de controlo e de colocação de amostras e foi atribuído **0** aos 3 coelhos, em todos os locais de aplicação, para todos os tempos

Dado que não foram observadas lesões na pele do animal no decorrer do teste não foi necessário estender o tempo do mesmo<sup>(86)</sup>.

Este teste permite o estudo do produto quanto ao potencial risco de obter uma reacção de irritação ao dispositivo médico. Segundo as equações apresentadas anteriormente e o descrito na norma ISO 10993-10 o resultado da experiência é PII=0. Segundo a tabela "Irritation Response categories in rabbit", ISO 10993-10, este resultado de "Primary Irritation Index" cai sobre a categoria "insignificante". Assim, o produto hidrogel é adequado para utilização como dispositivo médico quanto à indução de reacção de irritação.

O hidrogel testado, tal como já foi referido, é composto apenas por quitosano e água, composição transversal aos produtos apresentados neste trabalho. Este facto leva a que as conclusões retiradas deste teste de irritação sejam seguramente extrapoláveis aos restantes produtos, na condição de o ácido usado na produção seja eficazmente removido e/ou neutralizado.

### 3.5. Teste de sensibilização

Como o material sob estudo é um sólido foi necessário preparar um extracto deste para a realização das injeções intradérmicas. A concentração escolhida para o extracto foi a mais alta dado que não era prevista nenhuma reacção de hipersensibilização ao produto. A preparação do extracto foi realizada com o meio de extracto mais indicado considerando o tipo de material e a sua indicação de uso.

Foram realizadas as injeções intradérmicas tal como descrito. 7 dias após as injeções, o penso que foi colocado à volta do dorso do animal, para evitar que este interferisse no estudo coçando

## Produção de Matrizes à Base de Quitosano para o Tratamento de Feridas

ou mordendo a área de teste, foi removido e verificou-se que os pontos de injeção apresentavam pequenas crostas, tanto no grupo de controlo como nos locais de injeção de controlo no grupo teste. A Figura 3.20 mostra dois exemplos de animais em que tal se observou.

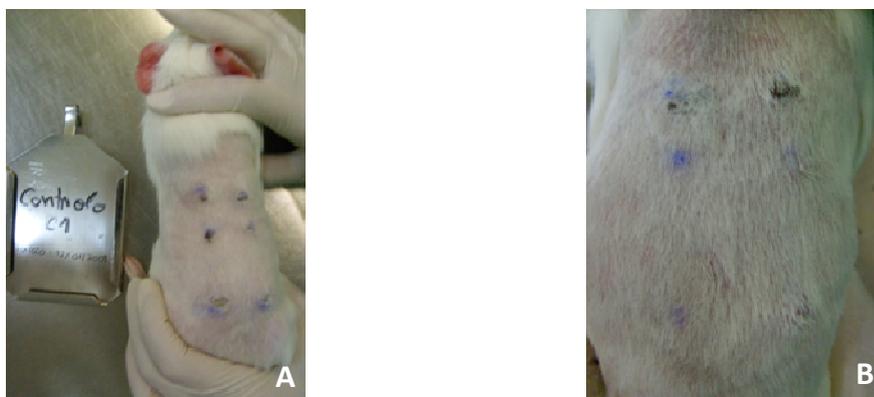


Figura 3.20- Dorso dos porquinhos-da-índia 7 dias após a fase de indução intradérmica do grupo de controlo (A) e do grupo teste (B)

O facto de se ter observado no grupo de controlo e em todos os pontos de injeção também é indicativo que as crostas formadas não têm a ver com o que foi injectado mas sim com o procedimento em si. Com o passar do tempo no decorrer da experiência estas crostas acabaram por sarar e desaparecer.

7 dias após as injeções intradérmicas avançou-se para a fase de indução tópica. No grupo de controlo, após 24h da aplicação, o penso e a compressa foram removidos. Em nenhum dos 5 animais que constituíram este grupo foram observadas reacções adversas ao meio de extracto. Na mesma fase, no grupo de teste, também não se observou nenhuma reacção, como por exemplo edema ou eritema, na área de aplicação. Assim, nesta primeira fase de sensibilização não ocorreu nenhuma reacção alérgica ao produto nos porquinhos-da-índia.

14 dias após a fase de indução tópica avançou-se para a fase de desafio. Nesta fase foram aplicadas as amostras durante 24 horas.

Os 5 animais constituintes do grupo de controlo apresentaram uma classificação inferior a 1, o que indica que o meio seleccionado para a preparação do extracto não causou por si só uma reacção de sensibilização. Por outro lado, os 10 animais do grupo de teste foram também classificados abaixo de 1. Aliás, não foi observada nenhuma alteração na pele de nenhum dos 15 animais testados.

Assim, é possível classificar o produto hidrogel como não indutor de reacção de hipersensibilização retardada. Esta conclusão também é extensível aos restantes produtos à base de quitosano apresentados nesta tese. A reacção imunológica é desencadeada pela composição do dispositivo médico e não pela sua estrutura ou morfologia. Assim, os resultados destes testes são extrapoláveis para os restantes dispositivos à base de quitosano apresentados nesta tese.

### 3.6. Biocompatibilidade por implantação subcutânea

#### 3.6.1. Ensaio de biocompatibilidade em ratos Wistar

O primeiro estudo de biocompatibilidade foi realizado em ratos Wistar.

Os dois animais foram observados 5 dias após a operação. Observou-se que a incisão estava a cicatrizar bem e a existência de um alto na zona do implante, que se devia provavelmente à presença do implante sob a pele, tal como é possível observar na Figura 3.21. No entanto, em nenhum dos animais foi observado edema ou eritema. Os ratos apresentavam um comportamento normal, em termos de actividade e alimentação.



Figura 3.21 - Rato 5 dias após operação com alto visível na zona da incisão

Voltaram a ser realizadas observações dos 2 animais ao 43º dia (aproximadamente 1 mês e meio). Neste ponto as incisões dos dois animais apresentavam-se totalmente cicatrizadas, como pode ser confirmado na imagem da Figura 3.22, mas ainda com um alto na zona do implante.



Figura 3.22 - Cicatriz da primeira incisão realizada para a colocação do implante subcutâneo no dia 43 após operação

Foi realizada uma nova incisão na zona do implante. No Rato I foi possível identificar o implante na zona subcutânea, apesar de apresentar uma superfície muito irregular com tecido aderido. No Rato II não foi possível distinguir exactamente e tão obviamente o implante, mas foi possível identificar um novo tecido formado na zona de implante. Os dois casos descritos foram confirmados pelas observações à lupa. Na Figura 3.23 são apresentadas microfotografias

recolhidas aquando destas observações, mas a qualidade das imagens não permite identificar o descrito.



Figura 3.23 - Microfotografias recolhidas durante a incisão no dia 43 para recolha de amostra nos dois ratos; A e B: Rato I; C:Rato II

Foi realizada uma colheita nos dois animais para análise histológica. No Rato I foi recolhido material do implante e do tecido aderido e no Rato II foi recolhido o tecido formado na zona do implante. As amostras foram devidamente colocadas em microtubos com formaldeído e enviadas para análise histológica.

O exame histológico aos dois animais revelou algumas diferenças entre estes. O relatório do Rato I revelou a existência de um processo inflamatório activo de carácter piogranulomatoso, que consiste numa mistura de neutrófilos e macrófagos, podendo incluir numerosos linfócitos ou plasmócitos (células do sistema imunológico). O infiltrado inflamatório celular era constituído por numerosos macrófagos de citoplasma ampliado e espumoso como sinal da sua acção de fagocitose, juntamente com numerosos macrófagos de leucócitos polimorfonucleares e neutrófilos. Ainda, e acompanhando este infiltrado inflamatório activo, foram observados linfócitos em grande quantidade, algumas células plasmáticas, neovascularização junto a um tecido conectivo de granulação de suporte à lesão. No entanto não foi registada a presença de matriz exógena, associada ao processo inflamatório. Toda esta caracterização indica uma reacção normal do organismo a um corpo estranho, não sendo indicativo, no entanto, de uma reacção severa de rejeição nem de uma reacção imunológica anormal, dado que efectivamente foi implantado subcutaneamente um hidrogel.

O resultado do mesmo exame para o Rato II apresenta um tecido conectivo fibroso com edema do tecido associado e neovascularização na espessura do corte. Não foram encontrados vestígios do implante nem elementos inflamatórios notáveis. Neste caso a reabsorção do hidrogel terá sido mais rápida, levando a que neste ponto já não se observasse reacção inflamatória.

Tudo indica que nesta altura já não existiriam vestígios do implante consideráveis e identificáveis por análise histológica. Não foram disponibilizadas imagens da análise histológica por parte do laboratório.

No dia 84 após a operação (cerca de 2 meses e meio) os dois ratos apresentavam um comportamento normal. A incisão realizada no dia 43 para observação e recolha apresentava uma boa cicatrização.

A palpação do local do implante não denunciou a existência de hidrogel ainda presente. Foi realizada uma nova incisão nos dois ratos no local onde foi colocado o implante e verificou-se que não existiam já vestígios dos implantes colocados em nenhum dos dois ratos. A Figura 3.24 apresenta microfotografias recolhidas durante a observação à lupa. À lupa verifica-se a existência de um tecido formado na zona do implante não pertencente a nenhuma das estruturas originais do animal. Tal foi mais evidente no Rato II do que no Rato I tendo sido removido esse tecido para uma melhor observação à lupa e registado na Figura 3.24 - a.

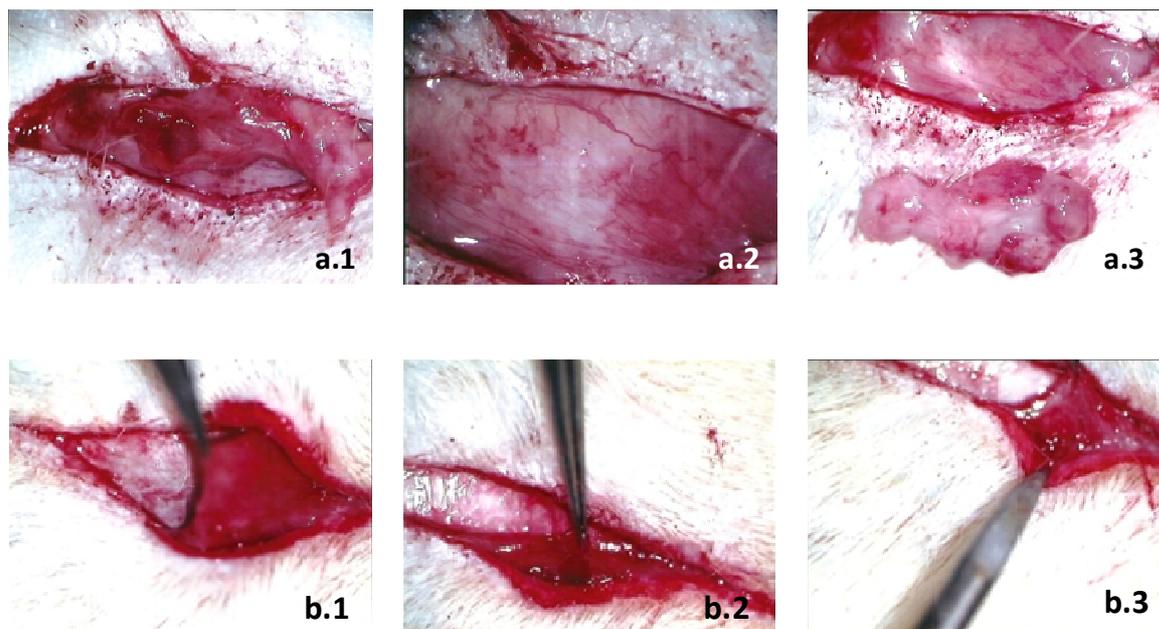


Figura 3.24 - Microfotografias recolhidas durante o dia 84. Não foi possível identificar o implante colocado; a - Rato I; b - Rato II

À semelhança do que tinha sido observado cerca de 1 mês antes, todo o produto implantado já teria sido degradado e absorvido pelo sistema.

A ausência de reacção severa dos tecidos circundantes na zona do implante está concordante com a indicação de biocompatibilidade do hidrogel. No entanto, a utilização de um número reduzido de animais (dois) não permite afirmar que o produto é biocompatível com base apenas nestes resultados.

### 3.6.2. Ensaio de biocompatibilidade em coelhos New Zealand

Na Figura 3.25 é possível observar um exemplo da incisão e da amostra de hidrogel que foi implantada para a realização do teste de biocompatibilidade.

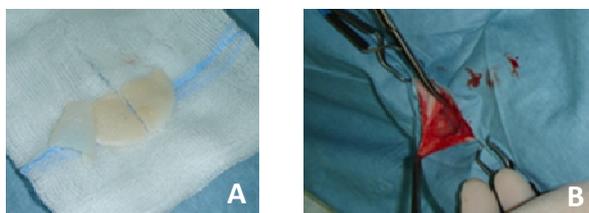


Figura 3.25 – A: hidrogel preparado para implante; B: incisão realizada no dorso do coelho com bolsa já preparada para implantação

Os animais foram observados várias vezes no decorrer da experiência, tendo sempre apresentado um comportamento normal e uma boa cicatrização da incisão, sem ter sido observado edema ou eritema.

3 meses e 20 dias após a operação, foi recolhida uma amostra do material, do tecido adjacente e da pele de cada um dos coelhos para análise histológica. Quando esta recolha foi realizada verificou-se que o implante estava totalmente aderido à pele nos dois casos.

A Figura 3.26 é um resultado do teste de histologia realizado.

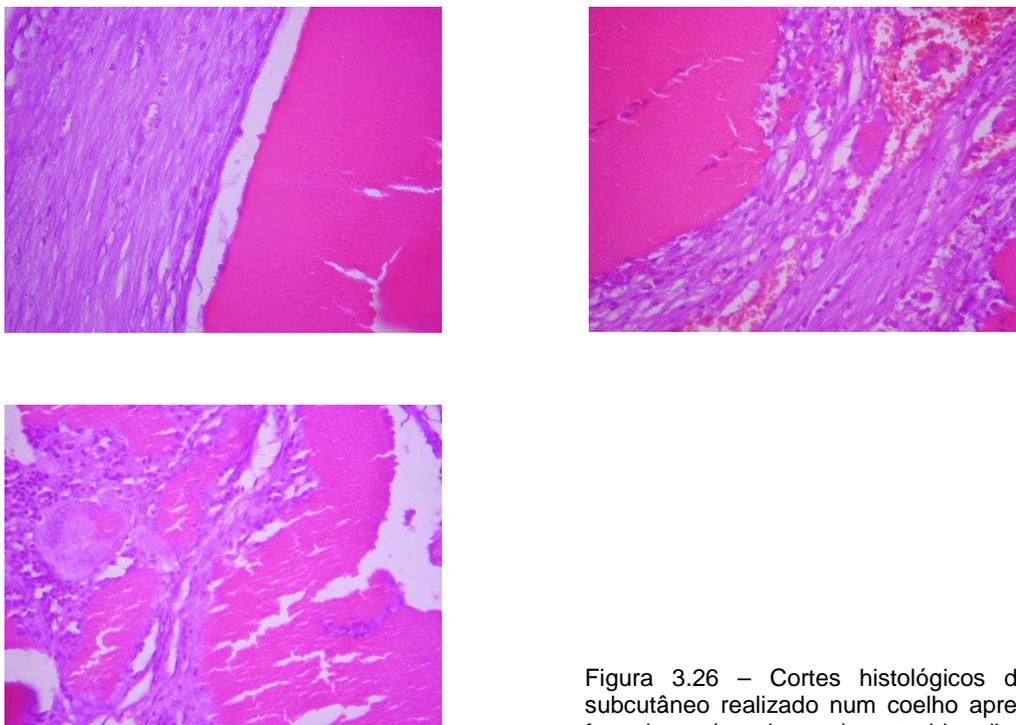


Figura 3.26 – Cortes histológicos do implante subcutâneo realizado num coelho apresentando a fase densa (cor-de-rosa) e o tecido adjacente (lilás)

Nesta imagem é clara a presença do hidrogel como sendo a zona mais densa rodeada por material celular. Na derme, e em associação a um material homogéneo amorfo (hidrogel implantado), verifica-se um infiltrado inflamatório do tipo misto acompanhado de uma banda delimitante de tecido conectivo fibroso, a qual num coelho era delgada e no outro apresentava uma espessura já considerável. Este infiltrado inflamatório é constituído essencialmente por macrófagos e células epitelióides activas, assim como por um menor número de eosinófilos e um moderado número de células gigantes multinucleadas formadas em resultado de uma reacção do tipo corpo estranho. Imerso neste infiltrado inflamatório nota-se a presença de neovascularização, a qual difere de um animal para o outro de escassa a moderada quantidade neovascularização. Nos dois casos verifica-se a presença de elementos fibroblásticos reparativos, sendo num caso moderada e no outro em quantidade significativa. Em nenhum dos casos foram revelados agentes infecciosos associados à lesão.

Os resultados desta análise histológica revelam mais uma vez, e tal como no caso do implante de hidrogel em ratos, uma reacção inflamatória, típica de reacção à presença de corpo estranho.

A reacção inflamatória típica de corpo estranho observada em ambos os testes é normal quando é realizado um implante subcutâneo. A análise dos dois testes de biocompatibilidade realizados e aqui descritos indicam biocompatibilidade do hidrogel. Não é possível declarar a biocompatibilidade do produto a partir destes dois testes dada o reduzido número de animais utilizados.

A diferença no tempo de degradação do produto quando implantado poder-se-á dever à diferença do modelo animal em cada um dos testes, sendo nos ratos a degradação mais acelerada do que nos coelhos. Isto indica que o hidrogel é um produto biodegradável, mas este teste não é indicativo quanto à sua degradação quando aplicado em feridas em casos clínicos e em humanos, dado que nesse caso estará em contacto com tecidos diferentes e sob a influência de um sistema fisiológico também diferente.

Os dois testes permitem concluir que os dispositivos à base de quitosano serão biocompatíveis dado que esta será influenciada exclusivamente pela composição do dispositivo, e não pelas diferenças de estrutura dos casos apresentados neste trabalho, uma vez garantido que o produto em questão tem a mesma composição.

### **3.6.3. Avaliação do desempenho do hidrogel de quitosano na cicatrização de feridas**

O objectivo deste teste foi avaliar a influência do hidrogel de quitosano quando aplicado em queimaduras severas num modelo animal. Foram realizadas feridas por queimadura em ratos Wistar para avaliação do desempenho do hidrogel como penso para tratamento de feridas tendo em conta a variação do tamanho da ferida ao longo do tempo e o efeito da sua aplicação nos tecidos.

Uma das propriedades do hidrogel de quitosano, como já foi referido, é a sua capacidade de aderir a superfícies, mesmo quando são irregulares, o que se verificou durante a aplicação dos hidrogéis à superfície das feridas. Esta adesão é explicada pelas suas propriedades mecânicas mas também pelo facto de o quitosano ter cargas positivas e a pele ter cargas negativas (derivadas da membrana citoplasmática das células que constituem o tecido)<sup>(91)</sup>. Os animais foram divididos em dois grupos: grupo controlo tratado com soro fisiológico (0,9%NaCl), e o grupo teste tratado com o hidrogel de quitosano.

A observação dos animais foi realizada ao fim de 2, 6, 9, 13, 15 e 21 dias com registo fotográfico. A avaliação do leito da ferida foi feita em termos qualitativos quanto ao aspecto da ferida em fase de cicatrização e quanto ao tamanho da ferida, como já descrito no Capítulo II.

Não se verificou durante os 21 dias de evolução qualquer processo de inflamação anormal e os animais apresentavam um comportamento normal. A

Figura 3.27 apresenta a evolução da ferida induzida ao longo do tempo no grupo controle e no grupo teste.



Figura 3.27 - Imagens da ferida no grupo tratado com o hidrogel (A) e no grupo controle (B)

Macroscopicamente o tamanho de ferida do grupo de teste foi superior ao grupo controle durante todas as observações efectuadas ao longo de 21 dias. A evolução do tamanho da ferida está representada na Figura 3.28. Através deste gráfico é possível observar que há um aumento inicial do tamanho da ferida no grupo controle, enquanto no grupo de teste ocorre logo ao fim de 2 dias uma redução do tamanho da ferida. O tamanho da ferida no grupo teste é sempre estatisticamente inferior ao do grupo controle até ao dia 9, a partir do qual deixa de existir diferença na área da ferida.

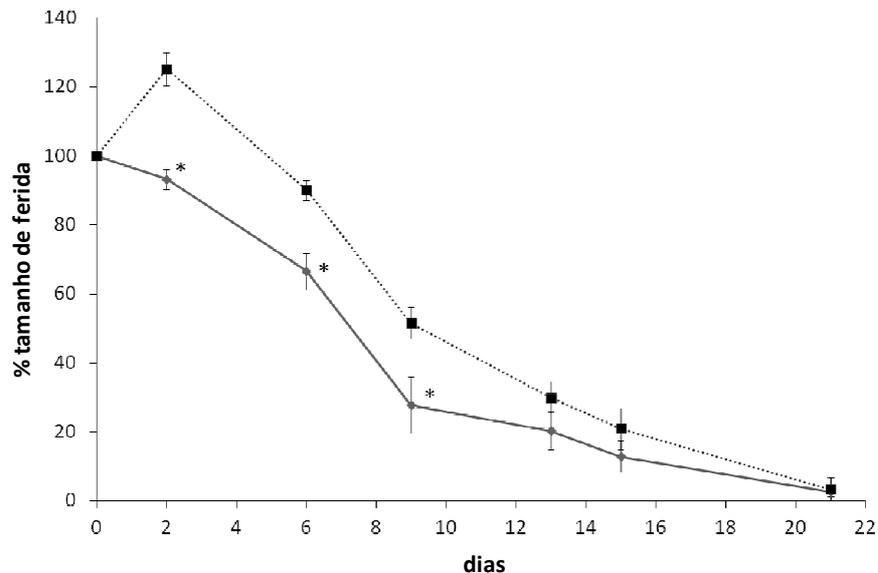


Figura 3.28 - Evolução do tamanho da ferida face ao tamanho inicial no grupo tratado com o hidrogel de quitosano (◆) e no grupo controle (■)

O hidrogel tem um papel relevante nas fases iniciais de cicatrização da ferida ao manter uma redução do tamanho desta, sendo portanto relevante no processo de cicatrização e contribuindo

## Produção de Matrizes à Base de Quitosano para o Tratamento de Feridas

para uma recuperação mais rápida. No entanto, a presença do hidrogel não diminui o tempo total de cicatrização.

As imagens dos cortes histológicos realizados a partir do material recolhido da lesão induzida são apresentadas na Figura 3.29.

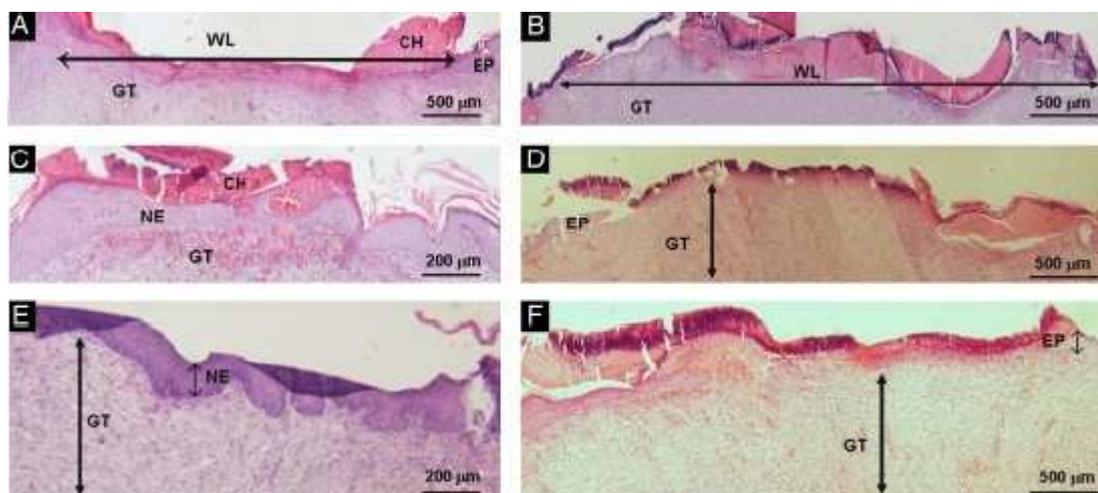


Figura 3.29 – Seções de biópsia coradas com hematoxilina e eosina para avaliação morfológica das lesões induzidas na pele do animal. Feridas tratadas com o hidrogel no dia 7, barra de escala 500 µm (A), dia 14, barra de escala 500 µm (C), e dia 21, barra de escala 200 µm (E). Ferida de controlo no dia 7, barra de escala 500 µm (B), dia 14, barra de escala 500 µm (D), e dia 21, barra de escala 500 µm (F). CH, hidrogel de quitosano; EP, camada epitelial; GT, tecido de granulação; NE, camada epitelial neo formada; WL, comprimento da ferida

A observação dos cortes histológicos com a respectiva coloração permite concluir que não ocorreu nenhuma reacção específica de inflamação ou granuloma, típico de reacção a corpo estranho, confirmando os resultados dos ensaios realizados anteriormente. Não foi observada a presença de microrganismos na lesão. Na necrópsia realizada aos animais não foram observadas histologicamente nenhuma anomalias patológicas no cérebro, coração, fígado, pulmões e baço. Estes resultados confirmam a histocompatibilidade tanto ao nível local, através dos cortes histológicos apresentados, como ao nível sistémico, apoiado pela necrópsia realizada.

Os resultados de variação de tamanho de ferida sustentam a influência do hidrogel de quitosano no processo de cicatrização na ferida.

O hidrogel de quitosano tem um papel activo no processo de cicatrização, acelerando a diminuição do tamanho de ferida nas fases iniciais de cicatrização, nomeadamente na fase de hemostasia, inflamação e no início da fase de proliferação, tendo em conta os períodos a que correspondem os tamanhos de ferida inferiores aos de controlo. Este efeito diminui o risco de infecção pelo aparecimento da ferida e melhora significativamente o processo de cura da ferida. Na fase final de cicatrização da ferida, o hidrogel não demonstra vantagens significativas, o que poderá indicar que, apesar de não ter um efeito directo na fase plena de proliferação, e provavelmente início da fase de remodelação, melhora consideravelmente as condições no local

da ferida, como por exemplo quanto ao nível de humidade, protecção contra agressões externas, pH, entre outras.

Estes resultados demonstram que a utilização de hidrogéis de quitosano para cicatrização de feridas por queimadura é vantajosa, acelerando o processo de cicatrização e diminuindo o risco de infecção pela diminuição significativa do tamanho de feridas nas fases iniciais de reparação da pele.

Os resultados histológicos dos tecidos adjacentes à aplicação do hidrogel na ferida, juntamente com os resultados obtidos nos ensaios de biocompatibilidade por implante subcutâneo, permitem observar uma diferença na reacção obtida. Enquanto no implante subcutâneo a histologia demonstrou a presença de reacção a corpo estranho, com um processo de inflamação e granulomas reactivos, no caso do ensaio de aplicação do hidrogel numa ferida este tipo de reacção não foi observada. O teste descrito aqui em último representa uma das aplicações clínicas do hidrogel de quitosano no tratamento de feridas. Em acréscimo a este resultado, a ausência de anormalidades patológicas em órgãos vitais, que não estavam em contacto directo com o hidrogel de quitosano, validam a segurança da utilização deste produto no tratamento de feridas.

### 3.7. Concepção e desenvolvimento empresarial

Em termos práticos foi necessário construir um protótipo em que a solução de quitosano, uniformemente distribuída nos seus moldes, estivesse em contacto com o gás de amónia. A forma mais simples encontrada foi criar uma câmara onde eram colocados os moldes (desde caixas de Petri até moldes de plástico) com uma determinada massa de solução de quitosano e um copo com solução de hidróxido de amónia a 2,5% (m/m) (uma concentração inferior à descrita por Domard *et al.*, mas que se revelou eficiente na criação de uma câmara de gás de amónia).

Dos vários protótipos para a produção dos hidrogéis desenvolvidos numa fase inicial foi adoptado o equivalente ao esquematizado na Figura 3.30. Este sistema é passível de um aumento de escala muito simples, fazendo variar apenas as dimensões e a quantidade de solução de hidróxido de amónio utilizada.



Figura 3.30- Esquema da câmara de amónia utilizada para a produção de hidrogéis de quitosano

## Produção de Matrizes à Base de Quitosano para o Tratamento de Feridas

O período de tempo indicado por Domard *et al.* de permanência da solução de quitosano na câmara de amónia para coagulação é 48 horas. No entanto, durante a concepção e desenvolvimento deste produto, verificou-se que o produto obtido com tempos de contacto da solução de quitosano com o gás de amónia inferiores eram igualmente eficazes, pelo que se definiu como tempo de reacção mínimo 12 horas, facto suportado pela demonstração de Venault *et al.*<sup>(81)</sup>, como já foi referido. Esta diminuição de tempo otimiza o tempo de ocupação do equipamento, tornando-se numa vantagem na produção a grande escala.

Após a formação dos hidrogéis é necessário remover o acetato de amónia formado, assim como o excesso de amónia dos hidrogéis. O método adoptado para esta etapa foi a lavagem dos hidrogéis com água apirogénica e 30 minutos de repouso dos hidrogéis para a evaporação da amónia. Este processo é realizado com os hidrogéis ainda nos moldes em que foram produzidos, e revelou-se eficiente para a lavagem dos mesmos.

Quando prontos, e tendo atenção ao manuseamento dos hidrogéis, estes foram transferidos para embalagens de PA/PE laminado. Este tipo de embalagens é permeável aos raios UV, permitindo assim a esterilização dos hidrogéis por este método. O produto foi irradiado dos dois lados durante 30 minutos, um intervalo de tempo estipulado inicialmente e que se revelou eficaz no decorrer dos testes *in vitro* realizados.

O dimensionamento do processo de produção dos hidrogéis teve em atenção vários factores, sendo de destacar o interesse na sua optimização e a redução de risco de contaminação do produto. A redução do tempo de gelificação na câmara de amónia é um dos exemplos de optimização do processo. A redução do risco de contaminação é conseguida através da realização de todas as etapas até à primeira embalagem dentro de sala-limpa.

Aliado à presença do quitosano num penso para o tratamento de feridas foi possível obter um produto com uma percentagem de água elevada, que permite manter o leito das feridas húmido quando aplicado, o que é de especial relevância no caso de queimaduras. Tendo em conta estes dois factores e o propósito de se obter, como estratégias de desenvolvimento da empresa, um produto exclusivamente de quitosano, este método de produção e desenvolvimento é perfeitamente compatível e preenche os pré-requisitos exigidos.

### **3.7.1. Fluxo e condições de produção**

A produção dos hidrogéis de quitosano para comercialização tem que corresponder às exigências compatíveis com as de um dispositivo médico, e segundo o processo certificado. A quantidade produzida tem ainda que ser numa escala suficientemente grande para comercialização. O fluxo da Figura 3.31 esquematiza as várias fases de produção estabelecidas.

O local de execução de cada uma das tarefas está directamente relacionado com o perigo de contaminação do produto. Todas as actividades realizadas antes da embalagem de esterilização,

### Capítulo III - Hidrogéis de Quitosano para o Tratamento de Feridas

incluindo esta, envolvem uma exposição do produto ao meio ambiente, pelo que têm que ser realizadas em ambiente controlado de forma a minimizar o risco de aumento de carga microbiana do produto. As actividades seguintes, dado que o produto já se encontra protegido, são realizadas em salas próprias mas sem controlo ambiental.

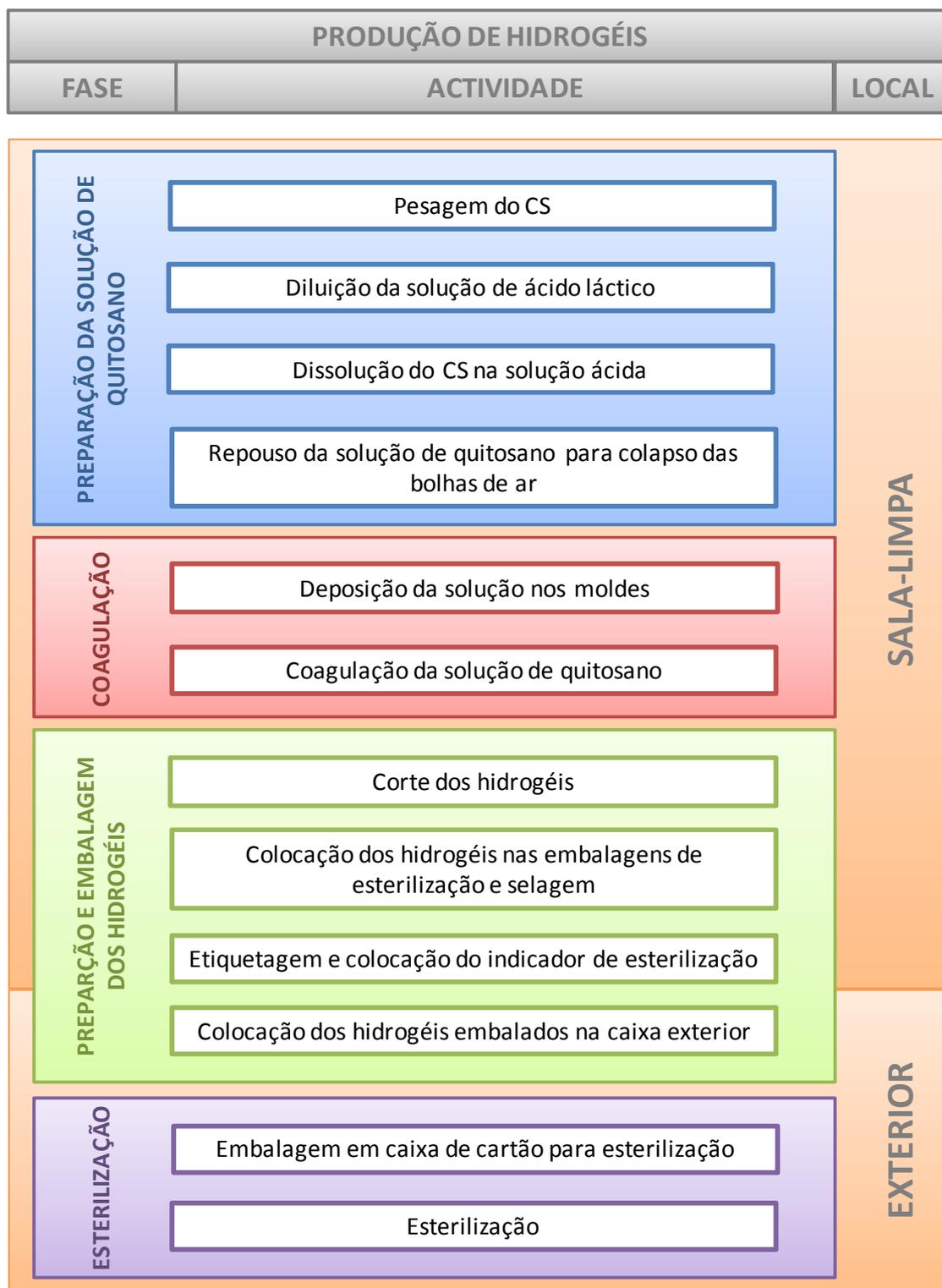


Figura 3.31 - Esquema da produção dos hidrogéis de quitosano, explicitando as quatro fases de produção, as actividades que as compreendem, e se é realizada dentro ou fora da sala-limpa

#### 4. Conclusão

Os resultados dos ensaios aqui apresentados para este produto permitiram a certificação do produto hidrogel de quitosano sob a designação comercial de HidroKI<sup>®</sup> - hidrogel à base de quitosano para o tratamento de feridas.

Os hidrogéis são um tipo de penso indicado para a aplicação em feridas com ausência ou quantidade reduzida de exsudado, sendo capazes de hidratar até à quantidade ideal o leito da ferida. O processo de produção de hidrogéis foi otimizado tendo em conta a obtenção de propriedades mecânicas adequadas para o seu manuseamento, uma das desvantagens referidas para este tipo de pensos. Foram produzidos hidrogéis a partir de uma solução de quitosano a 3% (m/m) em ácido láctico a 2% (v/v), utilizando um método físico através do aumento do pH da solução de quitosano pela presença de vapor de amónia, levando à precipitação do polímero em solução.

A caracterização dos hidrogéis permitiu verificar que o teor em água destes corresponde a cerca de 95%, valor dentro da gama típica deste tipo de pensos, confirmando a sua aplicabilidade no tratamento de feridas que necessitem de ser hidratadas.

Foram realizados testes com o hidrogel de quitosano desenvolvido em modelos *in vitro* e *in vivo* para avaliação da sua compatibilidade como dispositivo médico. A citotoxicidade foi avaliada segundo a norma ISO 10993-5 com duas linhas celulares distintas. Foi demonstrado que o hidrogel não apresenta qualquer efeito citotóxico, tendo sido obtidos valores de viabilidade celular relativa superiores a 100%, com as duas linhas utilizadas. Estes resultados foram confirmados por SEM, pela observação de fibroblastos aderidos e em proliferação.

Este produto foi seleccionado como padrão para a avaliação dos produtos desenvolvidos neste trabalho quanto à sua irritação, sensibilização e biocompatibilidade, dado que estes parâmetros são dependentes da composição química e não serão influenciados pela estrutura e morfologia. Concluiu-se que este hidrogel de quitosano é adequado à utilização como dispositivo médico por não induzir reacção de irritação nem de sensibilização. A avaliação da biocompatibilidade do produto por implante subcutâneo foi positiva.

O desempenho do hidrogel como penso para tratamento de feridas foi analisado *in vivo*. Pela análise da evolução do tamanho da ferida provocada ao longo do tempo é possível concluir que o quitosano tem propriedades benéficas na cicatrização de feridas, sendo indicado como penso no tratamento de feridas.



## Capítulo IV – Matrizes Porosas de Quitosano para o Tratamento de Feridas

### 1. Introdução

#### 1.1. Matrizes porosas como materiais

Matrizes porosas, também designadas por esponjas, podem ser definidas como uma dispersão de um gás (normalmente ar) numa matriz sólida. Existem diferentes processos de produção de matrizes porosas que dão origem a produtos com diferentes características por alteração da porosidade, do tamanho dos poros e da interconectividade dos mesmos<sup>(87)</sup>.

As aplicações deste tipo de estruturas variam desde a medicina até à indústria química, sendo os mercados mais significativos os de dispositivos médicos e de tratamento de águas. No caso do tratamento de águas, as membranas porosas são utilizadas nas operações de separação e/ou na retenção de determinados químicos de uma forma selectiva. Como dispositivos médicos este tipo de matrizes porosas biodegradáveis têm aplicações como suporte para a proliferação celular e colonização tridimensional. As suas aplicações incluem a vascularização, o tratamento de feridas, a promoção da diferenciação de células estaminais e a construção de biosensores. A estrutura, propriedades biológicas e a sua degradação desempenham um papel crucial na utilização destas matrizes para aplicações médicas<sup>(92-94)</sup>.

É também de destacar o foco na área da biomedicina e farmacêutica destas matrizes, particularmente em libertação controlada de fármacos (“drug delivery”) e pensos para tratamento de feridas. No caso da aplicação como pensos para o tratamento de feridas, a sua função tem sido combinada para utilização como meio de libertação de fármacos e material genético, incluindo ADN plasmídico, a uma taxa controlada e durante períodos de tempo alargado<sup>(95,96)</sup>.

Estas matrizes porosas podem ser utilizadas na regeneração do osso, sendo um exemplo a sua utilização como substitutos ósseos. Li *et al.*<sup>(97)</sup> apresentaram um estudo de cultura de osteoblastos em matrizes porosas à base de quitosano nas quais as células aderiram e proliferaram, promovendo ainda a deposição de minerais num curto espaço de tempo após o início da cultura. Lee *et al.*<sup>(98)</sup> prepararam uma matriz porosa de quitosano e fosfato tricálcico como matriz para crescimento de osteoblastos numa estrutura 3D para posterior transplante para regeneração do osso, tendo sido obtidos resultados muito promissores. Muitos outros estudos têm sido desenvolvidos demonstrando o sucesso da aplicação de matrizes porosas de quitosano ou de compósitos na área da regeneração do osso<sup>(99)</sup>.

Sem dúvida, a aplicação de matrizes porosas com maior impacto na investigação na medicina, hoje em dia, é em Engenharia de Tecidos, sendo o seu principal objectivo regenerar tecidos e órgãos. Tal é facilitado pela utilização de uma matriz capaz de simular a matriz extracelular. De uma forma geral, o processo de utilização de matrizes na ET passa pela recolha de tecido do paciente e o isolamento das células que o constituem. De seguida, *in vitro*, essas células são cultivadas sobre a matriz seleccionada. Quando se atinge o ponto desejado de desenvolvimento celular na matriz o tecido danificado do doente é removido e substituído pela matriz com células. Com o decorrer do tempo a matriz será absorvida e o novo tecido irá formar-se. Alguns dos tecidos que têm sido estudados incluem pele, cartilagem, osso, nervos e fígado. Os materiais utilizados neste tipo de aplicações têm que respeitar variados pré-requisitos relacionados com o seu comportamento biológico. Por exemplo, deverão ser biocompatíveis, promover a adesão e proliferação celular, ser biodegradáveis e o produto de degradação ser não-tóxico. Quanto às propriedades físicas pretende-se, tipicamente, uma matriz porosa com uma porosidade de 90% ou acima, com tamanho de poro entre 100 e 200  $\mu\text{m}$ , com poros interconectados, além de uma resistência mecânica capaz de suportar todo o manuseamento necessário desde a cultura celular até ao implante no paciente. No entanto, as propriedades pretendidas dependerão sempre da aplicação. Na área da ET é possível observar a aplicação de matrizes porosas na formação de osso, na regeneração periodontal, na reparação de malformações nasais e auriculares, no desenvolvimento de cartilagem, de córneas artificiais, de válvulas cardíacas, na reparação de tendões, na substituição de ligamentos e também no tratamento de tumores<sup>(96,100)</sup>.

É possível produzir matrizes porosas a partir de diferentes materiais. As características destes materiais condicionam o tipo de técnica e as características finais do produto. A diversidade de matérias-primas e técnicas de produção permitem controlar a morfologia da matriz em termos de porosidade (tamanho de poro, orientação dos poros ou interconectividade), o que torna este tipo de matrizes alvo de intensa investigação para diferentes aplicações.

Os biomateriais utilizados na produção de matrizes podem ser polímeros naturais, tais como alginato, proteínas, colagénio, gelatina e albumina. Podem também ser utilizados polímeros sintéticos como é o caso do álcool polivinílico e o ácido poliglicólico. Podem ainda ser utilizados cerâmicos tais como hidroxiapatite e o fosfato tricálcico<sup>(96)</sup>.

As matrizes porosas podem ser produzidas utilizando um ou vários polímeros combinados. O alginato, sendo um polímero hidrossolúvel, pode ser transformado numa matriz macroporosa através do processo de liofilização. Dois exemplos de combinação de polímeros são: quitosano e goma xantana (um polissacarídeo) ou de um poliéster alifático saturado sintetizado com celulose bacteriana<sup>(101-103)</sup>.

Liu *et al.*<sup>(104)</sup> desenvolveram uma estrutura combinada de microesferas liofilizadas incorporadas numa matriz liofilizada, ambas compostas por gelatina e quitosano e carregadas com factor de crescimento de fibroblastos para aplicação em enxertos de pele. Os testes de cultura de

fibroblastos humanos sobre esta matriz demonstraram que este é um bom suporte para libertação controlada de factores de crescimento e ao mesmo tempo adequado para a proliferação e crescimento celular.

Têm sido utilizadas várias abordagens na produção de pensos para o tratamento de feridas a partir de quitosano, quer como estruturas simples quer combinadas. Um exemplo deste último caso é o penso desenvolvido por Ma *et al.*<sup>(109)</sup> que consiste numa bicamada de filme denso de quitosano sobre uma matriz porosa produzida por liofilização.

## 1.2. Pensos porosos de quitosano

Este tipo de pensos em forma de matrizes porosas são indicados para feridas com uma produção de exsudado que precise de ser gerida. Além de manterem a humidade necessária à sua cicatrização, têm a capacidade de amortecer eventuais agressões externas, especialmente do foro mecânico, e de diminuir o odor. Estes pensos são moldáveis de forma a se adaptarem às cavidades (no caso de existirem) da ferida e podem ser apresentados como pensos adesivos ou não-adesivos. Este tipo de pensos está indicado em todos os estádios do processo de cicatrização e em todos os tipos de feridas<sup>(20,33,105-107)</sup>. A sua aplicação inclui o tratamento de úlceras vasculares crónicas e úlceras de pressão, queimaduras superficiais e de segundo grau, pequenas abrasões, lacerações, cortes e escaldaduras<sup>(108)</sup>.

O produto mais comum dentro desta categoria de pensos é a espuma de poliuretano hidrofílico revestida por um filme impermeável<sup>(33)</sup>. No entanto, hoje em dia já existe uma grande variedade de produtos tanto em termos de composição como de apresentação e ainda em termos de efeitos/propriedades no tratamento de feridas.

O mercado de polímeros hidrofílicos para o tratamento de feridas é actualmente bastante vasto, estando os produtos mais relevantes em termos de comparação com o penso aqui proposto apresentados na Tabela 4.1.

## Produção de Matrizes à Base de Quitosano para o Tratamento de Feridas

Tabela 4.1 - Pesquisa de mercado de produtos equivalentes ao produto poroso para o tratamento de feridas proposto para desenvolvimento neste trabalho

CARACTERÍSTICA	PRODUTO			
	ChitoSkin, Sangui	Medical plus, Aquacel Apósito de Hydrofiber	Vanson HaloSource, HemoHalt Hemostasis Pad Wound Dressing	Oasis Wound Dressing
<b>Composição química</b>	Quitosano e gelatina de suíno	Carboximetilcelulose de sódio	Quitosano	MEC obtida da submucosa intestinal do porco; contem colagénico, elastina, glicosaminoglicanos, glicoproteínas e proteoglicanos
<b>Composição física</b>	Matriz absorvente	Compressa ou tira composta hidrofibras	Matriz não-tecida	Matriz 3D seca
<b>Indicações de uso</b>	ChitoSkin está indicado no tratamento de feridas na sequência de ferimentos graves (queimaduras, acidentes), úlceras arteriais e venosas, feridas de pressão, feridas graves com exsudado, feridas infectadas (sendo necessário um tratamento adicional) e em feridas profundas como enchimento.	Absorve o exsudado. Pequenas abrasões, lacerações, cortes, escaldaduras. Queimaduras superficiais e de 2º grau. Úlceras vasculogénicas. Feridas crónicas, traumáticas e infectadas	Indicado para tratamento local e rápido controlo de hemorragia: para superfície da pele após procedimentos vasculares; cateteres e/ou tubos percutâneos; após tratamentos de hemodiálise; para pacientes em tratamentos de hemodiálise; pacientes em terapia de anti-coagulantes. E também para tratamento de abrasões, lacerações e hemorragias nasais. Para uso exclusivo em feridas hemorrágicas externas.	Oasis está indicado para o tratamento de feridas, incluindo úlceras de diabéticos, úlceras venosas, feridas parciais de profundidade total, úlceras de pressão, úlceras vasculares crónicas, feridas traumáticas, feridas com exsudado e feridas cirúrgicas.
<b>Embalagem</b>	Envelope de Tyvek	Envelope de laminado de alumínio	Embalagem laminada	Envelope de Tyvek
<b>Método de esterilização</b>	Radiação (gama)	Radiação gama	Radiação e-beam	Óxido de etileno

O foco deste trabalho é o desenvolvimento de um penso hidrofílico à base de quitosano.

### 1.3. Produção de uma matriz porosa de quitosano

É possível encontrar variados métodos na literatura para a produção de matrizes porosas a partir de polímeros, tais como: liofilização, ligação de fibras ("fiber bonding"), utilização de agentes expansores ("foaming"), lixiviação de agentes porogénicos ("salt-leaching", em que, regra geral, o agente porogénico é um sal que depois é lixiviado), prototipagem rápida (impressão 3D), tecnologia de fluido supercrítico, electrofiação (técnica utilizada neste trabalho e que será descrita no próximo capítulo), técnica sol-gel, moldagem de fundidos ("melt molding"), compactação de pós, separação de fases por indução térmica ("Thermal induced phase separation", TIPS), malha de fibras ("fiber mesh"), utilização de emulsões e tecnologias têxteis (96,100).

Por definição, a liofilização é um processo estabilizante através do qual a substância é primeiro congelada, depois a quantidade de solvente é reduzida por sublimação (secagem primária) seguida da desorção (secagem secundária)<sup>(110)</sup>.

O processo de ligação de fibras é, tal como a designação indica, a formação de uma estrutura tridimensional porosa por promoção de espaços intersticiais entre fibras de polímero, as quais são unidas por diferentes processos, por exemplo a fusão do material em questão<sup>(100,111-113)</sup>.

No processo de “foaming” é utilizado um gás, normalmente dióxido de carbono, para produzir poros na matriz. A porosidade obtida é caracterizada por poros não interconectados com dimensões tipicamente de 100  $\mu\text{m}$ <sup>(100,111)</sup>.

Um outro método de produção de matrizes porosas passa pela incorporação de partículas insolúveis na solução de polímero, como por exemplo um sal, e a posterior evaporação desse solvente (“solvent-casting”), mantendo as partículas insolúveis aprisionadas na estrutura da matriz. Por último, essas partículas são removidas ao ser adicionado à matriz um solvente do sal, mas que não seja solvente do polímero, deixando assim no seu lugar poros. Este método é designado por “salt-leaching” e as matrizes assim formadas têm tamanhos de poro e porosidade muito variada, dependendo das partículas utilizadas<sup>(100,111)</sup>.

A prototipagem rápida permite a obtenção de estruturas tridimensionais, com um controlo preciso das características morfológicas, assim como da composição química e das propriedades mecânicas. O processo decorre por deposição de camadas de pós ou líquidos que são solidificados, a partir da informação de um ficheiro informático<sup>(96)</sup>.

A tecnologia de fluido supercrítico envolve a dissolução do polímero num gás (ex.: dióxido de carbono) em estado supercrítico, a alta pressão, formando uma solução polímero/gás. A pressão é reduzida de forma a criar uma instabilidade termodinâmica do gás dissolvido, levando à nucleação e crescimento de células de gás, que criam poros dentro da matriz de polímero<sup>(96)</sup>.

No método de moldagem de fundidos o polímero é primeiro fundido na presença de porogénicos que, após arrefecimento, são removidos por dissolução. Normalmente estas matrizes são ainda liofilizadas no final<sup>(96)</sup>.

A compactação de pós é realizada utilizando uma prensa ou por projecção do próprio pó, de forma a se atingir a consolidação do material com a porosidade pretendida<sup>(96)</sup>.

A técnica de TIPS envolve a dissolução do polímero num solvente e a têmpera da solução a uma determinada temperatura. A redução de temperatura induz uma separação de fases, uma com elevado teor em polímero e outra com baixo teor de polímero. Após a separação de fases o solvente é removido por extracção ou liofilização, deixando uma microestrutura porosa<sup>(96)</sup>.

As matrizes porosas também podem ser obtidas através da tecelagem de fibras individuais em estruturas tridimensionais com tamanhos de poro variável. Estas estruturas apresentam áreas superficiais elevadas, no entanto não possuem estabilidade estrutural para serem utilizadas *in vivo*<sup>(113)</sup>.

Foram ainda desenvolvidos processos para a obtenção de matrizes porosas através de emulsões. A fase descontínua da emulsão serve de molde para os futuros poros, enquanto a polimerização ocorre na fase contínua. Após a polimerização a fase descontínua é removida dando origem a uma estrutura porosa<sup>(96)</sup>.

Na área têxtil existem também várias tecnologias de produção de malhas não-tecidas úteis na produção de matrizes com as características desejadas a partir de vários polímeros<sup>(96)</sup>

À parte destes métodos, Malafaya *et al.*<sup>(114)</sup> propõem a produção de matrizes porosas por empacotamento de esferas de quitosano, obtendo-se uma estrutura constituída por poros intersticiais interconectados ("particle aggregation").

A liofilização é o método de produção de matrizes mais utilizado. Este método tem vários parâmetros que podem ser controlados e que originaram matrizes com diferentes características, sendo também um método simples que envolve apenas a utilização de um solvente, em termos operacionais é de baixo custo e permite uma implementação à escala industrial simples, para posterior comercialização. Estas razões levaram a que fosse este o método escolhido neste trabalho.

### 1.3.1. Método de liofilização

De uma forma resumida, no processo de liofilização, a solução começa por ser congelada. Quando o sistema atravessa a linha de equilíbrio líquido/sólido, inicia-se a cristalização do solvente a partir de pontos de nucleação o que conduz ao aumento da concentração de soluto no resto da solução. Assim, forma-se uma rede interpenetrante de cristais de gelo e do precipitado do soluto da solução, polímero neste caso. A redução da pressão dentro da câmara de liofilização leva à sublimação dos cristais de gelo, e por último dá-se a evaporação do solvente a baixa temperatura, ainda sob vácuo, deixando um sólido altamente poroso<sup>(100,115)</sup>.

A cristalização depende de vários factores como a velocidade de arrefecimento (que inclui a taxa de transferência de calor, a zona de contacto do recipiente com a zona de arrefecimento e a uniformidade da temperatura na câmara de processamento), a concentração inicial do soluto, a temperatura final de arrefecimento e o tempo que é mantida esta temperatura. O processo de cristalização é um dos principais factores na definição do tamanho dos poros e da microestrutura da matriz resultante<sup>(54,115)</sup>.

No caso de a solução a liofilizar ser água, na ausência de partículas insolúveis, começam-se a formar aglomerados de moléculas de água de uma forma homogénea por toda a solução, sem locais preferenciais de nucleação, processo denominado de nucleação homogénea. No entanto, se existem partículas não dissolvidas na água estas irão actuar como núcleo para a cristalização de gelo, sendo este processo denominado por nucleação heterogénea, que é o que ocorre quando se liofiliza uma solução de quitosano. Certas condições, como a refrigeração ser realizada sob pressão alta e a taxa de arrefecimento ser o mais alta possível, ajudam a evitar a formação de cristais. Uma taxa de arrefecimento inicial mais elevada forma mais cristais mas de menores dimensões, formando uma matriz com uma microestrutura mais homogénea<sup>(115,116)</sup>.

No caso de produção de matrizes a partir de soluções poliméricas o processo de formação de poros está relacionado com a formação de cristais de solvente durante o arrefecimento. A solubilidade dos polímeros nestes cristais é normalmente muito reduzida, levando a que o polímero se concentre entre os cristais, à medida que estes se formam e precipite. No final do processo obtém-se finalmente um sólido poroso composto pelo polímero, cuja porosidade é condicionada pelos cristais formados durante o arrefecimento, como já descrito. Assim, o tamanho e fracção de volume dos poros dependem, respectivamente, da taxa de arrefecimento e da percentagem de polímero inicial<sup>(100,110,116)</sup>.

Uma taxa de arrefecimento durante o processo de congelação da solução mais lenta leva à formação de poros de diâmetro superior, isto porque o arrefecimento lento permite a formação de cristais maiores, originando matrizes com uma microestrutura irregular e com paredes entre poros rasgadas<sup>(116,117)</sup>. Idêntico ao descrito para matrizes liofilizadas a partir de alginato, também a concentração no caso do quitosano desempenha um papel importante na morfologia final em termos de porosidade: a diminuição da concentração de polímero inicial produz estruturas com poros maiores e espessura de paredes entre os poros inferior<sup>(52,116)</sup>.

Após o arrefecimento, em que ocorre o congelamento total da solução, segue-se a secagem, que se divide em dois passos: no primeiro ocorre o fornecimento da energia necessária à passagem do gelo a vapor de água, e no segundo o transporte deste vapor da superfície de sublimação através do produto já seco, para ser recolhido no condensador do sistema de liofilização. Na secagem primária aproximadamente 90% do total de água (essencialmente toda a "água livre" e alguma da água adsorvida pelo polímero) existente na amostra é removida por sublimação. A secagem secundária remove a restante água por desorção resultando, tipicamente, num produto com uma percentagem de água residual inferior a 1-3%; o tempo necessário para esta fase é bastante inferior ao da secagem primária<sup>(115,118)</sup>.

O processo de liofilização de uma solução de quitosano produz matrizes com poros que poderão estar mais ou menos interconectados entre si. Entre outros factores que podem afectar essa interconectividade é de sublinhar a concentração inicial de polímero. Assim, para as mesmas

## Produção de Matrizes à Base de Quitosano para o Tratamento de Feridas

condições de liofilização, quanto maior a concentração de polímero na solução, menor será a interconectividade dos poros<sup>(52)</sup>.

Os principais factores que influenciam e a sua consequência na estrutura porosa de quitosano, e que foram considerados e estudados na concepção e desenvolvimento deste penso poroso para o tratamento de feridas estão resumidos na Tabela 4.2.

Tabela 4.2 - Factores associados à produção de matrizes porosas de quitosano pelo método de liofilização e características do produto final relacionadas<sup>(119)</sup>

Factor	Característica
Aumento da concentração de quitosano na solução inicial	Diminuição do diâmetro dos poros Diminuição da interconectividade dos poros
Diminuição da temperatura de arrefecimento	Diminuição do diâmetro dos poros
Taxa de arrefecimento durante o processo	Variação na orientação, forma e tamanho dos poros

O objectivo deste projecto é a obtenção de uma matriz porosa composta por 100% de quitosano. Como já foi descrito, a técnica de liofilização seleccionada para a produção deste produto envolve passos bastante simples ao mesmo tempo que permite a produção de um material com as características pretendidas.

## 2. Materiais e métodos

### 2.1. Materiais

Foi utilizado quitosano *Chitopharm*<sup>®</sup> M com peso molecular médio de 650.000 e grau de desacetilação de 74%.

Foi ainda utilizado ácido acético glacial para a preparação da solução ácida para dissolução do polímero, anidro acético e solução de hidróxido de amónia a 25% (v/v), todos fornecidos pela *Fluka*, Alemanha. Foi ainda utilizado hidróxido de sódio a 50% (m/v), *Sigma-Aldrich*, EUA.

### 2.2. Métodos

Os métodos gerais de RMN, FTIR, testes de tracção, obtenção de imagens por SEM e microscopia confocal, testes de citotoxicidade e proliferação celular *in vitro*, testes *in vivo* foram descritos no Capítulo II.

#### 2.2.1. Alteração do grau de desacetilação do quitosano

O objectivo deste passo foi produzir três tipos de quitosano, ou seja três matérias-primas, para a produção das matrizes com diferentes graus de desacetilação (DD). Assim, optou-se por partir do

quitosano *Chitopharm*<sup>®</sup> M (inalterado), definido como o quitosano de grau de desacetilação médio e aumentar ou diminuir o grau de desacetilação por reacção química.

O grau de desacetilação obtido foi determinado por RMN.

- **Aumento do grau de desacetilação – reacção de desacetilação**

O aumento do grau de desacetilação foi obtido por reacção heterogénea em meio alcalino. Especificamente, foi adicionada ao quitosano uma solução de hidróxido de sódio a 50% (m/v) numa proporção de 1:10, respectivamente. A reacção decorreu durante 4 horas à temperatura de 80°C. No final da reacção o quitosano foi filtrado e lavado sucessivamente com água destilada até se obter pH neutro. A última lavagem foi realizada com acetona para facilitar o passo seguinte de secagem do quitosano sob vácuo.

- **Diminuição do grau de desacetilação – reacção de acetilação**

O método aqui descrito foi adaptado a partir do utilizado por Vachoud, *et al.*<sup>(120)</sup>. Foi preparada uma solução de quitosano a 1% (m/v) em ácido acético a 0,5% (v/v). Após total dissolução foi-se acrescentado metanol à solução de quitosano numa quantidade correspondente a metade do volume desta última. A solução de acetilação foi preparada por adição de anidro acético ao mesmo volume de metanol usado anteriormente (na proporção de 1:120) para preparar a solução de acetilação. Esta solução de acetilação foi adicionada lentamente e sob agitação vigorosa durante 1 hora.

Para recuperar o quitosano foi preparada uma solução coagulante de hidróxido de amónia e metanol numa proporção 3:7 em volume, respectivamente. Sobre esta solução foi vertida a solução de quitosano, sob agitação vigorosa; este sistema foi mantido sob agitação durante a noite para garantir a coagulação total do quitosano e a total desprotonação dos grupos amina.

O gel formado pelo quitosano precipitado foi filtrado e lavado sucessivamente com água destilada e por fim com metanol. Este gel foi liofilizado de forma a se obter o quitosano seco e pronto a ser utilizado como matéria-prima.

### **2.2.2. Métodos de produção da matriz porosa**

O processo de produção das matrizes de quitosano estudadas neste capítulo consiste na dissolução do quitosano numa solução ácida, a sua liofilização em molde adequado e a evaporação do excesso de ácido.

Na produção de matrizes para os testes *in vitro* e *in vivo* as matérias-primas utilizadas foram esterilizadas em autoclave e os passos de dissolução e liofilização foram realizados dentro de sala-limpa, com todos os cuidados de higiene necessários para diminuição da carga microbiana, e posteriormente esterilizados por radiação gama.

- **Dissolução**

As soluções de quitosano foram preparadas por dissolução do polímero numa solução de ácido acético a 2% (v/v). As concentrações de quitosano utilizadas foram 0,5% (m/m), 2% (m/m) e 3% (m/m). A mistura foi agitada até dissolução total e deixada a repousar durante a noite para colapso das bolhas de ar incorporadas durante o processo de agitação.

- **Liofilização**

As soluções de quitosano preparadas foram depositadas em moldes adequados e colocadas na prateleira do liofilizador. O liofilizador utilizado tem o sistema de pré-congelação incorporado, pelo que não é necessário pré-congelar as soluções como é comum na maioria dos sistemas de liofilização. A Tabela 4.3 descreve o ciclo de liofilização utilizado e a Figura 4.1 representa-o esquematicamente.

Tabela 4.3 - Descrição do ciclo de liofilização utilizado para a preparação das matrizes liofilizadas

Segmento do Ciclo	Descrição
Segmento pré congelação	A amostra é arrefecida até cerca de -52°C. A amostra é mantida a esta temperatura durante 3 horas.
Segmento 1	A amostra é aquecida a 5°C·min <sup>-1</sup> até -25°C. A amostra é mantida a essa temperatura durante 10 horas.
Segmento 2	A amostra é aquecida a 0,5°C·min <sup>-1</sup> até 17°C. A amostra é mantida a essa temperatura durante 10 horas.

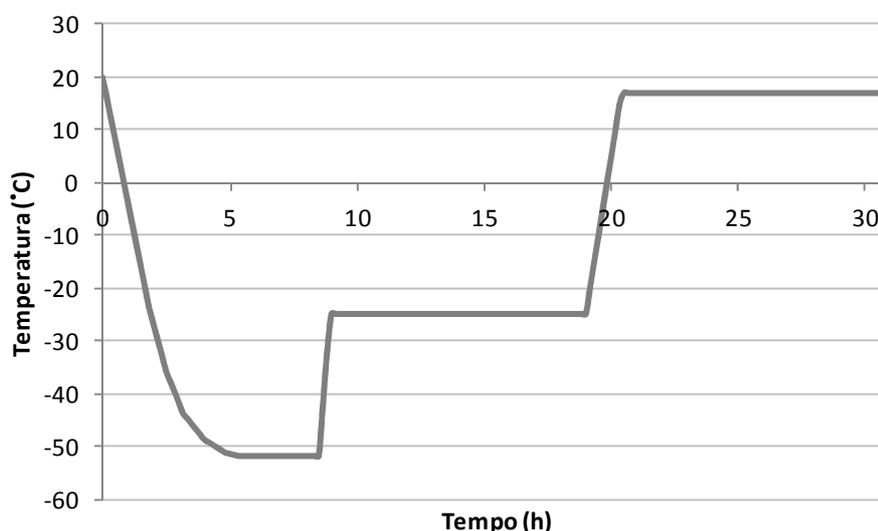


Figura 4.1 - Representação gráfica do ciclo de liofilização utilizado na produção das matrizes porosas de quitosano

As amostras foram preparadas, em termos de dimensões, conforme os testes a que se destinavam.

- **Esterilização**

Apenas as amostras destinadas aos testes *in vivo* e *in vitro* foram embaladas dentro de sala-limpa em embalagens de esterilização *Steriking Tyvek* (embalagens que permitem trocas gasosas com o exterior numa das faces, sendo a outra face plástico laminado transparente) e aplicado um indicador de esterilização para radiação gama. De seguida foram esterilizadas por radiação gama com uma dose compreendida entre 20 e 25 kGy.

- **Secagem**

No final do processo anterior todas as amostras foram colocadas dentro de uma estufa a 40 °C durante 3 dias. O objectivo deste passo é a evaporação do excesso de ácido acético ainda incorporado nas matrizes, ao qual a embalagem seleccionada é permeável. Este processo é realizado após a esterilização pois esta promove já à partida a evaporação de parte do ácido.

### **2.2.3. Métodos de caracterização**

#### **2.2.3.1. Caracterização mecânica - testes de tracção**

Os testes de tracção das matrizes porosas foram realizados tal como descritos no Capítulo II. Foram utilizadas três réplicas com cerca de 3 cm de comprimento e 1 cm de largura. Os dados obtidos permitiram determinar qual a tensão máxima ( $T_{max}$ ) necessária aplicar até à ruptura total da matriz (tensão de ruptura).

#### **2.2.3.2. Caracterização morfológica das matrizes liofilizadas**

A partir das imagens obtidas por SEM (método descrito no Capítulo II) foi possível observar a morfologia das matrizes liofilizadas produzidas.

#### **2.2.3.3. Capacidade de absorção**

A capacidade de absorção das estruturas produzidas foi determinada submergindo as estruturas em soro fisiológico à temperatura ambiente.

O procedimento experimental consiste em medir a massa de uma amostra imersa nesta solução a determinados intervalos de tempo, até estabilização. Para fins de reprodutibilidade, previamente a cada medida, a amostra fica a escorrer o excesso de solução durante cerca de 30 segundos sobre papel de filtro.

A capacidade de absorção foi calculada por comparação entre o peso da matriz saturada e o seu peso em seco segundo a Equação 4.1.

$$\text{Capacidade de absorção} = \frac{m_f - m_o}{m_o} \quad \text{Equação 4.1}$$

Em que:

$m_0$  - massa da amostra liofilizada seca;

$m_f$  - massa da amostra saturada em soro fisiológico.

#### 2.2.3.4. Porosidade

Para a obtenção de informação relativamente à porosidade das estruturas produzidas foi utilizado o método de comparação de densidades, uma vez que a consistência das membranas liofilizadas não permite o uso do método de porosimetria por intrusão de mercúrio.

Este método de determinação da porosidade de uma membrana consiste na comparação da densidade dessa membrana porosa com a de uma membrana densa<sup>(121)</sup>. O cálculo é feito pela aplicação da Equação 4.2.

$$Porosidade = \left( 1 - \frac{\rho_{membrana\ porosa}}{\rho_{filme\ denso}} \right) \quad \text{Equação 4.2}$$

Em que:

$\rho_{membrana\ porosa}$  - massa volúmica da membrana porosa calculada pelo quociente da massa seca da membrana pelo seu volume;

$\rho_{filme\ denso}$  - massa volúmica de um filme denso, considerada neste caso  $1,42 \text{ g}\cdot\text{cm}^{-3}$  <sup>(122)</sup>.

#### 2.2.4. Métodos de caracterização biológica

##### 2.2.4.1. Testes *in vitro*

O produto foi testado quanto à sua citotoxicidade e proliferação ao longo de 72 h pelo método de contacto directo com CCK-8, tal como descrito no Capítulo II. Estes testes foram complementados por observações em microscopia confocal.

##### 2.2.4.2. Testes *in vivo*

Para a realização destes testes foram utilizados ratos Wistar fêmeas. Dado o protocolo pretendido foram seleccionados animais com um peso de  $(342 \pm 36)$  g para que a superfície do dorso permitisse a colocação de dois pensos por animal.

Com o objectivo de estudar a influência do grau de desacetilação do quitosano utilizado na produção das matrizes e da sua porosidade foi definido que seriam testadas as combinações apresentadas na Figura 4.2.

	P1	P2	P3
D1		X	
D2	X	X	X
D3		X	

Figura 4.2- Combinações de características das matrizes porosas utilizadas nos testes *in vivo*; **D** – grau de desacetilação, em que D1 é o mais baixo e D3 o mais alto; **P** – porosidade da matriz, em que P1 é a mais porosa e P3 a menos porosa; (X) combinação de propriedades utilizadas

Cada grupo de animais foi testado apenas com uma matriz, sendo cada grupo constituído por cinco animais.

Os animais foram anestesiados com uma injeção intraperitoneal de diazepam (em solução injetável 10 mg/2 ml, *Labesfal*) e cetamina (em solução injetável 200 mg/20 ml, *Ketalar*<sup>®</sup>, *Pfizer*) numa proporção de 2:1, respectivamente. Após confirmação do estado anestesiado do animal procedeu-se à tricotomia do dorso do animal e à desinfeção da zona do dorso a operar com uma solução cutânea de iodopovidona a 10%, anti-séptica, com acção bactericida-fungicida, *Biossedan*<sup>®</sup>. A marcação do perímetro de excisão foi realizada com um marcador cirúrgico para pele e o auxílio da escala métrica de 15 cm que acompanha o marcador. Em cada animal testado foram realizadas duas excisões de pele totais de dimensões de 2x2 cm nas zonas dorso-caudal e dorso-cranial com o auxílio de um bisturi de lâmina descartável e uma tesoura cirúrgica romba curva. De seguida as bordas da pele foram suturadas à fáscia para que não ocorresse cicatrização das feridas induzidas por contracção. Foi utilizado fio de sutura de seda, entrançado e revestido, não reabsorvível, 4/00 com agulha de curvatura 3/8 com 24mm e de secção triangular.

Na ferida induzida na zona cranial foi aplicado o controlo, que consistiu na cobertura da ferida com gaze gorda e uma compressa. A matriz porosa sob estudo foi aplicada na outra ferida; este penso foi suturado às bordas da ferida e foi feito um penso atado com compressa para garantir a sua fixação.

O animal foi reposto na respectiva caixa e deixado a acordar do estado de anestesia naturalmente.

Foi definido que cada grupo de animais seria monitorizado regularmente quanto ao seu estado clínico, sendo eutanasiado ao fim de 21 dias excepto o grupo tratado com a matriz de grau de desacetilação médio e porosidade média (P2D2), no qual houve 3 grupos e cada um foi eutanasiado ao fim de cada 7 dias, a fim de obter resultados mais pormenorizados do processo de cicatrização da ferida com a aplicação da matriz porosa. Assim, um grupo é definido pelo tipo de matriz utilizada, tal como assinalado na Figura 4.2, e pelo período ao fim do qual será eutanasiado. Neste caso teremos 7 grupos: 4 grupos com quatro tipos de matrizes diferentes com tempo de eutanásia de 21 dias, e 3 grupos com o mesmo tipo de matriz (P2D2), com três

## Produção de Matrizes à Base de Quitosano para o Tratamento de Feridas

tempos de eutanásia (7, 14 e 21 dias). A Figura 4.3 esquematiza os vários grupos utilizados e os períodos de teste respectivos.

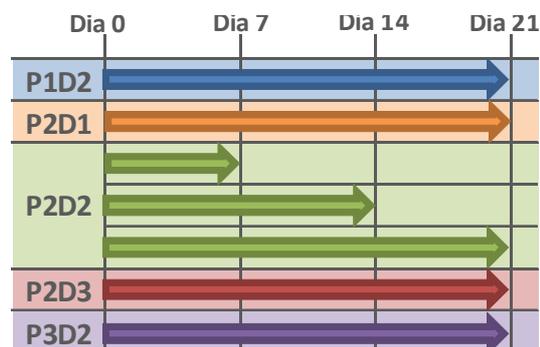


Figura 4.3 - Esquema dos períodos de teste dos vários grupos em estudo nos testes *in vivo*

A eutanásia dos animais foi realizada por hipoxia, que é um método considerado adequado para esta espécie. A colocação do animal numa câmara para este fim e a exposição do animal a uma concentração CO<sub>2</sub> elevada provoca uma rápida perda de consciência do animal, e portanto uma minimização do sofrimento<sup>(123)</sup>.

- **Estudo histológico**

Foi ainda recolhido tecido para análise histológica, compreendendo a zona da ferida e o perímetro em redor; este material foi colocado imediatamente em formaldeído para posterior processamento.

- **Avaliação do tamanho de ferida**

Foram recolhidas imagens com uma câmara digital e procedeu-se à observação, quando justificável, através de lupa (*Leica*) com registo de imagens. As imagens recolhidas para medição da ferida incluíram uma escala e foram analisadas recorrendo ao *software ImageJ versão 1.440*. A Redução de Área da Ferida em relação ao Controlo (RAFC) foi calculada segundo a Equação 4.3.

$$RAFC = \frac{A_c - A_t}{A_c} \quad \text{Equação 4.3}$$

Em que:

A<sub>c</sub> - área da ferida de controlo;

A<sub>t</sub> - área da ferida de teste.

- **Dimensionamento da experiência**

Tendo em vista a utilização mínima de animais por grupo, sem comprometimento dos resultados obtidos quanto à sua incerteza, procedeu-se ao dimensionamento da experiência. Para tal foi colocada como hipótese “o produto acelera a cicatrização de uma ferida” e como hipótese nula (H<sub>0</sub>) “não há diferença entre os tratamentos”, que será a hipótese a testar. O objectivo será então provar que H<sub>0</sub> não é verdade.

Existem dois tipos de erro possíveis neste teste:

- **Erro Tipo I:** falso positivo (concluir que o tratamento funciona quando na realidade não funciona); erro mais perigoso em termos de interpretação dos resultados;
- **Erro Tipo II:** falso negativo.

Assumindo um *power* ( $\pi$ ) de 90% (valor típico), só haverá uma probabilidade de 10% de se concluir que não funciona quando na realidade funciona. Por outro lado o valor típico de probabilidade de ocorrência de erro do Tipo I ( $\alpha$ ) é 5%.

Considerando uma diferença significativa entre grupos de 25%, o tamanho da amostra depende do coeficiente de variação do teste (CV) sendo, no mínimo, de 5 animais por grupo para  $\sigma=10\%$ <sup>(124)</sup>.

A realização dos procedimentos descritos cumpriu todos os requisitos de esterilidade a fim de não influenciar os resultados. Foram respeitadas todas as directrizes de bem-estar do animal na realização de experiências em animais<sup>(124)</sup>.

- **Avaliação estatística dos testes *in vivo***

Para avaliar a significância estatística dos resultados *in vivo* obtidos com as diferentes matrizes foram realizados testes *t-Student* com a função *T.TEST* do *Microsoft Excel 2007*. Os testes foram aplicados para verificar se as diferenças de desempenho entre os grupos são significativas. Assim foram considerados testes unicaudal, ou seja, foi testado se o melhor desempenho de um grupo relativamente a outro é significativo. Para a comparação do desempenho global dos pensos com o controlo foi utilizando um teste *t-Student* emparelhado. Para comparar o desempenho das diferentes matrizes foram realizados testes não emparelhados homoscedásticos, pois os sujeitos sob observação são idênticos, sendo a variância esperada idêntica. Como já referido, foi considerado um  $\alpha$  de 0,05, o que corresponde a um intervalo de confiança de 95%.

### **3. Resultados e discussão**

#### **3.1. Quitosanos utilizados nos estudos de comparação de graus de desacetilação diferentes**

A Tabela 4.4 apresenta os resultados dos graus de desacetilação dos quitosanos produzidos a partir das reacções de acetilação e desacetilação descritas, assim como do quitosano original a partir do qual foram realizadas as reacções.

Tabela 4.4 - Grau de desacetilação dos três quitosanos utilizados nos estudos das matrizes porosas

Quitosano	Grau de Desacetilação
DD baixo (reacção de acetilação)	58,8%
DD médio ( <i>Chitopharm</i> <sup>®</sup> M, original)	74,0%
DD alto (reacção de desacetilação)	93,6%

### 3.2. Caracterização macroscópica das matrizes porosas para o tratamento de feridas

#### 3.2.1. Análise macroscópica

Pelo processo descrito foram obtidas matrizes de quitosano porosas para o tratamento de feridas. A heterogeneidade do produto final, que se tentou contornar durante a concepção e desenvolvimento do produto, é evidente na Figura 4.4. Durante o processo de pré-arrefecimento das soluções de quitosano na câmara do liofilizador foi possível notar que o congelamento da solução se dava da periferia dos moldes para o interior. Assim, os pontos de nucleação, a partir dos quais o processo de cristalização vai seguindo, formam-se na periferia. O facto de estes pontos de nucleação não estarem distribuídos uniformemente pela matriz leva a que o processo de congelamento não seja uniforme; à medida que a temperatura desce, a água cristaliza preferencialmente junto a estes pontos, ocorrendo uma deslocação de moléculas de água para promover o crescimento do núcleo de cristalização, aumentando progressivamente a concentração de cristais nessa zona<sup>(125)</sup>.



Figura 4.4 – Fotografia de uma matriz de quitosano liofilizada produzida a partir de uma solução de concentração 3% (m/v) em ácido acético

Esta morfologia é inerente ao processo de liofilização. A utilização de moldes mais pequenos e maior área de contacto com a prateleira do liofilizador (superfície através da qual se dá a remoção de calor durante o pré-arrefecimento) permite obter matrizes mais uniformes (por o gradiente de heterogeneidade ser menos perceptível). Para os testes aqui descritos as matrizes foram efectivamente produzidas em moldes mais pequenos, levando a amostras com menos fissuras e textura menos heterogénea.

Quanto à espessura do produto final verificou-se que depende da densidade deste, ou seja, da concentração em quitosano da solução inicial utilizada na sua produção. A Tabela 4.5 apresenta o resumo das espessuras da matriz em função da concentração de quitosano na solução inicial, e assim da densidade.

Tabela 4.5 - Espessura média das matrizes em função da densidade desta, sendo P1 a densidade mais baixa estudada, P2 a intermédia e P3 a mais alta

Designação da matriz	Concentração de quitosano na solução inicial (m/m)	Densidade (g·cm <sup>-3</sup> )	Espessura média (mm)
P1	0,5%	5,13x10 <sup>-2</sup>	0,67
P2	2%	4,08x10 <sup>-2</sup>	1,89
P3	3%	5,99x10 <sup>-2</sup>	2,98

Dado que a quantidade de solução por molde foi exactamente a mesma, seria de esperar que o volume, e consequentemente a espessura, das matrizes fosse muito semelhante. No entanto verifica-se uma diferença entre os valores de espessura das várias matrizes, o que se deverá a um colapso da estrutura durante o processo de produção. Este colapso ocorre após o processo de liofilização e influencia as medições de espessura realizadas e consequentemente a alterações na determinação da densidade.

### 3.2.2. Análise microscópica: porosidade, tamanho de poro médio e distribuição de tamanho de poro

Foram recolhidas imagens por SEM, segundo o protocolo descrito no Capítulo II de matrizes liofilizadas com diferentes concentrações de polímero na solução inicial. As imagens exemplificativas da morfologia de cada uma das matrizes obtidas estão compiladas na Figura 4.5.

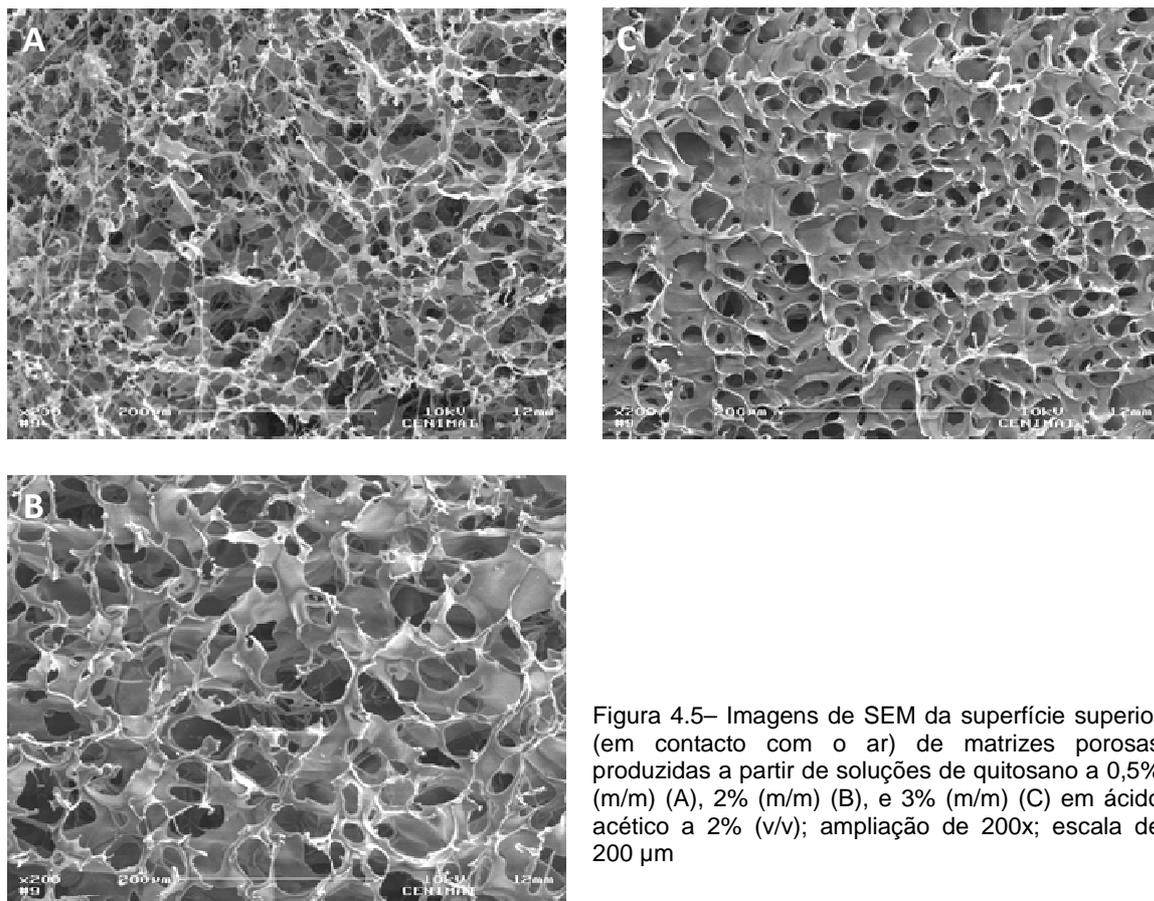


Figura 4.5– Imagens de SEM da superfície superior (em contacto com o ar) de matrizes porosas produzidas a partir de soluções de quitosano a 0,5% (m/m) (A), 2% (m/m) (B), e 3% (m/m) (C) em ácido acético a 2% (v/v); ampliação de 200x; escala de 200 μm

Na Figura 4.5 é evidente a variação do tipo de porosidade à medida que a concentração de quitosano é alterada. Na matriz formada a partir de uma solução com concentração de 0,5% (m/m) de quitosano em solução a porosidade observada não é composta por poros redondos e regulares, mas sim por um rendilhado de polímero, com as paredes muito finas. O aumento da concentração do polímero para 2% (m/m) leva à formação de uma matriz com paredes mais espessas. A matriz produzida a partir da concentração de 3% (m/m) apresenta poros esféricos evidentes. O aumento da concentração de polímero influencia a matriz porosa final no sentido em que, durante a precipitação do polímero no processo de congelamento do solvente, este será concentrado entre os cristais formados. Assim, quanto maior for a quantidade de polímero em solução maior será a quantidade de polímero na estrutura final, concentrando-se nas zonas entre poros, originando assim uma espessura de paredes tanto maior quanto maior a quantidade de polímero inicial.

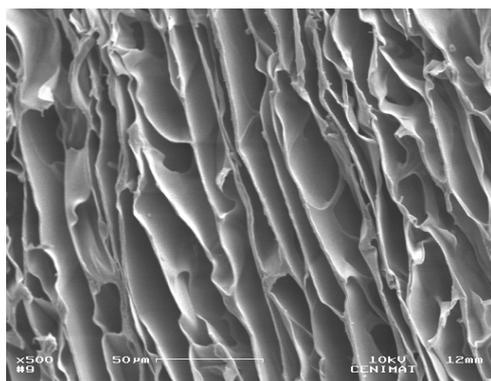
Por observação das imagens obtidas e apresentadas na Figura 4.5 é possível compreender a evolução da interconectividade dos poros nas matrizes. Efectivamente, o aumento da concentração de polímero leva a um aparente decréscimo acentuado na interconectividade. A concentração de 0,5% (m/m) de quitosano demonstra uma interconectividade muito elevada, ao passo que para a concentração mais elevada aqui analisada a interconectividade aparente é inferior. Assim, a conectividade entre poros, tal como a porosidade, é influenciada pela

concentração de polímero na solução inicial, sendo que concentrações maiores produzem matrizes com interconectividade menor<sup>(52)</sup>.

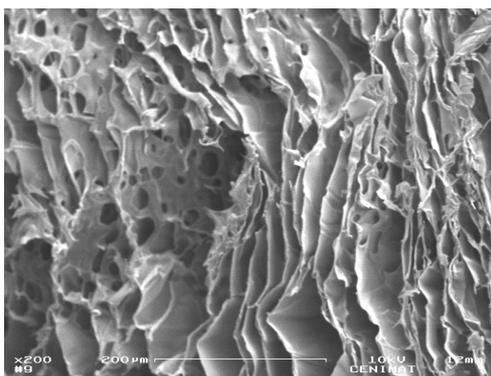
Resumindo, o aumento de concentração de polímero na solução inicial leva a um aumento da espessura das paredes dos poros e a uma alteração progressiva da morfologia da matriz. Parte de uma estrutura rendilhada, até atingir uma estrutura de poros esféricos, com efeito também na interconectividade, que diminui com o aumento da concentração de polímero, dentro da gama estudada<sup>(52,116)</sup>.

Estas considerações foram retiradas todas a partir da observação por SEM da superfície da matriz. Tornou-se assim importante analisar a morfologia interna das matrizes de forma a compreender a estrutura das matrizes também neste eixo.

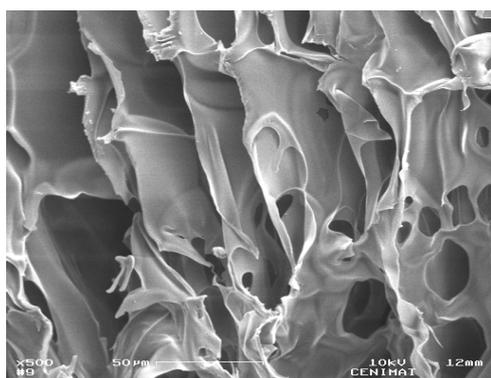
Para a matriz liofilizada produzida a partir de uma solução de quitosano à concentração de 3% (m/m) foram recolhidas imagens de microscopia electrónica da secção da matriz a diferentes níveis; essas imagens são apresentadas na Figura 4.6.



Secção de matriz porosa junto ao topo; ampliação de 500x, escala de 50 μm



Secção de matriz porosa a meio da matriz; ampliação de 200x, escala de 200 μm



Secção de matriz na base da secção da matriz; ampliação de 500x, escala de 50 μm

Figura 4.6 - Esquema de distribuição de imagens recolhidas na secção de uma matriz liofilizada a partir de uma solução de quitosano com concentração de 3% (m/m)

O tipo de morfologia identificada nas três zonas é bastante semelhante. Verifica-se a presença de poros de forma alongada e perpendiculares à base da matriz, interconectados através de aberturas/poros secundários formados na sua parede.

Através das imagens recolhidas é possível observar o descrito neste capítulo: durante o processo de liofilização das matrizes ocorre a formação de cristais do solvente, levando à insolubilidade/precipitação do polímero. Estas imagens são também bem representativas da formação de poros orientados no interior da matriz, como consequência da cristalização, com ligeiras alterações de morfologia ao longo da matriz, causada pela proximidade da camada da superfície de arrefecimento.

O tamanho de poro é dependente do crescimento dos cristais de gelo, que por sua vez é dependente do gradiente de temperatura ao longo da espessura da matriz, o que explica a

variação do tamanho dos poros nesta direcção (em secção perpendicular), sendo cada vez maiores à medida que se afastam da superfície de contacto com a prateleira onde se dá o arrefecimento<sup>(52)</sup>.

Madihally *et al.*<sup>(52)</sup>, demonstraram que efectivamente é possível controlar o tamanho de poros (dentro de certos limites) em matrizes de quitosano produzidas por liofilização variando a temperatura de arrefecimento e, conseqüentemente, a taxa de arrefecimento. A concentração de polímero, por seu lado, demonstrou ter uma influência menor no tamanho de poro, tendo-se verificado que para concentrações superiores se obtinham poros mais pequenos.

A orientação dos poros depende da superfície de arrefecimento. Madihally *et al.*<sup>(52)</sup>, produziram uma matriz porosa de forma cilíndrica e observaram a formação de poros com orientação radial, quando a superfície responsável pelo arrefecimento estava no perímetro. Neste caso o arrefecimento é radial, o que justifica a orientação dos poros observada. No caso de uma matriz planar igualmente estudada, em que a superfície de arrefecimento correspondia a uma das faces, observaram a formação de poros orientados perpendicularmente à mesma e de parede fina, bastante uniformes, de secção poligonal, e com interconectividade baixa. Esta orientação de poros deve-se, numa explicação apontada por Madihally *et al.* ao crescimento dos cristais de gelo, condicionados fortemente pelo gradiente térmico unidireccional estabelecidos durante o arrefecimento.

A variação do tamanho e forma dos poros e da sua conectividade ao longo de um plano de secção perpendicular à face de arrefecimento é explicada por Madihally *et al.* pela existência de duas fases distintas de nucleação do gelo: uma na interface entre o recipiente e a solução, e uma segunda na interface gelo-solução. A interconectividade entre os poros orientados deve-se principalmente à ocorrência de “rompimentos” na fase de polímero segregada durante a cristalização por acção dos próprios cristais. Assim, no caso de uma matriz plana, com um gradiente de arrefecimento unidireccional a probabilidade de tal ocorrer é bastante baixa.

A existência de diferentes fases de nucleação, por variação do tipo de interfaces ao longo do processo de arrefecimento, explica os resultados apresentados no estudo deste trabalho.

Foram determinadas as porosidades relativas para as matrizes utilizadas nos testes *in vivo* e *in vitro*, e que se encontram descritas na Figura 4.2. Os resultados obtidos são apresentados na Tabela 4.6.

Tabela 4.6 - Valores de porosidade relativa para as várias matrizes utilizadas; média±desvio padrão

	P1	P2	P3
D1		(98,1±0,1)%	
D2	(96,4±0,4)%	(97,1±0,4)%	(95,8±0,2)%
D3		(96,5±0,2)%	

Como se pode concluir pela análise dos valores de porosidade relativa, todas as matrizes utilizadas são muito porosas (acima de 95%). A sua porosidade é bastante próxima, com variações dentro do erro experimental. Verifica-se que o aumento de concentração de quitosano na solução inicial de 2% (P2) para 3% (m/m) (P3) origina matrizes tendencialmente menos porosas. No caso da matriz P1, embora a concentração de quitosano seja menor, a porosidade relativa determinada é inferior à da P2 devido à contracção da estrutura por apresentar poros com paredes mais finas e frágeis, como observado na Figura 4.5-A. O colapso da matriz leva a uma diminuição da espessura da matriz, que tem um valor médio de 0,67 mm (valores apresentados na Tabela 4.5), pelo que a sua porosidade fica afectada pela diminuição do volume da matriz.

### **3.2.3. Caracterização química das matrizes porosas e influência do processo de esterilização**

Foram realizados testes de FTIR para caracterizar quimicamente a matriz liofilizada de quitosano. O objectivo desta análise era confirmar a sua composição, o que foi realizado por comparação com o espectro da matéria-prima.

Tal como já referido, o método de esterilização adoptado foi a radiação gama, um dos métodos de esterilização mais comuns nos dispositivos médicos. No entanto é um processo que, para muitos produtos, não é inócuo provocando alterações na sua estrutura química e por vezes mesmo nas suas propriedades mecânicas. Assim, foi obtido o espectro de FTIR para o mesmo produto mas na sua versão final, após irradiação, para determinar se ocorriam alterações químicas quer ao nível de reticulação como de oxidação por efeito da radiação. Os espectros deste estudo encontram-se representados na Figura 4.7.

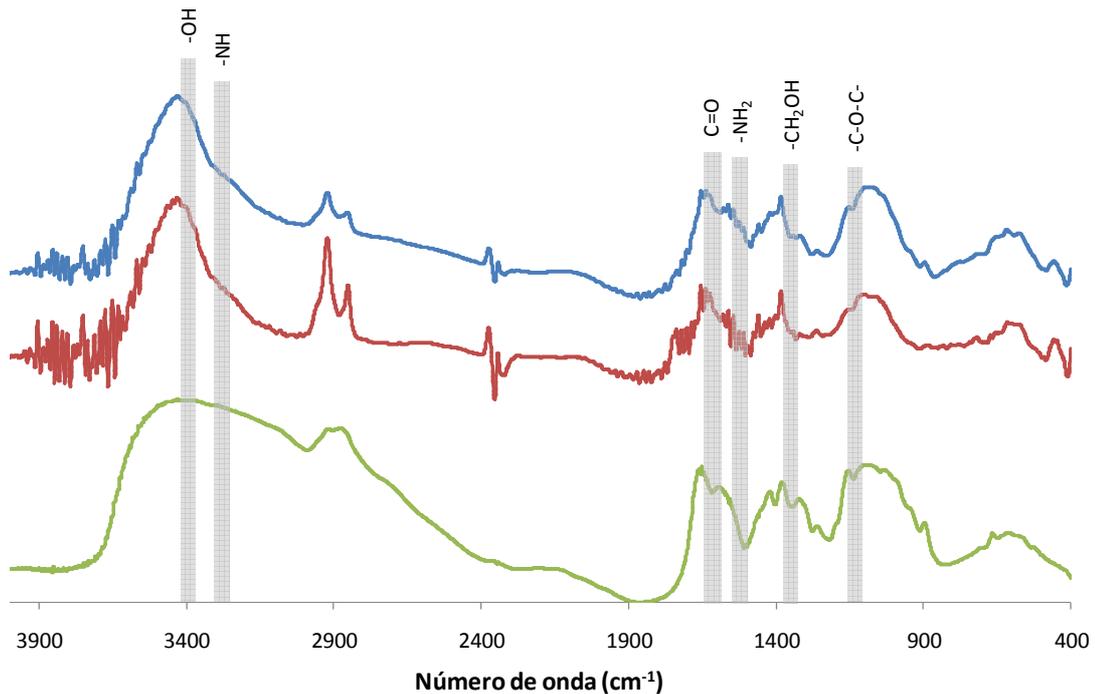


Figura 4.7- Gráfico de caracterização por FTIR de quitosano (—), matriz liofilizada antes de irradiação (—) e matriz liofilizada após irradiação (—)

Nos espectros de FTIR do quitosano, da matriz liofilizada e da matriz irradiada observam-se as bandas típicas do quitosano: vibração dos grupos hidroxila a  $3439\text{ cm}^{-1}$  e de aminas a  $3300\text{ cm}^{-1}$  (estas bandas podem não ser facilmente distinguíveis devido à presença de água que é observada nessa zona); a  $1655\text{ cm}^{-1}$  correspondente ao modo vibracional de extensão do grupo  $\text{C}=\text{O}$ ;  $1560\text{ cm}^{-1}$  ao modo vibracional de flexão da ligação  $-\text{NH}_2$ ;  $1381\text{ cm}^{-1}$  ao modo vibracional de extensão dos grupos álcool;  $1152\text{ cm}^{-1}$  correspondente à ligação entre os monômeros do quitosano  $-\text{C}-\text{O}-\text{C}-$  <sup>(49)</sup>. Nos espectros de FTIR da matriz liofilizada e da matriz irradiada não são visíveis picos atribuíveis a novas ligações químicas resultantes dos processos de liofilização e esterilização. Conclui-se assim que o processo de produção proposto não altera a estrutura molecular do quitosano, resultado que era esperado dado que a composição de partida é apenas quitosano e solvente, removido durante a liofilização e que a matriz liofilizada e esterilizada é composta por quitosano, equivalente à matéria-prima pois na sequência da irradiação também não foram detectadas alterações nos espectros de FTIR <sup>(122)</sup>.

### 3.2.4. Propriedades mecânicas das matrizes porosas

As propriedades mecânicas das matrizes liofilizadas foram analisadas pela realização de testes de tração segundo o método descrito no Capítulo II. Foram recolhidas amostras do produto numa forma aleatória a partir de matrizes de diferentes lotes de produção, de forma a diminuir o enviesamento amostral.

A dispersão dos valores obtidos para este teste está representada na Figura 4.8.

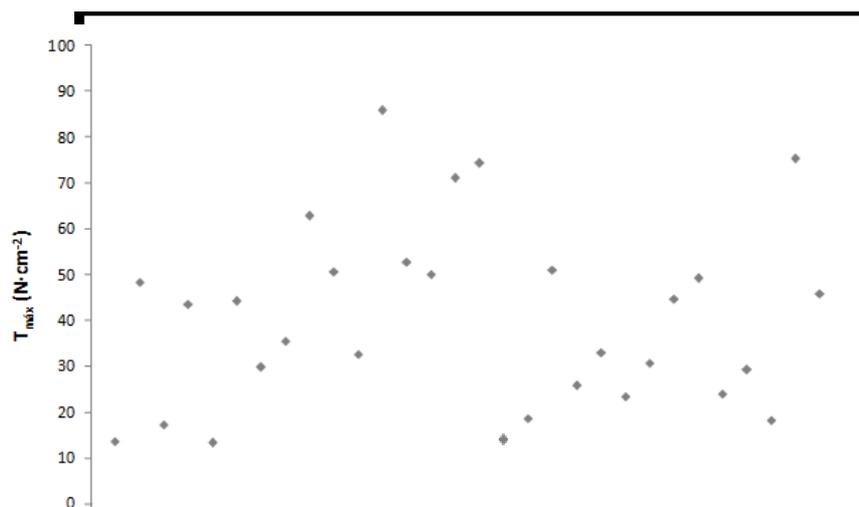


Figura 4.8 - Valores de tensão máxima ( $T_{max}$ ) obtidos para 30 amostras de matrizes liofilizadas a partir de uma solução de quitosano a 3% (m/m)

Cada amostra foi testada quanto à tensão máxima, tendo sido obtidos os valores apresentados na Figura 4.8. Como se pode observar há uma grande dispersão de resultados, entre cerca de 10 e 90  $N \cdot cm^{-2}$ , em que 50% dos valores obtidos encontram-se entre 10 e 40  $N \cdot cm^{-2}$ , e os outros 50% acima de 40  $N \cdot cm^{-2}$  e abaixo 90  $N \cdot cm^{-2}$ . Esta variação deve-se principalmente à heterogeneidade das matrizes, já discutida, originando que umas amostras tenham fissuras perpendiculares à direcção da força de tracção e outras paralelas, levando a resultados muito díspares. Por este teste não é possível quantificar uma tensão máxima característica de cada matriz. Porém, pelo manuseamento destas, verifica-se que a resistência, tanto em estado seco como hidratado, é a suficiente para a sua aplicação clínica. Conclui-se assim que as suas propriedades mecânicas são adequadas e que os valores de resistência mecânica apresentados deverão garantir produtos aptos para o uso pretendido.

O processo de esterilização pode influenciar a resistência mecânica das matrizes pela promoção de reticulação entre cadeias, aumentando assim a resistência à tracção, ou diminuindo a mesma pela destruição de ligações por processos de cisão na cadeia principal do polímero<sup>(126)</sup>. Assim, foram realizados testes de tracção a matrizes do mesmo lote de produção antes e depois de irradiadas, cujos resultados se encontram na Figura 4.9.

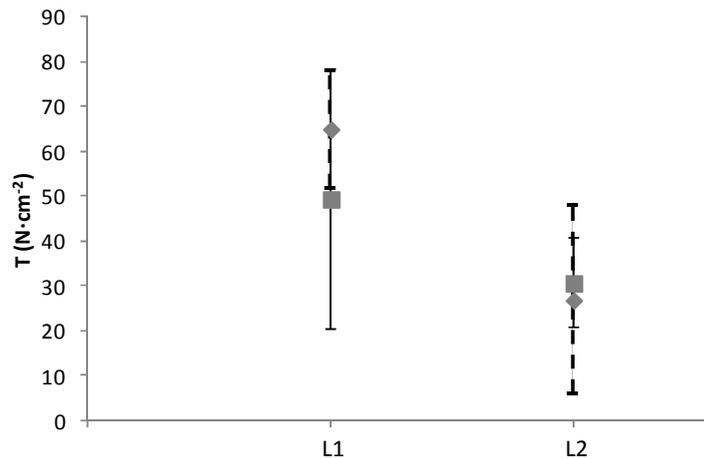


Figura 4.9 - Comparação de tensão de pensos porosos antes e após irradiação a 25 kGy em 2 lotes de produção diferentes, L1 e L2; (◆) – pré irradiação; (■) – pós irradiação

Os dois lotes testados não mostram alterações estatisticamente significativas na resistência mecânica das matrizes após esterilização. Estes resultados indicam que não ocorre nenhum dos possíveis fenómenos de alteração de propriedades mecânicas por efeito da esterilização descritos. Esta conclusão é confirmada pelo manuseamento das matrizes antes e pós irradiação, que se apresenta semelhante em termos de resistência.

### 3.2.5. Taxa de absorção das matrizes liofilizadas

A capacidade de a matriz porosa absorver soro fisiológico na sua estrutura foi estudada segundo o descrito. Os valores apresentados na Figura 4.9 correspondem à relação entre o peso da matriz mais o soro embebido na matriz, registado quando se verificou a estabilização da quantidade de líquido absorvido, com o peso da matriz seca.

Tabela 4.7 - Capacidade de absorção das matrizes liofilizadas em número de vezes em relação ao seu peso seco, calculado segundo a Equação 4.1; média±desvio padrão

	P1	P2	P3
D1		25,7±1,8	
D2	13,4±1,9	22,8±1,0	14,4±0,6
D3		19,2±2,2	

As matrizes com porosidade intermédia revelaram-se ser as com maior capacidade de reter o líquido na sua estrutura. Analisando os valores para o mesmo grau de desacetilação verifica-se que, tanto para a porosidade mais baixa como para a mais elevada os valores de rácio de peso são cerca de 1,6 vezes inferiores aos de porosidade média. A matriz de menor porosidade relativa (ver Tabela 4.6) P3, ou seja, com uma densidade superior e também com poros de menor diâmetro, terá uma capacidade de integrar líquidos na sua estrutura nos espaços vazios inferior. Tal verificou-se no decorrer da experiência, em que a matriz demorou mais tempo até se tornar totalmente translúcida (sinal de ter absorvido líquido) e ter demorado mais tempo que as outras matrizes a estabilizar o peso correspondente à saturação da matriz em soro fisiológico.

Por outro lado, a estrutura produzida a partir de uma solução com concentração inferior (P1), apesar de ter uma porosidade superior, tem uma estrutura mais frágil, com paredes intersticiais mais frágeis e descontínuas, tal como já foi discutido, levando a que a capacidade de integrar e manter o líquido na sua estrutura fique comprometida.

Os resultados da Tabela 4.7 indicam ainda a existência de uma relação entre a capacidade de adsorver soro fisiológico na sua estrutura e o grau de desacetilação. Quanto maior o grau de desacetilação, para o mesmo nível de porosidade, menor a capacidade de manter um líquido na sua estrutura. Isto está relacionado com a menor porosidade que se observa com o aumento do grau de desacetilação.

### 3.3. Caracterização *in vitro* das matrizes porosas para o tratamento de feridas

#### 3.3.1. Citotoxicidade de matrizes liofilizadas (24h, 3T3) e proliferação (72h, 3T3)

Durante o desenvolvimento de um dispositivo médico é necessário averiguar os possíveis efeitos nocivos deste nos tecidos. Um dos métodos para tal é a realização de testes *in vivo* com culturas celulares. Mesmo estando já demonstrado que o quitosano, independentemente do grau de desacetilação, não apresenta qualquer citotoxicidade, é necessário estudar se o dispositivo resultante da transformação e manipulação do quitosano apresenta citotoxicidade<sup>(127)</sup>.

Os testes foram realizados pelo método de contacto directo segundo o protocolo apresentado, utilizando a linha celular 3T3 com o kit CCK-8. Os resultados de viabilidade relativa obtidos estão apresentados na Tabela 4.8.

Tabela 4.8 - Valores de viabilidade celular relativa (calculado segundo a Equação 2.2) para as diferentes matrizes porosas sob estudo; viabilidade celular de controlo de células 100%

	P1	P2	P3
D1		13,6%	
D2	24,4%	15,3%	23,1%
D3		14,6%	

Analisando os resultados da Tabela 4.8 verifica-se que todas as matrizes apresentam valores de viabilidade celular relativa compreendidos entre 14% e 24%. São valores de viabilidade baixos e inferiores a 70% que é o valor de referência da norma ISO 10993 abaixo do qual o material se considera citotóxico.

Ao prolongar o teste para 72 horas, ou seja, realizando um teste de proliferação com a mesma linha celular e utilizando o mesmo método de quantificação de número de células, obtiveram-se os resultados apresentados na Figura 4.10.

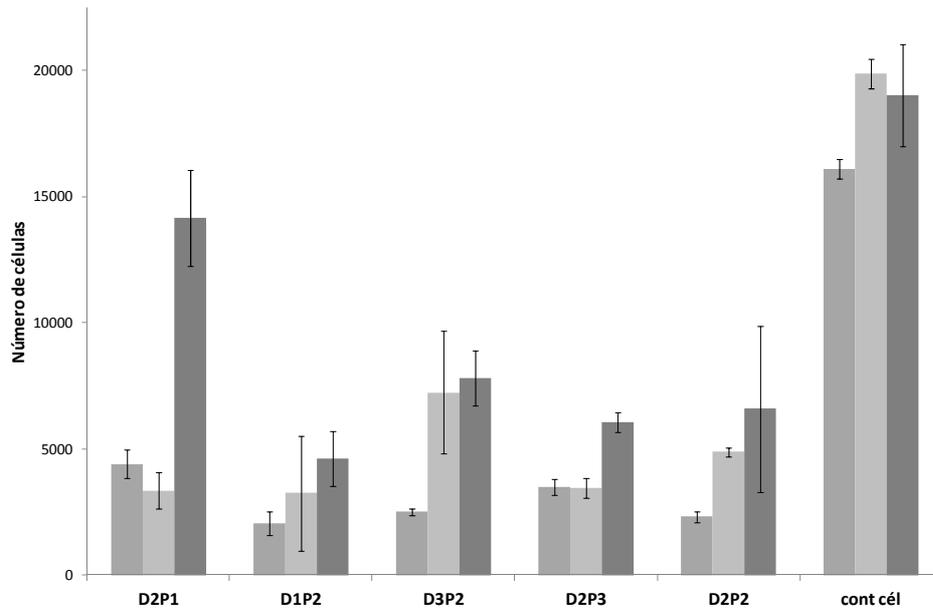


Figura 4.10 - Gráfico da evolução do número de células ao longo do teste de proliferação com células 3T3 por contacto directo para 24h (■), 48h (▨) e 72h (▩), sobre as matrizes em estudo e sem material adicionado (controlo de células)

Com estes dados é possível calcular uma taxa de proliferação da população celular registada ao fim de 72 horas de cultura face à registada ao fim de 24 horas. Esta taxa permite retirar conclusões sobre a capacidade de ocorrer crescimento celular num período mais alargado, de uma forma quantitativa. Os valores obtidos para as várias matrizes sob estudo estão registados na Tabela 4.9.

Tabela 4.9 - Taxa global de proliferação celular, em células·h<sup>-1</sup>, para as diferentes matrizes sob estudo utilizando a linha celular 3T3, para 72 horas; controlo de células com valor de 60,9 cél·h<sup>-1</sup>

	P1	P2	P3
D1		53,5	
D2	202,9	89,2	53,8
D3		110,5	

Analisando os resultados de crescimento celular por 72 horas verifica-se que em todos os casos há crescimento celular. Isto indica que as matrizes não inibem o crescimento celular. Os baixos valores de viabilidade celular inicial poderão traduzir citotoxicidade do produto ou uma baixa adesão celular inicial. Os valores de taxa global de proliferação celular indicam que o produto não será citotóxico dado que há crescimento celular na presença do produto. Tendo em conta a taxa global de crescimento celular conclui-se que para todas as matrizes o crescimento é semelhante ou superior ao observado no controlo.

Dado que o teste foi realizado por contacto directo, ou seja, as células depositaram-se sobre as matrizes colocadas no fundo do poço, e os resultados foram comparados com o controlo de células, em que as células se depositaram directamente no fundo do poço, é preciso considerar a possibilidade de existir uma causa física de inibição de adesão celular por parte do produto. O

## Produção de Matrizes à Base de Quitosano para o Tratamento de Feridas

fundo dos poços das placas utilizadas para este teste é sujeito a um tratamento para promover a adesão celular, ao passo que a matriz poderá não representar o meio físico ideal para a adesão celular pela sua rugosidade e poucos pontos de ancoragem para as células. Isto leva a que ocorra uma redução significativa inicial da viabilidade celular relativa, que contabiliza o número de células viáveis, ou seja, que foram capazes de aderir a uma superfície. No entanto, o facto de após este decréscimo inicial as células serem capazes de proliferar indica que o meio onde se encontram não é adverso à sua viabilidade e que a matriz representa suporte suficiente para essa proliferação. Isto indica que não há citotoxicidade induzida pela presença da matriz liofilizada.

A matriz que apresenta melhor taxa de proliferação é a D2P1, e para o mesmo grau de desacetilação esta taxa decresce à medida que a densidade da matriz aumenta. Estes resultados indicam que a porosidade mais adequada, entre as estudadas, é a correspondente à densidade de matriz mais baixa. Estas matrizes, tal como discutido no estudo da sua morfologia, têm paredes mais finas e maior volume de espaços intersticiais. A maior porosidade oferece mais espaço às células para penetrar na matriz, compensando o facto de não ter paredes de poros tão robustas e com tanta área como as matrizes mais densas. A penetração das células na matriz foi observada em microscopia confocal ao serem focados diferentes planos em profundidade. A dependência da taxa de proliferação com a porosidade está apresentada na Figura 4.11.

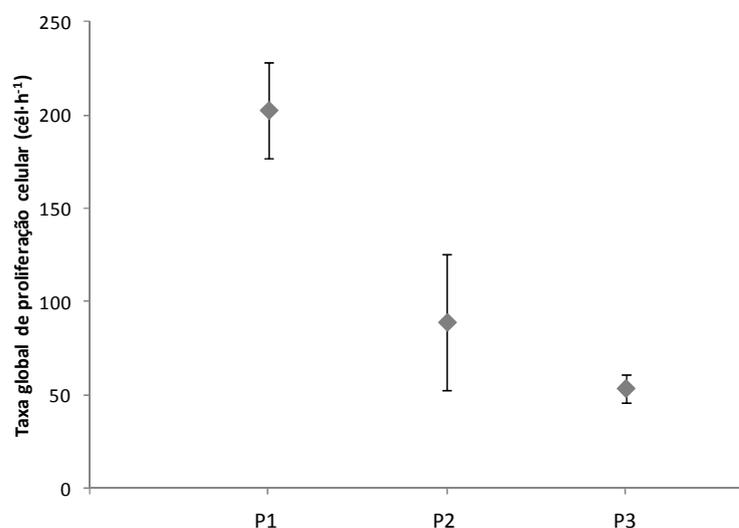


Figura 4.11 - Dependência da taxa de proliferação com a porosidade das matrizes liofilizadas, para um mesmo grau de desacetilação de quitosano

Referindo novamente aos valores de taxa global de proliferação, Tabela 4.9, verifica-se a sua dependência do grau de desacetilação do quitosano da matriz. Ou seja, ocorre um decréscimo da taxa de proliferação com a diminuição do grau de desacetilação, para um grau de porosidade constante. Este facto vai de encontro ao descrito na bibliografia, em que é referida a dependência da proliferação celular da afinidade do tipo de célula sob teste ao quitosano<sup>(127,128)</sup>.

A principal característica do quitosano que condiciona a afinidade celular, e assim a percentagem de células aderidas, é o seu grau de desacetilação, sendo que quanto maior o grau de desacetilação, maior a adesão celular. Mesmo a pH 7 estão presentes grupos catiónicos  $-\text{NH}_3^+$  na molécula de quitosano. Por outro lado a membrana celular apresenta cargas negativas na sua superfície, permitindo a interacção electrostática matriz-célula (54). O grau de desacetilação do quitosano utilizado na produção das matrizes influencia a adesão celular uma vez que, quanto mais desacetilada a molécula se encontrar maior densidade de cargas positivas vai existir, e assim maior a possibilidade de interacções célula-matriz e maior a promoção de adesão celular. No entanto este efeito poderá ser mais ou menos evidente dependendo do tipo de célula, pois determinados tipos de células podem apresentar uma densidade de cargas negativas na sua membrana do que outros. Um exemplo de tal diferença de adesão é a entre os fibroblastos e os queratinócitos, que se deve provavelmente à diferença de cargas na superfície da membrana entre as duas células, sendo os fibroblastos mais negativos, chegando a ser duas vezes superior à de queratinócitos<sup>(127,129,130,131)</sup>. Chatelet *et al.*<sup>(127)</sup> obtiveram resultados que demonstram uma adesão celular de fibroblastos em quitosano bastante elevada, mas taxas de proliferação baixas, e sugerem que os fracos resultados ao nível da proliferação podem ser explicados pela alta adesão celular, o que irá inibir a proliferação. A dependência da taxa de proliferação com o grau de desacetilação para as matrizes estudadas está apresentada na Figura 4.12.

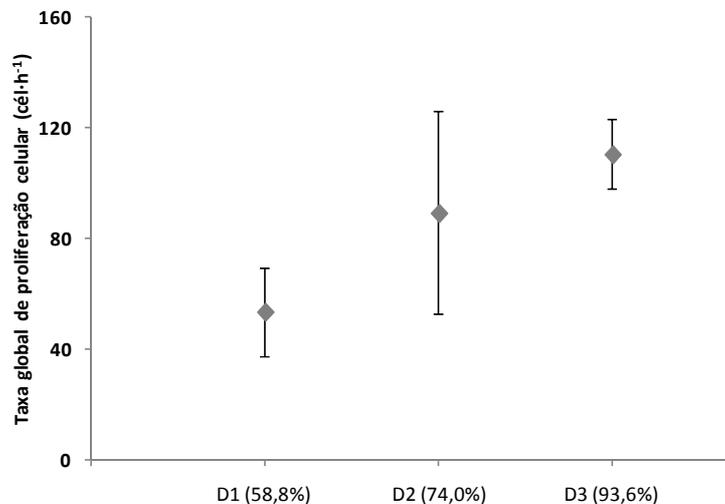


Figura 4.12 - Dependência da taxa de proliferação com o grau de desacetilação das matrizes liofilizadas

Os resultados apresentados na Figura 4.10 e na figura anterior demonstram que tanto a adesão inicial, como a taxa de proliferação, são promovidas por graus de desacetilação superiores. Estes resultados estão de acordo com os estudos anteriormente desenvolvidos com proliferação celular em matrizes de quitosano. Ao contrário do obtido por Chatelet *et al.*<sup>(127)</sup> e por Wang *et al.*<sup>(132)</sup>, a maior adesão celular não inibiu a taxa de proliferação; esta discrepância pode ser explicada pela utilização de linhas celulares diferentes.

### 3.3.2. Morfologia celular em matrizes liofilizadas

Para analisar a proliferação dos fibroblastos, foram realizadas análises por microscopia confocal para observação da morfologia das células. A morfologia dos fibroblastos semeados sobre uma matriz porosa de quitosano pode variar conforme a zona da matriz a que as células aderiram. Foi descrito por Ma *et al.*<sup>(109)</sup>, que a morfologia de fibroblastos neofetais depende da zona a que estes aderem. Quando no fundo plano de um poro, os fibroblastos adoptam uma forma achatada. No entanto, adoptam uma forma esférica em zonas com menor suporte para adesão, tal como a periferia de poros<sup>(109)</sup>. A mesma diferença de morfologia celular quando cultivadas em matrizes porosas de quitosano foi observada por Wang *et al.*<sup>(133)</sup>. Ao cultivar células estaminais neuronais verificou que estas adoptavam uma forma esférica, na sua maioria, contrariamente à típica alongada e achatada destas células. Esta esfericidade das células deve-se provavelmente à rugosidade e irregularidade da superfície<sup>(133)</sup>. Além da topologia do material, também a composição do material condiciona a adesão celular à estrutura, tanto ao nível da adsorção de proteínas como da afinidade celular<sup>(127,133)</sup>.

A morfologia celular das células cultivadas na matriz porosa é apresentada na Figura 4.13.

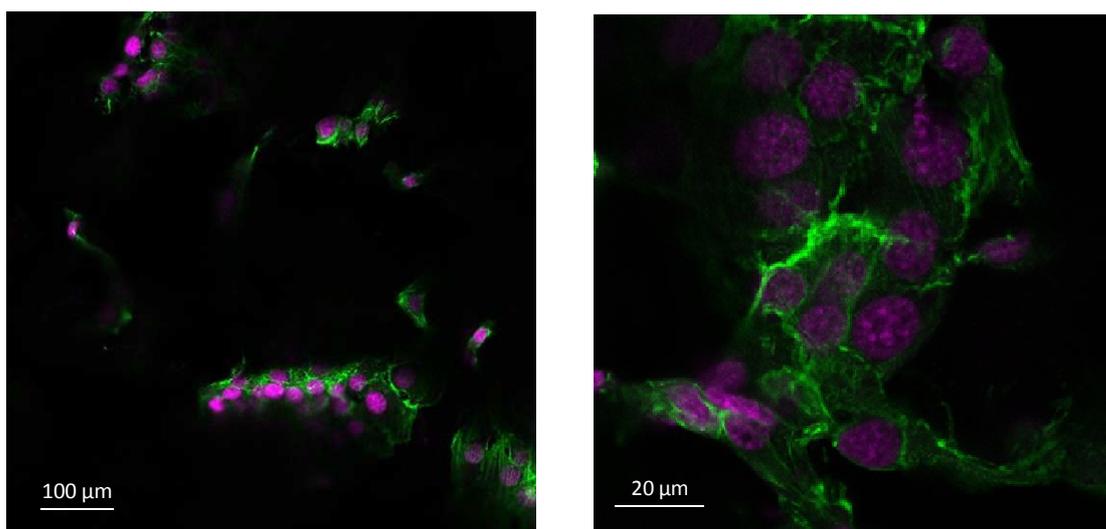


Figura 4.13 - Morfologia dos fibroblastos proliferados por 72 horas na matriz D3P2, avaliada por microscopia confocal; o núcleo e a membrana celular foram marcados e apresentam um tom roxo e verde respectivamente

Os fibroblastos apresentados na Figura 4.13 encontram-se aderidos à matriz porosa de quitosano, apresentando uma morfologia compatível com proliferação celular. As células apresentam-se agrupadas e com uma morfologia característica deste tipo de fibroblastos, compatível com adesão celular.

A migração de células em profundidade na matriz, observada por microscopia confocal ao serem focados diferentes planos, indicam que a estrutura e porosidade são adequadas à penetração deste tipo de células. A migração celular dentro de uma matriz destinada à regeneração de

feridas é um factor crucial para o seu sucesso. A permeabilidade de uma matriz às células do tecido circundante é o primeiro passo na formação de neodermis<sup>(134)</sup>.

Os resultados de morfologia estão dentro do expectável para uma matriz porosa que promova a crescimento celular, e confirmam os resultados obtidos de proliferação celular: a matriz liofilizada de quitosano promove a adesão e proliferação adequada de fibroblastos, sendo este um bom indicativo para o seu uso clínico.

### 3.4. Caracterização das matrizes porosas para o tratamento de feridas *in vivo*

#### 3.4.1. Procedimento de indução de ferida e tratamento

Tal como descrito nos Materiais e Métodos, foram realizadas em cada animal duas feridas: uma de controlo e outra de teste. Este procedimento é demonstrado na Figura 4.14.

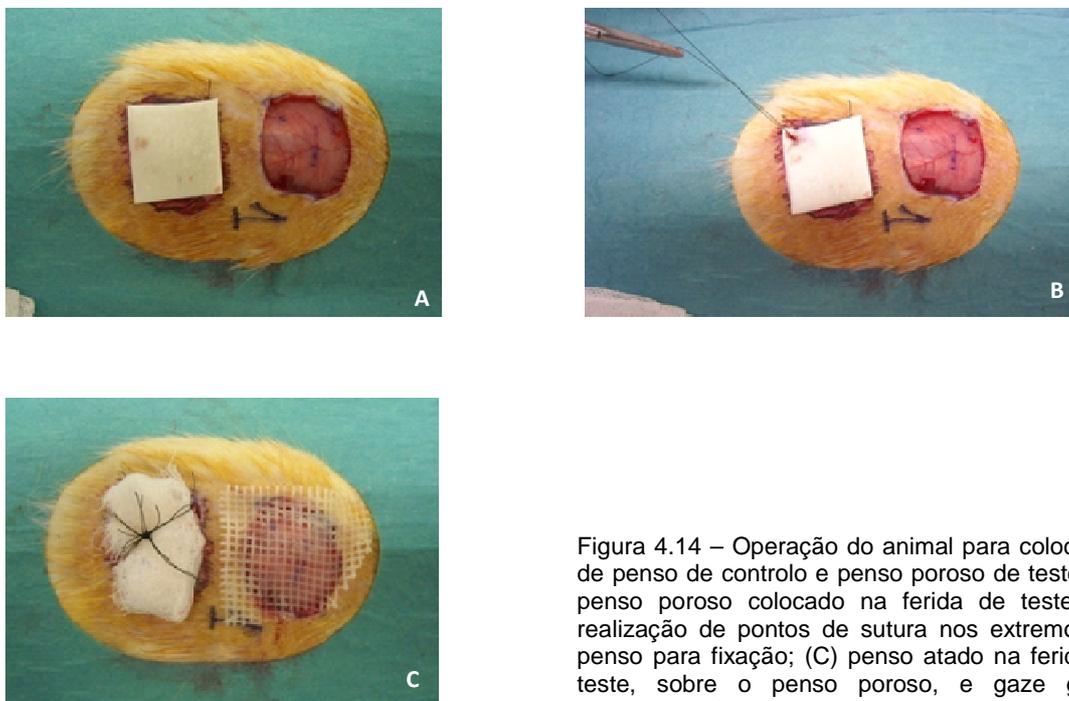


Figura 4.14 – Operação do animal para colocação de penso de controlo e penso poroso de teste; (A) penso poroso colocado na ferida de teste; (B) realização de pontos de sutura nos extremos do penso para fixação; (C) penso atado na ferida de teste, sobre o penso poroso, e gaze gorda colocada na ferida de controlo

No decorrer da experiência os animais foram regularmente monitorizados e nenhum apresentou sinais de sofrimento.

#### 3.4.2. Evolução da cicatrização de uma ferida de excisão total ao longo de 21 dias

Para avaliar a evolução da ferida ao longo do tempo foram utilizados 3 grupos de ratos aos quais foi aplicada a matriz D2P2. Os grupos foram eutanasiados a diferentes dias: 7, 14 e 21 e a evolução das feridas tratadas com o controlo e a matriz foram comparadas.

A evolução do tamanho de ferida está apresentada na Figura 4.15.

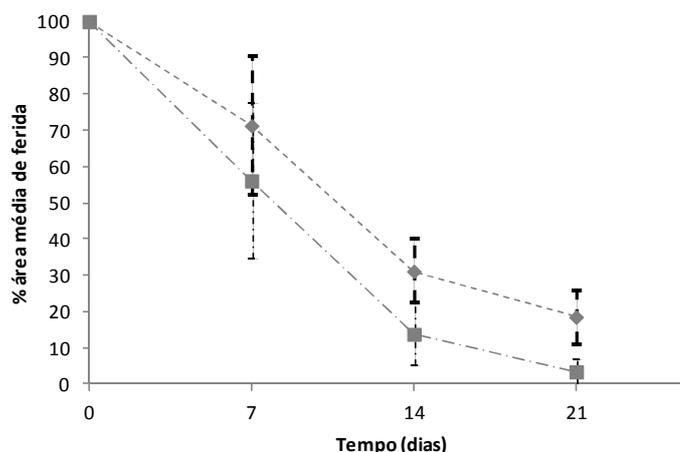


Figura 4.15 – Evolução da porcentagem de área média da ferida para o grupo de controle (◆) e para o grupo de teste (■) em que foi aplicado um penso P2D2 ao longo de 21 dias

Os dados apresentados na Figura 4.15 demonstram que a matriz porosa de quitosano tem um desempenho superior ao do controle no tratamento da ferida. Verifica-se que a zona por reepitelizar diminui mais rapidamente na ferida tratada com a matriz do que no controle. O aumento da velocidade de cicatrização reduz os problemas associados a uma ferida exposta às agressões exteriores. Ao fim de 21 dias, todas as feridas tratadas com a matriz porosa de quitosano estavam praticamente reepitelizadas (3% do tamanho inicial, com 4% de desvio padrão), enquanto as de controle ainda se apresentavam bastante atrasadas no processo de reepitelização (19% da área inicial, 8% de desvio padrão).

Estes dados confirmam que a utilização de matrizes porosas no tratamento de feridas ajuda no processo de reepitelização de feridas de espessura total, demonstrando tempos de cura mais rápidos do que utilizando um tratamento de feridas tradicional. O melhor desempenho das matrizes porosas deve-se à capacidade do penso de aderir facilmente e totalmente à ferida, e ter uma espessura e capacidade de absorção suficientes para manter a humidade e absorver o exsudado.

### 3.4.3. Influência das características das matrizes liofilizadas de quitosano no tratamento de feridas

A Figura 4.16 mostra imagens recolhidas logo após eutanásia dos animais e após remoção dos pensos para medição das feridas. É possível notar a diferença de área entre a ferida de controle e a de teste.

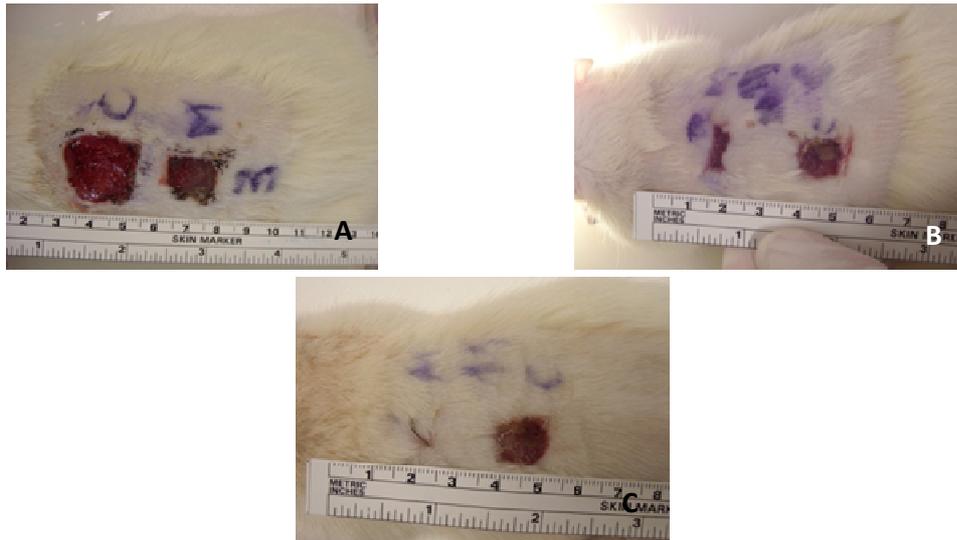


Figura 4.16 – Fotografias de ratos representativos dos grupos tratados com matriz de porosidade e grau de desacetilação intermédios (P2D2) ao fim de de 7 (A), 14 (B) e 21 (C) dias após operação; M: ferida teste, com matriz; C: ferida controlo

As áreas das feridas no final do período de teste, 21 dias, foram determinadas para cada animal incluído nos vários grupos. A Figura 4.17 permite analisar as áreas das feridas de controlo e teste para cada individuo.

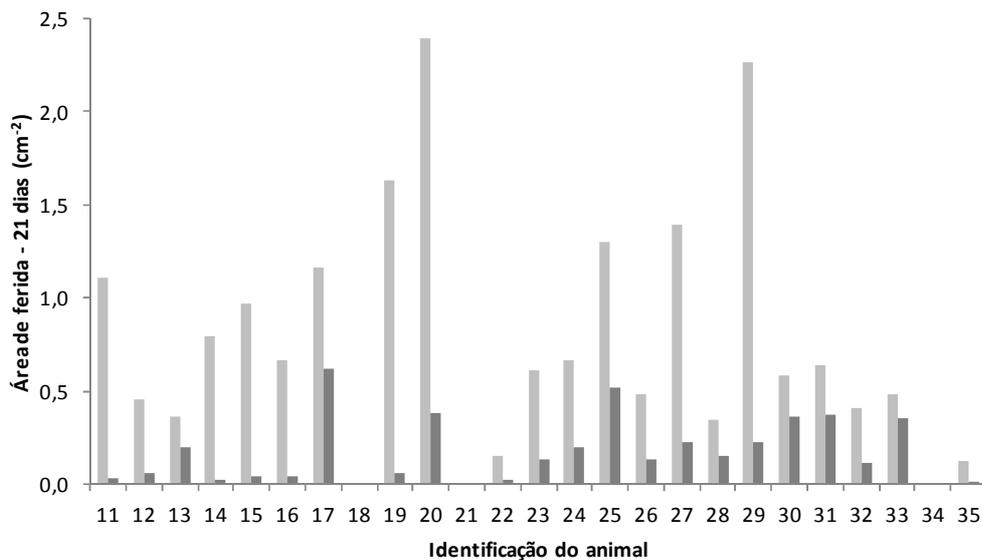


Figura 4.17 – Área das feridas ao final de 21 dias para o controlo (■) e teste (■) em todos os animais; ausência de informação para os animais que foram excluídos do estudo

A variação nas barras da ferida de controlo na Figura 4.17 corresponde à variabilidade inerente a este teste *in vivo*, dado que todas as feridas são equivalentes e aplicadas em animais equivalentes. As variações entre animais são significativas, o que demonstra a importância de normalizar a avaliação da área de teste por reepitelizar com o controlo, através do valor da percentagem de melhoria em relação ao controlo (Equação 4.3).

## Produção de Matrizes à Base de Quitosano para o Tratamento de Feridas

Pode-se verificar que, para todos os animais, a ferida de teste ao final de 21 dias apresentava uma área inferior à ferida de controlo. Foi testada a hipótese de as diferenças observadas entre os grupos de teste e de controlo serem equivalentes utilizando um teste de *t-Student* emparelhado. Foi obtido um valor P de  $1,24 \times 10^{-5}$ , muito inferior ao alfa de 0,05, confirmando estatisticamente que as matrizes porosas de quitosano são um meio adequado e com vantagens significativas em relação a meios tradicionais no tratamento deste tipo de feridas.

Os animais indicados acima correspondem a 5 grupos de teste aos quais foram aplicadas matrizes com características diferentes com o objectivo de otimizar o penso. Para cada animal foi determinada a melhoria da ferida em relação ao controlo, tendo sido obtidas as médias e desvios padrão para os 5 grupos distintos. Os valores médios de RAFC para os 5 grupos e os respectivos desvios padrões estão apresentados na Tabela 4.10.

Tabela 4.10 - Valores médios de percentagem de RAFC (média±desvio padrão) ao fim de 21 dias de teste para os 5 grupos testados

	P1	P2	P3
D1		(80±23)%	
D2	(73±10)%	(94±5)%	(59±31)%
D3		(68±21)%	

Os valores de RAFC em função da porosidade da matriz e do grau de desacetilação do quitosano utilizado estão apresentados na Figura 4.18 e Figura 4.19.

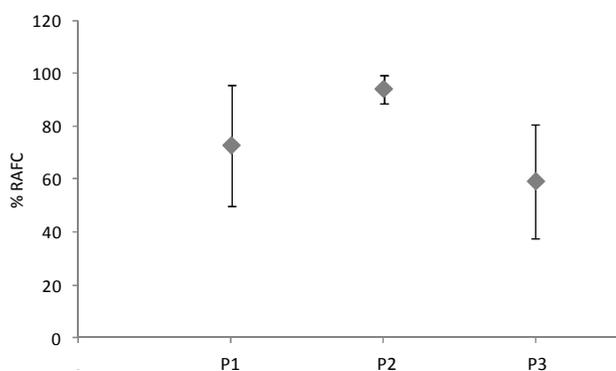


Figura 4.18 – Variação da percentagem de RAFC em função da porosidade da matriz de quitosano para o grau de desacetilação médio (D2) ao fim de 21 dias de teste

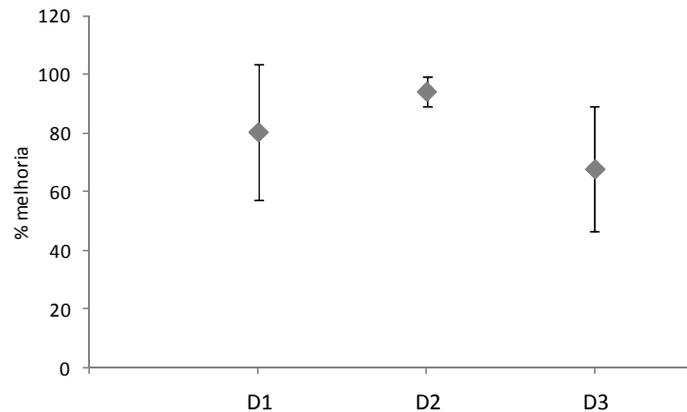


Figura 4.19 – Variação da % RAFC em função do grau de desacetilação do quitosano da matriz para a porosidade média (P2) ao fim de 21 dias de teste

Os gráficos apresentados nas figuras anteriores indicam que a porosidade da matriz tem uma influência idêntica no seu desempenho no tratamento de feridas a o grau de desacetilação.

Foram utilizados testes *t-Student* para verificar se as diferenças entre as médias de RAFC para os 5 grupos eram estatisticamente significativas entre si. Os resultados da comparação entre todos os grupos estão apresentados na Tabela 4.11.

Tabela 4.11 – Matriz de significância estatística (valor-P) para avaliação de diferenças entre os 5 grupos quanto aos valores de RAFC; (■) valores estatisticamente significativos com um grau de confiança de 95%

	D2P1	D2P2	D2P3	D1P2	D3P2
D2P1	■	0,004	0,221	0,284	0,339
D2P2		■	0,035	0,143	0,024
D2P3			■	0,160	0,322
D1P2				■	0,211
D3P2					■

Pela matriz apresentada na Tabela 4.11, e considerando um  $\alpha$  de 0,05 pode-se verificar que o melhor desempenho da matriz D2P2 é estatisticamente significativa em relação a todas as matrizes (com exceção da D1P2). As diferenças de médias de RAFC entre todas as outras matrizes não podem ser consideradas estatisticamente significativas. Isto deve-se à variabilidade natural do sistema em estudo e à grande variabilidade dos ensaios, especificamente no caso dos grupos que apresentaram problemas na adesão das matrizes à ferida (D3P2).

Ao longo do ensaio foram ainda feitas observações de todos os animais, o que permitiu obter informações qualitativas sobre o desempenho dos pensos. Estas informações estão resumidas na Tabela 4.12.

## Produção de Matrizes à Base de Quitosano para o Tratamento de Feridas

Tabela 4.12 – Dados qualitativos dos grupos obtidos por observações ao longo da experiência

Grupo	Observações relevantes
D2P1	Apenas um dos animais apresentou problemas de adesão da matriz à ferida
D2P2	Dois dos animais apresentavam pensos aparentemente pouco aderidos; um dos animais não tinha o penso passados 15 dias
D2P3	Três dos quatro animais que chegaram ao final do teste apresentaram problemas de adesão da matriz
D1P2	Apenas um dos animais aparenta não ter ficado com o penso bem aderido
D3P2	Quatro dos cinco animais do grupo tinham perdido o penso no final do ensaio

Aquando da remoção dos pensos porosos da ferida verificou-se que, na maioria dos casos, o penso estava apenas aderido na zona de ferida por cicatrizar. Ao redor da ferida, ou seja, na zona já cicatrizada, o penso encontrava-se seco e não aderido. A Figura 4.20 apresenta duas fotografias exemplificativas deste caso.

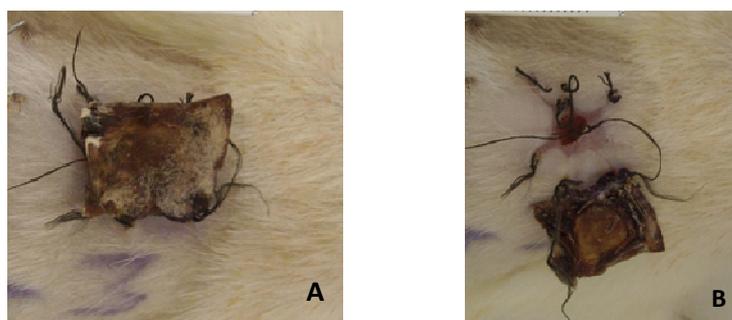


Figura 4.20 – Fotografia de um rato tratado durante 14 dias em que é possível observar que (a) o penso estava levantado nas bordas, mas aderido no centro (b) correspondendo à zona da ferida ainda por cicatrizar

Assim, entende-se que o penso não é incorporado durante o processo de cicatrização, mas mantém-se sobre a ferida, tendo um comportamento positivo na cicatrização, como é possível concluir pelos resultados.

Ao contrário dos estudos realizados com células, o grau de desacetilação D3 não foi o que apresentou melhores resultados nos testes *in vivo*. Existem várias explicações para este comportamento. Nos testes *in vitro* a matriz serve de suporte, tendo um papel activo na adesão e proliferação celular. No entanto, nos testes realizados em feridas induzidas em animais não se verificou uma integração da matriz na ferida cicatrizada, indicando que esta não funciona como matriz de crescimento celular na aplicação aqui estudada. No entanto não se pode excluir a possibilidade de estes pensos terem bioactividade apenas a partir dos testes aqui realizados. Assim, os testes celulares sendo necessários para a caracterização biológica da matrizes porosas, em termos de citotoxicidade e compatibilidade, apresentam resultados que não permitem avaliar as características da matriz quando aplicadas em modelos animais em feridas externas de profundidade total.

A tendência observada nos testes *in vitro* quanto à influência do grau de desacetilação do quitosano na proliferação celular não se verificou nos testes *in vivo* quanto à reepitelização. Tal facto dever-se-á aos problemas de adesão da matriz observados aquando da sua aplicação na ferida induzida e a sua dificuldade em se manter aderida durante o período de teste, levando a que a sua biodisponibilidade fosse menor, e não se tirando proveito das melhores propriedades químicas e efeitos na proliferação celular, observados nos testes *in vitro*. Estes resultados são confirmados pela caracterização física das matrizes em que, para um mesmo grau de porosidade o maior grau de desacetilação de quitosano apresenta a menor capacidade de absorção e maior rigidez da amostra, o que não terá influência nos testes *in vitro*, mas que demonstrou ser um factor importante nos *in vivo*.

Esta divergência reforça a necessidade de caracterização cuidada de matrizes para a regeneração de feridas, sendo que os testes *in vitro* indicaram determinadas características das matrizes como ideais para a proliferação celular e que nos ensaios *in vivo* apresentaram desempenhos muito inferiores.

Os resultados menos satisfatórios na redução da área de ferida ao fim de 21 dias são os para a porosidade maior e menor, sendo a matriz de porosidade média a com melhor desempenho. A matriz P1, com maior porosidade e densidade menor, apresenta uma espessura e massa de polímero inferiores a qualquer uma das duas por ter sido produzida a partir de uma solução menos concentrada e ter originado uma matriz susceptível ao colapso da sua estrutura. Assim, o seu pobre desempenho pode ser devido a uma menor protecção da ferida e menor capacidade de gestão da humidade no local da ferida. Por outro lado a matriz de porosidade inferior e maior densidade tem uma capacidade de absorção mais limitada, tal como foi verificado na sua caracterização, o que levou a que quando aplicada tivesse uma menor capacidade de adesão. Por ser uma membrana mais rígida (devido à sua densidade) a sua adaptação ao leito da ferida foi também mais limitado, apesar de ter ficado fixa quando suturada, podendo levar a um défice no efeito de protecção da ferida. Mais uma vez, à semelhança do que se verificou quanto ao grau de desacetilação do quitosano, os resultados *in vivo* não traduzem o desempenho expectável a partir dos testes *in vitro*. Esta característica física das matrizes, porosidade e consequentemente a densidade, foi um factor condicionante na taxa de proliferação celular nos testes realizados de uma forma directa. Como nestes testes a matriz não está sujeita a nenhum "stress" mecânico é a sua porosidade que influencia a taxa de proliferação celular. O facto de a matriz menos densa ter menor espessura e menor capacidade de protecção, e a mais densa não ser capaz de se adaptar nem de apresentar taxas de absorção tão elevadas é irrelevante nestes casos, pois ambas foram cobertas por meio antes de se iniciar o teste, permitindo às células encontrar uma estrutura com as características de porosidade adequadas à proliferação. A ausência de "stress" mecânico nestes testes, ao contrário do que acontece nos *in vivo*, levou a que o efeito da porosidade apresentasse resultados diferentes.

Produção de Matrizes à Base de Quitosano para o Tratamento de Feridas

#### **3.4.4. Análise histológica dos resultados da experimentação *in vivo***

A imagens de histologia para o estudo realizado ao longo do tempo com as matrizes D2P2 estão apresentadas na Figura 4.21.

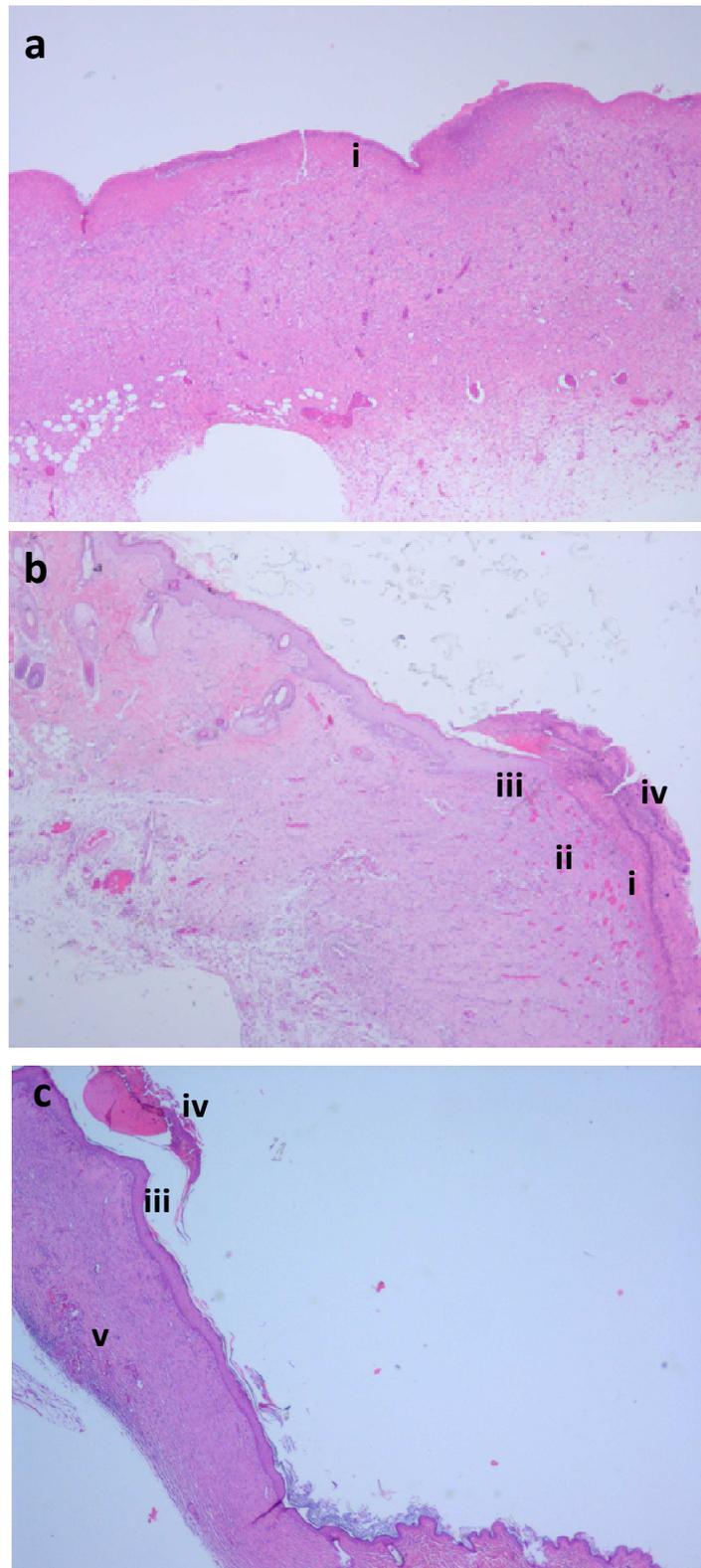


Figura 4.21 - Imagens de histologia ao longo do tempo para animais tratados com matrizes D2P2; a - 7 dias, b - 14 dias, c - 21 dias; i - zona ulcerada não reepitelizada, ii - zona vascularizada, iii - zona de reepitelização, iv - crosta, v - vestígios de matriz

Na Figura 4.21 é possível observar as várias fases de cicatrização da ferida tratada com uma matriz porosa. Após 7 dias, a zona da ferida não apresenta sinais de reepitelização nem de aumento da vascularização. Ao 14º dia de tratamento já se observa uma frente de reepitelização,

## Produção de Matrizes à Base de Quitosano para o Tratamento de Feridas

vascularização significativa na zona da ferida e a crosta formada. Ao final de 21 dias, já não é observável a zona ulcerada, a vascularização diminui em relação ao 14º dia, e ocorreu reepitelização completa numa camada fina. Em termos de estrutura, a epiderme formada aos 21 dias tem uma aparência recente, sem apresentar as características estruturais de uma epiderme madura, tais como a formação de papilas. Na imagem dos 21 dias observam-se vestígios da matriz de quitosano, indicado que esta foi absorvida pelo organismo durante o processo de cicatrização. Em alguns cortes histológicos foi observada a presença de vestígios da matriz de quitosano na derme.

A reepitelização das feridas tratadas com a matriz foram comparadas com as feridas de controlo através de cortes histológicos. A Figura 4.22 apresenta um corte histológico de uma ferida de controlo.

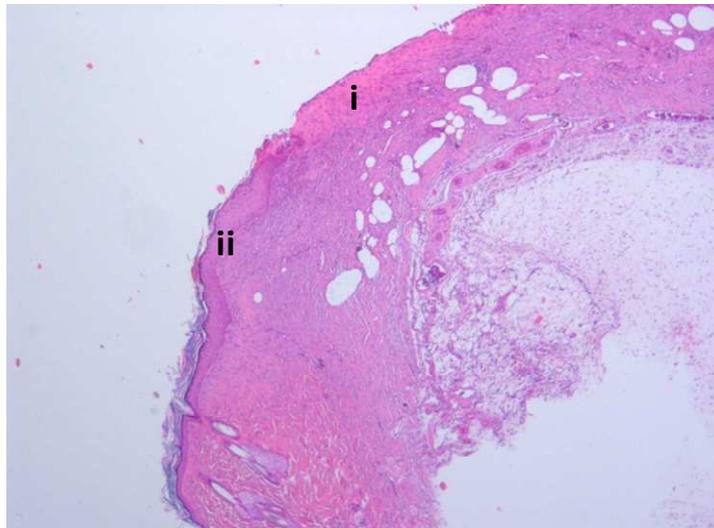


Figura 4.22 - Corte histológico de uma ferida de controlo ao fim de 21 dias de teste; i - zona de úlcera não reepitelizada, ii - zona de reepitelização

Comparando o corte histológico do controlo com o da matriz, observa-se uma reepitelização muito menor, com uma área ulcerada elevada e sem a presença de vascularização significativa.

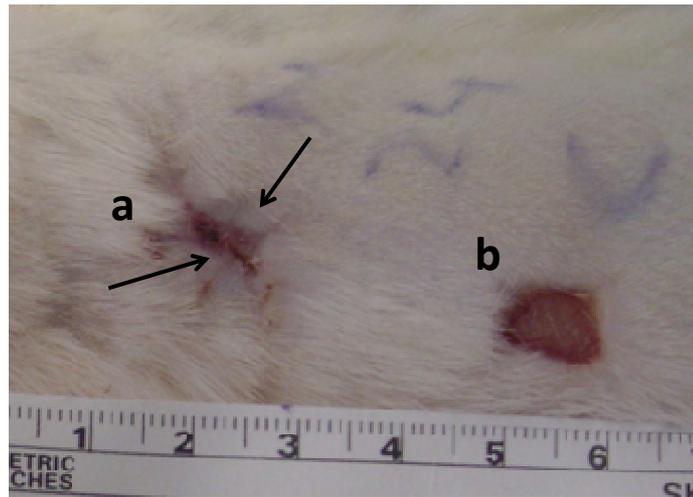


Figura 4.23 - Imagem de rato ao fim de 21 dias de teste com ferida tratada com matriz porosa de quitosano (a) e ferida de controlo (b); setas indicam zona de reepitelização

O processo de cura da ferida observado nestes testes englobou a contracção do tecido circundante da ferida inicial e a reepitelização desta ferida, tal como observável na Figura 4.23. Nos animais em que foi possível observar estes dois processos verificou-se que a sua proporção era diferente consoante se se tratasse da ferida tratada com a matriz ou a de controlo. Assim, as feridas tratadas com a matriz porosa de quitosano não só apresentaram uma zona cruenta final menor do que no caso do controlo como também uma área de reepitelização superior. A aceleração do processo de cura aliado à maior reepitelização indicam que a matriz porosa de quitosano tem um efeito benéfico no tratamento da ferida.

### 3.5. Conceção e desenvolvimento empresarial

Após alguns pré-testes realizados num liofilizador de um laboratório colaborador e de os seus resultados serem positivos, foi decidido pela Ceramed realizar o investimento na compra de um liofilizador próprio. O modelo seleccionado foi o *FreeZone Triad, Freeze Dry System, LABCONCO*. A câmara deste liofilizador permite a realização do pré-arrefecimento directamente, no mesmo local da liofilização. Esta característica do equipamento diminuiu o investimento, ao não ser necessário adquirir um sistema à parte para o congelamento da solução. O facto de o pré-arrefecimento estar incorporado no sistema de liofilização permite que a solução a liofilizar seja simplesmente colocada dentro da câmara, que o ciclo de liofilização (que inclui o pré-arrefecimento) seja efectuado, e no final seja apenas necessário remover o produto liofilizado. Esta simplificação do processo torna-se ainda mais relevante quando considerado o risco de contaminação proveniente da manipulação do produto.

Verificou-se nos primeiros testes que uma solução de quitosano a 3% (m/v) em ácido acético a 2% (v/v) resultava numa matriz bastante porosa e com uma resistência mecânica (analisada preliminarmente por simples manuseamento) aceitável. Assim, no início do processo de concepção e desenvolvimento do penso poroso foi esta a concentração utilizada.

## Produção de Matrizes à Base de Quitosano para o Tratamento de Feridas

O programa de processamento foi definido empiricamente. Este programa compreende duas fases: pré-arrefecimento e liofilização. A fase de liofilização é por sua vez constituída por dois segmentos, como já descrito, e cada um engloba uma rampa de aquecimento e um patamar a determinada temperatura.

A forma e dimensões finais do produto final são definidas pelo corte do material liofilizado. O recipiente utilizado para a liofilização da solução de quitosano foi definido sempre de forma a otimizar o processo e diminuir o desperdício de produto. As dimensões do produto foram definidas no *portfolio* da Ceramed consoante a aplicação, para feridas mais extensas ou menores.

O processo de cristalização provoca no produto final o aparecimento de fendas e de zonas de densidade aparentemente diferente, que dão um aspecto heterogéneo ao produto. Isto é resultado do processo de cristalização, tal como descrito anteriormente, devido principalmente aos gradientes de temperatura ao longo da matriz durante o arrefecimento. Esta heterogeneidade é observável a olho nu em várias áreas: observa-se uma maior rugosidade ao longo da superfície da face superior, ao passo que na superfície da face inferior (em contacto com o recipiente e mais perto da prateleira do liofilizador) a textura é mais suave.

De forma a contornar este evento, e identificando o processo de arrefecimento como o passo crítico para o surgimento desta heterogeneidade, foram planeadas experiências para melhorar e otimizar o aspecto da matriz porosa. Estas experiências concentraram-se em testar diferentes métodos de congelamento da solução de quitosano, e consequentemente diferentes temperaturas e taxas de arrefecimento. Assim, foi testado o pré-arrefecimento fora do equipamento de liofilização da solução de quitosano já nos moldes, tanto por congelamento a cerca de  $-18^{\circ}\text{C}$  (realizado num congelador) como na imersão da solução em azoto líquido, e depois a sua colocação no liofilizador já pré-arrefecido (temperatura a cerca de  $-78^{\circ}\text{C}$ ). Este método, de pré-arrefecimento externo, em que se pretendia uma taxa de arrefecimento mais elevada do que o arrefecimento realizado dentro do próprio liofilizador, e assim a diminuição do tamanho dos cristais, levava a prever a eliminação da heterogeneidade da matriz ao nível macroscópico. No entanto, estes processos não foram bem sucedidos devido às limitações do equipamento: após a abertura da câmara de liofilização para colocação das amostras pré-congeladas, quando já à temperatura mínima, o liofilizador não era capaz de criar o vácuo necessário às fases seguintes (de sublimação). Por último foi testado um pré-arrefecimento, pelos mesmos métodos do teste anterior de congelador e azoto líquido, mas desta vez com a colocação no liofilizador logo desde o início do ciclo do equipamento (antes do pré-arrefecimento deste). O objectivo neste caso foi aliar o arrefecimento mais rápido que era possível, externamente ao liofilizador, mas continuar a ser possível liofilizar as amostras ao contornar as limitações deste. Mas, mais uma vez, o equipamento não foi capaz de corresponder às expectativas em termos de capacidade de manter as amostras congeladas. A taxa de arrefecimento permitida pelo liofilizador é demasiado lenta, deixando que as amostras

descongelassem, voltando depois a congelar, mas já à taxa de arrefecimento normal do equipamento.

Concluiu-se assim que se deveria avançar com o método de pré-arrefecimento e liofilização no mesmo equipamento, e permanecer com as matrizes com as características assim obtidas.

Apesar de esteticamente ser preferível um produto mais homogéneo, especialmente em termos de *marketing*/apresentação do produto a clientes, não se prevê que esta heterogeneidade tenha influência no desempenho do produto. No *portfolio* definido para a comercialização destes pensos porosos foram definidos vários tamanhos, sendo o menor 3x3 cm. No caso deste tamanho de penso, especialmente, a heterogeneidade na face superior é praticamente imperceptível, apesar de ainda ser possível notar-se a diferença entre a face superior e inferior do penso.

### **3.5.1. Fluxo e condições de produção**

O método de produção das matrizes porosas de quitosano já descrito foi adaptado para uma escala maior e às condições necessárias à produção de um dispositivo médico com estas características. As condições de produção foram estabelecidas de acordo com as normas aplicáveis e o sistema de qualidade da empresa. O esquema da Figura 4.24 descreve as várias actividades que fazem parte de cada fase e se são realizadas dentro ou fora da sala-limpa. Todas as actividades em que o produto está em contacto directo com o ar exterior são realizadas em ambiente controlado, sala-limpa, de forma a minimizar a contaminação do produto e assim a carga microbiana do produto a esterilizar. Após a colocação do produto liofilizado na embalagem de esterilização e a selagem desta já não existe o perigo de contaminação pelo que as actividades seguintes são desenvolvidas já fora da sala-limpa.

A fase de preparação da solução de quitosano passa pela dissolução, sob agitação magnética, do quitosano em solução ácida e um momento de repouso para colapso das bolhas de ar que inevitavelmente se formam durante o processo. Segue-se a fase de liofilização e a fase de preparação e embalagem das matrizes produzidas que são seguidamente enviadas para esterilização.

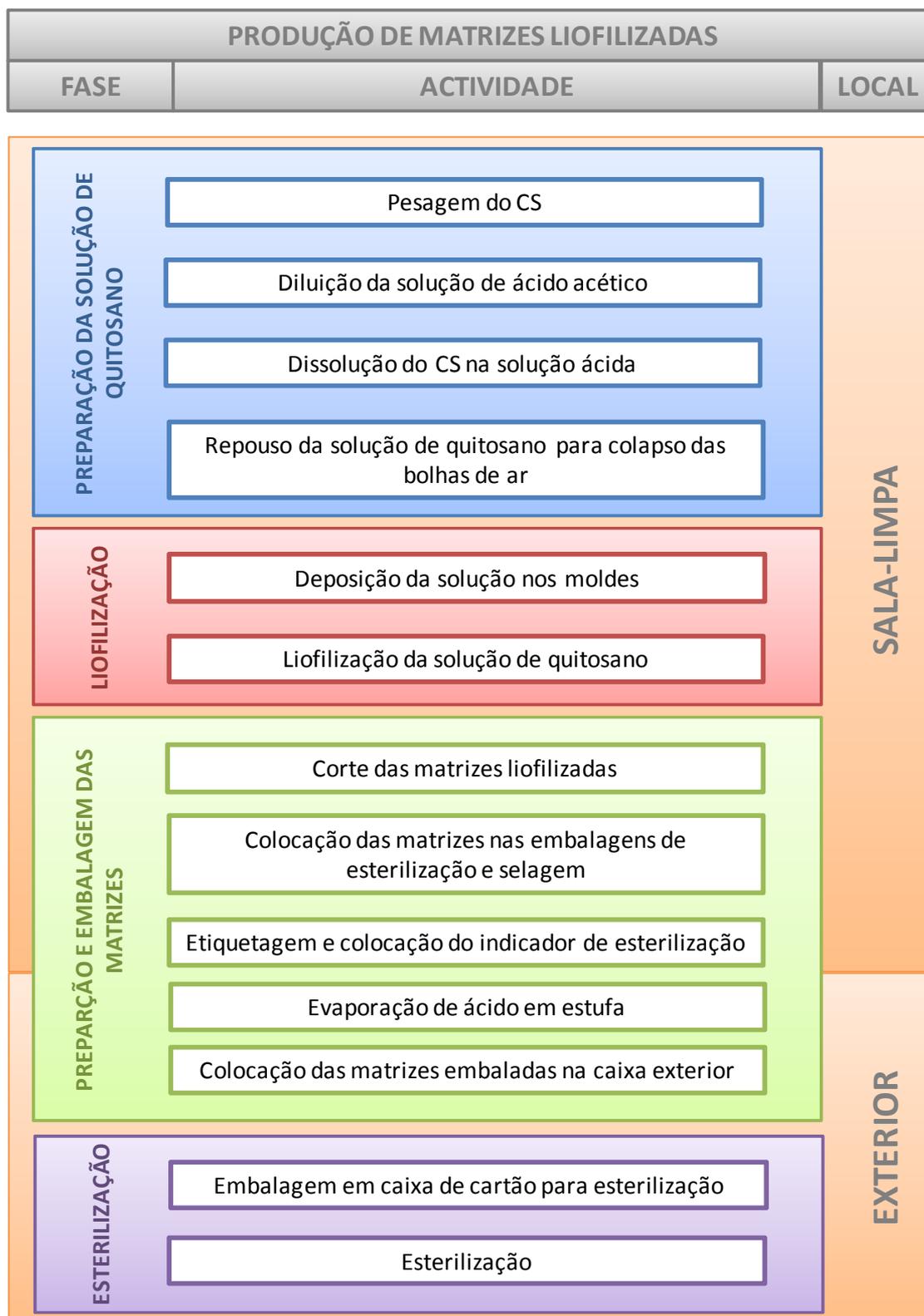


Figura 4.24 - Esquema da produção das matrizes porosas de quitosano, explicitando as quatro fases de produção, as atividades que as compreendem, e se é realizada dentro ou fora da sala-limpa

#### 4. Conclusão

Foi desenvolvido um processo de obtenção de matrizes porosas de quitosano para o tratamento de feridas. Esta matriz é obtida através da liofilização de uma solução de quitosano dissolvido em ácido acético. Foi possível otimizar as características (em termos de porosidade e grau de desacetilação) ideais para o tratamento de uma ferida de excisão total.

Esta matriz apresenta como vantagem em relação a outras descritas o facto de ter apenas um produto na sua composição e utilizar um processo de produção simples. O produto que consiste na matriz embalada e esterilizada foi certificado sob a designação comercial de AbsorKi<sup>®</sup> indicado no tratamento de feridas traumáticas, cirúrgicas, graves com exsudado, no tratamento de úlceras vasculares crónicas e de pressão, queimaduras superficiais e de segundo grau, e pequenas abrasões, lacerações e cortes.

Foi possível variar as características estruturais das matrizes porosas através da utilização de diferentes concentrações de polímero na solução inicial, mesmo tendo todas apresentado uma porosidade elevada, acima de 95%. Estas matrizes apresentaram-se mais porosas, com maior interconectividade e paredes mais frágeis quanto menor a concentração utilizada, e adoptando poros mais esféricos e menor interconectividade para uma concentração superior. O processo de esterilização adoptado para este produto, radiação gama, revelou-se ser o adequado uma vez que não induziu alterações na estrutura química do quitosano nem nas propriedades mecânicas da matriz. A capacidade de absorção de água das matrizes varia com o grau de desacetilação e, principalmente, com a porosidade. A matriz com maior capacidade de absorção foi a obtida a partir de soluções com concentração de quitosano 2% (m/m) e grau de desacetilação menor.

Os testes *in vitro* com fibroblastos 3T3 com as diferentes matrizes apresentaram valores de viabilidade para 24 horas muito baixos. No entanto os resultados de proliferação ao longo de 72 horas demonstraram que as matrizes promovem a proliferação celular na sua estrutura. Foi possível concluir que o grau de desacetilação superior leva a taxas de proliferação celular superiores, devido à maior densidade de cargas na sua molécula, o que aumenta a adesão celular. No entanto não se verificou o efeito inibidor da proliferação pela presença destas cargas, descrito na literatura. A proliferação celular é favorecida pela menor porosidade da estrutura devido à maior superfície disponível para adesão. Estes resultados foram sustentados pelas observações por microscopia confocal, em que os fibroblastos apresentaram morfologias consistentes com boa adesão e proliferação celulares assim como a possibilidade de migrarem para o interior da matriz. As matrizes têm assim uma estrutura adequada à sua utilização em regeneração de tecidos.

Os testes *in vivo* realizados demonstraram que a matriz acelera significativamente o processo de cura da ferida, e que ao fim de 21 dias a ferida se encontra praticamente fechada ( $3\pm 3\%$  do tamanho inicial no teste face a  $18\pm 8\%$  do tamanho inicial no controlo). Os resultados apresentam

## Produção de Matrizes à Base de Quitosano para o Tratamento de Feridas

alguma variabilidade, sendo necessário normalizar o tamanho de ferida com o controlo, tendo sido possível obter resultados estatisticamente significativos. Este processo é acelerado quando são utilizadas matrizes com porosidade superior, com capacidade de absorção do exsudado superior e conseqüentemente melhor gestão da humidade da ferida. O grau de desacetilação tem influência no desempenho da matriz no tratamento de feridas pelas características físicas que confere às matrizes, e não pela influência das suas características químicas de maior afinidade da matriz com as células presentes.

Foi demonstrado que o penso de quitosano poroso ajuda na cicatrização de uma ferida de excisão total quer na velocidade quer no tempo total necessário para a sua cura, diminuindo todos os problemas associados a feridas por cicatrizar.

Este estudo demonstra que o desempenho deste tipo de matrizes em modelos *in vitro* e *in vivo* não é directamente comparável e que não é possível tirar conclusões sobre o seu desempenho como pensos no tratamento de feridas utilizando um deles isoladamente.

## Capítulo V – Matrizes Combinadas de Microfibras e Nanofibras para o Tratamento de Feridas

### 1. Introdução

A produção de fibras a partir de polímeros é um processo bastante antigo e com aplicações variadas, tais como em têxteis ou dispositivos médicos. Estas duas áreas encontram-se na produção de pensos para o tratamento de feridas dada a ampla utilização de fibras para a produção de têxteis para pensos<sup>(20)</sup>. Fibras de diversos tipos fazem parte da maioria dos tratamentos de feridas hoje em dia. Os pensos aplicados podem ser produzidos a partir de fibras e polímeros de diferentes origens e fontes, tal como é possível ver na Tabela 5.1.

Tabela 5.1 - Fibras e polímeros geralmente usados em pensos para feridas<sup>(135,136)</sup>

Origem		Fibras e polímeros
Natural	Animal	Seda
	Vegetal	Algodão Cânhamo
Não-natural	Sintética	Poliéster Poliamida Polipropileno Poliuretano
	Regenerada (artificial)	Viscose (celulose regenerada) Proteínas regeneradas (colagénio) Alginato Quitina Quitosano Ácido hialurónico

Para a produção de pensos para feridas, as fibras naturais que se destacam são o algodão, a seda e o linho. Entre as não-naturais a partir de polímeros sintéticos é de destacar o poliéster, a poliamida, o polipropileno e o poliuretano. É na categoria de fibras não-naturais a partir de polímeros naturais que o quitosano recai, juntamente com outros polímeros como o alginato, ácido poliglicólico, celulose regenerada, quitina e ácido hialurónico.

Os pensos para feridas utilizando fibras apresentam-se sob variadas estruturas têxteis, tais como: fibras não agregadas, fios (conjunto de fibras), tecidos, não-tecidos, tricotados, entrançados, entre outros. Propriedades como uma grande área superficial, capacidade de absorção e possibilidade de manipulação para obtenção de várias formas são vantagens que tornam as fibras e os têxteis bons candidatos no desenvolvimento de produtos para o tratamento de feridas<sup>(30,136)</sup>.

## Produção de Matrizes à Base de Quitosano para o Tratamento de Feridas

Os produtos para o tratamento de feridas podem ser tecidos ou não-tecidos. Estes últimos podem ser produzidos directamente a partir de fibras ou até mesmo dos polímeros. Os pensos tecidos partem de fibras ou filamentos que são depois transformados consoante a textura, forma, tamanho, e outras propriedades físicas, químicas e mecânicas desejadas<sup>(136)</sup>.

Estudos realizados noutros campos que não só a pele têm apresentado bons resultados, comprovando a adequabilidade da fibras no tratamento de diferentes tecidos celulares, como por exemplo o tecido ósseo<sup>(137)</sup>. Notin *et al.*<sup>(138)</sup> desenvolveram o seu trabalho na prevenção da formação de aderências em pós-operatório e promoção da regeneração de tecidos tendo utilizado fibras de quitosano no reforço de estruturas para esses tratamentos. Estas fibras têm ainda o potencial de serem utilizadas em suturas e no preenchimento de rugas da pele.

As crescentes necessidades na área do tratamento de feridas, especificamente no desenvolvimento de novos materiais com características inovadoras, leva a que a investigação e desenvolvimento de novos produtos se encontre em crescendo. Especificamente, o mercado exige um desenvolvimento acelerado de novas tecnologias para a obtenção de materiais têxteis e polímeros modernos. São disto exemplo os tecidos de algodão com superfície alterada por quitosano capaz de absorver moléculas de antibiótico a partir de soluções aquosas<sup>(136)</sup>.

### 1.1. Aplicações de fibras em pensos

A importância dos têxteis no desenvolvimento de pensos para o tratamento de feridas prende-se com as suas excelentes características, apropriadas à finalidade: resistência, extensibilidade, flexibilidade, permeabilidade ao ar e humidade, disponibilidade em estruturas tri-dimensionais, variedade de comprimento de fibras e/ou filamentos, refinamento, forma e geometria da secção da fibra, e propriedades mecânicas. O papel dos têxteis no tratamento de feridas está constantemente a evoluir, e hoje em dia é possível combinar características tradicionais à multifuncionalidade moderna. Esta evolução repercute-se nos têxteis ao aumentar a procura cada vez maior de produtos com novas características<sup>(136)</sup>.

As fibras de polímero obtidas podem ser caracterizadas de várias formas sendo a mais relevante neste trabalho o seu diâmetro. Assim, é de distinguir as microfibras (tipicamente entre 10 e 100 µm) com um diâmetro superior ao das nanofibras (tipicamente entre 10 e 100 nm). A obtenção destes diferentes tipos de fibras depende, principalmente, do método de produção. Como já foi visto para outros materiais, também estas fibras podem ser organizadas em várias estruturas<sup>(139,140)</sup>.

As matrizes de nanofibras têm várias aplicações como em processos de separação<sup>(141-143)</sup>, em sistemas de imobilização de enzimas<sup>(144-146)</sup>, matriz para crescimento celular para implantação posterior<sup>(147,148)</sup>, inclusive em aplicações ortopédicas<sup>(149,150)</sup>, no tratamento de feridas<sup>(151,152)</sup> e em libertação controlada de fármacos<sup>(153)</sup>.

As propriedades destas matrizes, aliadas às propriedades biológicas do quitosano, apresentam um potencial interessante para a utilização como DM. Devido às propriedades únicas, tais como: uma elevada relação área superficial/volume, baixa espessura, diâmetro à escala nano, porosidade, baixo peso, as nanofibras são usadas no tratamento de feridas. Por outro lado, as fibras de quitosano têm várias aplicações além da produção de pensos para feridas, tal como têxteis, suturas e matrizes para engenharia de tecidos<sup>(30,42)</sup>.

## 1.2. Engenharia de Tecidos

A matriz extracelular tem um papel crucial na migração, proliferação e diferenciação celulares, pois é nesta matriz que as células irão proliferar e diferenciar. A simulação *in vivo* da MEC, compatível com a proliferação celular, tem sido cada vez mais o foco da Engenharia de Tecidos e medicina regenerativa. As nano estruturas são uma das várias alternativas empregues no desenvolvimento de matrizes com este grau de complexidade, dada a sua estrutura porosa e com superfície de fibra à escala nano. A sua utilização expande-se a vários tipos de tecidos de diferentes órgãos, como o do sistema respiratório e do sistema cardio-vascular<sup>(154)</sup>.

O quitosano, pelas suas características como polímero, tem sido alvo de investigação para aplicações em ET. A utilização do quitosano como matriz para ET tem sido direccionada para uma variedade de tecidos como o osso, o fígado, tecido nervoso, vasos sanguíneos, cartilagem e pele. Uma característica promissora do quitosano é a sua capacidade de libertar proteínas, como factores de crescimento, de uma forma estável e controlada. O quitosano é considerado como um bom candidato para matrizes para ET por diminuir os problemas de rejeição. No entanto, aos biopolímeros naturais também estão associadas más propriedades mecânicas e uma bioabsorção demasiado rápida<sup>(20,45)</sup>.

Existem duas propriedades que são consideradas essenciais numa matriz para ET<sup>(20,45)</sup>:

- Arquitectura e função similares à MEC natural;
  - Tamanho de poro: tamanho de poro dentro dos limites adequados; que permita uma distribuição uniforme das células e não represente nenhum impedimento à migração durante a proliferação celular;
  - Forma e material adequada ao reconhecimento celular;
- Taxa de degradação compatível com a taxa de regeneração do tecido durante a aplicação.

Perante estes requisitos para matrizes de ET as nanofibras têm recentemente sido alvo de interesse crescente como material para a sua construção. As nanofibras, quando comparadas com a microfibras, são consideradas superiores para estas aplicações pois reúnem certas vantagens como<sup>(20)</sup>:

- a elevada razão área superficial-volume, que permite aumentar a absorção de moléculas de adesão, importantes na adesão celular à matriz;

## Produção de Matrizes à Base de Quitosano para o Tratamento de Feridas

- a relação de tamanho da fibra para o tamanho da célula cria um ambiente tridimensional similar ao da matriz extra celular, o que favorece a interação celular;
- possibilidade de produzir matrizes que proporcionam um ambiente favorável à proliferação e desenvolvimento de certos fenótipos celulares;
- permitem a diferenciação de células estaminais;
- estudos apontam que as matrizes compostas por nanofibras são capazes de dar indicações quer pela sua composição quer pela estrutura, essenciais para mimetizar o crescimento natural do tecido.

As matrizes de nanofibras possuem uma porosidade, tamanho de fibra, e relação área superficial/volume que permitem a difusão de massa dentro da própria matriz. Manipulando a composição, a arquitectura das matrizes, por exemplo alinhando-as, ou adicionando componentes biológicos, o fenótipo das células e o seu comportamento será também alterado. Isto é especialmente interessante pelo possibilidade de um mesmo tipo de fibras poder ser aplicado em diferentes situações, de acordo com o tipo de célula e o tecido alvo, apenas por alterações morfológicas, por exemplo<sup>(154)</sup>. O tamanho adequado dos poros e uma porosidade elevada facilitam o cultivo celular e permitem uma troca de nutrientes e de produtos metabólicos entre as células aderidas e a rede vascular do paciente. Apesar de todas as vantagens das nanofibras, estas têm no entanto algumas desvantagens para a aplicação no tratamento de feridas especialmente ligadas às suas propriedades mecânicas ao nível da resistência à manipulação e aplicação, e pelo facto de serem susceptíveis a uma degradação mais rápida.

Por outro lado, a resistência mecânica é um pré-requisito para uma matriz adequada. A matriz deve ser suficientemente resistente para ser capaz de ser manipulada e aplicada na ferida e ainda de resistir durante o processo de biodegradação, durante o qual deve continuar a dar suporte biomecânico para a regeneração do tecido<sup>(20)</sup>. Têm sido realizados estudos com microfibras como material para melhorar a regeneração da pele com resultados positivos<sup>(155)</sup>.

Por ser uma área de tratamento muito recente, ainda existe um vazio grande em termos de legislação e documentos regulamentares. No entanto, a este assunto aplica-se o mesmo princípio que aos outros dispositivos médicos: devem ser seguros para o paciente e os benefícios para o paciente devem superar os riscos.

### 1.3. Processos de produção de fibras

Os processos de produção de fibras incluem a fiação seca, a fiação húmida e a fiação a partir de material fundido<sup>(136)</sup>. No caso específico da produção de fibras a partir de quitosano, vários processos de produção de fibras de quitosano têm sido propostos, quer por adaptação dos já usados industrialmente, como por desenvolvimento de novos processos. Estes incluem a produção de microfibras por fiação húmida (do inglês "wet-spinning"), produção de nanofibras por

electrofiação (do inglês "electrospinning") ou num processo conjugado de electro-fiação-húmida ("electro-wet-spinning")<sup>(156-160)</sup>.

No processo de fiação húmida a solução a fiar é extrudida sob pressão através de uma feira (como uma agulha, por exemplo). O jacto de líquido pode entrar directamente num banho de coagulação ou pode atravessar primeiro um espaço curto de ar (diferença entre a feira estar imersa no banho de coagulação ou acima da superfície do líquido). O banho de coagulação leva à formação primeiro de uma película na superfície da fibra, através da qual a solução de coagulação difunde. Os parâmetros mais importantes deste processo são: o diâmetro da feira, a composição do banho de coagulação, e a taxa de estiramento da fibra<sup>(161)</sup>.

Ren *et al.*<sup>(162)</sup> sugerem a produção de matrizes à escala nano através de um processo de degradação bioespecífica. Para tal é utilizada uma mistura binária de quitosano com graus de desacetilação diferentes. O quitosano com grau de desacetilação mais baixo é mais hidrófilico e susceptível à degradação com lisozima, pelo que será removido mais facilmente da estrutura, restando o outro quitosano intacto numa estrutura à escala nano.

As características intrínsecas assim como a morfologia da matriz influenciam a taxa de degradação da matriz como um todo. Ao nível do quitosano é de destacar a influência do grau de desacetilação, por outro lado a espessura das fibras e a porosidade da matriz também desempenham um papel relevante na taxa de degradação. Assim, a manipulação destes parâmetros permite ajustar a taxa de degradação à aplicação a que a matriz se destina<sup>(163,164)</sup>.

Várias técnicas têm sido usadas na produção de matrizes de nanofibras, tal como separação de fases<sup>(165)</sup>, auto-formação (do inglês "self-assembly")<sup>(166)</sup>, através da utilização da força centrífuga na extrusão do polímero ("rotary jet-spinning")<sup>(167)</sup> e electrofiação<sup>(168)</sup>. Esta última técnica tem sido alvo de interesse por ser simples, rápida, eficiente e de baixo custo, e é sobre esta que nos iremos debruçar neste trabalho<sup>(108)</sup>.

Para a produção de microfibras foi seleccionada a técnica de fiação húmida, uma técnica fácil de montar, sem envolver equipamento muito específico, relativamente barata, com bom rendimento de produção, e de fácil aumento de escala.

As nanofibras podem ser obtidas por vários métodos, sendo que neste trabalho foi escolhida a electrofiação. Um método igualmente de fácil montagem, sem envolver equipamento específico, relativamente barata. No entanto, é um método com um rendimento relativamente baixo (dependendo do objectivo), e com algumas limitações em termos de implementação industrial.

#### **1.4. Fiação húmida**

A fase inicial da produção de fibras é a produção de uma solução polimérica. As moléculas ficam livres e independentes ao se quebrarem algumas das ligações intermoleculares mais fortes.

## Produção de Matrizes à Base de Quitosano para o Tratamento de Feridas

Após se ter obtido o fluido este é extrudido através de um capilar e sai como um jacto fino de líquido. Por último, este jacto é endurecido e forma-se um filamento contínuo<sup>(169)</sup>.

A última fase, a formação do filamento, pode ser efectuada por diversos métodos. Especificamente, a fição húmida consiste na extrusão da solução de polímero para um banho de coagulação, no qual o endurecimento se dá por processos químicos ou físicos<sup>(169)</sup>.

Tal como já foi descrito, o quitosano é solúvel em soluções com pH abaixo de 6,0. No entanto, quando o pH da solução sobe acima deste valor, o quitosano perde as suas cargas, as aminas ficam desprotonadas, e torna-se insolúvel. Assim, este processo de coagulação consiste numa simples reacção ácido-base<sup>(42,170)</sup>.

O período em que a fibra é submetida à coagulação é importante para definir as suas características finais não só pelo processo de solidificação, mas também pelas forças a que é ou não submetida, controladas pela relação entre a velocidade de extrusão da solução e a velocidade de recolha num rolo. No caso de a velocidade a que a solução é extrudida ser igual ou superior à velocidade a que a fibra é enrolada, a fibra ficará relaxada enquanto solidifica. No entanto, se a velocidade de recolha for superior à de extrusão, a fibra sofrerá estiramento, e em último caso quebra. O próprio processo de extrusão promove a orientação das moléculas lineares do polímero no sentido do eixo longitudinal da fibra. No entanto, é durante o estiramento da fibra que é possível obter o alinhamento das moléculas em toda a fibra e, como consequência, o aumento da cristalinidade da fibra. As propriedades das fibras são muito influenciadas pelo quanto a fibra é estirada durante a sua produção<sup>(161,169)</sup>.

### 1.5. Electrofição

O processo adoptado neste trabalho para a produção de nanofibras foi a electrofição. A electrofição consiste na criação de nanofibras a partir de um jacto de solução de polímero carregado electricamente.

Este processo inicia-se com a aplicação de tensão à solução de polímero, criando cargas nesta. Quando a repulsão electrostática supera a tensão superficial da solução a gota de solução que se encontra à saída da agulha transforma-se num jacto de fluído. Esta zona inicial em que ocorre a transformação de uma gota num jacto tem uma forma característica, denominada de cone de Taylor. Este jacto é atraído para o alvo devido à sua carga eléctrica e ao campo eléctrico, e será mantido enquanto a tensão aplicada for suficiente para vencer a tensão superficial da solução. Nesse percurso o diâmetro da fibra vai diminuindo cada vez mais devido à evaporação do solvente e ao estiramento causado pela repulsão entre as cargas do mesmo sinal transportadas pela solução. No alvo, ligado à terra, forma-se uma matriz de deposição de nanofibras de polímero cuja espessura depende do tempo de deposição<sup>(42,171)</sup>.

O processo de electrofiação engloba factores, tanto de ordem ambiental, de montagem e ainda da própria solução a fiar, que influenciam o processo. Os parâmetros relativos à solução a fiar que afectam o processo de electrofiação e que devem ser tidos em conta na preparação de uma experiência são<sup>(171)</sup>:

- escolha de um solvente:
  - adequado para a dissolução do polímero;
  - com uma pressão de vapor suficientemente baixa para que a fibra atinja o alvo já seca, e suficientemente alta para que a solução não seque antes da formação da fibra;
- a viscosidade da solução deve ser suficientemente elevada para que se forme jacto e este não rompa;
- a tensão superficial não deve ser demasiado alta para que não se formem contos na fibra (irregularidades arredondadas).

Quanto aos factores de processo, há que ter em conta a distância do alvo ao colector, o caudal de saída da solução e a tensão aplicada<sup>(42,171)</sup>. As características químicas do quitosano combinam-se de tal forma que tornam muito difícil a obtenção de uma solução exclusivamente de quitosano com uma concentração de polímero suficientemente alta e com uma viscosidade suficientemente baixa que permitam a electrofiação.

A natureza policatiónica do quitosano leva a que as moléculas se repelem, dificultando a formação de fibras por este processo, pelo que só se encontram descritos trabalhos em que se tenham obtido fibras de quitosano por electrofiação com sucesso em condições muito agressivas, como um solvente muito ácido ou utilizando solventes tóxicos e prejudiciais ao meio ambiente<sup>(172,173)</sup>.

Foram analisadas várias variáveis durante os testes preliminares com o sistema. A análise destes parâmetros baseou-se essencialmente na possibilidade de fiar ou não a solução e as características das fibras formadas, observadas por microscopia (óptica e electrónica).

### **1.6. Matrizes combinadas de fibras**

Já foram referidas as várias vantagens das matrizes de nanofibras na regeneração de tecidos. Sendo o intuito deste trabalho obter uma matriz para a regeneração da pele, optou-se pela produção de nanofibras de quitosano combinada com microfibras, de forma a funcionarem de reforço mecânico e espaçadores da matriz. Tecidos com espaçadores (do inglês "spacer fabrics") consistem em duas camadas de têxteis intercaladas por fios que servem de espaçadores, atribuindo ao produto características interessantes na sua utilização na área médica, tais como propriedades mecânicas melhoradas, e características micro-climáticas melhoradas, com permeabilidade ao ar e termoregulação. Estas propriedades melhoradas permitem a sua utilização na prevenção de feridas crónicas<sup>(136)</sup>.

## Produção de Matrizes à Base de Quitosano para o Tratamento de Feridas

As nanofibras de quitosano apresentam elevada área superficial e porosidade. Além de permitirem as trocas gasosas e líquidas, vão ainda permitir uma maior adesão a qualquer micro irregularidade que a ferida apresente caso sejam bem aplicadas. Ao contrário de outra matriz porosa, que mesmo sendo depositada na ferida poderá não estar 100% em contacto com toda a área atingida, uma “manta” de nanofibras será completamente maleável, adaptando-se a qualquer irregularidade. Esta deverá ser uma vantagem significativa no tratamento de qualquer tipo de ferida.

As microfibras na matriz combinada sendo igualmente de quitosano não terão qualquer impacto negativo na regeneração da ferida, podendo também servir de suporte para proliferação celular e garantir uma estrutura para ocorrer a regeneração das feridas. As microfibras deverão igualmente possuir um maior tempo de residência no organismo até serem degradadas pelas enzimas, devido ao seu diâmetro superior, garantido que a estrutura se mantém até a ferida estar regenerada.

## 2. Materiais e métodos

### 2.1. Materiais

#### 2.1.1. Quitosano

Para a realização de experiências de estudo da influência do peso molecular na produção de microfibras por fiação húmida foram utilizados o 3 tipos de quitosano diferentes já mencionados. As suas características estão resumidas na Tabela 5.2.

Tabela 5.2 - Peso molecular médio e grau de desacetilação de 3 tipos de quitosano

Quitosano (Chitopharm®)	Peso molecular médio	Grau de desacetilação
S	415.000	75,5%
M	650.000	74,0%
L	745.000	70,3%

##### 2.1.1.1. Soluções de quitosano

Foram preparadas diferentes soluções de quitosano com concentrações de 2%, 3% e 4% (m/m) em ácido acético a 2% (v/v), a partir de cada um dos quitosanos apresentados, para determinar qual reuniria as melhores condições para a produção de fibras por fiação húmida.

##### 2.1.2. Óxido de polietileno (PEO)

Foi utilizado PEO para melhorar as características finais da solução de quitosano de forma a possibilitar a sua electrofiação. A adição de PEO permite baixar a viscosidade da solução dos



## Produção de Matrizes à Base de Quitosano para o Tratamento de Feridas

O aparato do sistema de fiação húmida utilizado para a produção de fibras de quitosano neste trabalho consiste numa bomba infusora, um banho de coagulação e um rolo no fim do banho para colectar as fibras produzidas, como representado na Figura 5.2.

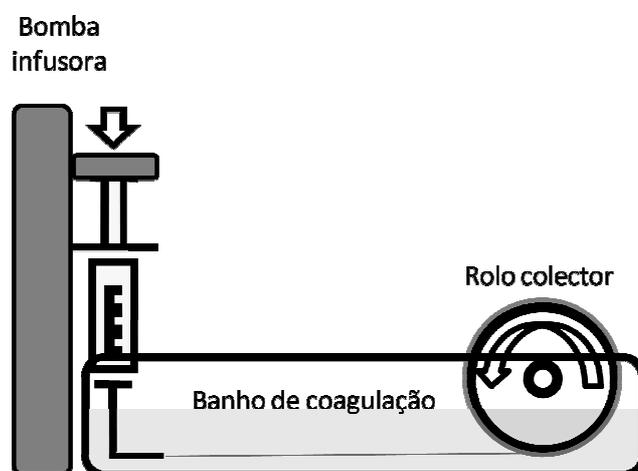


Figura 5.2 - Esquema do sistema de fiação húmida utilizado

A solução de quitosano é extrudida através de uma agulha, ligada a uma seringa, a um determinado caudal controlado pela bomba. Este caudal de extrusão foi otimizado com base num estudo de comparação de dois caudais diferentes quanto às propriedades mecânicas das fibras obtidas.

A ponta da agulha está mergulhada dentro do banho de coagulação. A fibra percorre o banho de coagulação até à outra extremidade do tabuleiro, uma distância de 24 cm, onde é enrolada à volta de um rolo parcialmente submerso no banho de coagulação. Esta distância é suficiente para se dar a coagulação da superfície da fibra e uma profundidade da fibra (em termos de diâmetro) suficiente para que a fibra ao ser recolhida no rolo não se cole à porção anterior nem se deforme

A solução de coagulação utilizada permite que, enquanto a solução está mergulhada no banho, dois processos ocorram: solidificação do quitosano dissolvido por reacção química entre o solvente e o coagulante (hidróxido de sódio), e remoção do solvente por troca física entre o solvente e um não solvente, o metanol neste caso. A fibra, durante o processo de fiação, mantém-se sempre em contacto com solução de coagulação, pelo que a difusão das moléculas ao longo da fibra continua a ser promovida. Na fase inicial deste período de coagulação, ao considerar-se uma secção transversal da fibra, observam-se duas zonas circulares concêntricas: a mais exterior constituída por polímero coagulado, e portanto sólida, e o interior constituído por solução viscosa não coagulada. Com o tempo esta fronteira vai-se movendo para o interior até atingir o centro da fibra e todo o polímero se encontrar solidificado<sup>(170)</sup>.

Quando o processo de extrusão termina as fibras, ainda enroladas no rolo de colecção, ficam durante 1 hora submersas no banho de coagulação para permitir que o interior da fibra também solidifique totalmente.

No final, as fibras são colocadas durante 3 horas no primeiro banho de lavagem, que consistiu numa solução de 50% água e 50% metanol puro. De seguida são mergulhadas em 100% metanol puro ficando aí durante a noite.

As fibras assim formadas foram secas à temperatura e humidade ambientes.

### 2.2.1.2. Electrofiação

A produção de nanofibras pelo processo de electrofiação foi realizada dentro de uma câmara com controlo de temperatura e humidade. Este aparato englobou uma fonte de alta tensão *iSeg High Voltage Power Supply*, Alemanha, uma bomba infusora *NE300* da *New Era Syring Pumps*, USA, e um alvo rotativo para deposição das fibras ligado à terra.

Foi utilizada uma solução de quitosano de peso molecular baixo (*Chitopharm<sup>®</sup> S*) a 2% (m/m), PEO de peso molecular 2.000.000 a 0,67% (m/m) em ácido acético a 2% (v/v). Esta solução foi extrudida através de uma agulha (calibre 27), à qual estava ligada a fonte de alta tensão, a uma distância do alvo de deposição de 25cm. A Figura 5.3 representa uma montagem simples, e a adoptada neste trabalho, para a produção de nanofibras por electrofiação.

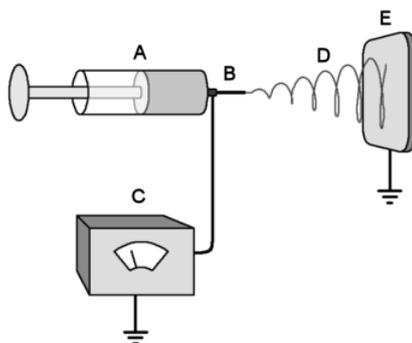


Figura 5.3 - Representação do sistema de electrofiação adoptado; A - seringa; B - agulha; C - fonte de alta tensão; D - projecção de fibras; E - alvo de deposição com ligação à terra<sup>(175)</sup>

- **Condições de electrofiação**

As condições de produção associadas ao sistema em si foram optimizadas ao longo de várias experiências. Assim, chegou-se às condições resumidas na Tabela 5.3.

Tabela 5.3 - Resumo das condições de produção otimizadas para o processo de electrofiação

<b>Distância agulha colector</b>	25 cm
<b>Vtagem aplicada</b>	19 kV
<b>Fluxo de injeção</b>	0,30 ml·h <sup>-1</sup>

Estas condições foram otimizadas para a solução anteriormente seleccionada.

### 2.2.2. Produção de matrizes combinadas

A produção de matrizes combinadas de fibras foi feita por camadas intercaladas de microfibras alinhadas e nanofibras depositadas sobre estas.

As microfibras produzidas foram secas de forma a ficarem rectas e rígidas. Pequenas porções destas fibras foram dispostas paralelamente, com uma distância de 1 mm entre si, até formarem um tapete de fibras, como demonstrado na Figura 5.4.

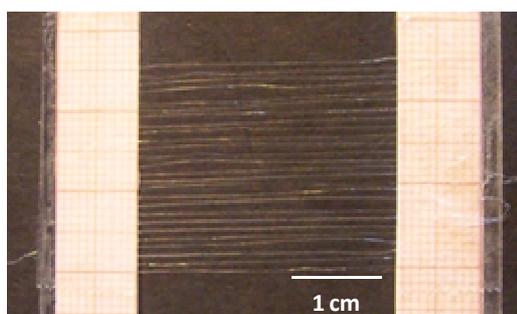


Figura 5.4 - Construção do tapete de microfibras sobre o qual são depositadas as nanofibras

Este tapete foi colocado sobre o alvo de deposição de nanofibras, e foram depositadas as nanofibras sobre este, com intervalos de tempo diferentes de forma a obter-se uma matriz de nanofibras com densidades e espessuras diversas. Um novo tapete de microfibras foi colocado sobre as nanofibras depositadas em posição perpendicular às anteriores. Voltaram a ser depositadas nanofibras durante o mesmo período de tempo, e o processo foi repetido até se terem atingido seis camadas de microfibras e seis de nanofibras.

As matrizes que necessitaram de ser esterilizadas para os ensaios *in vitro* e *in vivo* foram submetidas a radiação gama, à semelhança do que foi utilizado nas matrizes porosas de quitosano.

### 2.3. Métodos de caracterização

#### 2.3.1. Caracterização morfológica das fibras e matriz

As fibras produzidas foram observadas no microscópio *Nikon LV100* com o *software NIS Elements* e por SEM, segundo a técnica descrita no Capítulo II.

### 2.3.2. Reologia

Foram efectuadas medidas reológicas às soluções de quitosano em ácido acético a 2% (v/v) com diferentes pesos moleculares e concentrações. As medidas foram efectuadas em estado estacionário, num reómetro rotacional *Bohlin Gemini HR<sup>nano</sup>*, tendo-se obtido as curvas de fluxo das diferentes soluções analisadas. Todas as medidas foram efectuadas usando um sistema cone-prato com 2° de ângulo e 20 mm de diâmetro, a uma temperatura constante de 25°C. Para assegurar a homogeneidade da amostra, as medidas foram efectuadas após um pré-corte ("pre-shear") com uma taxa de corte de 1 s<sup>-1</sup> aplicado durante 60 s e seguido de um tempo de equilíbrio de 180 s. Estas medidas foram realizadas com o objectivo de determinar o comportamento reológico das soluções, em particular a sua viscosidade e sua influência no processo de formação de fibras. Foram utilizadas três réplicas.

### 2.3.3. Testes de tracção

Os testes de tracção das microfibras desenvolvidas foram realizados tal como descrito no Capítulo II. Foram utilizadas amostras com cerca de 3 cm, cujo diâmetro foi previamente determinado com um micrómetro. Os ensaios foram conduzidos até à ruptura total da fibra.

Neste teste foi determinado para cada ensaio o módulo de Young (E), que representa uma medida da rigidez do material, e é calculado pela razão entre a tensão exercida sobre o material e a deformação sofrida por este. No caso dos ensaios aqui realizados traduz-se no declive da zona linear da representação da tensão aplicada em função da deformação sofrida pela fibra no decorrer do teste.

### 2.3.4. Testes *in vitro*

Foram utilizadas células 3T3 em culturas sobre as matrizes combinadas, por 72 horas, segundo o procedimento descrito no Capítulo II. Após este período as matrizes com células foram observadas por microscopia confocal.

### 2.3.5. Testes *in vivo*

A experimentação animal realizada com as matrizes combinadas de microfibras e nanofibras foi semelhante, e portanto comparável, à realizada com as matrizes porosas descrita no Capítulo IV deste trabalho.

Assim, e de forma resumida, foi criada uma ferida no dorso de cada rato Wistar (peso médio (384±42) g) por excisão total de pele formando uma ferida de 2x2 cm. A ferida foi tratada com a matriz combinada, aplicada directamente, coberta com gaze gorda e com uma compressa, e as bordas da ferida foram suturadas à fáscia. Quanto ao controlo foram utilizados os dados da experiência apresentada no Capítulo IV, dado que o procedimento foi o mesmo, e portanto os dados transpotáveis.

## Produção de Matrizes à Base de Quitosano para o Tratamento de Feridas

Os animais foram observados regularmente e procedeu-se à sua eutanásia ao fim de 21 dias. Foi recolhido material para análise histológica.

A área da zona cruenta ao fim dos 21 dias de teste foi determinada como já descrito, e foi analisada segundo a Equação 5.1

$$FCF = \frac{\text{Área}_{t=0} - \text{Área}_{t=21}}{\text{Área}_{t=0}} \quad \text{Equação 5.1}$$

Em que:

FCF - fracção de cura de ferida;

Área<sub>t=0</sub> - área da ferida induzida inicialmente, 4cm<sup>2</sup>;

Área<sub>t=21</sub> - área da ferida ao fim de 21 dias de teste.

Tanto o dimensionamento da experiência como a avaliação estatística deste teste foram realizados de acordo com o descrito no Capítulo IV.

Todos os outros materiais e métodos estão de acordo com o já descrito.

### 3. Resultados e discussão

#### 3.1. Estudo das condições de produção de microfibras

##### 3.1.1. Caracterização das soluções de quitosano

As soluções preparadas para a obtenção de fibras foram caracterizadas por reologia. A viscosidade das soluções será um parâmetro fundamental na obtenção de fibras, pois é uma medida da resistência à deformação que condiciona o processo de extrusão durante a fiação, e consequentemente as características finais da fibra.

As curvas de fluxo em função do peso molecular do quitosano utilizado são apresentadas na Figura 5.5.

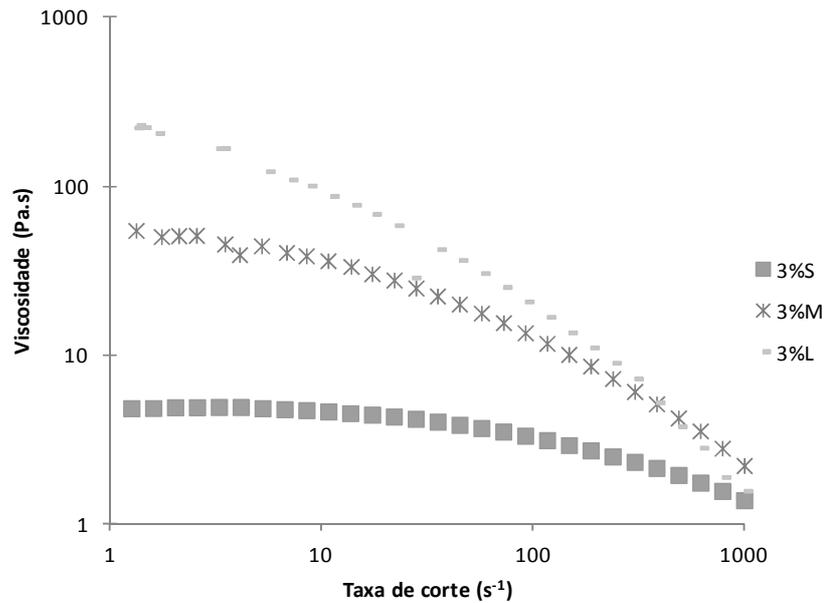


Figura 5.5– Curvas de fluxo para soluções de quitosano a 3% (m/m) com os diferentes pesos moleculares

Na Figura 5.5 é evidente o comportamento reofluidificante das soluções de quitosano. A viscosidade das soluções aumenta com o peso molecular do quitosano, o que é devido à maior resistência à deformação de cadeias de maior tamanho (maior peso molecular). As curvas de fluxo obtidas para soluções com diferentes concentrações de quitosano são apresentadas na Figura 5.6.

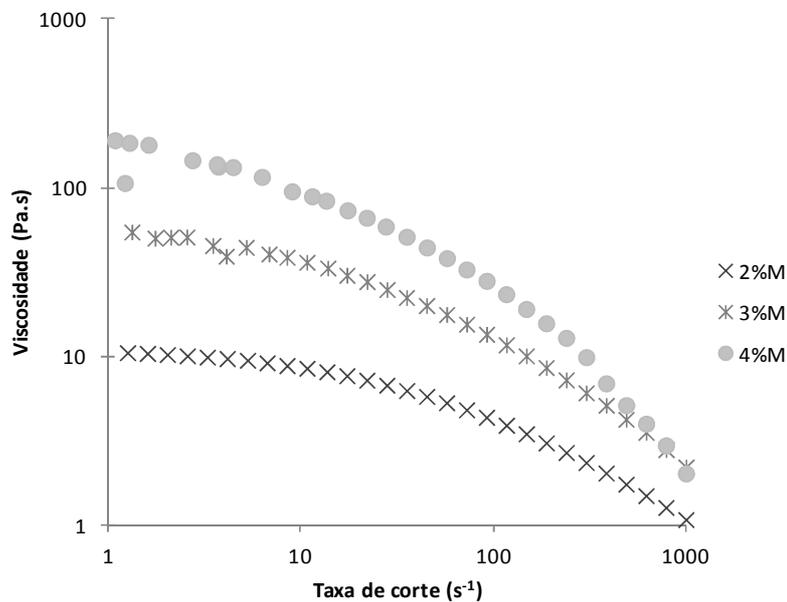


Figura 5.6 – Curvas de fluxo para soluções de quitosano de peso molecular médio a diferentes concentrações (m/m)

O comportamento observado na Figura 5.6 é idêntico ao verificado para o peso molecular mais baixo e mais elevado. Analogamente ao verificado na variação de peso molecular, observa-se

um comportamento reofluidificante das soluções e um aumento da viscosidade com o aumento da concentração de quitosano. O aumento da concentração de polímero em solução tem como consequência, tal como anteriormente, uma maior resistência à deformação de corte, pelo que a viscosidade aumenta.

### 3.1.2. Caracterização das fibras obtidas a partir de diferentes soluções de quitosano

Todas as soluções caracterizadas por reologia foram utilizadas para a preparação de microfibras por fiação húmida. Além dos parâmetros estudados em relação às propriedades da solução de partida, foi também variado o caudal de alimentação da bomba (daqui em diante simplesmente designado por caudal). As fibras foram caracterizadas quanto ao seu diâmetro e módulo de Young, sendo o último uma medida da rigidez elástica de um material, dando uma indicação sobre a resistência mecânica das microfibras à manipulação.

O diâmetro obtido para as várias fibras em função do caudal, concentração e peso molecular do quitosano estão apresentados na Figura 5.7.

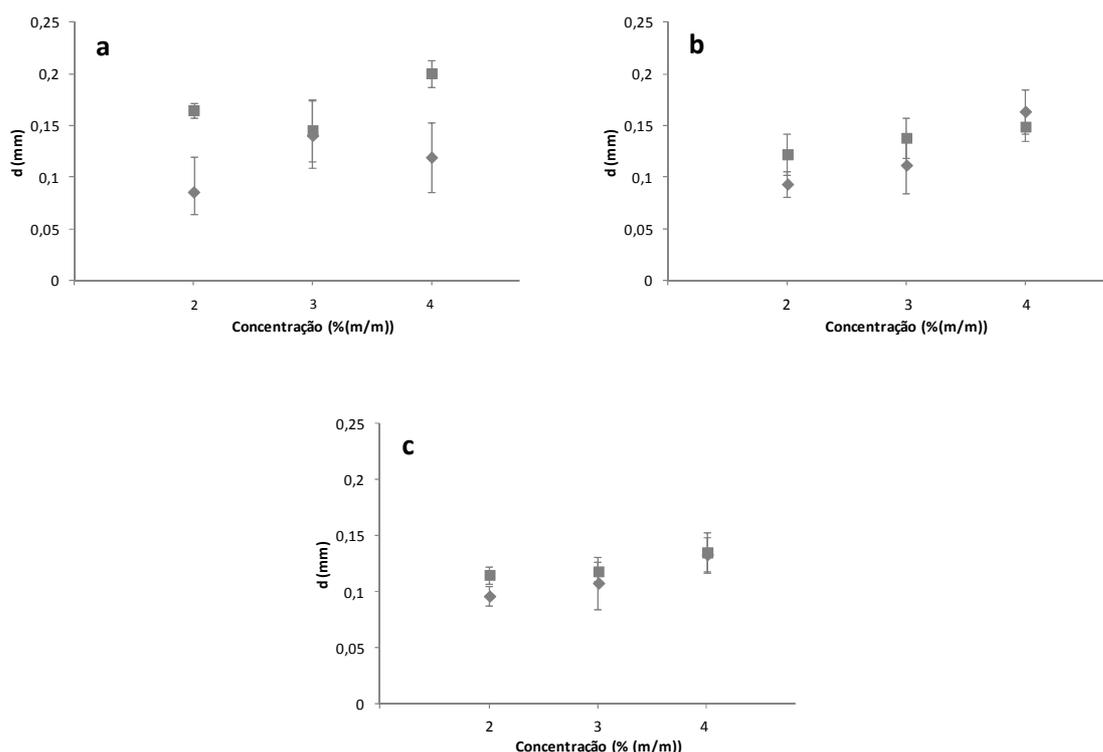


Figura 5.7 – Influência dos parâmetros de produção no diâmetro das microfibras; (a) peso molecular baixo; (b) peso molecular médio; (c) peso molecular alto; (♦) Q=10 ml·h<sup>-1</sup>; (■) Q=50 ml·h<sup>-1</sup>

Exceptuando as fibras obtidas a partir de peso molecular baixo, o caudal tem uma influência reduzida no diâmetro de fibras obtido. Utilizando quitosano de peso molecular médio ou alto observa-se um aumento do diâmetro médio de fibra com o aumento da concentração de quitosano para os dois caudais testados. Isto deve-se ao maior número de moléculas de

quitosano disponíveis para coagular e formar a fibra e também com a maior viscosidade destas soluções, que dão origem a fibras de maior diâmetro.

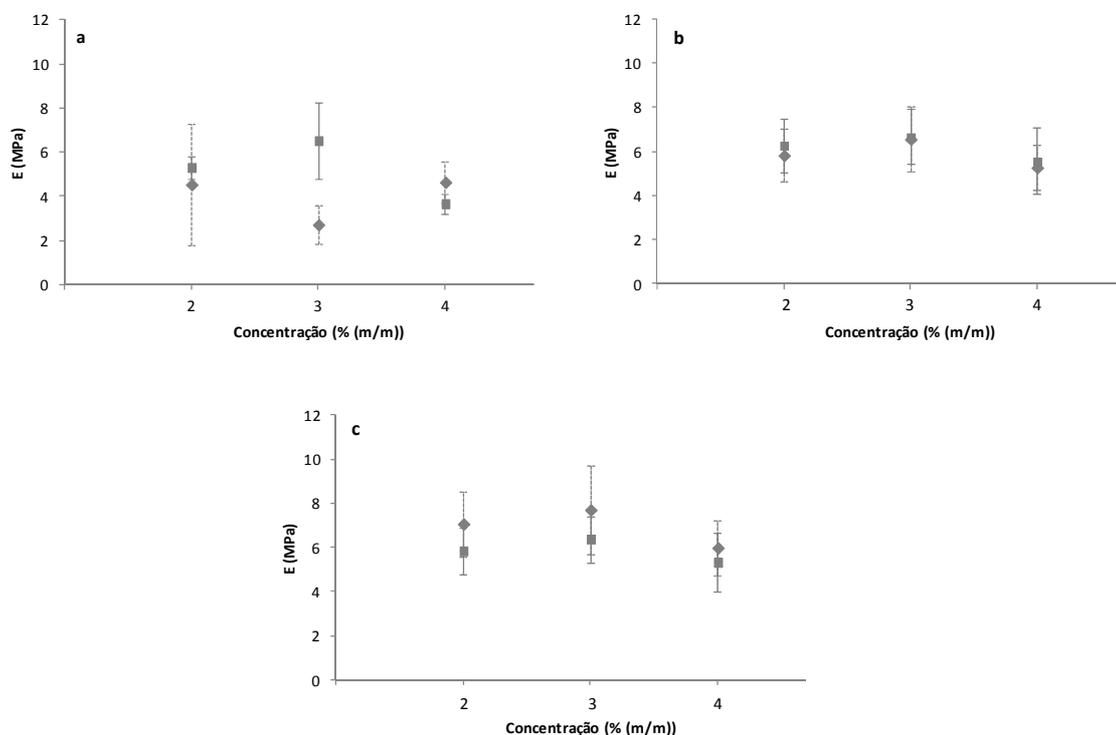


Figura 5.8 – Influência dos parâmetros de produção no módulo de Young das microfibras; (a) peso molecular baixo; (b) peso molecular médio; (c) peso molecular alto; (♦)  $Q=10 \text{ ml}\cdot\text{h}^{-1}$ ; (■)  $Q=50 \text{ ml}\cdot\text{h}^{-1}$

Analisando apenas as fibras obtidas a partir de quitosano de baixo peso molecular, o mesmo comportamento não linear que se observou para o diâmetro das fibras é verificado para o módulo de Young destas.

Para pesos moleculares superiores, observa-se que as fibras que apresentam maior resistência mecânica são as com uma concentração intermédia de quitosano (3% (m/m)) para os dois caudais testados, embora as diferenças obtidas não sejam estatisticamente significativas.

Para todas as concentrações testadas com as soluções de quitosano de peso molecular alto, obtiveram-se fibras mais frágeis com o caudal mais elevado. A mobilidade reduzida das cadeias de quitosano de elevado peso molecular dificulta o processo de orientação durante a extrusão, processo típico deste método, que se torna mais crítico com o aumento de caudal, dispondo de menos tempo para se orientarem e originando assim fibras menos resistentes.

Além da caracterização efectuada verificou-se, durante a produção das fibras, que este processo era mais difícil quando se utilizavam determinadas soluções. Este dado é bastante importante dado que, aliado às boas características das fibras, também é necessário que o processo de produção seja reprodutível, fiável e com elevado rendimento. Das várias combinações verificou-se que, se por um lado umas soluções eram muito pouco viscosas, outras eram demasiado

viscosas. As soluções menos viscosas foram as preparadas a partir do quitosano de baixo peso molecular e/ou concentrações de polímero em solução muito baixas. Nestes dois casos há uma fraca interação entre as cadeias de polímero, tornando o processo descontínuo, impedindo a formação de uma fibra: no caso de baixo peso molecular deve-se ao tamanho da cadeia, e no caso de baixa concentração deve-se à densidade de presença de cadeias. As soluções mais viscosas foram as originadas pela dissolução de quitosano de peso molecular alto e/ou concentrações de polímero em solução mais elevadas. Estas soluções levantam problemas ao nível da dissolução ficando muito viscosas ou com pequenos aglomerados de polímero (microgéis). Mais uma vez, durante o processo de fiação, o fluxo é interrompido e não se conseguiu formar uma fibra.

De forma a produzir microfibras com resistência mecânica adequada para produção de matrizes combinadas a aplicar em feridas sem apresentar problemas operacionais na sua produção, foi seleccionada a solução com 3% (m/m) de quitosano de peso molecular médio (650.000). Verificou-se que o caudal mais elevado testado trazia problemas operacionais (equipamento em esforço e obrigatoriedade de vigilância do processo constante), e dada a aparente independência da resistência das fibras do caudal nestas gamas, o caudal de alimentação foi estabelecido em  $20 \text{ ml}\cdot\text{h}^{-1}$  para aumentar a produtividade destas. Os parâmetros ideais para a obtenção de fibras resultam de um compromisso entre concentração e peso molecular de quitosano suficientemente elevados para darem origem a fibras resistentes, mas com soluções que não apresentem viscosidades muito elevadas.

### **3.2. Morfologia das matrizes combinadas**

As matrizes combinadas são constituídas por microfibras e nanofibras obtidas por dois processos diferentes. As suas condições de produção já foram estudadas, pelo que neste momento se torna necessário analisar as estruturas obtidas, microfibras e nanofibras, e quando combinadas numa só matriz.

A matriz final foi facilmente destacada do suporte onde foi construída, ficando completamente coesa no final e facilmente manipulável. Estas características estão demonstradas na Figura 5.9.

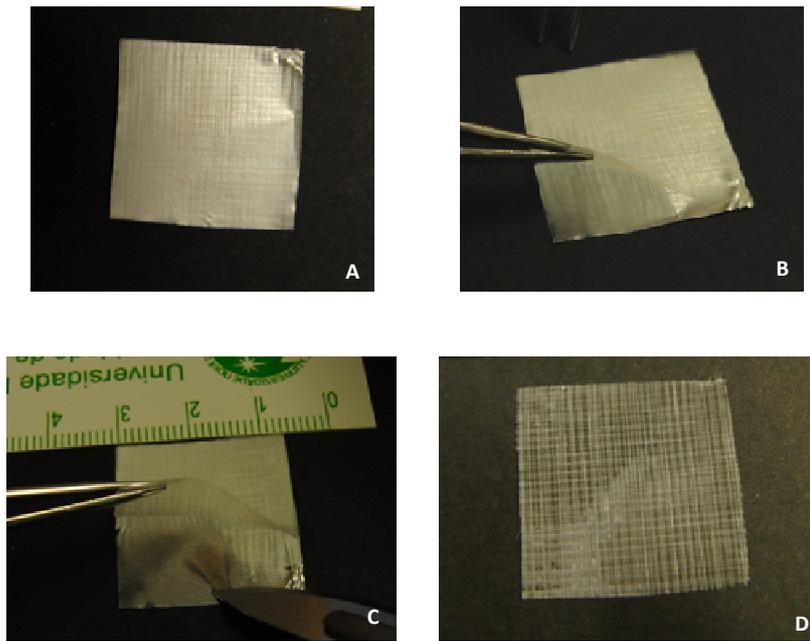


Figura 5.9 - Matriz de microfibras e nanofibras sobre o suporte em que foi produzida (A), a ser destacada (B e C) e o produto final já destacado (D)

As Figura 5.10 e Figura 5.11 apresentam em duas ampliações diferentes a organização de nanofibras quando depositadas isoladamente, formando um tapete.

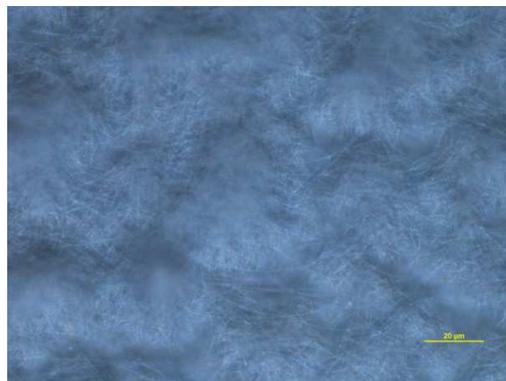


Figura 5.10 - Imagem de microscopia óptica da matriz de nanofibras de quitosano e PEO; escala 20μm; ampliação 50x

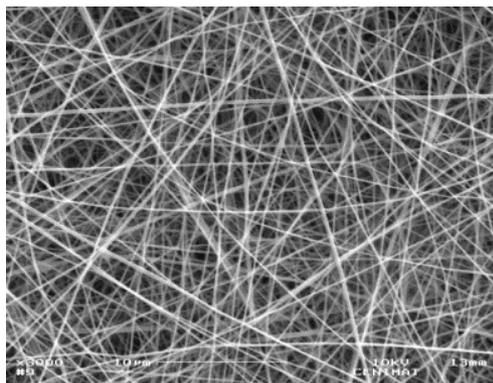


Figura 5.11 - Imagem obtida por SEM de nanofibras de quitosano e PEO; escala 10 $\mu$ m; ampliação 3000x

Como se pode ver nas imagens anteriores as nanofibras produzidas nas condições descritas apresentam-se sem defeitos, dispostas aleatoriamente (formando um não-tecido), originando uma matriz consideravelmente densa e homogênea. A estrutura das matrizes exclusivamente de nanofibras são tipicamente caracterizadas por uma grande área superficial, grande porosidade, propriedades mecânicas passíveis de controlo e capacidade de interagir com células fruto do mimetismo da MEC<sup>(176)</sup>.

Quando depositadas sobre as microfibras para formar a matriz combinada, as nanofibras são condicionadas pela topologia da camada anterior de microfibras. A Figura 5.12 incide sempre sobre a mesma zona, sobre uma microfibra, numa matriz combinada de microfibras e nanofibras e a Figura 5.13 apresenta a uma ampliação superior a morfologia de uma zona da matriz combinada.

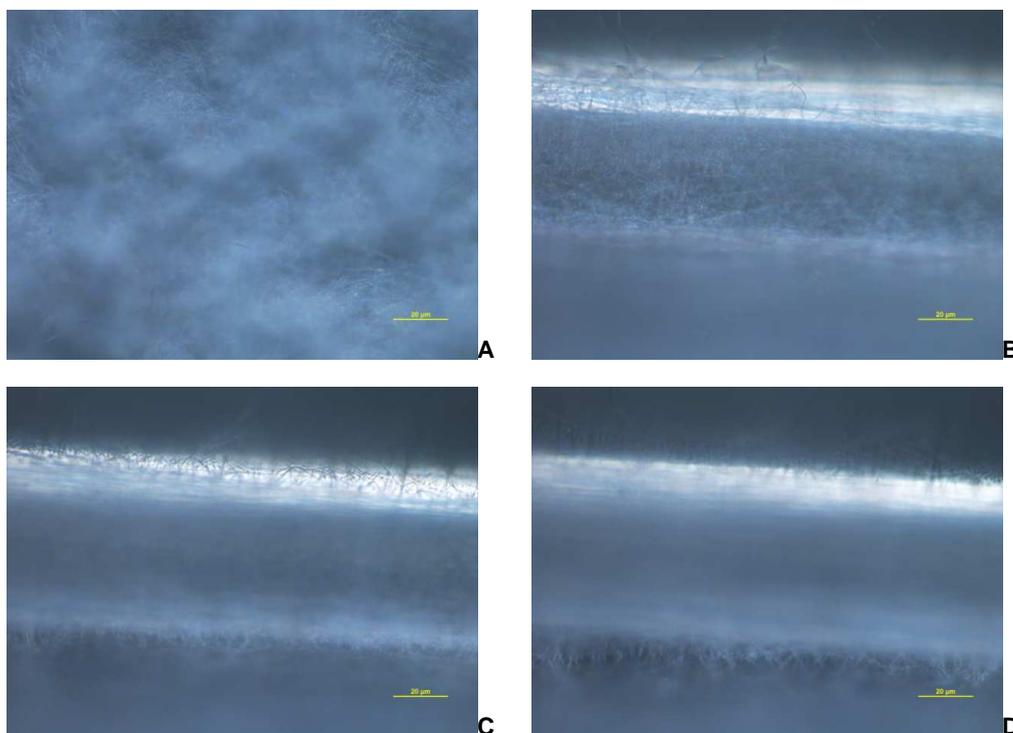


Figura 5.12 - Fotografias obtidas por microscopia óptica de uma matriz combinada de micro e nanofibras a várias profundidades sobre a mesma zona; escala 20 $\mu$ m, ampliação 50x

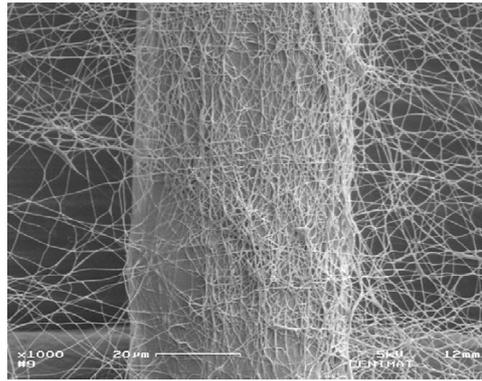


Figura 5.13 - Imagem de uma matriz combinada de microfibras e nanofibras obtida por microscopia electrónica; escala 20 μm, ampliação 1000x

As imagens da Figura 5.12 evidenciam num plano superior (A) o tapete de nanofibras depositado sobre uma das microfibras da camada anterior. À medida que se focam os planos inferiores já é possível observar a microfibra em questão e as nanofibras depositadas sobre esta (B e C). Com estas imagens é possível concluir que a camada de nanofibras depositadas sobre a camada anterior de microfibras segue o relevo destas, ou seja, as nanofibras depositam-se imediatamente sobre a microfibra mas depois estendem-se para os espaços entre microfibras onde passam para um plano inferior (D). Nestas imagens é ainda possível observar a estrutura regular das microfibras, que apresentam uma forma cilíndrica. O estiramento que ocorre no processo de fiação húmida enquanto o filamento se encontra no banho de coagulação, ou seja, entre a injeção da solução e a recolha da fibra, melhora não só as propriedades mecânicas como a morfologia da superfície das fibras<sup>(177)</sup>. A Figura 5.13 confirma estas observações a uma ampliação superior, tornando-se mais evidente a morfologia das nanofibras obtidas nestas condições.

A Figura 5.14 apresenta imagens em planos intermédios entre camadas de microfibras colocadas perpendicularmente entre cada camada.

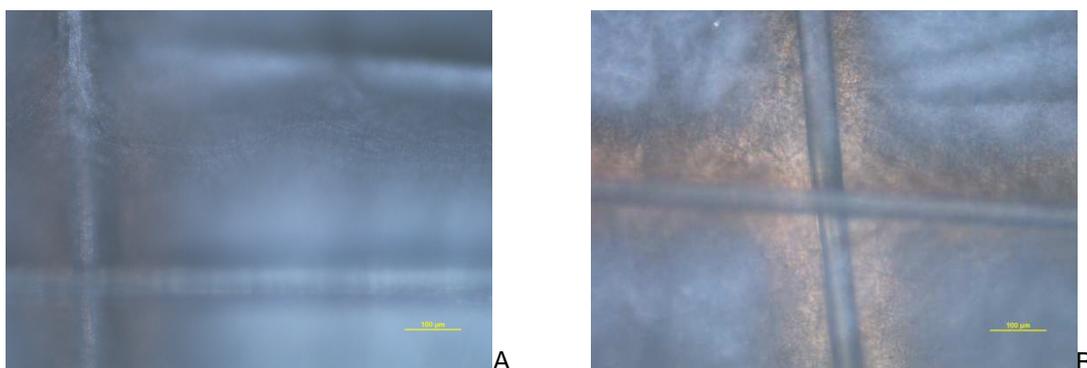


Figura 5.14 - Imagens de microscopia de uma matriz combinada de microfibras e nanofibras num plano mais superficial (A) e outro mais profundo (B); escala 100 μm; ampliação 10x

Na Figura 5.14-A é notório o acompanhamento do tapete de nanofibras depositadas sobre a microfibra indo preencher igualmente os espaços entre estas.

Esta matriz combinada de nanofibras e microfibras apresenta diversas vantagens originadas por esta combinação. Permite manter uma estrutura que preserva alguma semelhança relativamente à MEC e ao mesmo tempo ir de encontro às necessidades da sua aplicação clínica, nomeadamente de resistência na sua manipulação e adaptabilidade ao leito da ferida. Apresenta ainda a vantagem de a sua espessura poder ser controlada com o número de camadas acrescentadas, dependendo da aplicação pretendida, com nanofibras distribuídas por uma única matriz<sup>(178)</sup>.

### **3.3. Experimentação *in vitro* com matrizes combinadas de microfibras e nanofibras**

A matriz combinada desenvolvida foi estudada quanto à resposta celular de fibroblastos à sua estrutura. Para tal foram efectuadas culturas durante 72 horas de células 3T3 sobre as matrizes combinadas de microfibras e nanofibras. A morfologia celular foi observada por microscopia confocal e a Figura 5.15 apresenta imagens dos resultados obtidos.

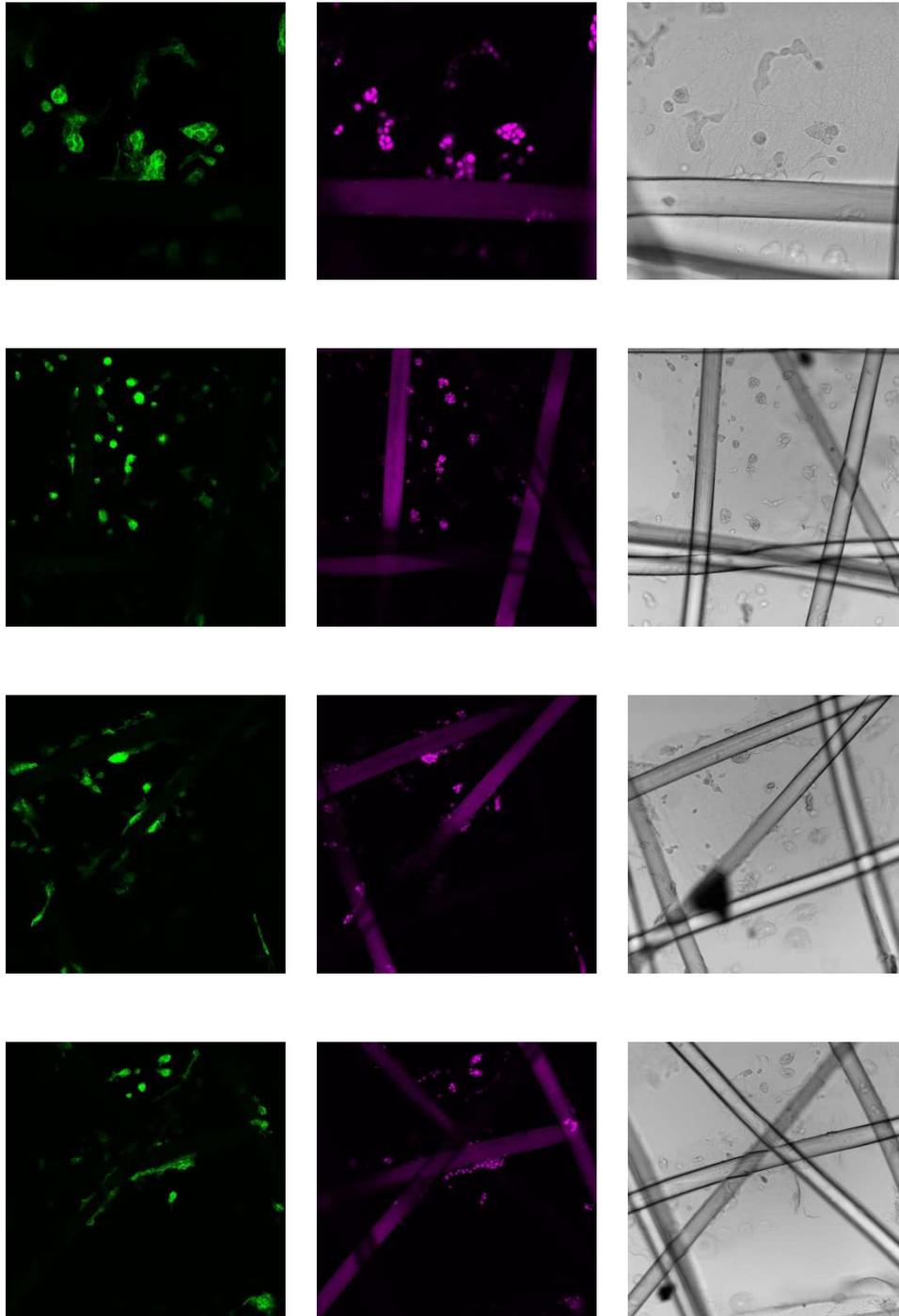


Figura 5.15 - Imagens de microscopia confocal de células 3T3 cultivadas sobre uma matriz combinada de microfibras e nanofibras durante 72 horas, em diferentes zonas e profundidades

As imagens recolhidas por confocal de células 3T3 cultivadas sobre uma matriz combinada durante 72 horas permitem analisar se as células crescem sobre as microfibras e as nanofibras. Como se pode observar, as células reconhecem as microfibras e as nanofibras como suporte para adesão e proliferação. Note-se a presença de células sobre as microfibras assim como sobre as nanofibras. As microfibras encontram-se cobertas por nanofibras, como se pode observar na Figura 5.12; assim, a proliferação celular que aparenta ocorrer sobre as microfibras

deverá estar a ocorrer nas nanofibras depositadas sobre estas (como se pode observar na imagem Figura 5.13). Verifica-se que as células têm afinidade e capacidade de adesão nesta superfície, distribuindo-se homoganeamente na matriz e observando-se pequenos agregados ao fim de 72 horas de cultura, e sendo capazes de se distender. Verifica-se que as células foram capazes de penetrar a estrutura na profundidade, observável por microscopia confocal ao serem focados vários planos em profundidade na estrutura. Assim, pode afirmar-se que a matriz combinada é permeável à penetração de células, servindo como base de crescimento 3D. As observações indicam ainda que, com o aumento do tempo de cultura, a tendência das células seria construir um tapete cada vez mais denso de células, tendendo para o povoamento total da estrutura. A proliferação de fibroblastos sobre as nanofibras indica que estas poderão estar a mimetizar a MEC e assim poderão servir de suporte para Engenharia de Tecidos, tal como acontece com outras células em estruturas semelhantes<sup>(179)</sup>.

### 3.4. Experimentação *in vivo* com matrizes combinadas de microfibras e nanofibras

A matriz combinada de nanofibras e microfibras foi aplicada numa ferida de excisão total no dorso de ratos Wistar, tal como descrito. Verificou-se que a matriz aderiu totalmente à ferida e às suas rugosidades, tal como se pode verificar na Figura 5.16 e Figura 5.17.



Figura 5.16 - Matriz combinada de micro e nanofibras aplicada numa ferida induzida de espessura total num rato Wistar

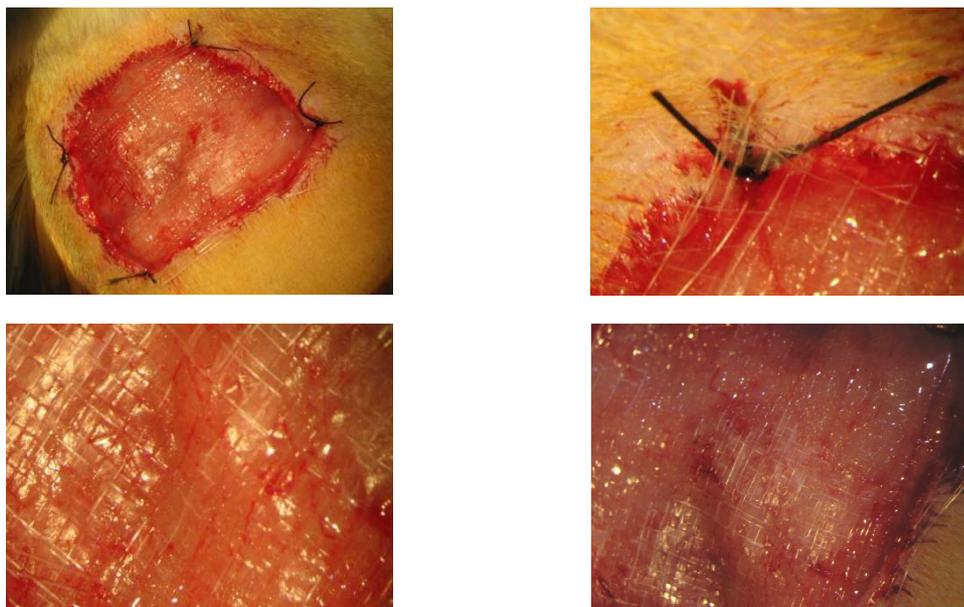


Figura 5.17 - Fotografias com diferentes ampliações da matriz combinada de micro e nanofibras numa ferida de espessura total induzida no dorso de uma rato Wistar

Ao aplicar-se a matriz verificou-se que esta apresentava uma grande afinidade e adaptabilidade à ferida, seguindo todas as suas irregularidades. Quando o animal se começou a mexer, verificou-se que a matriz não levantava nem saía do local onde tinha sido aplicada.

A comparação do desempenho destas matrizes no tratamento de feridas foi feita pela avaliação da diminuição do tamanho da ferida por cura ocorrida ao fim de 21 dias de teste em relação à ferida inicial. Estes dois factores permitem analisar a evolução da cicatrização da ferida ao longo do período estudado.

Para efeitos de comparação com o produto desenvolvido e apresentado no capítulo anterior, o desempenho das matrizes combinadas no tratamento de feridas em modelo animal foi comparado com a matriz porosa que apresentou as melhores características, a matriz D2P2. Os resultados estão apresentados na Tabela 5.4.

Tabela 5.4 - Valores de área de zona não epitelizada e de percentagem de cura de ferida da ferida nos testes *in vivo* ao fim de 21 dias no caso da matriz combinada e da matriz porosa D2P2; média±desvio padrão

	Área não epitelizada final (cm <sup>2</sup> )	Fracção de cura de ferida
<b>Matriz combinada</b>	0,057±0,067	98,6±1,7%
<b>Matriz porosa D2P2</b>	0,040±0,018	99,0±0,4%

Aplicando um teste *t-Student* não emparelhado aos valores de área de ferida obtém-se um valor-P de 0,31, que não possibilita a rejeição da hipótese nula (as diferenças de média não são significativas). Estes dados indicam que estas duas matrizes apresentam desempenhos

## Produção de Matrizes à Base de Quitosano para o Tratamento de Feridas

equivalentes como penso para o tratamento deste tipo de feridas neste modelo animal, numa avaliação quantitativa.

Observa-se que a matriz D2P2 aparenta ter um desempenho menos variável (embora tenha sido necessário excluir um dos animais por ter perdido o penso durante o ensaio), no entanto, a matriz combinada de microfibras e nanofibras parece apresentar o maior potencial, com 3 dos 5 animais a apresentar taxas de cicatrização superiores a 99%, sendo que um apresentou reepitelização total da ferida, o único de todos os animais testados.

Tal como foi observado nos animais tratados com a matriz porosa, também no caso deste teste, com matrizes combinadas, o processo de cura das feridas ocorreu pela combinação de dois processos: contração e reepitelização. Estes dois processos estão demonstrados no exemplo da Figura 5.18.

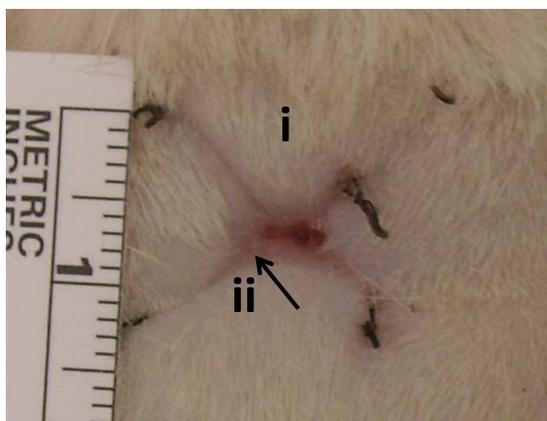


Figura 5.18 - Fotografia de zona da ferida tratada com matriz combinada ao fim de 21 dias; i - cura de ferida por contração; ii - zona reepitelizada

### 3.4.1. Análise histológica dos resultados

Tal como realizada para os ensaios com as matrizes porosas, também para as matrizes combinadas foram feitas análises histológicas. Os dados histológicos foram analisados para os 5 animais constituintes deste grupo. Os animais deste grupo apresentam uma reepitelização avançada, nalguns casos total, ou com úlcera muito reduzida. Foi ainda observado que no final dos 21 dias de experiência é possível observar a presença de microfibras que mantêm a sua estrutura original, não sendo possível a visualização de nanofibras por este método. Na Figura 5.19 está apresentado um corte histológico para um animal de comportamento médio neste grupo (97,7% de cura de ferida).

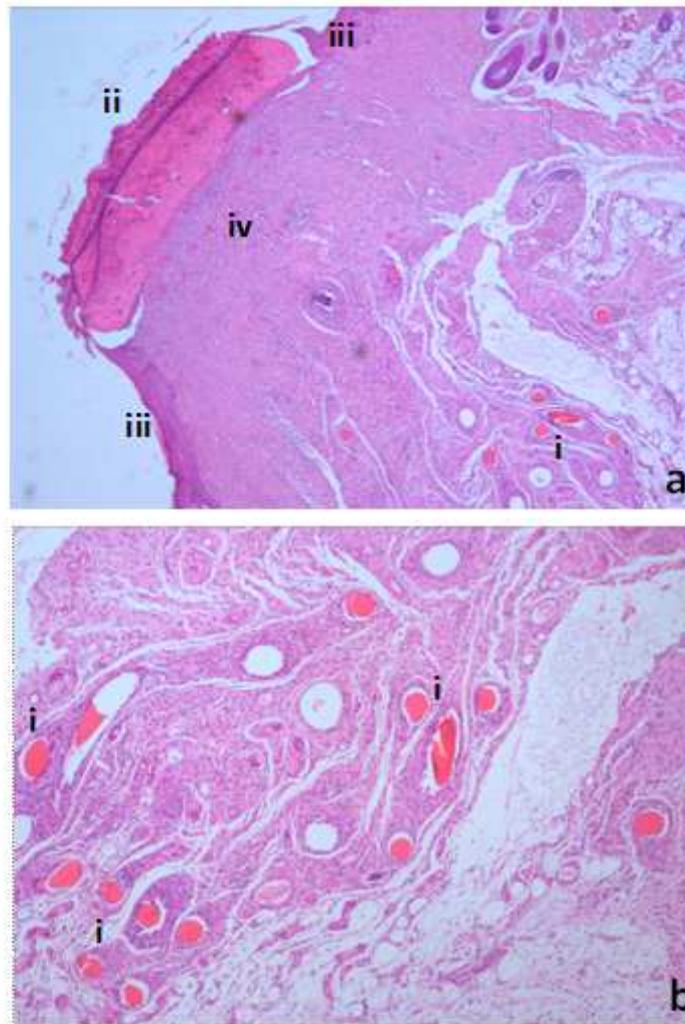


Figura 5.19 - Corte histológico de um animal tratado com uma matriz combinada; a - zona da úlcera ao final de 21 dias; b - pormenor da zona sub-cutânea; i - microfibras de quitosano; ii - crosta; iii -epitelização; iv - vascularização

A zona da úlcera apresenta elevada vascularização, que é essencial para o processo de cicatrização. A epitelização está muito evoluída encontrando-se uma lingueta de epitélio nas duas extremidades da úlcera restante. Ao fim de 21 dias ainda é possível encontrar material da matriz aplicada em grande profundidade, indicando que ocorreu o processo de cicatrização englobando a matriz. Como é normal para qualquer material introduzido no organismo, observa-se uma reacção de corpo estranho com activação de macrófagos e de células gigantes multinucleadas. É de referir que sendo este um animal com um desempenho de cicatrização medíocre dentro do grupo, o tecido formado apresenta a estrutura adequada e compatível com um processo bem guiado. O facto de a matriz ser observável indica que esta serviu de suporte à proliferação celular envolvida no processo de cicatrização. Estes resultados mostram um processo de cicatrização muito mais acelerado e completo do que o observado em qualquer grupo de controlo, demonstrando a importância do quitosano para o tratamento de feridas, diminuindo o tempo de recuperação e as complicações associadas a esta.

## Produção de Matrizes à Base de Quitosano para o Tratamento de Feridas

Para efeitos de comparação, foram observados os cortes histológicos dos dois animais com melhor desempenho no grupo das matrizes combinadas (100% de cura de ferida) e do grupo D2P2 (99,5% de cura de ferida). As imagens estão apresentadas na Figura 5.20.

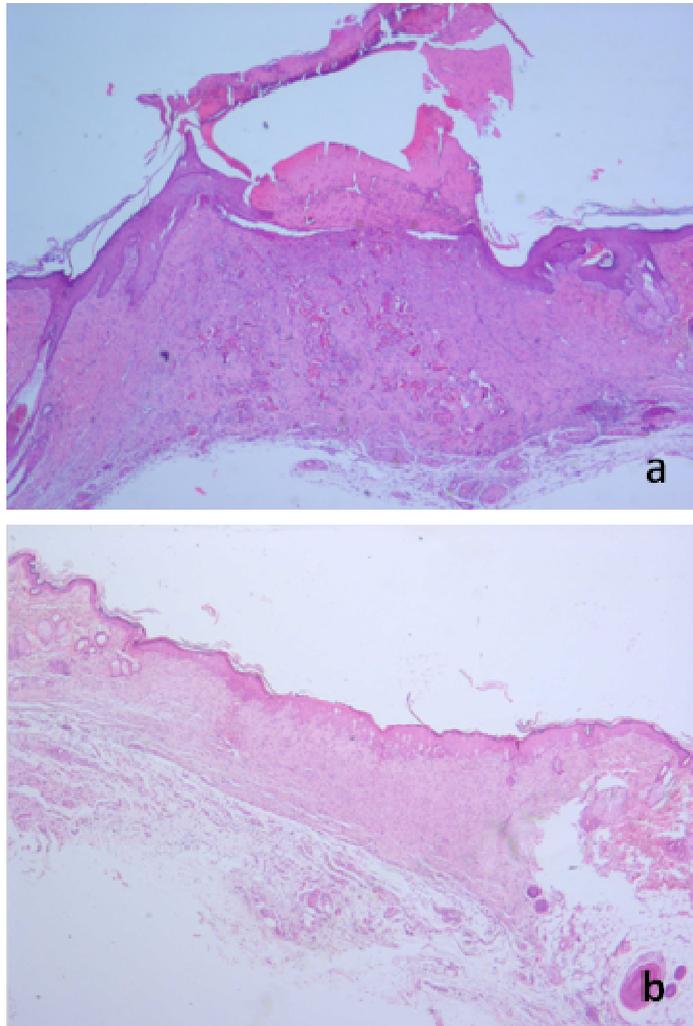


Figura 5.20 - Corte histológico de um animal do grupo tratado com matriz porosa (a) e com matriz combinada (b)

Embora quantitativamente a cura da ferida quando tratadas com matriz porosa ou com matriz combinada sejam comparáveis, histologicamente verifica-se que o segundo caso apresenta um processo de cicatrização muito evoluído, como observável na Figura 5.20. A epiteliação do animal tratado com a matriz porosa está incompleta, e ainda se observa úlcera, ao contrário do outro. Para a ferida tratada com a matriz porosa verifica-se uma reepitelização completa, estruturada com a formação de papilas, com células coesas e pavimento queratinoso estruturado. O infiltrado inflamatório encontra-se muito reduzido, indicando que o processo inflamatório típico da cicatrização já estará em regressão. Todas estas características são ainda mais evidentes na imagem apresentada na Figura 5.21.

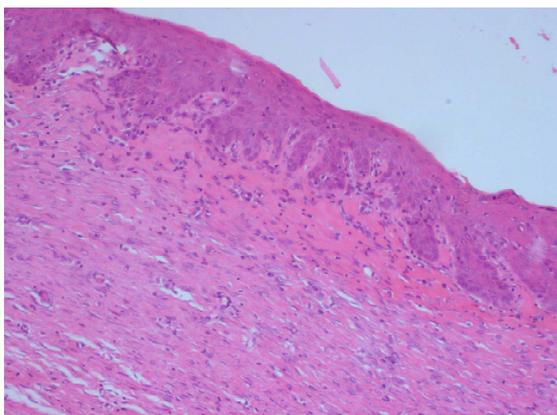


Figura 5.21 - Pormenor do corte histológico da zona central da ferida cicatrizada do animal com fecho de ferida 100%

#### 4. Conclusão

Foi desenvolvida uma matriz combinada de microfibras e nanofibras de quitosano para ser utilizada no tratamento de feridas. Esta matriz alia as propriedades do quitosano à elevada área superficial e grande porosidade de uma matriz de nanofibras numa estrutura resistente, moldável e perfeitamente adaptável a todas as formas e irregularidades de uma ferida. Este conjunto de características tornam ainda esta matriz num candidato ideal para suporte em Engenharia de Tecidos. Esta matriz foi testada com sucesso num modelo animal, tendo demonstrado um desempenho muito superior na cicatrização de feridas, em relação a um tratamento tradicional ou a uma matriz porosa de quitosano, desenvolvida e apresentada no capítulo anterior.

As microfibras de quitosano foram produzidas através de fiação húmida. O estudo de optimização do processo levou à selecção da solução de quitosano com uma concentração de 3% (m/m) e peso molecular 650.000. Estas duas características, juntamente com o caudal da solução do processo, foram determinadas fundamentalmente com base na sua resistência mecânica. Foi ainda desenvolvido um processo de lavagem das fibras eficaz para a remoção dos sais de sódio, após a coagulação, utilizando um primeiro banho de mistura água/metanol, seguido por um banho de metanol.

O processo de electrofiação para a produção de nanofibras de quitosano foi optimizado através do estudo de vários parâmetros do sistema. É de destacar a selecção da solução de mistura de quitosano a 2% (m/m) com PEO a 0,67% (m/m) em ácido acético a 2% (v/v).

As matrizes combinadas foram obtidas por deposição directa das nanofibras sobre uma camada de microfibras, intercaladas sucessivamente. As matrizes combinadas foram caracterizadas morfológicamente por microscopia óptica e SEM. Observou-se que as nanofibras produzidas nestas condições apresentavam-se sem defeitos, homogéneas, formando uma estrutura de elevada porosidade. A matriz combinada forma uma estrutura coesa, com ausência de grandes

## Produção de Matrizes à Base de Quitosano para o Tratamento de Feridas

espaços vazios entre camadas. Estas características reunidas possibilitam o seu propósito de simular a MEC durante o processo de cicatrização.

O estudo do desempenho biológico desta matriz *in vitro*, demonstrou que os fibroblastos 3T3, após 72 horas de proliferação na estrutura combinada aderem ao complexo de nanofibras e que penetram na estrutura em profundidade, confirmando que esta matriz combinada promove a mobilidade celular e que poderá servir de base ao crescimento de tecidos na cicatrização de uma ferida.

A matriz combinada aplicada no tratamento de uma ferida num modelo animal apresentou um bom desempenho, com uma percentagem de cura de ferida média de  $(98,6 \pm 1,7)\%$ , muito superior aos valores típicos de controlo de  $(78,0 \pm 15,0)\%$ . Este resultado é equiparável ao melhor desempenho obtido com a utilização de uma matriz porosa. O superior desempenho das matrizes combinadas no tratamento de feridas foi confirmado pela análise histológica da zona de cicatrização. Os animais tratados com as matrizes combinadas apresentaram uma reepitelização mais avançada, com zona de úlcera inexistente ou muito reduzida, e estruturas histológicas mais maduras, nomeadamente a presença de papilas dérmicas. Verificou-se a presença de microfibras ao longo da profundidade do novo tecido, podendo indicar que a matriz serviu de suporte à migração e proliferação celular durante a cicatrização.

As matrizes combinadas ofereceram as melhores condições para cicatrização de todas as matrizes estudadas neste trabalho, tendo sido obtidos os melhores resultados de desempenho de cura. Este facto deve-se à elevada área superficial, porosidade, resistência e eficiente cobertura da ferida, aliadas às propriedades biológicas do quitosano.

## Capítulo VI - Certificação de Dispositivos Médicos

### 1. Dispositivo Médico e marcação CE

Um dispositivo médico (DM) é definido, segundo a Directiva 93/42/EEC<sup>(180)</sup>, transposta para o direito interno pelo Decreto-Lei n.º 145/2009, de 17 de Junho, como:

*“(...) qualquer instrumento, aparelho, equipamento, “software”, material ou outro artigo, utilizado isoladamente ou em combinação, incluindo o “software” destinado pelo seu fabricante a ser utilizado especificamente para fins de diagnóstico e/ou terapêuticos e que seja necessário para o bom funcionamento do dispositivo médico, destinado pelo fabricante a ser utilizado em seres humanos para efeitos de:*

- diagnóstico, prevenção, controlo, tratamento ou atenuação de uma doença,*
- diagnóstico, controlo, tratamento, atenuação ou compensação de uma lesão ou de uma deficiência,*
- estudo, substituição ou alteração da anatomia ou de um processo fisiológico,*
- controlo da concepção,*

*cujo principal efeito pretendido no corpo humano não seja alcançado por efeitos farmacológicos, imunológicos ou metabólicos, embora a sua função possa ser apoiada por esses meios.”*

Um penso para o tratamento de feridas é assim, e de acordo com esta definição, um dispositivo médico.

Qualquer DM tem que ter a marcação CE para poder ser comercializado na Europa. A marcação CE foi instituída na Europa como uma forma de garantir a conformidade com as directivas de harmonização técnica, favorecendo a introdução no mercado europeu de produtos industriais. Tal é atingido através de meios harmonizados de avaliação dessa conformidade com vista a preservar interesses públicos como a saúde e a segurança dos utilizadores dos produtos. A marcação CE é em si uma garantia da conformidade de um produto com os requisitos essenciais que lhe são aplicáveis. A conformidade do produto é responsabilidade do fabricante<sup>(33,181)</sup>.

Após ter recebido a marcação CE os Estados-Membros não poderão restringir a comercialização e a colocação em serviço do produto, excepto se existirem provas de não conformidade dos mesmos<sup>(181)</sup>.

A marcação CE refere-se a todo o ciclo de vida do produto, desde a concepção, ao fabrico, comercialização e colocação em serviço.

A marcação CE de um DM é garantia de certos aspectos do produto como<sup>(33)</sup>:

- apropriado à sua finalidade, garantindo que este seja utilizado de acordo com o fim a que se destina, devendo ser especificada e conter todas as informações necessárias para tal;
- seguro, não apresentando riscos para a saúde do doente, utilizadores ou outros, e os riscos que possam ser associados ao seu uso devem ser aceitáveis quando comparados com os benefícios que trazem ao doente;
- alcança as características e o desempenho indicados pelo fabricante.

### **1.1. Processo de marcação CE**

A marcação CE de um DM deve ser solicitada pelo fabricante, sobre quem recai a responsabilidade deste processo, dado que apenas este pode demonstrar a conformidade do produto com a directiva aplicável. Este processo envolve várias etapas, umas mais complexas e extensas do tempo, ou mais dispendiosas, do que outras.

#### **1.1.1. Classificação dos dispositivos médicos**

Os dispositivos médicos são divididos em quatro classes, cujo objectivo é classificá-los em termos de procedimentos para análise de conformidade com a legislação e directivas. Esta divisão em classes é feita com base na duração do contacto do DM com o corpo humano, invasibilidade do corpo humano, anatomia afectada pela utilização e riscos potenciais decorrentes da concepção técnica e do fabrico. A classificação atribuída pelo fabricante ao DM irá condicionar os procedimentos que deverá adoptar.

Os DM estão assim divididos em quatro classes: I, IIa, IIb e III. Os critérios de classificação dos DM estão descritos no Anexo IX da Directiva 93/42/ECC. e têm por base

A análise dos dispositivos de classe I, dada a baixa vulnerabilidade de um paciente à sua utilização, pode ser realizada sob a responsabilidade do fabricante, bastando para tal a elaboração de uma Declaração de Conformidade e a notificação da Autoridade Competente. Para dispositivos pertencentes à classe IIa, a intervenção de uma identidade certificadora é obrigatória durante a fase de produção. Por fim, para DM da classe IIb e III, que representam dois grupos com um potencial de risco bastante elevado, é obrigatória uma inspecção do processo de concepção e desenvolvimento e da produção.

No caso dos DM apresentados neste trabalho, ou seja, pensos para o tratamento de feridas, e tendo em conta que incluem na sua composição quitosano obtido da casca do camarão, estes recaem na classe III. Pela sua aplicação pertenceriam a uma classe de nível de risco mais baixa (aplicação externa por um espaço de tempo curto), mas o facto de incluírem produtos de origem

animal leva a um acréscimo no nível de risco associado. Aplica-se neste caso a Regra nº 17, Anexo IX, Decreto-Lei n.º 145/2009, de 17 de Junho:

*“Todos os dispositivos em cujo fabrico se utilizem tecidos de origem animal ou seus derivados tornados não viáveis pertencem à classe III, excepto se esses dispositivos se destinarem a entrar em contacto apenas com pele intacta.”*

### **1.1.2. Sistema de Gestão da Qualidade**

O fabricante do DM deverá ter um Sistema de Gestão da Qualidade (SGQ) implementado de acordo com a Directiva de DM, Anexo II ou V. A conformidade com a Directiva pode ser mais facilmente atingida seguindo a norma ISO 13485 – “Medical devices – Quality management systems – Requirements for regulatory purposes”, que especifica quais os requisitos para um SGQ numa organização que precisa de demonstrar a sua capacidade de fornecer DM e serviços relacionados, que cumprem consistentemente os requisitos dos seus clientes assim como os requisitos regulamentados aplicáveis<sup>(182)</sup>.

### **1.1.3. Requisitos Essenciais**

A garantia da conformidade do DM é alcançada através do cumprimento dos Requisitos Essenciais, constantes na Directiva 93/42/ECC. Estes requisitos constituem uma série de exigências que, quando consideradas aplicáveis ao dispositivo, devem ser cumpridas, demonstradas e/ou comprovadas. Em geral, estes requisitos prendem-se com questões de segurança. Estes requisitos estão por sua vez divididos em várias áreas.

O primeiro requisito apontado na directiva tem por objectivo a garantia de que o produto é concebido e manufacturado de forma que, quando utilizado para o fim determinado, não comprometa o estado clínico nem a segurança do paciente nem de outras pessoas. No caso de existirem riscos associados a esta etapa, estes deverão ser ponderados face aos benefícios esperados.

- **Concepção e Desenvolvimento**

A concepção e desenvolvimento do dispositivo médico deve ser realizada tendo em conta o conhecimento existente à data sobre o assunto. Os riscos relacionados com o DM devem ser eliminados ou diminuídos o máximo possível durante esta fase. No caso de não ser possível eliminar o risco, devem ser tomadas medidas de prevenção, e até de alarme se necessário, relativamente a esse risco. Os utilizadores devem ser informados de qualquer risco residual devido à falha da medida de prevenção.

Durante a concepção e desenvolvimento de um dispositivo médico há requisitos que devem ser tidos em conta, e que estão listados na directiva.

## Produção de Matrizes à Base de Quitosano para o Tratamento de Feridas

Quanto às propriedades químicas, físicas e biológicas, há que ter em atenção as substâncias utilizadas durante a sua produção, especialmente em relação à sua toxicidade.

O dispositivo e o processo de produção devem ser concebidos de forma a eliminar ou reduzir o mais possível o risco de infecção do paciente ou de outros. No caso específico, que é o presente, de dispositivos que utilizem matérias de origem animal, deve ainda haver um controlo e vigilância veterinárias, informação sobre a origem geográfica do animal, e devem ser tomadas medidas para garantir que o material oferece segurança.

No caso de DM que são distribuídos estéreis, deve ser garantido que se mantêm estéreis até a embalagem ser aberta. Estes dispositivos devem ser produzidos em condições apropriadas e controladas. O processo de esterilização deve ser apropriadamente validado.

- **Desempenho e eficácia do DM**

O DM deve ser capaz de atingir o desempenho indicado e para o qual foi concebido. Deve ainda ser garantido o desempenho e segurança do DM durante a aplicação e utilização, tendo em conta as condicionantes a que vai estar sujeito. Cabe ainda ao produtor garantir que o transporte e armazenamento não irão afectar a segurança do dispositivo.

Os eventuais efeitos secundários provenientes da utilização do DM só serão admissíveis se considerados um risco aceitável quando ponderados face aos benefícios.

- **Avaliação clínica**

Por último, a demonstração de conformidade com os requisitos essenciais inclui uma avaliação clínica. A avaliação clínica não implica obrigatoriamente a realização de testes clínicos. Se a informação disponível de testes anteriores com outros produtos for aplicável, em termos de composição e aplicação, ao que se pretende avaliar a recolha e avaliação crítica desses testes é suficiente para provar a segurança clínica do DM.

### **1.1.4. Dossier Técnico**

Ao mesmo tempo que o SGQ é implementado é necessário preparar o *Dossier Técnico* (DT). Este *dossier* consiste numa compilação de documentos técnicos referentes à segurança e eficácia do dispositivo. Não existem indicações específicas sobre que informação deverá conter, mas é necessário que inclua todos os elementos relevantes na demonstração da conformidade com os Requisitos Essenciais. Esta compilação de informação deverá ser revista pela entidade que irá conferir a marcação CE.

O DT poderá incluir a descrição do dispositivo, utilização prevista, especificações do produto, desenhos técnicos, instruções de uso, embalagem e etiquetas, informação clínica, análise de risco, testes de desempenho, documentação sobre o processo de fabrico, normas e directivas

utilizadas, assim como outros documentos utilizados relevantes. Algumas destas categorias poderão não ser aplicáveis, e outras poderão ter que ser acrescentadas de forma a todo o processo ser rigorosamente documentado.

Apesar de não vir especificado na directiva dos DM, as leis nacionais dos países da EU obrigam a que as etiquetas e a bula que acompanham o DM estejam traduzidas na língua nacional do país em que serão comercializados.

### **1.1.5. Auditoria de certificação**

Uma vez o DT terminado e o SGQ implementado, estes devem ser auditados pelo Organismo Notificado (ON). O ON é uma organização pública ou privada que foi creditada para validar a conformidade do dispositivo com as Directivas Europeias, sendo reconhecido pela Comissão Europeia que lhe atribui um código de identificação de quatro dígitos (que aparecerá associado à marcação CE nos produtos que por ele foram avaliados)<sup>(33)</sup>. No caso desta auditoria decorrer com sucesso é emitido o Certificado CE de Conformidade. A partir dessa altura a certificação é mantida através da auditoria anual.

A emissão deste certificado leva à elaboração da Declaração de Conformidade. Esta declaração consiste numa página na qual o fabricante do DM declara a total conformidade com os Requisitos Essenciais da Directiva 93/42/EEC.

### **1.1.6. Colocação no mercado do DM**

Após se ter obtido a marcação CE e se ter colocado o DM no mercado é necessário continuar a monitorizar a sua segurança e eficácia. Isto inclui a gestão de eventuais relatos de incidentes de acordo com a Directiva de DM assim como uma vigilância pós-comercialização eficaz. É necessário ainda assegurar e manter actualizado um processo de análise sistemática da experiência adquirida com os dispositivos médicos nesta fase. Deverão também ser desenvolvidos meios adequados para a execução de quaisquer acções correctivas de segurança necessárias. Deste processo advêm eventuais medidas preventivas e/ou correctivas que sejam consideradas necessárias e adequadas.

Os dispositivos médicos colocados no mercado são supervisionados pela Autoridade Competente nacional. Esta Autoridade Competente é indicada pelo próprio país e reporta ao ministério da saúde nacional, assegurando que os dispositivos médicos satisfazem os requisitos legais aplicáveis. Em Portugal a Autoridade Competente para a área dos DM é o INFARMED.

## **2. Certificação dos pensos desenvolvidos no âmbito deste trabalho**

Dois dos produtos desenvolvidos neste trabalho foram certificados com sucesso, seguindo o processo descrito. Os dois produtos em causa são o hidrogel de quitosano, designado comercialmente por HidroKi<sup>®</sup>, e a matriz porosa, AbsorKi<sup>®</sup>.

A fase de Concepção e Desenvolvimento destes produtos foi constituída em grande parte pelo trabalho descrito nesta tese. Além dos estudos aqui apresentados foram realizados muitos outros necessários na averiguação da segurança e desempenho do produto final, consistindo maioritariamente em processos de validação. É de destacar nestes processos de validação a Validação da Esterilização, em que essencialmente o método de esterilização seleccionado a partir dos estudos feitos durante a concepção e desenvolvimento é validado quanto à sua segurança, eficácia, prazo de garantia de esterilidade e reprodutibilidade nas instalações onde será realizada. Foi também realizada a Validação da Embalagem, necessária para garantir que a embalagem adoptada para cada um dos produtos foi a mais indicada para o processo de esterilização adoptado assim como o prazo de validade definido. O prazo de validade por sua vez também foi validado através de um estudo em que foi simulado o envelhecimento acelerado do produto, o qual foi realizado com o objectivo de determinar se o produto mantém as suas características durante o tempo equivalente.

A acompanhar este processo foi realizada toda a investigação sobre experiências anteriores com produtos equivalentes, de forma a se obter o máximo de informação relevante para os produtos em questão.

Assim, e como poderá ser possível deduzir a partir do descrito neste trabalho, o processo de comercialização de um penso para o tratamento de feridas requer um trabalho exaustivo, minucioso e cuidado. A responsabilidade de desenvolver trabalho na área dos dispositivos médicos que origine produtos colocados no mercado está directamente ligada à segurança de pessoas e aos riscos que daí advêm.

## Capítulo VII – Conclusão Final

Este trabalho teve como objectivo o desenvolvimento de dispositivos médicos à base de quitosano para o tratamento de feridas. Esta é uma área de investigação muito activa, sendo de focar a procura de novas matérias-primas. Neste trabalho foi atingido esse objectivo, culminando com a comercialização de dois novos produtos.

Foram desenvolvidos três dispositivos diferentes utilizando este biopolímero manipulado de forma a originar estruturas com diferentes características: um hidrogel, uma matriz porosa e uma matriz combinada de microfibras e nanofibras. Os dois primeiros foram certificados e industrializados em ambiente empresarial com os nomes HidroKi<sup>®</sup> e AbsorKi<sup>®</sup>, respectivamente. Foi demonstrado que, de acordo com a sua estrutura, um dispositivo médico de quitosano pode desempenhar funções semelhantes às de um penso tradicional, protegendo e mantendo a humidade da ferida, e que é possível tirar o máximo partido das propriedades biológicas deste polímero através de estruturas que se adaptem às feridas e permitam a proliferação celular, servindo de suporte ao processo de regeneração.

Foi também verificado que o desempenho de dispositivos médicos no tratamento de feridas em modelos animal difere dos modelos celulares devido à necessidade de apresentarem características físicas que promovam adesão à ferida e flexibilidade, características que não parecem ter influência em modelos celulares.

A produção de matrizes combinadas pelo processo descrito é complexo e demorado. Dado o potencial demonstrado das nanofibras no tratamento de feridas, devem ser exploradas alternativas para a preparação de dispositivos médicos à base destas estruturas de quitosano com as propriedades físicas adequadas para o tratamento de feridas. Estas alternativas, tendo em conta a possibilidade de um aumento de escala simples, podem permitir a certificação e industrialização de um dispositivo médico à base de nanofibras.

Uma das medidas consideradas para estudar o desempenho dos dispositivos foi a diminuição da área de ferida. Durante a fase de cicatrização o tamanho de ferida irá diminuir por contracção e por formação de pele nova. Os métodos utilizados neste estudo não permitiram diferenciar estes dois factores, sendo de destacar a importância do crescimento de pele nova. Se o fecho de uma ferida ocorrer unicamente por contracção, a pele resultante terá limitações nas suas funções, nomeadamente elasticidade, além de possíveis problemas estéticos. Será interessante, de futuro, estudar a função da matriz combinada no processo de regeneração da pele utilizando técnicas que permitam evitar o fecho da ferida por contracção em modelos animal.

O trabalho desenvolvido no âmbito desta tese inserido numa empresa de dispositivos médicos, permitiu que o conhecimento adquirido se materializasse na forma de dois produtos com retorno

Produção de Matrizes à Base de Quitosano para o Tratamento de Feridas

de investimento, tendo sido atingidos os objectivos propostos de um ponto de vista académico e empresarial.

## Bibliografia

1. *ISO 10993-12:2002- Biological evaluation of medical devices: Sample preparation and reference materials.*
2. **Yannas, I. V.** *Tissue and Organ Regeneration in Adults.* New York : Springer, 2001.
3. *Biomaterials for tissue engineering of skin.* **MacNeil, Sheila.** 2008, *Materials Today*, pp. 11, 26-35.
4. *Tissue Engineering of Skin.* **Pomahac, B., et al.** 1998, *Crit Rev Oral Biol Med*, pp. 9(3): 333-344.
5. *Chitosan and Alginate Wound Dressings: A Short Review.* **Paul, W. and Sharma, C. P.** 2004, *Trends Biomater. Artif. Organs*, Vol. 18 (1), pp. 18-23.
6. **Dee, Kay C., Puleo, David A. and Bizios, Rena.** *An Introduction to Tissue-Biomaterial Interactions.* New Jersey : John Wiley & Sons, 2002.
7. **Atala, A. and Lanza, R. P.** *Methods of Tissue Engineering.* Londres : Academic Press, Elsevier, 2002.
8. **Rajendran, S.** *Advanced textiles for wound care.* Cambridge, UK : Woodhead Publishing Limited, 2009.
9. **Rainey, Joy.** *Wound Care: A Handbook for Community Nurses.* Londres, Reino Unido : Whurr Publishers, 2002.
10. *Textile-based smart wound dressings.* **Gupta, B., Agarwal, R. and Alam, M. S.** 2010, *Indian Journal of Fibre & Textile Research*, Vol. 35, pp. 174-187.
11. [http://www.scielo.cl/scielo.php?pid=S0366-16442000000200021&script=sci\\_arttext](http://www.scielo.cl/scielo.php?pid=S0366-16442000000200021&script=sci_arttext).  
Dezembro 2010.
12. *Chitin and chitosan polymers: Chemistry, solubility and fiber formation.* **Pillai, C. K. S., Paul, W. and Sharma, C. P.** 2009, *Progress in Polymer Science*, Vol. 34, pp. 641-678.
13. *Chitin and chitosan: Properties and applications.* **Rinaudo, Marguerite.** 2006, *Prog. Polym. Sci.*, Vol. 31, pp. 603–632.
14. *Overview on structural characterization of chitosan molecules in relation with their behavior in solution.* **Brugnerotto, J., et al.** 2001, *Macromol. Symp.*, Vol. 168, pp. 1-20.

15. *Preparation and function of composite asymmetric chitosan/CM-chitosan membrane.* **Pang, H. T., et al.** 2008, J Mater Sci: Mater Med, Vol. 19, pp. 1413-1417.
16. *Photocrosslinkable chitosan as a dressing for wound occlusion and accelerator in healing process.* **Ishihara, M., et al.** 2002, Biomaterials, Vol. 23, pp. 833-840.
17. *Chitosan application to X-ray irradiated wound in dogs.* **Ueno, H., et al.** 2007, Journal of Plastic, Reconstructive & Aesthetic Surgery, Vol. 60, pp. 304-310.
18. *Topical formulations and wound healing applications of chitosan.* **Ueno, H., Mori, T. and Fujinaga, T.** 2001, Advanced Drug Delivery Reviews, Vol. 52, pp. 105-115.
19. *Advanced textile materials and biopolymers in wound management.* **Petrulyte, S.** 2008, Dan. Med. Bull., Vol. 55, pp. 72-77.
20. *Research in to the Process of Manufacturing Alginate-Chitosan Fibres.* **Steplewski, W., et al.** 2006, Fibres & Textiles in Eastern Europe, Vol. 14(4), pp. 25-31.
21. *Some fragrant fibres and yarns based on chitosan.* **Hirano, S. and Hayashi, H.** 2003, Carbohydrate Polymers, Vol. 54, pp. 131-136.
22. *The N-acylation of chitosan fibres and the N-deacetylation of chitin fibre and chitin-cellulose blended fibre at a solid state.* **Hirano, S., et al.** 2000, Carbohydrate Polymers, Vol. 41, pp. 175-179.
23. *Fibrous poly(chitosan-g-DL-lactic acid) scaffolds prepared via electro-wet-spinning.* **Wan, Y., et al.** 2008, Acta Biomaterialia, Vol. 4, pp. 876-886.
24. *Preparation of chitosan microfibrils using electro-wet-spinning and their electroactuation properties.* **Lee, C. K., et al.** 2006, Smart Mater. Struct., Vol. 15, pp. 607-611.
25. *"in vitro" Osteoclastogenesis on Textile Chitosan Scaffolds.* **Heinemann, C., et al.** 2010, European Cells and Materials, Vol. 19, pp. 96-106.
26. *Preparation and characterization of polyethylene oxide (PEO)/gelatin blend for biomedical application: Effect of gamma irradiation.* **Rahman, M. A., Khan, M. A. and Tareq, S. M.** 2010, Journal of Applied Polymer Science, Vol. 117(4), pp. 2075-2082.
27. <http://www.oe-chemicals.com/news.html>. Dezembro 2010.
28. **Cook, J. G.** *Handbook of Textile Fibres - Man-made Fibres.* Trowbridge : Merrow Publishing, 1984. Vol. II.

29. *Coagulation Rate Studies of Spinnable Chitosan Solutions*. **Knaul, J. Z. and Creber, K. A. M.** 1997, *Journal of Applied Polymer Science*, Vol. 66, pp. 117-127.
30. <http://www.neotherix.com/technology.php>. Dezembro 2010.
31. **Ramakrishna, S., et al.** *An Introduction to Electrospinning and Nanofibers*. Singapore : World Scientific Publishing, 2005.
32. *Rheometric Study of the Gelation of Chitosan in Aqueous Solution without Cross-Linking Agent*. **Montebault, A., Viton, C. and Domard, A.** 2005, *Biomacromolecules*, Vol. 6, pp. 653-662.
33. **Leng, Y.** *Materials Characterization: Introduction to Microscopic and Spectroscopic Methods*. Singapore : John Wiley & Sons, 2008.
34. *Determination of degree of deacetylation of chitosan by <sup>1</sup>H NMR spectroscopy*. **Hirai, A., Odani, H. and Nakajima, A.** 1991, *Polymer Bulletin*, Vol. 26, pp. 87-94.
35. *Electrospun cellulose nanofiber as affinity membrane*. **Ma, Z., Kotaki, M. and Ramakrishna, S.** 2005, *Journal of Membrane Science*, Vol. 265, pp. 115-123.
36. *ISO 10993-5:2009- Biological evaluation of medical devices-Tests for "in vitro" cytotoxicity*.
37. *ISO 10993-10:2002-Biological evaluation of medical devices- Tests for irritation and delayed-type hypersensitivity*.
38. *"in vitro" and "in vivo" biological performance of collagen-chitosan/silicone membrane bilayer dermal equivalent*. **Ma, L., et al.** 2007, *J Mat Sci: Mater Med*, Vol. 18, pp. 2185-2191.
39. *ISO 10993-1:2009-Biological Evaluation of Medical Devices- Evaluation and testing within a risk management process*.
40. *Properties of chitosan containing PP-g-AA-g-NIPAAm bigraft nonwoven fabric for wound dressing*. **Yang, J. M. and Lin, H. T.** 2004, *Journal of Membrane Science*, Vol. 243, pp. 1-7.
41. *Fabrication and characterization of a sponge-like asymmetric chitosan membrane as a wound dressing*. **Mi, F. L., et al.** 2001, *Biomaterials*, Vol. 22, pp. 165-173.
42. *Chitosan acetate bandage as a topical antimicrobial dressing for infected burns*. **Dai, T., et al.** 2008, *Antimicrob Agents Chemother*, Vol. 53(2), pp. 393-400.
43. *An investigation on burn wound healing in rats with chitosan gel formulation containing epidermal growth factor*. **Alemdaroglu, C., et al.** 2006, *Burns*, Vol. 32, pp. 319-327.

44. *Chitosan and its derivatives for tissue engineering applications*. **Kim, I. Y., et al.** 2008, *Biotechnol Adv*, Vol. 26, pp. 1-21.
45. *Evaluation of adhesion, proliferation, and functional differentiation of dermal fibroblasts on glycosaminoglycan-coated polysulfone membranes*. **Attia, J., et al.** 2008, *Tissue Eng Part A*, Vol. 14, pp. 1687-1697.
46. *Accelerating effects of chitosan for healing at early phase of experimental open wound in dogs*. **Ueno, H., et al.** 1999, *Biomaterials*, Vol. 20, pp. 1407-1414.
47. *Effect of chitosan film containing basic fibroblast growth factor on wound healing in genetically diabetic mice*. **Mizuno, K., et al.** 2003, *J Biomed Mater Res A*, Vol. 64, pp. 177-181.
48. *The effect of continuous release of recombinant human epidermal growth factor (rh-EGF) in chitosan films on full thickness excisional porcine wounds*. **Hong, J. P., et al.** [ed.] 2923. 2008, *Ann Plast Surg*, Vol. 61, p. 2892.
49. *Development of a chitosan-based wound dressing with improved hemostatic and antimicrobial properties*. **Ong, S. Y., et al.** 2008, *Biomaterials*, Vol. 29, pp. 4323-4332.
50. *Effects of nonwoven mats of Di-O-butyrylchitin and related polymers on the process of wound healing*. **Blansinska, A. and Drobnik, J.** 2008, *Biomacromolecules*, Vol. 9, pp. 776-782.
51. **Ribeiro, M. P., et al.** Development of a new chitosan hydrogel for wound dressing. *Wound Rep Reg*. 2009, pp. 1-8.
52. *Chitosan Hemostatic Dressing for Renal Parenchymal Wound Sealing in a Porcine Model: Implications for Laparoscopic Partial Nephrectomy Technique*. **Xie, et al.** 2008, *JSLs*, Vol. 12, pp. 18-24.
53. *A New Hemostatic Agent: Initial Life-Saving Experience With Celox (Chitosan) in Cardiothoracic Surgery*. **Millner, R. W. J., et al.** 2009, *Ann Thorac Surg*, Vol. 87, pp. 13-14.
54. *Effect of a Chitosan-Based Hemostatic Dressing on Blood Loss and Survival in a Model of Severe Venous Hemorrhage and Hepatic Injury in Swine*. **Pusateri, A. E., et al.** 2003, *J Traum*, Vol. 54, pp. 177-182.
55. *Chitosan: A new hemostatic*. **Malette, W. G., et al.** 1983, *Ann Thorac Surg*, Vol. 36, pp. 55-58.
56. *Engineering extracellular matrix through nanotechnology*. **Kelleher, Cassandra M. and Vacanti, Joseph P.** 2010, *J. R. Soc. Interface*, pp. 7, S717-S729.

57. *Interaction of macrophages with fibrous materials in vitro*. **Bernatchez, S. F., Parks, P. J. and Gibbons, D. F.** 1996, *Biomaterials*, Vol. 17, pp. 2077-2086.
58. *Fibres for wound dressings based on mixed carbohydrate polymer fibres*. **Miraftab, M., et al.** 2003, *Carbohydrate Polymers*, Vol. 53, pp. 225-231.
59. *Chitin and chitosan fibres: A review*. **Kumar, M. N. V.** 1999, *Bull. Mater. Sci.*, Vols. 22, No.5, pp. 905-915.
60. *Chitosan Fibres Modified by Fibroin*. **Strobin, G., et al.** 2007, *Fibres & Textiles in Eastern Europe*, Vol. 15, pp. 64-65.
61. *Directiva 93/42/EEC*.
62. *Electrospun non-woven nanofibrous hybrid mats based on chitosan and PLA for wound-dressing applications*. **Ignatova, M., et al.** 2008, *Macromol Biosci*, Vol. 9(1), pp. 102-111.
63. *Porous chitin matrices for Tissue Engineering: Fabrication and in vitro cytotoxic assessment*. **Chow, K. S., Khor, E. e Wan, A. C. A.** 1, 2001, Vol. 8, pp. 27-35.
64. *Novel alginate sponges for cell culture and transplantation*. **Shapiro, L. e Cohen, S.** 8, 1997, *Biomaterials*, Vol. 18, pp. 583-590.
65. *A preliminary in vitro study on the fabrication and tissue engineering applications of a novel chitosan bilayer material as a scaffold on human neonatal dermal fibroblasts*. **Ma, J., et al.** 2001, *Biomaterials*, Vol. 22, pp. 331-336.
66. *Porous chitosan scaffolds for tissue engineering*. **Madihally, S. V. e Matthew, H. W. T.** 1999, *Biomaterials*, Vol. 20, pp. 1133-1142.
67. *Cellular materials as porous scaffolds for tissue engineering*. **Freyman, T. M., Yannas, I. V. e Gibson, L. J.** 2001, *Progress in Materials Science*, Vol. 46, pp. 273-282.
68. *In vitro characterization of chitosan scaffolds: influence of composition and deacetylation degree*. **Tigli, R. S., Karakeçili, A. e Gumusderelioglu, M.** 2007, *J Mater Sci: Mater Med*, Vol. 18, pp. 1665-1674.
69. *Gelatin-fibrinogen cryogel dermal matrices for wound repair: Preparation, optimisation and in vitro study*. **Dainiak, M. B., et al.** 2010, *Biomaterials*, Vol. 31, pp. 67-76.
70. *The effect of topology of chitosan biomaterials on the differentiation and proliferation of neural stem cells*. **Wang, G., et al.** 2010, *Acta Biomaterialia*, Vol. 6, pp. 3630-3639.

71. *EPDIM peptide-immobilized porous chitosan beads for enhanced wound healing: Preparation, characterizations and in vitro evaluation*. **Bae, J. W., et al.** 2009, *Materials Science and Engineering C*, Vol. 29, pp. 697-701.
72. *Influence of the degree of acetylation on some biological properties of chitosan films*. **Chatelet, C., Damour, O. e Domard, A.** 2001, *Biomaterials*, Vol. 22, pp. 261-268.
73. **Saladin.** *Anatomy and Physiology: The Unit of Form and Function*. 3ª edição. s.l. : The MacGraw-Hill Companies, 2003.
74. **Dillow, A. K. e Lowman, A. M.** *Biomimetic Materials and Design*. New York : Marcel Dekker, Inc., 2002.
75. **Lodish, H., et al.** *Molecular Cell Biology*. 3ª edição. U.S.A. : W. H. Freeman and Company, 2001.
76. **Paus, R., Burgdorf, W. e Sterry, W.** *Thieme Clinical Companions-Dermatology*. 1ª edição. Nova Iorque : Georg Thieme Verlag KG, 2006.
77. **Jeffcoate, W. J., Price, P. e Harding, K. G.** Wound healing and treatments for people with diabetic foot ulcers. *Diabetes/Metabolism Research and Reviews*. 2004, Vol. 20, 1, pp. 78-89.
78. **Falabella, A. F. e Kirsner, R. S.** *Wound Healing*. U.S.A. : Taylor and Francis Group, LLC, 2005.
79. *Wound Healing Dressings and Drug Delivery Systems: A Review*. **Boateng, J., et al.** 8, 2008, *Journal of Pharmaceutical Sciences*, Vol. 97, pp. 2892-2923.
80. [Online] <http://lupus-bible.com/>.
81. [Online] <http://skininfo.org/normal-skin/normal-skin-structure/>.
82. [Online] <http://www.electrotherapy.org/modalities/tissuerepair.htm>.
83. FERIDASAU. [Online] <http://www.feridasau.sinaisvitalis.pt/>.
84. MedicineNet.com. [Online] <http://www.medterms.com/script/main/art.asp?articlekey=15505>.
85. *Diabetes: Factos e Números, 2010, Relatório Anual do Observatório Nacional da Diabetes, Portugal*.
86. International Working Group on the Diabetic Foot. [Online] <http://www.iwgdf.org/>.
87. AlloDerm - Instructions For Use. [Online] [http://www.lifecell.com/downloads/LC\\_Alloderm114\\_IFU\\_B\\_T4.pdf](http://www.lifecell.com/downloads/LC_Alloderm114_IFU_B_T4.pdf).

88. INTEGRA™ Bilayer Matrix Wound Dressing. [Online]  
[http://www.ilstraining.com/bmwd/bmwd/bmwd\\_it\\_01.html](http://www.ilstraining.com/bmwd/bmwd/bmwd_it_01.html).
89. Epicel - Cultured Epidermal Autografts. [Online] <http://epicel.com/patients/about.aspx>.
90. *Skin Substitutes and Alternatives: A Review*. **Shores, J. T., Gabriel, A. e Gupta, S.** 2007, *Advances in Skin&Wound Care*, Vol. 20, pp. 493-508.
91. **Park, J. B. e Bronzino, J. D.** *Biomaterials: Principles and Applications*. USA : CRC Press, 2003.
92. **Sionkowska, A.** Current research on the blends of natural and synthetic polymers as new biomaterials: Review. *Progress in Polymer Science*. 2011, Vol. 36, pp. 1254-1276.
93. **Dash, M., et al.** Chitosan - A versatile semi-synthetic polymer in biomedical applications. *Progress in Polymer Science*. 2011, Vol. 36, pp. 981-1014.
94. **Kim, S. K.** *Chitin, Chitosan, Oligosaccharides and Their Derivatives - Biological Activities and Applications*. USA : CRC Press, 2011.
95. **Montebault, A., Viton, C. e Domard, A.** Physico-chemical studies of the gelation of chitosan in a hydroalcoholic medium. 2005, Vol. 26, pp. 933-943.
96. —. Physico-chemical studies of the gelation of chitosan in a hydroalcoholic medium. *Biomaterials*. 2005, Vol. 26, pp. 933-943.
97. **Elbert, Donald L.** Liquid-liquid two-phase systems for the production of porous hydrogels and hydrogel microspheres for biomedical applications: A tutorial review. *Acta Biomaterialia*. 2011, Vol. 7, pp. 31-56.
98. **Kim, I. L., Mauck, R. L. e Burdick, J. A.** Hydrogel design for cartilage tissue engineering: A case study with hyaluronic acid. *Biomaterials*. 2011, Vol. 32, pp. 8771-8782.
99. **Sun, J., et al.** PEG derived hydrogel: A novel synthesis route under mild conditions. *Materials Letters*. 2012, Vol. 67, pp. 215-218.
100. **Glampedaki, P., Jovic, D. e Warmoeskerken, M.** Moisture absorption capacity of polyamide 6,6 fabrics surface functionalised by chitosan-based hydrogel finishes. *Progress in Organic Coatings*. 2011, Vol. 72, pp. 562-571.
101. **Vlierberghe, S. V., Dubruel, P. e Schacht, E.** Biopolymer-Based Hydrogels As Scaffolds for Tissue Engineering Applications: A Review. *Biomacromolecules*. 2011, Vol. 12, pp. 1387-1408.

102. **Berger, J., et al.** Structure and interactions in covalently and ionically crosslinked chitosan hydrogels for biomedical applications. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. 2004, Vol. 57, pp. 19-34.
103. **Peppas, N. A.** Intelligent therapeutics: biomimetic systems and nanotechnology in drug delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2004, Vol. 56, pp. 1529-1531.
104. **Hoffman, A. S.** Hydrogels for biomedical applications. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2002, Vol. 43, pp. 3-12.
105. **Ananta, M., Brown, R. A. e Mudera, V.** A rapid fabricated living dermal equivalent for skin tissue engineering: an in vivo evaluation in an acute wound model. *Tissue Engineering Part A*. 2012, Vol. 18, 3-4, pp. 353-361.
106. **Liu, Y., Chen, W. e Kim, H. I.** Antibacterial activity of pH-sensitive genipin cross-linked chitosan/poly(ethylene glycol)/silver nanocomposites. *Polymers for Advanced Technologies*. 2012, Vol. 23, 1, pp. 8-14.
107. **Gouda, M.** Nano-zirconium oxide and nano-silver oxide/cotton gauze fabrics for antimicrobial and wound healing acceleration. *Journal of Industria Textiles*. 2012, Vol. 41, 3, pp. 222-240.
108. **Rustad, K. C., et al.** Enhancement of mesenchymal stem cell angiogenic capacity and stemness by biomimetic hydrogel scaffold. *Biomaterials*. 2012, Vol. 33, 1, pp. 80-90.
109. **Banerjee, I., et al.** Wound pH-Responsive Sustained Release of Therapeutics from poly(NIPAAm-co-AA) Hydrogel. *Journal of Biomaterials Science-Polymer edition*. 2012, Vol. 23, 1-4, pp. 111-132.
110. **Song, A., Rane, A. A. e Christman, K. L.** Antibacterial and cell-adhesive polypeptide and poly(ethylene glycol) hydrogel as a potential scaffold for wound healing. *Acta Biomaterialia*. 2012, Vol. 8, pp. 41-50.
111. **Biazar, E., Roveimiab, Z. e Shahhosseini, G.** Biocompatibility Evaluation of a New Hydrogel Dressing Based on Polyvinylpyrrolidone/Polyethylene Glycol. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*. 2012.
112. **Wong, V. W., et al.** Pullulan Hydrogels Improve Mesenchymal Stem Cells Delivery into High-Oxidative-Stress Wounds. *Macromolecular Bioscience*. 2011, Vol. 11, 11, pp. 1458-1466.
113. **Brower, J., et al.** Mesenchymal Stem Cell Therapy and Delivery Systems in Nonhealing Wounds. *Advances in Skin & Wound Care*. 2011, Vol. 24, 11, pp. 524-532.

114. **Blasinska, A. e Drobnik, J.** Effects of nonwoven mats of Di-O-butylchitin and related polymers on the process of wound healing. *Biomacromolecules*. 2008, Vol. 9, pp. 776-782.
115. **Nations, United.** *Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals*. 3ª edição. Nova Iorque e Genebra : s.n., 2009.
116. **Hong, H.-J., et al.** Accelerated wound healing by smad3 antisense oligonucleotides-impregnated chitosan/alginate polyelectrolyte complex. *Biomaterials*. 2008, Vol. 29, pp. 4831-4837.
117. **Chen, Y. M., et al.** Cultivation of endothelial cells on adhesive protein-free synthetic polymer gels. *Biomaterials*. 2005, Vol. 26, pp. 4588-4596.
118. **Lawrence, B. J. e Madhally, S. V.** Cell colonization in degradable 3D porous matrices. *Cell Adhesion & Migration*. 2008, Vol. 2, 1, pp. 9-16.
119. **Tupker, R.A., et al.** Guidelines on sodium lauryl sulfate (SLS) exposure tests. A report from the Standardization Group of the European Society of Contact Dermatitis. *Contact Dermatitis*. 1997, Vol. 37, 2, pp. 53-69.
120. **Malafaya, P. B., et al.** Morphology, mechanical characterization and in vivo neo-vascularization of chitosan particle aggregated scaffolds architectures. *Biomaterials*. 2008, Vol. 29, 29, pp. 3914-3926.
121. **Ma, L. Yu e Ma, X.** Preparation and characterization of novel sodium alginate/chitosan two ply composite membranes. *Journal of Applied Polymer Science*. 2007, Vol. 106, pp. 394-399.
122. **Oetjen, G. W.** *Freeze-Drying*. Weinheim : Wiley-VCH, 1999.
123. **Jennings, T. A.** *Lyophilization - Introduction and Basic Principles*. Nova Iorque : Informa Healthcare, 2008.
124. **Mikos, A. G. e Temenoff, J. S.** Formation of highly porous biodegradable scaffolds for tissue engineering. *Electronic Journal of Biotechnology*. 2000, Vol. 3, 2.
125. **Yang, S., et al.** The design of scaffolds for use in tissue engineering - Part I - Traditional Factors. *Tissue Engineering*. 2001, Vol. 7, 6.
126. **Mikos, A. G., et al.** Preparation of poly(glycolic acid) bonded fiber structures for cell attachment and transplantation. *Journal of Biomedical Materials Research*. 1993, Vol. 27, pp. 183-189.
127. **Dvir, T., Gang, T. e Cohen, S.** "Designer" scaffolds for tissue engineering and regeneration. *Israel Journal of Chemistry*. 2005, Vol. 45, pp. 487-494.

128. **Lim, L. Y., Khor, E. e Koo, O.** Gamma irradiation of chitosan. *J. Biomed. Mater. Res.* 1998, Vol. 43, 3, pp. 282-290.
129. **Vachoud, L., Zydowicz, N. e Domard, A.** Formation and characterization of a physical chitin gel. *Carbohydrate Research.* 1997, Vol. 302, pp. 169-177.
130. **Fluka.** Cell Counting Kit-8-, BioChemika. *Product Information.* 2006.
131. **Tominaga, Hideyuki, et al.** A water-soluble tetrazolium salt useful for colorimetric cell viability assay. *Anal. Commum.* 36, 1999, pp. 47-50.
132. **Silva, R. M., et al.** Influence of b-radiation sterilization in properties of new chitosan/soybean protein isolate membranes for guided bone regeneration. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine.* 2004, Vol. 15, 4, pp. 523-528.
133. **Venault, A., Bouyer, D. e Pochat-Bohatier, C.** Preparation of Composite Hydrogels for Medical Applications: Experimental Study and Modeling of Mass Transfer. *International Journal of Chemical Reactor Engineering.* 2010, Vol. 8, A104.
134. **Gutman, M., et al.** Kinetic analysis of the protonation of a surface group of a macromolecule. *European Journal of Biochemistry.* 1983, Vol. 134, 1, pp. 63-69.
135. **Lai, H. L., Abu'Khalil, A. e Craig, D. Q. M.** The preparation and characterization of drug-loaded alginate and chitosan sponges. *International Journal of Pharmaceutics.* 2003, Vol. 251, pp. 175-181.
136. **Li, Z., et al.** Chitosan-alginate hybrid scaffolds for bone tissue engineering. *Biomaterials.* 2005, Vol. 26, pp. 3919-3928.
137. **Lee, Y. M., et al.** Tissue engineering bone formation using chitosan/tricalcium phosphate sponges. *Journal of Periodontology.* 2000, Vol. 71, 3, pp. 410-417.
138. **Srikanth, G.** Membrane Separation Process - Technology and Business Opportunities. *Water Conditioning & Purification.* 2008.
139. **Ulbricht, M.** Advanced functional polymer membranes. *Polymer.* 2006, Vol. 47, pp. 2217-2262.
140. **Zmora, S., Glicklis, R. e Cohen, S.** Tailoring the pore architecture in 3-D alginate scaffolds by controlling the freezing regime during fabrication. *Biomaterials.* 2002, Vol. 23, pp. 4087-4094.
141. **Bellini, M. Z., et al.** Comparasion of the Properties of Compacted and Porous Lamellar Chitosan-Xanthan Membranes as Dressings and Scaffolds for the Treatment of Skin Lessions. *Journal of Applied Polymer Science.* DOI 10.1002/app.36693, 2012.

142. **Zhijiang, C., Chengwei, H. e Guang, Y.** Poly(3-hydroxybutyrate-co-4-hydroxybutyrate)/bacterial cellulose composite porous scaffolds: Preparation, characterization and biocompatibility evaluation. *Carbohydrate Polymers*. 2012, Vol. 87, pp. 1073-1080.
143. **Garg, T., et al.** Scaffold: a novel carrier for cell and drug delivery. *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems*. 2012, Vol. 29, 1, pp. 1-63.
144. **Albu, M. G., et al.** Collagen Wound Dressings with Anti-Inflammatory Activity. *Molecular Crystals and Liquid Crystals*. 2012, Vol. 555, pp. 271-279.
145. **Kim, J., et al.** Preparation and characterization of a Bacterial cellulose/Chitosan composite for potential biomedical application. *Journal of Polymer Research*. 2011, Vol. 18, pp. 739-744.
146. **Doillon, C. J.** Porous collagen sponge wound dressing: invivo and in vitro studies. *Journal of Biomaterials Applications*. 1988, Vol. 2, 4, pp. 562-578.
147. **Liu, H., et al.** Effects of the Controlled-Released Basic Fibroblast Growth Factor from Chitosan-Gelatin Microspheres on Human Fibroblasts Cultured on a Chitosan-Gelatin Scaffold. *Biomacromolecules*. 2007, Vol. 8, pp. 1446-1455.
148. **Jayakumar, R., et al.** Biomaterials based on chitin and chitosan in wound dressing application. *Biotechnology Advances*. 2011, Vol. 29, pp. 322-337.
149. **Tangsadthakun, C., et al.** The influence of molecular weight of chitosan on the physical and biological properties of collagen/chitosan scaffolds. *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition*. 2007, Vol. 18, 2, pp. 147-163.
150. **Wang, X. H., et al.** Crosslinked collagen/chitosan matrix for artificial livers. *Biomaterials*. 2003, Vol. 24, pp. 3213-3220.
151. <http://www.technobusiness-solutions.com/article-lyophilization1.html>. [Online]  
<http://www.technobusiness-solutions.com/article-lyophilization1.html>.
152. *Chitosan as scaffold materials: effects of molecular weight and degree of deacetylation.* **Hsu, S., et al.** 2004, *Journal of Polymer Research*, Vol. 11, pp. 141-147.
153. *Porous chitosan scaffolds for tissue engineering.* **Madhally, S. V. e Matthew, H. W. T.** 1999, *Biomaterials*, Vol. 20, pp. 1133-1142.
154. *Rat bone marrow stromall cell osteogenic differentiation and fibronectin adsorption on chitosan membranes: The effect of the degree of acetylation.* **Amaral, I. F., et al.** 2005, *Wiley InterScience*, Vol. DOI: 10.1002/jbm.a.30436.

155. **Close, B., et al.** Working Party Report: Recommendations for euthanasia of experimental animals: Part 1. *Laboratory Animals*. 1996, Vol. 30, pp. 293-316.
156. **Zutphen, L., Baumans, V. e Beynen, A.** *Principles of Laboratory Animal Science*. Second (revised) edition. Amesterdão : ELSEVIER, 2001.
157. Wikipedia. [Online] <http://en.wikipedia.org/wiki/Nucleation>.
158. **Brodell, L. A. e Rosenthal, K. S.** Skin structure and function: the body's primary defense against infection. *Infectious Diseases in Clinical Practice*. 2008, Vol. 16, 2, pp. 113-117.
159. **Tomasinsig, L. e Zanetti, M.** The cathelicidins - Structure, function and evolution. *Current Protein and Peptide Science*. 2005, Vol. 6, 1, pp. 23-34.
160. **Shier, D., Butler, J. e Lewis, R.** *Hole's Human Anatomy and Physiology*. 8th edition. Boston : McGraw Hill, 1999.
161. UNSW Embryology. [Online] 2013. [http://php.med.unsw.edu.au/embryology/index.php?title=File:Adult\\_epidermis\\_histology\\_02.jpg](http://php.med.unsw.edu.au/embryology/index.php?title=File:Adult_epidermis_histology_02.jpg).
162. *Laboratory Atlas for the Study of Medical Histology*. [Online] 2008. <http://www.medicalhistology.us/twiki/bin/view/Main/ConnectiveTissueAtlas02>.
163. **Notin, L., et al.** Morphology and mechanical properties of chitosan fibers obtained by gel-spinning: Influence of the dry-jet-stretching step and ageing. *Acta Biomaterialia*. 2006, Vol. 2, pp. 387-402.
164. **El-Tahlawy, K. e Hudson, S. M.** Chitosan: Aspects of fiber spinnability. *Journal of Applied Polymer Science*. 2006, Vol. 100, pp. 1162-1168.
165. **Ren, D., et al.** A preliminary study on fabrication of nanoscale fibrous chitosan membranes in situ by specific degradation. *Journal of Membrane Science*. 2006, Vol. 280, pp. 99-107.
166. **Cunha-Reis, C., et al.** Influence of orosity and fibre diamter on the degradation of chitosan fibre-mesh scaffolds and cell adhesion. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*. 2007, Vol. 18, pp. 195-200.
167. **Yang, Y., et al.** The controlling biodegradation of chitosan fibers by N-acetylation in vitro and in vivo. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*. 2007, Vol. 18, pp. 2117-2121.
168. **Knaul, J., et al.** Improvements in the drying process for wet-spun chitosan fibers. *Journal of Applied Polymer Science*. 1998, Vol. 69, pp. 1435-1444.

169. **Lee, D., et al.** Advances in chitosan material and its hybrid derivatives: A review. *The Open Biomaterials Journal*. 2009, Vol. 1, pp. 10-20.
170. **Lee, K., et al.** Electrospinning of polysaccharides for regenerative medicine. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2009, Vol. 61, pp. 1020-1032.
171. **Cramariuc, B., et al.** Fiber diameter in electrospinning process. *Journal of Electrostatics*. 2013, Vol. 71, 3, pp. 189-198.
172. **Jiang, H., et al.** Preparation and characterization of ibuprofen-loaded poly(lactide-co-glycolide)/poly(ethylene glycol)-g-chitosan electrospun membranes. *Journal of Biomaterials Science Polymer Edition*. 2004, Vol. 15, 3, pp. 279-296.
173. **Huang, X.-J., Ge, D. e Xu, Z.-K.** Preparation and characterization of stable chitosan nanofibrous membrane for lipase immobilization. 2007, Vol. 43, 9, pp. 3710-3718.
174. **Jung, K.-H., et al.** Preparation and antibacterial activity of PET/chitosan nanofibrous mats using an electrospinning technique. *Journal of Applied Polymer Science*. 2007, Vol. 105, 5, pp. 2816-2823.
175. **Huang, Z.-M., et al.** A review on polymer nanofibers by electrospinning and their applications in nanocomposites. *Composites Science and Technology*. 2003, Vol. 63, pp. 2223-2253.
176. **Tuzlakoglu, K., et al.** Design of nano- and microfiber combined scaffolds by electrospinning of collagen onto strach-based fiber meshes: a man-made equivalent of natural extracellular matrix. *Tissue Engineering: Part A*. 2011, Vol. 17, 3 e 4, pp. 463-473.
177. **Santos, M., et al.** Endothelial cell colonization and angiogenic potential of combined nano- and micro-fiber scaffolds for bone tissue engineering. *Biomaterials*. 2008, Vol. 29, pp. 4306-4313.
178. **Min, B.-M., et al.** Chitin and chitosan: electrospinning of chitin and deacetylation of chitin nanofibers. *Polymer*. 2004, Vol. 45, 21, pp. 7137-7142.
179. **Infarmed.** INFARMED. [Online] 2013. <http://www.infarmed.pt/portal/page/portal/INFARMED>.
180. Europa - Sínteses da legislação da UE. [Online] 2008. [http://europa.eu/legislation\\_summaries/index\\_pt.htm](http://europa.eu/legislation_summaries/index_pt.htm).
181. **Xia, C. e Xiao, C.** Preparation and characterization of dual responsive sodium alginate-g-poly(vynil alcohol) hydrogel. *Journal of Applied Polymer Science*. 2012, Vol. 123, pp. 2244-2249.
182. **Kumar, M., et al.** Chitosan chemistry and pharmacuetical perspectives. *Chemical Reviews*. 2004, Vol. 104, pp. 6017-6084.