

Universidade de Coimbra  
Faculdade de Ciências e Tecnologia

# SÍNTESE DE MATERIAIS POLIMÉRICOS PARA REGENERAÇÃO DE TECIDO MUSCULAR

Dissertação para a obtenção do Grau de Mestre em Engenharia Biomédica pela Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade de Coimbra sob orientação da Professora Doutora Maria Helena Gil e co-orientação da Doutora Paula Ferreira.

Coimbra, Setembro 2010

Trabalho realizado no Departamento de Engenharia Química da Faculdade de Ciências e Tecnologia e no Instituto de Patologia Experimental da Faculdade de Medicina.

**DEQFCTUC**



*Recomeça....*

*Se pudéres  
Sem angústia e sem pressa.  
E os passos que dæres,  
Nesse caminho duro  
Do futuro  
Dá-os em liberdade.  
Enquanto não alcances  
Não descanses.  
De nenhum fruto queiras só metade.*

*E, nunca saciado,  
Vai colhendo ilusões sucessivas no pomar.  
Sempre a sonhar e vendo  
O logro da aventura.  
Ês homem, não te esqueças!  
Só é tua a loucura  
Ondê, com lucidez, te reconheças...*

Miguel Torga

Aos meus pais

# AGRADECIMENTOS

Desenvolver um trabalho de investigação científica nunca é um esforço solitário, e portanto há muitas pessoas a quem devo agradecer por terem contribuído para a realização deste projecto.

Queria agradecer à Professora Doutora Maria Helena Gil pela forma como me orientou ao longo de um ano, transmitindo sabedoria e dando dicas indispensáveis para a realização do trabalho.

Obrigada também à Doutora Paula Ferreira, que na qualidade de co-orientadora esteve sempre presente, apoiando, incentivando e ajudando na resolução de problemas que são inerentes a um projecto deste tipo.

Agradeço ao Doutor António Silvério Cabrita por ter tornado possível a realização dos ensaios *in vivo*. Tiago e Rodrigo, do Instituto de Patologia Experimental merecem também a minha gratidão pela execução dos testes de biocompatibilidade, disponibilidade e esclarecimento de dúvidas.

Quero ainda agradecer a todos os que constituem o Grupo de Polímeros do Departamento de Engenharia Química, pela maneira como me acolheram, e pela disponibilidade em ajudar e partilhar conhecimentos que foram essenciais.

Depois, obrigada aos amigos pela constante presença e pelo optimismo infindo transmitido.

Por fim, àqueles que me têm apoiado desde sempre, a família, um sincero agradecimento por mais uma vez terem ajudado a cada passo de mais esta etapa, e por terem contribuído para o meu desenvolvimento pessoal.

## RESUMO

A Engenharia de Tecidos é uma área emergente que desenvolve biomateriais com o objectivo de regenerar tecidos ou órgãos que tenham sofrido danos ou perda das suas funções. Com isto, pretende-se ultrapassar a falta de dadores de órgãos, e também assegurar a aceitação do órgão pelo sistema imunitário do organismo receptor.

O objectivo deste trabalho foi desenvolver matrizes poliméricas de pectina e quitosano que sirvam de suporte para a regeneração do tecido muscular. Foram preparados scaffolds sob a forma de gel e de esponja (por liofilização) com rácios mássicos de pectina:quitosano 1:1 e 2:1. Desenvolveram-se ainda matrizes dos mesmos polímeros, incorporando um fármaco, a vancomicina, e usando uma carbodiimida como reagente.

As matrizes poliméricas obtidas foram caracterizadas em termos de tempo de biodegradação, morfologia (SEM), capacidade de inchaço, análise elementar, análise química (FTIR-ATR), libertação do fármaco, hemocompatibilidade e biocompatibilidade *in vivo*.

Os resultados obtidos mostraram que as matrizes 2:1 têm uma taxa de degradação superior, sendo que também apresentam maior capacidade de inchaço. Observou-se ainda que o comportamento de *swelling* apresentado está dependente do pH do meio. Pela técnica SEM visualizou-se a morfologia porosa das esponjas e o aumento do tamanho dos poros ao longo do tempo, consequência da biodegradação. A análise elementar permitiu confirmar os graus de esterificação e desacetilação da pectina e do quitosano respectivamente. A técnica FTIR-ATR serviu para constatar as interacções iónicas entre o grupo carboxílico ionizado da pectina (COO<sup>-</sup>) e o grupo amínico do quitosano (NH<sub>3</sub><sup>+</sup>), confirmando a formação de um complexo polieletrólito (PEC). Comparando o gel com a esponja em termos da libertação da vancomicina *in vitro*, o estudo de oito horas indicou uma libertação mais rápida por parte do gel, apesar de nos instantes iniciais se verificar o oposto. Os ensaios de hemocompatibilidade mostraram-se mais favoráveis para as esponjas com menos quitosano (2:1). Tal verificou-se tanto para o teste de trombogenicidade, em que ambas as matrizes se mostraram mais trombogénicas que o controlo positivo, como na determinação do índice hemolítico (*scaffolds* 1:1 são hemolíticos e 2:1 são ligeiramente hemolíticos). Os testes de biocompatibilidade são não conclusivos, já que o número de animais usados no estudo foi muito reduzido. No entanto, os resultados sugerem a não biocompatibilidade do biomaterial. Nas imagens histológicas observou-se a presença de infiltrado inflamatório com linfócitos e neutrófilos.

Terão de ser realizados novos testes de biocompatibilidade *in vivo*, afim de se confirmarem os resultados e saber se tais *scaffolds* são ou não viáveis. No entanto, todos os resultados obtidos sugerem que as matrizes de pectina e quitosano têm aplicação clínica, apesar de os resultados de hemocompatibilidade serem menos bons. Contudo, esses resultados podem ser melhorados, diminuindo a quantidade de quitosano nos *scaffolds*.

## ABSTRACT

Tissue Engineering is an emerging field that develops biomaterials in order to regenerate tissues or organs that have suffered damage or loss of their functions. So, we intend to overcome the lack of donor organs, and also ensure the acceptance of the organ by the receptor organism immunitary system.

The aim of this study was to develop and assess the ability of polymeric matrices of chitosan and pectin to act as support structures for the regeneration of muscle tissue. To this end polymeric scaffolds were prepared in the form of a gel and a sponge (by means of freeze drying) with mass ratios of pectin:chitosan 1:1 and 2:1. Moreover, vancomycin drug was introduced, using a carbodiimide reagent, in this process in order to reduce infection risks.

The polymeric matrices obtained were characterized in terms of time of biodegradation, morphology (SEM – Scanning Electron Microscope), swelling behavior, elemental analysis, chemical analysis (FTIR-ATR Fourier (Transform Infrared - Attenuated Total Reflectance)), drug release, hemocompatibility and biocompatibility *in vivo*.

Results showed us that the 2:1 scaffolds have higher degradation's rate, as well as higher swelling. It was also observed that the swelling behavior is dependent on the pH of the medium. By making use of the Scanning Electron Microscope (SEM) technique, it was possible to visualize the morphology of porous sponges and the increase of pore size through time, as a result of biodegradation. Elemental analysis allowed us to confirm the esterification and deacetylation degrees of pectin and chitosan respectively. The FTIR-ATR technique was used to verify the ionic interactions between the ionized carboxylic group of pectin ( $\text{COO}^-$ ) and the ionized aminic group of chitosan ( $\text{NH}_3^+$ ), which confirms the formation of a polyelectrolyte complex (PEC). A study of eight hours allowed us to compare the gel with the sponge in terms of *in vitro* vancomycin release. As a result we were able to observe that although the sponge approach had a faster release rate during the initial moments, the gel produced a higher overall vancomycin release. Hemocompatibility tests showed that the sponge presents itself as a more favorable approach when less chitosan (2:1) is applied. This was the case for the thrombogenicity test, in which both matrices were more thrombogenic than the positive control, as well as in the determination of the hemolytic index (scaffolds 1:1 are hemolytic and 2:1 are slightly hemolytic). Biocompatibility tests are not conclusive, since the number of animals used was insufficient. However, the results suggest the non biocompatibility of the biomaterial. Histological images indicated the presence of inflammatory infiltrate with lymphocytes and neutrophils.

Further *in vivo* biocompatibility tests must be carried out in order to confirm these results and to assess the viability of the polymeric scaffolds. Although all the obtained outcomes suggest that the pectin and chitosan matrices might have clinical application, the hemocompatibility results did not allow us to achieve such conclusion. To this end, the reduction of the chitosan in these scaffolds could lead us to an improvement in the hemocompatibility tests and a more evident conclusion.

# ÍNDICE

<b>Agradecimentos</b>	<b>iv</b>
<b>Resumo</b>	<b>v</b>
<b>Abstract</b>	<b>vi</b>
<b>Índice</b>	<b>vii</b>
<b>Lista de Figuras</b>	<b>ix</b>
<b>Lista de Gráficos</b>	<b>ix</b>
<b>Lista de Tabelas</b>	<b>x</b>
<b>Lista de Equações</b>	<b>x</b>
<b>Acrónimos</b>	<b>xi</b>
<b>1. Introdução Geral</b>	<b>1</b>
<b>1.1. Engenharia de Tecidos</b>	<b>1</b>
<b>1.2. Matriz Polimérica</b>	<b>4</b>
1.2.1. Pectina	4
1.2.2. Quitosano	5
1.2.3. Vancomicina	6
1.2.4. Carbodiimida	7
1.2.5. Formação das Matrizes Poliméricas	8
1.2.5.1. Preparação das matrizes pectina:quitosano por interacção iónica	8
1.2.5.2. Estado Físico das Matrizes Poliméricas	10
<b>1.3. Tecido Muscular</b>	<b>11</b>
<b>1.4. State-of-Art na Regeneração de Tecido Muscular</b>	<b>13</b>
<b>1.5. Técnicas de Caracterização</b>	<b>15</b>
1.5.1. Estudo de Degradação <i>In Vitro</i>	15
1.5.2. Microscopia Electrónica de Varrimento (SEM – <i>Scanning Electron Microscope</i> )	15
1.5.3. Capacidade de Inchaço ( <i>Swelling</i> )	16
1.5.4. Análise Elementar	16
1.5.5. Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier com Reflexão Total Atenuada (FTIR-ATR)	16
1.5.6. Estudo da Libertação Controlada do Fármaco	17
1.5.7. Estudo de Hemocompatibilidade	18
1.5.7.1. Teste de Trombogenicidade	18
1.5.7.2. Determinação do Índice Hemolítico	18
1.5.8. Estudo de Biocompatibilidade <i>In Vivo</i>	19
<b>2. Materiais e Métodos</b>	<b>20</b>
<b>2.1. Listas de reagentes e equipamentos</b>	<b>20</b>
2.1.1. Reagentes e equipamentos utilizados na preparação das matrizes poliméricas	20
2.1.2. Reagentes e equipamentos utilizados na caracterização das matrizes poliméricas	21
<b>2.2. Preparação das matrizes poliméricas</b>	<b>23</b>
2.2.1. <i>Scaffolds</i> Injectáveis – gel	23
2.2.2. <i>Scaffolds</i> Implantáveis – esponja	23
2.2.3. <i>Scaffold</i> Injectável com Fármaco	24
2.2.4. <i>Scaffold</i> Implantável com Fármaco	24



<b>2.3. Técnicas de Caracterização</b>	<b>24</b>
2.3.1. Estudo de Degradação <i>In Vitro</i>	24
2.3.2. Microscopia Electrónica de Varrimento (SEM)	24
2.3.3. Capacidade de Inchaço ( <i>Swelling</i> )	25
2.3.4. Análise Elementar	25
2.3.5. Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier com Reflexão Total Atenuada (FTIR-ATR)	25
2.3.6. Estudo da Libertação Controlada do Fármaco	26
2.3.7. Estudo de Hemocompatibilidade	26
2.3.7.1. Teste de Trombogenicidade	27
2.3.7.2. Determinação do Índice Hemolítico	27
2.3.8. Estudo de Biocompatibilidade <i>In Vivo</i>	30
2.3.8.1. Introdução das Matrizes Poliméricas nos Animais	30
2.3.8.2. Necrópsia e Processamento Histológico	32
2.3.9. Análise Estatística	33
<b>3. RESULTADOS</b>	<b>35</b>
3.1. Preparação das Matrizes Poliméricas	35
3.2. Estudo de Degradação <i>In Vitro</i>	35
3.3. Microscopia Electrónica de Varrimento (SEM)	36
3.4. Capacidade de Inchaço ( <i>Swelling</i> )	39
3.5. Análise Elementar	40
3.6. Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier com Reflexão Total Atenuada (FTIR-ATR)	43
3.7. Estudo da Libertação Controlada do Fármaco	44
3.8. Estudo de Hemocompatibilidade	46
3.8.1. Teste de Trombogenicidade	46
3.8.2. Determinação do Índice Hemolítico	47
3.8.2.1. Determinação da concentração de hemoglobina no sangue e no plasma e Diluição do Sangue	47
3.8.2.2. Contacto das matrizes com o sangue	48
3.9. Estudo de Biocompatibilidade <i>In Vivo</i>	48
<b>4. Discussão e Conclusões</b>	<b>50</b>
<b>5. Perspectivas Futuras</b>	<b>57</b>
<b>6. Referências Bibliográficas</b>	<b>59</b>
<b>Anexo</b>	<b>63</b>

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Órgãos e tecidos estudados para fins de regeneração. (3)	2
Figura 2 - Esquema das formas de aplicação dos 2 tipos de matrizes poliméricas.	3
Figura 4 - Estrutura química do quitosano parcialmente desacetilado (2 unidades desacetiladas e 1 acetilada). (12)	5
Figura 3 - Estrutura química da pectina. (8)	5
Figura 6 - Formação de uma amida através da reacção de um ácido carboxílico e de uma carbodiimida. (16)	7
Figura 5 - Estrutura química: a) da vancomicina (esquerda); b) da penicilina (direita). (15)	7
Figura 7 - Estrutura química de N-cyclohexyl-N'-(2-morpholinoethyl) carbodiimide metho-p-toluenesulfonate. (18)	8
Figura 8 - Formação do PEC de pectina e quitosano. Adaptado de (20)	9
Figura 9 - Reacção entre a pectina, a carbodiimida, o quitosano e a vancomicina.	10
Figura 10 - Esquema de formação de um hidrogel, na qual se visualiza a reacção por reticulação dos polímeros e a retenção de água. (6)	10
Figura 11 - Esquema da composição do músculo esquelético. (21)	12
Figura 12 - Diferenciação das células mesenquimais em vários tipos de tecidos. (23)	12
Figura 13 - Injecção do gel pectina:quitosano 1:1 no animal R1.	31
Figura 14 - Realização da incisão.	31
Figura 15 - Introdução da esponja no animal.	32
Figura 16 - Realização da sutura.	32
Figura 17 - Gel pectina:quitosano desenvolvido.	35
Figura 18 - Esponja pectina:quitosano desenvolvida.	35
Figura 19 - Imagens SEM dos scaffolds implantáveis pectina:quitosano 1:1 (à esquerda) e 2:1 (à direita) com uma ampliação de 50x.	37
Figura 20 - Imagens obtidas por SEM das esponjas pectina:quitosano 1:1 (1, 3, 5 e 7) e pectina quitosano 2:1 (2, 4, 6, 8 e 9), antes de imersas numa solução PBS (1 e 2) e depois de imersas por 1 (3 e 4), 2 (5 e 6), 3 (7 e 8) ou 4 (9) semanas.	38
Figura 21 - Esponja com trombo formado, já depois de seca.	46
Figura 22 - Imagem de microscopia de luz do tecido no qual foi injectado o gel de pectina e quitosano (HE). Observa-se a presença de inúmeros polimorfonucleares neutrófilos.	49
Figura 23 - Imagem de microscopia de luz do tecido no qual foi implantada a esponja de pectina e quitosano (HE). Observam-se numerosos polimorfonucleares neutrófilos, muito deles aderentes ao biomaterial, aparentemente a digeri-lo. Praticamente não há células mononucleadas.	49

## LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 - Percentagem média de peso restante de 3 amostras para os 2 tipos de esponjas por um período de 4 semanas.	36
Gráfico 2 - Teste de swelling 1, imersão das esponjas de rácios 1:1 e 2:1 em água destilada.	39
Gráfico 3 - Teste de swelling 2, imersão das esponjas de rácios 1:1 e 2:1 em PBS.	40
Gráfico 4 - Espectroscopia FTIR-ATR obtida dos 4 compostos analisados.	43
Gráfico 5 - Percentagem de fármaco libertado pela esponja e gel de rácio 1:1 ao longo do tempo.	45
Gráfico 6 - Percentagem da formação de trombo em função do tempo.	46
Gráfico 7 - Índice hemolítico das esponjas 1:1 e 2:1.	48

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Classificação de um biomaterial em relação ao seu índice hemolítico. (46)	19
Tabela 2 - Lista de reagentes usados na preparação das matrizes poliméricas.	20
Tabela 3 - Lista de equipamentos usados na preparação das matrizes poliméricas.	20
Tabela 4 - Lista de reagentes usados na caracterização das matrizes poliméricas.	21
Tabela 5 - Lista de equipamentos usados na caracterização das matrizes poliméricas.	22
Tabela 6 - Volumes das soluções de hemoglobina e Drabkin usados para fazer a curva de calibração.	29
Tabela 7 - Tempo de imersão das cassetes em cada tanque.	33
Tabela 8 - Percentagem de peso dos vários elementos químicos presentes em cada amostra.	41
Tabela 9 - Atribuição de diferentes tipos de ligações aos picos de absorvância.	44
Tabela 10 - Concentrações de fármaco usadas para calcular as absorvâncias características.	44
Tabela 11 - Concentração de hemoglobina de cada amostra.	47
Tabela 12 - Peso restante das esponjas Pec:Qui nas proporções 1:1 e 2:1 após 1, 2, 3 e 4 semanas de imersão numa solução PBS.	63
Tabela 13 - Capacidade de inchaço das esponjas 1:1 e 2:1 ao longo do tempo, quando imersas em água destilada.	63
Tabela 14 - Capacidade de inchaço das esponjas 1:1 e 2:1 ao longo do tempo, quando imersas em solução PBS.	63
Tabela 15 - Percentagem de fármaco libertado em esponja e gel 1:1 ao longo do tempo.	64
Tabela 16 - Percentagem de sangue que forma trombo, após 20 e 40 minutos de contacto entre o sangue e scaffolds implantáveis pec:qui 1:1 e 2:1 e também o controlo positivo.	64
Tabela 17 - Índices hemolíticos das esponjas 1:1 e 2:1.	64

## LISTA DE EQUAÇÕES

Equação 1	15
Equação 2	16
Equação 3	28
Equação 4	29
Equação 5	30
Equação 6	34
Equação 7	41
Equação 8	41
Equação 9	41
Equação 10	42
Equação 11	42
Equação 12	42
Equação 13	42

# ACRÓNIMOS

<b>ATR</b>	Reflexão Total Atenuada ( <i>Attenuated Total Reflectance</i> )
<b>ECM</b>	Matriz Extracelular ( <i>Extracellular Matrix</i> )
<b>ET</b>	Engenharia de Tecidos
<b>FGF</b>	Factor de Crescimento Fibroblático ( <i>Fibroblast Growth Factor</i> )
<b>FTIR</b>	Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier ( <i>Fourier Transform Infrared Spectroscopy</i> )
<b>GD</b>	Grau de Desacetilação
<b>GE</b>	Grau de Esterificação
<b>Hb</b>	Hemoglobina
<b>ISO</b>	Organização Internacional de Padronização ( <i>International Organization for Standardization</i> )
<b>IV</b>	Infravermelho
<b>MSC</b>	Células Estaminais Mesenquimais ( <i>Mesenchymal Stem Cell</i> )
<b>PBS</b>	Tampão Fosfato Salino ( <i>Phosphate Buffered Saline</i> )
<b>PEC</b>	Complexo Polieletrólito ( <i>Polyelectrolyte Complex</i> )
<b>PGA</b>	Ácido Poliglicólico ( <i>Polyglycolic Acid</i> )
<b>PLLA</b>	Poli(L-ácido-láctico) ( <i>Poly (L-lactic Acid)</i> )
<b>rpm</b>	rotações por minuto
<b>SEM</b>	Microscopia Electrónica de Varrimento ( <i>Scanning Electron Microscope</i> )
<b>UV/Vis</b>	Ultravioleta/Visível
<b>VEGF</b>	Factor de Crescimento Vascular Endotelial ( <i>Vascular Endothelial Growth Factor</i> )

# 1. INTRODUÇÃO GERAL

## 1.1. ENGENHARIA DE TECIDOS

Todos os anos, milhares de pacientes entram em lista de espera para receber um transplante de tecidos ou de órgãos indispensáveis (mais de 40 mil na Europa), não havendo doadores em número suficiente, muitos morrem antes de serem chamados para a intervenção (1). Além disso, os pacientes que são transplantados têm algumas limitações: devem seguir uma vida dependente de imunossuppressores, correndo sempre o risco do órgão transplantado ser rejeitado. Os substitutos artificiais também não são solução, devido ao aumento do risco de infecção, a um possível tromboembolismo e à sua curta durabilidade. Por exemplo, um implante prostético não se desenvolve ao mesmo ritmo que o crescimento de um paciente jovem.

Associado a esta necessidade, os países desenvolvidos começaram a investir no estudo de terapias que promovam o desenvolvimento de substitutos biológicos sem a necessidade de doadores, nascendo assim a Engenharia de Tecidos (ET).

Segundo Langer e Vacanti (investigadores que muito têm contribuído para o progresso desta ciência), a ET pode ser definida como “um campo interdisciplinar de pesquisa que aplica os princípios da engenharia e das ciências da vida através do desenvolvimento de substitutos biológicos que restauram, mantêm ou melhoram a função do tecido” (2). O objectivo é regenerar tecidos e criar substitutos biológicos aquando a perda de tecidos ou órgãos, ou defeitos nos mesmos.

Estudos feitos até ao momento, permitem verificar que existe uma lista considerável de tecidos/órgãos em fase de testes ou mesmo em aplicação. Alguns deles são: cartilagem, osso, músculo, vasos sanguíneos, coração, bexiga, rins, pele, córnea, pâncreas (ver figura 1). (3)

A estratégia de regeneração de tecidos passa por criar uma estrutura designada por matriz extracelular onde se dará a proliferação e diferenciação de células.

As células usadas devem ser não imunogénicas, altamente proliferativas e terem a capacidade de se diferenciarem numa variedade de células com funções específicas. Estas podem ser células estaminais, que têm o potencial de se transformarem em células de múltiplos tipos de tecidos. Também podem ser células num estadio intermédio, entre células estaminais e células maduras ((4) e (5)). A sua origem é um factor que condiciona o sucesso da regeneração tecidular. O ideal é serem obtidas a partir do próprio paciente. Neste caso, são as chamadas células autólogas, que têm a vantagem de não serem reconhecidas pelo sistema imunitário como um agente estranho. Podem também ser utilizadas células alogénicas, ou seja, células provenientes de outros humanos. Quando estas são usadas, há que ter em consideração a aceitação imunológica por parte do organismo receptor. (4) e (5)



Figura 1 - Órgãos e tecidos estudados para fins de regeneração. (3)

No campo da ET há que considerar também o designado *scaffold*. Um *scaffold* é um suporte físico para a adesão, proliferação e diferenciação celular, normalmente de origem polimérica (polímeros naturais ou sintéticos) que tem a capacidade de se biodegradar, enquanto o tecido regenera.

Existem duas estratégias no desenvolvimento das matrizes extracelulares (ECM) mediante o método de aplicação das mesmas.

Os *scaffolds* podem ser implantados no organismo do paciente com recurso a uma cirurgia, sendo então designados por *scaffolds* implantáveis. Estes podem apresentar-se na forma de esponjas ou filmes. As matrizes poliméricas que constituem um *scaffold* deste tipo têm uma estrutura porosa tridimensional que dão o suporte necessário às células e se vão biodegradando à medida que as células proliferam.

Um outro tipo de *scaffolds*, são os injectáveis. Estes são aplicados de uma maneira não invasiva, utilizando uma seringa que injecta a matriz directamente no local que se pretende regenerar. Normalmente existem sob a forma de hidrogéis ou microcápsulas. (4)

Na figura 2 é possível observar as diferenças morfológicas entre os *scaffolds* injectáveis, em forma de gel, e os implantáveis, em forma de esponja.

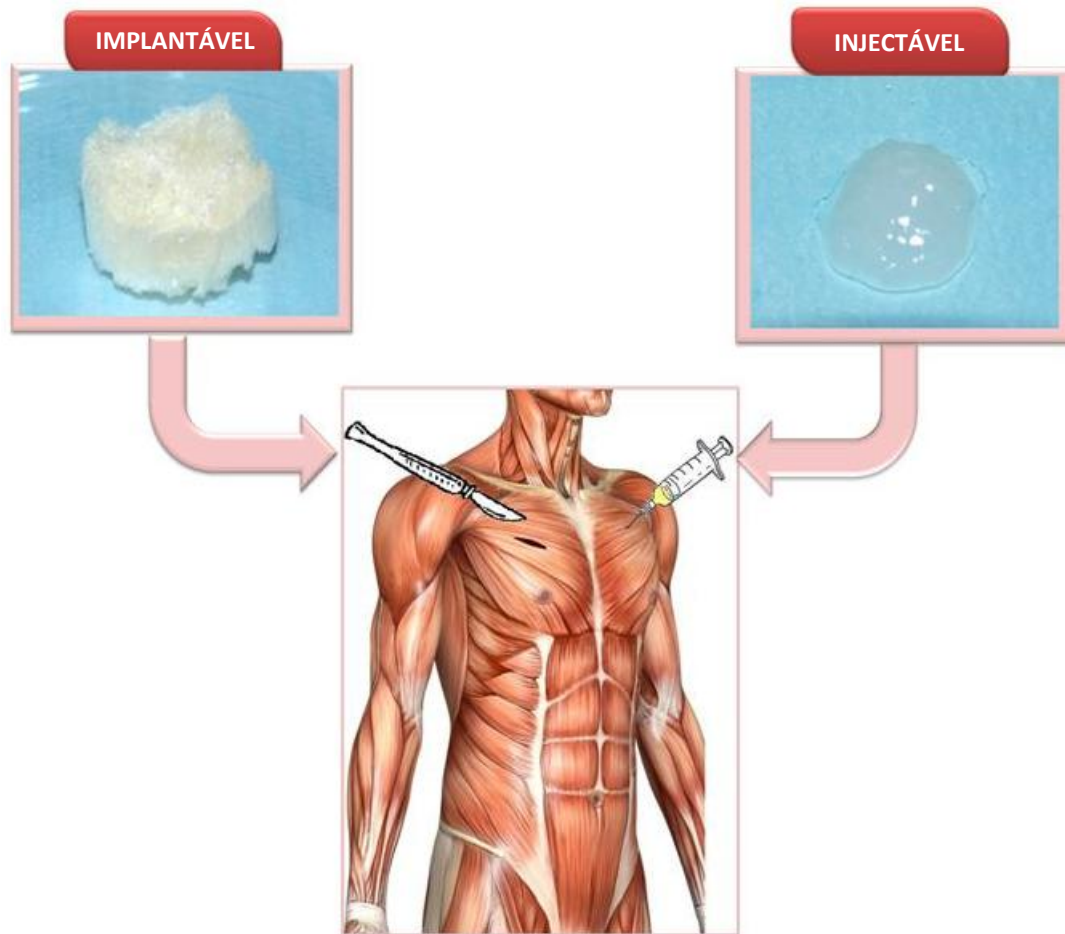


Figura 2 - Esquema das formas de aplicação dos 2 tipos de matrizes poliméricas.

Quando a capacidade de regeneração do tecido é muito baixa, pode ainda ser necessário o uso de factores de crescimento. Estes, tal como o nome indica, promovem a diferenciação e proliferação das células. Podem ser injectados directamente no enxerto, sendo que esta técnica não se tem mostrado muito promissora. Por outro lado, podem ser incorporados num sistema de libertação controlada que os vai libertando ao longo do tempo, por forma a prolongar a sua actividade. (5)

Podem também ser incorporados na matriz polimérica, antibióticos. Estes terão a finalidade de diminuir o risco de infecção aquando a aplicação do implante. Mediante o tipo de tecido que será regenerado, e portanto, o meio em que o scaffold será implantado, deve-se eleger o antibiótico que apresente as melhores características. Existe uma grande variedade de fármacos que possam ser aplicados, e com funções diferentes.

## 1.2. MATRIZ POLIMÉRICA

Para o desenvolvimento de um *scaffold* a escolha dos materiais a serem utilizados é um desafio, uma vez que as matrizes devem preencher certos requisitos.

Um *scaffold* deve:

- ser biocompatível e não tóxico, de maneira a não provocar uma resposta inflamatória ou tóxica;
- ser biodegradável, com uma taxa de degradação controlável que permita acompanhar o crescimento celular;
- ter propriedades mecânicas similares às do tecido onde vai ser implantado;
- formar uma estrutura porosa tridimensional, onde exista conexão entre os poros para a vascularização, crescimento das células e passagem de nutrientes e oxigênio. (6)

Surge muitas vezes a dúvida entre o uso de polímeros naturais ou sintéticos. Por um lado, no caso dos polímeros sintéticos as suas propriedades físico-químicas podem ser facilmente controladas, ajustando por exemplo o seu peso molecular e cristalinidade. No entanto, os polímeros naturais podem ser uma alternativa melhor, uma vez que são altamente biocompatíveis e mais facilmente biodegradáveis. (6)

No desenvolvimento deste estudo, optou-se pelo uso de polímeros de origem natural, sendo utilizados a pectina e o quitosano.

Desenvolveram-se também matrizes destes mesmos polímeros, mas incorporando um fármaco (a vancomicina), por reticulação e por oclusão. Para promover a sua ligação usou-se um reagente, uma carbodiimida.

### 1.2.1. Pectina

A pectina é um polissacarídeo aniónico que está presente na parede celular da maioria das plantas. A sua estrutura consiste numa cadeia linear de ácido galacturónico com ligações glicosídicas  $\alpha(1-4)$ .

A estrutura química da pectina (figura 3) é constituída por grupos carboxílicos (COOH), sendo que alguns deles são esterificados e apresentam-se sob a forma de grupos ésteres metílicos (COOCH<sub>3</sub>). Assim, a percentagem de grupos ésteres metílicos determina o grau de esterificação (GE) da pectina. (7)



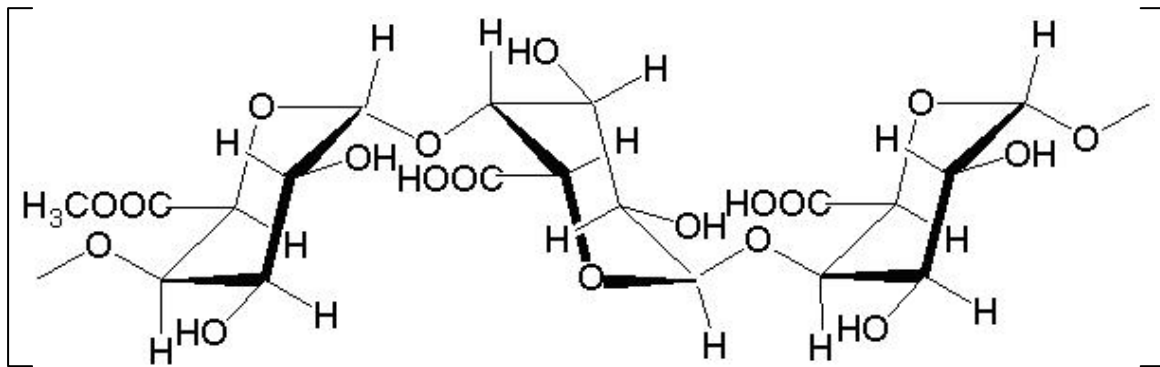


Figura 3 - Estrutura química da pectina. (8)

O seu peso molecular médio varia entre 50 a 150 kDa (9), dependendo da fonte da qual é extraída, bem como das condições de extracção. Possui um  $pK_a$  de aproximadamente 3,5.

Das suas propriedades realçam-se a sua capacidade de gelificação, biocompatibilidade, não toxicidade, biodegradabilidade, mucoadesividade, solubilidade em água, entre outros, fazem da pectina um polímero com muitas aplicações nas mais diversas áreas.

Nas indústrias alimentar e cosmética é usada como agente espessante. No campo clínico as suas propriedades terapêuticas são aproveitadas para diminuir os níveis de colesterol e glucose, inibir o crescimento das células tumorais, entre outros. É usada também na área da biomedicina como modificador de superfícies de aparelhos médicos, de materiais para serem implantados no corpo humano e em sistemas de libertação controlada de fármacos. (10)

### 1.2.2. Quitosano

O quitosano é um polímero natural derivado da quitina (obtido por desacetilação parcial da quitina) que se encontra presente no exoesqueleto dos crustáceos. Este polissacarídeo catiónico (estrutura química representada na figura 4) consiste numa cadeia linear de glucosamina (unidade desacetilada) e N-acetilglucosamina (unidade acetilada) ligadas por ligações  $\beta(1-4)$ . (11)

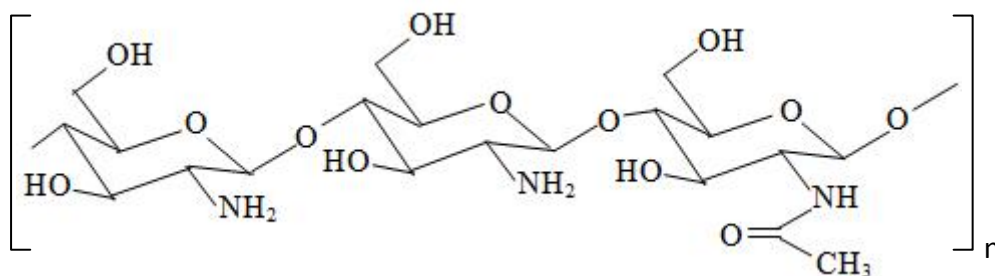


Figura 4 - Estrutura química do quitosano parcialmente desacetilado (2 unidades desacetiladas e 1 acetilada). (12)

O grau de desacetilação (GD) do polímero pode variar entre 30 e 95%, sendo definido como a razão entre a percentagem de unidades desacetiladas e a percentagem de unidades acetiladas. Pode ter um peso molecular médio entre 300 e 1000 kDa e apresenta um  $pK_a$  de 6,5. (11)

O quitosano é um polímero muito usado na área da saúde devido às suas excelentes propriedades. Ele é biocompatível, antibacteriano, antitumoral, cicatrizante, hemostático, anticoagulante, mucoadesivo, biodegradável. Assim, tem aplicações em pele artificial, suturas cirúrgicas que são absorvidas pelo organismo ao longo do tempo, tendo também a capacidade de reduzir a quantidade de colesterol que é absorvida pelo corpo humano. Pode ser usado em lentes de contacto e também na libertação controlada de fármacos. (7) e (13)

Este polímero pode ser utilizado no tratamento de águas (processo de filtração), sendo responsável pela remoção de metais pesados e óleos. É também usado na agricultura, como uma alternativa natural aos produtos químicos usados na defesa do crescimento das plantações agrícolas. Outra aplicação é na indústria alimentar, podendo ser usado, por exemplo, para pulverizar as frutas e vegetais actuando como um escudo antibacteriano. (13)

### 1.2.3. Vancomicina

A vancomicina é um fármaco antibacteriano da classe dos glicopeptídeos tricíclicos que é produzido pela fermentação da bactéria *Amycolatopsis Orientalis*.

A fórmula química da molécula de vancomicina é  $C_{66}H_{75}Cl_2N_9O_{24}$  (estrutura química representada na figura 5 a) o que lhe confere um peso molecular de aproximadamente 1450 g/mol.

Este antibiótico é utilizado no tratamento de infecções causadas por bactérias Gram-positivas, inibindo a biossíntese da parede celular das mesmas. Em relação às Gram-negativas, a vancomicina é ineficiente porque tem um elevado peso molecular que a impede de atravessar a membrana externa destas bactérias.

Pode também ser utilizado para o tratamento de infecções causadas por microorganismos resistentes à penicilina (figura 5 b), devido às semelhanças estruturais da vancomicina com a penicilina. (14)

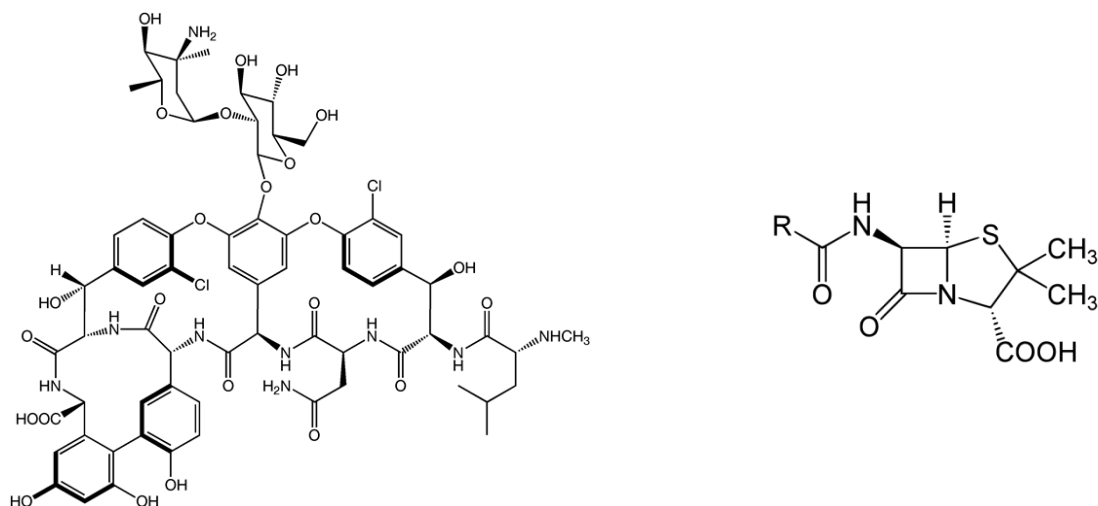


Figura 5 - Estrutura química: a) da vancomicina (esquerda); b) da penicilina (direita). (15)

### 1.2.4. Carbodiimida

Uma carbodiimida é um reagente que pode ser utilizado para ligar grupos amínicos a grupos carboxílicos depois de activados segundo uma reacção deste tipo:

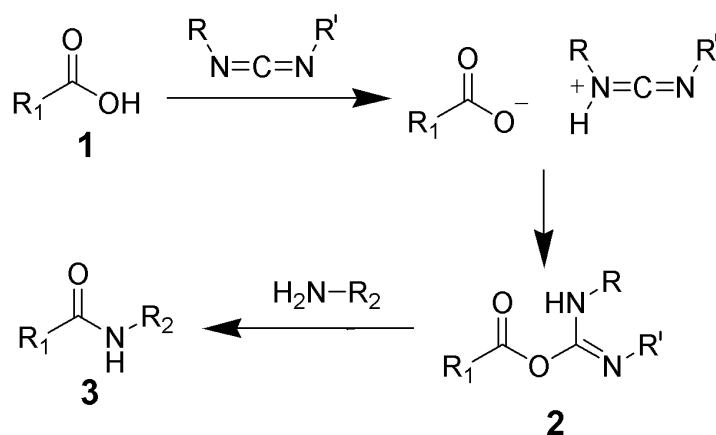


Figura 6 - Formação de uma amida através da reacção de um ácido carboxílico e de uma carbodiimida. (16)

O ácido carboxílico 1 reage com a carbodiimida formando um composto intermediário, uma acetilisourea 2. A reacção da acetilisourea com uma amina vai dar origem a uma amida 3.

Existem vários tipos de carbodiimidas, sendo o seu grupo funcional  $RN=C=NR'$ , em que R e R' podem ter várias estruturas. (17)

A carbodiimida utilizada neste estudo foi a *N-cyclohexyl-N'-(2-morpholinoethyl) carbodiimide metho-p-toluenesulfonate* (figura 7). A sua estrutura é composta por 2 moléculas de carga oposta que a tornam solúvel em água. A molécula com carga positiva será a responsável pela activação do grupo carboxílico da pectina.

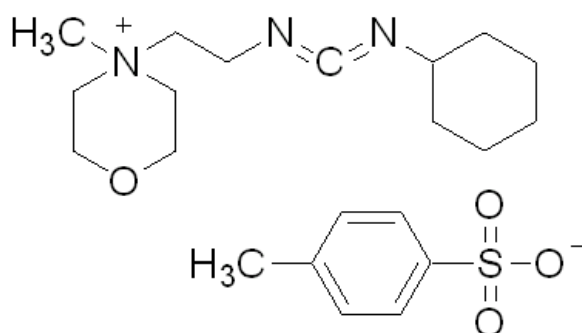


Figura 7 - Estrutura química de *N-cyclohexyl-N'-(2-morpholinoethyl) carbodiimide metho-p-toluenesulfonate*. (18)

### 1.2.5. Formação das Matrizes Poliméricas

#### 1.2.5.1. Preparação das matrizes pectina: quitosano por interacção iónica

A simples interacção dos dois polímeros, pectina e quitosano, vai levar à formação de um complexo polielectrólito (PEC).

Os PECs são formados pela interacção de polímeros com cargas opostas através de, por exemplo, forças electrostáticas. Estes complexos apresentam algumas propriedades diferentes dos polímeros quando estes se encontram isolados.

Para a formação do complexo polielectrólito é necessário que ambos os polímeros estejam ionizados. Por esta reacção ocorrer para um valor de pH próximo do valor do  $pK_a$  dos dois polímeros envolvidos, entre 3,5 e 6,5 (19). Neste intervalo de pH o quitosano apresenta os seus grupos amina carregados positivamente ( $NH_3^+$ ), tendo a capacidade de interagir com os grupos carboxílicos com carga negativa da pectina ( $COO^-$ ). A reacção descrita está representada na figura 8.



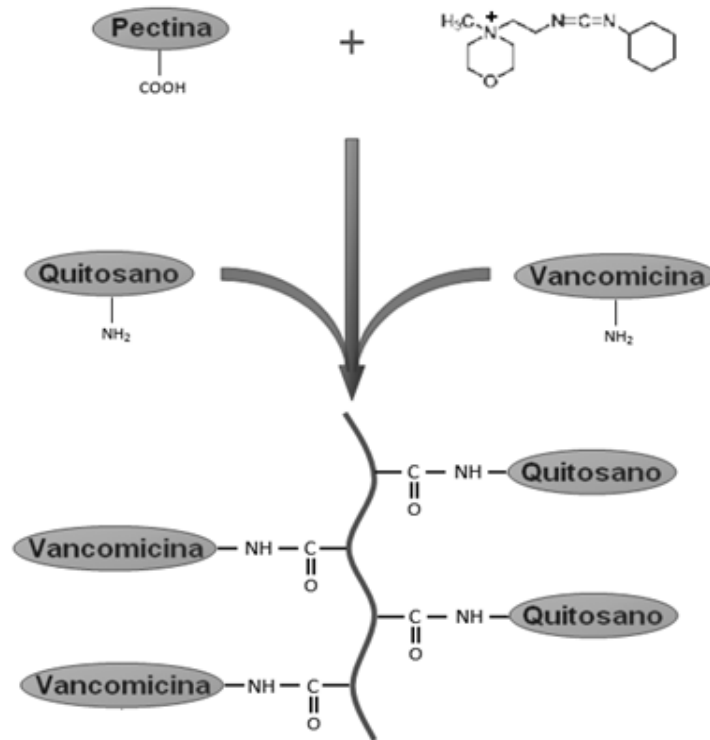


Figura 9 - Reacção entre a pectina, a carbodiimida, o quitosano e a vancomicina.

A molécula de vancomicina, além de interagir com a pectina através da reacção descrita anteriormente, também fica imobilizada na matriz polimérica por oclusão.

### 1.2.5.2. Estado Físico das Matrizes Poliméricas

Os 2 tipos de matrizes poliméricas desenvolvidas neste estudo apresentam características físicas diferentes.

O gel (hidrogel) forma-se através de uma reacção de reticulação que ocorre entre os 2 polímeros, resultando numa estrutura tridimensional insolúvel com a capacidade de absorver e reter uma amostra significativa de água, como exemplificado na figura 10. (6)

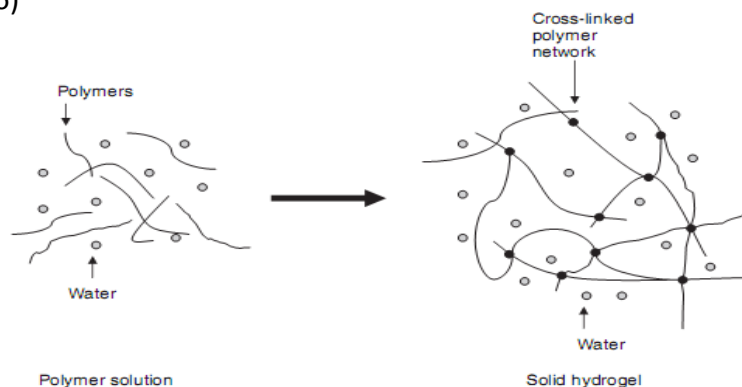


Figura 10 - Esquema de formação de um hidrogel, na qual se visualiza a reacção por reticulação dos polímeros e a retenção de água. (6)

Os polímeros sofrem uma transição de fase de líquido para gel uns momentos depois de entrarem em contacto.

As esponjas são desenvolvidas a partir do gel, passando posteriormente por um processo designado *freeze drying* (liofilização).

Este método permite obter uma estrutura extremamente porosa. A solução polimérica (gel) é submetida a baixas temperaturas, inferiores a  $-20^{\circ}\text{C}$ , de maneira a congelar a solução e manter todas as moléculas no estado sólido. As amostras são então liofilizadas em vácuo, ou seja, o solvente é sublimado passando directamente do estado sólido para o gasoso. Portanto os poros que aparecem na matriz pertencem aos espaços anteriormente ocupados pelo solvente. (6)

A existência destes poros vai ser importante porque criam espaços onde é permitido incorporar células ou factores de crescimento.

### 1.3. TECIDO MUSCULAR

O corpo humano tem mais de 600 músculos que são responsáveis por produzir forças que permitem os movimentos corporais e o funcionamento de órgãos vitais.

Existem 3 tipos de músculos: o músculo esquelético, o músculo liso e o músculo cardíaco.

Os músculos esqueléticos são os mais abundantes e estão fixos aos ossos através dos tendões. Estes são responsáveis por movimentos tão diversificados como andar, levantar pesos ou expressões faciais (controle voluntário). São compostos por células longas e multinucleares.

O músculo liso localiza-se nas paredes dos órgãos ocos, nos vasos sanguíneos, olhos, glândulas e pele. Desempenha acções como deslocamento dos alimentos ao longo do tubo digestivo ou bombeamento do sangue nos vasos sanguíneos, e tem células mononucleares tal como o músculo cardíaco. Este último encontra-se no coração e é o responsável pelas contracções cardíacas que fazem bombear o sangue para os vasos sanguíneos.

No caso do músculo esquelético, este é composto por feixes musculares e estes por sua vez compostos por fibras musculares (células designadas miócitos). Cada fibra contém miofibrilhas que têm os sarcómeros. Os sarcómeros são estruturas com miofilamentos de actina e miosina, que são responsáveis pela contracção e relaxamento muscular (ver figura 11). (21)

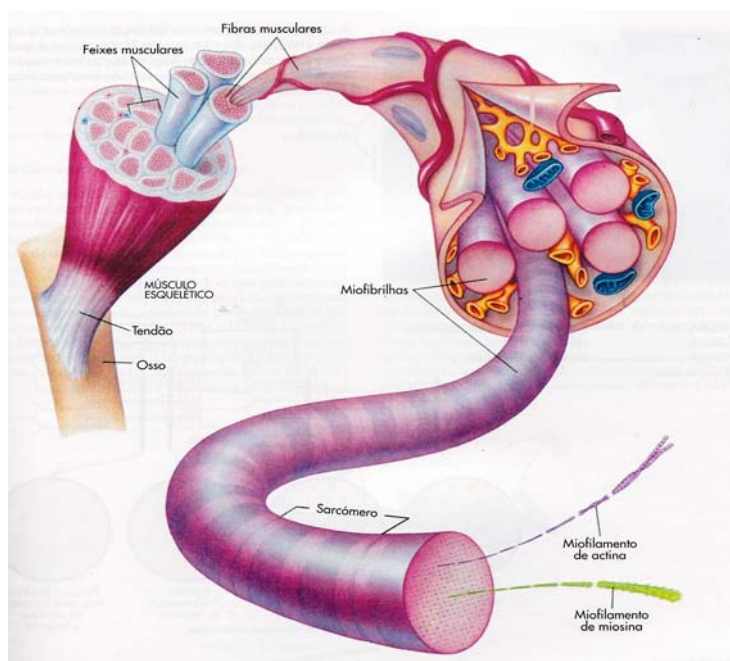


Figura 11 - Esquema da composição do músculo esquelético. (21)

As funções do tecido muscular dependem da manutenção da sua integridade. Em caso de perda ou deficiência deste tecido, é necessário um mecanismo que promova a sua regeneração. São exemplo: anomalias congénitas, doenças como a distrofia muscular, ou perdas em caso de cirurgias para remover tumores ou atrofias musculares. (22)

A medicina regenerativa vem de encontro a esta necessidade. Para tal devem ser incorporadas células na matriz polimérica que tenham a capacidade de proliferar e de se diferenciarem em células do tecido muscular.

As células mais usadas em estudos de regeneração de tecido muscular são as células estaminais mesenquimais (MSCs) e as células satélite.

A célula estaminal mesenquimal prolifera e diferencia-se em células do tecido ósseo, adiposo, muscular, cartilaginoso e outros (figura 12).

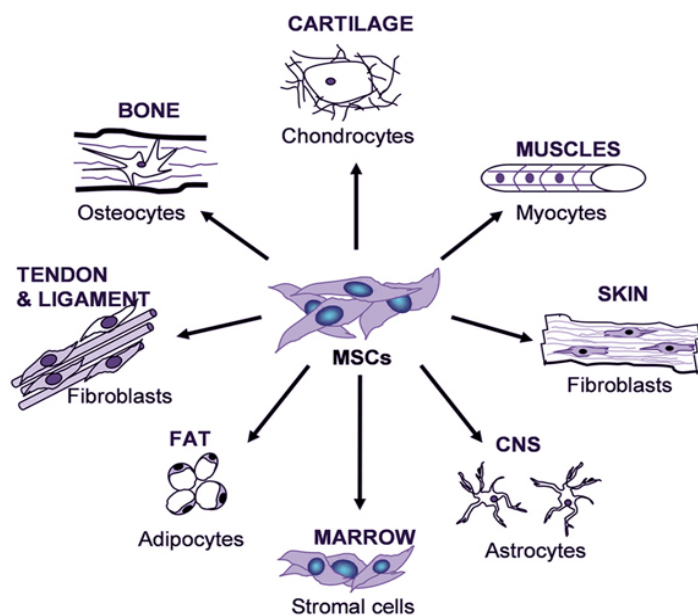


Figura 12 - Diferenciação das células mesenquimais em vários tipos de tecidos. (23)



Estas estão presentes no sangue do cordão umbilical, na matriz do cordão umbilical e na medula óssea. A recolha deste tipo de células deve ser feita preferencialmente na matriz do cordão umbilical. Isto porque é onde se encontra a maior percentagem deste tipo de células, são as que se multiplicam mais rapidamente e a sua colheita é não invasiva e não dolorosa. (24)

Para efeitos de regeneração de tecidos, as células estaminais mesenquimais podem ser isoladas, induzidas a proliferar e com a ajuda de factores oportunos, também se diferenciam em células do tecido muscular (miócitos).

As células satélite são células progenitoras das células musculares. Isto é, têm a tendência natural para se diferenciarem em miócitos. Normalmente não proliferam, mantendo-se “adormecidas”, mas em caso de um dano no tecido elas migram até ao local e começam a proliferar diferenciando-se depois em mioblastos.

#### 1.4. STATE-OF-ART NA REGENERAÇÃO DE TECIDO MUSCULAR

Com o objectivo de uma futura aplicação clínica de enxertos de tecido muscular, os estudos nesta área têm-se tornado bastante significativos. Ao longo dos últimos anos têm sido realizados estudos e testes variando factores condicionantes no processo, de forma a gerar um meio apropriado à regeneração do tecido e restabelecimento das suas funções no organismo.

Na estratégia de desenvolvimento dos *scaffolds*, existem estudos em que estes são biodegradáveis e outros em que são não-biodegradáveis.

Num exemplo de desenvolvimento de matrizes não biodegradáveis, utilizou-se vidro fosfatado para a regeneração *in vitro* de músculo esquelético craniofacial (25). Mas o modelo de *scaffold* que se biodegrada enquanto a estrutura muscular restaura naturalmente é o preferido.

No campo das matrizes biodegradáveis podem ser usados materiais sintéticos ou naturais.

Os estudos com materiais sintéticos englobam polímeros como o PGA (ácido poliglicólico) (26), PLLA (*poli (L-ácido-láctico)*) (27), poliuretanas (28), entre outros. Enquanto o PGA oferece a rigidez e conexão apropriadas à regeneração muscular, o PLLA permite a formação de fibras com uma grande variedade de diâmetros. O uso da poliuretana também mostrou ser possível a adesão, proliferação e diferenciação *in vitro* de miotubos multinucleados.

Os materiais naturais mais usados são o colagénio (29), a fibrina (30) e o alginato (31). O alginato permite a diferenciação miogénica em miotubos metabolicamente

activos. O uso de colagénio mostrou um alinhamento dos mioblastos e dos miofilamentos de actina e miosina. Por sua vez, a fibrina pode formar um gel através da incorporação de células satélite, factores de crescimento e trombina. Quando mioblastos são cultivados neste gel, eles diferenciam-se em fibras musculares contrácteis. Em relação ao colagénio e ao alginato, a fibrina tem a vantagem de permitir a ligação de factores de crescimento como FGF-2 (*fibroblast growth factor*) e VEGF (*vascular endothelial growth factor*) que aumentam fortemente a miogénese.

O uso de qualquer um dos materiais mencionados anteriormente mostrou-se viável na regeneração de tecido muscular, uma vez que promovem a proliferação de células satélite, diferenciação e o seu alinhamento. A escolha de um dos materiais para aplicação clínica deve ser feita mediante o meio e as condições de aplicação, já que cada um deles apresenta as suas próprias vantagens.

Os estudos na área de regeneração de tecido muscular utilizam preferencialmente as MSCs (32) ou as células satélite (31) e (33)).

As características das células satélite tornam-nas na escolha número um. As células satélite são mais acessíveis, sendo colhidas directamente do músculo, enquanto que as MSCs são colhidas da medula óssea por um processo invasivo e doloroso. Por outro lado, como são células progenitoras do tecido muscular, apresentam uma maior tendência para a diferenciação muscular (em relação às MSCs) exibindo as mesmas características e funções do tecido muscular do qual provêm.

Para uma aplicação clínica futura há que considerar outros factores, como a vascularização e inervação do tecido.

A vascularização do tecido muscular é importante para o transporte de nutrientes e gases até às células.

Existem pelo menos dois métodos estudados. Por um lado, pode-se incorporar *in vivo* uma estrutura muscular já regenerada onde exista uma rede de capilares que promova a vascularização do tecido (34). Ou então, desenvolver um *scaffold* pré-vascularizado onde serão implantados os mioblastos, por exemplo um gel de fibrina (35).

O sistema de inervação do tecido pode ser conseguido criando junções neuromusculares funcionais. Estas junções desenvolvem-se de uma co-cultura de miotubos e células neuronais (36). Como estes nervos musculares apresentam estímulos espontâneos, ou podem ser estimulados, alguns estudos (37) e (38) têm avançado fazendo variar o tipo de estímulo (eléctrico, mecânico..) até otimizar o processo.

Prevê-se que, com os avanços dos estudos nesta área, combinando diferentes tipos de *scaffolds* e de células, encontrar-se-á um método excelente e 100% viável.

## 1.5. TÉCNICAS DE CARACTERIZAÇÃO

As matrizes poliméricas desenvolvidas foram caracterizadas de acordo com a norma ISO 10993. Esta norma foi desenvolvida pela Organização Internacional de Padronização e pretende criar um padrão de testes a serem realizados no estudo da viabilidade de sistemas para implantar no corpo humano.

### 1.5.1. Estudo de Degradação *In Vitro*

Uma das características dos polímeros usados no desenvolvimento das matrizes poliméricas (pectina e quitosano) é a biodegradação. Ou seja, num ambiente como o corpo humano, estes polímeros quebram as suas ligações naturalmente, biodegradando-se.

Este estudo pretende simular as condições às quais vão ser submetidas as matrizes poliméricas, e avaliar a perda de massa das mesmas ao longo do tempo.

As matrizes são imersas num meio (solução) semelhante ao do organismo humano, e a percentagem da perda de peso é calculada através da equação 1, onde  $W_i$  corresponde ao peso inicial do *scaffold* e  $W_f$  ao peso final (em imersão) depois de se biodegradar.

Equação 1

$$\text{Perda de Peso} = \frac{W_i - W_f}{W_i} \times 100 (\%)$$

### 1.5.2. Microscopia Electrónica de Varrimento (SEM – *Scanning Electron Microscope*)

A microscopia electrónica de varrimento é uma técnica que permite obter uma imagem ampliada da superfície de um objecto.

Utiliza-se um feixe de electrões que vai incidir na superfície do objecto, fazendo um varrimento em toda a área superficial. Os electrões interagem com a superfície que foi previamente seca e revestida com um metal, geralmente ouro, dando origem a um sinal que será recolhido e analisado por um dispositivo electrónico. Todo este processo ocorre em vácuo para que não haja dispersão ou atenuação dos electrões.

Dependendo do tipo de equipamento, a técnica SEM consegue ampliar uma superfície até 500.000 vezes e tem um poder de resolução entre menos de 1 e 20 nm, fornecendo uma imagem muito detalhada. (39)

### 1.5.3. Capacidade de Inchaço (*Swelling*)

Os polímeros utilizados neste estudo têm a propriedade de absorver água ou soluções aquosas, aumentando o volume do *scaffold*, sem se dissolverem ou alterarem as propriedades do líquido envolvente.

Então, o estudo da capacidade de inchaço (*swelling*) é um parâmetro considerado importante, já que determina o comportamento dos *scaffolds* na presença de soluções aquosas. Esta análise é feita calculando o aumento de peso das matrizes ao longo do tempo, depois de imersas numa solução ( $W_h$ ). O valor de *swelling* é calculado pela equação 2, em que  $W_s$  é o peso do *scaffold* seco.

Equação 2

$$\text{Capacidade de inchaço} = \frac{W_h - W_s}{W_s} \times 100 (\%)$$

### 1.5.4. Análise Elementar

Esta técnica tem como objectivo analisar quantitativamente a presença de um determinado elemento químico (N, C, H e S) num composto, calculando a percentagem de peso de cada um em relação ao peso total da amostra.

O princípio de funcionamento desta técnica passa por submeter a amostra a uma reacção de combustão. O produto gasoso final (ao qual foi removido o oxigénio) é separado por cromatografia gasosa em azoto, dióxido de carbono, água e dióxido de enxofre. Estes gases vão então ser detectados e quantificados por um detector por condutividade térmica. (40) e (41)

Este processo é usado, por exemplo, para determinar a pureza de um composto químico.

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

A espectroscopia FTIR (*Fourier Transform InfraRed*) é uma técnica muito importante na caracterização de compostos químicos, sendo usada para verificar as ligações químicas ou as estruturas moleculares das amostras que são estudadas. (42)

Como é sabido, as ligações dos grupos funcionais vibram com uma frequência característica. Assim, quando uma molécula é exposta a radiação electromagnética na

região do infravermelho, ela absorve essa luz a frequências que são características da molécula. (42)

As frequências das vibrações dependem do comprimento da ligação (maior para ligações simples e menor para ligações triplas) e da massa dos átomos (os átomos mais leves têm maior frequência de vibração que os mais pesados). Existem alguns modos de vibração, mas os mais conhecidos são o alongamento, caracterizado pela mudança no comprimento da ligação, e a deformação, que acontece quando há uma variação do ângulo da ligação. Estas vibrações podem ser simétricas ou assimétricas. (43)

O espectrofotómetro usado em espectroscopia FTIR tem um interferómetro incorporado por onde é guiado o feixe de luz infravermelha (IV) com todos os comprimentos de onda. O sinal obtido é depois tratado por um método matemático, a transformada de Fourier, resultando num espectro idêntico ao de espectroscopia de infravermelho convencional: absorvância (%) em função de número de onda ( $\text{cm}^{-1}$ ). (44)

Na interpretação do espectro obtido é importante admitir o número de onda (que é proporcional à frequência) para o qual a absorvância é significativa. Para esses valores de número de onda, deve ser consultada a literatura para saber a que ligações químicas correspondem.

A técnica de FTIR pode ainda ser complementada com o ATR (*Attenuated Total Reflectance*) para uma análise superficial dos compostos químicos. O objectivo do ATR é então detectar os desvios no trajecto do feixe de luz IV, que acontecem num cristal com um elevado índice de refacção. (45)

O uso deste acessório faz diminuir o tempo de amostragem, minimizar as variações espectrais de utilizador para utilizador e obter uma melhor qualidade espectral para uma precisão maior no estudo das amostras. (45)

### 1.5.6. Estudo da Libertação Controlada do Fármaco

A incorporação de um fármaco numa matriz polimérica aumenta a sua eficiência, uma vez que a sua libertação ao longo do tempo pode ser regulada, dependendo dos polímeros usados, ou das condições químicas ou térmicas às quais o sistema é submetido.

A quantificação do fármaco que é libertado com o passar do tempo é feita através de uma análise espectrofotométrica UV/Vis da solução em que os *scaffolds* (com o fármaco) estão imersos. A partir dos valores de absorvância obtidos e de uma curva padrão relativa ao fármaco usado, calculam-se os valores de concentração.

### 1.5.7. Estudo de Hemocompatibilidade

Como se pretende que as matrizes poliméricas desenvolvidas neste estudo sejam utilizadas para implantar em organismos vivos, é de especial importância estudar a sua reacção quando em contacto com o sangue.

Por esta razão dois testes distintos foram realizados, por forma a avaliar a capacidade do material para induzir a formação de trombos (trombogenicidade) e em induzir a lise das hemácias (hemólise).

#### 1.5.7.1. Teste de Trombogenicidade

Quando se introduz um “material estranho” em contacto directo com o sangue, este responde apresentando alterações nos componentes sanguíneos.

Isto é o que acontece no caso de uma trombose. Durante este processo dá-se a adesão das plaquetas e uma resposta por parte dos factores de coagulação que formam fios de fibrina.

Este teste pretende quantificar a eficiência do processo de trombose. Colocando as amostras em contacto directo com uma determinada quantidade de sangue durante um certo intervalo de tempo. Depois de formado o trombo, este é pesado, calculando-se desta forma a percentagem de sangue que em contacto com o material desenvolveu o trombo.

#### 1.5.7.2. Determinação do Índice Hemolítico

A hemólise é um processo no qual se dá a ruptura das hemácias com a consequente libertação de hemoglobina para o meio.

Com o teste de hemólise pretende-se determinar a reacção hemolítica das matrizes poliméricas. Isto é, saber qual o grau de lise das hemácias, sabendo a quantidade de hemoglobina que é libertada para o plasma. Este estudo é importante, na medida em que é possível determinar a fragilidade das membranas das hemácias quando em contacto com os materiais poliméricos.

Após algum tempo com os *scaffolds* em contacto directo com sangue diluído faz-se a leitura do plasma por análise espectrofotométrica UV/Vis e através de uma curva de calibração calcula-se a concentração de hemoglobina. Como as concentrações iniciais de hemoglobina no sangue e no plasma são previamente conhecidas, através de alguns cálculos obtém-se a/o percentagem/índice de hemólise.

Este método é conhecido por método de cianometahemoglobina modificado. Ele determina qual a concentração de Hb por espectrofotometria quando ela se encontra sob a forma de cianometahemoglobina. Para tal é necessário fazer reagir a Hb com o ferrocianeto de potássio e o cianeto de potássio. Esta reação converte todas as formas de hemoglobina (oxihemoglobina, desoxihemoglobina, metahemoglobina e carbohemoglobina) em cianometahemoglobina que tem um pico de absorvância aos 540 nm.

A classificação dos *scaffolds* é feita através do valor do índice hemolítico obtido (ver tabela 1).

Índice Hemolítico	Classificação
0-2	Não hemolítico
2-5	Ligeiramente hemolítico
>5	Hemolítico

Tabela 1 - Classificação de um biomaterial em relação ao seu índice hemolítico. (46)

### 1.5.8. Estudo de Biocompatibilidade *In Vivo*

Este estudo baseia-se na avaliação dos efeitos locais de um tecido após o implante de um biomaterial num animal de laboratório. Analisando o tecido adjacente, consegue-se saber qual o efeito celular que ocorre em resposta à presença do material no organismo.

O implante de um *scaffold* é realizado normalmente no tecido subcutâneo do animal, também podendo ser utilizados tecidos específicos, como o osso ou o músculo, dependendo do tipo de estudo. Os animais mais utilizados, tal como prevê a norma ISO 10993-6, são os ratos, porquinhos-da-índia ou coelhos.

Depois de decorrido o tempo necessário para a experiência, os animais são sacrificados, e são colhidos os *scaffolds* com o tecido adjacente com o objectivo de ser realizada uma avaliação histológica.

## 2. MATERIAIS E MÉTODOS

### 2.1. LISTAS DE REAGENTES E EQUIPAMENTOS

#### 2.1.1. Reagentes e equipamentos utilizados na preparação das matrizes poliméricas

Para a preparação das matrizes poliméricas foram usados os reagentes e equipamentos que estão listados nas tabelas 2 e 3 respectivamente.

Reagentes	Fornecedor	Característica
Água destilada	Destilada no laboratório	-
Ácido acético	Sigma-Aldrich Fluka	>99,8%
Acetato de sódio	Sigma-Aldrich Ultra	≥99,0%
Cloreto de sódio	Sigma-Aldrich	≥99,5%
Pectina (de citrino)	Sigma	Ácido galacturónico ≥ 74,0%
Quitosano	Aldrich	Peso molecular médio
Vancomicina Cloridrato	FARMA-APS	-
Carbodiimida	Sigma	≥97,0%

Tabela 2 - Lista de reagentes usados na preparação das matrizes poliméricas.

Equipamentos	Marca	Modelo
Agitador magnético	IKA®	IKAMAG RCT
Balança analítica	PRECISA	125 A SCS
Homogenizador mecânico	Kinematica AG	Polytron PT 6000
Centrífuga	HERMLE LaborTechnik	Z 366
Liofilizador	Snijders Scientific	2040

Tabela 3 - Lista de equipamentos usados na preparação das matrizes poliméricas.



### 2.1.2. Reagentes e equipamentos utilizados na caracterização das matrizes poliméricas

Nas tabelas 4 e 5 constam respectivamente os reagentes e os equipamentos usados na caracterização dos *scaffolds*.

Reagentes	Fornecedor	Característica
PBS	Sigma	Dissolve 1 tablete em 200 mL de água destilada
Água destilada	Destilada no laboratório	-
Vancomicina	FARMA-APS	-
Sangue	Probiológica	Coelho
Cloreto de Cálcio	Panreac Quimica SA	-
Formaldeído	Riedel-de Haën	36,5%
Cloreto de Potássio	Merck KGaA	-
di-Hidrogenofosfato de Potássio	May & Baker LTD	-
Cloreto de Sódio	Sigma-Aldrich	-
Hidrogenofosfato de Sódio di-Hidratado	Riedel-de Haën	-
Cianeto de Potássio	Panreac Quimica SA	-
Ferrocianeto de Potássio	Riedel-de Haën	-
Triton X-100	Riedel-de Haën	-
Eritrócitos liofilizados	Sigma-Aldrich	-
Largactil (clorpromazina)	Laboratórios Vitória	25 mg/mL
Ketalar (cloridrato de cetamina)	Pfizer	50 mg/mL
Formol neutro tamponado	-	10%
Álcool	-	70%, 90% e 100%
Xilol	-	-
Parafina	-	-
Hematoxilina		
Eosina		

Tabela 4 - Lista de reagentes usados na caracterização das matrizes poliméricas.

Técnica	Equipamento	Marca	Modelo	origem
Degradação <i>In Vitro</i>	Balança analítica	PRECISA	125 A SCS	Suíça
	Incubadora	Memmert	ICP 600	Alemanha
SEM	Microscópio electrónico de varrimento	JEOL	JSM-5310	Japão
Capacidade de Inchaço	Balança analítica	PRECISA	125 A SCS	Suíça
Análise Elementar	Analizador elementar	FISONS	EA 1108 CHNS-O	Inglaterra

<b>FTIR-ATR</b>	Espectrofotômetro	JASCO	FT/IR - 4200 Mk II Golden	Inglaterra
	Acessório ATR	SPECAC	Gate™ com cristais de diamante	Inglaterra
<b>Libertação Controlada do Fármaco</b>	Espectrofómeto UV/Vis	JASCO	V-530	Inglaterra
	Balança Analítica	PRECISA	125 A SCS	Suíça
	Thermoshaker	Gerhardt	Thermoshake Dialysis Tubing	Alemanha
	Membrana de Diálise	Sigma	Cellulose (MWCO 12.400)	
<b>Trombose</b>	Centrífuga	HERMLE LaborTech nik	Z 366	Alemanha
	Incubadora	Memmert	ICP 600	Alemanha
	Balança Analítica	PRECISA	125 A SCS	Suíça
<b>Hemólise</b>	Agitador magnético	IKA®	IKAMAG RCT	Alemanha
	Espectrofotômetro UV/Vis	JASCO	V-530	Inglaterra
	Centrífuga	HERMLE LaborTech nik	Z 366	Alemanha
	Incubadora	Memmert	ICP 600	Alemanha
<b>Biocompatibilidade In Vivo</b>	Seringa	Pic Indolor	Insumed 1 mL	Itália
	Agulha hipodérmica	Pic Indolor	0,5×16 mm BD	Itália
	Seringa	BD	Discardit™ II 5mL	Espanha
	Agulha hipodérmica	Pic Indolor	0,9×25 mm	Itália
	Lâminas de bisturi	Kiato	Nº4	Índia
	Fio de sutura com agulha	D-tek sutures	Seda USP 3/0	Chipre
	Processador de tecidos	Shandon	Citadel 1000	EUA
	Inclusora de parafina	Shandon	Histocentre 2	EUA
	Micrótomo	Shandon	AS 325	EUA
	Microscópio Óptico	Nikon	Eclipse E600	Japão
Máquina Fotográfica	Nikon	FDX 35	Japão	

Tabela 5 - Lista de equipamentos usados na caracterização das matrizes poliméricas.

## 2.2. PREPARAÇÃO DAS MATRIZES POLIMÉRICAS

Foram desenvolvidos *scaffolds* injectáveis na forma de gel e *scaffolds* implantáveis na forma de esponja, de pectina:quitosano com rácios 1:1 e 2:1. Prepararam-se também matrizes poliméricas na proporção 1:1 com o fármaco incorporado, tanto em gel como em esponja.

Estas proporções mencionadas referem-se a proporções mássica.

### 2.2.1. *Scaffolds* Injectáveis – gel

Começou-se por preparar uma solução tampão de pH=4,5. Para isso, diluíram-se 3,42mL de ácido acético ( $\text{CH}_3\text{COOH}$ ), 3,2976g de acetato de sódio ( $\text{CH}_3\text{COONa}$ ) e 0,57g de cloreto de sódio ( $\text{NaCl}$ ) em 1L de água destilada.

No caso do hidrogel pectina:quitosano com um rácio 1:1 diluíram-se separadamente 5g de pectina e 5g de quitosano em 500mL de solução tampão, cada um. E para a preparação do hidrogel pectina:quitosano com um rácio 2:1 dissolveram-se também separadamente 5g de pectina e 2,5g de quitosano em 500mL da mesma solução tampão respectivamente.

Em ambos os *scaffolds* misturou-se com o auxílio de um homogenizador mecânico a pectina e o quitosano a 7000 rpm (rotações por minuto) durante 10 min.

### 2.2.2. *Scaffolds* Implantáveis – esponja

Na preparação dos *scaffolds* implantáveis nas razões 1:1 e 2:1 foi realizado todo o procedimento experimental anterior, como descrito na secção 2.2.1.

Depois de homogenizados durante 10 min, os géis obtidos foram colocados a centrifugar a 5000 rpm por 5 min.

Após este intervalo de tempo, as matrizes foram lavadas 2 vezes em água destilada e foram colocadas amostras de 50mL de cada matriz polimérica em tubos tipo Falcon onde foram congeladas.

As amostras com os rácios 1:1 e 2:1 foram posteriormente liofilizadas em vácuo durante 2 dias.

### 2.2.3. Scaffold Injectável com Fármaco

Diluíram-se separadamente 25mg de pectina e 25mg de quitosano em 2,5mL da solução tampão mencionada na secção 2.2.1., cada um.

Misturou-se a solução de pectina, a solução de quitosano, 20mg de vancomicina e 20mg de carbodiimida a 7000 rpm durante 20min usando um homogenizador mecânico.

### 2.2.4. Scaffold Implantável com Fármaco

No desenvolvimento da esponja também foi realizado o procedimento descrito na secção 2.2.3., depois o gel foi centrifugado a 5000 rpm por 5min. A amostra foi lavada duas vezes em água destilada e colocada a congelar, sendo posteriormente liofilizada em vácuo durante 2 dias.

## 2.3. TÉCNICAS DE CARACTERIZAÇÃO

### 2.3.1. Estudo de Degradação *In Vitro*

As matrizes poliméricas alvo deste estudo foram as esponjas de pectina:quitosano 1:1 e 2:1.

Foram cortadas pequenas amostras em forma de cubo com cerca de 5 mm de lado e colocadas em vials com uma solução PBS (tampão fosfato salino) com pH=7,4.

Um total de 24 exemplares (12 de cada rácio), que tinham sido pesados antes da sua imersão em PBS ( $W_i$ ), foram colocados numa incubadora a 37°C.

Foram efectuadas as medições de massa das esponjas semanalmente por um período de 4 semanas ( $W_f$ ). Sendo que 3 amostras (de cada rácio) permaneceram em imersão durante uma semana, outras 3 amostras durante 2 semanas, e assim sucessivamente até à 4ª semana de estudo.

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

Esta técnica serviu para visualizar a morfologia e topografia das esponjas de rácios 1:1 e 2:1, antes e depois de sofrerem biodegradação por imersão em PBS (pH=7,4). As amostras imersas em PBS foram analisadas uma (de cada rácio) por cada semana, durante um período de 4 semanas.

As amostras que tinham sido previamente revestidas por uma fina camada de ouro/platina (Au/Pt) por forma a serem electricamente condutoras, foram colocadas no microscópio electrónico de varrimento, utilizando um potencial eléctrico de excitação de 20 kV.

### 2.3.3. Capacidade de Inchaço (*Swelling*)

Os testes de *swelling* foram realizados às esponjas com as proporções 1:1 e 2:1, à temperatura ambiente ( $T \approx 25^\circ\text{C}$ ), por um período de cerca de 6 horas.

Este estudo foi realizado, colocando as esponjas em 2 soluções diferentes.

No estudo 1, pequenas amostras foram pesadas e colocadas em vials, imersas em água destilada. Em intervalos de tempo frequentes, as amostras eram retiradas dos vials, pesadas, e colocadas em imersão novamente.

No caso do estudo 2 foi realizado o mesmo procedimento do estudo 1, mas as matrizes foram imersas numa solução PBS de  $\text{pH} = 7,4$ , em vez de em água destilada.

### 2.3.4. Análise Elementar

As amostras analisadas foram os *scaffolds* implantáveis 1:1 e 2:1, bem como a pectina e o quitosano puros.

Pequenas amostras de cada um foram colocadas em cápsulas de estanho. As cápsulas foram introduzidas no aparelho de análise elementar, do qual se obtiveram as percentagens de peso de cada elemento químico.

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

As amostras caracterizadas através desta técnica foram a pectina e o quitosano puros, e as matrizes poliméricas na forma de esponja nas razões 1:1 e 2:1.

Na análise por FTIR-ATR foi usada uma resolução espectral de  $4 \text{ cm}^{-1}$ , sendo feitas 128 acumulações à temperatura ambiente na região de  $4000$  a  $500 \text{ cm}^{-1}$ .

Depois da área do cristal ter sido limpa e de se efectuar a análise do background (calibração), colocou-se na área do cristal o material a ser analisado. Feito isto, o braço do dispositivo de ATR foi colocado por forma a exercer uma pressão sobre a amostra.

Este procedimento foi repetido para todas as amostras, e através do software disponível obtiveram-se os gráficos de absorvância (%) em função do número de onda ( $\text{cm}^{-1}$ ) para cada uma delas.

### 2.3.6. Estudo da Liberação Controlada do Fármaco

Este teste pretende estudar o perfil de liberação do fármaco, da esponja 1:1 com fármaco e do gel 1:1 também com fármaco.

Começou-se por fazer a curva padrão correspondente à vancomicina. Assim, prepararam-se 8 soluções de PBS com diferentes quantidades de vancomicina, sabendo a concentração de fármaco de cada solução. Foi feita a leitura da absorvância a 280 nm (comprimento de onda característico da vancomicina) para cada solução. Sabidos os valores da concentração de fármaco e os valores de absorvância, construiu-se a curva padrão do fármaco.

Para estudar as esponjas com fármaco, cortaram-se 3 fatias semelhantes que foram pesadas e imersas em soluções de PBS com  $\text{pH}=7,4$ . As amostras imersas foram colocadas num *thermoshaker* a 100 rpm e a uma temperatura de  $37^\circ\text{C}$ .

Em intervalos de tempo determinados, era recolhido 1 mL da solução PBS onde as esponjas estavam imersas e posteriormente substituído pelo mesmo volume de solução PBS (sem fármaco). A solução PBS com presença de fármaco foi depois analisada no espectrofotómetro num comprimento de onda de 280 nm.

No caso do gel com a vancomicina, o estudo também foi feito em triplicado. Colocaram-se 3 amostras de gel, previamente pesadas, em membranas de diálise. Essas membranas foram imersas em PBS nas mesmas condições das esponjas, a  $37^\circ\text{C}$ , no *thermoshaker* a 100 rpm. E tal como anteriormente, era retirado 1 mL de PBS com fármaco e colocado 1 mL de solução PBS, e feita a leitura do valor de absorvância.

Todo o procedimento tido anteriormente com a esponja e o gel com fármaco, foi também feito à esponja 1:1 sem fármaco e ao gel 1:1 sem fármaco, como sendo o “branco”.

Todos os valores de absorvância obtidos permitiram calcular a concentração do fármaco em cada solução, a partir da curva padrão determinada no início.

### 2.3.7. Estudo de Hemocompatibilidade

Estes testes pretendem estudar a hemocompatibilidade em *scaffolds* implantáveis de rácios 1:1 e 2:1.

Antes de iniciados os experimentos com o sangue, primeiro realizou-se um teste ao sangue a ser utilizado para determinar se estava em perfeitas condições para análise.

Uma pequena amostra de sangue foi colocada a centrifugar a 5500 rpm durante 15 minutos. No final verificou-se a formação de 2 camadas, uma sólida que corresponde às células (glóbulos brancos e vermelhos e plaquetas) e uma líquida que corresponde ao plasma. Conclui-se então que o sangue é passível de uso.

#### *2.3.7.1. Teste de Trombogenicidade*

Foram cortadas e pesadas pequenas fatias das matrizes poliméricas com os 2 rácios diferentes. O estudo feito em triplicado, envolveu 6 amostras (3 de cada rácio) para um intervalo de tempo de 20 minutos, e outras 6 para 40 minutos.

Sobre cada amostra adicionou-se 250  $\mu\text{L}$  de sangue de coelho e 25  $\mu\text{L}$  de uma solução de cloreto de cálcio com uma concentração de 0,1M. Este procedimento foi também feito, adicionando o sangue e o cloreto de cálcio a 3 caixas de Petri de vidro sem amostras, de maneira a obter os resultados do controlo positivo.

As caixas de Petri com as amostras e com o controlo positivo, foram posteriormente colocadas numa incubadora a 37°C durante 20 minutos e durante 40 minutos.

Passado esse tempo, adicionaram-se 5 mL de água destilada e 1 mL de formaldeído. A função da água é travar o processo de coagulação, “lavando” as esponjas por forma a retirar das mesmas o sangue que não formou o trombo, já o formaldeído foi usado para fixar o trombo aos *scaffolds*.

A água com sangue diluído e o formaldeído foram retirados por sucção com recurso a uma pipeta. Mais uma vez colocou-se 1 mL de formaldeído, que foi posteriormente removido pelo mesmo processo.

As amostras foram novamente colocadas na estufa a 37°C, onde permaneceram por 1 dia, e ao fim desse tempo foram pesadas.

#### *2.3.7.2. Determinação do Índice Hemolítico*

Começou-se por preparar uma solução de PBS de pH=7,4, uma solução de Drabkin modificada e uma solução de hemoglobina (Hb).

Para a solução de PBS, de concentração 0,01M, dissolveram-se 0,2 g de cloreto de potássio (KCl), 0,2 g de di-hidrogenofosfato de potássio ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ), 0,8 g de cloreto

de sódio (NaCl) e 1,43 g de hidrogenofosfato de sódio di-hidratado ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ) em 1L de água destilada.

Na preparação da solução de Drabkin modificada dissolveram-se em 1L de água destilada, 50 mg de cianeto de potássio (KCN), 200 mg de di-hidrogenofosfato de potássio ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ), 140 mg de ferrocianeto de potássio ( $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ ) e 1 mL de Triton X-100 (tensioactivo não iónico). A solução foi filtrada e colocada num recipiente de vidro revestido com papel de alumínio (para proteger da luz).

A solução de Hb foi preparada dissolvendo 0,28g de eritrócitos liofilizados em 75 mL de solução de PBS. A solução foi filtrada até ficar límpida.

#### *2.3.7.2.1. Determinação da concentração de hemoglobina no sangue e no plasma*

Para determinar a concentração da hemoglobina é necessário obter uma curva de calibração.

Diluiu-se então 1 mL da solução de hemoglobina em 5 mL da solução de Drabkin modificada, e após 5 minutos de espera fez-se um varrimento no espectrofotómetro na gama de comprimentos de onda entre 400 a 800 nm.

Foram feitas as leituras de absorvância a 540, 504 e 750 nm, a fim de verificar as seguintes condições:

$$1,59 < \frac{A_{540}}{A_{504}} < 1,63$$

$$A_{750} \leq 0,003$$

Como os resultados estavam concordantes, continuou-se com os ensaios.

A concentração da hemoglobina na solução foi calculada pela equação 3:

Equação 3

$$[\text{Hb}]_{\text{solução}} = 1,465 \times A_{540 \text{ nm}} \times f_d \text{ (g/L)}$$

onde  $f_d$  é o factor de diluição (neste caso é 6) e  $A_{540 \text{ nm}}$  é o valor da absorvância para um comprimento de onda de 540 nm.

Preparou-se um conjunto de 9 amostras, dissolvendo um certo volume de solução de hemoglobina num determinado volume de solução de Drabkin, conforme a tabela 6.



<b>Amostra nº</b>	1	2	3	4	5	6	7	8	9
<b>Solução de Hemoglobina (mL)</b>	0	0,5	1	1,5	2	2,5	3	3,5	4
<b>Solução de Drabkin (mL)</b>	5	4,5	4	3,5	3	2,5	2	1,5	1

Tabela 6 - Volumes das soluções de hemoglobina e Drabkin usados para fazer a curva de calibração.

Cada amostra foi colocada no espectrofotómetro por forma a ler o seu valor de absorvância a 540 nm e então determinar a curva de calibração.

Calcula-se a concentração da hemoglobina em cada amostra através da equação 4:

Equação 4

$$[\text{Hb}]_{\text{amostra}} = \frac{V_{\text{solução hemoglobina}}}{V_{\text{total}}} \times [\text{Hb}]_{\text{solução}} \text{ (g/L)}$$

sendo  $V_{\text{solução hemoglobina}}$  o volume da solução de hemoglobina (mL) e  $V_{\text{total}}$  a soma do volume de solução de hemoglobina com o volume de solução de Drabkin (mL).

A cada amostra corresponde um valor de concentração de hemoglobina e um valor de absorvância, e assim constrói-se a curva de calibração.

Para calcular a concentração de hemoglobina no plasma, diluiu-se 1 mL da parte sobrenadante, da amostra de sangue que foi previamente centrifugada, em 1 mL de solução de Drabkin. Foi lido o valor de absorvância a 540 nm e através da curva de calibração determinou-se a concentração de hemoglobina no plasma.

No caso da determinação da concentração de hemoglobina no sangue, diluíram-se 20  $\mu\text{L}$  de sangue em 5 mL de solução de Drabkin modificada. Tal como anteriormente, leu-se a absorvância para um comprimento de onda de 540 nm e determinou-se a concentração da hemoglobina do sangue usando a curva de calibração.

#### 2.3.7.2.2. Diluição do sangue

O sangue foi diluído em 5 mL de solução de Drabkin por forma a obter uma concentração de hemoglobina de  $10 \pm 1 \text{ mg/mL}$ . Com o objectivo de comprovar o valor da concentração de hemoglobina, leu-se a absorvância no espectrofotómetro a 540 nm e através da curva de calibração calculou-se esse valor.

O valor da concentração de hemoglobina no sangue calculado foi de 10,11 mg/ml, o que permitiu continuar com o protocolo já que se encontra dentro do valor pretendido.

### 2.3.7.2.3. *Contacto das matrizes com o sangue*

As esponjas foram cortadas em rodela circular por forma a terem uma área superficial total com cerca de 18 cm<sup>2</sup>. Foram então colocadas em tubos Falcon imersas em solução PBS, na incubadora a 37°C durante 12 horas.

Passado esse intervalo de tempo, as esponjas foram retiradas do PBS, e num novo tubo juntou-se ao material 6 mL do sangue que tinha sido anteriormente diluído. As amostras permaneceram imersas no sangue, durante 3 horas na incubadora a 37°C.

Os tubos foram colocados na centrífuga a 5500 rpm durante 15 minutos.

Formaram-se duas camadas, e da parte sobrenadante recolheu-se 1 mL que se diluiu em 1 mL da solução de Drabkin. Leu-se a absorvância a 540 nm e calculou-se a concentração de hemoglobina (através da curva de calibração).

Fez-se o mesmo para o controlo negativo e positivo, sendo que o controlo negativo inclui 1 mL de sangue diluído e 1 mL de solução PBS e o controlo positivo, 1 mL do mesmo sangue e 1 mL de água destilada.

O índice hemolítico foi calculado através da equação 5, onde *A* representa a absorvância a 540 nm:

Equação 5

$$\text{Índice Hemolítico} = \frac{A_{\text{amostra}} - A_{\text{Controlo Negativo}}}{A_{\text{Controlo Positivo}} - A_{\text{Controlo Negativo}}}$$

## 2.3.8. Estudo de Biocompatibilidade *In Vivo*

### 2.3.8.1. *Introdução das Matrizes Poliméricas nos Animais*

Para o estudo de biocompatibilidade *in vivo* (estudo prévio) utilizaram-se dois ratos machos de estirpe Wistar, com 9 semanas.

Num animal foi injectado o *scaffold* injectável (gel) de rácio 1:1 dando-lhe o nome de R1, e no outro animal introduziu-se o *scaffold* implantável (esponja) também de rácio 1:1 por via cirúrgica, designando-o de R2.

Para a anestesia preparou-se uma mistura com 0,1 mL de Largactil que tem uma acção sedativa e anti-psicótica, e 0,7 mL de Ketalar com uma acção disruptora do sistema nervoso periférico. Foi feita uma administração intraperitoneal, injectando 0,8 mL da mistura anestésica em cada animal.

Quando a anestesia começou a fazer efeito, permanecendo os animais imóveis, estes foram colocados num campo esterilizado para a introdução das matrizes poliméricas. Ao animal R1 foi realizada a assepsia (com gaze embebida em solução antisséptica) no local da introdução do biomaterial. Injectou-se 0,4 mL de gel pectina:quitosano 1:1 utilizando uma agulha com um diâmetro de 0,9 mm para permitir a passagem do mesmo. A administração subcutânea foi realizada na área dorsal do animal, uma injeção de cada lado da linha sagital ao nível das costelas flutuantes (figura 13).



Figura 13 - Injecção do gel pectina:quitosano 1:1 no animal R1.

No caso do animal R2 foi realizada a tricotomia (remoção dos pêlos) na zona a ser colocada a esponja.

Depois de exposta a pele do rato, realizou-se também a assepsia por forma a manter o animal num meio inerte. O biomaterial foi introduzido nos mesmos dois locais em que foi colocado no animal R1.

Com o auxílio do bisturi realizou-se uma incisão paralela à linha sagital com cerca de 1,5 cm (figura 14). Através de uma tesoura de pontas redondas criou-se uma bolsa, expondo o espaço subcutâneo, onde foi colocada a esponja com dimensões 5x5x3 mm (figura 15). Por fim, as bordas da incisão foram unidas e suturadas com 3 pontos, usando um fio de seda (figura 16).

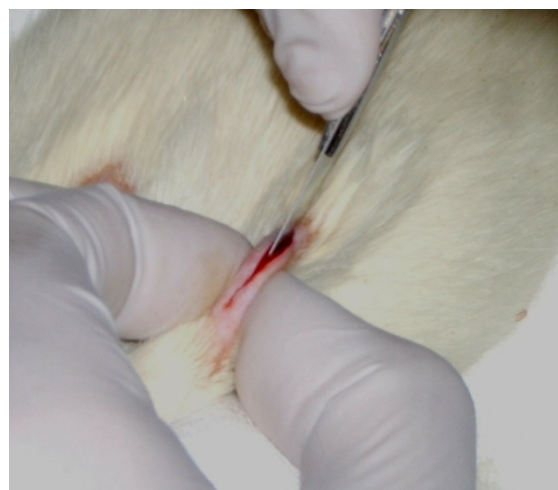


Figura 14 - Realização da incisão.

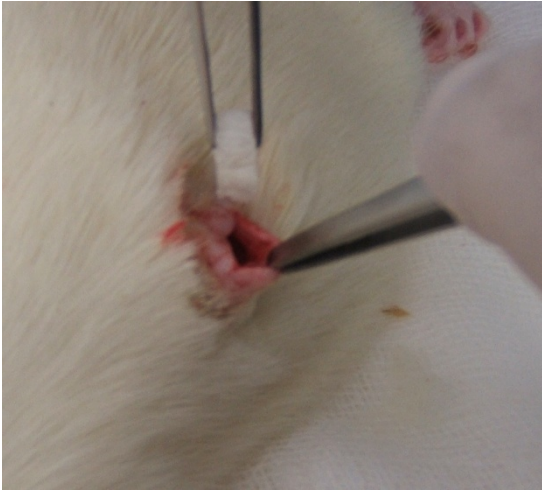


Figura 15 - Introdução da esponja no animal.



Figura 16 - Realização da sutura.

Os animais foram mantidos no Biotério por um período de 7 dias, sendo alimentados com ração e água.

#### 2.3.8.2. *Necrópsia e Processamento Histológico*

Decorridos 7 dias desde o implante do gel e da esponja nos animais R1 e R2 respectivamente, os animais foram eutanasiados através de uma injeção intramuscular de uma mistura de Ketalar e Largactil com sobredosagem anestésica. Sendo que cada animal foi sacrificado sem a presença do outro.

Foram realizadas incisões com uma margem de segurança, retirando os *scaffolds* e o tecido adjacente. O tecido retirado foi imerso numa solução de formol neutro tamponado a 10% por um período 7 dias.

Foi também observado o baço de ambos os animais, apresentando-se com aparência normal.

Passado esse período de tempo, o tecido foi cortado em pequenos fragmentos com espessura reduzida e colocado em cassetes. Essas cassetes foram introduzidas num processador de tecidos com vários tanques com solventes diferentes. De tempos a tempos, as cassetes com o tecido mudavam do tanque onde estavam imersas para o tanque seguinte com um solvente diferente. A tabela 7 resume os tempos em que as cassetes estiveram em cada tanque. O processo que demorou 20 horas pretendeu desidratar os tecidos, impregná-los com um solvente da parafina, o xilol, e depois com parafina.

<b>Solvente</b>	<b>Tempo (horas)</b>
<b>Formol 1</b>	2
<b>Formol 2</b>	2
<b>Álcool 70%</b>	1
<b>Álcool 90%</b>	1
<b>Álcool 100% 1</b>	1
<b>Álcool 100% 2</b>	2
<b>Álcool 100% 3</b>	2
<b>Xilol 1</b>	1
<b>Xilol 2</b>	1,5
<b>Xilol 2</b>	1,5
<b>Parafina 1</b>	2
<b>Parafina 2</b>	3

Tabela 7 - Tempo de imersão das cassetes em cada tanque.

Os fragmentos que foram removidos da máquina de processamento, foram incluídos em parafina a cerca de 60°C por uma máquina de inclusão e colocados num prato frio para solidificar a parafina.

Os blocos de parafina estiveram a arrefecer no frigorífico e depois foram seccionados por um micrótomo com uma espessura de 3 µm.

Os cortes obtidos foram imersos em água a uma temperatura de 55°C, para posteriormente serem montados em lâminas histológicas e secos numa estufa (temperatura de 37°C).

A fim de remover a parafina, as lâminas foram imersas em xilol e depois novamente em álcool a 100 e a 90%, e seguidamente foram hidratadas.

Finalmente os cortes foram corados pela técnica de Hematoxilina e Eosina. Começou-se por uma coloração nuclear, sendo as lâminas imersas em Hematoxilina durante 15 minutos. As lâminas foram lavadas em água corrente e foram coradas numa solução aquosa de Eosina a 1% durante 3 minutos, sendo novamente lavadas em água corrente.

Por fim, os cortes foram desidratados em álcool a 70, 90 e 100% e imersos em xilol. As lâminas foram montadas num meio de montagem sintético, por forma a serem observadas ao microscópio e fotografadas.

### 2.3.9. Análise Estatística

Todos os ensaios de caracterização foram feitos em triplicado para observar se existe uma diferença significativa (variância) entre amostras nas mesmas condições.

Os cálculos de análise estatística foram realizados pelo método *ANOVA*, sendo expressos como média  $\pm$  desvio padrão.

O valor do desvio padrão ( $\sigma$ ) calcula-se pela equação seguinte:

Equação 6

$$\sigma = \sqrt{\frac{(x_1 - \bar{x})^2 + (x_2 - \bar{x})^2 + (x_3 - \bar{x})^2}{3}}$$

em que  $x_1$ ,  $x_2$  e  $x_3$  são os valores das amostras 1, 2 e 3 respectivamente e  $\bar{x}$  é o valor médio das 3 amostras.

## 3. RESULTADOS

### 3.1. PREPARAÇÃO DAS MATRIZES POLIMÉRICAS

As matrizes poliméricas de pectina e quitosano obtidas apresentam-se na forma de gel e na forma de esponja como se pode observar nas figuras 17 e 18.

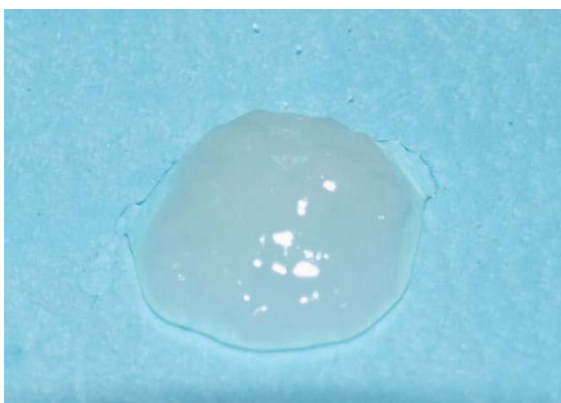


Figura 17 - Gel pectina:quitosano desenvolvido.



Figura 18 - Esponja pectina:quitosano desenvolvida.

### 3.2. ESTUDO DE DEGRADAÇÃO *IN VITRO*

O gráfico 1 ilustra os resultados do teste de degradação *in vitro*.

Para calcular a percentagem de peso perdido usou-se a equação 1 da secção 1.5.1. Assim, o gráfico seguinte representa o peso final das esponjas após cada semana de imersão, bem como os respectivos desvios padrão. Ou seja, ao seu peso inicial

(considerado 100%) subtrai-se a percentagem de perda de peso, para obter a percentagem de peso final.

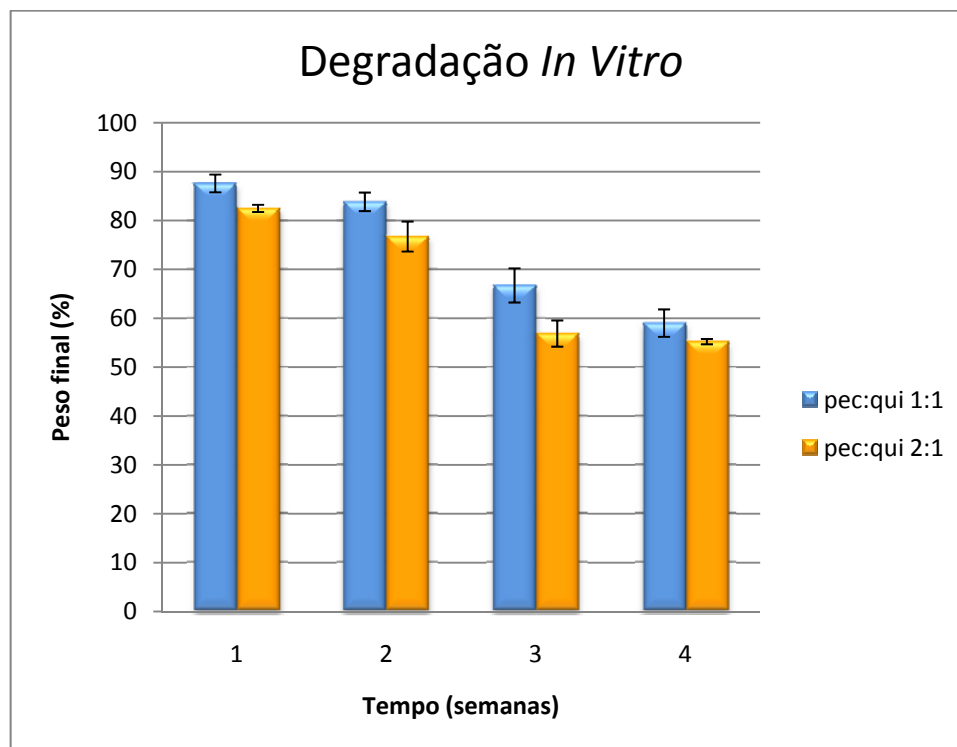


Gráfico 1 - Percentagem média de peso final de 3 amostras para os 2 tipos de esponjas por um período de 4 semanas.

Da análise do gráfico 1 verifica-se que ao longo do tempo as matrizes se vão biodegradando, ou seja vão perdendo peso. E esta perda de peso é sempre maior nos *scaffolds* pectina:quitosano de rácio 2:1.

Durante a 1ª semana, as matrizes 1:1 perderam cerca de 13% do seu peso inicial, enquanto que as 2:1 perderam mais de 17%. E ao fim de um mês, os *scaffolds* de rácios 1:1 e 2:1 já só apresentavam cerca de 59 e 55% respectivamente, do seu peso inicial.

Todos estes resultados apresentam um desvio padrão médio de cerca de 2,5% para as matrizes 1:1 e 1,76% para as matrizes 2:1.

### 3.3. MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE VARRIMENTO (SEM)

A visualização da morfologia das esponjas pectina:quitosano 1:1 e 2:1 por técnica SEM (figura 19) evidencia a estrutura tridimensional e porosa de ambos os *scaffolds*, havendo interconecção entre os poros.



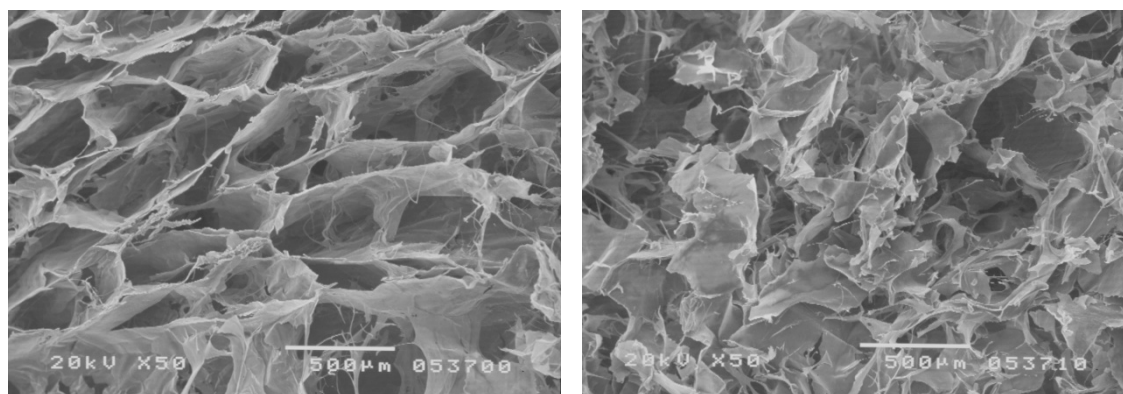
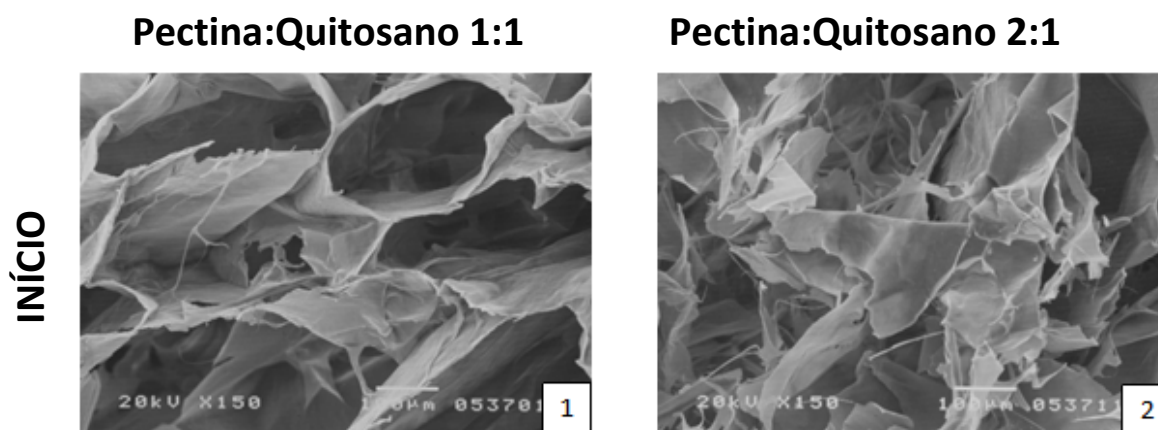


Figura 19 - Imagens SEM dos *scaffolds* implantáveis pectina:quitosano 1:1 (à esquerda) e 2:1 (à direita) com uma ampliação de 50×.

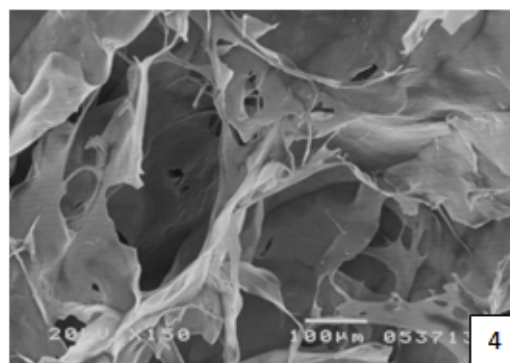
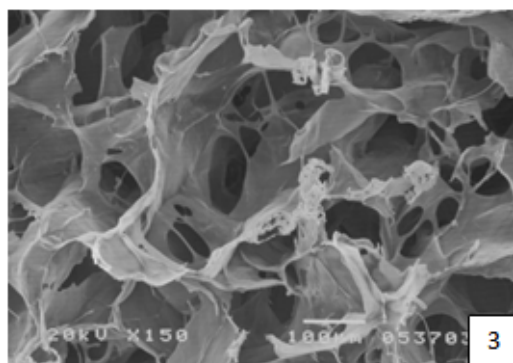
O *scaffold* 1:1 apresenta uma estrutura mais ordenada e com diâmetro de poro mais homogêneo que o *scaffold* 2:1. Enquanto que a esponja pectina:quitosano 1:1 apresenta poros com diâmetros aproximadamente iguais, de cerca de  $300 \mu\text{m}^1$ , a esponja de rácio 2:1 tem poros cujos diâmetros podem variar entre os 200 e  $500 \mu\text{m}$  aproximadamente.

As imagens SEM das esponjas de rácio 1:1 e 2:1, antes e depois de imersão em PBS com diferentes intervalos de tempo, e ampliação de 150×, estão representadas na figura 20.

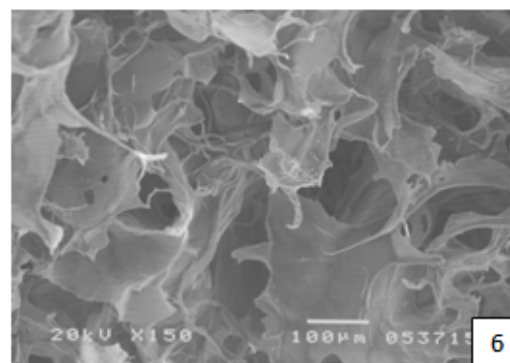
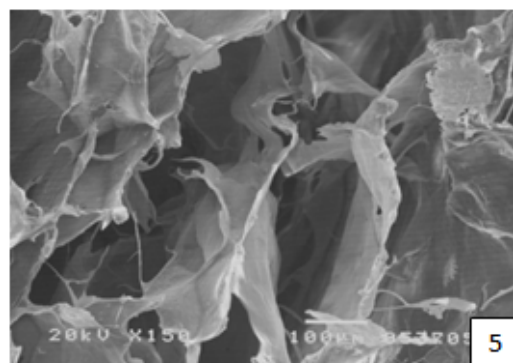


<sup>1</sup> Os valores de diâmetro de poro aqui mencionados foram calculados por aproximação baseada na aparência dos poros nas imagens SEM, não sendo utilizada qualquer técnica específica que permitisse saber o seu valor exacto.

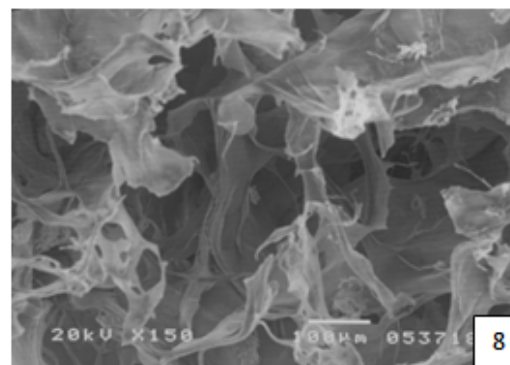
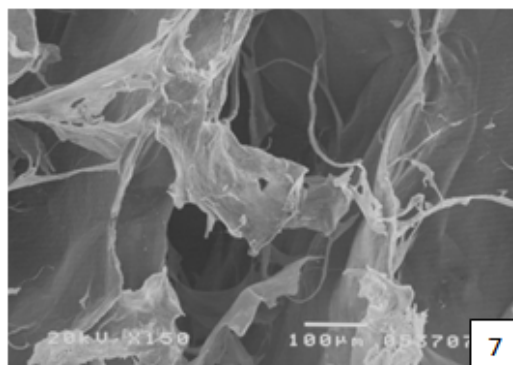
1 SEMANA



2 SEMANAS



3 SEMANAS



4 SEMANAS

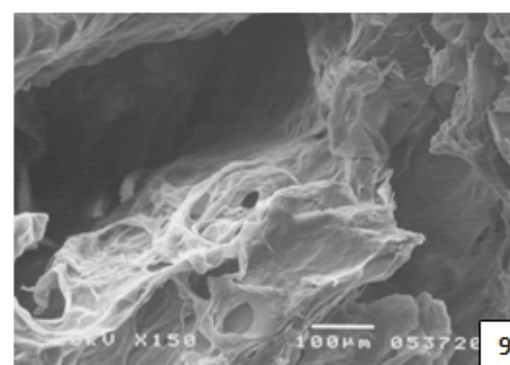


Figura 20 - Imagens obtidas por SEM das esponjas pectina:quitosano 1:1 (1, 3, 5 e 7) e pectina quitosano 2:1 (2, 4, 6, 8 e 9), antes de imersas numa solução PBS (1 e 2) e depois de imersas por 1 (3 e 4), 2 (5 e 6), 3 (7 e 8) ou 4 (9) semanas.

Para ambos os *scaffolds*, após a imersão das esponjas em PBS durante 1, 2, 3 e 4 semanas, o tamanho dos poros vai aumentando. Isto acontece para as matrizes poliméricas de ambos os rácios, embora esse aumento seja superior no caso do *scaffold* 2:1.

Assim, a esponja pectina:quitosano 1:1 que apresenta um tamanho de poro inicial de aproximadamente 300  $\mu\text{m}$ , aumenta para 400  $\mu\text{m}$  o seu diâmetro passada uma semana, e para cerca 500 e 600  $\mu\text{m}$  depois da 2ª e 3ª semanas respectivamente.

Já no caso da esponja de rácio 2:1, o seu tamanho de poro no início é também 300  $\mu\text{m}$ , aumentando para 400, 550, 650 e 750  $\mu\text{m}$  após 1, 2, 3 e 4 semanas de imersão, respectivamente.

Estes resultados eram previsíveis, uma vez que, tal como mencionado anteriormente, as matrizes 2:1 sofrem uma biodegradação mais acentuada num mesmo intervalo de tempo que as matrizes 1:1.

### 3.4. CAPACIDADE DE INCHAÇO (*SWELLING*)

Nos gráficos seguintes estão representadas as percentagens da capacidade de inchaço das esponjas 1:1 e 2:1 quando imersas em soluções diferentes.

Para a construção dos gráficos usou-se a equação 2 da secção 1.5.3.

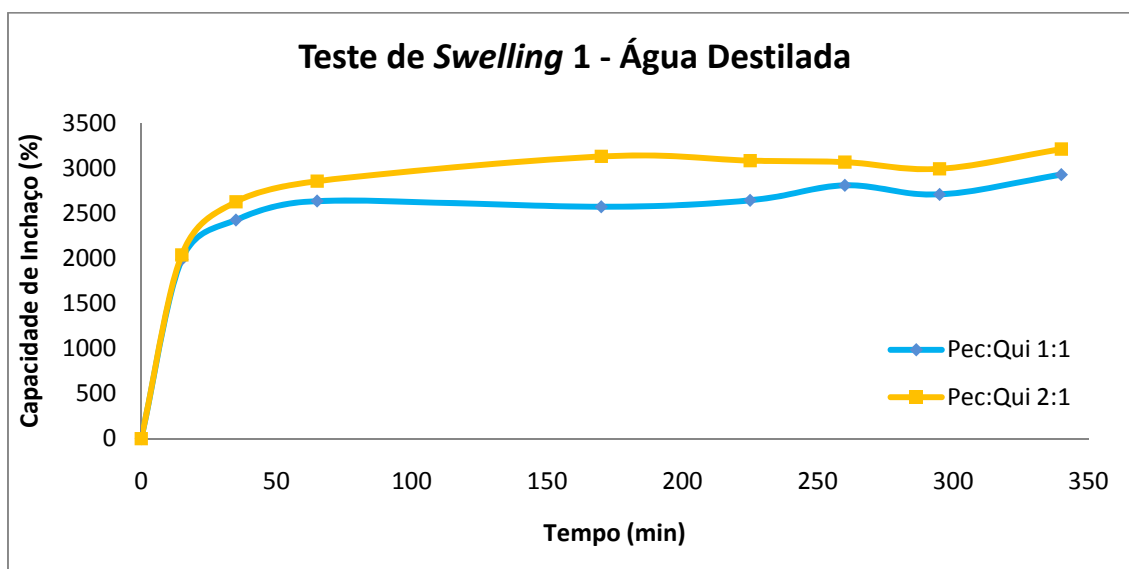


Gráfico 2 - Teste de *swelling* 1, imersão das esponjas de rácios 1:1 e 2:1 em água destilada.

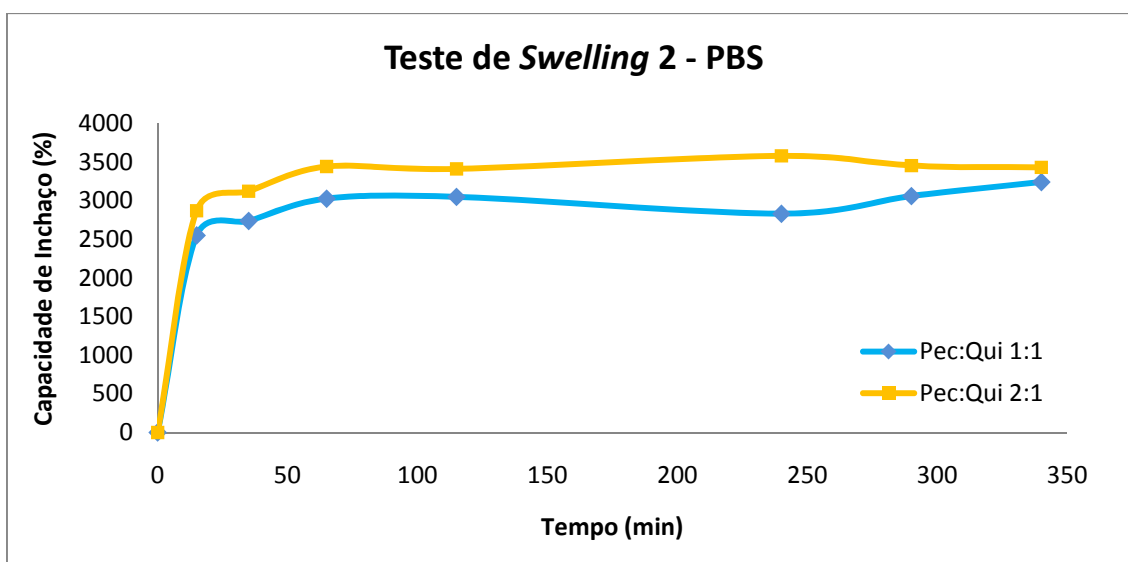


Gráfico 3 - Teste de *swelling* 2, imersão das esponjas de rácios 1:1 e 2:1 em PBS.

O gráfico 2 corresponde ao caso em que a imersão é feita em água destilada, com um pH=7, e o gráfico 3 diz respeito ao teste feito em PBS, ou seja, com um pH de 7,4.

Em ambos os testes, é visível uma maior capacidade de inchaço por parte das esponjas 2:1 comparativamente com as 1:1. De salientar também, nos primeiros minutos da experiência, ambas as matrizes poliméricas absorvem uma elevada quantidade da água atingindo um ponto de equilíbrio (aproximadamente aos 65 min.) e mantendo o *swelling* estável.

Relativamente ao teste de *swelling* 1, o *scaffold* 1:1 apresenta um *swelling* máximo de aproximadamente 2800% e o *scaffold* 2:1 tem uma capacidade de inchaço de mais de 3000%. No teste 2, as esponjas de rácio 1:1 e 2:1 têm um *swelling* de cerca de 3000% e 3500% respectivamente. Então, há maior inchaço das esponjas quando imersas num meio cujo pH é mais básico.

### 3.5. ANÁLISE ELEMENTAR

A tabela 8 apresenta os resultados obtidos da análise elementar à pectina e quitosano puros e às esponjas pectina:quitosano de rácios 1:1 e 2:1.

Os resultados são apresentados em termos de percentagem de peso de cada elemento químico, em relação ao peso total de cada amostra.

AMOSTRA	%N (w/w <sub>T</sub> )	%C (w/w <sub>T</sub> )	%H (w/w <sub>T</sub> )	%Outros (w/w <sub>T</sub> )	%S (w/w <sub>T</sub> )
Pectina	0,753	40,899	6,047	52,301	≤100 ppm
Quitosano	7,057	39,729	7,946	45,268	≤100 ppm
Pec:Qui 1:1	3,006	38,883	6,569	51,542	≤100 ppm
Pec:Qui 2:1	2,897	38,803	5,976	52,324	≤100 ppm

Tabela 8 - Percentagem de peso dos vários elementos químicos presentes em cada amostra.

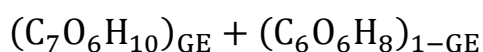
A amostra de pectina tem uma percentagem de azoto (%N) diferente de zero, quando teoricamente deveria ser zero, isto porque a sua composição química contém apenas carbono, oxigénio e hidrogénio. Já o quitosano, cerca de 7% do seu peso total corresponde ao azoto, pois este elemento faz parte da composição química deste polímero.

Em relação às esponjas estudadas, aquela com maior rácio de pectina (2:1) é a que apresenta mais baixa percentagem de azoto.

A percentagem de outros compostos químicos (5ª coluna da Tabela 8), no caso da pectina e do quitosano diz respeito apenas ao oxigénio, mas nas esponjas além de oxigénio, existem ainda sódio (Na) e cloro (Cl) que são constituintes da solução tampão na qual se dissolveram os polímeros.

Os resultados da análise elementar permitem ainda calcular o grau de esterificação da pectina (GE) e o grau de desacetilação do quitosano (GD).

Sabe-se que a fórmula química da pectina é:



Podem-se usar as equações seguintes (adaptado de (47)) para calcular o grau de esterificação da pectina (M corresponde à massa total dos componentes da unidade estrutural):

Equação 7

$$\frac{12}{M} \times (7GE + 6(1 - GE)) = C\%$$

Equação 8

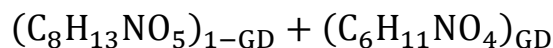
$$\frac{16}{M} \times (6GE + 6(1 - GE)) = O\%$$

Equação 9

$$\frac{1}{M} \times (10GE + 8(1 - GE)) = H\%$$

Pela equação 8 (percentagem de oxigénio 52,30%) calcula-se M, e o resultado é M=183,55g. Por sua vez, através da equação 7 e do valor de M já conhecido, determina-se o grau de esterificação da pectina. Então GE=25,6%.

No caso do quitosano, a sua fórmula química é:



Por analogia com a pectina, usam-se as equações seguintes (47) para calcular GD.

Equação 10

$$\frac{12}{M} \times (8(1 - GD) + 6GD) = C\%$$

Equação 11

$$\frac{1}{M} \times (13(1 - GD) + 11GD) = H\%$$

Equação 12

$$\frac{14}{M} \times (1(1 - GD) + GD) = N\%$$

Equação 13

$$\frac{16}{M} \times (5(1 - GD) + 4GD) = O\%$$

A partir da equação 12 determina-se que M=198,38g, e da equação 10 calcula-se GD= 71,6%.

### 3.6. ESPECTROSCOPIA DE INFRAVERMELHO POR TRANSFORMADA DE FOURIER COM REFLEXÃO TOTAL ATENUADA (FTIR-ATR)

Os espectros FTIR-ATR obtidos da pectina pura, do quitosano puro, e das matrizes pectina:quitosano 1:1 e 2:1 estão representados no gráfico 4.

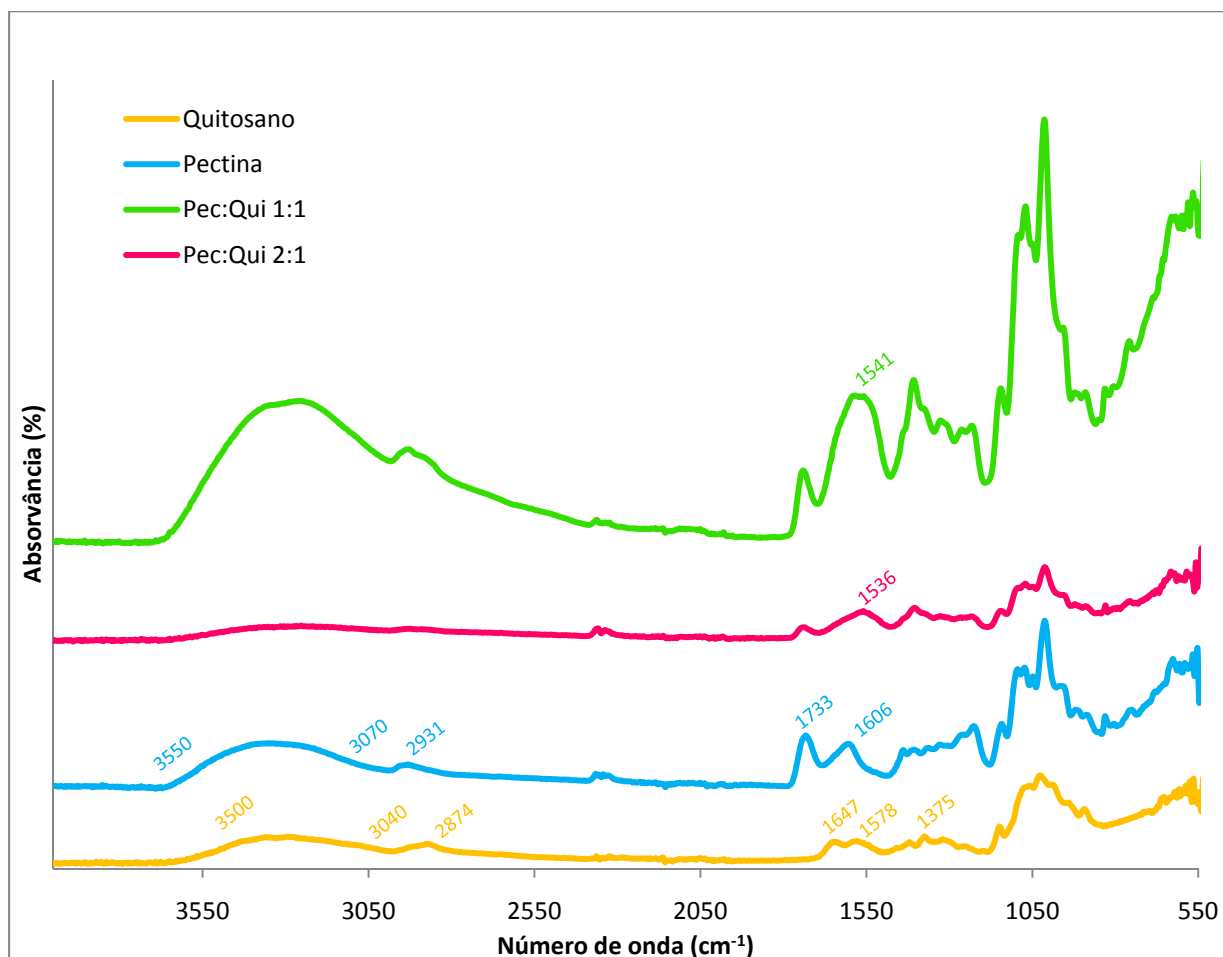


Gráfico 4 - Espectroscopia FTIR-ATR obtida dos 4 compostos analisados.

Relativamente ao espectro da pectina pura, uma banda relevante é a de  $1733\text{ cm}^{-1}$  que corresponde à vibração por alongamento da ligação C=O do grupo COOH e do grupo COOCH<sub>3</sub>. À volta dos  $1606\text{ cm}^{-1}$  há uma vibração que corresponde ao alongamento assimétrico da ligação C=O quando o grupo carboxílico está ionizado (COO<sup>-</sup>). Existe ainda uma banda entre os  $3070$  e  $3550\text{ cm}^{-1}$  que diz respeito às vibrações por alongamento da ligação O-H (48) e (49). E, correspondente à vibração por alongamento do grupo C-H, existe uma banda aos  $2931\text{ cm}^{-1}$ .

No caso do quitosano puro são visíveis duas bandas características a  $1647$  e  $1578\text{ cm}^{-1}$  que correspondem à amida I e à amida II respectivamente. O alongamento das ligações N-H e O-H podem ser caracterizados pela banda entre os  $3040$  e  $3500\text{ cm}^{-1}$ .

Existem ainda outras bandas, apesar de menos significativas a  $2874\text{ cm}^{-1}$  que corresponde ao alongamento de C-H e a  $1375\text{ cm}^{-1}$  que diz respeito à deformação simétrica do grupo  $\text{CH}_3$ . (50) e (51)

Na literatura (51) a amida I é definida como a vibração por alongamento da ligação C=O, enquanto a amida II corresponde à deformação da ligação N-H acoplada com o alongamento da ligação C-N.

Como era de esperar, embora ambas as matrizes apresentem as mesmas bandas que a pectina e o quitosano puros (apesar de terem intensidades diferentes) há uma das bandas no espectro de cada matriz que sofre alterações em relação aos polímeros puros.

Existe uma mudança da banda da amida II no quitosano situado a  $1578\text{ cm}^{-1}$  para  $1541$  e  $1546\text{ cm}^{-1}$  no caso das matrizes pectina:quitosano 1:1 e 2:1 respectivamente (52). Em termos de absorvância, no caso da matriz de rácio 1:1, a banda tem maior intensidade.

Composto	Nº de onda ( $\text{cm}^{-1}$ )	Atribuição
PECTINA	3070-3550	$\nu$ OH
	2931	$\nu$ C-H
	1733	$\nu$ C=O (COOH e COOCH <sub>3</sub> )
	1606	$\nu_{as}$ COO <sup>-</sup>
QUITOSANO	3040-3500	$\nu$ N-H e $\nu$ O-H
	2874	$\nu$ C-H
	1647	Amida I ( $\nu$ C=O)
	1578	Amida II ( $\delta$ N-H + $\nu$ C-N)
	1375	$\delta_s$ CH <sub>3</sub>
PECTINA:QUITOSANO 1:1	1541	$\delta$ N-H
PECTINA:QUITOSANO 2:1	1536	$\delta$ N-H

Tabela 9 - Atribuição de diferentes tipos de ligações às bandas de absorvância.

Legenda:  $\nu$  – alongamento;  $\delta$  – deformação;  $\delta_s$  – simétrico;  $\delta_{as}$  – assimétrico

### 3.7. ESTUDO DA LIBERTAÇÃO CONTROLADA DO FÁRMACO

Para a elaboração da curva padrão analisaram-se 8 amostras de vancomicina diluída em solução PBS com concentrações diferentes, estando os resultados obtidos resumidos na tabela 10.

Amostra nº	1	2	3	4	5	6	7	8
Concentração de Vancomicina (mg/mL)	0	0,04	0,08	0,10	0,12	0,16	0,20	0,22
Absorvância ( $\text{cm}^{-1}$ )	0	0,18	0,32	0,38	0,47	0,63	0,78	0,83

Tabela 10 - Concentrações de fármaco usadas para calcular as absorvâncias características.



Construiu-se um gráfico concentração de vancomicina (y) VS. absorvância (x), e aos pontos obtidos ajustou-se uma recta, cuja equação foi:  $y=0,2592x$ .

A partir desta equação, todos os valores de absorvância obtidos foram usados para determinar a concentração de fármaco e construir os perfis de libertação da vancomicina, em scaffolds implantáveis e injectáveis com o mesmo rácio (1:1) de pectina:quitosano (gráfico 5).

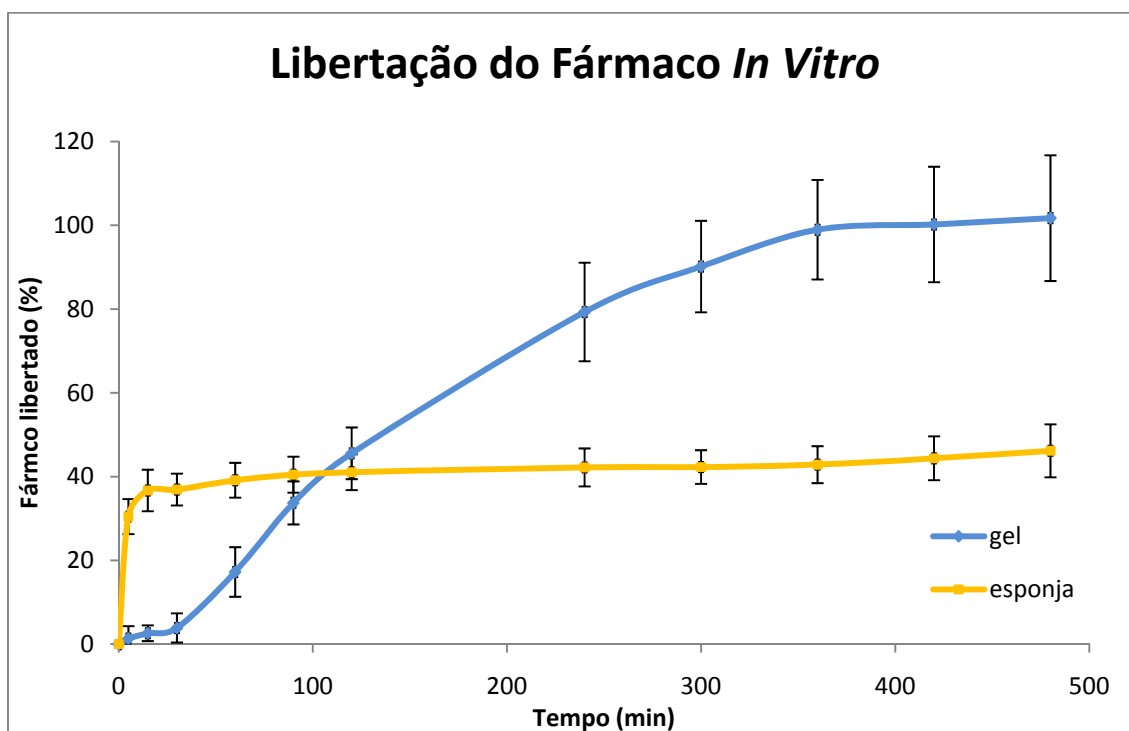


Gráfico 5 - Percentagem de fármaco libertado pela esponja e gel de rácio 1:1 ao longo do tempo.

Analisando cada tipo de *scaffold* isoladamente, a esponja mostra uma elevada libertação de fármaco logo nos primeiros instantes ( $\approx 37\%$ ). A partir dos 15 minutos, essa libertação torna-se muito lenta, sendo que no espaço de 465 minutos (corresponde a 7 horas e 45 minutos) só cerca de 10% do fármaco total é libertado para a solução de PBS.

Já no caso do gel, observa-se um perfil de libertação muito diferente. A sua libertação ao longo do tempo é constante até aproximadamente aos 360 minutos (6 horas) em que a sua libertação é próxima de 100%. Neste ponto, observa-se uma estabilização, já que quase todo o fármaco foi libertado.

Portanto, ao fim das 8 horas de estudo, o gel tinha libertado (quase) todo o fármaco, enquanto a esponja apresentava apenas metade da vancomicina libertada.

### 3.8. ESTUDO DE HEMOCOMPATIBILIDADE

#### 3.8.1. Teste de Trombogenicidade

Após o teste de trombogenicidade, nas esponjas era visível a formação de um coágulo, tal como se pode constatar na figura 21.



Figura 21 - Esponja com trombo formado, já depois de seca.

Os resultados do teste de trombogenicidade feito às esponjas nas proporções 1:1 e 2:1, e ao vidro (controlo positivo) estão representados no gráfico 6.

Este gráfico representa a percentagem de formação de coágulo em função do tempo. Essa percentagem é calculada pela razão entre a massa do coágulo que se formou, e a massa de sangue que foi adicionado às amostras.

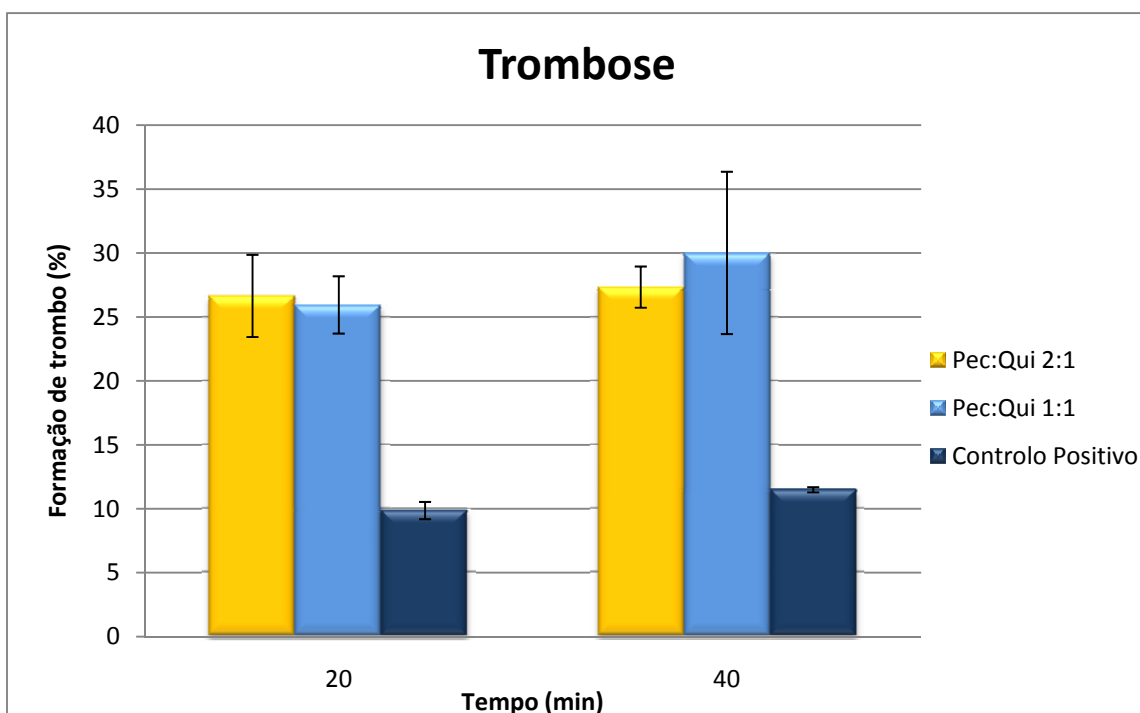


Gráfico 6 - Percentagem da formação de trombo em função do tempo.

É visível que ambas as esponjas originam a formação de trombos, com massa superior aos trombos formados pelo controlo positivo.

No teste realizado em 20 minutos, apesar da esponja 2:1 ter formado um coágulo ligeiramente superior, a trombogenicidade de ambas é muito próxima.

Já no caso em que o tempo de contacto dos scaffolds com o sangue foi de 40 min, a matriz polimérica de rácio 1:1 é a que apresenta a trombogenicidade superior.

### 3.8.2. Determinação do Índice Hemolítico

#### 3.8.2.1. Determinação da concentração de hemoglobina no sangue e no plasma e Diluição do Sangue

O valor da concentração de hemoglobina da solução foi calculado pela equação 3 (ver secção 2.3.7.2.1), sabendo que o factor de diluição é 6 ( $f_d = \frac{V_{Drabkin} + V_{sangue}}{V_{sangue}}$ ). O valor de absorvância a 540 nm obtido foi  $0,296 \text{ cm}^{-1}$ , sendo então  $[Hb]_{solução} = 2,6 \text{ (g/L)}$ .

Para determinar os valores da concentração de hemoglobina de cada uma das 9 amostras, usou-se a equação 4 (ver secção 2.3.7.2.1). A tabela 11 resume os valores obtidos dos cálculos e também os de absorvância pelo método de leitura espectrofotométrica.

Amostra nº	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Absorvância 540nm ( $\text{cm}^{-1}$ )	0	0,17	0,34	0,50	0,67	0,85	1,03	1,20	1,38
$[Hb]_{amostra} \text{ (g/L)}$	0	0,26	0,52	0,78	1,04	1,30	1,56	1,82	2,08

Tabela 11 - Concentração de hemoglobina de cada amostra.

Com estes valores construiu-se um gráfico de absorvância ( $\text{cm}^{-1}$ ) VS.  $[Hb]_{amostra} \text{ (g/L)}$ , marcando os pontos referentes a cada amostra. Ajustando uma recta a esses pontos, obteve-se a curva de calibração cuja expressão foi:  $y=1,5217x$  em que y será a concentração de hemoglobina e x a absorvância.

Os cálculos das concentrações de hemoglobina no plasma e no sangue foram feitos por extrapolação da equação da curva de calibração, não esquecendo de multiplicar pelo factor de diluição. Assim, para o caso do plasma cujos valores de absorvância e factor de diluição foram respectivamente  $0,0811 \text{ cm}^{-1}$  e 2, temos uma concentração de hemoglobina de aproximadamente  $0,25 \text{ g/L}$ . O valor da concentração

de hemoglobina no sangue foi 172,13 g/L, já que apresentou uma absorvância de 0,45  $\text{cm}^{-1}$  e um factor de diluição de 251.

O sangue foi diluído e a concentração de hemoglobina obtida foi 10,11 g/L. Este valor foi calculado pelo valor de absorvância obtido e usando a curva de calibração.

### 3.8.2.2. *Contacto das matrizes com o sangue*

Os valores do índice hemolítico obtidos das amostras que foram incubadas em PBS estão representados no gráfico 7.

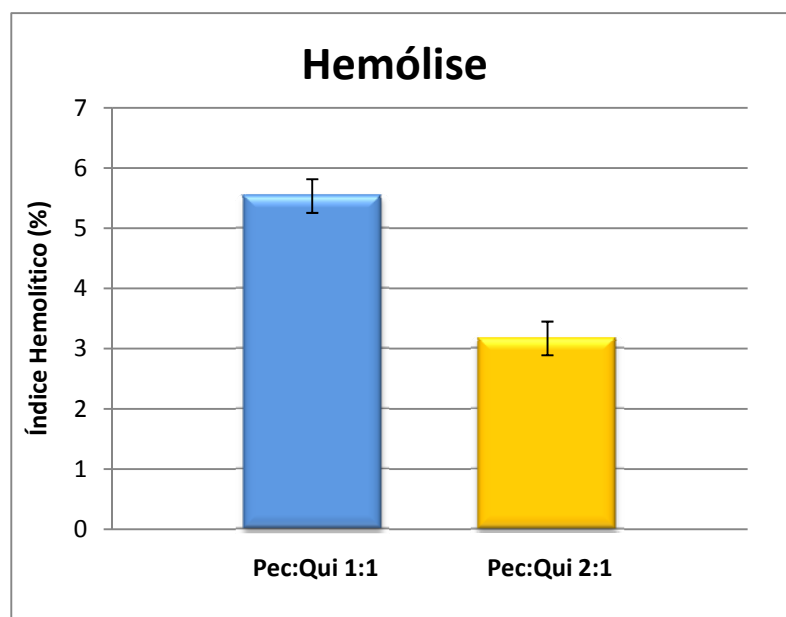


Gráfico 7 - Índice hemolítico das esponjas 1:1 e 2:1.

A esponja pectina:quitosano 1:1 é a que apresenta o índice hemolítico superior. De acordo com a tabela 1, a esponja de rácio 1:1 é hemolítica e a de rácio 2:1 é ligeiramente hemolítica.

## 3.9. ESTUDO DE BIOCOMPATIBILIDADE *IN VIVO*

Observadas as lâminas com o tecido e o biomaterial, conclui-se que se dá a biodegradação de parte das matrizes poliméricas.

As figuras 22 e 23 mostram respectivamente as imagens histológicas do gel e da esponja, com o tecido adjacente.

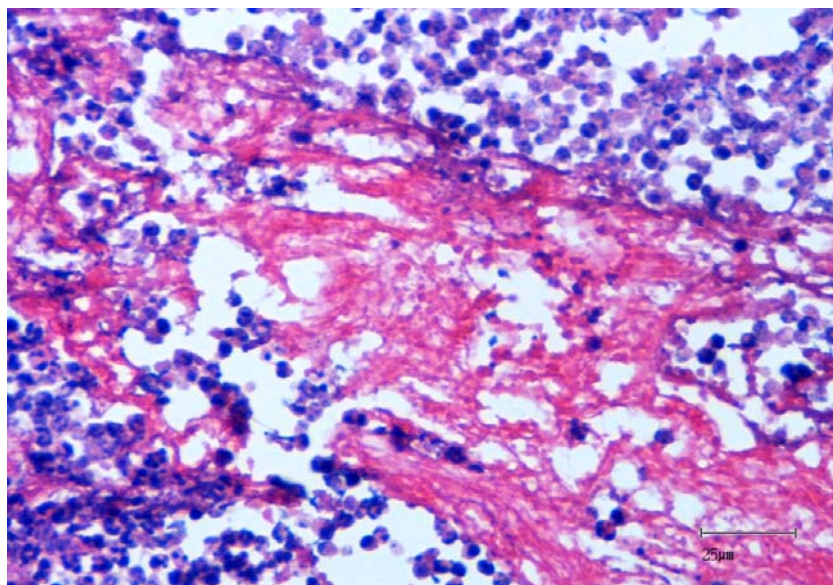


Figura 22 – Imagem de microscopia de luz do tecido no qual foi injectado o gel de pectina e quitosano (HE). Observa-se a presença de inúmeros polimorfonucleares neutrófilos.

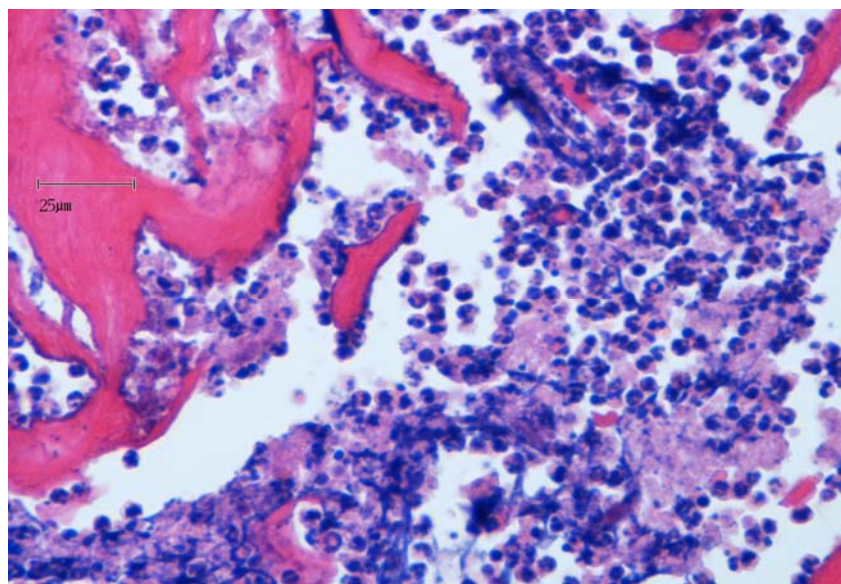


Figura 23 – Imagem de microscopia de luz do tecido no qual foi implantada a esponja de pectina e quitosano (HE). Observam-se numerosos polimorfonucleares neutrófilos, muito deles aderentes ao biomaterial, aparentemente a digerir-lo. Praticamente não há células mononucleadas.

O comportamento biológico foi semelhante para os dois tipos de matrizes poliméricas. Não existe formação de cápsula fibrosa nem se identificou a presença bacterias. Observou-se a presença de infiltrado inflamatório intenso com raros linfócitos e numerosos neutrófilos. Em alguns campos identificam-se neutrófilos aderentes ao material, sobretudo quando aplicado na forma de esponja, parecendo estar a fazer a sua degradação. Em nenhum dos casos observados parece haver necrose nem hemorragia.

## 4. DISCUSSÃO E CONCLUSÕES

Este trabalho descreve o desenvolvimento de matrizes poliméricas à base de pectina e quitosano, incorporando um fármaco, com o objectivo de auxiliar na regeneração de tecido muscular. As matrizes foram desenvolvidas na forma de gel e de esponja (por *freeze drying*).

Nas esponjas e géis sem fármaco, verificou-se a formação de complexos polielectrólitos entre os dois polímeros através de interacções iónicas entre  $\text{NH}_3^+$  do quitosano e  $\text{COO}^-$  da pectina. Aquando da incorporação do fármaco usou-se uma carbodiimida a fim de promover a ligação do mesmo e do quitosano, à pectina.

Os ensaios de caracterização dos *scaffolds* foram o início de um processo que pretendeu estudar a viabilidade deste biomaterial para aplicação clínica.

O gráfico da degradação *in vitro*, evidencia uma crescente degradação de ambas as matrizes poliméricas, quando imersas numa solução de PBS (pH=7,4), ao longo do tempo. Tal já era de esperar, uma vez que essas matrizes são constituídas por polímeros biodegradáveis, a pectina e o quitosano.

Durante as 4 semanas de estudo, as matrizes de rácio 2:1 mostraram sempre mais perda de massa que as matrizes 1:1. Ao avaliar as matrizes em termos de percentagens totais, conclui-se que as esponjas 1:1 apresentam 50% de pectina e 50% de quitosano, enquanto que as esponjas 2:1 têm uma componente de cerca de 67% de pectina e aproximadamente 33% de quitosano. Isto significa que a percentagem total de quitosano é superior nas esponjas pectina:quitosano 1:1.

Sabe-se também que as subunidades de quitosano estão ligadas por ligações  $\beta(1-4)$ , enquanto que as de pectina se ligam por ligações  $\alpha(1-4)$ . As ligações glicosídicas  $\beta(1-4)$  são mais fortes e criam estruturas mais estáveis do que as  $\alpha(1-4)$ . (53)

Então, a justificação da biodegradação ser superior nas esponjas 2:1 deve-se ao tipo de ligações. Como as matrizes 1:1 apresentam uma percentagem de quitosano maior que as 2:1, também têm mais ligações glicosídicas do tipo  $\beta(1-4)$ , e portanto são matrizes mais estáveis e menos susceptíveis à quebra de ligações, ou seja, à biodegradação.

As imagens SEM obtidas das esponjas pectina:quitosano nas proporções 1:1 e 2:1 revelaram a existência de estruturas 3D com poros que se interconectam. Esta propriedade de conexão dos poros torna estes *scaffolds* uma excelente escolha na regeneração de tecidos, isto porque permitem a ligação e proliferação celular e facilitam o transporte de nutrientes, gases, ou outros componentes.

Analisando a morfologia das matrizes 1:1 e 2:1, constata-se que enquanto o *scaffold* 1:1 apresenta uma estrutura porosa homogénea e ordenada, o *scaffold* 2:1 tem poros de tamanhos mais variados e uma estrutura mais desorganizada.

A solução de quitosano confere uma estrutura muito mais ordenada, que a solução de pectina, devido maioritariamente ao tipo de ligação (54). Como a esponja 1:1 tem uma percentagem total de quitosano (50%) superior à esponja 2:1 (33%), têm-se a explicação de 1:1 apresentar a estrutura mais ordenada.

Tal como discutido anteriormente, as esponjas 2:1 são as que têm uma degradação mais rápida ao longo do tempo. Isso reflecte-se no tamanho dos poros, que se apresentam maiores quando comparados com os da matriz de rácio 1:1, estando ambas imersa numa solução de pH 7,4, durante o mesmo tempo e nas mesmas condições de temperatura.

Dos testes de *swelling* realizados em meios de imersão diferentes, observa-se uma capacidade de inchaço maior, em ambas as esponjas, quando se trata da solução de PBS. Como o PBS tem um pH de 7,4 e a água destilada tem pH de aproximadamente 7, os resultados demonstraram que quanto mais básico for o meio (aumento do pH) mais as esponjas incham.

O grau de interacção entre a pectina e o quitosano varia dependendo do valor de pH do meio. Assim, num meio ácido a pectina está neutra e o quitosano ionizado na forma  $\text{NH}_3^+$ , por sua vez, num meio básico o quitosano encontra-se na sua forma neutra e a pectina com iões  $\text{COO}^-$ .

A existência de cargas negativas ou positivas no complexo, estimula a entrada de água com iões de cargas opostas com o objectivo e neutralizar o meio, e portanto há um aumento de *swelling*.

Posto isto, as matrizes imersas num meio a pH 7,4 apresentam mais grupos carboxílicos na forma ionizada ( $\text{COO}^-$ ) comparativamente com um meio de pH de 7, o que justifica que essas matrizes sejam as que absorvam mais água.

Assim, ajustando o pH do meio, consegue-se seleccionar o *swelling* desejado para uma matriz polimérica, dependendo do tipo de aplicação.

Os resultados indicaram também que as matrizes poliméricas de rácio 2:1 absorvem mais água do que as de rácio 1:1, em ambos os meios de imersão alvos do estudo.

Considerando, tal como citado anteriormente, que o *scaffold* 1:1 apresenta uma percentagem de 50% de pectina e 50% de quitosano, e o *scaffold* 2:1 tem 67% e 33% de pectina e quitosano respectivamente, a matriz 1:1 deve ter ausência de cargas, enquanto que 2:1 tem um grau de interacção muito menor, com iões  $\text{COO}^-$  e sem iões  $\text{NH}_3^+$  livres aos quais eles se possam ligar (no caso de pH próximo de neutro). Então, a existência de cargas negativas na esponja 2:1 vai aumentar os níveis de *swelling*, pelas razões já referidas.

O perfil da curva de absorção de água é muito idêntico para os dois meios em ambas as esponjas. Nos primeiros minutos, existe uma absorção muito acentuada, que coincide com os instantes em que os poros das esponjas são ocupados na totalidade. A partir desse momento, a massa das esponjas mantém-se relativamente constante, uma vez que existe saturação das matrizes e estas já não conseguem absorver mais.

Por métodos estatísticos foram calculados os desvios padrão, que não estão representados nos gráficos 2 e 3, devido aos seus valores extremamente elevados. Em água destilada, a esponja 1:1 apresenta um desvio padrão médio de cerca de 150% e a esponja 2:1 de 270%, já em PBS, os *scaffolds* 1:1 e 2:1 têm desvios padrão médios na ordem dos 250% e dos 550% respectivamente. Estes valores muito elevados indicam que os dados obtidos em cada amostra são dispersos, estando afastados do valor médio.

A análise elementar revelou a presença de azoto na pectina, possivelmente provocada por resíduos existentes no polímero.

As esponjas pectina:quitosano 1:1 têm maior percentagem de azoto do que as esponjas 2:1, isto porque as primeiras têm maior quantidade de quitosano, que é o único polímero constituinte dos *scaffolds* com a presença desse elemento químico, considerando que a percentagem de azoto na pectina irrelevante.

Dos cálculos efectuados para a determinação do grau de esterificação e de desacetilação da pectina e do quitosano respectivamente, obteve-se:  $\text{GE}=25,6\%$  e  $\text{GD}=71,6\%$ .

O grau de esterificação calculado está concordante com o fabricante, que indica que a pectina usada tem percentagem de ácido galacturónico  $\geq 74\%$ , ou seja,  $\text{GE}=100-$



74=26%. Já o grau de desacetilação, apesar de não estar concordante com as características do fornecedor, que indicam GD entre 75 e 85%, está muito próximo.

A análise química por espectroscopia de infravermelho aos polímeros (pectina e quitosano) e às esponjas nas proporções 1:1 e 2:1, confirmou a existência das bandas características dos polímeros, nas esponjas. Apenas existe alteração ao nível da banda característica do grupo amina.

Esta mudança de banda pode indicar que houve uma mudança no grupo amina devido à sua interação com a pectina. Isto pode ainda confirmar a interação iónica entre os grupos  $\text{COO}^-$  da pectina e  $\text{NH}_3^+$  do quitosano.

O *scaffold* 1:1 apresenta essa banda com maior intensidade que o *scaffold* 2:1, podendo evidenciar que existe maior interação iónica entre os polímeros, na esponja 1:1.

O ensaio da libertação controlada do fármaco serviu para traçar o perfil de libertação da vancomicina em esponjas e géis de pectina:quitosano na razão 1:1.

Como o gel se considera uma matriz hidratada, a presença de água ou de solventes aquosos vai facilitar o processo de difusão do fármaco para fora do *scaffold*. Já no caso da esponja, a libertação da vancomicina será mais lenta, uma vez que é uma matriz seca.

Como a esponja é mais porosa do que o gel, apresenta uma superfície de contacto maior, e daí, libertar-se mais fármaco na esponja nos primeiros instantes. Esse fármaco corresponde ao fármaco que estará à superfície e será de mais fácil acesso.

Depois dos 15 minutos iniciais, a libertação torna-se mais lenta, já que o acesso ao fármaco presente no interior da matriz é dificultado. Isto não se verifica no caso do gel, tal como foi dito anteriormente, uma vez que a água será responsável por difundir a vancomicina.

Embora os resultados obtidos indiquem uma libertação ligeiramente superior a 100% no caso gel ao fim de 8 horas, há que ter em conta o desvio padrão relativamente elevado. Com isto, o seu valor real será obviamente inferior, ou mesmo igual a 100%.

Em suma, apesar de nos instantes iniciais a esponja libertar mais fármaco do que o gel, este ensaio demonstrou a maior capacidade de libertação no caso do *scaffold* injectável, devido ao seu elevado grau de hidratação.

Da análise da trombogenicidade das esponjas concluiu-se que ambas as esponjas têm maior capacidade de indução de trombos, comparando com o controlo positivo. Considerando que o controlo positivo consiste numa avaliação da formação do coágulo

sobre a superfície de um vidro, e se se sabe à partida que o vidro é um material trombogénico, conclui-se que ambas as matrizes poliméricas são trombogénicas.

Esta avaliação permitiu ainda verificar que as esponjas 1:1 (as que têm maior percentagem de quitosano) são as mais trombogénicas.

A justificação pode estar no facto de o quitosano ser um polímero trombogénico. As cargas positivas do quitosano ( $\text{NH}_3^+$ ) atraem as negativas das membranas dos glóbulos vermelhos, e esta interacção pode ser responsável pela formação de um coágulo. A formação de um trombo ocorre independentemente de toda a cascata de coagulação, ou seja, mesmo na ausência de fibrina o quitosano é responsável pela agregação dos glóbulos vermelhos e consequente formação de um coágulo sanguíneo estável. (55) e (56)

Assim como a esponja pectina:quitosano 1:1 é a mais trombogénica, também é a que apresenta o índice hemolítico mais elevado.

Os valores do índice hemolítico obtidos das amostras de pectina:quitosano 1:1 e 2:1 foram respectivamente 5,54% e 3,17%. Segundo a norma ASTM F756, a esponja de rácio 1:1 é hemolítica, e a de rácio 2:1 ligeiramente hemolítica.

Apesar do índice hemolítico de 5,54% caracterizar a esponja 1:1 como sendo hemolítica, como o seu valor é muito próximo do valor limite (5%), a hipótese da sua aplicação clínica não deve ser excluída à partida.

Para justificar a maior ruptura das membranas das hemácias no caso da matriz com mais quitosano, mais uma vez se deve ter em consideração as características desse polímero. As glicoproteínas existentes na membrana dos glóbulos vermelhos, que são aniónicas, são atraídas pelas cargas positivas do quitosano induzindo uma curvatura na membrana e como consequência a sua ruptura. (57)

Assim sendo, para assegurar a hemocompatibilidade (prevenção da trombose e hemólise) de matrizes poliméricas constituídas por quitosano, há que conjugá-lo com polímeros aniónicos, como é o caso da pectina ( $\text{COO}^-$ ), cujas cargas negativas serão responsáveis pela repulsão das cargas negativas presentes nas hemácias.

O estudo de biocompatibilidade *in vivo*, como um ensaio preliminar, não permite concluir em definitivo se estas matrizes têm aplicabilidade ou não para regeneração de tecidos.

A resposta inflamatória não poderá ter sido causada por bactérias, uma vez que não há evidência destas nas imagens histológicas. Também não parece estar relacionado com o acto cirúrgico, pelo tempo que passou e pela localização do infiltrado. Então esta resposta deve estar relacionada com o próprio biomaterial.

Sabe-se da literatura (58) que o quitosano tem um efeito quimiotáxico sob os neutrófilos e os linfócitos. Isto é, este polímero promove a migração de células imunitárias até ele. Apesar do mecanismo de acção do quitosano sob o sistema imunitário ainda não ser totalmente conhecido, pensa-se que este polímero interaja com receptores presentes nas membranas dessas células. É curioso que neste estudo quase não se observam linfócitos no infiltrado, o que nos faz suspeitar que possa estar em causa algum produto de degradação dos materiais usados.

A biodegradação observada das matrizes poliméricas não pode ser justificada apenas pela capacidade fagocitária dos neutrófilos, já que o próprio material tem a capacidade inerente de se biodegradar. Contudo, não podemos esquecer as imagens em que os neutrófilos estão aderentes aos *scaffolds*.

Este estudo *in vivo* sugere a pouca ou não biocompatibilidade do biomaterial, embora pelo reduzido número da amostra, não seja possível tirar conclusões definitivas. Terão de ser realizados outros estudos com uma amostra maior, e caracterizar melhor a reacção do organismo ao biomaterial e aos seus produtos de degradação, utilizando protocolos de imunohistoquímica e de expressão génica.

Os resultados sugerem também que o material poderá ser usado como agente de quimiotaxia para os polimorfonucleares neutrófilos, merecendo outros estudos neste sentido.

Quando se realiza um estudo com a finalidade de desenvolver um biomaterial para aplicação clínica, há que ter em conta todas as propriedades por ele apresentadas durante o processo de caracterização. Assim, no caso desse biomaterial apresentar algumas características que sejam menos desejáveis, é importante fazer o balanço dos riscos e dos benefícios.

Neste caso concreto, embora os valores do índice hemolítico e de trombose sejam um pouco elevados, encontram-se num limite clínico aceitável. E já que todos os outros resultados obtidos são favoráveis a aplicação clínica (à excepção dos resultados dos ensaios *in vivo* que são não conclusivos), as matrizes poliméricas desenvolvidas neste estudo serão passíveis de uso para a regeneração de tecidos.

Apesar de todas as matrizes poliméricas desenvolvidas poderem ter uso clínico, algumas apresentaram resultados mais promissores.

Com base nos resultados obtidos, a aplicação de esponjas será possivelmente o processo mais vantajoso, uma vez que apresenta uma libertação do fármaco mais prolongada, que permite acompanhar a regeneração do tecido e a biodegradação do *scaffold*. Por outro lado, o gel tem uma libertação muito rápida. Já em relação ao teste

de biocompatibilidade *in vivo*, o comportamento biológico dos 2 tipos de matrizes foi idêntico, então não influenciará a escolha de uma delas para uso clínico.

Relativamente às proporções de polímeros, os resultados apontaram uma preferência para as matrizes poliméricas de pectina:quitosano com rácio 2:1. Estas, apesar de serem as que absorvem mais água e portanto incham mais, também são as que se degradam mais rapidamente. Também ao nível da hemocompatibilidade foram as que apresentaram melhores resultados.

O inchaço das matrizes, ou seja, o seu aumento de volume não se tornará prejudicial quando aplicado *in vivo*. Além do mais, esse inchaço não é muito superior ao das esponjas de rácio 1:1. A biodegradação mais rápida no caso das matrizes 2:1 não será um problema, se houver tempo suficiente para dar o suporte necessário à regeneração do tecido.

Até a este ponto da investigação verifica-se o potencial destas matrizes poliméricas para a regeneração de tecido muscular. No entanto, este estudo deve ser complementado com outros testes de caracterização por forma a otimizar o biomaterial, e confirmar se o material é ou não biocompatível.

No entanto uma duvida persiste. Será o quitosano, ao contrário do que é citado na literatura, um polímero não biocompatível?

## 5. PERSPECTIVAS FUTURAS

Apesar do trabalho realizado fazer parte de um processo de caracterização que pretende avaliar a viabilidade destes *scaffolds* para uso clínico, outros ensaios fundamentais devem ser realizados.

Já que as esponjas de pectina:quitosano 2:1 foram as que apresentaram mais potencialidades, seria de especial interesse que se estudasse o perfil de libertação da vancomicina nestes *scaffolds*.

Os testes de hemólise realizados por contacto indirecto, deveriam ser complementados com testes por contacto directo, a fim de determinar se a existência de hemólise se dá por interacção directa com o material, ou se a causa reside nas substâncias que por ele são libertadas.

Como no estudo de biocompatibilidade *in vivo* o único tempo usado foi o de uma semana, seria interessante prolongar o tempo de implantação do biomaterial. Assim seria possível avaliar melhor, em termos temporais a evolução da degradação do material e o respectivo infiltrado. Uma questão necessita de ser esclarecida, é o material em si que tem a acção quimiotáctica para os neutrófilos ou é algum dos seus produtos de degradação? Se for um dos seus produtos, seria interessante perceber qual e em que momento é máximo. Também seria interessante perceber o que acontece após a degradação total do biomaterial.

Em estudos mais avançados, e confirmando-se a biocompatibilidade do biomaterial, para ter a certeza que estas matrizes promovem a regeneração muscular, teriam de se incorporar factores de crescimento e realizar testes em animais. Nesses testes, seria realizada uma lesão a nível muscular no animal, e posteriormente aplicar-se-ia o biomaterial. Ao fim de algum tempo, deveria observar-se se houve efectivamente a regeneração do tecido.

Determinando o tempo da regeneração do tecido, poder-se-ia usar outras proporções de polímeros, de forma a ajustar o seu tempo de degradação bem como a sua capacidade de inchaço. Isto sempre tendo em conta, que quanto maior for a proporção de pectina maior é a sua compatibilidade com o organismo humano.

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. EUROPA - Press Releases - Commission proposes actions to increase organ donation. [Online] [Citado em: 25 de Março de 2010.] <http://europa.eu/rapid/pressReleasesAction.do?reference=IP/07/718&format=HTML&aged=0&language=EN&guiLanguage=en>.
2. **Langer, R. e Vacanti, J. P.** Tissue Engineering. 1993, 260.
3. *Supermercado de Órgãos. A.P.S.* 113, Setembro de 2007, Super Interessante.
4. **Lanza, R., Langer, R. e Vacanti, J.** *Principles of Tissue Engineering*. 2ª. s.l. : Academic Press, 2007.
5. **Tabata, Y.** [ed.] N. Ashammakhi e P. Ferreti. *Topics in Tissue Engineering*. s.l. : University of Oulu, 2003, Vol. 1, Tissue Regeneration Based on Drug Delivery Technology.
6. **Jenkins, M.** *Biomedical Polymers*. s.l. : Woodhead Pub. and Maney Pub. on behalf of Institute of Materials, Minerals & Mining, 2007.
7. **Neves, N. et al.** Natural-based polymers for biomedical applications. [ed.] Rui Reis e Nuno Neves. Cambridge : Woodhead Publishing Ltd, 2008, pp. 12-13.
8. Pectin - The Polymer Research Group, Departement of Chemistry, University of Oslo. [Online] [Citado em: 9 de Março de 2010.] <http://www.kjemi.uio.no/Polymerkjemi/Research/Pectin.htm>.
9. **Sriamornsak, P.** Chemistry of Pectin and Its Pharmaceutical Uses: A Review. *Silpakorn University International Journal*. 2003.
10. **Mohnen, D.** Pectin structure and biosynthesis. *Current Opinion in Plant Biology*. 2008, Vol. 11, 3, pp. 266-277.
11. **Di Martino, A., et al.** Chitosan: A versatile biopolymer for orthopaedic tissue-engineering. *Biomaterials*. 2005, 26, pp. 5983-5990.
12. Chitosan Used In Pharmaceutical Formulations: A Review | Pharmainfo.net. [Online] [Citado em: 16 de Março de 2010.] <http://www.pharmainfo.net/reviews/chitosan-used-pharmaceutical-formulations-review>.

13. Chitin and Chitosan: Plastics Trends Net. [Online] [Citado em: 16 de Março de 2010.] [http://www.plasticstrends.net/index.php?option=com\\_content&task=view&id=12&Itemid=1](http://www.plasticstrends.net/index.php?option=com_content&task=view&id=12&Itemid=1).
14. Vancomycin - Drug information from Medic8.com. [Online] [Citado em: 21 de Março de 2010.] <http://www.medic8.com/medicines/Vancomycin.html>.
15. Vancomycin.png. [Online] [Citado em: 21 de Março de 2010.] <http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/2/24/Vancomycin.png>.
16. Carbodiimide. *Wikipedia, the free encyclopedia*. [Online] [Citado em: 15 de Julho de 2010.] <http://en.wikipedia.org/wiki/Carbodiimide>.
17. Carbodiimide - encyclopedia article. *Citizendium*. [Online] [Citado em: 21 de Junho de 2010.] <http://en.citizendium.org/wiki/Carbodiimide>.
18. *Sigma - Aldrich*. [Online] [Citado em: 21 de Junho de 2010.] [http://www.sigmaaldrich.com/catalog/ProductDetail.do?lang=en&N4=C1011|SIGMA&N5=SEARCH\\_CONCAT\\_PNO|BRAND\\_KEY&F=SPEC](http://www.sigmaaldrich.com/catalog/ProductDetail.do?lang=en&N4=C1011|SIGMA&N5=SEARCH_CONCAT_PNO|BRAND_KEY&F=SPEC).
19. **Nordby, M. et al.** Thermoreversible Gelation of Aqueous Mixtures of Pectin and Chitosan. Rheology. *Biomacromolecule*. 2003, Vol. 4, 2, pp. 337-343 .
20. **Gómez, L. et al.** Polyelectrolyte complex formation mediated immobilization of chitosan-invertase neoglycoconjugate on pectin-coated chitin. *Bioprocess Biosyst Eng*. 2006, Vol. 28, 6, pp. 387-395.
21. **Seeley, R., Stephens, T. e Tate, P.** *Anatomia & Fisiologia*. 3ª. s.l. : Lusodidacta, 2001.
22. **Meyer, U. et al.** *Fundamentals of Tissue Engineering and Regenerative Medicine*. s.l. : Springer, 2009.
23. xpanse.com | bioreactor technology. *Xpanse biotechnology*. [Online] [Citado em: 16 de Junho de 2010.] <http://www.xpanse-biotech.com/images/schema.jpg>.
24. Informação Científica > As Células Estaminais. *Cytothera*. [Online] [Citado em: 16 de Junho de 2010.] <http://www.cytothera.pt/pt/Informa%C3%A7%C3%A3oCient%C3%ADfica/AsC%C3%A9lulasEstaminais.aspx>.
25. **Shah, R. et al.** Craniofacial muscle engineering using a 3-dimensional phosphate glass fibre construct. *Biomaterials*. 2005, Vol. 26, 13, pp. 1497-1505.
26. **Saxena, A. K. et al.** Skeletal muscle tissue engineering using isolated myoblasts on synthetic biodegradable polymers: preliminary studies. *Tissue Eng*. 1999, 5, pp. 525-532.
27. **Cronin, E. M., et al.** Protein-coated poly(L-lactic acid) fibers provide a substrate for differentiation of human skeletal muscle cells. *Journal of biomedical materials research. Part A*. 2004, Vol. 69, 3, pp. 373-381.
28. **Riboldi, S. A., et al.** Electrospun degradable polyesterurethane membranes: potential scaffolds for skeletal muscle tissue engineering. *Biomaterials*. 2005, Vol. 26, 22, pp. 4606-4615.
29. **Kroehne, V., Heschel, I., et al.** Use of a novel collagen matrix with oriented pore structure for muscle cell differentiation in cell culture and in grafts. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*. 2008, Vol. 12, 5 (a), pp. 1640-1648.



30. **Beier, J. P., et al.** Tissue engineering of injectable muscle: three-dimensional myoblast-fibrin injection in the syngeneic rat animal model. *Plastic and Reconstructive Surgery*. 2006, Vol. 118, 5, pp. 1113-1124.
31. **Kamelger, F. S., et al.** A comparative study of three different biomaterials in the engineering of skeletal muscle using a rat animal model. *Biomaterials*. 2004, Vol. 25, 9, pp. 1649-1655.
32. **Dezawa, M., et al.** Bone marrow stromal cells generate muscle cells and repair muscle degeneration. *Science*. 2005, Vol. 309, 5732, pp. 314-317.
33. **Stern-Straeter, J., et al.** Characterization of human myoblast cultures for tissue engineering. *International Journal of Molecular Medicine*. 2008, Vol. 21, 1, pp. 49-56.
34. **Saxena, A. K., et al.** Vascularized three-dimensional skeletal muscle tissue-engineering. *Biomedical Materials and Engineering*. 2001, Vol. 11, 4, pp. 275-281.
35. **Bach, A. D., et al.** A new approach to tissue engineering of vascularized skeletal muscle. *Journal of Cellular and Molecular Medicina*. 2006, Vol. 10, 3, pp. 716-726.
36. **Wagner, S., et al.** Functional maturation of nicotinic acetylcholine receptors as an indicator of murine muscular differentiation in a new nerve-muscle co-culture system. *Pfugers Archiv: European Journal of Physiology*. 2003, Vol. 447, 1, pp. 14-22.
37. **Pedrotty, D. M., et al.** Engineering skeletal myoblasts: roles of three-dimensional culture and electrical stimulation. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2005, Vol. 288, pp. H1620-H1626.
38. **Powel, C. A., et al.** Mechanical stimulation improves tissue-engineering human skeletal muscle. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2002, Vol. 283, 5, pp. C1557-C1565.
39. Scanning electron microscope. *Wikipedia, the free encyclopedia*. [Online] [Citado em: 7 de Junho de 2010.] [http://en.wikipedia.org/wiki/Scanning\\_electron\\_microscope](http://en.wikipedia.org/wiki/Scanning_electron_microscope).
40. LAC - Laboratorio Analisi Chimiche. [Online] [Citado em: 9 de Junho de 2010.] [http://www.chem.polimi.it/lac/analisi\\_ele.php](http://www.chem.polimi.it/lac/analisi_ele.php).
41. Elemental Oxygen Analysis. [Online] [Citado em: 9 de Junho de 2010.] [http://www.univie.ac.at/Mikrolabor/O\\_eng.htm](http://www.univie.ac.at/Mikrolabor/O_eng.htm).
42. FTIR (Fourier Transform Infrared) Spectroscopy. [Online] [Citado em: 18 de Fevereiro de 2010.] <http://www.siliconfareast.com/FTIR.htm>.
43. Infrared identification of organic unknowns. [Online] [Citado em: 18 de Fevereiro de 2010.] <http://www.800mainstreet.com/irsp/eir.html>.
44. Infrared Spectroscopy - Wikipedia. [Online] [Citado em: 18 de Fevereiro de 2010.] [http://en.wikipedia.org/wiki/Infrared\\_spectroscopy](http://en.wikipedia.org/wiki/Infrared_spectroscopy).
45. TCH\_FTIRATR. [Online] [Citado em: 18 de Fevereiro de 2010.] [http://las.perkinelmer.com/content/TechnicalInfo/TCH\\_FTIRATR.pdf](http://las.perkinelmer.com/content/TechnicalInfo/TCH_FTIRATR.pdf).
46. ASTM Standards. *F 756 Pratices for Assessment of Hemolytic Properties of Materials*.
47. **Lee, Y., et al.** Effect of Deacetylation Degree in Chitosan Composite Membranes on Pervaporation Performance. *SEPARATION SCIENCE AND TECHNOLOGY*. 33, 1998, Vol. 9, pp. 1255-1269.

48. **Kamnev, A. et al.** Comparative spectroscopic characterization of different pectins and their sources. 1998, 12, pp. 263-271.
49. **Chatjigakis, A.K.** FT-IR spectroscopic determination of the degree of esterification of cell wall pectins from stored peaches and correlation to textural changes. 1998, 37, pp. 395–408.
50. **Kolhe, P., Kannan R.** Improvement in Ductility of Chitosan through Blending and Copolymerization with PEG: FTIR Investigation of Molecular Interactions. 2003, 4, pp. 173-180 .
51. **Amaral, I. F., Granja, P. L. e Barbosa, M. A.** Chemical modification of chitosan by phosphorylation: an XPS, FT-IR and SEM study. 2005, Vol. 16, 12, pp. 1575–1593 .
52. **Bigucci, F., et al.** Chitosan/pectin polyelectrolyte complexes: Selection of suitable preparative conditions for colon-specific delivery of vancomycin. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*. 35, 2008, pp. 435-441.
53. Biochemistry/Carbohydrates. *Wikibooks*. [Online] [Citado em: 28 de Julho de 2010.] <http://en.wikibooks.org/wiki/Biochemistry/Carbohydrates>.
54. **Rashidova, S. et al.** Characteristics of Interactions in the Pectin-Chitosan System. *Chromatographia*. 59, 2004, pp. 779-782.
55. Padetec. *Hemoband*. [Online] [Citado em: 17 de Agosto de 2010.] <http://www.padetec.ufc.br/novapagina/outros/hemoband.php>.
56. **Okamoto, Y., et al.** Effects of chitin and chitosan on blood coagulation. *Carbohydrate Polymers*. 2003, Vol. 53, 3, pp. 337-342.
57. **Yang, Y., et al.** Preparation and Blood Compatibility of Oxidized-chitosan Films. *Chinese Chemical Letters*. 2005, Vol. 16, 7, pp. 991-994.
58. **Vande Vord, P., et al.** Evaluation of the biocompatibility of a chitosan scaffold in mice. *Journal of Biomedical Materials Research*. 2002, Vol. 59, 3, pp. 585-590.

## ANEXO

Neste anexo constam os valores numéricos de todos os ensaios realizados, com os respectivos desvios padrão.

### ESTUDO DE DEGRADAÇÃO IN VITRO

Tempo (semanas)	Pec:Qui 1:1 Peso restante $\pm \sigma$ (%)	Pec:Qui 2:1 Peso restante $\pm \sigma$ (%)
0	100	100
1	87,60 $\pm$ 1,81	82,49 $\pm$ 0,74
2	83,84 $\pm$ 1,90	76,74 $\pm$ 3,07
3	66,73 $\pm$ 3,49	56,89 $\pm$ 2,68
4	59,02 $\pm$ 2,81	55,24 $\pm$ 0,54

Tabela 12 - Peso restante das esponjas Pec:Qui nas proporções 1:1 e 2:1 após 1, 2, 3 e 4 semanas de imersão numa solução PBS.

### CAPACIDADE DE INCHAÇO (SWELLING)

#### TESTE 1

Tempo (minutos)	Pec:Qui 1:1 Swelling $\pm \sigma$ (%)	Pec:Qui 2:1 Swelling $\pm \sigma$ (%)
0	0	0
15	2004,95 $\pm$ 132,69	2047,74 $\pm$ 237,19
35	2445,18 $\pm$ 179,83	2642,57 $\pm$ 409,07
65	2653,90 $\pm$ 162,74	2863,75 $\pm$ 318,59
170	2580,20 $\pm$ 105,05	3151,83 $\pm$ 224,73
225	2647,27 $\pm$ 66,69	3082,36 $\pm$ 218,36
260	2813,55 $\pm$ 106,92	3070,49 $\pm$ 249,94
295	2724,06 $\pm$ 391,40	3012,19 $\pm$ 186,47
340	2923,69 $\pm$ 36,67	3211,83 $\pm$ 329,64

Tabela 13 - Capacidade de inchaço das esponjas 1:1 e 2:1 ao longo do tempo, quando imersas em água destilada.

#### TESTE 2

Tempo (minutos)	Pec:Qui 1:1 Swelling $\pm \sigma$ (%)	Pec:Qui 2:1 Swelling $\pm \sigma$ (%)
0	0	0
15	2550 $\pm$ 358,36	2868,07 $\pm$ 937,02
35	2736,66 $\pm$ 123,27	3120,65 $\pm$ 814,34
65	3024,97 $\pm$ 114,78	3440,65 $\pm$ 552,65
115	3048,33 $\pm$ 372,26	3409,68 $\pm$ 565,96
240	2829,81 $\pm$ 256,04	3578,55 $\pm$ 454,16
290	3058,41 $\pm$ 409,29	3452,65 $\pm$ 315,78
340	3240,44 $\pm$ 123,84	3429,03 $\pm$ 406,12

Tabela 14 - Capacidade de inchaço das esponjas 1:1 e 2:1 ao longo do tempo, quando imersas em solução PBS.

## ESTUDO DA LIBERTAÇÃO CONTROLADA DO FÁRMACO

Tempo (minutos)	Gel	Esponja
	Fármaco libertado $\pm \sigma$ (%)	Fármaco libertado $\pm \sigma$ (%)
0	0	0
5	1,33 $\pm$ 0,52	30,46 $\pm$ 4,19
15	2,61 $\pm$ 1,85	36,69 $\pm$ 4,95
30	3,86 $\pm$ 2,48	36,91 $\pm$ 3,80
60	17,23 $\pm$ 5,93	39,13 $\pm$ 4,16
90	33,72 $\pm$ 5,13	40,46 $\pm$ 4,30
120	45,57 $\pm$ 6,18	41,06 $\pm$ 4,27
240	79,31 $\pm$ 11,78	42,19 $\pm$ 4,54
300	90,16 $\pm$ 10,92	42,29 $\pm$ 4,03
360	98,95 $\pm$ 11,88	42,86 $\pm$ 4,41
420	100,20 $\pm$ 13,79	44,38 $\pm$ 5,23
480	101,71 $\pm$ 15,01	46,16 $\pm$ 6,32

Tabela 15 - Percentagem de fármaco libertado em esponja e gel 1:1 ao longo do tempo.

## HEMOCOMPATIBILIDADE

### TESTE DE TROMBOGENICIDADE

Tempo (minutos)	Pec:Qui 1:1	Pec:Qui 2:1	Controlo Positivo
	Formação do trombo $\pm \sigma$ (%)	Formação do trombo $\pm \sigma$ (%)	Formação do trombo $\pm \sigma$ (%)
20	25,95 $\pm$ 2,24	26,65 $\pm$ 3,21	9,87 $\pm$ 0,68
40	30,02 $\pm$ 6,35	27,34 $\pm$ 1,61	11,49 $\pm$ 0,21

Tabela 16 - Percentagem de sangue que forma trombo, após 20 e 40 minutos de contacto entre o sangue e scaffolds implantáveis pec:qui 1:1 e 2:1 e também o controlo positivo.

## ÍNDICE HEMOLÍTICO

Pec:Qui 1:1	Pec:Qui 2:1
Índice Hemolítico $\pm \sigma$ (%)	Índice Hemolítico $\pm \sigma$ (%)
5,54 $\pm$ 0,28	3,17 $\pm$ 0,28

Tabela 17 - Índices hemolíticos das esponjas 1:1 e 2:1.