



Instituto Superior de Engenharia

Politécnico de Coimbra

DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA QUÍMICA E
BIOLÓGICA

Preparação de membranas eletrofiadas para regeneração da pele

Trabalho de Projeto para a obtenção do grau de Mestre em
Engenharia Química e Biológica

Autor

João Pedro Rama Lemos

Orientador

Maria José Capelas de Moura

Co-Orientador

Paula Cristina Nunes Ferreira



INSTITUTO POLITÉCNICO
DE COIMBRA

INSTITUTO SUPERIOR
DE ENGENHARIA
DE COIMBRA

Coimbra, dezembro 2023

SUMÁRIO

O objetivo principal do presente estudo prende-se com a preparação e caracterização de membranas fibrosas, poliméricas, produzidas por *electrospinning*, para aplicação em regeneração da pele.

Mais especificamente, foram produzidos três tipos de membranas poliméricas: membranas produzidas apenas com policaprolactona, designadas Tipo I, membranas compósitas, produzidas com uma mistura de policaprolactona e acetato de celulose (percentagem mássica de policaprolactona de 78%), designadas Tipo II, e membranas assimétricas, com uma camada base constituída apenas por policaprolactona e a segunda camada pela mistura policaprolactona e acetato de celulose previamente referida, designadas Tipo III.

Estas matrizes destinam-se não só a proteger a ferida, mas também devem favorecer a regeneração da pele, bem como evitar processos de infeção bacteriana por via da libertação de um fármaco antimicrobiano – o diacetato de clorexidina, incorporado nas membranas assimétricas (Tipo III).

Depois de preparadas, as matrizes foram caracterizadas a nível físico-químico, morfológico, térmico e biológico. Para tal foram usadas técnicas como a Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier com Reflexão Total Atenuada (FTIR-ATR), a Análise Termogravimétrica (TGA), e foram realizados estudos de medição de ângulos de contacto dinâmicos, de determinação da capacidade de absorção de água (*swelling*), de degradação em meio aquoso e por fim estudos de libertação do diacetato de clorexidina. No que respeita a estudos de carácter biológico, foi também avaliada a citocompatibilidade das matrizes poliméricas bem como a sua atividade antimicrobiana com recurso a duas estirpes distintas de bactérias (*E. coli* e *S. aureus*).

A análise de FTIR-ATR comprovou a presença dos polímeros e as suas bandas características. Na análise termogravimétrica verificou-se que as membranas são termicamente estáveis à temperatura ambiente. Os testes de ângulo de contacto indicaram um perfil hidrofóbico de todas as membranas. A avaliação da capacidade de absorção indicou que o volume das membranas não variou significativamente. Os estudos de perda de massa indicaram que as membranas são estáveis e não sofrem grandes perdas de material. Os estudos de atividade antimicrobiana mostraram, como esperado, que o fármaco inibiu a colonização das bactérias *E. coli* e *S. aureus*. Os testes de biocompatibilidade indicaram que as membranas são biocompatíveis. Por fim, nos estudos de libertação verificou-se que é possível libertar quase a totalidade de fármaco incorporado na membrana e existe uma predominância desta libertação nas primeiras 48 horas.

O presente estudo demonstrou que as membranas produzidas pelo processo de *electrospinning* possuem as propriedades adequadas para serem aplicadas em feridas cutâneas.

Palavras-chave: biocompatibilidade, *electrospinning*, membrana, policaprolactona, regeneração de tecido.

ABSTRACT

The main objective of this study focuses on the preparation and characterization of fibrous polymeric membranes, produced by electrospinning, to be applied in skin regeneration.

Three types of polymeric membranes were fabricated, the first one produced only with polycaprolactone, designated Type I, composite membranes, produced with a mixture of polycaprolactone and cellulose acetate (polycaprolactone mass percentage of 78%), designated Type II, and asymmetrical membranes, with a base layer consisting only of polycaprolactone and the second layer of the previously mentioned mixture of polycaprolactone and cellulose acetate, designated Type III.

These matrices are intended not only to protect the wound but also to promote skin regeneration, as well as prevent bacterial infection processes through the release of an antimicrobial drug – chlorhexidine diacetate, incorporated into the asymmetric membranes (Type III).

After being prepared, the matrices were characterized at a physical-chemical, morphological, thermal, and biological level. To this end, techniques such as Fourier Transform Infrared Spectroscopy with Attenuated Total Reflection (FTIR-ATR), Thermogravimetric Analysis (TGA) were used, and studies were carried out to measure dynamic contact angles, determining the absorption capacity of water (swelling), degradation in aqueous media and finally studies on the release of chlorhexidine diacetate. Regarding biological studies, the cytocompatibility of the polymeric matrices was also evaluated as well as their antimicrobial activity using two different strains of bacteria (*E. coli* and *S. aureus*).

FTIR-ATR analysis confirmed the presence of the used polymers and their characteristic bands. In the thermogravimetric analysis, it was found that the membranes are thermally stable at room temperature. Contact angle tests indicated a hydrophobic profile for all the membranes. The swelling study indicated that the volume of the membranes did not vary significantly. Mass loss studies indicated that the membranes are stable and do not suffer large material losses. Antimicrobial activity studies showed that the drug inhibited the colonization of bacteria. Biocompatibility tests indicated that the membranes are biocompatible. Finally, in the release studies, it was found that it is possible to release almost all the drug incorporated in the membrane, and there is a predominance of this release in the first 48 hours.

Keywords: biocompatibility, electrospinning, membrane, polycaprolactone, tissue regeneration.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a todas as pessoas que me ajudaram diretamente ou indiretamente e que me influenciaram positivamente de alguma maneira neste último ano.

Primeiramente, agradeço à Dr.^a Maria José Moura e à Dr.^a Paula Ferreira pela disponibilidade, conselhos e conhecimento que ofereceram durante este período.

Um agradecimento especial à investigadora Marta Santos que desde o primeiro dia se mostrou disponível para me ajudar nesta etapa, desde a ambientação ao novo espaço de trabalho, assim como todos os conselhos e apoio que me deu, especialmente nos dias de investigação mais complexos e trabalhosos. Este trabalho não seria possível sem essa ajuda e amizade, por isso um grande obrigado.

Um obrigado ao meu colega e amigo André Pereira, que se encontra nesta etapa comigo desde a licenciatura. Esteve sempre presente quando mais precisei, fez-me companhia e ajudou ao longo destes anos tanto no período académico como pessoal da minha vida.

Um grande obrigado à minha família, sem eles nada disto seria possível. Não podia pedir maior apoio da parte deles, assim como conforto e carinho. Obrigado por acreditarem em mim e nas minhas capacidades nos dias em que eu próprio tinha deixado de acreditar. E por fim aos meus queridos avós, que estão sempre no meu pensamento e que todos os dias me dão motivação para dar o meu melhor em todos os aspetos da vida.

ÍNDICE

Sumário.....	ii
<i>Abstract</i>	iv
Agradecimentos.....	v
Índice.....	vi
Índice de figuras.....	viii
Índice de tabelas.....	ix
1 Introdução.....	1
2 Revisão bibliográfica.....	3
2.1 Engenharia de tecidos.....	3
2.2 A pele humana.....	4
2.3 Princípios básicos de regeneração da pele.....	5
2.4 Membranas para regeneração de pele.....	7
2.5 Fundamentos de <i>electrospinning</i>	8
2.5.1 Parâmetros que influenciam a técnica de <i>electrospinning</i>	9
2.6 Materiais poliméricos.....	12
2.6.1 Policaprolactona.....	12
2.6.2 Acetato de celulose.....	13
2.7 Libertação controlada de fármacos.....	14
3 Procedimento experimental.....	17
3.1 Materiais.....	17
3.1.1 Preparação das soluções poliméricas.....	17
3.1.2 Montagem e instalação do <i>electrospinning</i>	18
3.1.3 Preparação das membranas eletrofiadas.....	19
3.2 Caracterização das membranas.....	21
3.2.1 Espetroscopia de infravermelho por transformada de Fourier com reflexão total atenuada (FTIR-ATR).....	22
3.2.2 Análise termogravimétrica.....	22
3.2.3 Ângulos de contacto dinâmicos.....	23
3.2.4 Capacidade de absorção de água (<i>swelling</i>).....	24
3.2.5 Estudos de perda de massa.....	24
3.2.6 Avaliação da biocompatibilidade.....	25
3.2.7 Estudos de libertação do fármaco.....	26

3.2.8	Atividade antimicrobiana.....	27
4	Resultados e discussão	28
4.1	Caracterização das membranas.....	28
4.1.1	Espectroscopia de infravermelhos por transformada de Fourier com reflexão total atenuada (FTIR-ATR).....	28
4.1.2	Análise termogravimétrica.....	29
4.1.3	Ângulos de contacto dinâmicos.....	31
4.1.4	Capacidade de absorção de água (<i>Swelling</i>)	32
4.1.5	Estudos de perda de massa	33
4.1.6	Avaliação da biocompatibilidade.....	34
4.1.7	Estudos de libertação do fármaco.....	35
4.1.8	Atividade antimicrobiana.....	35
5	Conclusão	38
	Referências bibliográficas	39
	Anexos	45
	Anexo 1– Curva de calibração	46

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 - Representação esquemática da estrutura da pele (Adaptado de Jo et al., 2021).....	4
Figura 2 - Esquema do processo de electrospinning incluindo algumas (Adaptado de Marcolin, 2017).....	8
Figura 3 - Estrutura química da poli(ϵ -caprolactona) (Adaptado de Song et al., 2018).	13
Figura 4 - Estrutura química do acetato de celulose (Adaptado de Meireles, 2007).	13
Figura 5 - Comparação dos perfis de libertação de um fármaco resultantes da administração de um sistema de libertação convencional por dose única (—) e várias doses (----) de um sistema de libertação controlada (— — —) (Adaptado de Dash & Cudworth, 1998).	15
Figura 6 – Equipamento utilizado no processo de <i>electrospinning</i>	19
Figura 7 - Bomba de seringa utilizada no processo de <i>electrospinning</i>	20
Figura 8 – Fotografia representativa de uma membrana eletrofiada.	21
Figura 9 - Classificação dos regimes de molhabilidade baseados no valor do ângulo de contacto (Ramos et al., 2014).....	23
Figura 10 – Espetros FTIR-ATR das membranas eletrofiadas Tipo I e Tipo II.	28
Figura 11 – Curva termogravimétrica de uma membrana Tipo I.....	30
Figura 12 - Curva termogravimétrica de uma membrana Tipo II.....	30
Figura 13 - Ângulos de contacto dinâmicos das membranas Tipo I e Tipo II.....	31
Figura 14 – Valores da viabilidade celular após 1, 3 e 7 dias das membranas Tipo I e Tipo II, K ⁺ (controlo positivo, com células mortas) e, K ⁻ , (controlo negativo com a totalidade das células viáveis.	34
Figura 15 - Perfil de libertação do fármaco diacetato de clorexidina em água Milli-Q.	35
Figura 16 – Relação entre a área de inibição bacteriana média com as diferentes membranas para a bactéria <i>E. coli</i>	36
Figura 17 - Fotografias do desempenho antibacteriano das membranas Tipo I, Tipo II e Tipo III com representação dos halos inibitórios.....	37

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1 - Quantidades (massa e volume) de reagentes definidas para a produção dos vários tipos de membranas.....	18
Tabela 2 - Valores das frequências e respectivos grupos químicos observados nos espectros da análise FTIR-ATR para as membranas Tipo I e Tipo II.	29
Tabela 3 - Valores percentuais do rácio de absorção lidos para os diferentes tipos de membranas no segundo dia.....	32
Tabela 4 - Valores percentuais do rácio de absorção lidos para os diferentes tipos de membranas o oitavo dia.....	32
Tabela 5 - Valores percentuais do rácio de absorção lidos para os diferentes tipos de membranas no nono dia.	33

1 INTRODUÇÃO

O envelhecimento da população mundial, a perda natural da capacidade de funcionamento do organismo e a busca pela manutenção da qualidade de vida, levou a comunidade científica a procurar novas abordagens para o tratamento de várias patologias, incluindo a reparação/regeneração de tecidos e órgãos.

A pele é o maior órgão do corpo humano e funciona como barreira protetora contra agentes do meio ambiente, como bactérias ou vírus, sendo também responsável por funções essenciais como regulação da temperatura, percepção sensorial (tato, pressão, frio, calor, dor, etc), excreção, síntese de vitamina D, colesterol e melanina, entre outras (Nour et al., 2021). Uma vez que se encontra em permanente contacto com o meio exterior, a suscetibilidade da pele a lesões incapacitantes, ou outros problemas que reduzem a qualidade de vida humana, é muito elevada. De facto, a integridade do tecido cutâneo pode ser afetada por fatores, tais como, disfunções genéticas, traumas agudos, feridas crónicas (por exemplo feridas diabéticas), intervenções cirúrgicas, queimaduras, entre outros. Apesar do tecido cutâneo ter capacidade para se regenerar, nas situações mais graves o tratamento pode passar pelo recurso a enxertos de pele, enquanto nas situações mais ligeiras o revestimento da zona lesada com um curativo que promova a cicatrização e cura da ferida pode ser suficiente (Nourian Dehkordi et al., 2019).

O desenvolvimento de novos materiais ou o aperfeiçoamento dos já existentes, nomeadamente a nível de substitutos biológicos cada vez mais semelhantes à pele, constitui atualmente um campo de pesquisa, de elevado interesse para a comunidade científica, na área dos Biomateriais. A Engenharia de Tecidos é a ferramenta chave que tem possibilitado tal evolução.

Na última década, a pesquisa de biomateriais funcionais para regeneração do tecido cutâneo tem sido dirigida para o desenvolvimento de *scaffolds*. Neste sentido, uma atenção especial tem sido dada à preparação de membranas fibrosas, poliméricas, tridimensionais e biodegradáveis (*scaffolds*) produzidas através da técnica de *electrospinning*.

Os polímeros têm sido amplamente utilizados como biomateriais para o fabrico de dispositivos médicos e *scaffolds* em Engenharia de Tecidos. Polímeros sintéticos, como a policaprolactona (PCL), e polímeros naturais, como o acetato de celulose (ACE), têm revelado elevado potencial e propriedades favoráveis para adesão e proliferação celular, mimetizando as funções naturais da pele e conduzindo à sua regeneração.

O objetivo principal do presente estudo prende-se com a preparação e caracterização de membranas fibrosas, poliméricas, para aplicação em regeneração da pele, com recurso à técnica de *electrospinning*. Uma vez que o desenvolvimento de formulações

para aplicação cutânea é uma estratégia interessante para transportar fármacos por via transdérmica foi também testada a incorporação de um fármaco com ação antimicrobiana, que evita a proliferação de bactérias na pele.

A presente tese encontra-se organizada em cinco capítulos principais. À presente Introdução segue-se o Capítulo 2 que engloba uma revisão bibliográfica dos vários conceitos associados ao tema, como a Engenharia de Tecidos, a estrutura da pele, o princípio de funcionamento da técnica de *electrospinning* e os sistemas de libertação de fármacos com ênfase na libertação por via transdérmica.

O Capítulo 3 incide sobre os materiais e métodos utilizados, sendo que é neste capítulo que são detalhados todos os procedimentos experimentais realizados, tanto para a preparação das membranas como para a sua caracterização físico-química, térmica, estudos de libertação do fármaco, avaliação da biocompatibilidade e atividade antimicrobiana.

O Capítulo 4 é direcionado para a apresentação e discussão dos resultados obtidos a partir das técnicas descritas no capítulo anterior e, finalmente, o Capítulo 5 resume as principais conclusões do trabalho aqui apresentado e sugere algumas propostas para a continuidade do mesmo.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Engenharia de tecidos

A Engenharia de Tecidos é uma área da Bioengenharia que surge para dar resposta à necessidade de reparação e regeneração de tecidos e órgãos (Vacanti & Langer, 1999). Esta ciência interdisciplinar aplica os princípios e métodos da engenharia e das ciências da vida no desenvolvimento de substitutos biológicos, que possam restaurar, manter ou melhorar a função de um tecido ou de um órgão (Fuchs et al., 2001). Sendo uma área emergente na atual sociedade, a Engenharia de Tecidos tem contribuído para o avanço do tratamento de múltiplas patologias que até há bem pouco tempo eram consideradas incuráveis.

O objetivo da Engenharia de Tecidos é combinar materiais biodegradáveis e compatíveis com o organismo humano com células vivas por forma a possibilitar a formação de um suporte biológico ao tecido/órgão danificado, de maneira a atingir a sua restauração e/ou regeneração adequada (Madni et al., 2021). Atualmente, é possível o tratamento de lesões crónicas e de difícil cicatrização através da combinação de células estaminais (*stem cells*), que ajudam à formação de tecido funcional, de fatores de crescimento e de estruturas tridimensionais, porosas e biodegradáveis, que servem de suporte para o crescimento celular, denominadas de *scaffolds* (Madni et al., 2021).

Os biomateriais são uma ferramenta crucial utilizada em Engenharia de Tecidos. Podem ser definidos como materiais que contactam com fluidos ou tecidos biológicos e, por isso, podem fazer parte de uma estrutura viva ou de um dispositivo médico. Estes materiais devem possuir características mecânicas, químicas e biológicas adequadas para serem inseridos diretamente no organismo diminuindo assim o risco de rejeição dos mesmos (Rahmati et al., 2021).

Os biomateriais requerem características específicas, que variam de aplicação para aplicação, uma vez que cada material é projetado com um determinado objetivo na regeneração de um dado tecido. Por outro lado, os biomateriais devem oferecer segurança, durabilidade (para que se minimize o número de intervenções cirúrgicas), biocompatibilidade (para que não haja rejeição do tratamento), biofuncionalidade (para garantir que a intervenção é adequada e não põe em causa o bem-estar do paciente) e biodegradabilidade (para permitir uma remoção natural do material sem envolver uma resposta imunológica) (Festas et al., 2019).

As principais aplicações deste ramo do conhecimento – a Engenharia de Tecidos, prendem-se, até à data, com a produção de tecido ósseo e tecidos moles, como a pele. A anatomia da pele e as suas principais funções serão abordadas na secção que se segue.

2.2 A pele humana

A pele é o maior órgão do corpo humano e, além de realizar várias atividades biológicas vitais, como a regulação da temperatura corporal e o armazenamento de energia, fornece a primeira linha de defesa protegendo o corpo contra fatores ambientais externos (Nour et al., 2021).

Anatomicamente a pele é composta por três camadas distintas: a epiderme, a derme e a hipoderme. Na Figura 1 encontra-se uma representação esquemática da pele humana.

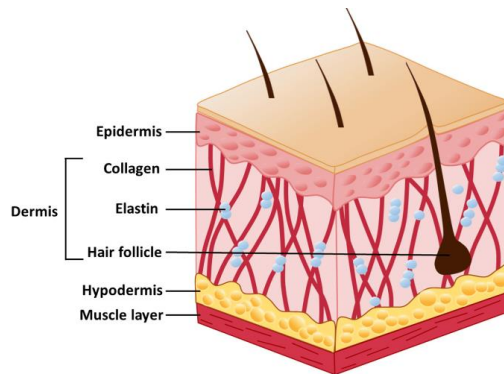


Figura 1 - Representação esquemática da estrutura da pele (Adaptado de Jo et al., 2021).

A epiderme, a camada mais externa, desempenha funções de barreira protetora contra agressões externas e reguladoras de umidade corporal. É composta por queratinócitos (responsáveis pela produção de queratina), melanócitos (responsáveis pela produção de melanina (pigmento que dá cor à pele e protege contra os raios UV), células de Langerhans (responsáveis pela defesa imunológica) e células de Merkel (com função sensorial).

A epiderme está ligada à derme, através da membrana basal, local onde são produzidos os queratinócitos. Esta junção dermoepidérmica forma cristas que aumentam a superfície de contacto entre as duas camadas, facilitando a passagem de nutrientes.

A derme, camada central, constitui cerca de 90% do peso da pele e é responsável pela resistência, hidratação e elasticidade da pele (devido à presença de colagénio e elastina). A derme é constituída por tecido conjuntivo, células endoteliais vasculares e fibroblastos, assim como glândulas adiposas, glândulas sudoríparas, folículos capilares, vasos sanguíneos e terminações nervosas.

Por fim, a hipoderme, a camada mais profunda da pele, também denominada por tecido celular subcutâneo, é composta essencialmente por tecido conjuntivo posicionado em torno dos adipócitos (células que armazenam gordura), vasos sanguíneos e células nervosas (Nourian Dehkordi et al., 2019). A hipoderme fornece proteção contra traumas e choques mecânicos e funciona como isolante devido ao armazenamento de energia.

A pele tem uma função excretora de substâncias que necessitam de ser eliminadas pelo organismo. Devido à elevada inervação, vascularização e presença de neuromediadores, a pele apresenta também funções sensoriais, metabólicas e imunitárias.

A função sensorial da pele é traduzida por vários recetores do tato, da dor, do calor e do frio, localizados na epiderme e nas papilas dérmicas.

A função metabólica da pele inclui a síntese de vitamina D, cuja principal função é manter os valores normais de cálcio e fósforo no sangue, desempenhando um papel relevante a nível do crescimento e remodelação óssea.

O desempenho da função imunitária da pele resulta da interação desta com as células sanguíneas – linfócitos. As células responsáveis pela imunidade cutânea são as células de Langerhans e as citoquinas, produzidas pelos queratinócitos.

A integridade deste órgão pode ser posta em causa devido a diversas doenças ou traumas. Ferimentos neste tecido proporcionam um ambiente rico para o crescimento e proliferação de bactérias, que acabam por comprometer as funções da pele. A cicatrização normal da pele, ou seja, sem recursos a tratamentos, pode por estas razões, ser inviabilizada (Nour et al., 2021).

Estima-se que um terço da população mundial sofra de lesões de pele, lesões essas que podem ter fortes impactos tanto na autoestima como na saúde mental da população (Hosseini & Shafiee, 2021).

2.3 Princípios básicos de regeneração da pele

A perda de integridade da pele, devido a lesão ou doença aguda, pode potenciar o aparecimento de um desequilíbrio fisiológico que, se não for tratado adequadamente, poderá resultar na perda de viabilidade do tecido ou, até mesmo, na morte do paciente (Trinca et al., 2017a).

A causa mais comum de perda de integridade cutânea é a lesão térmica (ou queimadura), embora outras, como traumas, úlceras por pressão, ulcerações decorrentes da diabetes, feridas cirúrgicas, feridas crónicas, também possam ocorrer.

Apesar do próprio tecido cutâneo ter a capacidade de se autorregenerar, por vezes, essa função não é suficiente (Chouhan & Mandal, 2020). De facto, a cicatrização pode não ser um processo simples e linear sobretudo no caso de lesões graves e que ocorram em grande extensão.

A cicatrização de uma ferida é um processo interativo e dinâmico que compreende três fases: inflamação, proliferação e remodelação, destinadas a restaurar a estrutura e a função das células e tecidos danificados (Chouhan et al., 2019).

A fase inflamatória ocorre imediatamente após a lesão e tem como principal objetivo prevenir a infeção do ferimento. É uma fase de preparação do local para o início da cicatrização, durante a qual ocorre a ativação do sistema de coagulação sanguínea e

a libertação de mediadores químicos, o que pode gerar edema, vermelhidão e dor. A duração desta etapa depende da natureza da lesão (Kamolz et al., 2022).

A fase seguinte, a proliferação, é considerada a fase da regeneração. Durante esta etapa toda a área da ferida é coberta com células epiteliais e fibroblastos, sendo que em simultâneo ocorre a vascularização e a contração da ferida.

Na última fase do processo, a fase de remodelação, a densidade celular e a vascularização diminuem, resultando na remodelação do tecido cicatricial. Nesta fase ocorre reorganização celular com vista à reformulação da matriz extracelular. Esta fase pode ter uma duração de meses (Nourian Dehkordi et al., 2019).

Muitas vezes o processo de cicatrização pode ser acelerado através da aplicação de curativos. Estes materiais devem proporcionar troca gasosa e humidade necessária para uma regeneração completa do tecido cutâneo. O material deve também ser flexível e fácil de manusear, de modo a poder ser adaptado a diferentes conformações e tamanhos de feridas. Para além disso, deve evitar infeções causadas pela penetração de agentes patogénicos estranhos. A incubação dos agentes patogénicos locais também deve ser evitada, sendo que para isso o curativo deve assegurar uma eficaz remoção do exsudato (fluido inflamatório proveniente da ferida, com elevada concentração de proteínas e fragmentos celulares).

Quando a área afetada é demasiado extensa há uma maior dificuldade no tratamento da ferida através de métodos convencionais. Conforme anteriormente mencionado, em feridas de gravidade maior, como por exemplo, queimaduras ou ferimentos profundos com elevada perda de tecido, pode ser necessário o recurso a transplantes ou substitutos de pele para permitir a cura da ferida (Chouhan & Mandal, 2020).

Atualmente, os enxertos mais utilizados na transplantação de pele são o autoenxerto e o aloenxerto. No autoenxerto o tecido é proveniente do próprio paciente enquanto que no aloenxerto o tecido provém de um outro indivíduo.

Apesar destas abordagens terem revolucionado a regeneração do tecido cutâneo existem algumas limitações em ambos os tipos de enxerto. Naturalmente que os enxertos mais desejáveis são os autoenxertos, pois não apresentam limitações tais como rejeição pelo sistema imunológico do paciente e risco de transmissão de algum agente patogénico do dador para o recetor. No entanto, a colheita de autoenxertos é dispendiosa, dolorosa e limitada em quantidade de tecido.

Como forma de ultrapassar as limitações associadas à transplantação do tecido natural, a comunidade científica tem-se voltado para o desenvolvimento de substitutos artificiais da pele humana, capazes de mimetizar, cada vez mais, a histologia, a fisiologia e a morfologia da pele humana (Hosseini & Shafiee, 2021).

A secção seguinte aborda o papel dos substitutos da pele e os requisitos que estes devem obedecer para garantir eficácia e segurança para o tecido em regeneração.

2.4 Membranas para regeneração de pele

As membranas para regeneração de pele funcionam como um suporte temporário para o crescimento de um tecido novo e, como tal, alguns aspectos estruturais assumem particular relevo.

Para além de proporcionarem o suporte mecânico para o tecido em regeneração, os substitutos da pele devem ser capazes de se degradarem em subprodutos biocompatíveis numa janela de tempo adequada para que o novo tecido possa substituir o suporte e promover a adesão, a fixação e a proliferação celular.

A existência de comunicação intercelular, a disponibilidade de nutrientes, fatores de crescimento e a presença de substâncias ativas são alguns aspectos a ter em conta na preparação das membranas e que serão discutidos de seguida.

Em primeiro lugar o suporte deverá ser tridimensional por forma a proporcionar às células um ambiente idêntico ao que têm *in vivo*.

A porosidade, o diâmetro dos poros e a interconectividade dos mesmos são cruciais para a formação do tecido novo, para a difusão de nutrientes, para o transporte de gases e substâncias ativas e para a vascularização do tecido recém-formado. Estudos encontrados na literatura referem que os valores ideais para a porosidade e para o diâmetro dos poros deverão situar-se na ordem dos 90% e 100 μm , respetivamente (Dhandayuthapani et al., 2011).

Durante a regeneração do tecido, a interação celular depende fortemente das características físico-químicas da superfície do suporte. O suporte deverá apresentar natureza hidrofílica moderada. Num suporte muito hidrofílico a adesão celular é fraca enquanto numa superfície hidrofóbica a adsorção de proteínas e outras substâncias ativas é baixa o que leva igualmente a uma fraca adesão celular.

Além do mais, as membranas deverão possuir propriedades mecânicas semelhantes às do tecido cutâneo que vão substituir, que permitam o seu manuseamento durante a implantação no paciente e resistência à tração ou compressão a que estarão sujeitas depois de aplicadas, de modo a garantir a proteção das células aderidas.

Várias estratégias têm sido seguidas pela comunidade científica com vista ao desenvolvimento de novos suportes que possam ter, não só menor custo de produção, mas também maior especificidade. A funcionalização da superfície do suporte, por exemplo, através da incorporação de compostos biologicamente ativos, tais como, fármacos, proteínas, fatores de crescimento, entre outros, permite que estes suportes funcionem também como sistemas de libertação de substâncias bioativas.

Existem variadas forma de incorporar fármacos ou outros compostos bioativos em matrizes poliméricas. Entre elas podemos destacar a liofilização e a eletrofiliação (ou *electrospinning*) (Calori et al., 2020).

A liofilização permite a obtenção de estruturas altamente porosas, geralmente com características esponjosas, através do congelamento de uma solução polimérica a temperaturas entre os $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ e os $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$, seguido da remoção do solvente por sublimação num equipamento denominado liofilizador. A porosidade resulta do espaço ocupado pelos cristais de gelo que se torna vazio após a sublimação.

Dado que no presente trabalho foi utilizada a técnica de *electrospinning* para a produção das membranas, a secção seguinte descreve os fundamentos desta metodologia.

2.5 Fundamentos de *electrospinning*

O método de *electrospinning* permite obter, através de um processo simples e de baixo custo, matrizes fibrosas com elevada porosidade e área superficial (Rahmati et al., 2021). Basicamente, o método consiste na aplicação de uma diferença de potencial entre dois elétrodos, um que coincide com a origem da solução polimérica e outro que atua como coletor do material fibroso. É uma das técnicas mais promissoras para a produção de membranas / *scaffolds* para regeneração da pele e foi a metodologia utilizada no presente trabalho.

Conforme visualizado na Figura 2, no processo de *electrospinning* existem três componentes fundamentais: uma fonte de alimentação de alta voltagem, um tubo capilar com uma agulha e um coletor de metal (Huang et al., 2003). O processo é baseado na injeção de uma carga numa solução polimérica transferindo-lhe polaridade. Consequentemente é formado um menisco com forma de cone, denominado cone de Taylor e, devido à atração do coletor que contém uma polaridade oposta, vai ser produzido um jato de fibras quando a força do campo elétrico excede a tensão superficial da solução. O solvente quando entra em contacto com a atmosfera, evapora, produzindo-se fibras sólidas que vão depositar-se no coletor formando-se assim uma membrana (Sill & von Recum, 2008a).

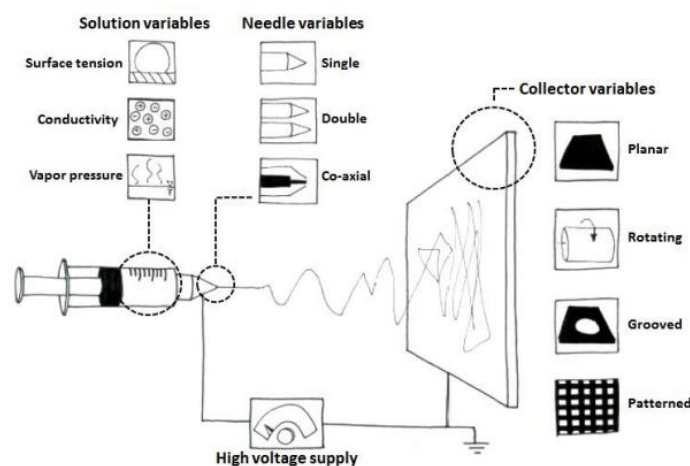


Figura 2 - Esquema do processo de electrospinning incluindo algumas (Adaptado de Marcolin, 2017).

As fibras obtidas por *electrospinning* possuem diâmetros que normalmente variam entre os 10 µm e os 10 nm. O diâmetro da fibra pode ser influenciado pelo tipo de polímero utilizado, natural, sintético ou mistura de ambos (Lannutti et al., 2007).

Devido às reduzidas dimensões das fibras, à sua elevada porosidade e área superficial, são inúmeras as aplicações possíveis das matrizes fibrosas obtidas por *electrospinning*. Uma das aplicações mais comuns é a utilização destas membranas como matrizes de libertação controlada de fármacos (Cramariuc et al., 2013). A baixa rigidez das fibras produzidas e a dificuldade na regulação do tamanho e forma dos poros (devido à deposição aleatória das fibras) constitui a principal limitação das matrizes produzidas por esta metodologia (Liu et al., 2007).

2.5.1 Parâmetros que influenciam a técnica de *electrospinning*

Existem diversos parâmetros capazes de influenciar o processo de *electrospinning*, entre os quais se destacam: i) parâmetros ambientais: humidade e temperatura; ii) parâmetros relativos à solução polimérica: concentração, viscosidade, condutividade e peso molecular e iii) parâmetros relativos ao processo: distância entre a agulha e o coletor, voltagem e caudal (Haider et al., 2018a).

Uma vez que estes parâmetros têm um forte impacto na estrutura morfológica das fibras obtidas por *electrospinning*, então, por forma a otimizar o processo de produção, é essencial compreender os efeitos que cada um deles tem nas mesmas. A secção que se segue aborda, de forma sucinta, este assunto.

2.5.1.1 Humidade e temperatura

A humidade e a temperatura são fatores ambientais que afetam o diâmetro e a morfologia das fibras, além de controlar a solidificação do jato de fibras que é projetado pela agulha (Haider et al., 2018a).

Quando a humidade se encontra relativamente baixa pode ser prejudicial para o processo, a solução pode secar ainda no equipamento devido à elevada taxa de evaporação do solvente nestas condições. Consequentemente, se não se realizar o processo rapidamente, os capilares utilizados podem sofrer entupimento sendo impedida a formação de fibras (Bhardwaj & Kundu, 2010a).

Contrariamente, uma humidade relativa elevada, poderá beneficiar a produção de um jato de fibras, assim como aumentar o diâmetro das fibras obtidas (Ibrahim & Klingner, 2020).

Por seu lado, a temperatura aumenta a taxa de evaporação do solvente e diminui a viscosidade da solução (Haider et al., 2018a). Quando o processo ocorre a elevada temperatura, as fibras obtidas geralmente têm diâmetros inferiores devido à baixa viscosidade da solução polimérica (Bhardwaj & Kundu, 2010a).

A temperatura afeta ainda a tensão superficial da solução. Elevadas temperaturas fazem diminuir a tensão superficial, podendo impedir a formação de fibras. Em oposição são produzidos *beads*, pequenas gotas solidificadas de solução polimérica.

Esta situação ocorre quando as forças eletrostáticas aplicadas através da voltagem, proveniente da fonte de alimentação, não conseguem quebrar a tensão superficial da solução (He et al., 2021).

2.5.1.2 Concentração e viscosidade

Uma vez que o processo de *electrospinning* se baseia no fenómeno do alongamento uniaxial de um jato de solução carregada numa seringa, a concentração e a viscosidade da solução polimérica são parâmetros que podem afetar, de forma significativa, o comportamento do jato e, conseqüentemente, o diâmetro e a morfologia das fibras produzidas (Kulkarni et al., 2010).

A concentração e a viscosidade são parâmetros que exibem uma relação direta. Assim, a preparação de uma solução polimérica com baixa concentração leva a que também possua uma baixa viscosidade. Como resultado, a solução deixa de ser adequada ao processo de *electrospinning*, originando-se *beads* no lugar de fibras. No caso oposto, com o aumento da concentração, a viscosidade aumenta, levando à formação de fibras mais uniformes (He et al., 2021).

De sublinhar que, para a formação contínua de fibras por *electrospinning*, é necessário que a viscosidade da solução polimérica seja suficientemente elevada, por forma que as cadeias poliméricas também aumentem de comprimento e potenciem a formação de fibras mais alongadas em vez da formação de *beads* (Islam et al., 2019). Em contrapartida, este parâmetro pode acabar por prejudicar o fluxo da solução se for exagerado. É, portanto, relevante o equilíbrio entre ambos os parâmetros.

2.5.1.3 Condutividade

A condutividade da solução polimérica não só afeta a formação do cone de Taylor, como também é um parâmetro relevante para o controlo do diâmetro das fibras.

Soluções com elevada condutividade estão mais propícias a uma maior capacidade de transporte de carga e, conseqüentemente, na presença de um campo elétrico, são submetidas a uma maior força de tensão. Este fator é importante pois soluções com elevadas condutividades acabam por se tornar instáveis, levando à possível formação de *beads* em conjunto com as fibras (Sill & von Recum, 2008b).

Por outro lado, quando a solução apresenta baixa condutividade, a superfície da gota não tem carga suficiente para que haja a formação do cone de Taylor, impedindo totalmente a utilização da técnica de *electrospinning*. O mesmo acontece para valores elevados deste parâmetro.

Assim, a condutividade elétrica da solução é uma variável de grande importância na escolha das condições experimentais quando se pretende preparar matrizes fibrosas pela técnica de *electrospinning*.

2.5.1.4 Peso molecular do polímero

O efeito do peso molecular do polímero em solução é um parâmetro que afeta diretamente o diâmetro das fibras produzidas. Com o aumento do peso molecular

das cadeias poliméricas, estas encontram-se mais enroladas entre si originando um aumento na viscosidade da solução. Como referido anteriormente, este aumento de viscosidade contribuirá para a manutenção do jato de solução na saída da agulha evitando a quebra das fibras que se formam. Estudos realizados anteriormente mostraram que na preparação de fibras de polimetacrilato de metilo (PMMA) e variando o seu peso molecular entre 12,47 a 365,7 kDa, a morfologia das fibras sofria significativas variações. Enquanto pesos moleculares inferiores resultaram na formação de *beads*, pesos superiores originaram fibras definidas cujo diâmetro aumentava com o aumento do peso molecular do PMMA (Gupta et al., 2005).

2.5.1.5 Distância entre a agulha e o coletor

A distância entre a ponta da agulha e o coletor é mais um fator que influencia a morfologia das fibras obtidas por *electrospinning*. Tal como os fatores anteriormente mencionados este parâmetro também depende do sistema polimérico usado.

Curtas distâncias podem implicar a formação de fibras defeituosas, com *beads*, e de grande diâmetro, devido ao curto espaço de tempo disponível para a sua secagem antes de serem depositadas no coletor (Bhardwaj & Kundu, 2010b) o que pode resultar numa evaporação incompleta do solvente.

Quando é aumentada a distância, o jato é mais alongado e, conseqüentemente, o diâmetro da fibra diminui. No entanto, para a formação de fibras contínuas e sem *beads* a distância também não pode ser demasiado elevada. Torna-se, então, crucial encontrar uma distância ótima entre a ponta da agulha e o coletor para que se possam produzir fibras por *electrospinning* mais uniformes e com o diâmetro desejado.

De realçar que a distância ótima entre a agulha e o coletor também é fortemente influenciada pela natureza do solvente (Islam et al., 2019).

O solvente deve ser capaz de solubilizar completamente o polímero sendo também uma das suas propriedades mais importantes o ponto de ebulição. Solventes muito voláteis têm elevadas taxas de evaporação o que facilita a volatilização dos mesmos durante o percurso da fibra desde a ponta da agulha até ao coletor. No entanto, solventes com volatilidade muito elevada podem provocar a secagem do jato de solução na ponta da agulha.

Por outro lado, solventes pouco voláteis devem ser evitados, uma vez que não são completamente evaporados durante o trajeto das fibras. A deposição de fibras com solvente ainda presente leva à formação de nervuras, ou à dissolução das fibras já depositadas.

Face ao exposto, a seleção do solvente é um fator determinante para a produção de fibras de qualidade através do método de *electrospinning*.

2.5.1.6 Voltagem

A voltagem aplicada à solução a utilizar tem um efeito importante na estrutura das fibras produzidas. No equipamento de *electrospinning*, é necessário aplicar uma voltagem mínima de 6 kV para que seja iniciada a projeção de fibras no coletor (Islam

et al., 2019). Deste modo, voltagens abaixo deste valor não promovem a formação de fibras, mas antes de gotas de solução que caem da ponta da agulha (He et al., 2021). Voltagens superiores àquele valor promovem a formação de fibras mais longas e de menor diâmetro devido a uma maior alongação da solução, devido às forças de Coulomb da mesma, e à formação de um campo elétrico mais forte provocado pela repulsão de carga dentro do jato polimérico (Bhardwaj & Kundu, 2010b). Todavia, valores muito superiores ao mínimo podem resultar na pulverização da solução, deixando de se verificar a formação de fibras. De realçar que a voltagem a aplicar varia consoante o polímero utilizado (Haider et al., 2018b).

2.5.1.7 Caudal

O caudal da solução polimérica que atravessa a ponta da agulha influencia a forma, tamanho e porosidade das fibras obtidas. À medida que o caudal é aumentado, o diâmetro e a porosidade das fibras também aumentam, o que pode levar à libertação descontrolada de fibras e à formação de *beads*, uma vez que as fibras são ejetadas rapidamente e o solvente não tem tempo suficiente para evaporar na totalidade durante o percurso entre a ponta da agulha e o coletor (Zhang et al., 2005).

O caudal configurado na bomba tem de ser o suficiente para que haja a formação de um cone de Taylor na ponta da agulha. Se o volume de solução ejetada não for repostado de maneira que o cone se mantenha constante, as fibras não vão ser uniformes devido às paragens durante a sua ejeção (Sill & von Recum, 2008c). Desta forma deve ser usado, preferencialmente, um caudal mínimo que permita manter um equilíbrio entre a solução polimérica que sai da ponta da agulha e a substituição dessa solução por uma nova durante a formação do jato, sem que haja interrupção.

2.6 Materiais poliméricos

Mais de cinquenta tipos diferentes de soluções poliméricas foram estudadas e utilizadas eficazmente em *electrospinning*. A preparação destas soluções baseia-se na dissolução completa do polímero num solvente apropriado, pois nem todos os polímeros podem ser dissolvidos nas mesmas condições (Huang et al., 2003).

Nesta secção descrevem-se as principais características dos polímeros utilizados no presente trabalho para produzir as membranas eletrofiadas, a sua estrutura química e os diferentes campos de aplicação.

2.6.1 Policaprolactona

A poli(ϵ -caprolactona) (policaprolactona ou PCL), cuja estrutura química se encontra representada na Figura 3, é um poliéster sintético linear e semicristalino que, além da sua elevada durabilidade (tempo de degradação entre 2 a 3 anos) e elasticidade, é biodegradável e biocompatível (Dwivedi et al., 2020a). Além do mais, pode ser solubilizada, à temperatura ambiente, em vários solventes orgânicos (incluindo clorofórmio e metanol). É também parcialmente solúvel em acetona e insolúvel em

água e álcoois. Acresce o facto de poder ser processada a baixas temperaturas. Estas características são cruciais para a utilização deste polímero na preparação de membranas para regeneração de tecido cutâneo (Dwivedi et al., 2020b).

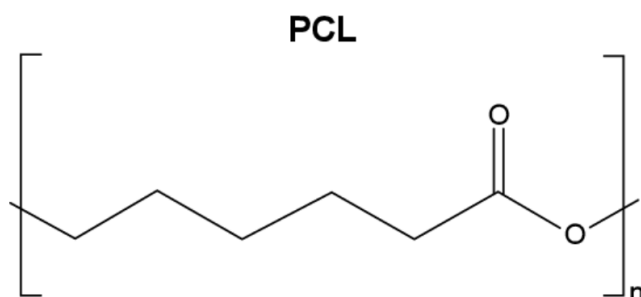


Figura 3 - Estrutura química da poli(ε-caprolactona) (Adaptado de Song et al., 2018).

Quanto às características físico-químicas, a PCL exibe uma temperatura de transição vítrea por volta dos $-60\text{ }^{\circ}\text{C}$, uma temperatura de fusão entre $59\text{ e }64\text{ }^{\circ}\text{C}$ e um peso molecular médio que varia entre os $3000\text{ e }90000\text{ g/mol}$ (Ilyas et al., 2022). Estas características resultam do facto de a PCL possuir cadeias muito longas e, conseqüentemente, reduzida mobilidade, o que lhe confere boas propriedades mecânicas e um caráter hidrofóbico.

Devido à sua natureza semicristalina, viscosidade variável e elevada resistência, a PCL é utilizada numa grande variedade de aplicações, nomeadamente na área da medicina regenerativa, impressão 3D e *electrospinning* (Bartnikowski et al., 2019), assim como na regeneração de tecido lesado e na libertação de fármacos (Dwivedi et al., 2020b).

De sublinhar que a PCL já se encontra aprovada pela *Food and Drug Administration* (FDA) para uma vasta gama de aplicações biomédicas.

2.6.2 Acetato de celulose

O acetato de celulose (ACE), cuja estrutura química se encontra representada na Figura 4, é um polímero natural, de natureza hidrofílica, e que possui um conjunto de propriedades muito atrativas na área das ciências biomédicas, como biocompatibilidade e biodegradabilidade, não ser tóxico e ter um custo relativamente baixo (Wsoo et al., 2020).

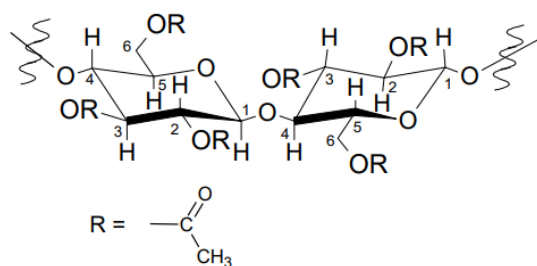


Figura 4 - Estrutura química do acetato de celulose (Adaptado de Meireles, 2007).

Membranas compostas por este polímero possuem uma grande estabilidade química e mecânica, boa afinidade com a água e propriedades de transporte. Uma vez que o ACE confere às superfícies onde é aplicado uma elevada capacidade de absorção de água, o polímero também é ideal para a transferência e absorção de fármacos (Vatanpour et al., 2022).

Muitas vezes o ACE é utilizado em conjunto com outros polímeros devido às suas propriedades que influenciam a formação de poros. A presença de poros em membranas permite a passagem de um fluxo moderado através dos mesmos (Arthanareeswaran et al., 2008). Além disso, a combinação do acetato de celulose com a policaprolactona aumenta a força de tensão das membranas produzidas (Trinca et al., 2017b).

O ACE pode ser sintetizado a partir de um grande número de matérias-primas, tais como algodão, palha e casca de arroz. A celulose é extraída destes materiais através de um processo de acetilação, usando ácido acético como solvente (Yadav & Hakkarainen, 2021) ou, em alternativa, a acetilação também pode ser alcançada através de enzimas. Após esta etapa ocorre a degradação da cadeia por cisões, que têm como objetivo encurtar o comprimento das mesmas (Yadav & Hakkarainen, 2021).

O ACE é normalmente utilizado em processos de separação por membranas, mais propriamente na preparação de membranas dedicadas à osmose reversa, ultrafiltração (Arthanareeswaran et al., 2008), nanofiltração, microfiltração, separação de gases e eletrofiltração de membranas para libertação controlada de fármacos (Vatanpour et al., 2022).

2.7 Libertação controlada de fármacos

Os Sistemas de Libertação Controlada (SLC) de fármacos têm por objetivo prolongar e melhorar o controlo da administração de fármacos por forma a otimizar a sua ação terapêutica com o mínimo de efeitos colaterais.

As formas de administração convencionais (ex: nebulização ou “*spray*”, via intravenosa e via oral) permitem uma libertação rápida e indiscriminada da substância ativa. Este tipo de libertação resulta num aumento da concentração do fármaco no sangue, atingindo rapidamente um máximo, a que se segue uma diminuição exponencial (Figura 5). Cada fármaco possui um intervalo de ação terapêutica acima do qual esta ação é tóxica e abaixo do qual é ineficaz. A manutenção da concentração dentro do intervalo terapêutico pode, contudo, ser problemática. Assim, para que a concentração do fármaco seja eficaz e não tóxica, ou seja, se localize dentro do intervalo terapêutico continuamente, é necessário administrá-lo em várias doses, resultando numa flutuação significativa da sua concentração no organismo (Dash & Cudworth, 1998).

O objetivo de um SLC reside em manter a concentração do fármaco no organismo dentro do intervalo terapêutico por tempo prolongado, utilizando-se uma única dosagem. A Figura 5 compara os perfis de liberação de um fármaco, administrado através de um sistema convencional (por unidose e várias doses) e de um SLC, em função do tempo.

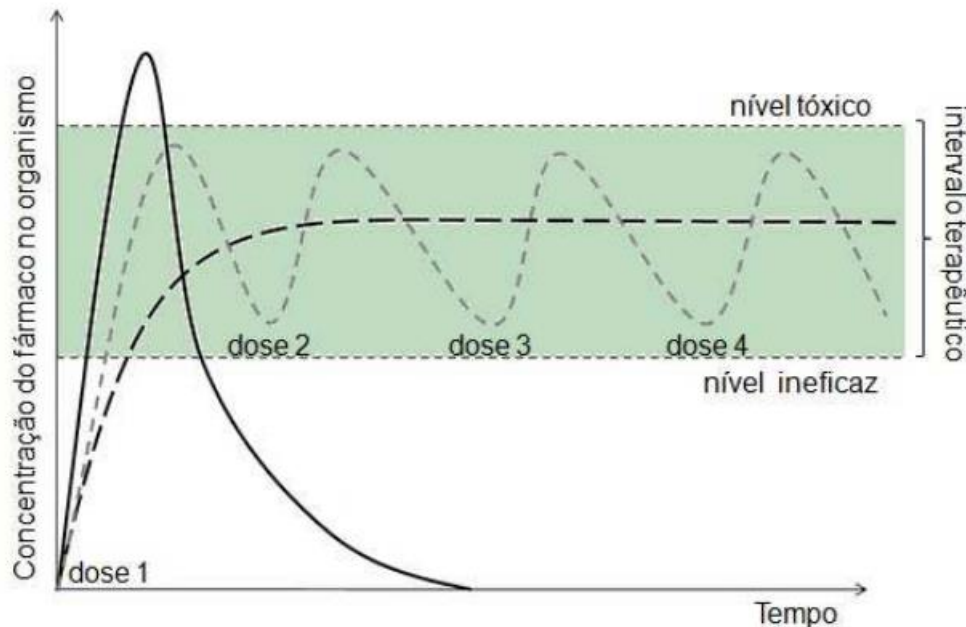


Figura 5 - Comparação dos perfis de liberação de um fármaco resultantes da administração de um sistema de liberação convencional por dose única (—) e várias doses (----) de um sistema de liberação controlada (— — —) (Adaptado de Dash & Cudworth, 1998).

A principal aplicação das membranas enquanto SLC é na liberação de fármacos por via transdérmica. De facto, a pele é uma via atrativa para a administração de fármacos devido à sua extensão, permitindo direcionar os fármacos para o local onde são necessários, seja na colocação direta sobre um ferimento ou no alívio da dor ou outras aplicações médicas e cosméticas. Contudo, a administração de medicamentos através da pele pode ser dificultada porque a camada exterior resistente da pele pode impedir a passagem de algumas moléculas. Neste quadro, várias abordagens têm sido usadas para ultrapassar a “barreira” da pele, como por exemplo, o uso de promotores de absorção (químicos ou físicos) para facilitar a penetração do fármaco, que nem sempre são totalmente inócuos. Recentemente, tem sido investigada a utilização de ondas ultrassónicas que impulsionam as moléculas do medicamento para a pele, criando pequenos canais que facilitam a passagem do fármaco (Yu et al., 2023).

A permeação de fármacos através da pele é ainda influenciada pelas próprias características da pele, como a espessura, a temperatura, o grau de hidratação, a limpeza da pele, o fluxo sanguíneo, a concentração de lípidos, o número de folículos pilosos, a função das glândulas sudoríparas, a raça, o pH na superfície da pele, etc.

Na administração por via transdérmica, a liberação do fármaco ocorre de forma contínua, a partir de uma matriz polimérica. Um dos requisitos fundamentais para

que os materiais poliméricos possam ser utilizados como SLC é que estes e os seus produtos de degradação não sejam tóxicos. Além disso, devem apresentar boa biocompatibilidade, sobretudo com os tecidos com que vão entrar em contacto.

Polímeros biodegradáveis, de origem sintética, tais como a policaproactona, são amplamente utilizados em SLC devido à facilidade de ajustar da sua taxa de degradação e à manutenção da integridade e bioatividade destas matrizes durante todo o processo de libertação (Swanson et al., 2020).

A libertação do fármaco pode ser controlada através das características da própria membrana onde vai ser incorporado, e ou através da concentração do próprio fármaco.

Propriedades como porosidade e morfologia são relevantes para a difusão e fluxo do fármaco através da matriz, podendo ser controladas e ajustadas durante o processo produtivo das membranas (Sun et al., 2020).

A grande vantagem da libertação transdérmica face, por exemplo, à via oral reside na proteção do fármaco da biotransformação e da hidrólise enzimática no trato gastrointestinal. Acresce ainda o facto de oferecer menos toxicidade sistémica, ser uma libertação localizada, cómoda, indolor e fácil de interromper, caso se manifestem efeitos secundários.

3 PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

3.1 Materiais

No presente trabalho foram utilizados diversos materiais/reagentes para a síntese e caracterização das membranas poliméricas, obtidas por *electrospinning*, e que serão descritos de seguida.

A policaprolactona (PCL) foi o polímero principal utilizado na síntese das membranas eletrofiadas, possui uma massa molecular de 80000 g mol⁻¹, e foi adquirido à empresa Thermo Fisher Scientific.

O acetato de celulose (ACE) tem uma massa molecular de 100000 g mol⁻¹, foi utilizado devido à sua natureza hidrofílica, assim como à estabilidade que fornece à membrana quando misturado com a policaprolactona, e foi adquirido à empresa Acros Organics.

Foram ainda testados outros polímeros, como a gelatina e o quitosano, mas que acabaram por ser abandonados por conduzirem a resultados desfavoráveis e, por conseguinte, não serão referidos nesta secção.

O fármaco utilizado, o diacetato de clorexidina (CHX), possui uma massa molecular de 625,56 g mol⁻¹, foi escolhido devido às suas propriedades antifúngica e bactericida, e foi adquirido à Tokyo Chemical Industry (TCI).

Foram também utilizados outros reagentes, como por exemplo, triclorometano (CHCl₃), cuja designação comercial é clorofórmio, metanol (CH₃OH) e água Milli-Q.

Na fase da cultura celular foram utilizados meio de Eagle modificado por Dulbecco F-12 (DMEM-F12), penicilina/estreptomicina, tripsina, resazurina e caldo LB foram adquiridos da Sigma Aldrich (Sintra, Portugal), fibroblastos dérmicos humanos normais (NHDF) adquiridos da Promo-Cell (Heidelberg, Alemanha), soro fetal bovino (FBS) adquirido da Biochrom AG (Berlim, Alemanha), isolado clínico de *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*; ATCC 25923) e *Escherichia coli* DH5a (*E. coli*) foram utilizados para avaliar as propriedades antimicrobianas das membranas eletrofiadas.

3.1.1 Preparação das soluções poliméricas

Para a preparação das soluções poliméricas foi necessário identificar os solventes capazes de solubilizar os polímeros. De acordo com a literatura consultada (Trinca et al., 2017), os solventes que promovem a dissolução da PCL são misturas de triclorometano e metanol na proporção de 5:1.

Foram produzidos três tipos de membranas poliméricas: membranas produzidas apenas com PCL (Tipo I), membranas compósitas, produzidas com misturas de PCL e ACE (Tipo II), e membranas assimétricas, em que a camada base é constituída

apenas por PCL e a segunda camada por PCL e ACE, designadas Tipo III. O diacetato de clorexidina apenas foi incorporado nestas últimas.

Conforme já mencionado, o processo de *electrospinning* é fortemente influenciado pela concentração da solução polimérica, pelo que houve necessidade de otimizar a massa de polímero a dissolver. Para tal, foram testadas diversas concentrações, compreendidas entre 10% (m/v) e 25% (m/v), para se determinar qual seria a mais favorável juntamente com os outros fatores, quer ambientais quer do processo.

A concentração polimérica de todas as soluções precursoras das membranas considerada ótima, foi de 15%, m/v. Assim, as quantidades de polímero (PCL e ACE) e de diacetato de clorexidina (CHX), dissolvidas em 12 mL de uma mistura de clorofórmio (CHCl₃) e metanol (CH₃OH) (5:1), usadas para preparar cada um dos três tipos de membranas encontram-se na Tabela 1.

Tabela 1 - Quantidades (massa e volume) de reagentes definidas para a produção dos vários tipos de membranas

Membranas	Massa (g)			Volume (mL)	
	PCL	ACE	CHX	CHCl ₃	CH ₃ OH
Tipo I	1,8	0,0	0,0	10,0	2,0
Tipo II	1,4	0,4	0,0	10,0	2,0
Tipo III	1,4	0,3	0,1	10,0	2,0

A dissolução do(s) polímero(s) ocorreu sob agitação magnética, à temperatura ambiente, durante um período variável de duas a quatro horas, até homogeneização completa das soluções.

3.1.2 Montagem e instalação do *electrospinning*

Uma vez que o equipamento não se encontrava em funcionamento há já muito tempo foi necessário montar toda a instalação de *electrospinning* e colocá-la operacional. Neste ponto é descrito todo o trabalho experimental desenvolvido até ter o equipamento funcional para a produção das membranas eletrofiadas.

De referir que todo o processo de *electrospinning* deve ser realizado em ambiente controlado para garantir a repetibilidade dos resultados nas mesmas condições. Como o processo é fortemente dependente de fatores externos de difícil controlo em ambiente laboratorial, designadamente a humidade e temperatura, estas variáveis foram registadas para posteriormente se avaliar o seu impacto nos resultados. Conforme anteriormente mencionado, estas variáveis afetam, por exemplo, a viscosidade da solução, parâmetro fundamental para a produção de membranas eletrofiadas.

Outros fatores, como a distância entre a agulha e o coletor, a voltagem aplicada pela fonte de alimentação e o caudal da solução polimérica, são controlados e configurados no início do processo, embora possam ser alterados a qualquer momento. Estes fatores são tão ou mais importantes como os referidos anteriormente (humidade e temperatura) e é fundamental a sua otimização para identificar a melhor configuração que permita a formação de fibras uniformes.

Todo o processo de produção de membranas eletrofiadas é realizado numa caixa própria, que serve de suporte e de camada adicional de segurança, para que as fibras obtidas fiquem contidas dentro da mesma. Esta caixa é colocada numa *botte*, com a ventilação ligada, de maneira a manter a segurança do utilizador. A Figura 6 mostra a instalação do *electrospinning* usada no presente trabalho.



Figura 6 – Equipamento utilizado no processo de *electrospinning*.

A instalação é constituída por uma bomba de seringa, seringa, que possui um diâmetro interno de 15,9 mm e 10 mL de volume, um tubo capilar, duas agulhas de aço inoxidável de calibre 18, um coletor (neste caso foi utilizado papel de alumínio), uma fonte de alimentação de alta voltagem (0-30 kV), não visível na respetiva Figura 6 (por se encontrar a uma distância de segurança da instalação), e dois suportes, um para o coletor e o outro para a agulha.

3.1.3 Preparação das membranas eletrofiadas

O processo de *electrospinning* inicia-se com a introdução da solução polimérica na seringa. Como alguns dos reagentes podem emitir vapores prejudiciais à saúde são necessários cuidados no manuseamento dos mesmos, pelo que a sua manipulação deve ser realizada numa *botte*, assim como deve usar-se luvas e máscara (Huang et al., 2003).

Antes da utilização do equipamento é registada a humidade e a temperatura da atmosfera da caixa, utilizando um higrómetro e um termómetro, respetivamente. Este passo é importante para se ter uma noção da influência destes fatores nas fibras

produzidas. De seguida é colocada a seringa que contém a solução polimérica na bomba de seringa própria, tal como mostra a Figura 7.



Figura 7 - Bomba de seringa utilizada no processo de *electrospinning*

Antes de se ligar a bomba é montado o capilar e as respetivas agulhas por onde vai circular a solução. A ponta de uma das agulhas é presa com uma mola, de maneira que a agulha fique orientada na direção do coletor.

A bomba é ligada e de seguida liga-se também a fonte de alimentação, onde é possível selecionar a voltagem da corrente que se pretende transferir sendo esta transmitida para a agulha que está em contacto com a solução. O mesmo acontece no coletor, que se encontra envolvido em papel de alumínio recebendo este uma corrente que vai atrair as fibras produzidas que possuem o polo oposto.

Este processo dá-se por concluído quando toda a solução presente na seringa é colhida no coletor. O equipamento é desligado, com especial cuidado na fonte de alimentação, é retirado o papel de alumínio, guardado e identificado para ser usado posteriormente na caracterização das fibras produzidas.

Como este processo possui diversas variáveis que afetam drasticamente o resultado, tais como humidade, temperatura ambiente, voltagem, caudal e distância entre agulha e coletor, e necessita de ser otimizado, inicialmente, foram feitos vários testes em que foi utilizado um volume menor de solução, 6 mL, para economia de reagentes. Quando se obtiveram fibras com a qualidade desejável aumentou-se o volume, mantendo a concentração, para que houvesse maior quantidade de fibras disponível para uma posterior análise e caracterização.

Conforme já referido, na impossibilidade de controlar os parâmetros ambientais, humidade e temperatura, fez-se o seu registo para cada experiência, encontrando-se os valores daqueles parâmetros entre os 50% e 70% e 24 °C e 28 °C respetivamente.

Por fim, os testes experimentais, realizados previamente, conduziram às seguintes condições ótimas de utilização do equipamento de *electrospinning*:

- Concentração da solução polimérica – 15%, m/v

- Volume de solução polimérica – 10 mL
- Distância entre a agulha e o coletor – 15 cm
- Voltagem – 25 kV
- Caudal – 5 mL h⁻¹

A Figura 8 mostra o aspeto macroscópico de uma das membranas obtidas por *electrospinning*. O aspeto visual à vista desarmada é semelhante para todas as amostras.



Figura 8 – Fotografia representativa de uma membrana eletrofiada.

Depois de preparadas, todas as membranas foram caracterizadas do ponto de vista físico-químico, morfológico, térmico e biológico, de acordo com o descrito de seguida.

3.2 Caracterização das membranas

Todas as membranas (Tipo I, II e III) foram alvo de uma caracterização exaustiva com recurso a várias técnicas de análise.

A Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier com Reflexão Total Atenuada, do inglês *Fourier-Transform Infrared Spectroscopy – Attenuated Total Reflectance*, FTIR-ATR, permitiu avaliar possíveis alterações na estrutura química das membranas (Tipo I e II), resultantes das interações entre os polímeros (Tipo II).

A Análise Termogravimétrica (*Thermogravimetric Analysis*, TGA) é uma técnica que permite avaliar a estabilidade térmica de materiais, incluindo polímeros, através da monitorização da perda de massa de cada um dos polímeros utilizados em função da temperatura.

O carácter hidrofílico/hidrofóbico das membranas foi avaliado através da determinação de ângulos de contacto dinâmicos e através de estudos de absorção de água, enquanto a capacidade de degradação das mesmas foi inferida através de testes de perda de massa quando submersas em meio líquido.

Considerando a imobilização do diacetato de clorexidina nas membranas Tipo III, a libertação do mesmo foi avaliada de forma a inferir acerca do eventual papel antimicrobiano das membranas preparadas por este método. Este foi também avaliado pelo estudo de atividade antimicrobiana recorrendo a duas estirpes de bactérias: *E. coli* e *S. aureus*.

Uma vez que as membranas se destinam a contactar diretamente com o organismo foi, também, avaliada a sua biocompatibilidade recorrendo a culturas celulares de fibroblastos.

3.2.1 Espetroscopia de infravermelho por transformada de Fourier com reflexão total atenuada (FTIR-ATR)

A Espetroscopia de Infravermelhos por Transformada de Fourier com Reflexão Total Atenuada (FTIR-ATR) é uma metodologia de análise a ligações químicas e estruturas moleculares de compostos químicos. A maioria das moléculas absorve radiação na região infravermelha do espectro eletromagnético. Esta radiação pode ser lida com base na utilização de feixes de radiação eletromagnética com o propósito de gerar um sinal através da mudança do caminho ótico entre os feixes. Com o uso de diversos cálculos matemáticos, a distância do comprimento ótico pode ser convertida de maneira a obter-se o valor da frequência da radiação. A cada tipo de ligação química corresponde uma frequência específica.

As análises de FTIR-ATR foram realizadas num espectrofotómetro, mais especificamente, um *JASCO FT-IR-4200*, equipado com um *Golden Gate Single Reflection Diamond ATR*. Os espectros foram obtidos com 64 scans, com uma resolução de 4 cm^{-1} , à temperatura ambiente, na gama entre 500 e 4000 cm^{-1} .

Esta técnica foi aplicada às membranas Tipo I e Tipo II. As membranas Tipo III não foram sujeitas a esta análise por serem compostas pela combinação das membranas Tipo I e Tipo II.

3.2.2 Análise termogravimétrica

A termogravimetria é uma técnica fundamental na caracterização de materiais, pois permite a monitorização da perda de massa da amostra em função da temperatura.

O equipamento possui uma microbalança, capaz de medir com precisão a alteração da massa das amostras com o aumento progressivo de temperaturas a que são sujeitas.

No presente trabalho, a análise termogravimétrica das membranas poliméricas foi realizada no equipamento TGA Q500 da *Thermal Analysis (TA) Instruments*.

As membranas foram submetidas a um aumento gradual de temperatura de 10 °C por minuto, desde a temperatura ambiente até se atingir a temperatura máxima de 600 °C. Conforme mencionado, no decurso da análise a amostra é continuamente pesada, à medida que sofre o aquecimento progressivo.

De acordo com o *software* da *TA Instruments (Universal Analysis 2000)* foram obtidos os perfis de degradação de cada uma das amostras.

A análise foi realizada em triplicado para cada um dos três tipos de membranas obtidas por *electrospinning* (Tipo I, II e III).

3.2.3 Ângulos de contacto dinâmicos

O ângulo de contato é uma medida quantitativa que se baseia no humedecimento de uma superfície sólida por um líquido. Utilizando um sistema ótico de medição de ângulo de contato, pode ser analisado o comportamento de uma gota aplicada numa superfície.

Por norma é assumido que a superfície analisada é ideal, ou seja, plana e homogénea e que não ocorrem interações entre o líquido e o substrato. Dada a dificuldade em observar estes critérios, são normalmente utilizados ângulos de contacto dinâmicos para que seja observado o comportamento durante alguns instantes.

A classificação das superfícies é feita de acordo com a Figura 9. Assim, as superfícies que apresentam ângulos de contacto superiores a 150° são classificadas de superhidrofóbicas, entre 150° e 90° de hidrofóbicas e abaixo de 90° hidrofílicas. Podem também existir casos extremos em que existem superfícies completamente molháveis, com ângulo de 0° ou não molháveis com ângulos de 180°(Law, 2014).

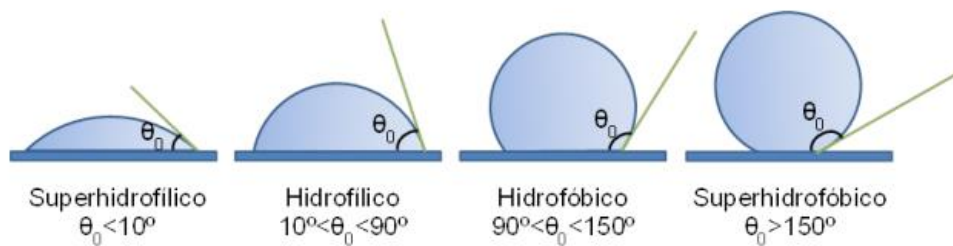


Figura 9 - Classificação dos regimes de molhabilidade baseados no valor do ângulo de contacto (Ramos et al., 2014).

No presente trabalho, a determinação de ângulos de contacto dinâmicos teve como finalidade avaliar a hidrofobicidade ou hidroflicidade das membranas.

Para tal, foi utilizado o equipamento OCA 20, da *Dataphysics*. Cada gota de água dispensada pela seringa do equipamento tinha um volume de 10 µL. Após a queda da gota na superfície da amostra foi, imediatamente, iniciada a gravação do seu comportamento, pelo período de 1 minuto (com 5 *frames* a cada 2,5 segundos). Após a gravação, com base no vídeo criado, o *software* calculou o ângulo de contacto formado entre a linha da superfície do material e a gota depositada, ao longo do

tempo. Esta análise foi também realizada em triplicado para cada um dos três tipos de membranas obtidas.

3.2.4 Capacidade de absorção de água (*swelling*)

O ensaio de determinação da capacidade de absorção de água pelas membranas, juntamente com a determinação de ângulos de contacto, permite, sobretudo, avaliar a hidrofiliabilidade das amostras, podendo este conceito ser aplicado na avaliação preliminar da sua capacidade para a absorção dos exsudatos formados em feridas.

Para este ensaio, as membranas foram recortadas em pequenas amostras com cerca de 16 cm² de superfície (4×4 cm), pesadas e colocadas num exsiccador com uma atmosfera húmida. Ao longo de vários dias estas foram pesadas até se verificar que já se encontravam saturadas, ou seja, o seu peso não varia significando que foi absorvida a quantidade máxima possível de água. Num período de nove dias, as amostras foram pesadas três vezes. No primeiro dia as amostras foram deixadas em repouso no exsiccador, no segundo, oitavo e nono dias foram pesadas. Neste último, confirmou-se que a quantidade de água absorvida já tinha atingido o seu limite, ou seja, que se encontravam saturadas.

A percentagem de absorção de água pelas membranas foi determinada de acordo com a equação 1.

$$\text{Absorção (\%)} = \frac{\text{Massa Húmida Final} - \text{Massa Seca Inicial}}{\text{Massa Seca Inicial}} \times 100 \quad (1)$$

Este ensaio permitiu não só obter os perfis de absorção de água ao longo do tempo, mas também determinar a capacidade máxima de absorção das membranas.

O ensaio de determinação da capacidade de absorção de água foi realizado, em triplicado, para cada um dos três tipos de membranas produzidas (Tipo I, II e III).

3.2.5 Estudos de perda de massa

Um dos métodos mais utilizados para avaliar a degradação das membranas poliméricas, e/ou a sua dissolução em água, consiste em analisar a perda de massa de amostras submersas numa solução aquosa, ao longo do tempo.

No presente trabalho os estudos de degradação foram realizados em amostras de membranas de dimensão 4×4 cm, submersas em água Milli-Q, durante um período de 9 dias. Em determinados dias (2º, 8º e 9º dias) as amostras foram removidas do meio aquoso e secas numa estufa de vácuo à temperatura de 100 °C, até peso constante. Para cada tipo de membrana (I, II e III) o número total de amostras avaliadas foi de 9 (3 amostras correspondentes a cada dia de avaliação).

Com base na massa das amostras antes de submetidas ao procedimento descrito e na massa das amostras após todo o processo é possível avaliar a perda de massa experimentada pelos vários tipos de membranas, calculada de acordo com a equação 2.

$$\text{Perda de Massa(\%)} = \frac{\text{Massa Seca Inicial} - \text{Massa Seca Final}}{\text{Massa Seca Inicial}} \times 100 \quad (2)$$

3.2.6 Avaliação da biocompatibilidade

A avaliação da biocompatibilidade de um material é uma etapa fundamental, especialmente se for pressuposto a sua eventual interação com o corpo humano, como é o caso das membranas produzidas no presente estudo. A biocompatibilidade é avaliada de acordo com as características do material, desde o formato, porosidade, esterilização do material até aos tipos de elementos químicos presentes no mesmo.

Como as membranas vão estar em contacto com fluidos fisiológicos então é essencial que não causem reações adversas no organismo.

A avaliação da biocompatibilidade de todas as membranas foi realizada em laboratório da Universidade da Beira Interior (UBI), de acordo com o procedimento descrito na norma ISO 10993-5:2009 - *Biological Evaluation of Medical Devices — Part 5: Tests for in Vitro Cytotoxicity*, 2009.

Para a determinação da citocompatibilidade das membranas eletrofiadas foram realizados testes em culturas de fibroblastos da derme (NHDF, *Normal Human Dermal Fibroblasts*), recorrendo ao ensaio de resazurina (Melo et al., 2022; Pontinha et al., 2023). O meio de cultura de NHDF foi constituído por DMEM-F12 com suplementações de soro bovino fetal (FBS (10% (v/v)) e penicilina/estreptomicina (1% (v/v)), e as células foram deixadas crescer em frascos-T de 75 cm² numa incubadora, com atmosfera húmida (37 °C, 5% CO₂).

Para realizar os ensaios, os fibroblastos foram colhidos e preparou-se uma cultura em placas de 96 poços com densidade celular específica de acordo com o tempo total de incubação com as membranas Tipo I e Tipo II, de maneira a diminuir qualquer possibilidade de morte celular devido à confluência. Assim, a densidade celular inicial utilizada para os fibroblastos incubados durante 1, 3 e 7 dias com as membranas eletrofiadas Tipo I e Tipo II foi de 15 000, 8 000 e 1 500 células/poço, respetivamente.

Passadas 24 h, o meio de cultura foi retirado e as células foram incubadas com as membranas (com tamanhos abaixo de 10% da área do poço), acompanhadas de meio de cultura fresco, no mesmo período de dias referido.

Em seguida, as membranas foram removidas, sendo os fibroblastos incubados com resazurina (10% (v/v), em meio de cultura fresco) durante 4 h no escuro (37 °C, 5% CO₂).

Finalmente, a viabilidade das células foi determinada avaliando a fluorescência da resazurina, com um comprimento de onda de excitação e de emissão de 560 nm e 590 nm, respetivamente (utilizando o espectrofluorímetro Spectramax Gemini EM). O controlo negativo (K⁻) foi constituído pelos fibroblastos incubados apenas com

meio de cultura e o controlo positivo (K^+) com as mesmas células incubadas com etanol (70% (v/v)).

Antes da etapa de incubação da resazurina, o crescimento/morfologia das células foi observado num microscópio de luz invertida Olympus CX41 (Tóquio, Japão) equipado com uma câmara digital Olympus SP-500 UZ.

3.2.7 Estudos de libertação do fármaco

O perfil de libertação do fármaco foi avaliado para as membranas assimétricas, designadas Tipo III, pois apenas nestas foi incorporado o diacetato de clorexidina (CHX).

Os testes de libertação foram realizados durante um período de 16 dias, em triplicado. Primeiramente, a membrana assimétrica carregada com o fármaco foi cortada em três fragmentos de 16 cm² (4×4 cm) e, em seguida, cada fragmento foi colocado em tubos de *Falcon* onde foram adicionados 15 mL de água Milli-Q.

Ao longo do período de libertação, a quantificação do fármaco ocorreu em cinco momentos (2^o, 3^o, 6^o, 10^o e 16^o dias). Nestes mesmos dias, cada uma das três membranas foi transferida para um novo tubo de *Falcon* com meio limpo.

A quantificação de CHX foi feita através da leitura da absorvância de uma amostra de meio, num espetrofotómetro UV-visível. O equipamento utilizado foi o espetrofotómetro P9 *Double Beam UV-Visible Spectrophotometer* (Avantor®, USA). As leituras foram realizadas num comprimento de onda de 254 nm (comprimento de onda que corresponde à absorvância máxima do CHX) e para o “branco” foi utilizada água Milli-Q. A concentração de CHX foi calculada através de uma curva de calibração, absorvância *vs* concentração, que se encontra no Anexo 1.

Sempre que as concentrações de CHX não se inseriam na gama de concentrações da curva de calibração, foram realizadas diluições previamente à medição da absorvância.

Para a obtenção da percentagem libertada de fármaco, em cada momento de quantificação, foram utilizadas as equações 3 e 4. Com recurso à equação 3, é possível calcular a massa de fármaco presente na membrana Tipo III, tendo em consideração a fração do fármaco incorporada na solução para a preparação desta membrana.

$$\text{Massa Inicial CHX} = \text{Massa Membrana} \times \text{Fração CHX na Membrana} \quad (3)$$

A concentração de fármaco em água Milli-Q, calculada pela utilização do espetrofotómetro no mesmo comprimento de onda, permite obter a massa de fármaco final libertada. Com estes dados é então possível calcular a percentagem libertada de fármaco em cada momento de quantificação a partir da equação 4.

$$\text{Libertação de Fármaco (\%)} = \frac{\text{Massa Final CHX}}{\text{Massa Inicial CHX}} \times 100 \quad (4)$$

Com os valores da libertação de fármaco obtidos para os intervalos de tempo mencionados foi possível construir o perfil de libertação acumulado de CHX em função do tempo para a membrana assimétrica (Tipo III).

3.2.8 Atividade antimicrobiana

A capacidade antibacteriana das membranas estudadas foi avaliada em *Escherichia coli* (*E. coli*; gram-negativo) e *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*; gram-positivo), pelo método de difusão em ágar (Lima-Sousa et al., 2020).

Para tal, as bactérias (1×10^8 UFC/mL; 0,2 mL de meio bacteriano) foram dispersas em placas de ágar. Posteriormente, as membranas Tipo I, Tipo II e Tipo III foram colocadas em contacto com as bactérias nas placas de ágar por 24 horas. Por fim, os halos de inibição ao redor das membranas foram fotografados e seus diâmetros medidos utilizando o *software* ImageJ (*National Institutes of Health*).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste capítulo encontram-se descritos e discutidos os resultados obtidos pela caracterização das diferentes membranas eletrofiadas, Tipo I, Tipo II e Tipo III.

4.1 Caracterização das membranas

4.1.1 Espectroscopia de infravermelhos por transformada de Fourier com reflexão total atenuada (FTIR-ATR)

A espectroscopia de infravermelhos é utilizada para identificar e confirmar a presença de grupos químicos de polímeros. Se existir uma interação química na amostra analisada, esta é identificada por um pico no gráfico resultante.

Na Figura 10 encontram-se representados os espectros das membranas Tipo I e Tipo II obtidas por *electrospinning*. De notar que a membrana Tipo I é constituída apenas por PCL e a membrana Tipo II por uma mistura de PCL e ACE.

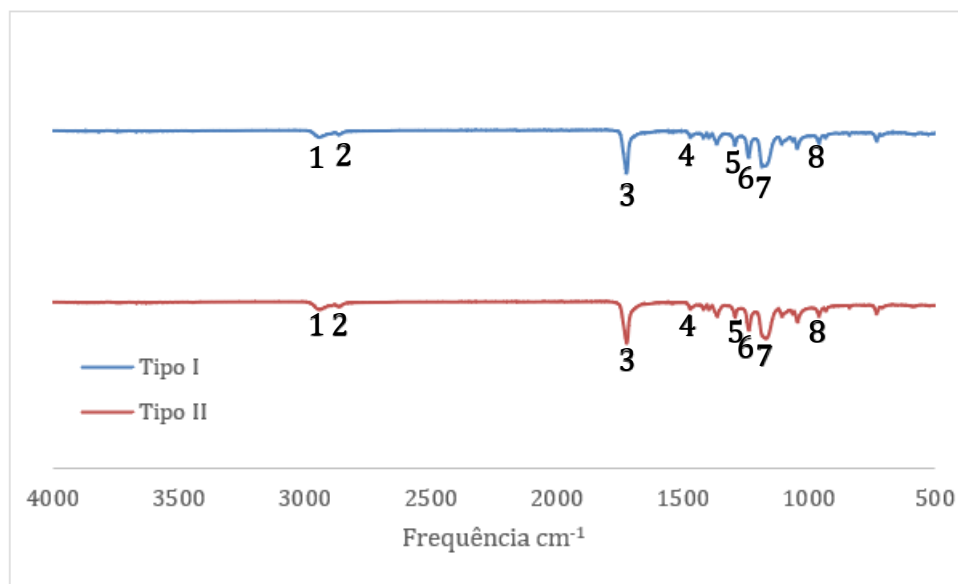


Figura 10 – Espectros FTIR-ATR das membranas eletrofiadas Tipo I e Tipo II.

Observando os espectros verifica-se que ambos são bastante similares, sendo então necessário identificar as frequências características dos grupos químicos existentes nos polímeros constituintes das membranas para que se confirme a sua presença.

Na Tabela 2 estão listadas as frequências dos picos registados em ambos os espectros, assim como os grupos químicos correspondentes. Segue-se também uma análise das frequências referidas na literatura dos polímeros utilizados e respetiva comparação com os dados obtidos.

Tabela 2 - Valores das frequências e respetivos grupos químicos observados nos espetros da análise FTIR-ATR para as membranas Tipo I e Tipo II.

Pontos	1	2	3	4	5	6	7	8
Frequência Membrana Tipo I (cm ⁻¹)	2944	2866	1724	1471	1294	1240	1172	961
Frequência Membrana Tipo II (cm ⁻¹)	2943	2867	1724	1471	1294	1239	1171	961
Grupo Químico	CH ₂	CH ₂	C=O	CH ₂	C-O C-C	C-O-C	C-O C-C	C-H

As frequências 1 e 2, são relativas ao estiramento assimétrico e simétrico de CH₂, respetivamente; o ponto 3 ao estiramento C=O carbonilo; o ponto 4 à deformação CH₂; o ponto 5 ao estiramento C-O e C-C em fase cristalina; o ponto 6 ao estiramento assimétrico da ligação C-O-C; o ponto 7 ao estiramento C-O e C-C em fase amorfa; e por fim o ponto 8 que representa a deformação externa C-H.

De acordo com a literatura (Ali et al., 2014), as bandas resultantes de ambos os espetros identificam a presença de PCL. Contudo, em estudos de FTIR-ATR para membranas com ACE, são normalmente registados: a banda correspondente à função carbonilo (C=O), a banda atribuída à ligação C-O-C e a banda correspondente à elongação assimétrica do grupo COO a 1231 cm⁻¹. Assim, verifica-se que as bandas típicas do ACE são sobreponíveis às existentes na PCL. Mais ainda, e uma vez que a PCL se encontra numa massa significativamente superior à de ACE na mistura polimérica é compreensível que sejam detetadas as bandas típicas dos polímeros tornando os espetros similares.

4.1.2 Análise termogravimétrica

Para se estudar a estabilidade térmica e o comportamento de materiais poliméricos em função da temperatura foram realizados ensaios termogravimétricos.

As curvas termogravimétricas apresentadas nesta secção relacionam a variação de massa de uma membrana à medida que é exposta a aumentos graduais de temperatura.

Normalmente, em análise termogravimétrica, é possível verificar pequenas perdas de massa nas amostras até se atingir a temperatura de 100 °C, sendo esta perda associada à desidratação das amostras ou à eliminação de moléculas residuais de baixo peso molecular. A PCL é um polímero hidrofóbico, sendo por isso de esperar que não sejam observadas perdas de massa significativas nesta gama de temperatura.

Na Figura 11 encontra-se representada a curva termogravimétrica da membrana Tipo I, constituída apenas por PCL. De acordo com este registo, é possível analisar o comportamento deste polímero quando submetido a elevadas temperaturas.

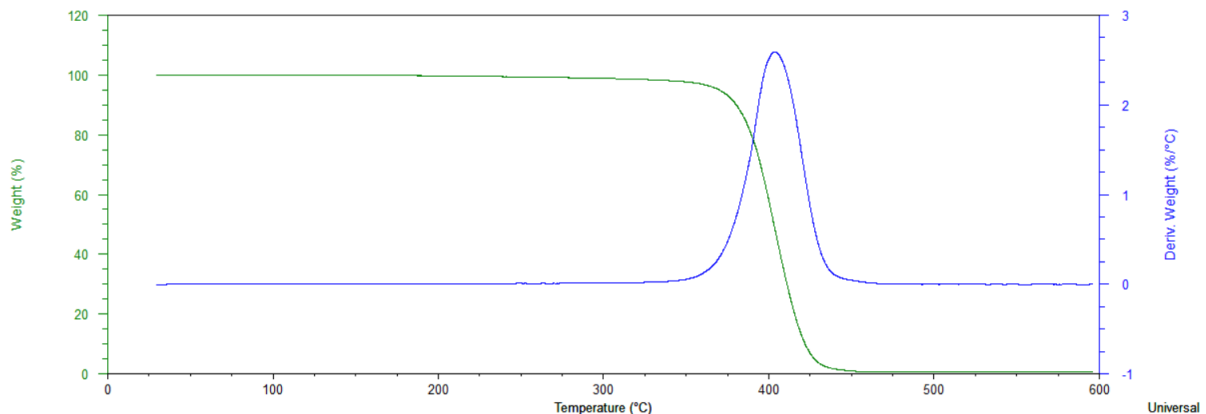


Figura 11 – Curva termogravimétrica de uma membrana Tipo I.

Inicialmente, a massa da membrana não sofre alterações significativas, porém, quando se atinge a temperatura de 365 °C parece ter início uma lenta perda de massa do *scaffold* que se mantém até se atingir a temperatura de 375 °C. Esta temperatura é crítica para o polímero, pois é iniciada a sua etapa de degradação até se atingir os 450 °C, temperatura esta que corresponde à degradação total da membrana, atingindo-se uma massa de aproximadamente zero. Ou seja, é verificada uma decomposição completa do material que ocorre numa só etapa.

Na Figura 12 está apresentada a curva termogravimétrica relativa à membrana Tipo II, constituída por PCL e ACE.

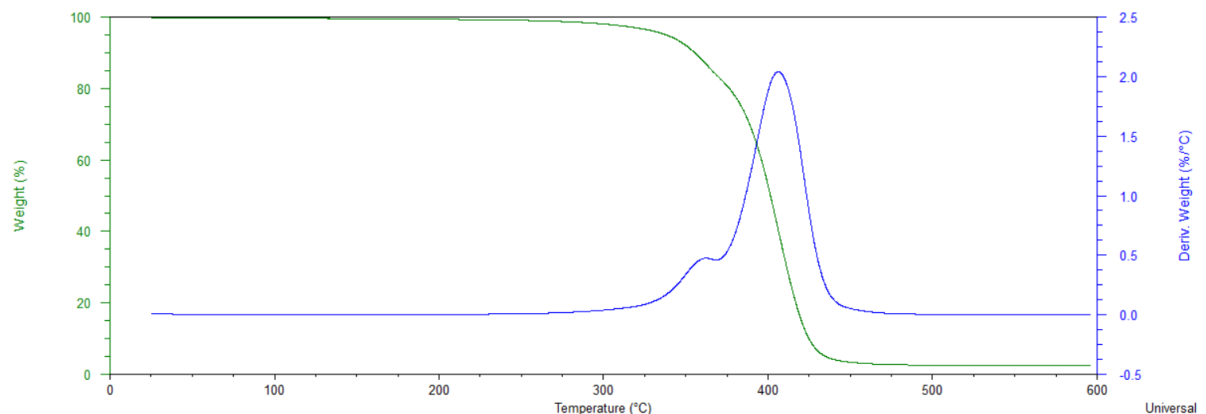


Figura 12 - Curva termogravimétrica de uma membrana Tipo II.

Sendo o ACE um polímero de origem natural, a sua inclusão na composição das fibras das membranas vai levar a um aumento da instabilidade térmica, ou seja, a um acelerar da taxa de degradação da membrana com a temperatura. Este facto pode ser atribuído à pirólise parcial da membrana devido à quebra das ligações carbonilo e carboxílica da glicose. Assim, verifica-se que, contrariamente ao caso das membranas de PCL, a degradação da amostra se dá em duas etapas (representadas por duas inflexões da curva). A primeira etapa de degradação tem o seu término pelos 375 °C,

e que corresponderá à degradação do ACE ocorrendo em contínuo a degradação da PCL. De acordo com a literatura (Benahmed et al., 2022), a temperatura normal de degradação do ACE é de 290 °C, mas, observando o termograma da Figura 12 verifica-se que, no presente estudo, este valor é superior, provavelmente devido à sua mistura física com a PCL, mais estável termicamente.

4.1.3 Ângulos de contacto dinâmicos

Após a análise dos dados obtidos dos ângulos de contacto das membranas Tipo I e Tipo II, estes foram tratados e determinaram-se os respetivos perfis demonstrados na Figura 13.

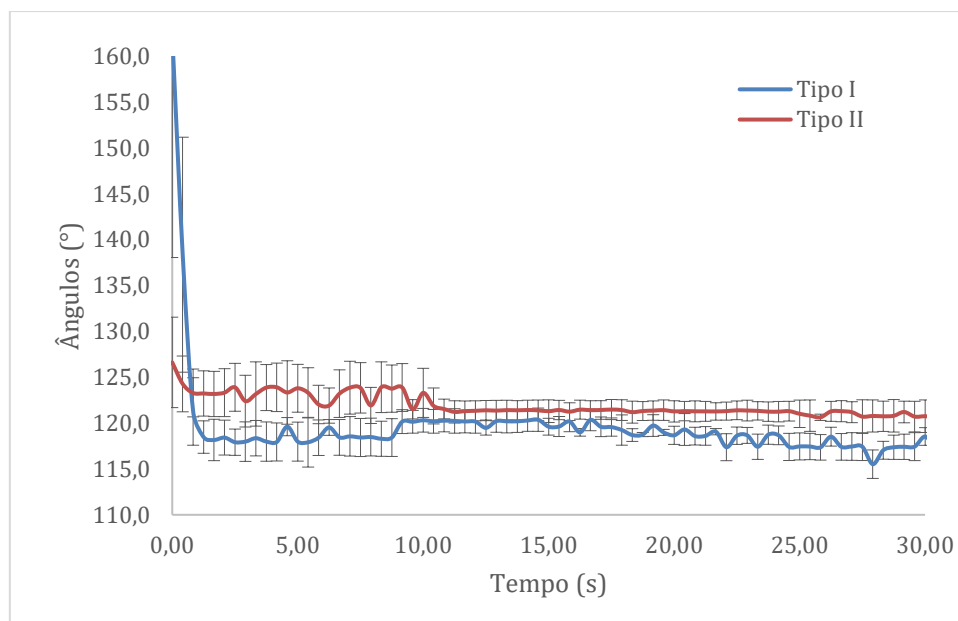


Figura 13 - Ângulos de contacto dinâmicos das membranas Tipo I e Tipo II.

A primeira membrana analisada, formada apenas por fibras de PCL, apresenta um ângulo de contacto médio de 117,5°, comparativamente, a segunda membrana, constituída por fibras de PCL e ACE apresenta um ângulo de contacto médio de 121°. Ambos os valores se encontram entre o intervalo de 90° e 150° o que comprova o carácter hidrofóbico de ambas as membranas. Devido à reduzida área de contacto entre a gota e a superfície da membrana, a gota apresenta um formato esférico daí serem obtidos ângulos elevados ao longo do tempo.

Considerando que se pretendem usar membranas assimétricas, a superfície da membrana apenas composta por PCL, quando aplicada no ferimento, ficará em contacto com o ambiente, protegendo o tecido biológico. Assim, será vantajoso que esta apresente um carácter hidrofóbico, com reduzida molhabilidade, de maneira a evitar, não só a libertação de fluidos e a desidratação da zona afetada, mas também, a contaminação do ferimento por entrada de fluidos externos. A membrana constituída por PCL e ACE deverá ter um carácter mais hidrofílico pois estará em contacto com o ferimento e seus exsudatos. Contudo, apesar do ACE ter natureza

hidrofílica, a sua mistura com a PCL originou uma membrana com um ligeiro aumento do valor do ângulo de contacto.

Deve-se, porém, ter em consideração erros experimentais ocorridos durante a análise, tais como, o início da gravação após a dispersão da gota na membrana, assim como a existência de irregularidades superficiais nas membranas. No caso de membranas preparadas por *electrospinning*, e considerando a distribuição aleatória de fibras e consequentemente de porosidade, é comum que os resultados da medição de ângulos de contacto sejam associados a alguma incerteza. Por exemplo, a queda da gota de água pode ocorrer em zonas irregulares da superfície, levando a alguma variação dos valores que acabam por não ser representativos da totalidade da área da amostra.

4.1.4 Capacidade de absorção de água (Swelling)

Para testar a capacidade de absorção das membranas, estas foram expostas a uma atmosfera húmida. Dado que estes *scaffolds* são constituídos por uma rede polimérica que lhes fornece um comportamento elástico e porosidade, então é expectável que haja um aumento dos seus volumes. A absorção da água acaba por criar uma tensão entre as cadeias poliméricas e impede a sua dissolução.

O rácio de absorção é uma propriedade mecânica, que se refere à alteração do volume das membranas quando absorvem um solvente, neste caso a água.

Na Tabela 3, Tabela 4 e Tabela 5 encontram-se registados os rácios de absorção de água das membranas em função do tempo a que estiveram expostas à atmosfera húmida. Os resultados são apresentados na forma de valor médio \pm desvio padrão, para ensaios feitos em triplicado.

Tabela 3 - Valores percentuais do rácio de absorção lidos para os diferentes tipos de membranas no segundo dia.

Membrana	Rácio de absorção (%)
Tipo I	2,4518 \pm 1,8260
Tipo II	1,8868 \pm 0,8894
Tipo III	7,6520 \pm 0,4495

Após 72 horas verificou-se que a membrana Tipo III apresenta um maior rácio de absorção de água relativamente às restantes, seguida da membrana Tipo I e por fim da Tipo II.

Tabela 4 - Valores percentuais do rácio de absorção lidos para os diferentes tipos de membranas o oitavo dia.

Membrana	Rácio de absorção (%)
Tipo I	0,0251 \pm 0,4580
Tipo II	2,3363 \pm 1,0086
Tipo III	0,7371 \pm 0,2048

Após 168 horas já é a membrana Tipo II que apresenta um maior rácio de absorção, seguida da Tipo III e Tipo I. É de esperar que os rácios de absorção diminuam ao longo do tempo devido ao aumento da saturação das membranas.

Tabela 5 - Valores percentuais do rácio de absorção lidos para os diferentes tipos de membranas no nono dia.

Membrana	Rácio de absorção (%)
Tipo I	0,5592 ± 0,4322
Tipo II	0,3058 ± 0,4325
Tipo III	0,1488 ± 0,2104

Ao final de nove dias verifica-se que os rácios de absorção das membranas são pouco significativos uma vez que já se encontram saturadas com água.

É possível observar que, a membrana assimétrica Tipo III, composta por uma camada de PCL e outra de PCL, ACE e CHX é capaz de absorver mais água do que as restantes membranas. Esta ocorrência verifica-se especialmente durante o segundo dia, e indica que esta é capaz de absorver um maior volume de água num menor espaço de tempo em comparação com as restantes.

De acordo com os dados é possível concluir que as membranas são relativamente estáveis e são capazes de estar expostas a uma atmosfera húmida sem que sofram um inchaço significativo. Isto deve-se à possibilidade de as membranas possuírem um baixo grau de porosidade, esta característica acaba por restringir a capacidade de absorção, visto haver menos espaço livre para permitir a entrada de água.

4.1.5 Estudos de perda de massa

Com o objetivo de avaliar a perda de massa dos *scaffolds* produzidos, realizou-se um estudo onde foram colocadas amostras das membranas em água Milli-Q durante 9 dias.

Os dados obtidos deste estudo encontram-se apresentados na Tabela 6, na forma de valor médio ± desvio padrão, para ensaios feitos em triplicado. Valores de perda de massa negativos indicam que a membrana analisada não perdeu material comparativamente com a sua massa original e podem refletir apenas erros experimentais, valores positivos já referem o contrário, que houve uma perda de material.

Tabela 6 - Valores percentuais de perda de massa lidos para os diferentes tipos de membranas após 9 dias.

Membrana	Perda de massa (%)
Tipo I	-0,2847 ± 0,9340
Tipo II	-1,1437 ± 0,8130
Tipo III	2,9512 ± 0,7192

De acordo com os dados indicados na Tabela 6, verifica-se claramente que, após nove dias, apenas a membrana Tipo III perdeu material. O facto de ser uma membrana com uma constituição assimétrica poderá estar sujeita a uma maior degradação o que indica também que a membrana possui uma menor resistência quando submersa em água por um longo período (9 dias).

Em suma, o *scaffold* Tipo III possui a menor estabilidade e resistência, ainda assim é capaz de suportar ambientes húmidos que simulam, no limite, as condições de uma ferida.

4.1.6 Avaliação da biocompatibilidade

A avaliação da biocompatibilidade foi realizada na Universidade da Beira Interior com o objetivo de estudar a viabilidade celular dos diferentes tipos de *scaffolds*, e, para esse fim, foram colocados fibroblastos na superfície das membranas. Foram cultivados e incubados fibroblastos por períodos de 1, 3 e 7 dias. Na Figura 14 é representada a resposta das células na presença das membranas Tipo I (PCL) e Tipo II (PCL e ACE).

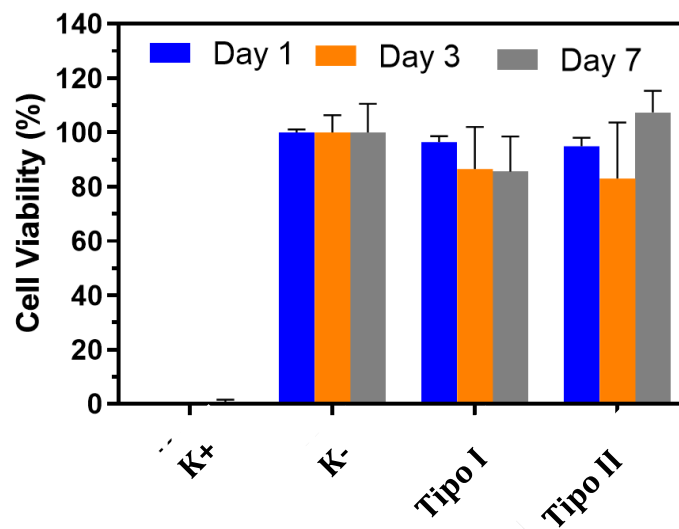


Figura 14 – Valores da viabilidade celular após 1, 3 e 7 dias das membranas Tipo I e Tipo II, K⁺ (controlo positivo, com células mortas) e, K⁻, (controlo negativo com a totalidade das células viáveis).

Quando se comparam as membranas Tipo I e Tipo II entre si e com o K⁻, verifica-se que não existe uma diferença significativa entre os valores de viabilidade celular. Estes são, para qualquer tempo de incubação, acima de 80% tanto para as membranas Tipo I como para as membranas Tipo II, indicando que as mesmas são biocompatíveis e não citotóxicas.

Podemos assim concluir que as membranas preparadas podem ser utilizadas como biomateriais e aplicadas em contacto com tecidos biológicos não induzindo morte celular.

4.1.7 Estudos de libertação do fármaco

A libertação do fármaco, diacetato de clorexidina, a partir de uma membrana assimétrica (Tipo III) ocorreu em água Milli-Q, durante um período de quinze dias (cerca de 350 horas). O perfil de libertação encontra-se representado na Figura 15.

Tendo em consideração a absorvância (254 nm) e a curva de calibração obtida (Anexo 1), calculou-se a percentagem de fármaco libertado durante o período indicado (Figura 15).

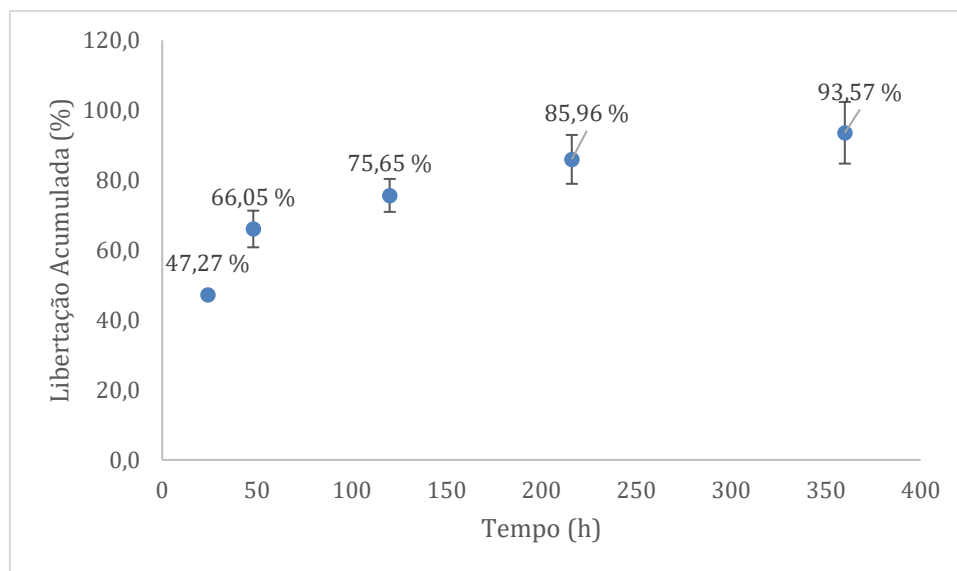


Figura 15 - Perfil de libertação do fármaco diacetato de clorexidina em água Milli-Q.

Da análise do perfil é possível constatar uma rápida libertação do diacetato de clorexidina, especialmente nas primeiras 24 horas (cerca de metade da quantidade de fármaco incorporado na membrana é libertado no primeiro dia). A partir daí, o fármaco continua a ser libertado progressivamente ao longo do tempo, com uma taxa reduzida comparativamente ao primeiro dia, até perfazer os quinze dias do estudo, onde atinge uma libertação de cerca de 93% de todo o fármaco contido na membrana.

O estudo de libertação levado a cabo no presente trabalho permitiu concluir que o diacetato de clorexidina pode ser incorporado durante a preparação de membranas assimétricas por *electrospinning* e pode ser libertado a partir destes mesmos substratos.

A elevada taxa de libertação indicia que, apesar do fármaco ser misturado com os polímeros durante a preparação da membrana, a molécula acaba por não se ligar quimicamente à PCL ou ao ACE, daí a facilidade da sua libertação num curto espaço de tempo.

4.1.8 Atividade antimicrobiana

Foi avaliada a atividade antimicrobiana das membranas Tipo I, Tipo II e Tipo III, com base no método de difusão em ágar, recorrendo tanto a bactérias Gram-

negativas (*E. coli*) como Gram-positivas (*S. aureus*), de forma a observar-se a sua atividade inibitória.

Os resultados dos testes antimicrobianos realizados com a bactéria *E. coli* são mostrados na Figura 16.

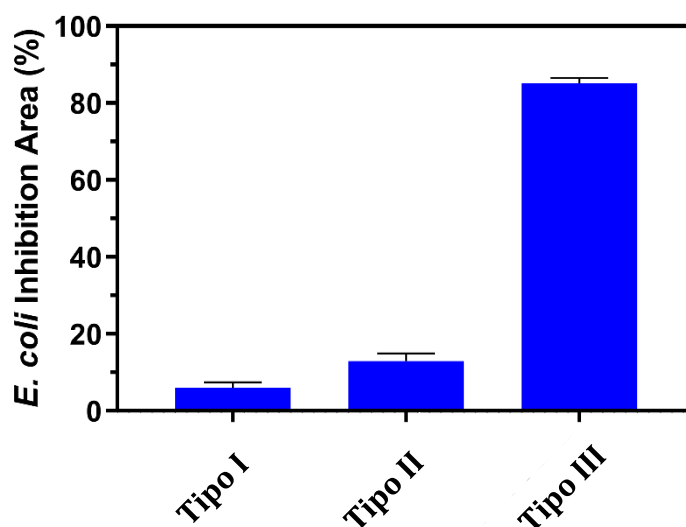


Figura 16 – Relação entre a área de inibição bacteriana média com as diferentes membranas para a bactéria *E. coli*.

As membranas constituídas apenas por PCL (Tipo I) não apresentaram atividade significativa contra a bactéria testada, com uma percentagem de área de inibição média de $6,0618 \pm 1,1302$ %. A membrana compósita de PCL e ACE (Tipo II) por seu lado apresenta uma percentagem de área inibitória superior à da membrana Tipo I, de $12,9463 \pm 1,6622$ %. Por fim, a membrana que possui o fármaco incorporado (Tipo III) já apresenta um halo inibitório significativo com um valor de área percentual de $85,2046 \pm 1,0833$ %.

Os resultados dos testes antimicrobianos para *S. aureus*, encontram-se também na Figura 17. A membrana Tipo I, mais uma vez não apresentou atividade significativa contra as bactérias do controlo positivo, possui uma percentagem de área de inibição média de $7,8739 \pm 5,2207$ %. Em relação à membrana Tipo II observa-se uma zona inibitória superior à da membrana anterior, $16,0059 \pm 4,7535$ %. Por último, a membrana Tipo III que possui o fármaco já apresenta uma área inibidora relativamente elevada de $85,4365 \pm 3,5583$ %, comparando com as restantes membranas que não continham fármaco na sua matriz.

A Figura 17 mostra os halos inibitórios exibidos por cada uma das membranas (Tipo I, II e III) expostas à atividade microbiana das bactérias, *E. coli* e *S. aureus*, em placas de ágar.

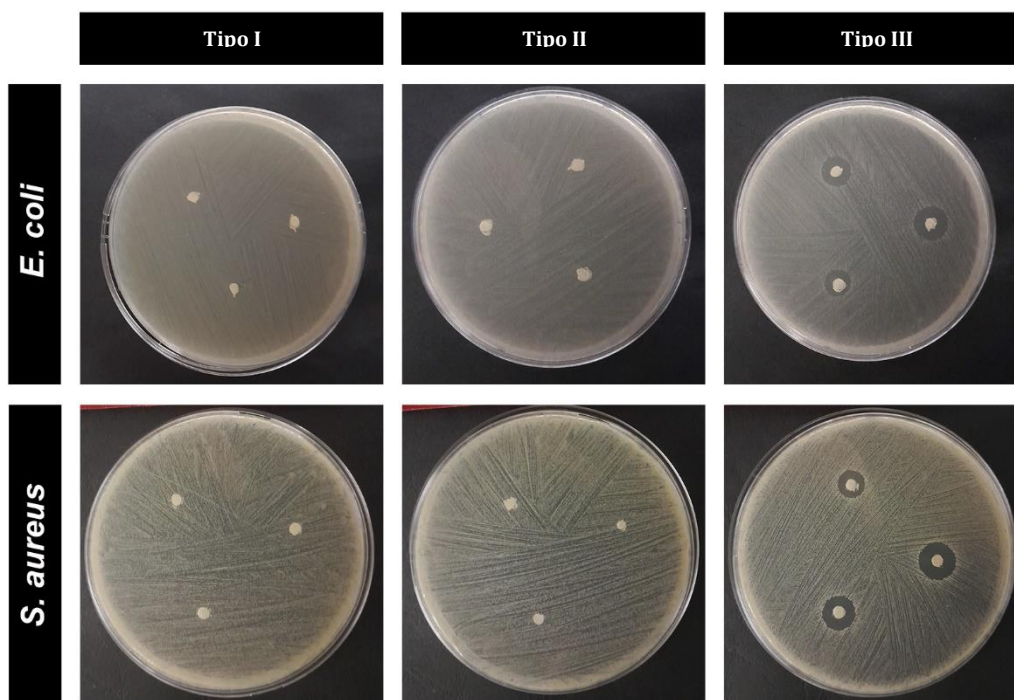


Figura 17 - Fotografias do desempenho antibacteriano das membranas Tipo I, Tipo II e Tipo III com representação dos halos inibitórios.

Com base nos resultados obtidos com a técnica de difusão em ágar, pode concluir-se que nenhuma das membranas poliméricas apresenta um efeito inibitório significativo tanto para a *E. coli* como para a *S. aureus*, contrastando, como esperado, com a membrana Tipo III que incorpora um fármaco antimicrobiano. Assim, concluiu-se que as membranas Tipo III, com o fármaco CHX incorporado, possuem a capacidade de inibir com sucesso a colonização de bactérias em feridas e, conseqüentemente, o fármaco incorporado pode ser libertado de forma eficaz a partir do suporte polimérico.

5 CONCLUSÃO

De acordo com a investigação realizada, o polímero PCL demonstrou ser fundamental na produção de membranas eletrofiadas estáveis. Estas membranas são estruturas cujo objetivo é a regeneração e melhoramento de tecidos, e detêm a capacidade de proteger a área afetada e até a possibilidade de libertar fármacos para auxiliar a regeneração da mesma. Após os estudos realizados verificou-se que estas membranas possuem as características necessárias para a sua utilização em aplicações biomédicas.

Os espectros obtidos na análise de FTIR-ATR comprovaram a presença de ambos os polímeros utilizados, a policaprolactona e o acetato de celulose, devido à presença das suas bandas características.

De acordo com os termogramas obtidos, relativos à análise termogravimétrica, concluiu-se que o perfil de degradação das membranas é estável quando submetidas a temperaturas elevadas.

Nos testes de ângulo de contacto, verificou-se que a todas as membranas analisadas eram hidrofóbicas, independentemente da sua constituição.

No estudo das propriedades de absorção das membranas, concluiu-se que, todas as membranas são estáveis e possuem um rácio de absorção relativamente baixo.

Os ensaios de perda de massa demonstraram que a PCL fornece às membranas propriedades que lhes permitem não se degradar facilmente, ou seja, não existe perda de material significativo.

Relativamente aos estudos da atividade antimicrobiana, observou-se que a membrana que continha o fármaco, diacetato de clorexidina, possuía as propriedades necessárias para inibir com sucesso a colonização de bactérias.

Nos testes de biocompatibilidade verificou-se que os fibroblastos proliferaram quando em contacto com as diferentes membranas, concluindo-se que eram estas eram biocompatíveis.

Em relação aos estudos de libertação do diacetato de clorexidina, destacou-se uma maior libertação nas primeiras 48 horas, seguido de uma diminuição da sua taxa de libertação até que se obteve uma libertação média final de 93 %. Este resultado indica que a membrana assimétrica tem as propriedades essenciais para permitir a transferência do fármaco para uma região ferida.

Posso concluir que a produção de membranas de estrutura assimétrica, constituídas por polímeros sintéticos e naturais, PCL e ACE, com o objetivo da libertação de um fármaco para auxiliar a regeneração de tecido são promissoras no ramo da engenharia de tecidos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Ali, S., Khatri, Z., Oh, K. W., Kim, I. S., & Kim, S. H. (2014). Preparation and characterization of hybrid polycaprolactone/cellulose ultrafine fibers via electrospinning. *Macromolecular Research*, 22(5), 562–568. <https://doi.org/10.1007/S13233-014-2078-X/METRICS>
- Arthanareeswaran, G., Thanikaivelan, P., & Raajenthiren, M. (2008). Fabrication and characterization of CA/PSf/SPEEK ternary blend ultrafiltration membranes. *Industrial and Engineering Chemistry Research*, 47(5), 1488–1494. <https://doi.org/10.1021/IE070810K/ASSET/IMAGES/LARGE/IE070810KF0005.JPEG>
- Bartnikowski, M., Dargaville, T. R., Ivanovski, S., & Hutmacher, D. W. (2019). Degradation mechanisms of polycaprolactone in the context of chemistry, geometry and environment. *Progress in Polymer Science*, 96, 1–20. <https://doi.org/10.1016/J.PROGPOLYMSCI.2019.05.004>
- Benahmed, A., Azzaoui, K., El Idrissi, A., Belkheir, H., Hassane, S. O. S., Touzani, R., & Rhazi, L. (2022). Cellulose Acetate-g-Polycaprolactone Copolymerization Using Diisocyanate Intermediates and the Effect of Polymer Chain Length on Surface, Thermal, and Antibacterial Properties. *Molecules*, 27(4). <https://doi.org/10.3390/MOLECULES27041408>
- Bhardwaj, N., & Kundu, S. C. (2010a). Electrospinning: A fascinating fiber fabrication technique. *Biotechnology Advances*, 28(3), 325–347. <https://doi.org/10.1016/J.BIOTECHADV.2010.01.004>
- Bhardwaj, N., & Kundu, S. C. (2010b). Electrospinning: A fascinating fiber fabrication technique. *Biotechnology Advances*, 28(3), 325–347. <https://doi.org/10.1016/J.BIOTECHADV.2010.01.004>
- Calori, I. R., Braga, G., de Jesus, P. da C. C., Bi, H., & Tedesco, A. C. (2020). Polymer scaffolds as drug delivery systems. *European Polymer Journal*, 129, 109621. <https://doi.org/10.1016/J.EURPOLYMJ.2020.109621>
- Chouhan, D., Dey, N., Bhardwaj, N., & Mandal, B. B. (2019). Emerging and innovative approaches for wound healing and skin regeneration: Current status and advances. *Biomaterials*, 216, 119267. <https://doi.org/10.1016/J.BIOMATERIALS.2019.119267>
- Chouhan, D., & Mandal, B. B. (2020). Silk biomaterials in wound healing and skin regeneration therapeutics: From bench to bedside. *Acta Biomaterialia*, 103, 24–51. <https://doi.org/10.1016/J.ACTBIO.2019.11.050>
- Cramariuc, B., Cramariuc, R., Scarlet, R., Manea, L. R., Lupu, I. G., & Cramariuc, O. (2013). Fiber diameter in electrospinning process. *Journal of Electrostatics*, 71(3), 189–198. <https://doi.org/10.1016/J.ELSTAT.2012.12.018>

- Dash, A. K., & Cudworth, G. C. (1998). Therapeutic applications of implantable drug delivery systems. *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods*, 40(1), 1–12. [https://doi.org/10.1016/S1056-8719\(98\)00027-6](https://doi.org/10.1016/S1056-8719(98)00027-6)
- Dhandayuthapani, B., Yoshida, Y., Maekawa, T., & Kumar, D. S. (2011). Polymeric scaffolds in tissue engineering application: A review. *International Journal of Polymer Science*, 2011. <https://doi.org/10.1155/2011/290602>
- Dwivedi, R., Kumar, S., Pandey, R., Mahajan, A., Nandana, D., Katti, D. S., & Mehrotra, D. (2020a). Polycaprolactone as biomaterial for bone scaffolds: Review of literature. *Journal of Oral Biology and Craniofacial Research*, 10(1), 381–388. <https://doi.org/10.1016/J.JOBCR.2019.10.003>
- Dwivedi, R., Kumar, S., Pandey, R., Mahajan, A., Nandana, D., Katti, D. S., & Mehrotra, D. (2020b). Polycaprolactone as biomaterial for bone scaffolds: Review of literature. *Journal of Oral Biology and Craniofacial Research*, 10(1), 381–388. <https://doi.org/10.1016/J.JOBCR.2019.10.003>
- Festas, A. J., Ramos, A., & Davim, J. P. (2019). Medical devices biomaterials – A review. <https://doi.org/10.1177/1464420719882458>, 234(1), 218–228. <https://doi.org/10.1177/1464420719882458>
- Fuchs, J. R., Nasser, B. A., & Vacanti, J. P. (2001). Tissue engineering: a 21st century solution to surgical reconstruction. *The Annals of Thoracic Surgery*, 72(2), 577–591. [https://doi.org/10.1016/S0003-4975\(01\)02820-X](https://doi.org/10.1016/S0003-4975(01)02820-X)
- Gupta, P., Elkins, C., Long, T. E., & Wilkes, G. L. (2005). Electrospinning of linear homopolymers of poly(methyl methacrylate): exploring relationships between fiber formation, viscosity, molecular weight and concentration in a good solvent. *Polymer*, 46(13), 4799–4810. <https://doi.org/10.1016/J.POLYMER.2005.04.021>
- Haider, A., Haider, S., & Kang, I. K. (2018a). A comprehensive review summarizing the effect of electrospinning parameters and potential applications of nanofibers in biomedical and biotechnology. *Arabian Journal of Chemistry*, 11(8), 1165–1188. <https://doi.org/10.1016/J.ARABJC.2015.11.015>
- Haider, A., Haider, S., & Kang, I. K. (2018b). A comprehensive review summarizing the effect of electrospinning parameters and potential applications of nanofibers in biomedical and biotechnology. *Arabian Journal of Chemistry*, 11(8), 1165–1188. <https://doi.org/10.1016/J.ARABJC.2015.11.015>
- He, Z., Rault, F., Lewandowski, M., Mohsenzadeh, E., & Salaün, F. (2021). Electrospun PVDF Nanofibers for Piezoelectric Applications: A Review of the Influence of Electrospinning Parameters on the β Phase and Crystallinity Enhancement. *Polymers* 2021, Vol. 13, Page 174, 13(2), 174. <https://doi.org/10.3390/POLYM13020174>
- Hosseini, M., & Shafiee, A. (2021). Engineering Bioactive Scaffolds for Skin Regeneration. *Small*, 17(41), 2101384. <https://doi.org/10.1002/SMLL.202101384>

- Huang, Z. M., Zhang, Y. Z., Kotaki, M., & Ramakrishna, S. (2003). A review on polymer nanofibers by electrospinning and their applications in nanocomposites. *Composites Science and Technology*, 63(15), 2223–2253. [https://doi.org/10.1016/S0266-3538\(03\)00178-7](https://doi.org/10.1016/S0266-3538(03)00178-7)
- Ibrahim, H. M., & Klingner, A. (2020). A review on electrospun polymeric nanofibers: Production parameters and potential applications. *Polymer Testing*, 90, 106647. <https://doi.org/10.1016/J.POLYMERTESTING.2020.106647>
- Ilyas, R. A., Zuhri, M. Y. M., Norrrahim, M. N. F., Misenan, M. S. M., Jenol, M. A., Samsudin, S. A., Nurazzi, N. M., Asyraf, M. R. M., Supian, A. B. M., Bangar, S. P., Nadlene, R., Sharma, S., & Omran, A. A. B. (2022). Natural Fiber-Reinforced Polycaprolactone Green and Hybrid Biocomposites for Various Advanced Applications. *Polymers 2022, Vol. 14, Page 182, 14(1)*, 182. <https://doi.org/10.3390/POLYM14010182>
- Islam, M. S., Ang, B. C., Andriyana, A., & Afifi, A. M. (2019). A review on fabrication of nanofibers via electrospinning and their applications. *SN Applied Sciences*, 1(10), 1–16. <https://doi.org/10.1007/S42452-019-1288-4/TABLES/1>
- Jo, H., Brito, S., Kwak, B. M., Park, S., Lee, M. G., & Bin, B. H. (2021). Applications of Mesenchymal Stem Cells in Skin Regeneration and Rejuvenation. *International Journal of Molecular Sciences 2021, Vol. 22, Page 2410, 22(5)*, 2410. <https://doi.org/10.3390/IJMS22052410>
- Kulkarni, A., Bambole, V. A., & Mahanwar, P. A. (2010). Electrospinning of Polymers, Their Modeling and Applications. <Http://Dx.Doi.Org/10.1080/03602550903414019>, 49(5), 427–441. <https://doi.org/10.1080/03602550903414019>
- Lannutti, J., Reneker, D., Ma, T., Tomasko, D., & Farson, D. (2007). Electrospinning for tissue engineering scaffolds. *Materials Science and Engineering: C*, 27(3), 504–509. <https://doi.org/10.1016/J.MSEC.2006.05.019>
- Law, K. Y. (2014). Definitions for hydrophilicity, hydrophobicity, and superhydrophobicity: Getting the basics right. *Journal of Physical Chemistry Letters*, 5(4), 686–688. https://doi.org/10.1021/JZ402762H/SUPPL_FILE/JZ402762H_LIVESLIDES.MP4
- Lima-Sousa, R., de Melo-Diogo, D., Alves, C. G., Cabral, C. S. D., Miguel, S. P., Mendonça, A. G., & Correia, I. J. (2020). Injectable in situ forming thermo-responsive graphene based hydrogels for cancer chemo-photothermal therapy and NIR light-enhanced antibacterial applications. *Materials Science and Engineering: C*, 117, 111294. <https://doi.org/10.1016/J.MSEC.2020.111294>
- Liu, C., Xia, Z., & Czernuszka, J. T. (2007). Design and development of three-dimensional scaffolds for tissue engineering. *Chemical Engineering Research and Design*, 85(7 A), 1051–1064. <https://doi.org/10.1205/CHERD06196>

- Madni, A., Kousar, R., Naeem, N., & Wahid, F. (2021). Recent advancements in applications of chitosan-based biomaterials for skin tissue engineering. *Journal of Bioresources and Bioproducts*, 6(1), 11–25.
<https://doi.org/10.1016/J.JOBAB.2021.01.002>
- Marcolin, C. (2017). *Electrospinning of biopolymers for regenerative medicine*.
<https://www.politesi.polimi.it/bitstream/10589/132688/1/Tesi%20Marcolin%20rev.pdf>
- Meireles, C. (2007). *UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA INSTITUTO DE QUÍMICA Programa de Pós-Graduação em Química*.
<https://repositorio.ufu.br/bitstream/123456789/17456/1/CSMeirelesDISPRT.pdf>
- Melo, B. L., Lima-Sousa, R., Alves, C. G., Moreira, A. F., Correia, I. J., & de Melo-Diogo, D. (2022). Chitosan-based injectable in situ forming hydrogels containing dopamine-reduced graphene oxide and resveratrol for breast cancer chemophotothermal therapy. *Biochemical Engineering Journal*, 185, 108529.
<https://doi.org/10.1016/J.BEJ.2022.108529>
- Nour, S., Imani, R., Chaudhry, G. R., & Sharifi, A. M. (2021). Skin wound healing assisted by angiogenic targeted tissue engineering: A comprehensive review of bioengineered approaches. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 109(4), 453–478. <https://doi.org/10.1002/JBM.A.37105>
- Nourian Dehkordi, A., Mirahmadi Babaheydari, F., Chehelgerdi, M., & Raeisi Dehkordi, S. (2019). Skin tissue engineering: wound healing based on stem-cell-based therapeutic strategies. *Stem Cell Research & Therapy* 2019 10:1, 10(1), 1–20. <https://doi.org/10.1186/S13287-019-1212-2>
- Pontinha, A. D. R., Moreira, B. B., Melo, B. L., Melo-Diogo, D. de, Correia, I. J., & Alves, P. (2023). Silica Aerogel-Polycaprolactone Scaffolds for Bone Tissue Engineering. *International Journal of Molecular Sciences* 2023, Vol. 24, Page 10128, 24(12), 10128. <https://doi.org/10.3390/IJMS241210128>
- Rahmati, M., Mills, D. K., Urbanska, A. M., Saeb, M. R., Venugopal, J. R., Ramakrishna, S., & Mozafari, M. (2021). Electrospinning for tissue engineering applications. *Progress in Materials Science*, 117, 100721.
<https://doi.org/10.1016/J.PMATSCI.2020.100721>
- Sill, T. J., & von Recum, H. A. (2008a). Electrospinning: Applications in drug delivery and tissue engineering. *Biomaterials*, 29(13), 1989–2006.
<https://doi.org/10.1016/J.BIOMATERIALS.2008.01.011>
- Sill, T. J., & von Recum, H. A. (2008b). Electrospinning: Applications in drug delivery and tissue engineering. *Biomaterials*, 29(13), 1989–2006.
<https://doi.org/10.1016/J.BIOMATERIALS.2008.01.011>
- Sill, T. J., & von Recum, H. A. (2008c). Electrospinning: Applications in drug delivery and tissue engineering. *Biomaterials*, 29(13), 1989–2006.
<https://doi.org/10.1016/J.BIOMATERIALS.2008.01.011>

- Song, R., Murphy, M., Li, C., Ting, K., Soo, C., & Zheng, Z. (2018). Current development of biodegradable polymeric materials for biomedical applications. *Drug Design, Development and Therapy*, *12*, 3117–3145. <https://doi.org/10.2147/DDDT.S165440>
- Sun, H., Hu, C., Zhou, C., Wu, L., Sun, J., Zhou, X., Xing, F., Long, C., Kong, Q., Liang, J., Fan, Y., & Zhang, X. (2020). 3D printing of calcium phosphate scaffolds with controlled release of antibacterial functions for jaw bone repair. *Materials & Design*, *189*, 108540. <https://doi.org/10.1016/J.MATDES.2020.108540>
- Swanson, W. B., Zhang, Z., Xiu, K., Gong, T., Eberle, M., Wang, Z., & Ma, P. X. (2020). Scaffolds with controlled release of pro-mineralization exosomes to promote craniofacial bone healing without cell transplantation. *Acta Biomaterialia*, *118*, 215–232. <https://doi.org/10.1016/J.ACTBIO.2020.09.052>
- Trinca, R. B., Westin, C. B., da Silva, J. A. F., & Moraes, Â. M. (2017a). Electrospun multilayer chitosan scaffolds as potential wound dressings for skin lesions. *European Polymer Journal*, *88*, 161–170. <https://doi.org/10.1016/J.EURPOLYMJ.2017.01.021>
- Trinca, R. B., Westin, C. B., da Silva, J. A. F., & Moraes, Â. M. (2017b). Electrospun multilayer chitosan scaffolds as potential wound dressings for skin lesions. *European Polymer Journal*, *88*, 161–170. <https://doi.org/10.1016/J.EURPOLYMJ.2017.01.021>
- Vacanti, J. P., & Langer, R. (1999). Tissue engineering: The design and fabrication of living replacement devices for surgical reconstruction and transplantation. *Lancet*, *354*(SUPPL.1), 32–34. [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(99\)90247-7](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(99)90247-7)
- Vatanpour, V., Pasaoglu, M. E., Barzegar, H., Teber, O. O., Kaya, R., Bastug, M., Khataee, A., & Koyuncu, I. (2022). Cellulose acetate in fabrication of polymeric membranes: A review. *Chemosphere*, *295*, 133914. <https://doi.org/10.1016/J.CHEMOSPHERE.2022.133914>
- Wsoo, M. A., Shahir, S., Mohd Bohari, S. P., Nayan, N. H. M., & Razak, S. I. A. (2020). A review on the properties of electrospun cellulose acetate and its application in drug delivery systems: A new perspective. *Carbohydrate Research*, *491*, 107978. <https://doi.org/10.1016/J.CARRES.2020.107978>
- Yadav, N., & Hakkarainen, M. (2021). Degradable or not? Cellulose acetate as a model for complicated interplay between structure, environment and degradation. *Chemosphere*, *265*, 128731. <https://doi.org/10.1016/J.CHEMOSPHERE.2020.128731>
- Yu, C. C., Shah, A., Amiri, N., Marcus, C., Nayeem, M. O. G., Bhayadia, A. K., Karami, A., & Dagdeviren, C. (2023). A Conformable Ultrasound Patch for Cavitation-Enhanced Transdermal Cosmeceutical Delivery. *Advanced Materials (Deerfield Beach, Fla.)*, *35*(23). <https://doi.org/10.1002/ADMA.202300066>

Zhang, C., Yuan, X., Wu, L., Han, Y., & Sheng, J. (2005). Study on morphology of electrospun poly(vinyl alcohol) mats. *European Polymer Journal*, 41(3), 423–432. <https://doi.org/10.1016/j.EURPOLYMJ.2004.10.027>

ANEXOS

ANEXO 1– CURVA DE CALIBRAÇÃO

Para ser possível adquirir as concentrações de CHX nos estudos de libertação de fármaco foi necessário, previamente, a obtenção de uma curva de calibração que relaciona a concentração e a absorvância.

Preparou-se uma solução mãe de CHX, de concentração conhecida, e a partir desta, foram realizadas múltiplas diluições. De seguida, num espectrofotómetro, foi calculado a absorvância das mesmas, e, com estes dados, foi possível a construção do gráfico da Figura A.

Esta curva de calibração serve de referência e, permite que, a partir da equação da reta obtida, que se obtenha as concentrações das amostras analisadas.

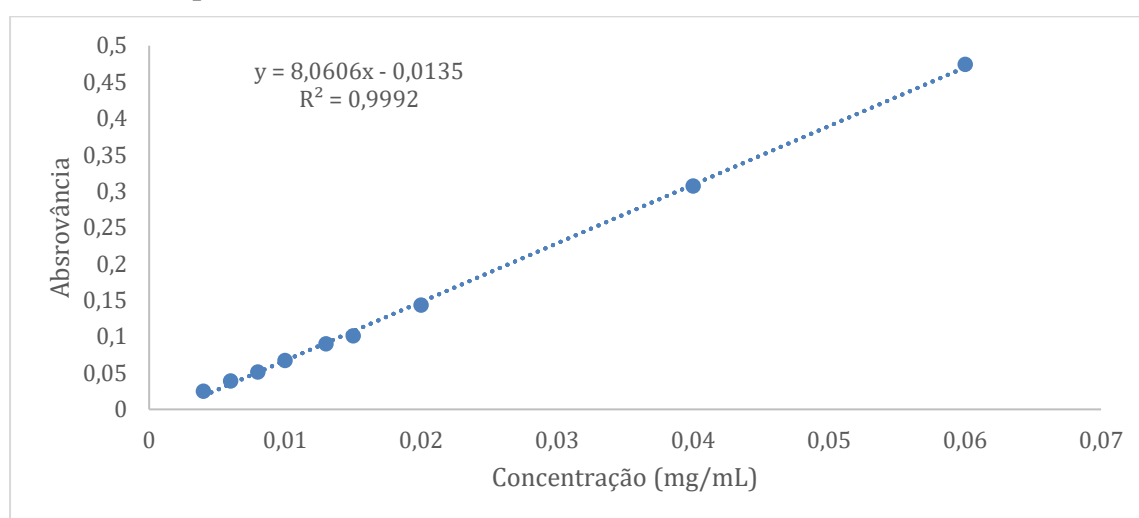


Figura A – Reta de calibração do diacetato de clorexidina (CHX)



**Instituto Superior
de Engenharia**

Politécnico de Coimbra