

Universidade do Minho
Escola de Engenharia

Jerome Bruno Antunes

**Materiais capazes de transportar e libertar
colagenase para o tratamento de lesões cutâneas:
síntese e caracterização**

Dissertação de Mestrado

Mestrado em Química Têxtil

Trabalho efetuado sob a orientação:

Professora Doutora Graça Maria Barbosa Soares

Outubro de 2019

DIREITOS DE AUTOR E CONDIÇÕES DE UTILIZAÇÃO DO TRABALHO POR TERCEIROS

Este é um trabalho académico que pode ser utilizado por terceiros desde que respeitadas as regras e boas práticas internacionalmente aceites, no que concerne aos direitos de autor e direitos conexos.

Assim, o presente trabalho pode ser utilizado nos termos previstos na licença abaixo indicada. Caso o utilizador necessite de permissão para poder fazer um uso do trabalho em condições não previstas no licenciamento indicado, deverá contactar o autor, através do RepositóriUM da Universidade do Minho.

Licença concedida aos utilizadores deste trabalho



Atribuição

CC BY

<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>

Agradecimentos

Esta dissertação é o culminar de um desafio pessoal que se iniciou com o mestrado. Todas as palavras serão insuficientes para transmitir a enorme satisfação e orgulho que sinto com este ciclo que agora se encerra. Apesar de ser um trabalho individual, a sua realização não teria sido possível sem o contributo de algumas pessoas, a quem desde já expresso os meus mais sinceros agradecimentos.

Em primeiro lugar agradecer à minha orientadora e professora Graça Soares, pela possibilidade de realizar este projeto, pela disponibilidade e apoio incansável, pela confiança e empenho que sempre dedicou, pela simpatia e amizade que sempre demonstrou. Agradeço a paciência e a forma como sempre me motivou para continuar o trabalho. Um sincero obrigado.

À Universidade do Minho e à Fibernamics pela cedência de materiais e equipamentos necessários à execução da parte experimental. À Ângela e a Anabela pelo auxílio prestado nos processos de caracterização.

A todos os meus colegas de mestrado, pela simpatia e entejuda partilhada ao longo destes dois anos. Eramos um grupo pequeno mas unido, onde sempre houve alegria e boa disposição.

A todos os meus amigos que sempre me apoiaram no decorrer deste caminho. Com o seu espírito de companheirismo e amizade tornaram possível a realização deste trabalho, especialmente nos momentos mais difíceis ajudaram-me a manter o rumo. O meu sincero obrigado. Um agradecimento especial à Sandra por me ter dado a conhecer o mestrado e me ter ajudado em todas as ocasiões.

À minha namorada, minha amiga, minha confidente, quero agradecer todo o carinho e atenção que me dás, toda a preocupação que tens comigo, todos os conselhos e desabafos, todo o apoio e presença diária na minha vida. O meu mais sincero obrigado, Adriana.

Por último, mas não menos importante, quero agradecer à minha família. Pela motivação que sempre me transmitiram, por sempre terem acreditado que este caminho seria possível, por sempre me elevarem e não me deixarem cair e por tudo fazerem para que seja feliz e me sinta realizado. Quero agradecer em particular ao meu tio Mário e à minha tia Teresinha pela confiança depositada em mim desde o primeiro dia. São um exemplo para mim, muito obrigado. Por fim, um agradecimento especial aos meus pais por TUDO terem feito para que este momento fosse possível. Não apenas o meu trajeto como estudante mas como pessoa. Tudo que tenho, tudo que sou, tudo que um dia possa ser devo a vocês. Muito obrigado.

DECLARAÇÃO DE INTEGRIDADE

Declaro ter atuado com integridade na elaboração do presente trabalho académico e confirmo que não recorri à prática de plágio nem a qualquer forma de utilização indevida ou falsificação de informações ou resultados em nenhuma das etapas conducente à sua elaboração.

Mais declaro que conheço e que respeitei o Código de Conduta Ética da Universidade do Minho.

Resumo

Materiais capazes de transportar e libertar colagenase para o tratamento de lesões cutâneas: síntese e caracterização

Os danos causados à pele podem trazer consequências nefastas e afetar a homeostasia do organismo. Nesse sentido, é fundamental desenvolver sistemas que auxiliem o processo de cicatrização e evitem a proliferação de microrganismos invasores. Uma nova era de dispositivos biocompatíveis de matriz têxtil, mais eficientes no tratamento das lesões cutâneas e com a capacidade de transporte e libertação controlada de substâncias bioativas, é capaz de proporcionar uma resposta terapêutica mais célere do que os tratamentos convencionais. Por sua vez, os hidrogéis e as nanofibras podem ser materiais biocompatíveis que permitem mimetizar a matriz extracelular de forma a proporcionar um microambiente favorável para a regeneração tecidual.

No presente trabalho foram sintetizados hidrogéis e nanofibras com a capacidade de transportar e libertar colagenase para o tratamento de lesões cutâneas. Para isso, foram sintetizados hidrogéis à base de hidroxipropilmetilcelulose (HPMC) e ciclodextrinas (β CD ou HP β CD). Foram também produzidas nanofibras de policaprolactona (PCL) pela técnica de *electrospinning*.

Os materiais desenvolvidos foram caracterizados através de técnicas de FTIR, DSC e TGA. A caracterização química demonstrou a presença dos principais grupos químicos nos diversos componentes dos materiais. A avaliação dos perfis térmicos através do DSC permite visualizar dois picos endotérmicos, relativos à desidratação e ao intervalo de fusão, para cada um dos materiais analisados e a análise de TGA demonstra uma única fase de degradação térmica tanto nos hidrogéis como nas nanofibras. A sua capacidade de inchaço também foi avaliada em diferentes condições de pH, apresentando o hidrogel de HPMC-HP β CD a maior retenção de água em qualquer das condições estudadas. Por sua vez, o hidrogel de HPMC- β CD mostrou ser o menos sensível a variações de pH do meio. No caso das nanofibras de PCL, foi ainda feita uma análise microscópica usando um microscópio eletrónico de varrimento (SEM). As fibras produzidas apresentaram-se uniformes e homogêneas, com diâmetros compreendidos entre 110 e 137nm sem enzima e entre 195 a 200nm quando incorporada a colagenase na solução do polímero.

Nos hidrogéis a colagenase foi incorporada por adsorção. Os dois hidrogéis apresentaram capacidade de adsorção enzimática semelhante.

Os estudos de libertação controlada efetuados permitiram concluir que quer nos hidrogéis quer nas nanofibras, a colagenase ficou fortemente retida na estrutura polimérica.

Palavras-Chave: *Electrospinning*; Hidrogel; Nanofibras; *Swelling*.

Abstract

Materials for transport and release of collagenase in the treatment of skin wounds: synthesis and characterization

Skin damage can have harmful consequences and affect the body's homeostasis. For this reason, it is essential to develop systems that help the healing process and prevent the proliferation of invasive microorganisms. A new era of biocompatible textile matrix devices, more efficient in the treatment of skin lesions and able for transport and controlled release of bioactive substances, can provide a faster therapeutic response than conventional treatments. On the other hand, hydrogels and nanofibers can be biocompatible materials that mimic the extracellular matrix in order to provide a favorable microenvironment for tissue regeneration.

In the present work hydrogels and nanofibers were synthesized with the ability to transport and release collagenase for the treatment of skin lesions. Thus, hydrogels based on hydroxypropyl methylcellulose (HPMC) and cyclodextrins (β CD or HP β CD) were synthesized. Polycaprolactone (PCL) nanofibres were also produced by the electrospinning technique.

The developed materials were characterized by FTIR, DSC and TGA techniques. The chemical characterization revealed the presence of the main chemical groups in the various components of the materials. The evaluation of the thermal profiles by DSC technique showed two endothermic peaks, related to dehydration and melting range, for both analyzed materials and the TGA technique demonstrated a single thermal degradation phase in both hydrogels and nanofibers. Its swelling capacity was assessed in different pH conditions, with the HPMC-HP β CD hydrogel showing the highest water retention in all of the studied conditions. On the other hand, the HPMC- β CD hydrogel was the least sensitive to pH variations. For the PCL nanofibers, a microscopic analysis was also performed using a scanning electron microscope (SEM). The produced fibers were uniform and homogeneous, with diameters between 110 and 137nm without enzyme and between 195 and 200nm when collagenase was incorporated into the polymer solution.

The collagenase was incorporated by adsorption in the hydrogels. Both hydrogels presented similar enzymatic adsorption capacity.

Controlled release studies showed that collagenase was strongly retained in the polymeric structures studied.

Keywords: Electrospinning; Hydrogel; Nanofibers; Swelling.

Índice

Resumo	v
Abstract	vi
Índice	vii
Lista de Figuras	ix
Lista de Tabelas	xi
Lista de Abreviaturas, Siglas e Acrónimos	xii
1. Objetivo e estrutura da dissertação	1
2. Introdução	1
2.1. Cicatrização cutânea e regeneração celular	1
2.2. Substâncias ativas usadas no tratamento de feridas e na regeneração celular	3
2.3. Imobilização de enzimas com aplicação no tratamento de feridas	5
2.3.1 Colagenase	7
2.4. Materiais e sistemas de liberação controlada para tratamento de feridas.....	8
2.4.1. Sistema de liberação controlada	9
2.5. Materiais poliméricos usados no tratamento de feridas	11
2.5.1. Polímeros naturais	11
2.5.2. Polímeros sintéticos	13
2.5.2.1. Hidrogéis para tratamento de feridas	14
2.5.2.2. Hidrogéis de HPMC-HP β CD e de HPMC- β CD	16
2.6. Nanofibras	18
2.6.1. Aplicações de nanofibras por <i>electrospinning</i>	19
3. Desenvolvimento Experimental	22
3.1. Materiais e métodos	22
3.1.1. Reagentes	22
3.2. Procedimento Experimental	23
3.2.1. Síntese dos hidrogéis de HPMC-HP β CD e de HPMC- β CD	23
3.2.2. Preparação das nanofibras de PCL	23
3.2.3. Incorporação da colagenase nas matrizes poliméricas	25
3.2.3.1. Adsorção da colagenase nos hidrogéis	25
3.2.3.2. Incorporação da colagenase no PCL	26

3.2.3.3. Condições de <i>electrospinning</i> e ensaios realizados	26
3.2.4. Caracterização das amostras	27
3.2.4.1. Espectroscopia no infravermelho com transformadas de Fourier (FTIR)	27
3.2.4.2. Calorimetria diferencial de varrimento (DSC)	28
3.2.4.3. Análise termogravimétrica (TGA)	28
3.2.4.4. Microscopia Eletrónica de Varrimento (SEM)	29
3.2.4.5. <i>Swelling</i>	30
3.2.4.6. Avaliação da atividade da colagenase	31
4. Apresentação, Análise e Discussão dos Resultados	33
4.1. Síntese dos Hidrogéis e das Nanofibras de PCL	33
4.2. Caracterização dos hidrogéis e nanofibras	36
4.2.1. FTIR-ATR	36
4.2.1.1. Hidrogéis de HPMC-HP β CD e HPMC- β CD	36
4.2.1.2. Nanofibras de PCL	39
4.2.2. DSC	41
4.2.2.1. Hidrogéis de HPMC-HP β CD e HPMC- β CD	41
4.2.2.2. Nanofibras de PCL	43
4.2.3. TGA	45
4.2.3.1. Hidrogéis de HPMC-HP β CD e de HPMC- β CD	46
4.2.3.2. Nanofibras de PCL	48
4.2.4. SEM	49
4.2.4.1. Nanofibras de PCL	50
4.2.5. Avaliação do <i>swelling</i>	54
4.2.5.1. Hidrogéis de HPMC-HP β CD e de HPMC- β CD	55
4.2.5.2. Nanofibras de PCL	56
4.2.6. Avaliação da retenção e libertação da colagenase nas estruturas poliméricas	57
5. Conclusão	58
6. Bibliografia	59

Lista de Figuras

Figura 1. Representação esquemática do mecanismo de libertação de compostos bioativos por difusão (Costa, 2013).	10
Figura 2. Representação esquemática do mecanismo de libertação de compostos bioativos por intumescimento (Costa, 2013).	11
Figura 3. Esquema de métodos para a formação de hidrogéis químicos e físicos (Hoffman, 2012).	15
Figura 4. Estrutura da β CD (Petry, et al., 2007).	17
Figura 5. Estrutura da HP β CD (Petry, et al., 2007).	17
Figura 6. Estrutura química do PCL (Casarin, 2011).	19
Figura 7. Esquema de montagem mais utilizado no <i>electrospinning</i> (He, et al., 2008).	20
Figura 8. <i>Electrospinning</i> modelo NF-103 da MECC	24
Figura 9. Papel de alumínio no coletor fixo para a deposição da nanofibra	25
Figura 10. Espectrómetro FTIR Shimadzu Irapidity-1S	27
Figura 11. DSC822 Metter Toledo	28
Figura 12. Analisador termogravimétrico Hitachi STA7200	29
Figura 13. Microscópio Nova NanoSEM 200 (SEMAT, 2019)	30
Figura 14. Medidor de microplacas EZ Read 2000 Microplate Reader	31
Figura 15. Aspeto dos hidrogéis HPMC-HP β CD (esquerda) e HPMC- β CD (direita)	34
Figura 16. Aspeto da nanofibra de PCL (E11)	35
Figura 17. Espetros FTIR do HPMC (vermelho), β CD (preto) e HPMC- β CD (verde)	37
Figura 18. Espetros FTIR do HPMC (vermelho), HP β CD (preto) e HPMC-HP β CD (verde)	38
Figura 19. Espetros FTIR das amostras de nanofibras de PCL sem colagenase: PCL (preto) e E4 (azul)	39
Figura 20. Espetros FTIR das amostras de nanofibras de PCL com colagenase: PCL (preto) e E14 (verde)	40
Figura 21. Termogramas de DSC da HPMC (vermelho), da β CD (preto) e do HPMC- β CD (verde)	42
Figura 22. Termogramas de DSC da HPMC (vermelho), do HP β CD (preto) e do HPMC-HP β CD (verde)	43

Figura 23. Termogramas de DSC das amostras de nanofibras de PCL E4 (azul) e E14 (verde)	44
Figura 24. Curvas de TGA da HPMC (vermelho), do β CD (preto) e do HPMC- β CD (verde)	46
Figura 25. Curvas de TGA da HPMC (vermelho), do HP β CD (preto) e do HPMC-HP β CD (verde)	47
Figura 26. Curvas de TGA do PCL (preto), da E4 (azul) e E14 (verde)	48
Figura 27. Fotografias obtidas do SEM das nanofibras sem colagenase: E4 (com ampliação de 5000x em cima à esquerda e de 50000x em cima à direita) e E7 (com ampliação de 10000x em baixo à esquerda e de 50000x em baixo à direita)	51
Figura 28. Fotografias obtidas do SEM das nanofibras com colagenase: E13 (com ampliação de 5000x em cima à esquerda e de 50000x em cima à direita) e E11 (com ampliação de 10000x em baixo à esquerda e de 50000x em baixo à direita)	53
Figura 29. <i>Swelling</i> dos hidrogéis de HPMC- β CD e de HPMC- HP β CD	55
Figura 30. <i>Swelling</i> das amostras de nanofibra de PCL	56

Lista de Tabelas

Tabela 1. Dados da análise calorimétrica	45
Tabela 2. Valores de T_i , T_f , TG e DTG dos hidrogéis HPMC-HP β CD e HPMC- β CD e dos respectivos componentes individuais HPMC, HP β CD e β CD	48
Tabela 3. Valores de T_i , T_f , TG e DTG das amostras de nanofibra de PCL (E4 e E11) e PCL padrão	49
Tabela 4. Diâmetro médio das amostras de nanofibras analisadas no SEM a uma ampliação de 50000x	50

Lista de Abreviaturas, Siglas e Acrónimos

ALG – Alginato

ATR – Reflexão total atenuada

βCD –β-ciclodextrina

BDGE - 1,4-butenodiolglicidil éter

CA – Carvão ativado

CD – Ciclodextrina(s)

CMC - Carboximetilcelulose

CS - Quitosano

DACC - Cloreto de Dialquil Carbamoil

DMF - Dimetilformamida

DSC – Calorimetria Diferencial de Varrimento

DTG - Temperatura máxima de degradação

FTIR – Espetroscopia de infravermelho com transformadas de Fourier

HA – Ácido hialurônico

HPβCD – Hidroxipropil-β-ciclodextrina

HPMC – Hidroxipropilmetilcelulose

PAM - Poliacrilamida

PCL – Policaprolactona

PEG - Polietilenoglicol

PEO - Óxido de polietileno

PLA - Políácido láctico

PLCL - Poli (L-lactideo-co-e-caprolactona)

PU - Poliuretano

PVA – Poli (álcool de vinilo)

Q – *Swelling*

TG - Percentagem de perda de massa

TGA – Termogravimetria

SEM - Microscopia eletrônica de varrimento

ST – Solução de trabalho

1. Objetivo e Estrutura da Dissertação

Este trabalho teve como objetivo a síntese e caracterização de materiais com potencial aplicação no tratamento de lesões cutâneas. Nesse sentido, foram preparados hidrogéis com ciclodextrinas HP β CD e β CD e nanofibras de PCL através da técnica de *electrospinning*, com a capacidade de incorporar e libertar de forma controlada a enzima colagenase. A caracterização destes materiais foi realizada através de análises de FTIR, DSC, TGA, SEM e *Swelling*.

A dissertação está organizada em 5 partes: “Objetivo e Estrutura da Dissertação”, “Introdução”, “Procedimento Experimental”, “Apresentação, Análise e Discussão de Resultados” e “Conclusão”.

Na Introdução é apresentada a componente teórica desta dissertação, considerando um conjunto de conceitos importantes para o desenvolvimento do trabalho e uma melhor percepção dos capítulos posteriores.

No Procedimento Experimental são descritos todos os materiais e métodos experimentais utilizados, relacionados com biofuncionalização e caracterização dos materiais desenvolvidos através de diferentes técnicas de FTIR, DSC, TGA, SEM e *Swelling*.

Na Apresentação, Análise e Discussão de Resultados são ilustrados os resultados provenientes dos procedimentos experimentais e feita a sua discussão.

Na Conclusão são enunciadas as principais conclusões do estudo realizado.

2. Introdução

2.1. Cicatrização cutânea e regeneração celular

A pele é o maior órgão do corpo humano e representa a primeira linha de proteção contra as agressões do meio externo. A pele fornece ainda funções sensoriais, permite a regulação térmica e mantém um funcionamento estável dos fluidos presentes. Os danos na pele, resultantes em lesões cutâneas, comprometem a sua integridade devendo, por isso, ser tratados de forma adequada e rápida para evitar potenciais complicações na saúde do paciente (Saghazadeh, et al., 2018); (Dreifke, et al., 2015).

A cicatrização das feridas consiste essencialmente na coordenação de diversos fatores de natureza celular e molecular que interagem em simultâneo de forma a proceder à reconstituição

do tecido (Fazio, et al., 2000). Após uma lesão na pele inicia-se um processo altamente orquestrado de várias etapas fisiológicas com o intuito de promover a auto-regeneração da pele (Saghazadeh, et al., 2018). Essas etapas podem ser classificadas em cinco grandes fases denominadas como hemostasia, inflamação, proliferação, migração e remodelação/maturação (Boateng & Catanzano, 2015). Monteiro et al., defendem que a cicatrização das feridas é uma das formas mais usadas para obter o restabelecimento da integridade do organismo, sendo este visto como um processo complexo, segmentado entre um estágio inflamatório seguido de granulação e posterior epitelização (Monteiro, et al., 2007).

As feridas podem ser classificadas como agudas ou crônicas. No entanto, de uma maneira geral, no momento da lesão todas as feridas podem ser categorizadas como agudas. Tendo em conta essa definição, uma ferida será denominada como crônica quando o tempo de cicatrização não segue o processo esperado, sendo prolongado por um tempo excessivo em relação ao que seria esperado para o seu tratamento (Whitney, 2005). As lesões agudas são geralmente lesões tecidulares que se curam completamente, num tempo previsto entre oito a doze semanas, com cicatrizes mínimas. Este tipo de feridas pode ter origem numa lesão mecânica, como por exemplo abrasões, penetração da pele por armas ou incisões, queimaduras ou ter origem química. As lesões crônicas surgem de lesões teciduais que se curam lentamente, com tempos de cicatrização superiores a doze semanas. Em muitos casos a cicatrização é ineficaz e ocorre o reaparecimento da lesão. Estas feridas podem ter origem diversa, tal como química, térmica e elétrica. Normalmente estão contaminadas e observa-se uma perda significativa de tecido, podendo ainda afetar outras estruturas tais como os ossos, os nervos ou as articulações (Boateng & Catanzano, 2015).

Numa ferida aberta há uma competição entre as bactérias e as células do nosso corpo para tentar colonizar a sua superfície. As bactérias têm vantagem neste processo devido à sua capacidade natural de colonizar superfícies biológicas e não biológicas. Em termos gerais, grande parte das feridas infetadas são contaminadas por micróbios endógenos que residem nas membranas mucosas e pela micropopulação disponível na pele adjacente (Simões, et al., 2018).

As práticas convencionais de tratamento têm-se mostrado pouco eficazes no tratamento de cortes profundos, deixando uma cicatriz visível na pele. No sentido de contrariar esse facto, têm sido estudadas outras alternativas de tratamento que permitam repor as propriedades regenerativas da pele antes da lesão. Inicialmente, os curativos atuavam apenas como uma barreira protetora contra agentes externos agressores, no entanto, é possível proporcionar a sua

interação com a ferida de modo a catalisar todo o processo de cicatrização (Saghazadeh, et al., 2018) (Pinho, 2014). Nesse sentido, as formas de tratamento convencionais baseadas no uso de gazes, espumas ou ligaduras, evoluíram para sistemas que incluem a possibilidade de libertação de moléculas bioativas e que permitem manter um ambiente húmido, necessário para uma cicatrização eficaz da ferida. Este novo conceito de biomateriais pode ser encontrado na forma de espumas, filmes, hidrocolóides e hidrogéis (Pinho, 2014).

2.2. Substâncias ativas usadas no tratamento de feridas e na regeneração celular

Apesar do nosso corpo ser capaz de promover a auto-regeneração da pele, lesões crónicas mais graves poderão colocar em risco a saúde do paciente. Nesse sentido, é necessário recorrer a métodos que melhorem a eficiência do tratamento da lesão em causa (Boateng & Catanzano, 2015); (Simões, et al., 2018).

De forma a viabilizar o processo de cicatrização e auxiliar na regeneração tecidual, têm sido estudadas formas de promover a atividade biológica, ou seja, permitir a libertação de substâncias bioativas já incorporadas nos pensos aplicados nas lesões. Essas substâncias libertadas podem atuar de uma forma direta com um papel mais focado na limpeza e remoção do tecido necrótico ou de uma forma indireta desempenhando um papel ativo na prevenção e tratamento de microrganismos indesejados e impedindo a proliferação microbiana (Boateng & Catanzano, 2015). As substâncias ativas utilizadas variam conforme o tipo de ferida e podem variar também em termos de origem, podendo ser sintéticas ou naturais. As substâncias ativas com propriedades antimicrobianas têm como principal objetivo prevenir e combater infeções presentes na ferida. Um dos antibióticos mais utilizados é o cloreto de *dialquil carbamoil* (DACC) (Boateng, et al., 2008), no entanto, existem outros agentes antibióticos que são utilizados, tais como, aminoglicosídeos, antibioticos β -lactâmicos, quinolona, tetraciclina, entre outros. A utilização excessiva destes fármacos permitiu o aparecimento de bactérias resistentes à sua ação. Para contrariar essa situação são utilizadas nanopartículas com efeito antibacteriano, destacando-se a utilização de nanopartículas de prata. O seu tamanho reduzido e sua grande área de superfície permitem uma atuação eficaz, para além de apresentarem menores efeitos colaterais indesejáveis e não provocarem resistência microbiana. Existem, ainda, outras substâncias antimicrobianas de origem

natural tais como o mel, o *aloe vera*, a curcumina, o quitosano (CS), entre outros, que também se utilizam (Simões, et al., 2018).

No que respeita ao processo de tratamento de lesões cutâneas existem diversas substâncias presentes nos pensos que vão atuar diretamente no tratamento das feridas. Destaca-se o carvão ativado (CA), utilizado como absorvente de odor em feridas com odor intenso (Naylor, et al., 2009) e que atua ainda ao nível da limpeza do leito da ferida através da retenção do exsudato e de bactérias, promovendo o processo de cicatrização (Kerihuel, 2010).

Os pensos hidrocolóides contêm uma matriz hidrocolóide (carboximetilcelulose), na camada interior e uma camada externa de poliuretano (PU). A carboximetilcelulose (CMC) presente no interior do penso absorve de forma moderada o exsudato, ocorrendo a formação de um gel que mantém a humidade da ferida, o que induz um desbridamento natural e conseqüentemente ao progresso no processo de cicatrização. A camada mais exterior permite realizar trocas externas de natureza gasosa, nomeadamente de água e oxigénio, mas impossibilita o contato da ferida com fluidos externos e bactérias (Cunha, 2012).

O alginato (ALG) é um polissacarídeo, presente em extratos de algas marinhas, constituídos pelos monómeros de ácidos gulurónicos e manurónicos. Estas substâncias são mais utilizadas em feridas profundas e exsudativas com sangramento, devido à elevada capacidade de absorção por capilaridade das fibras, ocorrendo trocas iónicas entre o líquido exsudato e os polímeros constituintes do alginato (Elias, et al., 2012).

O ácido hialurónico (HA) é um polissacarídeo endógeno que pertence ao grupo dos glicosaminoglicanos. A sua incorporação nos pensos permite desempenhar um papel ativo no tratamento das feridas inflamatórias prolongadas, na medida em que promove a expansão do espaço extracelular, de forma a obter maior elasticidade e estabilidade, conduz a uma maior migração das células, em particular dos fibroblastos, impulsionando a reestruturação da matriz celular (Neuman, et al., 2015); (Brown, 2004); (Nazarko, 2006).

O colagénio é uma proteína crucial na estrutura dos tecidos e a sua incorporação em pensos irá potenciar o processo de cicatrização da ferida. O colagénio exógeno será degradado pelas enzimas responsáveis a este processo, de forma a que não haja um excesso de colagénio na ferida. Os produtos resultantes da digestão enzimática serão promotores da proliferação celular no tecido de granulação, apresentam capacidade de absorção de radicais livres e funcionam como hemostático em feridas de natureza hemorrágica (Elias, et al., 2012); (Rocha, et al., 2006); outras substâncias com ação terapêutica são os ácidos gordos esterificados, colagenase, hidrogel,

espumas de poliuretano, carboximetilcelulose sódica, iodo, maltodextrina, poliacrilatos e polímeros acrílicos (Elias, et al., 2012).

2.3. Imobilização de enzimas com aplicação no tratamento de feridas

As enzimas são proteínas dotadas de especificidade que funcionam como biocatalisadores em reações químicas. Além da sua especificidade, as enzimas são caracterizadas por adotar os princípios da química verde. A sua utilização é muito diversificada podendo ser utilizada pelas indústrias farmacêutica, de produtos alimentares, de papel, de detergentes, têxtil e de cosméticos. De modo a aumentar a sua utilização a nível industrial é necessário obter preparações enzimáticas estáveis e o seu uso permite muitas vezes diminuir a necessidade de matérias-primas, de produtos químicos e energia gasta. De modo a obter enzimas com maior estabilidade operacional recorre-se frequentemente à sua imobilização (Reis, et al., 2019). A retenção destas biomoléculas permite reutiliza-las, usá-las de maneira mais estável a diferentes valores de pH e de temperatura em determinados processos biocatalíticos. Podem ainda implicar baixa produção de subprodutos não desejáveis e a não necessidade de etapas adicionais de purificação.

A imobilização de enzimas pode apresentar desvantagens em relação à sua utilização na forma livre, nomeadamente em termos de dificuldade em encontrar suportes adequados, custo adicional com os suportes e com as enzimas, restrições funcionais ou de impedimento estérico que inativam a enzima ou diminuem a sua atividade (Mendes, et al., 2011); (Dai, et al., 2017); (Brena, et al., 2016).

A imobilização das enzimas pode ser feita usando métodos físicos e químicos. Usam-se técnicas que implicam: (1) A adsorção física. É o método mais simples e muito utilizado para imobilizar as enzimas. Nesta técnica ocorre interações entre o suporte e a enzima através de interações iónicas, forças *Van der Waals* e pontes de hidrogénio. O tipo de interação formada está dependente da estrutura química da superfície e da enzima. Os benefícios desta abordagem são desde logo a sua simplicidade de execução, com pequenas alterações na estrutura conformacional da enzima, em que esta é imobilizada numa orientação que lhe é preferencial e energeticamente favorável. No entanto, as forças envolvidas na ligação são fracas o que tornam o composto mais instável e propenso a desadsorver por alterações no pH ou na temperatura (Mesquita, et al., 2018); (Reis, et al., 2019); (2) A adsorção iónica é baseada em ligações eletrostáticas, por interação de

cargas opostas, entre os suportes sólidos e as enzimas. Este método é muito semelhante à adsorção física no entanto as forças envolvidas são mais fortes mas ainda assim inferiores às ligações covalentes. Permite imobilizar enzimas com elevada atividade sem alteração significativa da conformação enzimática, no entanto, existe a possibilidade de interferência por parte de outros íões e a desadsorção ocorrer se o pH não estiver ajustado corretamente (Mesquita, et al., 2018); (3) A ligação covalente é muito importante para estabilizar as enzimas nos suportes. O número de ligações químicas existentes entre o suporte e a enzima definem o fator de estabilização da enzima imobilizada. A formação de múltiplas ligações covalentes é o que permite manter as posições relativas inalteradas de todos os grupos químicos envolvidos no processo, durante a alteração conformacional provocada por diversos fatores como variação extremas do pH, aumento da temperatura, presença de solventes orgânicos, entre outros. No entanto, a relação custo-benefício não é tão favorável como nas outras técnicas, devido à irreversibilidade da ligação formada entre o suporte e a enzima (Reis, et al., 2019); (4) O encapsulamento de enzimas é uma técnica baseada na retenção física da enzima numa rede polimérica porosa, de forma que esta fique confinada nas cavidades internas da matriz sólida. A cinética de difusão do substrato e os produtos formados é um fator limitante do encapsulamento. Nesta técnica, a rede polimérica delimita o contato da enzima com o meio reacional, o que proporciona uma melhor preservação da enzima e minimiza possíveis efeitos de inativação da sua atividade. Outras vantagens deste método estão relacionadas com a possibilidade de encapsulamentos em simultâneo com enzimas com qualquer grau de purificação e sem modificação da sua estrutura e a elevada área superficial entre o substrato e a enzima, dentro de um volume relativamente pequeno. No entanto, alguns fatores desfavoráveis prendem-se com a necessidade de uma elevada concentração da enzima para garantir o encapsulamento, da casualidade de ocorrer desorção da enzima se o tamanho dos poros da matriz não for o adequado e a possibilidade de ocorrer difusão de substratos ou produtos na cavidade da matriz porosa (Pereira, 2014); (Reis, et al., 2019); (Mesquita, et al., 2018); (5) A reticulação é uma técnica utilizada quando é necessário imobilizar duas ou mais enzimas associadas. Este método tem como base a formação de ligações covalentes entre as enzimas, através de reagentes bi ou multifuncionais. Tal como a adsorção, a reticulação é caracterizada pela sua simplicidade, no entanto as suas desvantagens estão relacionadas com a produção de partículas frágeis e difusão limitada. As enzimas, aquando da sua imobilização, podem perder atividade catalítica devido às alterações que sofrem na sua conformação morfológica (Resende, 2016); (Mesquita, et al., 2018); (Pereira, 2014).

A escolha do suporte é muito importante para que a proteína catalisadora consiga manter o seu bom desempenho quando for imobilizada. O suporte deve ser biocompatível com a enzima e compatível com os seus substratos e cofatores. Os suportes podem ser classificados em dois grupos, os que imobilizam fisicamente a enzima, ou seja, a proteína é aprisionada no suporte e os suportes em que as enzimas se ligam na sua superfície por intermédio de ligações químicas. Exemplos desses suportes pode ser: polímeros naturais, polímeros sintéticos e fibras de polissacarídeos ou proteínas (Mesquita, et al., 2018); (Pereira, 2014).

As enzimas apresentam um bom potencial de aplicação na síntese de curativos à base de hidrogéis (Guebitz & Nyanhongo, 2018). Para além disso, podem ser incorporadas em pensos, aproveitando-se as suas propriedades catalíticas para melhorar o processo de cicatrização. Neste trabalho, a colagenase foi a enzima aplicada aos hidrogéis de HPMC- β CD e de HPMC-HP β CD e incorporada nas nanofibras de PCL.

2.3.1. Colagenase

A colagenase é uma enzima que pertence ao grupo das proteases, com a capacidade de degradação do colagénio. Foi descoberta em 1962 e referida num estudo publicado por Jerome Gross e Charles Lapiere, como a enzima com a capacidade de degradar colagénio tipo I e promover a degradação da matriz extracelular da pele (Gross & Lapiere, 1962).

As colagenases podem ter origem animal ou vegetal, no entanto são maioritariamente obtidas a partir de microrganismos (Oliveira, et al., 2017); (Costa, 2017) devido ao facto de deste modo serem obtidas com facilidade a um custo mais reduzido, com elevada taxa de produção, diversidade, estabilidade e reprodutibilidade (Banerjee & Ray, 2017). Para além disso, Hamdy (2008) citou que as colagenases microbianas apresentavam uma boa capacidade de clivar a tripla hélice do colagénio em inúmeros locais, enquanto as colagenases provenientes dos mamíferos clivavam apenas num único local (Hamdy, 2008). O *Clostridium histolyticum* tem sido uma das fontes mais frequente para obtenção deste tipo de enzimas (Daboor, et al., 2010).

As colagenases microbianas aplicam-se em diferentes contextos científicos e farmacêuticos, no entanto podem também ser usadas em processos muito diferentes tais como o tratamento do couro ou o amaciamento de carnes (Costa, 2017).

A colagenase tem a capacidade de clivar a tripla hélice do colagénio e são utilizadas em diversas situações fisiológicas e patológicas, como o desenvolvimento ósseo, desenvolvimento

embrionário, ulceração do intestino, artrite reumatoide e no tratamento de feridas cutâneas (Kang, et al., 2005); (Oliveira, et al., 2017). Outras aplicações na área da medicina estão relacionadas com a doença de Peyronie (Jordan, 2008), doença de Dupuytren (Watt, et al., 2010), tratamento de feridas necrosadas (Erdeve, et al., 2007), queimaduras em crianças (Ozcan, et al., 2002), tratamento de cicatrizes hipertróficas (Cheng, et al., 1999), estudos terapêuticos pré-clínicos em diversas tipologias de fibroses destrutivas (Jin, et al., 2005), isolamento e transplante de células (Wang, et al., 2004) e os tratamentos de retenção de placenta (Eiler & Hopkins, 1993). Domogatsky apresentou um caso concreto da aplicação de *Bacillus Subtilis*, *B. licheniformis*, *Streptomyces sp* e *Aspergillus Niger*, com atividade colagenolítica, no tratamento de queimaduras de terceiro grau. Verificou que não se observavam efeitos tóxicos nem irritação de pele, sendo fomentado um processo de cicatrização em metade do tempo que seria necessário em queimaduras tratadas sem estas enzimas (Domogatsky, 2010).

A colagenase é especificamente referida pela sua capacidade de desbridamento e indutora da cicatrização de feridas cutâneas. Segundo Alipour et al., diversos estudos apontam a colagenase como uma substância que elimina o tecido desvitalizado ou qualquer material contaminado que se encontre no leito da ferida, após o surgimento de uma lesão ou queimadura na pele. A colagenase de *Clostridium histolyticum* foi utilizada no processo de desbridamento enzimático, potenciando a cicatrização através da proliferação e migração das células constituintes da pele, tais como os fibroblastos e facilitando o crescimento de novos vasos sanguíneos (Alipour, et al., 2016).

2.4. Materiais e sistemas de libertação controlada para tratamento de feridas

Um curativo é uma barreira de proteção contra o meio externo que evita a entrada de microrganismos indesejados, no entanto, a interação com o leito da ferida requer um material com propriedades específicas e necessárias, tais como: (1) Boa biocompatibilidade para evitar qualquer toxicidade com os tecidos da ferida; (2) Capacidade de absorção de fluido, dado que o excesso de líquido exsudado deve ser retirado do leito da ferida para diminuir a possibilidade de crescimento bacteriano; (3) Aptidão para manter a taxa de transmissão de vapor de água num valor conveniente, para manter o leito da ferida húmido (uma elevada taxa provoca a desidratação da ferida e aumenta o risco de cicatrizes e um valor baixo da taxa aumenta o risco da proliferação

das infecções devido à acumulação de exsudatos); (4) Apresentar atividade antimicrobiana para suprimir a proliferação dos micróbios por debaixo do curativo e (5) Ainda ser um material não aderente de forma a evitar o risco de outra lesão aquando da remoção do curativo (Naseri-Nosar & Ziora, 2018).

A utilização controlada de substâncias bioativas permite um tratamento mais eficaz das feridas. Cremes, pomadas ou soluções podem transportar essas substâncias no entanto, devido às suas propriedades físicas, promovem uma rápida absorção do exsudato no leito da ferida e durante esse processo perdem as suas características reológicas tornando-se móveis. A utilização de um material sólido é mais adequado e promove um tratamento mais eficaz no caso de feridas com líquido exsudato, permitindo uma melhor gestão do próprio líquido e um maior tempo de atuação das substâncias bioativas no leito da ferida. No entanto, os pensos tradicionais não possibilitam a utilização de um sistema de libertação controlada. Este sistema é particularmente importante no tratamento de lesões crónicas onde existe a necessidade frequente de trocar o penso, portanto, um sistema de libertação controlada no tratamento destas feridas permite aumentar a eficiência dos resultados terapêuticos. Além da redução do tempo de tratamento, também é possível utilizar menores doses de antibióticos no tratamento de uma lesão local, o que permite evitar altas doses sistemáticas deste produto, reduzindo assim a exposição do paciente a um excesso de medicação além do necessário no local da ferida (Boateng & Catanzano, 2015).

2.4.1. Sistema de libertação controlada

Os hidrogéis são uma rede tridimensional de macromoléculas, compostas por cadeias poliméricas, com uma elevada capacidade de absorção de água, podendo absorver, por vezes, até 10 vezes o seu volume inicial. A capacidade de retenção de grandes quantidades de água permite a inclusão de substâncias hidrofílicas e apresenta-se como uma favorável similaridade física com os tecidos da pele, o que traduz-se numa elevada biocompatibilidade. Este sistema de absorção e desadsorção controlado é determinado pela capacidade de *swelling* do hidrogel. (Li & Mooney, 2016); (Gupta, et al., 2002).

As substâncias ativas imersas no interior do hidrogel podem ser libertadas. As propriedades estruturais do hidrogel, a afinidade entre os compostos libertados e a matriz, a quantidade e solubilidade dos compostos e os mecanismos de libertação controlada (erosão, difusão,

intumescimento) são os parâmetros que definem a cinética, duração e taxa de libertação deste processo (Wei, et al., 2012).

As propriedades do hidrogel condicionam a predominância de um dos três mecanismos de libertação controlada. Comumente sempre que os hidrogéis entram em contacto com um meio de natureza aquosa, a sua estrutura mantém-se significativamente inalterada ao longo de todo o processo de difusão, podendo no entanto degradar-se através de intumescimento (*swelling*) (Lopes, et al., 2005).

O mecanismo da difusão pode ser descrito como a passagem dos compostos bioativos, do interior da matriz polimérica, para o meio exterior ao sistema que estavam inseridos (Costa, 2013); (Coelho, 2007). Neste ponto, a solubilidade e a difusividade são critérios essenciais a ter em consideração aquando deste tipo de mecanismo. A solubilidade consiste numa propriedade de equilíbrio que relata a interação entre os compostos e a matriz polimérica. Desta forma, a cinética da difusão é inversamente proporcional à interação entre o agregado polímero-compostos bioativos, intensificando os níveis de retenção. Por sua vez, a difusividade apresenta numa característica cinética, descrevendo a simplicidade de movimentação dos compostos através da matriz polimérica, podendo os mesmos ser influenciados por alguns fatores, como é o caso da porosidade dos hidrogéis (Costa, 2013). Este mecanismo pode ser observado na figura 1.

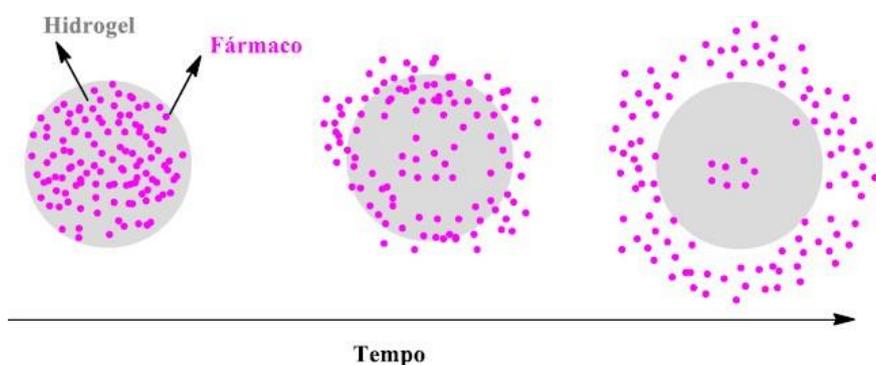


Figura 1. Representação esquemática do mecanismo de libertação de compostos bioativos por difusão (Costa, 2013).

Tomando como ponto de partida o mecanismo controlado por difusão, a lei de Fick (equação 1) descreve essa difusão. Através da lei de Fick é possível determinar a velocidade do mecanismo de difusão, por unidade de superfície (Coelho, 2007); (Lin & Metters, 2006).

Equação (1):
$$\frac{dQ}{dt} = -D \frac{dC}{dx}$$

Onde, dQ/dt é a velocidade de difusão, Q é a massa do composto no interior do polímero, t é o tempo, D o coeficiente de difusão, C a concentração do composto que se difunde e X é a coordenada espacial normal à secção (Coelho, 2007).

Em relação ao *control release* através de mecanismos de intumescimento, este ocorre devido à difusão das substâncias no interior do polímero. Quando existe um incremento do volume da estrutura polimérica devido à absorção de moléculas de água do meio externo, através das moléculas hidrofílicas dos polímeros, ocorre um aumento do *swelling* do polímero e da relaxação das suas cadeias poliméricas e consequentemente, a libertação por difusão do composto bioativo para o exterior (Costa, 2013); (Lin & Metters, 2006). Na figura 2 é possível observar este mecanismo.

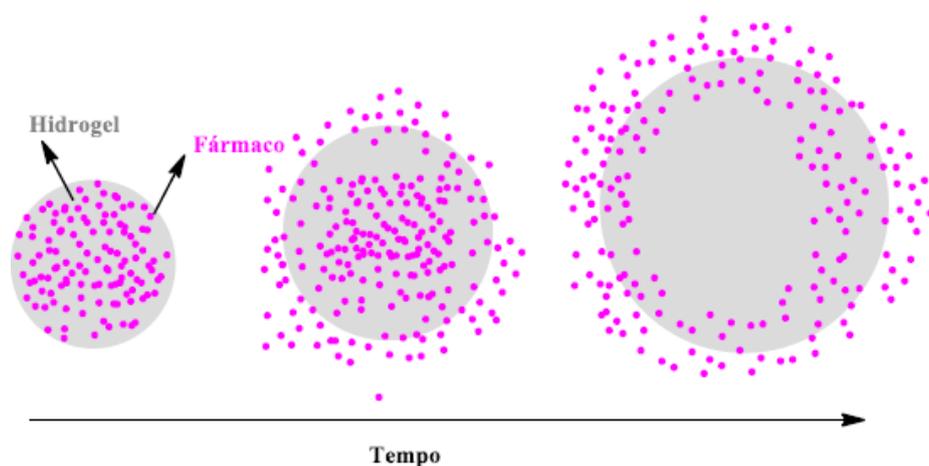


Figura 2. Representação esquemática do mecanismo de libertação de compostos bioativos por intumescimento (Costa, 2013).

2.5. Materiais poliméricos usados no tratamento de feridas

Os polímeros são macromoléculas constituídas por unidades estruturais que se repetem ao longo das cadeias. Para o tratamento de feridas foram desenvolvidos curativos mais avançados utilizando polímeros naturais e polímeros sintéticos.

2.5.1. Polímeros naturais

A utilização de polímeros naturais não é recente e a sua utilização para o uso clínico já remonta a milhares de anos atrás. Os polímeros naturais são caracterizados pela sua biocompatibilidade e

biodegradabilidade. Este tipo de polímeros é encontrado na natureza, sendo a sua origem proveniente de matéria macromolecular orgânica de plantas, animais ou micro-organismos. Estes polímeros podem ser classificados em: (1) Polissacarídeos, como a celulose, dextrano, quitina, amido, ácido hialurônico e glicosaminoglicanos; (2) Proteínas de origem vegetal, como a soja e proteínas de origem animal, como a seda natural, colágeno e queratina; (3) Polinucleótidos como o DNA e RNA (Huang, et al., 2019); (Lamas, 2015).

Os polímeros naturais apresentam bons níveis de biocompatibilidade, biodegradabilidade, são mais interessantes em termos econômicos, não são tóxicos e estão prontos a ser utilizados, o que torna a sua utilização atrativa. Além disso, permitem a adesão, a proliferação e a diferenciação celular. Contudo a sua utilização também apresenta desvantagens em termos das suas propriedades mecânicas e risco de transmissão patogénica. De forma a superar esses inconvenientes, os polímeros naturais são sujeitos a processos de modificação química, reticulação ou misturados com outros polímeros sintéticos (Kulkarni, et al., 2012); (Lamas, 2015); (Mogosanu & Grumezescu, 2014).

Uma parte significativa destes polímeros faz parte da matriz natural do corpo ou então possui componentes que apresentam atividade fisiológica como parte do processo natural de cicatrização de feridas. Os curativos com polímeros bioativos mais comuns incluem o alginato de sódio, o colágeno, o ácido hialurónico (HA) e o quitosano. O alginato de sódio é muito utilizado devido à sua biocompatibilidade e facilidade de gelificação. O colágeno é um dos componentes dos tecidos conjuntivos do ser humano e apresenta boa biodegradabilidade, resistência à tração e desempenha um papel ativo na cicatrização da ferida e na nova formação de tecido. O ácido hialurónico (HA) também faz parte da matriz tecidual natural e desempenha um papel importante na formação de novos tecidos, tornando o processo de cicatrização mais eficaz. O quitosano, tal como os exemplos anteriores, também auxilia o processo de cicatrização de feridas, com o contributo para a hemostasia e atividade antibacteriana (Boateng & Catanzano, 2015).

A celulose bacteriana é um composto orgânico, denominado por exopolissacarídeo, de origem microbiana. É um dos polímeros mais utilizados devido às suas propriedades de elevada biocompatibilidade, resistência mecânica, hemocompatibilidade, microporosidade e biodegradabilidade. O polímero apresenta muitas das propriedades de um curativo ideal, sendo capaz de promover um ambiente húmido no leito da ferida, bem como a aceleração da granulação, permitindo uma cicatrização mais eficaz (Rajwade, et al., 2015).

A fibroína de seda é uma proteína passível de ser utilizada como biomaterial, característico pela sua sequência de aminoácidos altamente repetitiva, que promove boas propriedades mecânicas e biológicas. Apresenta também características de um curativo ideal, tornando este material propício ao tratamento de feridas (De Olyveira, et al., 2011).

2.5.2. Polímeros sintéticos

Estes polímeros são produzidos de maneira artificial, ou seja, são sintetizados pelo Homem, ainda que podendo ter origem natural. O primeiro polímero sintético utilizado para o tratamento de feridas foi a metilcelulose, derivado da celulose (Sezer & Cevher, 2011).

Os pensos de polímeros sintéticos podem ser classificados de acordo com o seu mecanismo de ação, podendo ser passivos ou interativos. As gazes de viscosse são um exemplo de curativos de polímero sintético passivo, normalmente não são oclusivos, sendo apenas utilizados para cobrir a lesão cutânea. No caso dos curativos interativos, são designados como oclusivos ou semi-oclusivos, tomando parte ativa no processo de tratamento ao fornecer uma barreira protetora que impede a entrada de bactérias exteriores. Estes pensos podem estar sob a forma de filmes, espumas, hidrogéis ou hidrocolóides (Mir, et al., 2018).

Estes polímeros são nanobiomateriais compósitos com poros de pequenas dimensões e uma área de superfície elevada (Mogosanu & Grumezescu, 2014). A sua natureza hidrofílica auxilia no processo de tratamento da ferida. Através de uma boa capacidade de retenção da humidade e boa gestão da taxa de transmissão de vapor de água permite manter o leito da ferida húmido, sem comprometer a entrada de bactérias e líquido, proporcionando condições mais favoráveis para a cicatrização (Boateng & Catanzano, 2015).

De forma a promover ainda mais o processo de cicatrização é necessário sintetizar, modificar e projetar curativos que tenham capacidade de libertação controlada, desta forma permitindo a libertação de substâncias que vão atuar diretamente no leito da ferida (Liu & Jia, 2018).

Alguns destes materiais poliméricos têm vantagens relativamente aos polímeros naturais, no sentido em que podem ser sintetizados e processados de forma controlada em laboratório, o que permite reprodutibilidade. Apresentam baixa sensibilidade a vários processos enzimáticos e, portanto, o seu processo de degradação não irá variar muito de paciente para paciente. Outro fator importante é a inexistência de risco de contaminação biológica (Moura, et al., 2013). Pensos de polímeros sintéticos podem ser produzidos utilizando a eletrofiação ou a síntese de hidrogéis.

Alguns exemplos desses pensos incluem poli (álcool de vinilo), poliuretano e óxido de polietileno (Boateng & Catanzano, 2015).

2.5.2.1. Hidrogéis para tratamento de feridas

Os hidrogéis são estruturas poliméricas muito importantes no tratamento de feridas. Os hidrogéis podem ser descritos como uma rede tridimensional de cadeias poliméricas, com uma vasta capacidade de absorção de água ou fluidos corporais sem que haja perda da sua estrutura (Pillai, et al., 2009); (Ganji, et al., 2010). No entanto, determinados hidrogéis podem sofrer degradação com o tempo (Hoffman, 1987).

Em 1955 os professores Lim e Wichterle, da Republica Checa, conseguiram sintetizar com sucesso o hidrogel de metacrilato de 2-hidroxiétilo. Este foi o polímero sintético pioneiro com potencial aplicação biomédica, tendo sido utilizado posteriormente na produção de lentes de contato.

O crescimento da utilização dos hidrogéis ocorreu na última metade do século 20, onde o hidrogel teve a sua aplicação na oftalmologia e em diversas práticas clínicas para curar doenças como a diabetes *mellitus*, osteoporose, asma e doenças cardíacas. Este biomaterial obteve grande sucesso por apresentar boas propriedades químicas, onde se destacam a elevada estabilidade sob diferentes condições, nomeadamente diferentes valores de pH, de temperatura e de tonicidade (Gibas & Janik, 2010), uma elevada compatibilidade e baixa tensão entre o hidrogel e a superfície da pele. A nível das propriedades físicas, os hidrogéis são caracterizados pela sua composição elástica e suave e uma estrutura que permite a difusão de substâncias, funcionando como um sistema de libertação controlada, permitindo ainda a circulação de oxigénio através da sua estrutura (Buwalda, et al., 2014).

Os hidrogéis podem ser classificados em três tipos: (1) Os hidrogéis da primeira geração são os que apresentam menor complexidade e são constituídos apenas por redes poliméricas simples; (2) Os de segunda geração são mais complexos que os da primeira e já apresentam interações físicas de acordo com a resposta necessária às mudanças do meio em que estão inseridos e (3) Os hidrogéis de terceira geração onde ocorrem interações físicas e formação de complexos que proporcionam a inclusão e coordenação com metais (Buwalda, et al., 2014); (Rizwan, et al., 2017).

Além das designações acima mencionadas, os hidrogéis podem ser classificados como físicos ou reversíveis e químicos ou permanentes. A presença ativa de uma grande variedade de grupos

hidrófilos nas cadeias poliméricas é a principal causa pela elevada absorção de água nos hidrogéis. Há hidrogéis com uma vasta gama de composições químicas e de propriedades físico químicas, contribuindo para uma forte adaptação no que respeita às características das diversas dimensões e tipologias de feridas (Hoare & Kohane, 2008); (Rizwan, et al., 2017).

Os hidrogéis físicos apresentam estruturas que interagem a nível intra ou intermolecular, através de ligações iónicas, ligações hidrofóbicas e ligações de ponte de hidrogénio. No caso dos hidrogéis químicos, as ligações são de natureza covalente, sendo estas ligações muito mais fortes que as citadas anteriormente. Estes hidrogéis permanentes podem ser formados por processos de reticulação onde os polímeros hidrofóbicos sejam convertidos em hidrofílicos que originam uma rede polimérica ou ainda pela reticulação de polímeros hidrofílicos com outros materiais (Hoffman, 2012); (Ratner, et al., 2013). Na figura 3 estão representados os modelos esquemáticos da formação dos hidrogéis químicos e físicos.

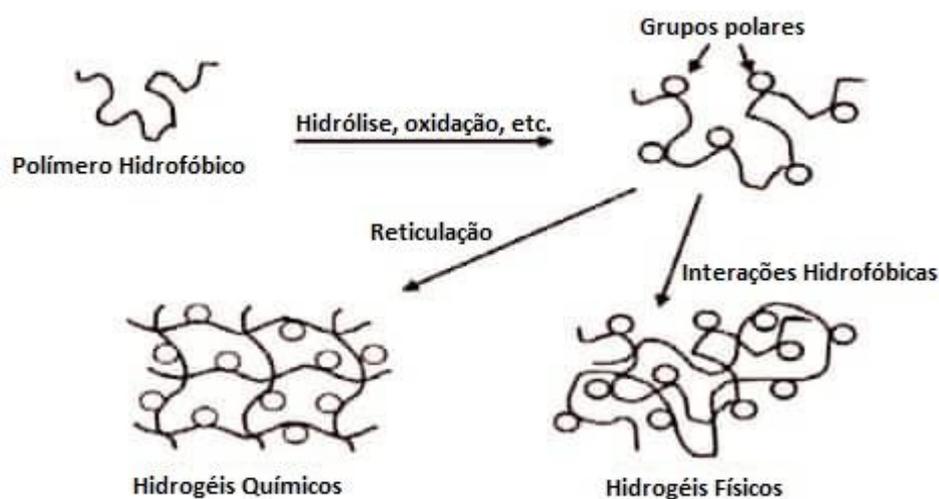


Figura 3. Esquema de métodos para a formação de hidrogéis químicos e físicos (Hoffman, 2012).

Os hidrogéis podem ter origem em polímeros naturais ou sintéticos. Os hidrogéis sintéticos apresentam uma maior estabilidade e durabilidade em relação aos hidrogéis de origem natural devido às suas ligações químicas mais fortes e coesas e com uma taxa de degradação consideravelmente mais baixa. Estes hidrogéis são preparados por processos de polimerização de homo- ou copolímeros sintéticos tais como a poli(acrilamida) (PAM), poli(álcool de vinilo) (PVA) e o polietilenoglicol (PEG) (Meikle, 2016); (Sudhakar, et al., 2018). No caso dos hidrogéis naturais, a elevada biocompatibilidade, a não toxicidade e o facto de serem componentes da matriz extracelular são pontos favoráveis à sua utilização no tratamento de feridas, no entanto por serem

de origem natural, a sua reprodutibilidade é inferior à dos polímeros sintéticos. Estes hidrogéis são provenientes de polímeros naturais como o colagénio, ácido hialurónico (HA), fibrina, quitosano e alginato (Yahia , et al., 2015).

Os hidrogéis apresentam características essenciais para a sua utilização no tratamento de feridas: (1) Extremamente sensível a ambientes fisiológicos e seus estímulos como temperatura, pH, força iónica; (2) A sua estrutura mole permite uma boa flexibilidade e elasticidade permitindo adaptar a qualquer superfície do corpo (Kamoun, et al., 2017); (3) Elevados níveis de *swelling* e porosidade, que permite a absorção de exsudato e difusão de nutrientes e gases; (4) Permeabilidade ao oxigénio, que previne a necrose; (5) Capacidade de reter água permite manter o leito da ferida húmido (Meikle, 2016); (6) Cobertura total da ferida sem provocar aderência; (7) A sua natureza fria provoca sensação de alívio da dor (Koehler, et al., 2018).

O hidrogel atua pela absorção e retenção dos líquidos exsudatos da ferida, que promove o aumento dos fibroblastos que irão remodelar a matriz celular e a migração dos queratinócitos para formação da pele (Kamoun, et al., 2017).

2.5.2.2. Hidrogéis de HPMC-HP β CD e HPMC- β CD

Os dois hidrogéis utilizados neste trabalho foram sintetizados usando hidroxipropilmetilcelulose (HPMC) e ciclodextrinas (CD), a β -ciclodextrina (β CD) e o seu derivado hidroxipropil- β -ciclodextrina (HP β CD).

As CD consistem num grupo de oligossacarídeos cíclicos, em forma de cone, com 6 (α -ciclodextrinas), 7 (β -ciclodextrinas), 8 (γ -ciclodextrinas) ou mais unidades de α -D-glucopiranosose unidas por ligações do tipo α -1,4 (Del Valle, 2004).

As CD exibem uma face exterior hidrofílica e uma cavidade interior hidrofóbica com capacidade para a criação de complexos de inclusão com diversas moléculas lipofílicas. A β -ciclodextrina (figura 4) é constituída por sete unidades de glicose, sendo vista como a ciclodextrina natural mais utilizada devido, essencialmente, ao seu baixo custo de obtenção, aos prazos de vigência das patentes bem como à dimensão da sua cavidade que permite encapsular uma larga variedade de compostos (Petry, et al., 2007).

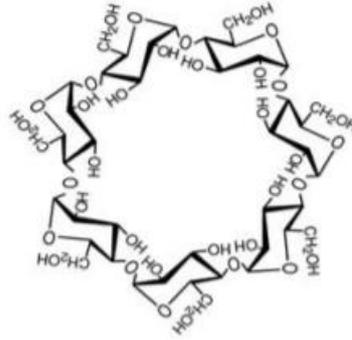


Figura 4. Estrutura da β CD (Petry, et al., 2007).

No entanto, a β CD apresenta baixos níveis de solubilidade em água, pelo que foram sintetizados derivados mais hidrossolúveis como é o caso da HP β CD (figura 5).

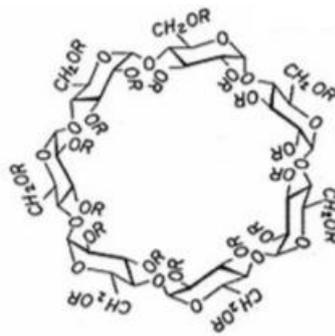


Figura 5. Estrutura da HP β CD (Petry, et al., 2007).

As CD formam agregados complexos com os medicamentos em solução aquosa. Os polímeros solúveis em água desempenham um papel importante na estabilização desses agregados. A adição destes polímeros é amplamente utilizado na indústria farmacêutica, como é o caso do polímero sintético celulósico, hidroxipropilmetilcelulose (HPMC). O HPMC vai aumentar a capacidade complexante das CD. A formação de um complexo ternário CD/medicamento/HPMC permite reduzir o volume da formulação e conseqüentemente reduz os custos de fabricação, ou seja, não vai ser necessário tanta quantidade de CD para solubilizar a mesma fração de medicamento (Jug, et al., 2004); (Saokham, et al., 2018). Saokham et al., referem na sua análise sobre CD e complexos CD/medicamentos que para solubilizar 3,0mg de glibenclamida eram necessárias 300mg de β CD, no entanto, com a adição de HPMC ao complexo binário permitiu reduzir a quantidade de β CD necessária para 120mg (Saokham, et al., 2018). Jug et al.,

demonstram no seu trabalho o efeito da adição de HPMC à solução aquosa contendo HP β CD e o *piroxicam* (medicamento anti-inflamatório), concluindo que a presença de 0,05% do polímero HPMC na solução triplicava a capacidade de solubilização do composto. Concluíram ainda que essa capacidade solubilizadora aumentava 4 vezes no caso de 1% HPMC na solução (Jug, et al., 2004).

2.6. Nanofibras

O surgimento das nanofibras é uma consequência do desenvolvimento da nanotecnologia. Em 1887 o físico britânico Charles Vernon Boys publicou um documento relativo ao desenvolvimento e produção de nanofibras (Tucker, et al., 2012).

Segundo a Fundação de Ciência Natural (NSF), as nanofibras são definidas como fibras com diâmetros inferiores a 100 nanômetros, sendo compostas por estruturas na escala nanométrica que podem originar não tecidos. Em relação aos não tecidos convencionais, as nanofibras apresentam uma relação superfície/volume extremamente superior. São vistas como estruturas contínuas e apresentam uma elevada flexibilidade, boa resistência axial, baixa densidade e apresentam uma estrutura com elevada porosidade, sendo esta um sistema dinâmico onde o tamanho e a forma dos poros podem mudar ao contrário das estruturas porosas rígidas convencionais. O seu tamanho reduzido permite o transporte de substâncias ativas e posterior libertação de forma eficiente e precisa. Todos estes fatores tornam as nanofibras interessantes para uma vasta gama de aplicações (Bharat, et al., 2012); (Mattoso, et al., 2012); (Greiner & Wendorff, 2007).

As nanofibras podem ser usadas em áreas muito diversas, como a filtração de água, em sensores químicos e biológicos, no setor têxtil, em nanocompósitos, na geração e armazenamento energético e no setor biomédico, onde se destaca a engenharia de tecidos e sistemas de administração de medicamentos (Aijaz, et al., 2013); (Bhagwan, et al., 2019).

Os métodos de preparação das nanofibras incluem a automontagem, molde estrutural, separação de fases e eletrospinning. As nanofibras podem ainda ser preparadas a partir de diversos polímeros, tais como o colagénio, a celulose, a queratina, o poliácido láctico (PLA), a fibroína da seda e polissacarídeos (Nasrollahzadeh, et al., 2019). Outro polímero que pode ser utilizado é a policaprolactona (PCL).

O PCL é um polímero sintético semicristalino, hidrofóbico, biocompatível e de degradação relativamente lenta. Apresenta ainda boa estabilidade em diversas condições ambientais e facilidade na sua produção e manipulação, muito devido à sua baixa temperatura de fusão e às suas elevadas propriedades viscoelásticas (Mondal, et al., 2016); (Middleton & Tipton, 2000). A degradação lenta do PCL é particularmente útil, sendo aconselhável a sua utilização em implantes de longa duração (Middleton & Tipton, 2000). Woodruff et al., defenderam que o PCL tem sido alvo de investigação em aplicações relacionadas com a engenharia de tecidos devido à sua elevada biocompatibilidade (Woodruff & Hutmacher, 2010).

O PCL pode ser sintetizado, ocorrendo a polimerização com abertura de anel da ϵ -caprolactona, obtendo-se a sua unidade repetitiva (figura 6). Este polímero tem sido utilizado com sucesso em engenharia de tecidos cardiovasculares e ósseos, em curativos de feridas, regeneração nervosa e em variados sistemas de administração de substâncias terapêuticas.

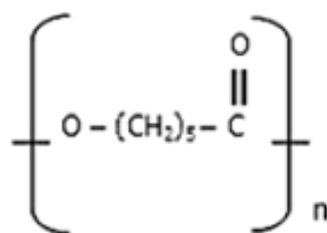


Figura 6. Estrutura química do PCL (Casarin, 2011).

O PCL apresenta boa solubilidade em solventes orgânicos, como o clorofórmio, o diclorometano, o benzeno, a dimetilformamida e o tolueno. É pouco solúvel em compostos como a acetona e o acetato de etilo, sendo insolúvel em álcool, em éter etílico e em éter de petróleo (Sinha, et al., 2004). Neste trabalho o PCL foi dissolvido numa solução de clorofórmio e dimetilformamida.

2.6.1. Aplicações de nanofibras por *electrospinning*

O *electrospinning* é o método mais utilizado para a produção das nanofibras. Esta técnica utiliza forças mecânicas e electroestáticas para a produção de fibras poliméricas, com diâmetros de escala nanométrica, utilizando uma vasta gama de materiais de partida (Khan, 2012); (D. Schiffman & L. Schauer, 2008).

O primeiro registo rudimentar desta técnica remonta ao século XVI, onde o físico inglês William Gilbert descreveu experiências envolvendo fenómenos eletrostáticos e magnéticos de um líquido, constituindo o primeiro registo de electropulverização. Durante o século XIX e XX diversos trabalhos nesta área foram sendo desenvolvidos e aperfeiçoados. No final da década de 1960, o físico e matemático britânico Geoffrey Taylor iniciou uma fundamentação teórica sobre eletrofiação, consolidada em termos matemáticos através da modulação da forma do cone de Taylor, que consistia na passagem de uma gota de fluido sob um campo elétrico (Tucker, et al., 2012).

O *electrospinning* é um processo que produz fibras de espessura muito fina, visto que força a passagem de uma solução viscosa de polímero, gota a gota, através do orifício da seringa, que ao entrar em contato com o campo elétrico é transformada numa estrutura denominada por cone de Taylor. Assim, caso determinados parâmetros como a viscosidade e a tensão superficial da solução sejam devidamente ajustados, a quebra deste cone é evitada sendo, portanto, formado um jato com elevada estabilidade progressivamente depositado no coletor (figura 7).

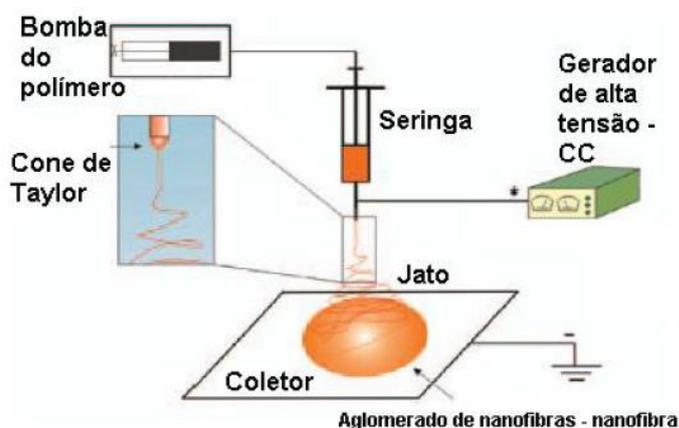


Figura 7. Esquema de montagem mais utilizado no *electrospinning* (He, et al., 2008).

Por *electrospinning* é possível produzir fibras com uma elevada porosidade e área superficial. Este processo de eletrofiação permite um controlo ao nível estrutural das fibras. Obtém-se fibras poliméricas multinível, na escala nano-, micro- e macro, que podem ser usadas com grande eficiência em aplicações biomédicas. Não obstante, este processo permite ainda uma elevada versatilidade, visto que permite usar uma variedade de polímeros, para além da inclusão de diversos compostos e substâncias ativas nas fibras, melhorando as propriedades biológicas ou de natureza mecânica dos materiais (Zong, et al., 2005); (Beachley & Wen, 2009). O *electrospinning* pode ser utilizado na maioria das soluções poliméricas, desde que o polímero apresente um peso

molecular suficientemente elevado e os solventes possam ser evaporados no trajeto entre a seringa e o coletor.

A tecnologia de *electrospinning* pode ter várias aplicações no campo da biomedicina. A sua utilização deve-se essencialmente à simplicidade do processo de geração de um material com uma elevada área de superfície e boa estabilidade mecânica, requisitos essenciais para a sua utilização no tratamento biomédico. Destaca-se três pontos fundamentais que são objeto de estudo nesta área: (1) Engenharia de tecidos; (2) Mecanismos de libertação controlada e (3) Cicatrização de feridas (Khan, 2012); (Zong, et al., 2005).

No presente trabalho, foi utilizado o polímero PCL conjuntamente com solventes adequados à eletrofiação da solução polimérica.

O PCL tem vindo a ser usado por diferentes investigadores para produção de fibras por *electrospinning*.

No trabalho desenvolvido por Suganya et al., foram produzidas nanofibras de PCL combinado com *aloe vera*. O biomaterial resultante apresentou uma significativa atividade de regeneração dos tecidos da pele (Suganya, et al., 2014).

Chen et al., utilizaram um polissacarídeo denominado heparina e encapsularam-no em nanofibras de Poli (L-lactídeo-co-e-caprolactona) (PLCL) e verificaram que o material resultante provocava uma forte inibição da proliferação dos fibroblastos, importante no processo de cicatrização das feridas cirúrgicas. Ao compararem com fibras sem libertação da heparina, confirmaram que era possível impedir o crescimento celular em dois dias (Chen, et al., 2010).

O trabalho desenvolvido por Okuda et al., pretendeu desenvolver uma estrutura de malha usando PLCL com libertação controlada de fármacos. Estes investigadores concluíram que variando os parâmetros de *electrospinning*, tais como o tamanho da malha e o diâmetro da fibra era possível controlar o tempo de libertação do fármaco (Okuda, et al., 2010).

Outro estudo realizado por Pan et al., consistiu na fabricação de um biomaterial formado por duas camadas, uma superior de nanofibra de PLCL produzida através de *electrospinning* e uma inferior de hidrogel. A camada superior ofereceu suporte mecânico à estrutura e a camada inferior permitiu a proliferação das células, possibilitando o crescimento da matriz celular (Pan, et al., 2014).

Katsogiannis et al., demonstraram a formação de fibras porosas de PCL recorrendo a um mecanismo de processamento de informações neurais e investigaram o efeito que as propriedades dos solventes tinham no tamanho e na morfologia das fibras de PCL (Katsogiannis, et al., 2015).

3. Desenvolvimento Experimental

3.1. Materiais e métodos

Neste trabalho foram sintetizados dois hidrogéis, usando HPMC e ciclodextrinas (hidroxipropil- β -ciclodextrina (HP β CD) e β -ciclodextrina (β CD). Foram ainda produzidas nanofibras de policaprolactona (PCL) pela técnica de *electrospinning*. Neste capítulo são apresentados os reagentes utilizados na síntese destes materiais, todo o procedimento experimental que decorreu durante o trabalho e os procedimentos de caracterização utilizados.

3.1.1. Reagentes

Na síntese dos hidrogéis foram utilizadas: (1) As ciclodextrinas hidroxipropil- β -ciclodextrina (HP β CD, M= 1309 g/mol) e β -ciclodextrina (β CD, M= 1135 g/mol), adquiridas na empresa Appli-Chem (USA); (2) A hidroxipropilmetilcelulose, Methocel K4M (HPMC, M=84,200 g/m), foi obtida na empresa VWR Prolab Chemicals (Portugal); (3) O agente de reticulação utilizado na síntese dos hidrogéis foi o 1,4-butenodiolglicidil éter (BDGE, M=202,25 g/mol), adquirido na empresa Acros Organics (Bélgica) e (4) O ácido clorídrico (M=36,46g/mol), comprado à Aldrich (Portugal).

Na produção das nanofibras os reagentes utilizados foram: (1) O polímero policaprolactona (PCL, M_w =45000), obtida na empresa Primex (Islândia); para a dissolução do PCL foram utilizados (2) Clorofórmio (M=119,38 g/mol) e (3) Dimetilformamida (M=73,09 g/mol) ambos obtidos da Sigma (Espanha).

Para a determinação do *swelling*, prepararam-se duas soluções tampão (ácida e básica) e nesse sentido utilizou-se: (1) Mono-cloridrato de L-histidina mono-hidratada (M=209,63 g/mol); (2) Mono-hidrogenofosfato disódico di-hidratado (M=177,99 g/mol); (3) Di-hidrogenofosfato de sódio di-hidratado (M=156,02 g/mol) obtidos na empresa Panreac (Espanha) e (4) Cloreto de sódio (M=58,44 g/mol). Para a correção do pH utilizou-se hidróxido de sódio (M=39,99 g/mol).

Na adsorção da colagenase, os reagentes utilizados foram: (1) Tricina (M=179,17 g/mol), adquirida na empresa Acros Organics (Bélgica); (2) Hidróxido de sódio (M=39,99 g/mol); (3) Cloreto de sódio (M=58,44 g/mol); (4) FALGPA (M=476,5 g/mol), adquirida na empresa Sigma-Aldrich (USA) e (5) Colagenase (10mg/mL), obtida na empresa Appli-Chem (USA).

3.2. Procedimento experimental

3.2.1. Síntese dos hidrogéis de HPMC-HP β CD e de HPMC- β CD

Os hidrogéis foram sintetizados de acordo com o procedimento descrito por Pinho et al. (2014). As amostras foram preparadas em triplicado para cada um dos diferentes hidrogéis. Assim, pesou-se $1,25\text{g} \pm 0,05\text{g}$ de HP β CD e β CD e dissolveu-se cada uma delas em 5mL de NaOH (0,2M), a 25°C sob agitação mecânica (200rpm) durante 5min. Após dissolução adicionou-se $0,0125\text{g} \pm 0,0005\text{g}$ de HPMC a cada solução, manteve-se sob agitação mecânica (200rpm), durante mais de 5min, a 25°C. De cada uma destas soluções, pipetou-se 5mL para placas de petri plásticas (5cm de diâmetro). O agente de reticulação (BDGE, 2mL) foi depois adicionado sob leve agitação manual para permitir uma melhor distribuição homogênea, sendo seguidamente as caixas de petri seladas com parafilme e mantidas sob agitação mecânica (200rpm) durante 2min, a 25°C. Para completar o processo de reticulação, as placas de petri foram colocadas sob agitação (60rpm), durante 16h, a 50°C. Passado esse período de tempo, os hidrogéis foram imersos em água ultrapura durante 8h, a 25°C, de forma a proporcionar o seu inchaço. Seguidamente os hidrogéis foram transferidos para uma solução de HCl (10mM) onde permaneceram durante 16h, a 25°C. Após esse tempo foram novamente imersos em água ultrapura durante 7 dias, a uma temperatura de 25°C. A secagem das amostras foi realizada numa estufa, durante 48h, a 40°C. Por fim os hidrogéis foram transferidos para um exsiccador de forma a estabilizar o seu peso. O peso registado dos hidrogéis de HPMC-HP β CD e de HPMC- β CD foi de $6,5990\text{g} \pm 0,05\text{g}$ e $7,4066\text{g} \pm 0,05\text{g}$ respetivamente.

3.2.2. Preparação das nanofibras de PCL

As nanofibras foram sintetizadas utilizando o polímero PCL (Policaprolactona, M_w 4500) usando um equipamento de *electrospinning* modelo NF-103 da MECC (figura 8) que se encontra nas instalações da Fibrenamics, na Universidade do Minho.

No total foram realizados 14 ensaios (que serão descritos na alínea 3.2.2.1 – Condições de *electrospinning* e ensaios realizados), utilizando 5 soluções de PCL de diferente concentração: 15%, 16%, 20%, 30% e 40% (W/V). Inicialmente foi preparado o solvente, composto por

clorofórmio:DMF (8:2). Para isso, utilizaram-se 16mL de clorofórmio e 4mL de DMF, de forma a preparar um volume de 20mL de solução de solvente. De seguida, dissolveu-se a quantidade de PCL necessária de forma a atingir os valores de concentrações pretendidos e a solução foi mantida sobre agitação magnética (200rpm), durante 1h, de forma a promover a sua solubilização.



Figura 8. *Electrospinning* modelo NF-103 da MECC.

Definiram-se os parâmetros desejados no equipamento de *electrospinning* para a produção das fibras (conforme descrito no ponto 3.2.3.3.) e a extração foi ligada. Foi colocada uma folha de alumínio no coletor por baixo da seringa e outra no coletor de amostra. Posteriormente, a solução polimérica foi inserida numa seringa, tendo sido necessário garantir que não tinha bolhas de ar. Foram encaixados os adaptadores, agulha e tubo na seringa com a solução de PCL sendo de seguida inserida num suporte para dar início ao processo de *electrospinning*. A amostra foi depositada no papel de alumínio, no coletor fixo (figura 9) e depois seca durante 24h à temperatura ambiente.



Figura 9. Papel de alumínio no coletor fixo para a deposição da nanofibra.

3.2.3. Incorporação da colagenase nas matrizes poliméricas

3.2.3.1. Adsorção da colagenase nos hidrogéis

O processo de adsorção da colagenase pelos hidrogéis foi realizado de acordo com o procedimento descrito por Van Wart & Steinbrink (1981). Inicialmente preparou-se uma solução tampão. Nesse sentido, pesou-se $2,24\text{g} \pm 0,05\text{g}$ de tricina e adicionou-se a 200mL de água ultrapura. Após a dissolução da tricina, acrescentou-se 20mL de cloreto de sódio (5M). De seguida, misturou-se bem a solução e procedeu-se ao ajustamento do pH para um valor de 7,5 a 25^oC. Após o ajuste de pH adicionaram-se 25mL de cloreto de cálcio (100mM) e completou-se a totalidade do balão volumétrico de 250mL, com água ultrapura. Por fim, o valor de pH foi novamente verificado e corrigido para 7,5. Para os ajustes de pH utilizaram-se soluções de NaOH (1M) ou HCl (1M).

Após a preparação da solução tampão, seguiu-se a preparação da solução de colagenase (10mg/mL). Assim, pesaram-se 100mg de colagenase num *falcon* de 15mL. Seguidamente, adicionaram-se 10mL da solução tampão.

Colocaram-se 2 amostras de cada hidrogel (HPMC-HP β CD e de HPMC- β CD) com 30mg cada um numa tina de vidro e adicionaram-se 5mL de solução de colagenase. As amostras foram incubadas numa estufa a 37^oC durante 24h.

3.2.3.2. Incorporação da colagenase no PCL

A colagenase foi incorporada no PCL antes do *electrospinning*. Nesse sentido, inicialmente foi preparado uma solução tampão e uma solução de colagenase (conforme descrito no ponto 3.2.3.6 Avaliação da atividade da colagenase). Após a solubilização do PCL no solvente (de acordo com a descrição na alínea 3.2.2. Preparação das nanofibras de PCL), foram adicionados 5mL da solução de colagenase, em pequenas porções durante aproximadamente 30 minutos, sob agitação mecânica (200rpm) para promover o processo de distribuição e dispersão da colagenase no solvente.

3.2.3.3. Condições de *electrospinning* e ensaios realizados

As condições desejadas em termos de diâmetro da seringa, campo magnético, distância do *slider* ao coletor fixo, caudal de saída da seringa, tempo de limpeza da seringa e tempo de deposição no coletor fixo foram definidos. Realizaram-se 14 ensaios, numerados de 1 a 14, com parâmetros diferentes, tendo sido selecionado 6 amostras (3 com a colagenase incorporada e os restantes 3 sem colagenase) para caracterização posterior. Os ensaios de que resultaram estas 6 amostras descrevem-se abaixo:

No ensaio 4 (E4), foi utilizado uma solução de PCL 20% (sem colagenase) numa seringa de 16mm de diâmetro com capacidade para 12mL, campo magnético de 24Kv, *slider* a uma altura de 280mm, caudal de 1mL.h⁻¹, limpeza da seringa a cada 90 segundos e com um tempo de deposição de 1h.

No ensaio 7 (E7), foi utilizado uma solução de PCL 20% (sem colagenase) numa seringa de 16mm de diâmetro com capacidade para 12mL, campo magnético de 28Kv, *slider* a uma altura de 280mm, caudal de 1mL.h⁻¹, limpeza da seringa a cada 90 segundos e com um tempo de deposição de 1h.

No ensaio 8 (E8), foi utilizado uma solução de PCL 20% (sem colagenase) numa seringa de 16mm de diâmetro com capacidade para 12mL, campo magnético de 28Kv, *slider* a uma altura de 220mm, caudal de 1mL.h⁻¹, limpeza da seringa a cada 90 segundos e com um tempo de deposição de 1h.

No ensaio 11 (E11), foi adicionado 5mL de solução de colagenase e utilizado uma solução de PCL 16% numa seringa de 16mm de diâmetro com capacidade para 12mL, campo magnético de

24Kv, *slider* a uma altura de 280mm, caudal de 0.6mL.h⁻¹, limpeza da seringa a cada 90 segundos e com um tempo de deposição de 1h30min.

No ensaio 13 (E13), foi adicionado 5mL de solução de colagenase e utilizado uma solução de PCL 20% numa seringa de 16mm de diâmetro com capacidade para 12mL, campo magnético de 28Kv, *slider* a uma altura de 280mm, caudal de 0.6mL.h⁻¹, limpeza da seringa a cada 90 segundos e com um tempo de deposição de 1h15min.

No ensaio 14 (E14), foi adicionado 5mL de solução de colagenase e utilizado uma solução de PCL 20% numa seringa de 16mm de diâmetro com capacidade para 12mL, campo magnético de 28Kv, *slider* a uma altura de 280mm, caudal de 0.4mL.h⁻¹, limpeza da seringa a cada 90 segundos e com um tempo de deposição de 1h15min.

3.2.4. Caracterização das amostras

3.2.4.1. Espectroscopia no Infravermelho com Transformadas de Fourier (FTIR)

As nanofibras de PCL e os hidrogéis de HPMC-HP β CD e de HPMC- β CD foram analisados através da espectroscopia no infravermelho com transformadas de Fourier (FTIR) com ATR, utilizando o *software* Spectrum (FTIR IRAffinity). O equipamento encontra-se no Laboratório de Análise Avançada de Materiais Têxteis, na Universidade do Minho. Para a análise foi utilizado um espectrómetro FTIR Shimadzu Iraffinity-1S (figura 10), no modo de medição da refletância, na apodização Happ-Genzel, utilizando um cristal de diamante para análise das amostras. Os espectros foram analisados em 45 varrimentos, entre 400 a 4000 cm⁻¹ com uma resolução de 4 cm⁻¹.



Figura 10. Espectrómetro FTIR Shimadzu Iraffinity-1S.

3.2.4.2. Calorimetria Diferencial de Varrimento (DSC)

As medições da calorimetria diferencial de varrimento (DSC) das amostras de nanofibra de PCL e dos hidrogéis de HPMC-HP β CD e de HPMC- β CD, foram realizadas no equipamento DSC822 Mettler Toledo (figura 11), utilizando o *software* Mettler. O aparelho está localizado no Laboratório de Análise Avançada de Materiais Têxteis, na Universidade do Minho. As amostras foram aquecidas de 0 a 500°C com um aumento gradual de temperatura de 10°C.min⁻¹, numa atmosfera de azoto (80mL/min).

As amostras foram seladas em cadinhos antes da sua introdução no aparelho e o seu peso variou entre 6 a 10 mg.



Figura 11. DSC822 Mettler Toledo.

3.2.4.3. Análise Termogravimétrica (TGA)

A análise termogravimétrica (TGA) permitiu determinar a percentagem de perda de massa das amostras de nanofibras de PCL e dos hidrogéis de HPMC-HP β CD e de HPMC- β CD. O equipamento utilizado foi um analisador termogravimétrico Hitachi STA7200 (figura 12), utilizando o *software* TA7000 Measurement Hitachi STA7200. O equipamento encontra-se no Laboratório de Análise Avançada de Materiais Têxteis, na Universidade do Minho. As amostras foram aquecidas entre 20 a 600°C, com uma velocidade de aquecimento de 10°C.min⁻¹, numa atmosfera de azoto (200mL/min).

Foram utilizados cadinhos para selar as amostras sendo posteriormente introduzidas no equipamento. A massa das amostras variou entre 6 a 10 mg.



Figura 12. Analisador termogravimétrico Hitachi STA7200.

3.2.4.4. Microscopia Eletrónica de Varrimento (SEM)

A microscopia eletrónica de varrimento é uma técnica com a capacidade de produzir imagens tridimensionais de alta resolução das amostras, com o objetivo de uma posterior análise da sua morfologia e dimensão. Nesse sentido, foram analisadas 6 amostras de nanofibras de PCL (3 com a colagenase incorporada e as restantes 3 sem colagenase). O equipamento utilizado foi o microscópio eletrónico de varrimento Nova NanoSEM 200 (figura 13), localizado nos Serviços de Caracterização de Materiais da Universidade do Minho (SEMAT). Os parâmetros usados na análise foram HV= 10,0kV, mode SE, det ETD, WD entre 5,0 a 10,2mm \pm 0,5mm e a ampliação variou entre 1000 e 50000x.

Visto que o polímero PCL não é um material condutor, antes da sua introdução no equipamento, foi necessário recorrer à deposição de uma ténue camada de ouro sobre as amostras, através da técnica de *sputtering*.



Figura 13. Microscópio Nova NanoSEM 200 (SEMAT, 2019).

3.2.4.5. *Swelling*

Os hidrogéis de HPMC-HP β CD e de HPMC- β CD e as nanofibras de PCL foram avaliados de modo a determinar a sua capacidade de inchaço. Foram analisados em três condições diferentes: em água ultra pura, em suor ácido e em suor alcalino. Nesse sentido, foram preparadas as 2 soluções de suor, segundo a norma ISO 105-E04: 1994.

Para a solução de suor alcalino, dissolveu-se 0,100g de mono-cloridrato de L-histidina monohidratada, 1,000g de cloreto de sódio e 1,000g de mono-hidrogenofosfato disódico di-hidratado em 200mL de água e acertou-se o valor de pH para 8 usando uma solução de hidróxido de sódio 0,1mol/L.

No caso da solução de suor ácido, dissolveu-se 0,100g de mono-cloridrato de L-histidina monohidratada, 1,000g de cloreto de sódio e 0,440g de di-hidrogenofosfato de sódio di-hidratado em 200mL de água e acertou-se o valor de pH para 5,5 usando uma solução de hidróxido de sódio 0,1mol/L.

As amostras de hidrogel e nanofibra de PCL foram pesadas numa balança Saitouris BL 1,205 ($d=0,1\text{mg}$). Todas as amostras tinham a massa de $50\text{mg} \pm 5\text{mg}$ e foram imersas em 5mL de cada uma das 3 condições. As amostras foram retiradas 24h depois e o excesso de água foi removido com papel. A capacidade de *swelling* (Q) foi calculada através da equação 2.

Equação (2):
$$Q(\%) = \frac{W-W_0}{W_0} \times 100$$

Em que Q corresponde à capacidade de inchaço ou *swelling* em percentagem, W ao peso final da amostra e W_0 ao peso inicial da amostra.

3.2.4.6. Avaliação da atividade da colagenase

A avaliação da libertação da colagenase dos hidrogéis e das nanofibras preparados foi feita através da medição da atividade da enzima de acordo com o procedimento descrito por Van Wart & Steinbrink (1981). O ensaio enzimático para avaliação da atividade da colagenase foi realizado no equipamento EZ Read 2000 Microplate Reader (figura 14), utilizando o *software* Galapagos. Todos os ensaios foram analisados a uma absorvância de 345nm, durante 5 minutos com medições intervaladas por 30 segundos. Neste equipamento determinou-se a curva de calibração que permite calcular a quantidade de enzima em solução.



Figura 14. Medidor de microplacas EZ Read 2000 Microplate Reader.

Inicialmente foram preparadas 3 soluções: (1) Tampão; (2) FALGPA e (3) Colagenase. Para a solução tampão, pesou-se $2,24g \pm 0,05g$ de tricina e adicionou-se 200mL de água ultrapura. Após

a dissolução da tricina, acrescentou-se 20mL de cloreto de sódio (5M). De seguida, misturou-se bem a solução e procedeu-se ao ajustamento do pH para um valor de 7,5, a 25°C. Após o ajuste, adicionou-se 25mL de cloreto de cálcio (100mM) e completou-se a totalidade do balão volumétrico de 250mL, com água ultrapura. Por fim, o valor de pH foi novamente verificado e corrigido para os 7,5. O FALGPA foi o reagente utilizado para a deteção da atividade da colagenase. Na preparação da sua solução adicionou-se 0,96mg ± 0,05mg em 2mL de água ultra pura sob agitação magnética, durante 30 minutos. De seguida, o pH foi ajustado no valor de 7,5, a uma temperatura de 25°C. Para os ajustes de pH das soluções tampão e de FALGPA utilizaram-se soluções de NaOH (1M) ou HCl (1M), conforme o mais indicado. Por fim preparou-se a solução de colagenase, imediatamente antes da sua utilização. Nesse sentido, adicionou-se 100mg ± 0,05mg de colagenase em 10mL de tampão.

Após a preparação das soluções seguiu-se o procedimento para determinar a curva de calibração. Nesse sentido, preparou-se uma solução de trabalho (ST) de colagenase (1,2mg/mL), através da dissolução de 0,0024g ± 0,0001g em 2mL da solução de tampão, sob agitação mecânica (200rpm) de forma a promover a solubilização. A solução foi mantida sob gelo até ao momento da sua utilização. Para o ensaio enzimático foi utilizado uma microplaca tendo sido analisadas 6 poços com diferentes concentrações de colagenase e um poço para o “branco”. Primeiramente adicionou-se 100µL a todos os poços a ser utilizados (exceto o primeiro poço). Seguidamente, foi adicionado 200µL da ST no primeiro poço e desse volume transferiram-se 100µL para o poço seguinte e assim sucessivamente até ao sexto poço, de forma a ter um fator de diluição de 0, 2, 4, 8, 16 e 32, respetivamente. Do sexto poço foi descartado 100µL. Por fim, foi adicionado 150µL da solução de FALGPA. A microplaca foi incubada durante 2 min a 25°C e foi medida a absorção a 345nm.

Para a quantificação da colagenase em solução foi feita ao tempo 0 e 24h depois (conforme descrito no ponto 3.2.3.1 Adsorção da colagenase nos hidrogéis).

Para determinar a quantidade de enzima presente em solução foram aplicadas as seguintes equações:

Equação (3):
$$\Delta OD_{345nm} = A_1 - A_2$$

Em que A_1 é a OD média no tempo 1 e A_2 é a média no tempo 2, ambos na fase linear e com intervalo de pelo menos 1min.

Equação (4): $\Delta OD_c = \Delta OD_{345nm} - \Delta OD_{branco}$

Equação (5): $Colagenase \text{ (U/mL)} = \frac{\Delta OD_c}{\Delta T} \times 0,25 \times DF$
 $0,53 \times 0,1$

Onde, 0,25 é o volume total (mL) da mistura reacional, DF é o fator de diluição, 0,53 é o coeficiente de extinção milimolar de FALGPA a 345nm (determinado experimentalmente pela Sigma-Aldrich) e 0,10 é o volume (mL) da solução enzimática utilizada (Van Wart & Steinbrink, 1981).

4. Apresentação, Análise e Discussão dos Resultados

4.1. Síntese dos Hidrogéis e das Nanofibras de PCL

Os hidrogéis de HPMC-HP β CD e de HPMC- β CD foram sintetizados de acordo com o procedimento descrito por Pinho et al. (2014). Para a síntese dos dois hidrogéis foram utilizados duas CD diferentes (HP β CD e β CD) e a hidroximetilpropilcelulose (HPMC). Pinho et al. (2014), descrevem que a preparação de hidrogéis com β CD ou HP β CD e usando BDGE, precisa de HPMC para conveniente gelificação. O agente reticulante, BDGE, foi utilizado para promover o *crosslinking*. O BDGE apresenta dois grupos glicidilo capazes de reagir simultaneamente com o grupo hidróxido da CD ou o grupo éter do HPMC. A longa cadeia carbonada do BDGE permite distanciar as moléculas da CD das moléculas da celulose e obter um hidrogel mais flexível (Pinho, et al., 2014); (Nicoletti, et al., 2013).

Os hidrogéis de HPMC-HP β CD e de HPMC- β CD, após a sua preparação, foram secos e pesados, apresentando $6,5990g \pm 0,05g$ e $7,4066g \pm 0,05g$ respetivamente, exibindo um aspeto opaco e uma superfície lisa, fácil de manusear (figura 15). Quando imersos na água mantêm a sua estrutura e apresentam uma capacidade superabsorvente.



Figura 15. Aspeto dos hidrogéis HPMC-HP β CD (esquerda) e HPMC- β CD (direita).

As nanofibras de PCL foram produzidas por intermédio da técnica de *electrospinning*. O polímero hidrofóbico foi dissolvido em clorofórmio:DMF, à temperatura ambiente, tendo a solução ficado sob agitação mecânica (200rpm) durante 1h.

A análise macroscópica das nanofibras precedeu a sua observação pelo SEM. Não tendo sido visualizado qualquer diferença, nos 14 ensaios efetuados, em relação às alterações dos parâmetros de *electrospinning*, as nanofibras foram selecionadas para caracterização de acordo com a sua concentração em solução. As amostras com concentração de polímero inferior a 20% demonstraram um aspeto pouco consistente e apresentaram dificuldades aquando da sua remoção do papel de alumínio. As amostras com concentrações superiores a 20% evidenciaram uma densidade excessiva com o aumento da concentração da solução polimérica. Nesse sentido, a concentração do polímero que pareceu mais adequada foi a de 20%, abaixo ilustrada na amostra E14 (figura 16).



Figura 16. Aspeto da nanofibra de PCL (E14).

Estes resultados concordam com os de Matos (2016), segundo o qual as amostras de PCL produzidas a partir de uma solução com uma concentração de 20%, eram as que evidenciavam melhores características morfológicas e estruturais e demonstravam um aproveitamento superior a 90% após a remoção da nanofibra do papel de alumínio. O autor refere ainda que as amostras de PCL a partir de soluções com concentração de 30% apresentavam-se muito densas, com um aspeto de filme com pouca opacidade (Matos, 2016).

4.2. Caracterização dos hidrogéis e nanofibras

4.2.1. FTIR-ATR

A espectroscopia de infravermelho com transformadas de Fourier (do inglês *Fourier Transform Infrared Spectroscopy* – FTIR) é uma técnica de espectroscopia na faixa da radiação infravermelha (IV) muito utilizada na caracterização química de diversos materiais, entre eles os poliméricos, permitindo a detecção das variações na sua estrutura molecular. O FTIR é um método analítico que permite a análise de matéria através da utilização de uma fonte incandescente de luz, que emite um raio brilhante na gama dos IV (Leite, 2008); (Ricci, et al., 2015). A reflexão total atenuada (ATR) é uma técnica de amostragem que pode ser utilizada em conjunto com o FTIR. A análise FTIR-ATR torna possível a obtenção dos espectros diretamente da amostra no estado sólido ou líquido, não havendo necessidade de uma preparação adicional. Esta análise tem como base a identificação das bandas de estiramento ou de deformação associadas aos respetivos grupos funcionais constituintes do material. No entanto, a perceção e posterior interpretação dos espectros é dificultada pela ocorrência de sobreposições das bandas características dos diversos grupos funcionais (Lima, 2015); (Barros, et al., 2014); (Rosas-Casarez, et al., 2014).

4.2.1.1. Hidrogéis de HPMC-HP β CD e de HPMC- β CD

Os hidrogéis sintetizados foram caracterizados por FTIR-ATR. Na figura 17, apresenta-se o espectro FTIR do hidrogel de HPMC- β CD. Nela estão também representados os componentes individuais constituintes da rede polimérica (HPMC e β CD). As bandas de absorção mais relevantes para a interpretação dos espectros assim como os respetivos números de onda também estão sinalizadas na figura.

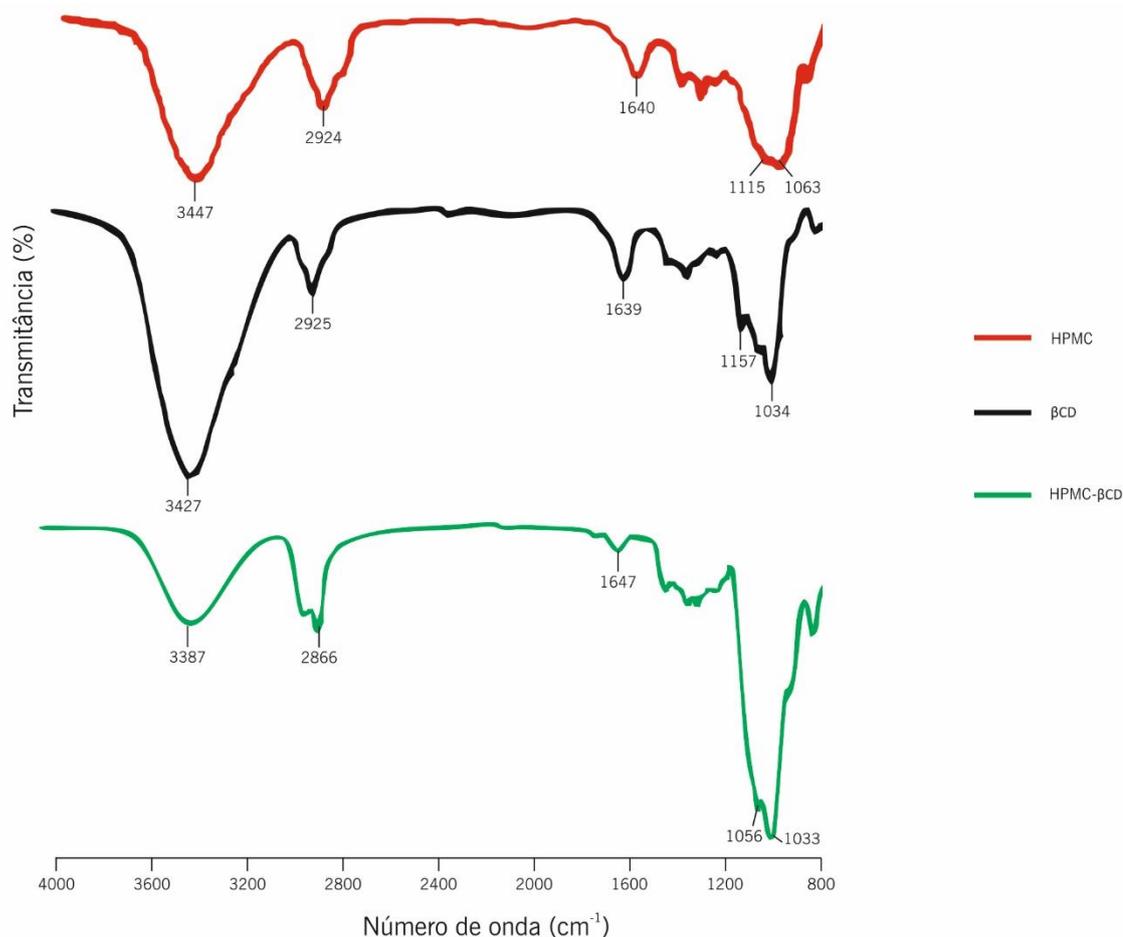


Figura 17. Espectros FTIR do HPMC (vermelho), β CD (preto) e HPMC- β CD (verde).

Os componentes individuais foram descritos e analisados por Pinho et al. O espectro do HPMC apresenta um espectro bastante equivalente ao espectro da CD e as bandas mais significativas foram: (1) A 3447 cm^{-1} , é devido à vibração de estiramento dos grupos hidroxilo; (2) A 2924 cm^{-1} , relativos à vibração de estiramento assimétrico da ligação (-CH); (3) A 1640 cm^{-1} , correspondente às ligações -CH dos grupos (-CH₂) e (4) A 1115 cm^{-1} e 1063 cm^{-1} , relativos às vibrações de estiramento assimétricas dos grupos éter (-C-O-C). No espectro da β CD, as bandas mais importantes são atribuídas aos picos: (1) A 3416 cm^{-1} , está associado às vibrações de estiramento dos grupos (-OH); (2) A 2924 cm^{-1} , relativo à vibração de estiramento assimétrico da ligação (-CH) do metileno; (3) A 1645 cm^{-1} , está associado às interações de hidrogénio; (4) A 1157 cm^{-1} , é devido à vibração de estiramento dos grupos carbonilo e (5) A 1029 cm^{-1} , relativos às vibrações de estiramento assimétricas dos grupos éter. (Miranda, et al., 2010); (Sun, et al., 2003); (Pinho, et al., 2014).

No espectro do HPMC- β CD, as principais bandas estão atribuídas a considerar são: (1) A 3383 cm^{-1} , relativo às vibrações de estiramento dos grupos (-OH); (2) A 2866 cm^{-1} , corresponde à

vibração de estiramento assimétrico da ligação (-CH); (3) A 1647 cm^{-1} , está associado às ligações -CH dos grupos (-CH₂) e (4) A 1076 cm^{-1} e 1026 cm^{-1} , relativo às vibrações de estiramento assimétricas dos grupos éter (Miranda, et al., 2010); (Sun, et al., 2003); (Pinho, et al., 2014).

O gráfico com as bandas de absorção mais relevantes, relativos aos espectros de FTIR do hidrogel de HPMC-HPβCD e os respectivos componentes individuais (HPMC e HPβCD), estão descritos na figura 18, bem como os respectivos números de onda.

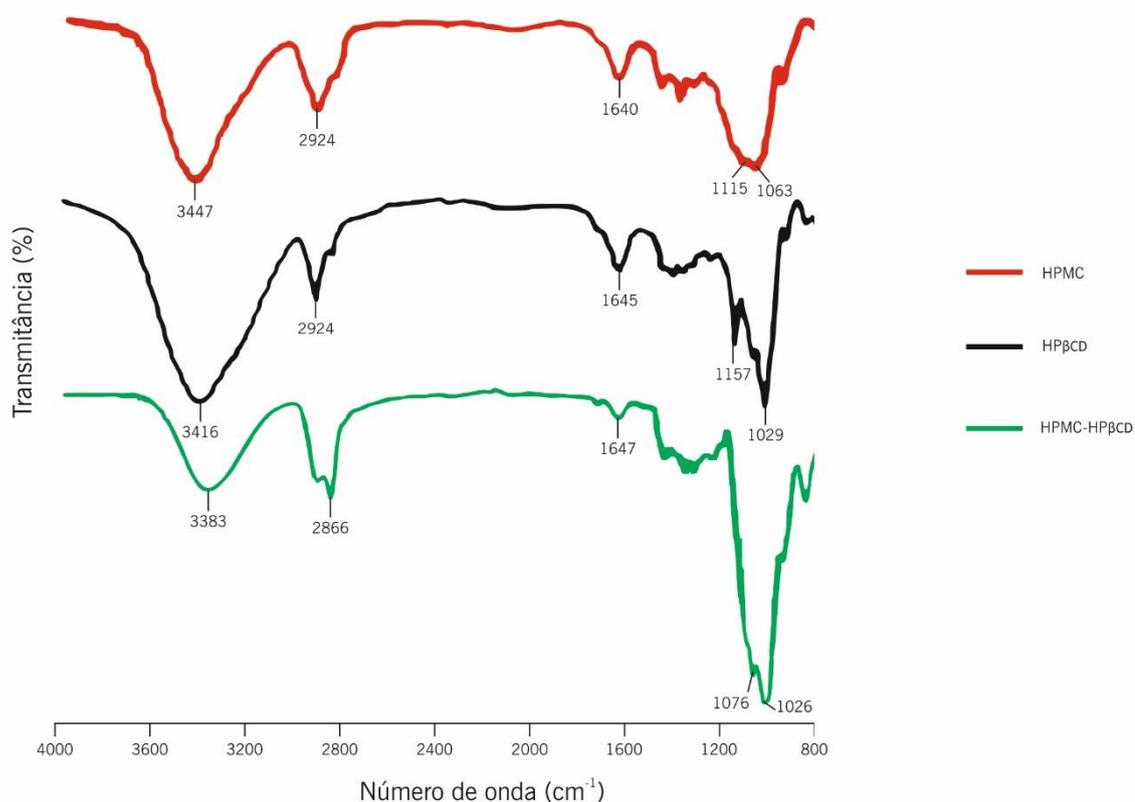


Figura 18. Espectros FTIR do HPMC (vermelho), HPβCD (preto) e HPMC-HPβCD (verde).

Os componentes individuais (HPMC e HPβCD) foram descritos e analisados por Pinho et al. O espectro de HPMC está descrito acima, relativamente ao FTIR da figura 17. O espectro da HPβCD apresenta picos mais significativos no comprimento de onda: (1) A 3416 cm^{-1} , está associado às vibrações de estiramento dos grupos (O-H); (2) A 2925 cm^{-1} , relativo à vibração de estiramento assimétrico da ligação -CH; (3) A 1639 cm^{-1} , está associado às ligações -CH dos grupos (-CH₂); (4) A 1157 cm^{-1} , correspondente à vibração de estiramento dos grupos (C-O) e (5) A 1034 cm^{-1} , relativos às vibrações de estiramento assimétricas dos grupos éter. (Rodríguez-Tenreiro, et al., 2006); (Schwingel, et al., 2008); (Zhang, et al., 2013); (Pinho, et al., 2014).

O espectro de HPMC-HP β CD apresenta um espectro muito semelhante ao espectro de HPMC- β CD e as bandas mais significativas são: (1) A 3387 cm^{-1} , é devido às vibrações de estiramento dos grupos hidroxilo; (2) A 2866 cm^{-1} , está associado à vibração de estiramento assimétrico da ligação (-CH) do metileno; (3) A 1639 cm^{-1} , correspondente às ligações -CH dos grupos (-CH₂) e (4) A 1056 cm^{-1} e 1033 cm^{-1} , relativo às vibrações de estiramento assimétricas dos grupos éter (-C-O-C) (Rodríguez-Tenreiro, et al., 2006); (Schwingel, et al., 2008); (Zhang, et al., 2013); (Pinho, et al., 2014).

4.2.1.2. Nanofibras de PCL

Na figura 19, estão representados os espectros FTIR das amostras de nanofibras de PCL sem a incorporação da colagenase. Nela está também representado o espectro de FTIR da policaprolactona (PCL) padrão. As bandas de absorção mais significativas estão representadas com o respetivo valor de número de onda.

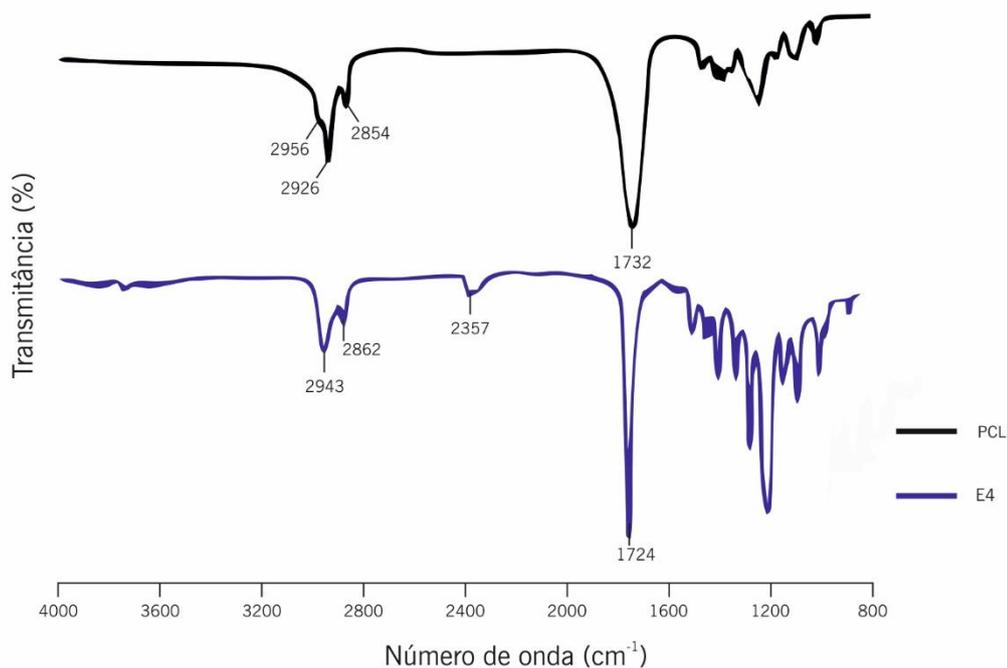


Figura 19. Espectros FTIR das amostras de nanofibras de PCL sem colagenase: PCL (preto) e E4 (azul).

O espectro de FTIR do PCL foi descrito e analisado por Chen, et al., e apresenta os picos mais significativos: (1) A 2956 cm^{-1} , 2926 cm^{-1} e 2854 cm^{-1} , estão associados às vibrações de estiramento assimétrico e simétrico do grupo (-CH₂) e (2) A 1732 cm^{-1} é possível verificar a banda

de absorção mais evidente do espectro, correspondente ao estiramento dos grupos carbonilo (Ramírez-Cedillo, et al., 2019); (Chen, et al., 2019).

Relativamente ao espectro de FTIR da amostra E4, as bandas de absorção mais significativas são: (1) A 2943 cm^{-1} e 2862 cm^{-1} , correspondente ao estiramento assimétrico e simétrico do grupo metilo e (2) A 1724 cm^{-1} , é possível verificar o pico mais intenso do espectro que está associado ao estiramento dos grupos carbonilo (Ramírez-Cedillo, et al., 2019); (Chen, et al., 2019).

Do ponto de vista químico, as amostras de nanofibra de PCL são semelhantes ao nível da sua estrutura e os gráficos das restantes amostras sem colagenase seriam uma sobreposição dos mesmos, por isso foi apenas colocado o gráfico FTIR da amostra E4.

A figura 20 apresenta o espectro de FTIR da amostra de nanofibra de PCL E4, com a incorporação da colagenase. Nela também se apresenta o espectro do polímero padrão de PCL. As bandas de absorção mais relevantes estão assinalados na figura de acordo com o respetivo número de onda.

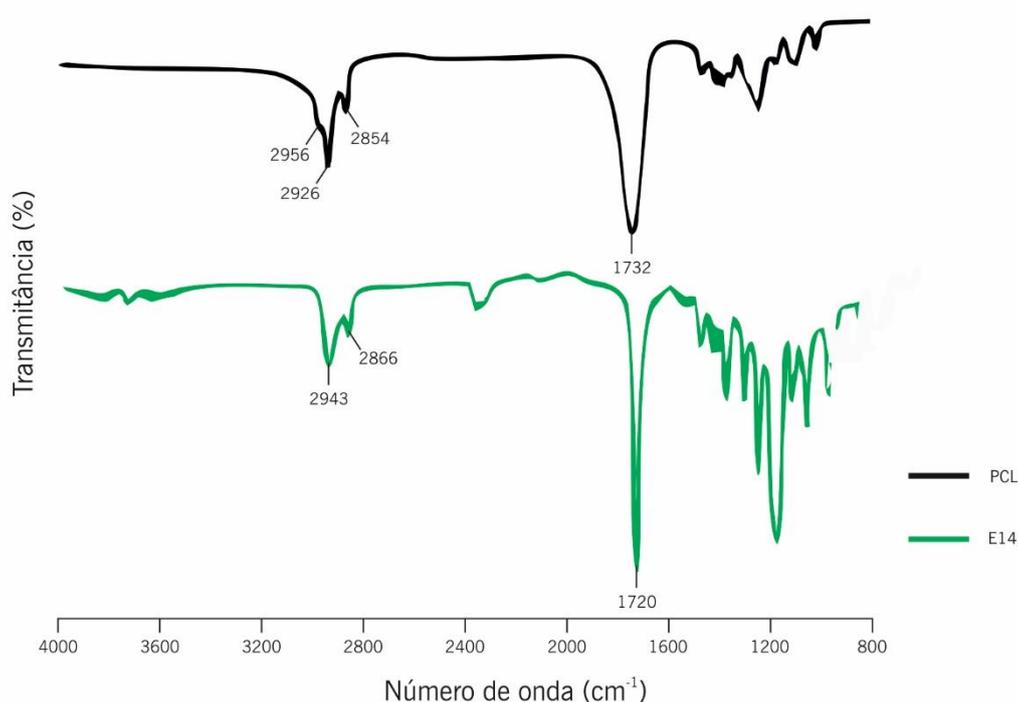


Figura 20. Espectros FTIR das amostras de nanofibras de PCL com colagenase: PCL (preto) e E14 (verde).

O espectro de FTIR do PCL foi descrito e analisado por Chen, et al., e a sua caracterização está descrita acima, relativamente ao FTIR da figura 19.

Em relação ao FTIR da amostra E14, os picos com maior relevância são: (1) A 2943 cm^{-1} e 2866 cm^{-1} , que estão associados ao estiramento assimétrico e simétrico do grupo (-CH₂) e (2) A 1720 cm^{-1} , é relativo à banda de absorção mais intensa do espectro que está associada ao estiramento dos grupos carbonilo (Ramírez-Cedillo, et al., 2019); (Chen, et al., 2019).

Do ponto de vista químico, as amostras de nanofibra de PCL são semelhantes porque a concentração de colagenase incorporada é a mesma e por essa razão foi apenas colocado o gráfico FTIR da amostra E14.

4.2.2. DSC

A calorimetria diferencial de varrimento (do inglês *Differential Scanning Calorimeter* - DSC) é uma técnica de caracterização de análise térmica que mede a alteração das propriedades físicas de diversos materiais, entre eles os polímeros, em função da temperatura e do tempo. Durante uma mudança de temperatura, o equipamento mede a quantidade de calor irradiada ou absorvida pela amostra com base na diferença de temperatura entre a amostra e o material de referência. O estudo do comportamento térmico dos polímeros permite obter informações de carácter qualitativo e quantitativo sobre as transformações físicas e químicas que envolvem os processos endotérmicos, exotérmicos e de mudanças da sua capacidade calorífica (Gill, et al., 2010); (Suksaeree, et al., 2015).

4.2.2.1. Hidrogéis de HPMC-HP β CD e de HPMC- β CD

Na figura 21, estão representados os termogramas do hidrogel de HPMC- β CD e também dos respetivos componentes individuais que constituem a rede polimérica (HPMC e β CD).

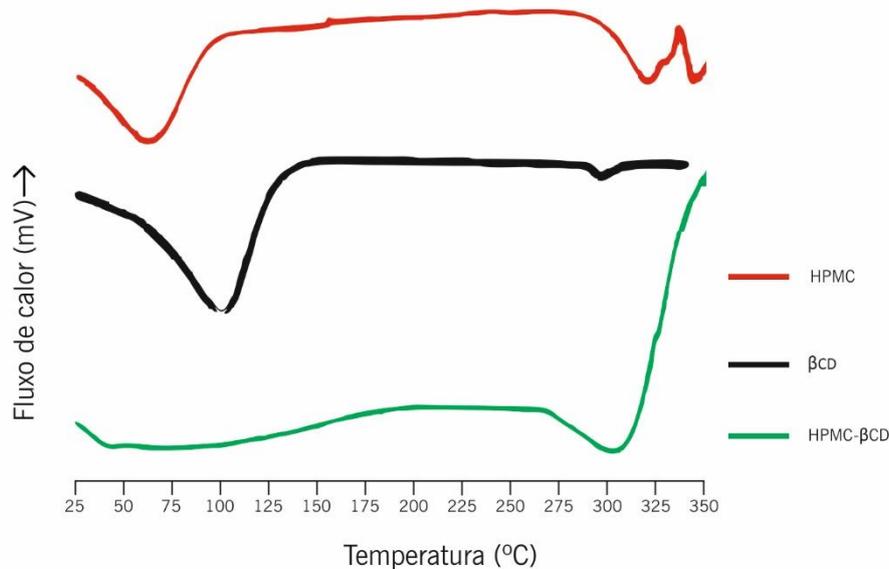


Figura 21. Termogramas de DSC da HPMC (vermelho), da β CD (preto) e do HPMC- β CD (verde).

Os termogramas dos componentes individuais foram descritos e analisados por Pinho et al. O termograma relativo ao HPMC apresenta três picos endotérmicos: (1) A 64°C ($\Delta H=137$ J/g), relativo à perda de moléculas de água associadas aos grupos OH não substituídos; (2) A 328°C ($\Delta H=49$ J/g) e (3) 361°C ($\Delta H=61$ J/g) estão associados à substituição parcial ou total dos grupos OH, que ocorrem no decurso da modificação química da celulose. A natureza amorfa do derivado da celulose explica a existência de três zonas endotérmicas. (Vieira, 2009); (Pinho, et al., 2014); (Machado, 2018). Relativamente ao termograma da β CD, apresenta dois picos endotérmicos: (1) Aos 100°C, devido à perda de água, relativo aos grupos OH não substituídos da CD e (2) Na zona dos 300°C, correspondendo ao pico endotérmico que está associado ao intervalo de fusão do composto.

O termograma relativo ao hidrogel de HPMC- β CD revela duas zonas endotérmicas: (1) A primeira, entre os 70 e os 105°C, associada à desidratação dos grupos OH não substituídos do hidrogel e (2) A segunda região endotérmica, situada nos 305°C que corresponde ao intervalo de fusão do composto (Raouf, et al., 2013); (Pinho, et al., 2014).

O gráfico com os termogramas de DSC do hidrogel HPMC-HP β CD e os componentes individuais que o constituem (HPMC e HP β CD), estão representados na figura 22.

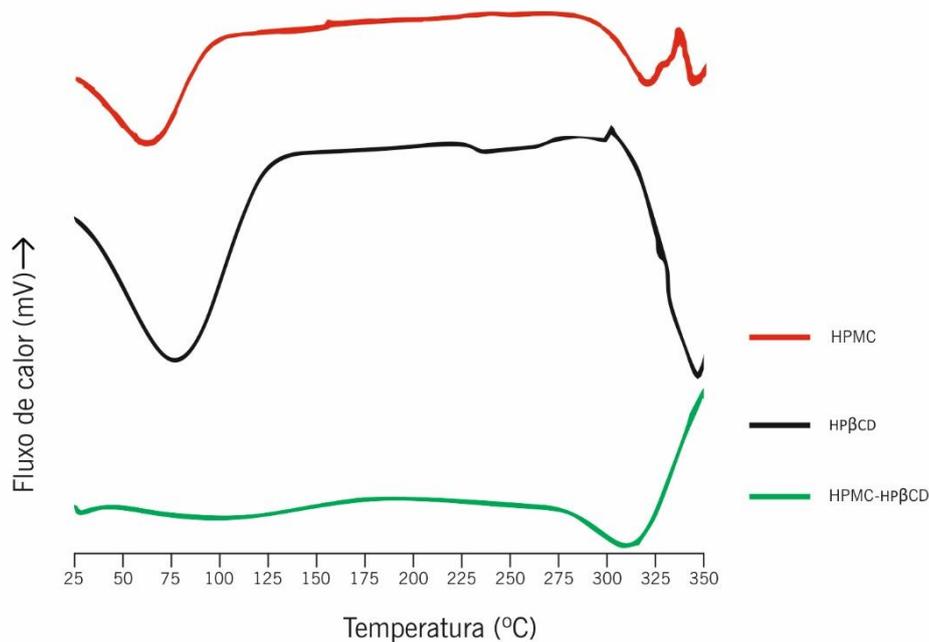


Figura 22. Termogramas de DSC da HPMC (vermelho), do HPβCD (preto) e do HPMC-HPβCD (verde).

Os termogramas relativos aos componentes individuais foram descritos e analisados por Pinho et al. O termograma da HPMC, está descrito acima, relativamente ao gráfico da figura 21. Em relação ao termograma do HPβCD, este apresenta duas regiões endotérmicas: (1) A primeira surge aos 80°C ($\Delta H=231$ J/g) e está associada à perda de moléculas de água; (2) A segunda zona endotérmica, aos 350°C ($\Delta H=238$ J/g), corresponde à decomposição dos grupos funcionais constituintes do HPβCD aquando da sua formação (Suta, et al., 2013); (Sun, et al., 2016); (Machado, 2018); (Pinho, et al., 2014b).

O termograma de DSC do HPMC-HPβCD é bastante semelhante ao do HPMC-βCD. Este apresenta duas zonas endotérmicas: (1) A primeira está situada entre 65°C e os 105°C e é relativa à desidratação dos grupos hidróxido não substituídos da matriz polimérica; (2) A segunda região endotérmica encontra-se na zona dos 310°C que está associado ao intervalo de fusão do hidrogel HPMC-HPβCD (Raov, et al., 2013); (Pinho, et al., 2014).

4.2.2.2. Nanofibras de PCL

Os termogramas relativos às amostras de nanofibra de PCL (E4 e E14) estão representados na figura 23.

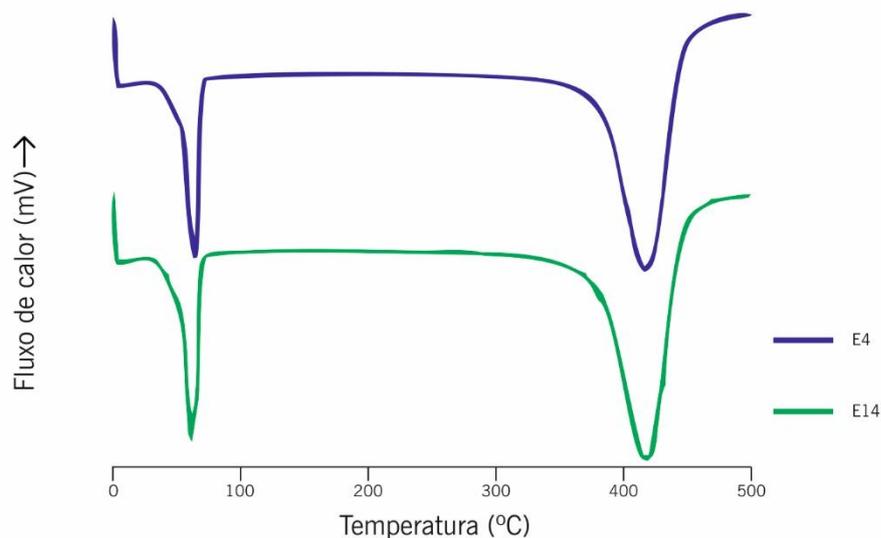


Figura 23. Termogramas de DSC das amostras de nanofibras de PCL E4 (azul) e E14 (verde).

Os termogramas das amostras E4 e E14 são praticamente idênticos devido à sua composição química ser o polímero policaprolactona. Nesse sentido, os dois termogramas apresentam duas regiões endotérmicas: (1) A primeira encontra-se aos 64°C que está associada à fusão do composto e (2) A segunda zona endotérmica situa-se a 416°C e está associada à carbonização do polímero devido à elevada temperatura (Chen, et al., 2019); (Speranza, et al., 2014); (Wang, et al., 2005).

Os termogramas relativos às amostras de PCL apresentam picos endotérmicos entre os 60 e 70°C e as suas alterações de entalpia encontram-se entre 87 e 98 J/g. Mais especificamente, no caso das amostras sem incorporação de collagenase, os picos endotérmicos situam-se entre 61,93 e 63,91°C com uma entalpia a variar entre 97,17 e 99,48 J/g. Os termogramas relativos às amostras de PCL com collagenase também apresentam picos endotérmicos entre os 59,44 e 64,81°C e alterações de entalpia entre 87,31 e 94,90 J/g.

Os resultados obtidos da análise térmica por DSC das diferentes amostras apresentam-se na tabela 1.

Tabela 1. Dados da análise calorimétrica.

Amostra	Temperatura de fusão (°C)	Onset T (°C)	Endset T (°C)	ΔH (J/g)
PCL (E4)	63,91	54,24	69,49	98,19
PCL (E7)	63,02	54,58	68,04	97,17
PCL (E8)	61,93	52,73	68,66	99,48
PCL+Colagenase (E11)	60,08	53,67	68,88	94,90
PCL+Colagenase (E13)	59,44	53,40	68,81	87,31
PCL+Colagenase (E14)	64,81	62,61	69,75	92,67

Os valores de entalpia são ligeiramente mais baixos para as nanofibras de PCL com colagenase, o que significa uma ligeira diminuição da cristalinidade das nanofibras devido à incorporação da colagenase na estrutura polimérica. Estes resultados concordam com os apresentados por Martins et al., que encontraram comportamento semelhante para fibras de PCL com tripsina (Martins, et al., 2015).

4.2.3. TGA

A Análise Termogravimétrica (do inglês *Thermogravimetric Analysis* – TGA) é uma técnica termoanalítica que consiste no estudo das alterações no peso de uma amostra sob o efeito de um aumento gradual e controlado da temperatura, onde a perda de massa decorre da quebra ou modificação das ligações químicas devido ao calor que vai sendo absorvido pelo material. A TGA é uma técnica importante na caracterização dos polímeros que permite a determinação da sua estabilidade térmica, ou a fração dos componentes voláteis e a fração de componentes inorgânicos, através de um controlo da variação da massa da amostra em função do tempo ou temperatura. A aplicação da primeira derivada das curvas termogravimétricas demonstram o comportamento térmico da amostra, indicando os momentos de início e fim de perda de massa (Ng, et al., 2018); (Braga, 2015); (Kwon, et al., 2015).

4.2.3.1. Hidrogéis de HPMC-HP β CD e de HPMC- β CD

Na figura 24 estão representados as curvas obtidas relativamente à análise dos gráficos de TGA do hidrogel HPMC- β CD e dos respetivos componentes individuais que o constituem (HPMC e β CD).

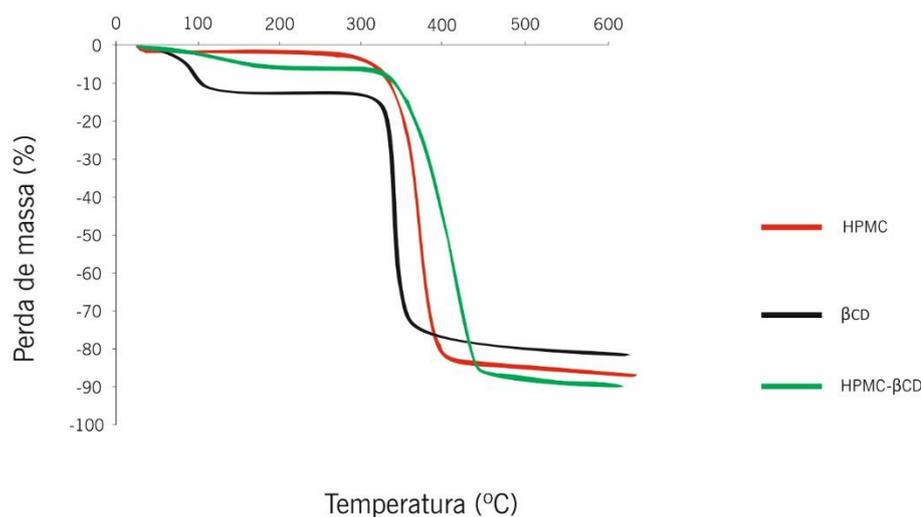


Figura 24. Curvas de TGA da HPMC (vermelho), do β CD (preto) e do HPMC- β CD (verde).

As curvas de TGA dos componentes individuais (HPMC e β CD) foram descritas e analisadas por Machado (2018) e o Monreal-Pérez (2018), respetivamente. Na curva de TGA relativa à HPMC, é visível uma única região de degradação compreendida no intervalo de temperatura 280-400°C. A degradação máxima foi observada aos 350°C, com uma perda de massa de 88.10% relativa à degradação dos grupos hidroxipropilo, constituintes da HPMC (Machado, 2018); (Kwon, et al., 2015); (O. Porfirio, et al., 2015). Na curva de TGA da β CD, observa-se duas etapas distintas de perda de massa: (1) A primeira começa entre os 40-50°C e termina aproximadamente aos 100°C, atribuída à perda de água por desidratação dos grupos (OH) constituintes da β CD e (2) A segunda inicia nos 320°C e termina nos 400°C e corresponde à decomposição térmica da CD. A degradação é máxima a 340°C com uma percentagem de perda de massa de 81.00% (Monreal-Pérez, et al., 2018).

Em relação ao hidrogel HPMC- β CD identifica-se uma etapa de degradação entre os 311 e 453°C. A temperatura de degradação máxima ocorreu a 405°C com uma perda de massa de 90.02% (Monreal-Pérez, et al., 2018); (Pinho, et al., 2018).

Na figura 25 estão representados as curvas obtidas da análise termogravimétrica do hidrogel de HPMC-HP β CD e dos respetivos componentes individuais que o constituem (HPMC e HP β CD).

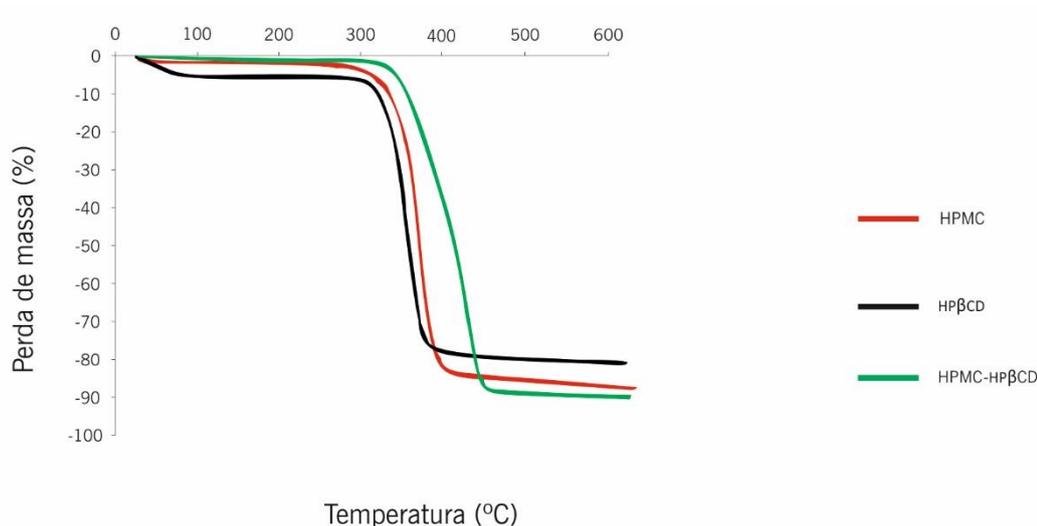


Figura 25. Curvas de TGA da HPMC (vermelho), do HP β CD (preto) e do HPMC-HP β CD (verde).

As curvas de TGA dos componentes individuais (HPMC e HP β CD) foram descritas e analisadas por Machado. A curva de TGA relativa à HPMC está descrita acima, relativamente ao TGA da figura 24. Na curva do HP β CD verifica-se duas fases de degradação distintas: (1) A primeira etapa é visível entre os 50 e os 100°C, correspondente à perda de água por desidratação dos grupos hidróxido do HP β CD; (2) A segunda etapa apresenta um nível de degradação mais elevado da CD situado entre as temperaturas de 280 a 380°C. Verifica-se degradação máxima a 343°C com uma perda de massa de 83,10% (Machado, 2018); (Malik, et al., 2017); (Pinho, et al., 2018).

A curva de TGA dos dois hidrogéis sintetizados revelam um comportamento bastante semelhante. Na curva de TGA do HPMC-HP β CD observa-se uma região de decomposição entre os 315 e 450°C. A temperatura onde a decomposição foi superior situa-se nos 406°C com uma perda de massa de 91,90% (Monreal-Pérez, et al., 2018); (Pinho, et al., 2018).

Na tabela 2 encontra-se os valores referentes às temperaturas iniciais (T_i) e temperaturas finais (T_f) relativas à degradação das amostras, a percentagem de perda de massa (TG) e a temperatura máxima de degradação (DTG).

Tabela 2. Valores de T_i , T_f , TG e DTG dos hidrogéis HPMC-HP β CD e HPMC- β CD e dos respectivos componentes individuais HPMC, HP β CD e β CD.

Amostra	T_i degradação (°C)	T_f degradação (°C)	TG (%)	DTG (°C)
HPMC	280	390	88,10	350
HP β CD	280	380	83,10	343
HPMC-HP β CD	315	450	91,90	406
β CD	320	400	81,00	340
HPMC- β CD	311	453	90,02	405

Os hidrogéis apresentam uma média de perda de massa de 90,96% em relação aos compostos individuais que os constituem que revelam apenas 84,10%. O perfil térmico das amostras demonstra ainda que os hidrogéis degradam a uma temperatura consideravelmente superior o que indica uma estabilidade térmica mais elevada devido às ligações químicas que os seus constituintes estabelecem entre si (Malik, et al., 2017).

4.2.3.2. Nanofibras de PCL

Na figura 26 estão descritas as curvas de TGA relativas às amostras de nanofibras de PCL (E4 e E14). Nela está também representado a curva de TGA correspondente ao PCL padrão.

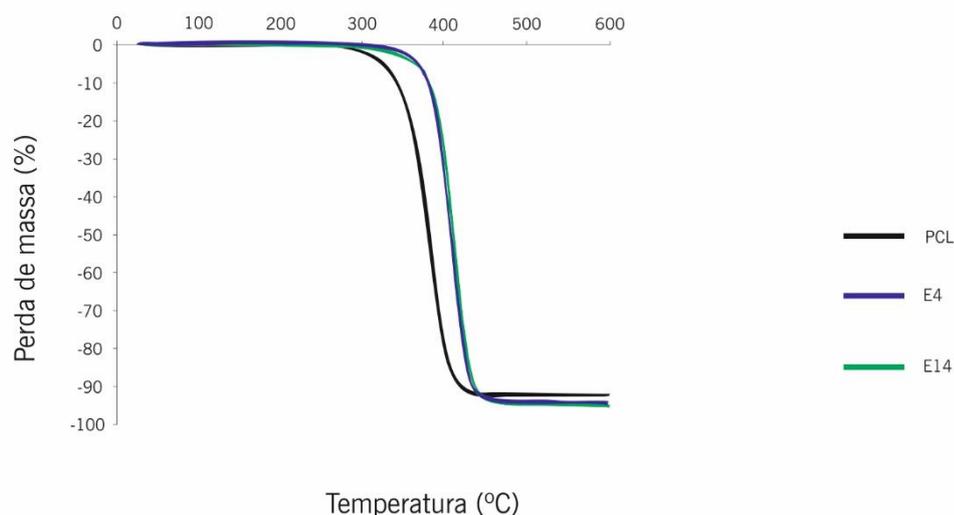


Figura 26. Curvas de TGA do PCL (preto), da E4 (azul) e E14 (verde).

A curva de TGA do componente padrão, o PCL, revela a existência de uma única etapa de degradação situada entre os 290 e os 420°C. A temperatura onde a degradação foi máxima situa-se nos 382°C com uma perda de massa de 92,10%.

Relativamente à curva de TGA da amostra E4, é visível uma única região de degradação compreendida no intervalo de temperatura 326-448°C. A degradação máxima foi observada aos 411°C, com uma perda de massa de 96,55%.

A curva de TGA da amostra E14 apresenta um comportamento bastante similar à observada no caso da amostra E4. No caso da E14, observa-se uma região de decomposição entre os 318 e 444°C. A temperatura onde a decomposição foi superior situa-se nos 404°C com uma perda de massa de 95,39% (Chen, et al., 2019); (Massoumi, et al., 2015).

Na tabela 3 estão apresentados os valores relativos às temperaturas iniciais (Ti) e temperaturas finais (Tf) associadas à degradação das amostras, bem como a percentagem de perda de massa (TG) e a temperatura máxima de degradação (DTG).

Tabela 3. Valores de Ti, Tf, TG e DTG das amostras de nanofibra de PCL (E4 e E11) e PCL padrão.

Amostra	Ti degradação (°C)	Tf degradação (°C)	TG (%)	DTG (%)
PCL	290	420	92,10	382
E4	326	448	96,55	411
E14	318	444	95,39	404

O perfil térmico das amostras de nanofibras demonstram que há um muito ligeiro abaixamento da DTG assim como da Ti e Tf das nanofibras com colagenase em comparação com as sem colagenase, resultados que concordam com os que já tinham sido observados no DSC.

4.2.4. SEM

A Microscopia Eletrónica de Varrimento (do inglês *Scanning Electron Microscopy* – SEM) é uma técnica imprescindível em diversas áreas científicas, nomeadamente em partículas na classe nanomateriais. O desenvolvimento de novos materiais exige uma maior perceção da sua composição estrutural. A microscopia ótica não permite a visualização na escala nanométrica e como tal pequenos detalhes estruturais só são possíveis de ser detetados através do SEM.

A microscopia eletrônica de varrimento baseia-se na emissão de um feixe de elétrons até à superfície da amostra, onde a aquisição de sinais produzidos entre os elétrons e a área superficial da amostra permite a produção uma imagem tridimensional de elevada resolução. A utilização do SEM permite a caracterização do polímero. Estas imagens permitem uma avaliação em termos qualitativos e quantitativos das características estruturais da amostra (Fonseca, 2013); (Ferreira, 2016).

4.2.4.1 Nanofibras de PCL

Um dos objetivos do trabalho era a produção de nanofibras de policaprolactona (PCL) pela técnica de *electrospinning*. Nesse sentido foram produzidas 14 amostras de nanofibras com diferentes parâmetros no equipamento de *electrospinning* (campo magnético, distância do *slider* ao coletor fixo, caudal de saída da seringa e tempo de deposição no coletor fixo). Essas amostras diferiam ainda em termos de concentração do polímero PCL: 15%, 16%, 20%, 30% e 40% (W/V), tendo sido analisadas no SEM uma amostra de 16% de PCL e cinco amostras de concentração de 20% de PCL. A seleção das amostras ao nível da concentração de PCL tendeu para o valor de 20% (conforme justificado no ponto 4.1 Síntese dos hidrogéis e das nanofibras de PCL). Foi ainda incorporado 5mL da enzima colagenase (10mg/mL) em alguns desses ensaios de *electrospinning*. Do total das 6 amostras analisadas, três delas continham a colagenase incorporada. Na tabela 4 está descrito o tamanho médio das nanofibras nas diferentes amostras analisadas.

Tabela 4. Diâmetro médio das amostras de nanofibras analisadas no SEM a uma ampliação de 50000x.

Amostras	Nanofibras sem colagenase			Nanofibras com colagenase		
	E4	E7	E8	E11	E13	E14
Diâmetro da nanofibra (nm)	110,74	129,72	136,78	195,27	221,98	199,89

Na figura 27 estão representadas fotografias obtidas do SEM relativas às amostras sem enzima (E4 e E7), com ampliações de 5000x, 10000x e 50000x.

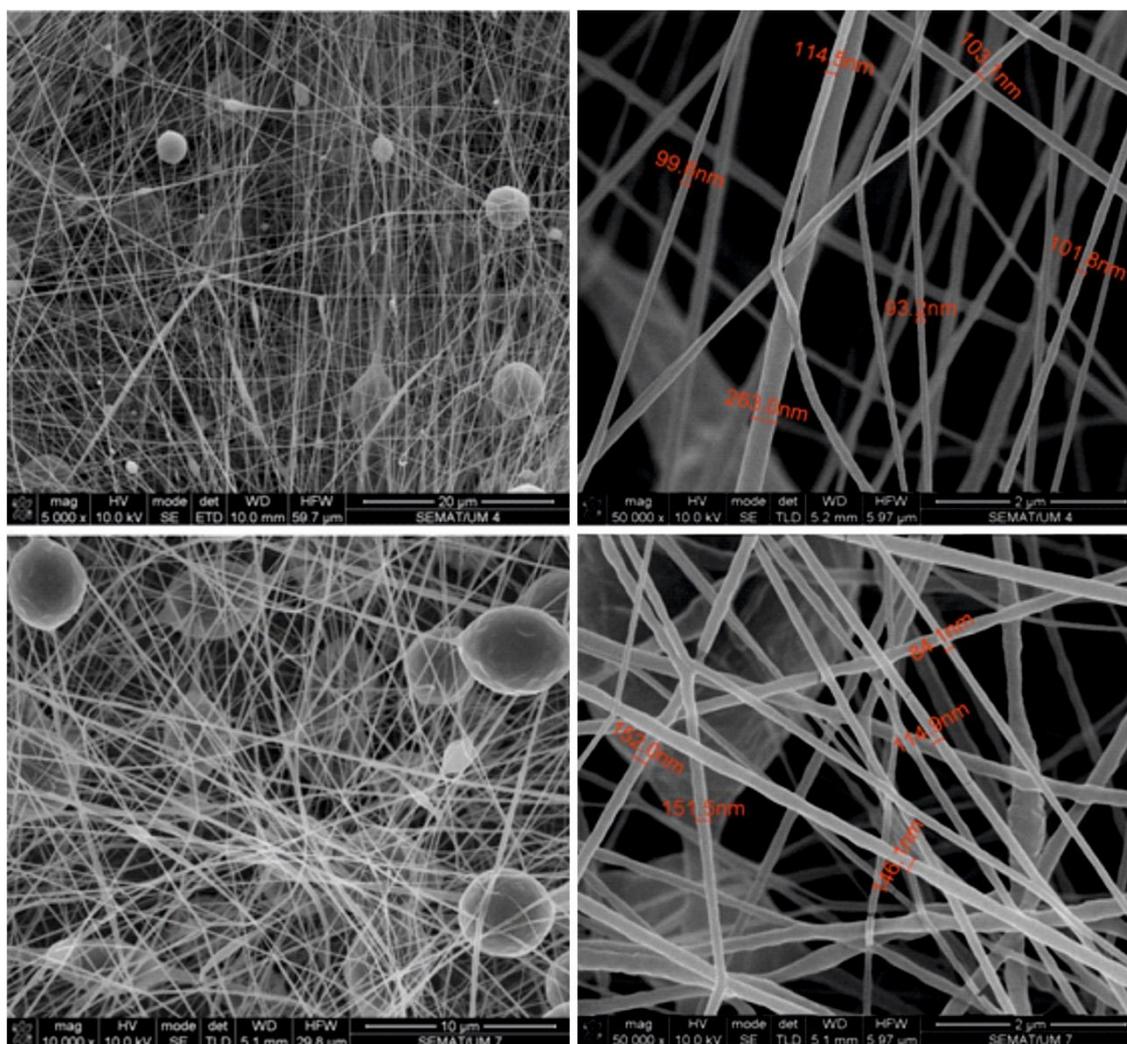


Figura 27. Fotografias obtidas do SEM das nanofibras sem colagenase: E4 (com ampliação de 5000x em cima à esquerda e de 50000x em cima à direita) e E7 (com ampliação de 10000x em baixo à esquerda e de 50000x em baixo à direita).

Através de uma análise das fotografias relativas à figura 27, conclui-se que as fibras de PCL apresentam um aspeto moderadamente uniforme e homogêneo devido à existência de algumas gotículas de polímero (designadas em inglês por *beads*) e um formato cilíndrico, o que evidencia que o processo de *electrospinning* para a produção de nanofibras foi adequado (Santos, et al., 2011).

A variação do campo elétrico aplicado, sem alteração dos outros parâmetros do equipamento de *electrospinning*, parece influenciar o tamanho médio das nanofibras. Através da comparação entre a amostra E4, com um campo elétrico aplicado inferior à amostra E7, verifica-se uma diminuição do diâmetro médio da fibra. Santos, et al., descrevem que a variação do campo elétrico permite observar uma tendência diretamente proporcional entre a diminuição do campo elétrico

aplicado e a diminuição do diâmetro médio das nanofibras (Santos, et al., 2011). Quando o campo elétrico é menor, a quantidade de solução polimérica que sai da seringa do equipamento de *electrospinning* será inferior como resposta à diminuição da força eletrostática que implica uma diminuição no diâmetro das fibras (Supaphol, et al., 2005); (Li, et al., 2006).

Outro parâmetro possível de ser comparado é a distância de trabalho (altura do *slider*). A amostra E7, com menor altura do *slider*, apresenta um diâmetro de fibra inferior à amostra E8. Santos, et al., referem no seu trabalho a existência de uma correlação entre o aumento da distância de trabalho com a diminuição do diâmetro da fibra porque o solvente terá mais tempo para evaporar, no percurso entre a saída da seringa até à sua deposição no coletor, como tal isso implica que existe uma maior facilidade no espalhamento do fluido (Santos, et al., 2011).

Na figura 28 apresenta-se as imagens obtidas do SEM em relação às amostras incorporadas com a colagenase (E13 e E11), com ampliações de 5000x, 10000x e 50000x.

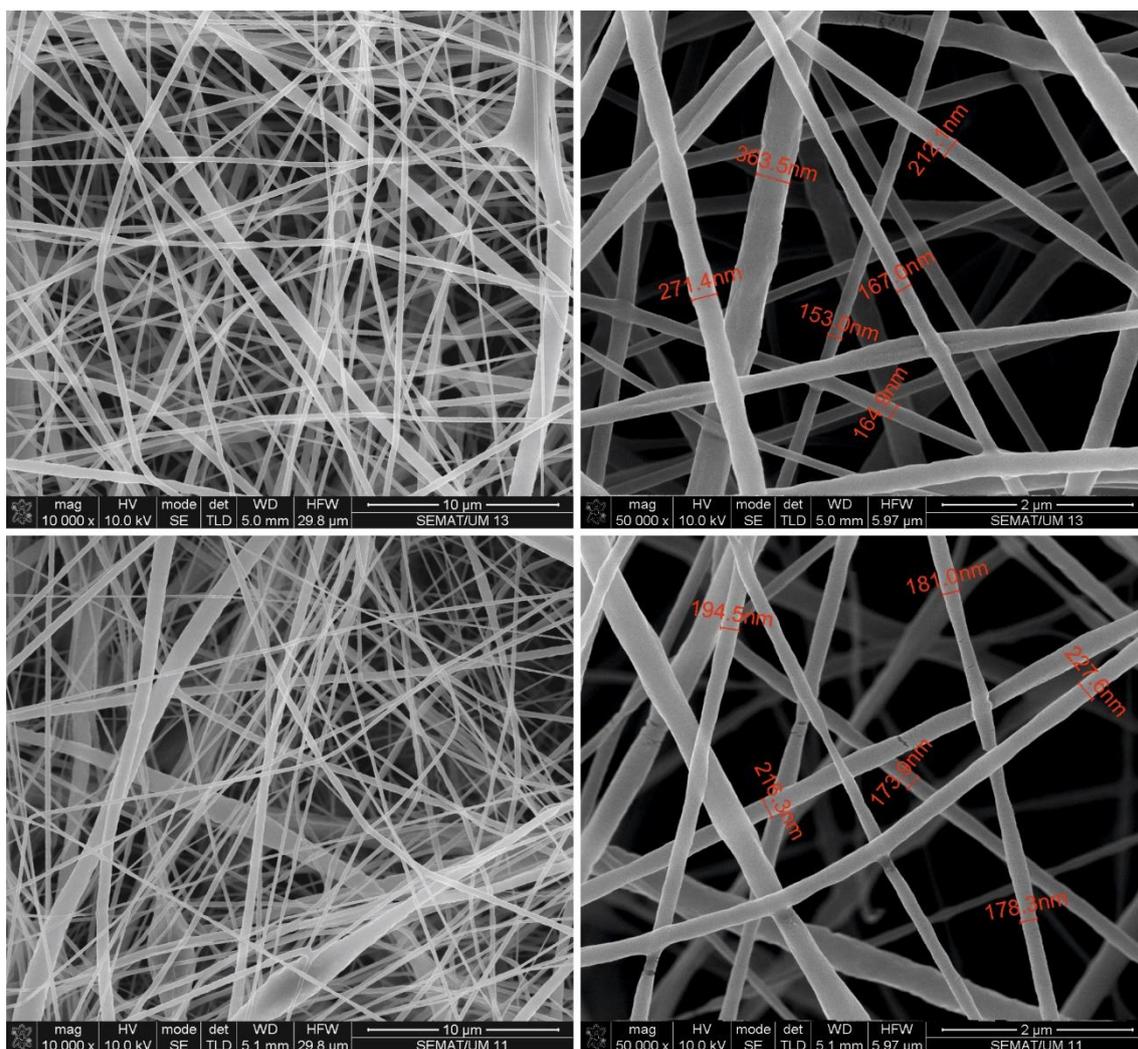


Figura 28. Fotografias obtidas do SEM das nanofibras com colagenase: E13 (com ampliação de 5000x em cima à esquerda e de 50000x em cima à direita) e E11 (com ampliação de 10000x em baixo à esquerda e de 50000x em baixo à direita).

Tal como mencionado e justificado na figura 27, em relação à morfologia das nanofibras, as amostras evidenciadas na figura 28 demonstram que o processo utilizado para produção de nanofibras foi também adequado. No caso das nanofibras com incorporação da enzima, verifica-se um decréscimo considerável da existência de *beads*, o que torna estas nanofibras mais uniformes e homogêneas (Santos, et al., 2011). Martins, et al., descrevem que a adição de outro material à solução de polímero pode resultar na diminuição da existência de *beads* nas nanofibras (Martins, et al., 2008). No caso específico deste trabalho, a adição da enzima à solução polimérica parece ser a responsável pela diminuição significativa dos *beads* nas nanofibras.

Tal como referido e justificado para a figura 27, é também possível verificar a diminuição do diâmetro das fibras como consequência de um menor campo elétrico entre as amostras E11 e E13 (Santos, et al., 2011); (Supaphol, et al., 2005); (Li, et al., 2006).

Entre as amostras E14 e E13, realizadas nas mesmas condições exceto na quantidade de caudal que saía da seringa, pode-se concluir que a amostra E14, que apresenta um caudal inferior, apresenta um diâmetro médio das fibras mais baixo. Esta razão justifica-se pelo mesmo princípio aplicado ao aumento da distância de trabalho, visto que um caudal inferior terá uma menor quantidade de polímero a sair da seringa, como tal o solvente será evaporado mais rapidamente e ocorrendo um melhor espalhamento do fluido no coletor. Martins, et al., descrevem o caudal do polímero como sendo um parâmetro importante na análise do SEM que influencia a velocidade que o polímero sai da seringa e a sua taxa de transferência. Concluem ainda que o aumento do caudal produz fibras com um diâmetro inferior (Martins, et al., 2008).

Santos, et al., descrevem no seu trabalho uma relação entre o aumento da concentração do polímero com o aumento do diâmetro médio das fibras (Santos, et al., 2011). A mesma relação pode ser verificada entre as amostras com a colagenase incorporada. A amostra E11, com uma concentração de 16% de PCL apresenta uma média de diâmetro inferior às amostras E13 e E14, ambas com 20% de PCL. No entanto, é de ressaltar que é apenas uma tendência para as amostras com enzima e não uma regra geral, visto que as amostras sem enzima, com concentração igual a 20% de PCL, apresentam diâmetros de fibra inferiores à amostra E11.

4.2.5. Avaliação do *swelling*

Os hidrogéis são redes de cadeias poliméricas com a capacidade de inchar quando imersos em água ou em outros sistemas de solventes aquosos. Esse fenómeno é denominado por *swelling* e permite ao hidrogel absorver grandes quantidades de soluções aquosas. Na área de biomédica, a capacidade do hidrogel ser um veículo para a libertação controlada de fármacos é muito útil em diversas áreas, como a investigação médica e farmacêutica. (Bajpai, 2001); (Lopes, et al., 2005).

A capacidade de intumescimento e posterior relaxamento da cadeia polimérica é responsável pela cinética de libertação de fármacos e pode ser influenciado diretamente pela difusão de água para o interior do hidrogel, pela capacidade de ligação dos grupos polares hidrofílicos com as moléculas de água e também pela expansão da rede polimérica, até ser atingido um equilíbrio entre as moléculas de água contidas no interior da rede com as moléculas de água “livre”. A

erosão do hidrogel pode também ser um fator que influencia a taxa de libertação do sistema (Lopes, et al., 2005); (Rizwan, et al., 2017).

O comportamento dos hidrogéis pode ser avaliado através da determinação do seu valor de *swelling* (Q), calculado pela equação 2 (descrita em 3.2.3.5.).

4.2.5.1. Hidrogéis HPMC-HP β CD e HPMC- β CD

O *swelling* das amostras de hidrogel de HPMC- β CD e de HPMC-HP β CD foi avaliado a diferentes condições de pH. Utilizaram-se três soluções tampão: (1) Suor Ácido com um valor de pH de 5,5; (2) Solução de água ultra pura e (3) Suor Alcalino com um pH igual a 8. Os resultados nas diferentes condições acima descritas, estão apresentados na figura 29.

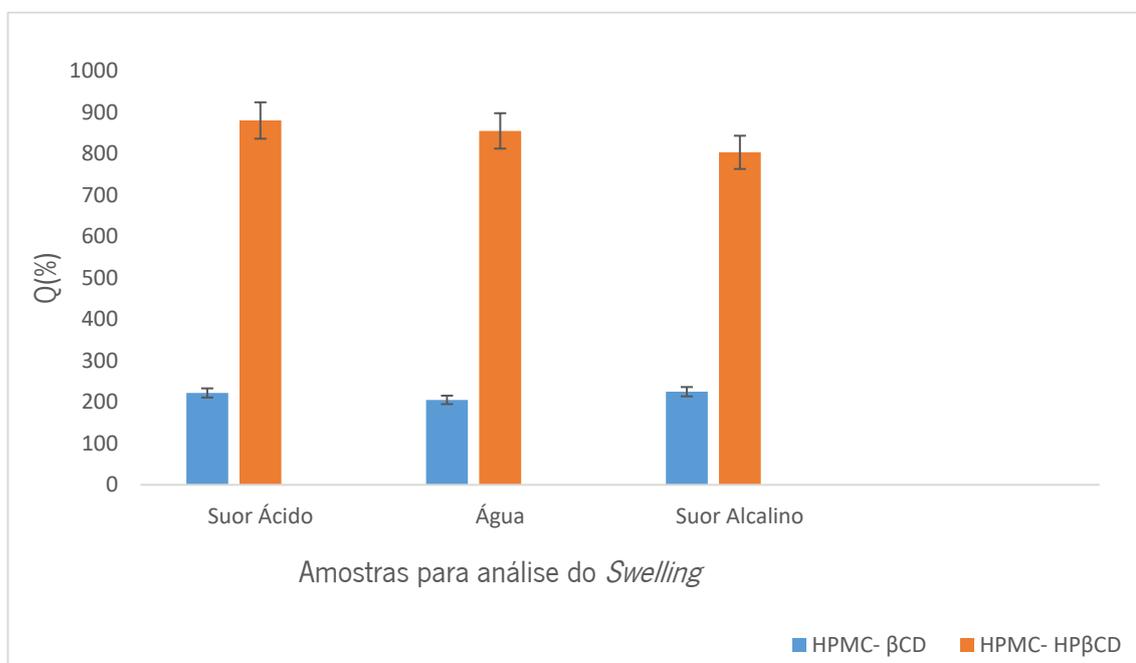


Figura 29. *Swelling* dos hidrogéis de HPMC- β CD e de HPMC-HP β CD.

Os hidrogéis de HPMC-HP β CD apresentam uma capacidade de inchaço muito diferente dos de HPMC- β CD, em qualquer dos meios estudados. Os hidrogéis de HPMC- β CD mostram valores médios de inchaço de 220,8 ± 1,6% em suor ácido, de 229,2 ± 1,2% em suor alcalino e 201,1 ± 1,4% em água. Para as mesmas condições, os hidrogéis de HPMC-HP β CD apresentaram valores médios de inchaço de 882,1 ± 0,37%, 803,1 ± 0,5% e 855,1 ± 1,9% respectivamente. Assim, a capacidade de inchaço dos hidrogéis de HPMC-HP β CD é cerca de 4 vezes superior que a dos de

HPMC- β CD. Resultados semelhantes foram anteriormente descritos por Pinho et al., relativamente a este tipo de hidrogéis. A justificação para este comportamento diferente prende-se com a menor afinidade para a água da β CD e com o facto dos grupos hidroxipropilo contribuírem para um maior tamanho de poro na estrutura reticulada do polímero, traduzida numa maior absorção de água (Pinho, et al., 2014). O maior valor de swelling do hidrogel HPMC-HP β CD ocorre em pH ácido, enquanto o do HPMC- β CD parece ser pouco influenciado pelo pH.

4.2.5.2. Nanofibras de PCL

A capacidade de retenção de água pelas amostras de nanofibra produzidas também foi avaliada (figura 30).

Verificou-se que apresentavam aumento de peso de 126,1% quando colocadas numa solução de suor ácido, $149,99 \pm 0,3\%$ quando colocadas numa solução de suor alcalino e $107,65 \pm 0,3\%$ quando colocadas em água. Esta retenção de água deve-se à estrutura porosa das fibras. Notou-se ainda que o maior valor de *swelling* ocorre a pH alcalino no caso das nanofibras.

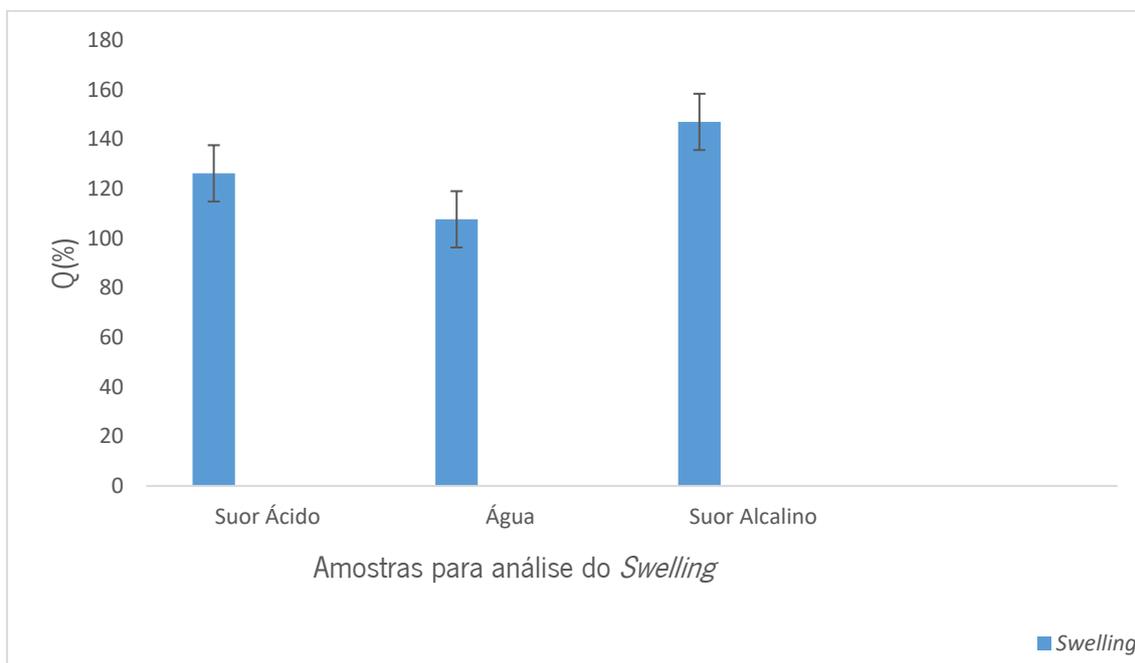


Figura 30. *Swelling* das amostras de nanofibra de PCL.

4.2.6. Avaliação da retenção e libertação da colagenase nas estruturas poliméricas

A incorporação da colagenase nos hidrogéis foi feita por adsorção. Para isso colocaram-se numa tina de vidro 2 amostras de HPMC-HP β CD e de HPMC- β CD 30mg cada uma e adicionou-se 5mL da solução de colagenase (10mg/mL). Ao fim de 24h avaliou-se a atividade da enzima no banho usando FALGPA como substrato e por diferença calculou-se a quantidade de colagenase adsorvida no polímero. Os resultados mostraram que o hidrogel de HPMC-HP β CD adsorveu em média 85,37% da colagenase colocada no banho e o hidrogel de HPMC- β CD 84,15%.

Estes resultados demonstram que não foi apenas a capacidade de inchaço do hidrogel a responsável pela adsorção da enzima. Os dois hidrogéis tinham apresentado valores *swelling* muito diferentes, no entanto, nas condições testadas apresentam capacidade de adsorção de colagenase muito semelhantes. Outros fatores, para além da encapsulação nos poros do hidrogel, parecem contribuir para a retenção das enzimas na matriz polimérica.

A avaliação da retenção de colagenase foi feita segundo um procedimento semelhante ao usado para os hidrogéis. Os cálculos efetuados considerando a quantidade acumulada de atividade detetada nas soluções de recolha ao longo do tempo, permitiu verificar que durante 24h, apenas cerca de 0,5% de enzima retida foi libertado do hidrogel de HPMC-HP β CD para o meio. No caso do hidrogel de HPMC- β CD, o valor de enzima libertado foi de 0,18% no mesmo intervalo de tempo. Atendendo que o *swelling* do hidrogel HPMC-HP β CD foi superior ao do HPMC- β CD e ao contributo dos grupos hidroxipropilo na abertura dos poros do hidrogel, estes resultados parecem justificar-se.

Assim estes sistemas parecem mais interessantes enquanto matrizes de imobilização da colagenase do que estruturas de libertação controlada.

No caso das nanofibras de PCL incorporaram-se 5mL de colagenase (10mg/mL) na solução polimérica antes da extrusão. O estudo da libertação permitiu perceber que a quantidade de enzima que são da estrutura é apenas residual, na ordem dos 0,05% ao fim de 24h, provavelmente devido a alguma erosão do polímero. O facto da enzima estar fortemente incorporada no interior das nanofibras pode explicar estes resultados.

5. Conclusão

O trabalho desenvolvido no âmbito desta dissertação permitiu concluir que:

- Foram desenvolvidos hidrogéis com HPMC e CD e nanofibras de PCL, com colagenase incorporada tendo a sua estrutura e composição sido devidamente caracterizada por FTIR, DSC, TGA e SEM.
- O *swelling* dos hidrogéis sintetizados foram avaliados a diferentes condições de pH. Os resultados demonstraram que o hidrogel HPMC-HP β CD apresenta uma capacidade de inchaço 4 vezes superior em relação ao hidrogel de HPMC- β CD em qualquer dos meios estudados. Verificou-se ainda um decréscimo do *swelling* no hidrogel HPMC-HP β CD com o aumento do pH. O hidrogel HPMC- β CD parece ser pouco influenciado pela variação do pH.
- A colagenase foi incorporada nos hidrogéis por adsorção. Não se notou diferença na capacidade de adsorção da enzima entre os hidrogéis, levando a supor que a capacidade de inchaço não foi o único fator responsável pela adsorção.
- Em termos de libertação, em meio aquoso e durante 24h à temperatura ambiente, tanto o hidrogel de HPMC-HP β CD como o hidrogel HPMC- β CD apresentaram uma forte retenção da enzima, com libertação de apenas 0,5 e 0,18% respetivamente para meio aquoso à temperatura ambiente após 24h. Considerando estes resultados pode-se concluir que estes sistemas parecem mais interessantes para ser usados como matrizes de imobilização enzimática.
- A colagenase foi incorporada na solução de PCL antes da preparação das nanofibras. Por *electrospinning* resultaram fibras uniformes e homogéneas, com diâmetros entre 110nm e 137nm, diâmetro esse que aumentou para 195nm a 200nm quando incorporada a colagenase.
- A libertação da enzima, em meio aquoso e durante 24h à temperatura ambiente, foi negligenciável, confirmando o facto da colagenase estar fortemente ligada no interior do polímero.
- Como perspetivas futuras seria importante um melhor esclarecimento dos mecanismos de ligação da colagenase com as estruturas poliméricas, que justifiquem o forte comportamento de retenção e a possibilidade de realização dos testes *in vivo* necessários de forma a comprovar a eficácia deste sistema no tratamento de lesões cutâneas.

6. Bibliografia

- Aijaz, O. et al., 2013. Nanofiber: Applications and Implementation in Advance Water Treatment Techniques. *Applied Mechanics and Materials*, Volume 376, pp. 97-100.
- Alipour, H., Raz, A., Zakeri, S. & Djadid, N., 2016. Therapeutic applications of collagenase (metalloproteases): A review. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, Volume 6(11), pp. 975-981.
- Bajpai, S., 2001. Swelling studies on hydrogel networks - A review. *Journal of scientific and industrial research*, Volume 60, pp. 451-462.
- Banerjee, G. & Ray, A., 2017. Impact of microbial proteases on biotechnological industries. *Journal Biotechnology and Genetic Engineering Reviews*, Volume 33, pp. 119-143.
- Barros, S. et al., 2014. Thermo-sensitive chitosan–cellulose derivative hydrogels: swelling behaviour and morphologic studies. *Cellulose* 21, pp. 4531–4544.
- Beachley, V. & Wen, X., 2009. Effect of electrospinning parameters on the nanofiber diameter and length. *Materials Science and Engineering C*, Volume 29, pp. 663–668.
- Bhagwan, J., Kumar, N. & Sharma, Y., 2019. Chapter 13 - Fabrication, Characterization, and Optimization of $MnxOy$ Nanofibers for Improved Supercapacitive Properties. Em: *Nanomaterials Synthesis*, pp. 451-481.
- Bharat, S. et al., 2012. Nanofibers In Pharmaceuticals -A Review. *Am. J. PharmTech Res.*, Volume 2(6).
- Boateng, J. & Catanzano, O., 2015. Advanced Therapeutic Dressings for Effective Wound Healing— A Review. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 104(11), pp. 3653-3680.
- Boateng, J., Matthews, K., Stevens, H. & Eccleston, G., 2008. Wound healing dressings and drug delivery systems: A review. *Journal of Pharmaceutical Sciences* 97, Volume 8, pp. 2892 - 2923.
- Braga, C., 2015. Produção de fibras de base renovável pela técnica de electrospinning. Dissertação de Mestrado. Escola de Engenharia, Universidade do Minho, Guimarães.
- Brena, B. et al., 2016. Immobilization of Enzymes. *Methods in Biotechnology: Immobilization of Enzymes and Cells*, Second Edition, pp. 15-26.
- Brown, J., 2004. The role of hyaluronic acid in wound healing's proliferative phase. *J Wound Care*, Volume 13(2), pp. 48-51.
- Buwalda, S. et al., 2014. Hydrogels in a historical perspective: from simple networks to smart materials. *J. Control. Release Off. J. Control. Release Soc.*, Volume 190, pp. 254–273.
- Cacicedo, M. et al., 2019. Immobilized Enzymes and Their. Em: *Advances in Enzyme Technology*, pp. 169-200.
- Casarin, S., 2011. Blendas de PHBV e PCL para uso em dispositivos de osteossintese. Tese Doutorado. Universidade Federal de São Carlos, São Carlos.

- Chen, C. et al., 2019. Fabrication, characterization and adsorption properties of cucurbit[7]uril-functionalized polycaprolactone electrospun nanofibrous membranes. *Beilstein J. Org. Chem*, Volume 15, pp. 992–999.
- Chen, F., Huang, P. & Mo, X.-M., 2010. Electrospinning of Heparin Encapsulated P(LLA-CL) Core/Shell Nanofibers. *Nano Biomed. Eng.*, pp. 56-60.
- Cheng, H., Sun, G. & Guan, Z., 1999. Experimental study and preliminary clinical application of bacterial collagenase in catabolizing scars. *Chinese journal of plastic surgery and burns*, Volume 15(3), pp. 202-205.
- Coelho, P., 2007. Desenvolvimento de formulações de libertação modificada de ranitidina. Tese de Doutorado. Escola de Engenharia, Universidade do Minho, Guimarães.
- Costa, E., 2017. Produção de proteases por actinobactéria isolada da rizosfera de licania. Tese de Doutorado. Universidade Federal de Pernambuco, Brasil.
- Costa, R., 2013. Síntese e teste de hidrogéis inteligentes para a libertação controlada de fármacos. Dissertação de Mestrado. Instituto Politécnico de Bragança, Escola Superior de Tecnologia e Gestão, Bragança.
- Cunha, B., 2012. Úlceras de pressão: Eleição do produto de tratamento. *Journal of Aging and Innovation*, Volume 1, pp. 1-10.
- D. Schiffman, J. & L. Schauer, C., 2008. A Review: Electrospinning of Biopolymer Nanofibers and their Applications. *Polymer Reviews*, Volume 48(2), pp. 317-352.
- Daboor, S. et al., 2010. Extraction and Purification of Collagenase Enzymes: A Critical Review. *American Journal of Biochemistry and Biotechnology*, Volume 6, pp. 239-263.
- Dai, H., Ou, S., Liu, Z. & Huag, H., 2017. Pineapple peel carboxymethyl cellulose/polyvinyl alcohol/mesoporous silica SBA-15 hydrogel composites for papain immobilization. *Carbohydrate Polymers*, Volume 169, pp. 504-514.
- Datta, S., Christena, L. & Rajaram, Y., 2013. Enzyme immobilization: an overview on techniques and support materials. *3 Biotech*, Volume 3, pp. 1-9.
- De Olyveira, G., Manzine, L., Basmaji, P. & L, X., 2011. Bacterial nanocellulose for medicine regenerative. *J Nanotechnol Eng Med* 2, Volume 2, pp. 1-8.
- Del Valle, E., 2004. Cyclodextrins and their uses: a review. *Process Biochemistry*, Volume 39, pp. 1033–1046.
- Domogatsky, S., 2010. Highly selective proteolytic enzymes preparation for debridement of necrotic tissue from burn wounds. [Online] Available at: Disponível em: <<http://www.crd.org/Events/bio2003-proteolityc-enzymes>> [Acedido em 28 8 2019].
- Dreifke, M., Jayasuriya, A. & Jayasuriya, A., 2015. Current wound healing procedures and potential care. *Materials Science and Engineering C*, pp. 651–662.

- Eiler, H. & Hopkins, F., 1993. Successful treatment of retained placenta with umbilical cord injections of collagenase in cows. *Journal of American Veterinary Medical Association*, Volume 203, pp. 436-443.
- Elias, C. et al., 2012. Manual de material de penso com ação terapêutica. Ordem dos Farmacêuticos - Conselho do Colégio de Especialidade de Farmácia Hospitalar, pp. 1-35.
- Erdeve, O., Atasay, B. & Arsan, S., 2007. Collagenase application for amputation in a preterm. *Pediatric Dermatology*, Volume 24, pp. 195-196.
- Fazio, M., Zitelli, J. & Goslen, J., 2000. Cicatrização de feridas. In: Coleman III WP, Hanke CW, Alt TH, Asken S. *Cirurgia Cosmética. Em: Princípios e Técnicas*. Rio de Janeiro, pp. 23-28.
- Ferreira, H. H., 2016. Importância do estudo em Microscopia Eletrônica de Varrimento de amostras incluídas em parafina para fins de diagnóstico. Dissertação de Mestrado. Técnico de Lisboa, Lisboa.
- Fonseca, A. M. C., 2013. Análise de materiais e superfícies: microscopia eletrônica. Publicação Pedagógica. Escola de Engenharia, Universidade do Minho, Guimarães.
- Ganji, F., Farahani, S. & Vasheghani-Farahani, E., 2010. Theoretical Description of Hydrogel Swelling: A Review. *Iranian Polymer Journal*, Volume 19(5), pp. 375-398.
- Gibas, I. & Janik, H., 2010. Review: Synthetic Polymer Hydrogels For Biomedical Applications. *Chemistry & Chemical Technology*, Volume 4, pp. 159-173.
- Gill, P., Moghadam, T. & Ranjbar, B., 2010. Differential Scanning Calorimetry Techniques: Applications in Biology and Nanoscience. *Journal of biomolecular techniques : JBT*, Volume 21, pp. 167-93.
- Greiner, A. & Wendorff, J., 2007. Electrospinning: a fascinating method for the preparation of ultrathin fibers. *Angewandte chemie international edition*, Volume 46(30), pp. 5670-5703.
- Gross, J. & Lapierre, C., 1962. Collagenolytic activity in amphibian tissues: a tissue culture assay. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, pp. 1014-1022.
- Guebitz, G. & Nyanhongo, G., 2018. Enzymes as Green Catalysts and Interactive Biomolecules in Wound Dressing Hydrogels. *Trends in Biotechnology*, Volume 7, pp. 1040-1053.
- Gupta, P., Vermani, K. & Garg, S., 2002. Hydrogels: from controlled release to pH-responsive drug delivery. *Drug Discovery Today*, 7(10), pp. 569-579.
- Hamdy, H., 2008. Extracellular collagenase from *Rhizoctonia solani*: Production, purification and characterization. *Indian Journal of Biotechnology*, Volume 7, pp. 333-340.
- He, J.-H. et al., 2008. *Electrospun Nanofibres and Their Applications*. Shrewsbury, Shropshire, United Kingdom: iSmithers: Shawbury.
- Hoare, T. & Kohane, D., 2008. Hydrogels in drug delivery: Progress and challenges. *Polymer*, 49(8), pp. 1993-2007.

- Hoffman, A., 1987. Applications of thermally reversible polymers and hydrogels in therapeutics and diagnostics. *Journal of Controlled Release*, Volume 6, pp. 297-305.
- Hoffman, A., 2012. Hydrogels for biomedical applications. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, Volume 64, pp. 18-23.
- Huang, J., Fu, S. & Gan, L., 2019. Chapter 4 - Lignin Chemicals and Their Applications. *Em: Lignin Chemistry and Applications*, pp. 79-134.
- Jin, B., Alter, H., Zhang, Z. & Cheng, L., 2005. Reversibility of experimental rabbit liver cirrhosis by portal collagenase administration. *Laboratory Investigation*, Volume 85(8), pp. 992-1002.
- Jordan, G., 2008. The use of intralesional clostridial collagenase injection therapy for Peyronie's disease: a prospective, single-center, non-placebo-controlled study. *The Journal of Sexual Medicine*, Volume 5, pp. 180-187.
- Jug, M., Becirevic-Lacan, M., Cetina-Cizmek, B. & Horvat, M., 2004. Hydroxypropyl methylcellulose microspheres with piroxicam and piroxi-cam-hydroxypropyl-cam-hydroxypropyl-. *Pharmazie*, Volume 59(9), pp. 686-691.
- Kamoun, E., Kenawy, E.-R. & Chen, X., 2017. A review on polymeric hydrogel membranes for wound dressing applications: PVA-based hydrogel dressings. *Journal of Advanced Research*, Volume 8, pp.217-233.
- Kamoun, E., Kenawy, E.-R. & Chen, X., 2017. A review on polymeric hydrogel membranes for wound dressing applications: PVA-based hydrogel dressings. *Journal of Advanced Research*, Volume 8, pp. 217-233.
- Kang, S.-I., Jang, Y.-B., Choi, Y.-J. & Kong, J.-Y., 2005. Purification and properties of a collagenolytic protease produced by marine bacterium *Vibrio vulnificus* CYK279H. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, Volume 10(6), pp. 593-598.
- Katsogiannis, K., Vladisavljević, G. & Georgiadou, S., 2015. Porous electrospun polycaprolactone (PCL) fibres by phase separation. *European Polymer Journal*, Volume 69, pp. 284-295.
- Kerihuel, J., 2010. Effect of activated charcoal dressings on healing outcomes of chronic wounds. *Journal of Wound Care*, Volume 19, pp. 208-215.
- Khan, N., 2012. Applications of electrospun nanofibers in the biomedical field. *Undergraduate Researchers at Guelph*, Volume 5, pp. 63-73.
- Koehler, J., Brandl, F. & Goepferich, A., 2018. Hydrogel wound dressings for bioactive treatment of acute and chronic wounds. *European polymer Journal* 100, pp. 1-11.
- Kulkarni, V., Butte, K. & Rathod, S., 2012. Natural Polymers- A comprehensive Review. *International Journal of Research in Pharmaceutical and Biomedical Sciences*, Volume 3(4), pp. 1597-1613.
- Kwon, S., Kong, B. & Park, S., 2015. Physicochemical properties of pH-sensitive hydrogels based on hydroxyethyl cellulose-hyaluronic acid and for applications as transdermal delivery systems for

skin lesions. Eur. J. Pharm. Biopharm. Off. J. Arbeitsgemeinschaft Pharm. Verfahrenstechnik EV, Volume 92, pp. 146–154.

Lamas, M., 2015. Bio scaffolds poliméricos para construção de estruturas celulares. Dissertação de Mestrado. Universidade de Coimbra.

Leite, J., 2008. Aplicação das Técnicas de Espectroscopia FTIR e de Micro Espectroscopia Confocal Raman à Preservação do Património. Dissertação de Mestrado. Faculdade de Engenharia da Universidade do Porto (FEUP).

Li, J. & Mooney, D., 2016. Designing hydrogels for controlled drug delivery. Nature Reviews Materials, Volume 1.

Lima, C., 2015. Caracterização bioquímica de lesões neoplásicas via espectroscopia de absorção no infravermelho por transformada de Fourier. Dissertação de Mestrado. Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, São Paulo.

Lin, C.-C. & Metters, A. T., 2006. Hydrogels in controlled release formulations: Network design and mathematical modeling. Advanced Drug Delivery Reviews, Volume 58, pp. 1379-1408.

Liu, M. & Jia, G., 2018. Modern Wound Dressing Using Polymers/Biopolymers. Journal of Material Sciences & Engineering, Volume 7(4), pp. 454.

Li, Y., Huang, Z. & Lǚ, Y., 2006. Electrospinning of nylon-6,66,1010 terpolymer. European Polymer Journal, 42(7), pp. 1696-1704.

Lopes, C., Lobo, J. & Costa, P., 2005. Formas farmacêuticas de liberação modificada: polímeros hidrofílicos. Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences, Volume 41, pp. 143-154.

Lopes, C. M., Lobo, J. M. S. & Costa, P., 2005. Formas farmacêuticas de liberação modificada: polímeros hidrofílicos. Rev. Bras. Cienc. Farm. [online], Volume 41, pp. 143-154.

Machado, S., 2018. Desenvolvimento e caracterização de um hidrogel sensível ao pH para libertação controlada do ácido cafeico. Dissertação de Mestrado. Escola de Engenharia, Universidade do Minho, Guimarães.

Malik, N., Ahmad, M. & Minhas, M., 2017. Cross-linked β -cyclodextrin and carboxymethyl cellulose hydrogels for controlled drug delivery of acyclovir. Volume 12. Doi:10.1371/journal.pone.0172727

Martins, A. et al., 2015. Physical and mass transfer properties of electrospun ϵ -polycaprolactone nanofiber membranes. Em: Process Biochemistry, pp. 885-892.

Martins, A., Reis, R. & Neves, N., 2008. Electrospinning: processing technique for tissue engineering scaffolding. International Materials Reviews, Volume 53:5, pp. 257-274.

Massoumi, B., Ramezani, M., Jaymand, M. & Ahmadinejad, M., 2015. Multi-walled carbon nanotubes-g-[poly(ethylene glycol)-b-poly(ϵ -caprolactone)]: synthesis, characterization, and properties. Journal of Polymer Research, Volume 11, pp. 1-11.

Matos, C., 2016. Síntese e caracterização de nanofibras de policaprolactona com adição de progesterona utilizando o solvente ácido acético pelo método de eletrospiação. Tese de Doutoramento. Escola de Engenharia, Universidade do Minho, Guimarães.

- Mattoso, L. et al., 2012. Electrospinning of Polymers in Solution. Part I: Theoretical Foundation. *Polímeros: Ciência e Tecnologia*, Volume 22, pp. 170-177.
- Meikle, S., 2016. Silver-doped hydrogels for wound dressings. Em: *Wound Healing Biomaterials*. Volume 2, pp. 335-351.
- Mendes, A., Oliveira, P., Castro, H. & Giordano, R., 2011. Aplicação de quitosana como suporte para a imobilização de enzimas de interesse industrial. *Química Nova*, Volume 34, pp. 831-840.
- Mesquita, M. et al., 2018. Imobilização enzimática em matrizes poliméricas. *Boletim Informativo Geum*, Volume 9, pp. 38-50.
- Middleton, J. & Tipton, A., 2000. Synthetic biodegradable polymers as orthopedic devices. *Biomaterials*, 21(23), pp. 2335-2346.
- Miranda, T., Le Goff, A., Pereira, A. & Soares, G., 2010. Studies on cotton modification with dodecyl succinic anhydride (DDSA). Em: *Book of Proceedings-International Textile Clothing & Design Conference*. Dubrovnik: University of Zagreb. Faculty of Textile Technology, pp. 1-6.
- Mir, M. et al., 2018. Synthetic polymeric biomaterials for wound healing: a review. *Progress in Biomaterials*, Volume 7(5), pp. 1-21.
- Mogosanu, G. & Grumezescu, A., 2014. Natural and synthetic polymers for wounds and burns dressing. *International Journal of Pharmaceutics*, Volume 463, pp. 127-136.
- Mondal, D., Griffith, M. & Venkatraman, S., 2016. Polycaprolactone-based biomaterials for tissue engineering and drug delivery: Current scenario and challenges. *International Journal of Polymeric Materials and Polymeric Biomaterials*, 65(5), pp. 255-265.
- Monreal-Pérez, P. et al., 2018. Cyclodextrin-Grafted TiO₂ Nanoparticles: Synthesis, Complexation Capacity, and Dispersion in Polymeric Matrices. *Nanomaterials*, Volume 8, pp. 1-14.
- Monteiro, V. et al., 2007. Cana de Acucar ao tratamento de feridas cutaneas por segunda ou terceira intenção. *Medicina Veterinária (UFRPE)*, Volume 1, pp. 1-8.
- Moura, L., Dias, A., Carvalho, E. & Sousa, H., 2013. Recent advances on the development of wound dressings - A review. *Acta Biomaterialia*, Volume 9, pp. 7093-7114.
- Naseri-Nosar, M. & Ziora, Z., 2018. Wound Dressings from Naturally-occurring Polymers: A Review on Homopolysaccharide-based Composites. *Carbohydrate Polymers*, Volume 189, pp. 379-398.
- Nasrollahzadeh, M. et al., 2019. Chapter 2 - Types of Nanostructures. Em: *Interface Science and Technology*, pp. 29-80.
- Naylor, C., Azevedo, E., Bolzan, M. & Barbosa, V., 2009. Tratamento e controle de feridas tumorais e úlceras por pressão no câncer avançado. Em: T. Facina, ed. *Série cuidados paliativos*. Rio de Janeiro: Coordenação de Educação, pp. 33-40.
- Nazarko, L., 2006. Advanced wound care products for accelerating healing. *Nursing and Residential Care*, Volume 8(2), pp. 65-68.

- Neuman, M., Nanau, R., Oruña-Sanchez, L. & Coto, G., 2015. Hyaluronic Acid and Wound Healing. *Journal of Pharmacy & Pharmaceutical Sciences*, Volume 18(1), pp. 53 - 60.
- Ng, H. et al., 2018. *Thermogravimetric Analysis of Polymers*, 1, pp. 1-29.
- Nicoletti, A. et al., 2013. Effects of different crosslinking conditions on the chemical-physical properties of a novel bio-inspired composite scaffold stabilised with 1,4-butanediol diglycidyl ether (BDDGE). *J. Mater. Sci. Mater. Med*, 24(1), pp. 17–35.
- O. Porfírio, L. et al., 2015. Compatibility study of hydroxypropylmethylcellulose films containing zidovudine and lamivudine using thermal analysis and infrared spectroscopy. *J. Therm. Anal. Calorim*, Volume 120, pp. 817–828.
- Okuda, T., Tominaga, K. & Kidoaki, S., 2010. Time-programmed dual release formulation by multilayered drug-loaded nanofiber meshes. *Journal of Controlled Release*, Volume 143, pp. 258-264.
- Oliveira, V. et al., 2017. Colagenases do pescado e suas aplicações industriais. *PUBVET*, Volume 11, pp. 243-255.
- Ozcan, C. et al., 2002. Enzymatic debridement of burn with collagenase in children with partial-thickness burns. *Journal of the International Society for Burn Injuries*, Volume 28, pp. 791-794.
- Pan, J.-F., Liu, N.-h., Sun, H. & Xu, F., 2014. Preparation and Characterization of Electrospun PLCL/Poloxamer Nanofibers and Dextran/Gelatin Hydrogels for Skin Tissue Engineering. *PLoS One*, Volume 9, pp. 1-12.
- Pereira, R., 2014. Técnicas de imobilização e estabilização de lipases obtidas a partir de diferentes fontes microbianas. Dissertação para obtenção do grau de Engenharia Química. Instituto de Ciência e Tecnologia, Universidade Federal de Alfenas, Poços de Caldas-MG.
- Petry, M., Borghett, G. & Bassani, V., 2007. Influência de Ciclodextrinas e Polímero Hidrofílico sobre a Hidrossolubilidade de Diferentes Formas Polimórficas de Quercetina. *Latin American Journal of Pharmacy*, Volume 26, pp. 831-836.
- Pillai, C., Paul, W. & Sharma, C., 2009. Chitin and chitosan polymers: Chemistry, solubility and fiber formation. *Progress in Polymer Science*, Volume 34, pp. 641-678.
- Pinho, E., 2014. Development of a New Antimicrobial. Tese de Doutorado. Escola de Engenharia, Universidade do Minho, Guimarães.
- Pinho, E., Calhelha, R., Ferreira, I. & Soares, G., 2018. Cotton-hydrogel composite for improved wound healing: Antimicrobial activity and anti-inflammatory evaluation-Part 2. *Polymers for Advanced Technologies*, Volume 30, pp. 863-871.
- Pinho, E., Henriques, M. & Soares, G., 2014b. Caffeic acid loading wound dressing: physicochemical and biological characterization. *Ther. Deliv.* 5, pp. 1063–1075.
- Pinho, E., Henriques, M. & Soares, G., 2014. Cyclodextrin/cellulose hydrogel with gallic acid to prevent wound infection. *Cellulose* 21, pp. 4519–4530.

- Rajwade, J., Paknikar, K. & Kumbhar, J., 2015. Applications of bacterial cellulose and its composites in biomedicine. *Appl Microbiol Biotechnol*, Volume 99, pp. 2491-2511.
- Ramakrishna, S. et al., 2006. Electrospun nanofibers: solving global issues. *Materialstoday*, Volume 9, pp. 40-50.
- Ramírez-Cedillo, E. et al., 2019. Electrospun Polycaprolactone Fibrous Membranes Containing Ag, TiO₂ and Na₂Ti₆O₁₃ Particles for Potential Use in Bone Regeneration. *Membranes (Basel)*, Volume 12, pp. 1-14.
- Raov, M., Mohamad, S. & Abas, M., 2013. Synthesis and Characterization of β -Cyclodextrin Functionalized Ionic Liquid Polymer as a Macroporous Material for the Removal of Phenols and As(V). *Int J Mol Sci*, Volume 15, pp. 100–119.
- Ratner, B., Hoffman, A., Schoen, F. & Lemons, J., 2013. An introduction to Materials in Medicine. *Biomaterials Science*, Volume 3, pp. 757-1118.
- Reis, C. et al., 2019. Design of Immobilized Enzyme Biocatalysts: Drawbacks and Opportunities. *Quim. Nova*, Volume 42, pp. 768-783.
- Resende, R. R., 2016. Imobilização Enzimática: Princípios Fundamentais e Tipos de Suporte. Em: *Biotecnologia aplicada à Agro&Indústria: Fundamentos e Aplicações*. São Paulo, Volume 4, pp. 529-556.
- Ricci, A. et al., 2015. Application of Fourier Transform Infrared (FTIR) Spectroscopy in the Characterization of Tannins. *Appl. Spectrosc. Rev*, Volume 50, pp. 407– 442.
- Rizwan, M. et al., 2017. pH sensitive hydrogels in drug delivery: Brief history, properties, swelling, and release mechanism, material selection and applications. *Polymers*, Volume 9(4), pp. 1-137.
- Rocha, M., Cunha, E., Dinis, A. & Coelho, C., 2006. Feridas uma Arte Secular - Avanços Tecnológicos no Tratamento de Feridas.
- Rodriguez-Tenreiro , C., Alvarez-Lorenzo , C. & Rodriguez-Perez , A., 2006. New cyclodextrin hydrogels cross-linked with diglycidylethers with a high drug loading and controlled release ability. *Pharm Res* 23, pp. 121–130.
- Rosas-Casarez, C. et al., 2014. Experimental study of XRD, FTIR and TGA techniques in geopolymeric materials. A: *International Conference on Advances in Civil and Structural Engineering*. "Proceedings of the International Conference on Advances in Civil and Structural Engineering (CSE), 02-03 August, pp. 25-30.
- Saghazadeh, S. et al., 2018. Drug delivery systems and materials for wound healing applications. *Advanced Drug Delivery Reviews*, pp. 138-166.
- Santos, C., Bretas, R., Branciforti, M. & Canova, T., 2011. Preparação e Caracterização de Nanofibras de Nanocompósitos de Poliamida 6,6 e Argila Montmorilonita. *Polímeros*, Volume 21, pp. 398-408.
- Saokham, P., Muankaew, C., Jansook, P. & Loftsson, T., 2018. Solubility of Cyclodextrins and Drug/Cyclodextrin Complexes. *Molecules*, Volume 23(5), pp. 1-1161.

Schwingel, L., Fasolo, D. & Holzschuh, M., 2008. Association of 3-O-methylquercetin with β -cyclodextrin: complex preparation, characterization and ex vivo skin permeation studies. *J Incl Phenom Macrocycl Chem* 62, pp. 149–159.

SEMAT, 2019. SEMAT. [Online] Available at: [http://www.semat.lab.uminho.pt/ Equipamento_1.html](http://www.semat.lab.uminho.pt/Equipamento_1.html) [Acedido em 5 10 2019].

Sezer, A. & Cevher, E., 2011. Biopolymers as Wound Healing Materials: Challenges and New Strategies. Em: *Biomaterials Applications for Nanomedicine*, pp. 661-664.

Simões, D. et al., 2018. Recent advances on antimicrobial wound dressing: A review. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, Volume 127, pp. 130-141.

Sinha, V. et al., 2004. Poly- ϵ -caprolactone microspheres and nanospheres: an overview. *International Journal of Pharmaceutics*, Volume 278, pp. 1–23.

Speranza, V., Sorrentino, A., De Santis, F. & Pantani, R., 2014. Characterization of the Polycaprolactone Melt Crystallization: Complementary Optical Microscopy, DSC, and AFM Studies. *The Scientific World Journal*, Volume 2014, pp. 1-9.

Sudhakar, Y., Selvakumar, M. & Bhat, D., 2018. Methods of Preparation of Biopolymer Electrolytes. Em: *Biopolymer Electrolytes*, pp. 35-52.

Suganya, S. et al., 2014. Aloe vera incorporated biomimetic nanofibrous scaffold: a regenerative approach for skin tissue engineering. *Iran. Polym. J.*, pp. 237-248.

Suksaeree, J. et al., 2015. Formulation, Physicochemical Characterization, and In Vitro Study of Chitosan/HPMC Blends Based Herbal Blended Patches. *AAPS PharmSciTech*, Volume 16, pp. 171–181.

Sun, R., Sun, X. & Tomkinson, J., 2003. Hemicelluloses and Their Derivatives. Em: In: Gatenholm P, Tenkanen M (eds) *Hemicelluloses: Science and Technology*. Washington, DC: American Chemical Society, pp. 2-22.

Sun, X. et al., 2016. Voriconazole Compositated Polyvinyl Alcohol/Hydroxypropyl- β -Cyclodextrin Nanofibers for Ophthalmic Delivery. *PLOS ONE* 11, e0167961.

Supaphol, P., Mit-uppatham, C. & Nithitanakul, M., 2005. Ultrafine Electrospun Polyamide-6 Fibers: Effects of Solvent System and Emitting Electrode Polarity on Morphology and Average Fiber Diameter. *Macromol. Mater. Eng.*, Volume 290, pp. 933-942.

Suta, L.-M. et al., 2013. Evaluation Study of the Inclusion Complexes of Some Oxicams with 2-hydroxypropyl- β -cyclodextrin. *Rev. Chim. -Buchar.- Orig.*, pp. 1279–1283.

Tucker, N. et al., 2012. The History of the Science and Technology of Electrospinning from 1600 to 1995. *Journal of engineered fibers and fabrics*, Volume 7(2), pp. 1-12.

Van Wart, H. & Steinbrink, D., 1981. A Continuous Spectrophotometric Assay for *Clostridium histolyticum* Collagenase. *Analytical Biochemistry*, Volume 113, pp. 356-365.

Vieira, J., 2009. Síntese e caracterização da metilcelulose, a partir do bagaço de cana-de-açúcar, para utilização como aditivo na construção civil, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia.

- Wang, H. et al., 2004. Improved enzymatic isolation of fibroblasts for the creation of autologous skin substitutes. *In Vitro Cellular Developmental Biology Animal*, Volume 40(8-9), pp. 268-277.
- Wang, Y., Rodriguez-Perez, M., Reis, R. & Mano, J., 2005. Thermal and Thermomechanical Behaviour of Polycaprolactone and Starch/Polycaprolactone Blends for Biomedical Applications. *Macromol. Mater. Eng*, Volume 290, pp. 792–801.
- Watt, A., Curtin, C. & Hentz, V., 2010. Collagenase injection as nonsurgical treatment of Dupuytren's disease: 8-year follow-up. *Journal of Hand Surgery*, Volume 35A, pp. 534-539.
- Wei, C.-S., Kim, C., Kim, H. & Limsakul, P., 2012. Hydrogel drug delivery: diffusion models, pp. 1-23.
- Whitney, J., 2005. Overview: Acute and Chronic Wounds. *Nursing Clinics of North America*, Volume 40(2), pp. 191–205.
- Woodruff, M. & Hutmacher, D., 2010. The return of a forgotten polymer—Polycaprolactone in the 21st century. *Progress in Polymer Science*, 35(10), pp. 1217-1256.
- Xin, F. et al., 2019. Chapter 9 - Biosynthetic Technology and Bioprocess. *Em: Current Developments in Biotechnology and Bioengineering*, pp. 207-232.
- Yahia , L. et al., 2015. History and Applications of Hydrogels. *J Biomedical Sci*, Volume 4, pp. 1-23.
- Zhang, L., Zhou, J. & Zhang, L., 2013. Structure and properties of bcyclodextrin/cellulose hydrogels prepared in NaOH/urea aqueous solution. *Carbohydr Polym* 94, pp. 386–393.
- Zong, X. et al., 2005. Electrospun fine-textured scaffolds for heart tissue constructs. *Biomaterials*, Volume 26, pp. 5330–5338.