Universidade do Minho
Escola de Engenharia

Lara Cristina Silva Ribeiro

Produção de um sistema sanduíche multifuncional para combater infeções em feridas crónicas

outubro de 2023

Produção de um sistema sanduíche multifuncional para combater infeções em feridas crónicas

Lara Ribeiro

UMinho | 2023

Universidade do Minho
Escola de Engenharia

Lara Cristina Silva Ribeiro

Produção de um sistema sanduíche multifuncional para combater infeções em feridas crónicas

Dissertação de Mestrado
Mestrado em Engenharia Química e Biológica

Trabalho realizado sob a orientação da
Doutora Helena Prado Felgueiras
e da
Doutora Carla Manuela Pereira Marinho da Silva

outubro de 2023

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.



Atribuição-NãoComercial-SemDerivações
CC BY-NC-ND

https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/

Agradecimentos

No culminar de mais uma etapa, que foi sem dúvida a mais desafiante da minha vida e um enorme crescimento tanto a nível profissional como a nível científico, e ao longo destes cincos anos de curso foram várias as pessoas que me ajudaram a concretizar este sonho que sempre tive, o sonho de um dia ser engenheira resta-me apenas expressar os meus mais sinceros agradecimentos a todos aqueles que tornaram possível a sua conclusão.

Primeiramente gostaria de agradecer à instituição que há cerca de cinco anos me acolheu a Universidade do Minho. A todos os professores que passaram pela minha vida ao longo destes cinco anos, uma muito obrigada por todos os ensinamentos e toda a formação que me deram. Quero também agradecer ao centro desta instituição que me permitiu realizar este projeto, o 2C2T. Agradeço a toda a gente que neste centro tão bem me recebeu e acolheu e que tanto me ensinou.

À Professora Helena, a minha orientadora, por todo o apoio, paciência, compreensão e disponibilidade, por todo o conhecimento e sugestões transmitidas ao longo destes seis meses, por todo o tempo que dedicou a mim e a este projeto e por me guiar em cada etapa, um muito obrigado, sem ti esta dissertação não seria possível.

À Professora Carla por toda, ajuda, apoio, orientação e conselhos dados, por toda a disponibilidade e sugestões cedidas ao longo da realização da dissertação, bem como ao longo do mestrado, tanto na qualidade de Professor como de orientador, um muito obrigado.

Às minhas mentoras, Marta e Ana Rita, que neste projeto tiveram presentes durante todo o processo, por todo o apoio, paciência, compreensão e por toda a disponibilidade ao longo destes seis meses, por todo o tempo que dedicaram a mim e a este projeto, um muito obrigada.

Por último e mais importante, a toda à minha família, principalmente aos meus pais, João e Teresa, e ao meu irmão João Pedro, porque sem eles este percurso não teria sido possível, sempre lutaram comigo e me inspiraram para que este sonho se concretizasse. Tenho a agradecer por todo o amor, apoio, incentivo e orgulho que demonstram constantemente em mim e por estarem sempre presentes ajudaram e apoiaram-me com tudo o que podia e nas minhas decisões, em todas as fases da minha vida. Obrigada por acreditarem sempre em mim! Sou eternamente agradecida, a eles eu dedico esta dissertação, é um orgulho ser vossa filha e pertencer a esta família!

E porque estes 5 anos passaram a correr, um muito obrigada!

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.

Sumário

Produção de um sistema sanduíche multifuncional para combater infeções em feridas crónicas

As feridas crónicas são caracterizadas pela interrupção do processo de cicatrização em uma ou mais fases. Estas feridas caracterizam-se por: matrizes celulares defeituosas, alta concentração microbiana, humidade desregulada, e por ficarem retidas numa fase de inflamação descoordenada, o que as deixa mais suscetíveis à presença e desenvolvimento de infeções. A estratégia geralmente adotada para gerir ou tratar estas feridas é baseia-se na aplicação de pensos. No entanto, pensos convencionais são incapazes de combater infeções, manter uma humidade local ótima, ou promover as fases de cicatrização. Assim, foi proposto desenvolver um sistema multifuncional em sanduíche, modificado com agentes bioativos, capaz de combater infeções em feridas crónicas. O sistema foi idealizado com três camadas: a camada exterior composta por um filme fibroso de policaprolactona (PCL) que trabalha como uma barreira para prevenir outros microrganismos e impurezas de alcançar à ferida; a camada intermédia formada por um hidrogel de alginato de sódio (SA) carregado com ampicilina (Amp) que mantém um ambiente húmido, absorve exsudatos e liberta a carga antimicrobiana de forma controlada; e a camada interna, também ela composta por um filme fibroso obtido da combinação de PCL e polietileno glicol (PEG), que facilita a integração e reconhecimento celulares, impede a adesão local do penso, e promove efeitos antimicrobianos complementares.

Análises antimicrobianas da Amp e PEG foram realizadas contra as bactérias prevalentes em feridas crónicas, *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*. O PCL foi utilizado sozinho (camada externa), ou combinado com PEG (camada interna) à concentração mínima bactericida (MBC), e processado na forma de filmes fibrosos por eletrofiação. O hidrogel foi obtido usando uma solução aquosa de SA modificada com Amp a 100×MBC. Análises termo gravimétricas determinaram a estabilidade térmica dos polímeros. O sistema demonstrou capacidade de hidratação até 60% do seu peso inicial após 24 h e o teste de degradação reportou perdas de massa de cerca de 70% após 7 dias de incubação (perfil biodegradável). A libertação do antibiótico foi monitorizada até 24 h, confirmando a libertação cadenciada das moléculas encapsuladas no hidrogel. Testes antimicrobianos determinaram a elevada eficácia do sistema (> 99% eliminação das bactérias). Ensaios de adesão confirmaram a facilidade do sistema em ser destacado sem grande esforço mecânico. Em suma, os dados mostram a eficiência do sistema sanduíche para a potencial aplicação no tratamento de feridas crónicas.

Palavras-chave: filmes poliméricos fibrosos; hidrogel carregado com fármaco; sistema sanduíche; anti-adesivo; potencial tratamento para feridas.

Abstract

Production of multifunctional sandwich-like system for fighting infections in chronic wounds

Chronic wounds are wounds in which the healing cascade gets interrupted in one or more phases. Usually, these wounds are characterized by defective cell matrices, high microbial concentration, dysregulated moisture, and for being trapped in an uncoordinated and self-sustaining inflammatory phase, which makes them more susceptible to the presence of infections. The strategy adopted to manage or treat these wounds is through the application of dressings. However, conventional dressings are not ideal, since they are incapable of fighting infections, maintaining optimum humidity at site or promoting the healing phases. As such, a multifunctional sandwich-like system was here proposed and examined for its potential in fighting CW infections. The scaffolding system was made of three layers: (outer) fibrous mat of polycaprolactone (PCL) working as a barrier for preventing other microorganisms and impurities from reaching the wound bed; (middle) sodium alginate (SA) hydrogel loaded with the antimicrobial agent ampicillin (Amp) for maintaining a moisture environment, absorbing exudates and liberating the antimicrobial payload in a paced manner; and (inner) a second fibrous mat composed of PCL and polyethylene glycol (PEG) for facilitated cell integration and recognition, preventing wound adhesion and for complementary antimicrobial effects.

Antimicrobial examinations of Ampicillin and PEG were conducted against the most prevalent bacteria in CW, *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. PCL was used alone (outer layer) or modified with PEG (inner layer) at MBC and processed in the form of fibrous mats via electrospinning. The hydrogel was obtained by solvent casting-phase inversion method using SA aqueous solution in combination with Amp at 100×MBC. Thermal gravimetry and calorimetry analyses established the polymers' thermal stability. Hydration capacity was averaged at > 60% of the sample's weight, and degradation experiments reported a loss in mass of ≈ 70% after 7 days of incubation (biodegradable profile). Controlled release of the antibiotic was examined up to 24 h, revealing a paced liberation of the hydrogel-entrapped molecules. Antimicrobial testing determined the high efficiency of the scaffold (> 99% elimination of both bacteria). Adhesion experiments determined the scaffold's ability to be detached without great mechanical effort. Overall, data reports the effectiveness of this sandwich-like system for potential applications in CW care.

Keywords: fibrous polymer films, drug-loaded hydrogel, sandwich-like system, anti-adhesive, effective wound care.

Índice

Agradecimentos ii
Sumário iv
Abstract v
Índice vi
Lista de Figuras viii
Lista de Tabelas x
1. Introdução Geral 1
2. Estado da arte 3
2.1. Feridas agudas e crónicas 3
2.2. Pensos 4
2.3. Pensos multicamada 6
2.3.1. Produção de nafibras por eletrofiação 7
2.3.2. Hidrogéis 9
2.4. Polímeros 10
2.4.1. Policaproclactona (PCL) 10
2.4.2. Polietilenoglicol (PEG) 11
2.4.3. Alginato de sódio (SA) 12
2.5. Antibióticos 13
2.5.1. Ampicilina (Amp) 14
3. Motivação e objetivos 15
4. Materiais e métodos 16
4.1. Materiais 16
4.2. Métodos 16
4.2.1. Avaliação do caracter antimicrobiano dos agentes ativos 16
4.2.2. Preparação do hidrogel antibacteriano 17
4.2.3. Produção das camadas fibrosas interna e externa por eletrofiação 18
4.2.4. Caracterização física, química, térmica e mecânica 19
4.2.5. Avaliação *in vitro* do sistema sanduíche 22
5. Resultados e discussão 23
5.1. Avaliação do caracter antimicrobiano dos agentes ativos 23
5.1.1. Determinação dos MIC e MBC 23
5.2. Hidrogéis antibacterianos 24

5.2.1. Otimização das condições de produção 24
5.2.2. Hidrogéis com ação antibacteriana 27
5.3. Filmes fibrosos interno e externo 29
5.3.1. Camada externa de PCL 29
5.3.2. Camada interna de PCL/PEG 31
5.4. Caracterização química, física e mecânica 33
5.4.1. Morfologia do sistema sanduíche 33
5.4.2. Composição química (ATR-FTIR) 34
5.4.3. Resposta térmica (TGA) 36
5.4.4. Molhabilidade 39
5.4.5. Capacidade de hidratação 40
5.4.6. Perfil de degradação 41
5.4.7. Adesividade 43
5.4.8. Libertação de Amp 45
5.5. Avaliação *in vitro* do sistema sanduíche 46
5.5.1. Ensaio “shake flask” 46
5. Conclusões finais 49
Bibliografia 51
Anexos 57
Anexo A) Dados complementares à análise FTIR 57
Anexo B) Testes de adesão com a pele de porco 59
Anexo C) Determinação da equação para a analise da libertação da ampicilina 61

Lista de Figuras

Figura 1: Fases de cicatrização de uma ferida: A-Hemostasia; B-Inflamação; C-Proliferação; D-Remodelação (Firlar et al., 2022). 3

Figura 2: Pensos comerciais, (a) gases; (b) filmes transparentes; (c) hidrocloides; (d) espumas e (e) hidrogéis (adaptado de Laurano et al., 2022). 5

Figura 3: Esquema representativo do equipamento de eletrofiação (Jain et al., 2020). 8

Figura 4: Hidrogéis aplicados no tratamento de feridas, (a) tubos de hidrogel e (b) filmes de hidrogel. . 9

Figura 5: Estrutura química genérica do polímero PCL. 11

Figura 6: Estrutura química genérica do PEG (Zarrintaj et al., 2020). 11

Figura 7: Estrutura química do SA. 12

Figura 8: Estrutura química da ampicilina. 14

Figura 9: (a) Exemplo de hidrogel 70/30 SA/GN processado com secagem a 50°C. Realce a vermelho de região heterogénea, onde o líquido parece ter evaporado de forma diferente da área restante (hidrogel impossível de ser destacado da placa de petri). (b) Exemplo do hidrogel de 70/30 SA/GN processado 21°C por 144 h e banho de coagulação aplicado por 2 h. Destaque a vermelho de região notoriamente mais seca. (c) Hidrogel de 90/10 SA/GN após 24 h de secagem a 21 °C e 1 h em banho de coagulação. (d) Hidrogel de 100% SA após 24 h de secagem a 21°C e 1 h em banho de coagulação. 27

Figura 10: Redução do número de colónias de *S. aureus* e *E. coli* após 24 h de incubação com hidrogéis de SA carregados com Amp a diferentes concentrações. 28

Figura 11: Micrografias dos filmes de 14% de PCL processados por eletrofiação durante 1 h, com voltagem de 12 kV, fluxo de 0,7 mL/h e 17 cm de distância entre agulha (18 Gauge) e coletor. Imagens foram capturadas a 500× (esquerda; escala 200 μm) e 10.000× (direta; escala 10 μm) de ampliação. 30

Figura 12: Micrografias dos filmes de PCL/PEG processados por eletrofiação durante 1 h, com voltagem de 12 kV, fluxo de 0,7 mL/h e 17 cm de distância entre agulha (18 Gauge) e coletor. Imagens foram capturadas a 500× (esquerda; escala 200 μm) e 10.000× (direta; escala 10 μm). 33

Figura 13: Esquema da produção do sistema sanduíche: (a) imagem SEM do filme fibroso exterior de PCL; (b) camada intermédia - hidrogel carregado com Amp; (c) imagem SEM do filme fibroso interior de PCL/PEG; (d) visão superior do sistema sanduíche; (e) visão transversal do sistema sanduíche. A linha vermelha tracejada demonstra a divisão entre as três camadas (1 – filme fibroso de PCL; 2 – hidrogel carregado com Amp; 3 – filme fibroso de PCL/PEG). 34

Figura 14: Espectros ATR-FTIR de (a) PCL, PEG e fibras de PCL e PCL/PEG, (b) SA, Amp e hidrogéis de SA e SA/Amp e (c) sistema sanduíche de PCL+SA+PCL, PCL+SA/Amp+PCL, PCL+SA+PCL/PEG e PCL+SA/Amp+PCL/PEG. 35

Figura 15: Espectros TGA de (a) pó de PCL e PEG e fibras de PCL e PCL/PEG; (b) SA e Amp pó e hidrogel de SA e SA/Amp e (c) fibras de PCL e PCL/PEG, hidrogel de SA e SA/Amp, e sistema sanduíche de

PCL+SA+PCL, PCL+SA/Amp+PCL, PCL+SA+PCL/PEG e PCL+SA/Amp+PCL/PEG, obtidos sob atmosfera de azoto a 200 mL/min. 37

Figura 16: Força (N) necessária para promover a separação entre o papel cavalinho e as amostras dos hidrogéis SA e SA/Amp e das sanduíches PCL+SA+PCL, PCL+SA+PCL/PEG, PCL+SA/Amp+PC e PCL+SA/Amp+PCL/PEG. 44

Figura 17: Perfil de libertação da Amp incorporada no sistema sanduíche PCL+SA/Amp+PCL e PCL+SA/Amp+PCL/PEG após 1, 2, 4, 6, e 24 h de incubação em PBS. 45

Figura 18: Redução do número de colónias das bactérias (a) *S. aureus* e (b) *E. coli*, após 1-24 h de incubação a 37 °C com os sistemas sanduiche controlo e final. 47

Figura A-1: Espectros ATR-FTIR dos sistemas sanduíche de PCL+SA+PCL/PEG, PCL+SA+PCL/PEG virado (v), PCL+SA/Amp+PCL/PEG e PCL+SA/Amp+PCL/PEG v. 58

Figura A-2: (a) amostra entre duas tiras de pele de porco; (b) peso sobre a amostra entre as tiras de pele de porco. 59

Figura A-3: amostras após 10 min com peso entre a pele de porco (a) amostra do sistema sanduíche sem adesão à pele; (b) amostra do sistema sanduích com adesão a uma das peles; (c) amostra de hidrogel com adesão à pele superior. 59

Figura A-4: (a) amostra com aderência a duas tiras de papel/cartão; (b) ensaio de adesão no texturometro. Destacado a vermelho o local onde se encontra a amostra. 60

Figura A-5: Curva de calibração de Amp. 61

Lista de Tabelas

Tabela 1: Determinação de MIC e MBC para Amp e PEG contra as bactérias *S. aureus* e *E. coli*..... 23

Tabela 2: Otimização da produção de hidrogéis, SA/GN (70/30, 80/20, 90/10 e 100/0), com variação no volume de solução (5-60 mL), nas condições de secagem (T=21-50 °C e t=0-144 h) e de banho de coagulação (v=5-60 mL e t=0-18 h). 25

Tabela 3: Otimização da produção de fibras de PCL (camada externa). 29

Tabela 4: Otimização da produção de fibras de PCL/PEG (camada interna). 32

Tabela 5: Grau de hidratação das amostras imersas em PBS após 4, 6, 8 e 24 h de incubação a 37°C. 40

Tabela 6: Perfil de degradação das amostras ao longo de sete dias de incubação em PBS a 37°C..... 42

Tabela A-1: Análise dos comprimentos de onda dos espectros de ATR-FTIR e ligações químicas inerentes (adaptada de LibreTexts). 57

1. Introdução Geral

A pele é o maior órgão do corpo humano e tem várias funções, entre as quais a de proteger o corpo contra os ataques do ambiente exterior, incluindo agentes patogénicos, traumas, ataques térmicos ou químicos e/ou da radiação ultravioleta (Wang e Windgergs, 2017 e Abdo et al., 2020). A pele é constituída por três camadas, epiderme, derme e hipoderme, com diferentes composições e organizações (Tavakoli e Klar, 2020). A epiderme é formada por quatro camadas paralelas, enquanto a derme, que consiste essencialmente na matriz extracelular (ECM), é caracterizada por uma organização aleatória das fibras e dos vasos sanguíneos. Já a hipoderme é composta primariamente por gordura e tecido de ligação (Tavakoli e Klar, 2020). Qualquer anormalidade na estrutura da pele que comprometa a sua função é definida como uma ferida. A cicatrização de uma ferida é um mecanismo complexo que envolve várias funções celulares e é caracterizada por quatro fases: a hemostasia (coagulação de sangue), inflamação, proliferação, e remodelação ou maturação do tecido (Tavakoli e Klar, 2020; Raziyeva et al., 2021 e Tottoli et al., 2020). Dependendo das causas e facilidade de cicatrização, as feridas podem ser classificadas em dois grupos principais, feridas agudas e feridas crónicas (ex. úlceras vasculares, úlceras diabéticas e úlceras de pressão). As feridas agudas seguem o processo de cicatrização de maneira organizada com vista à restauração anatómica e de funções. Contrariamente, as feridas crónicas apresentam três problemas principais: (1) interrupção do processo de cicatrização na fase inflamatória, tornando esta fase desregulada e prolongada (Tottoli et al., 2020 e Sharifi et al., 2021); (2) ambiente desfavorável para a proliferação de células (Sharifi et al., 2021); e (3) presença de infeções que aumentam o risco de morbilidade e mortalidade (Sharifi et al., 2021 e Landis, 2008). A presença de microrganismos patogénicos nas feridas crónicas é um problema que tem vindo a piorar nos últimos anos devido ao aumento da resistência a antibióticos (Raziyeva et al., 2021). Duas das principais bactérias infeciosas encontradas em feridas crónicas são a *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) e a *Escherichia coli* (*E. coli*), cujos biofilmes estão muitas vezes presentes nas proximidades da superfície da ferida. Em 2019, apenas nos EUA, as feridas crónicas afetaram 2% da população total (Kadam et al., 2019). Estudos realizados demonstraram que mais de 60% das feridas crónicas estão associadas a infeções bacterianas. (Oluwolu et al., 2022). Em Portugal, estima-se que por 1000 habitantes existem 3,3 portadores de feridas crónicas (dados de 2014), segundo Jorge Pereira Alves em "Feridas: prevalência e custos", tese de doutoramento em Enfermagem, na Universidade Católica Portuguesa.

A estratégia mais comumente utilizada para gerir ou tratar feridas crónicas é através de pensos. No entanto, os pensos convencionais são incapazes de combater infeções ou de promover as fases de cicatrização, oferecendo apenas uma barreira protetora. Tendo em conta estas limitações, é imperativo

desenvolver novas formulações que combatam os principais microrganismos causadores de infeções graves, enquanto estimulam a proliferação e a migração celular e, consequentemente, aceleram a cicatrização (Han e Ceilley, 2017). Biomateriais são materiais com grande potencial para aplicações em dispositivos médicos e várias áreas da medicina com: implantes médicos, engenharia de tecidos, libertação de medicamente e imunoterapia, uma vez que estes materiais possuem a capacidade de interagir em sistemas biológicos para avaliar, tratar, substituir ou melhorar o desempenho de tecidos (Mariani et al. 2019). A pesquisa contínua nesta área aumentou o nível de especialidade dos biomateriais desenvolvidos e, com isto, o impacto na saúde global. Os polímeros representam uma grande porção dos biomateriais de uso em biomedicina graças ao seu fácil processamento na forma de partículas, filmes, espumas, membranas, hidrogéis e fibras. Adicionalmente, a combinação destas estruturas pode ser feita de forma a gerar sistemas biomédicos, interligados, direcionados e especializados. A necessidade de ir ao encontro de determinadas funções ou características de um tecido lesado levou ao desenvolvimento de estruturas mais complexas, geradas da combinação de diferentes tipologias de biomateriais (ex. estrutura de fibra e hidrogel) (Teixeira et al., 2021).

2. Estado da arte

2.1. Feridas agudas e crónicas

Feridas ligeiras na pele podem ocorrer a qualquer momento sob as mais diversas circunstâncias. Em condições normais, o processo de cicatrização passa por quatro fases principais: hemostasia, inflamação, proliferação e remodelação (Figura 1) (Tavakoli e Klar, 2020 e Raziyeva et al., 2021). No entanto, em feridas crónicas o processo normal de cicatrização tende a ser interrompido em uma ou mais fases, sendo frequente ficarem retidas numa fase de inflamação descoordenada e autossustentada deixando-as mais suscetíveis a infeções (Homem et al., 2021).

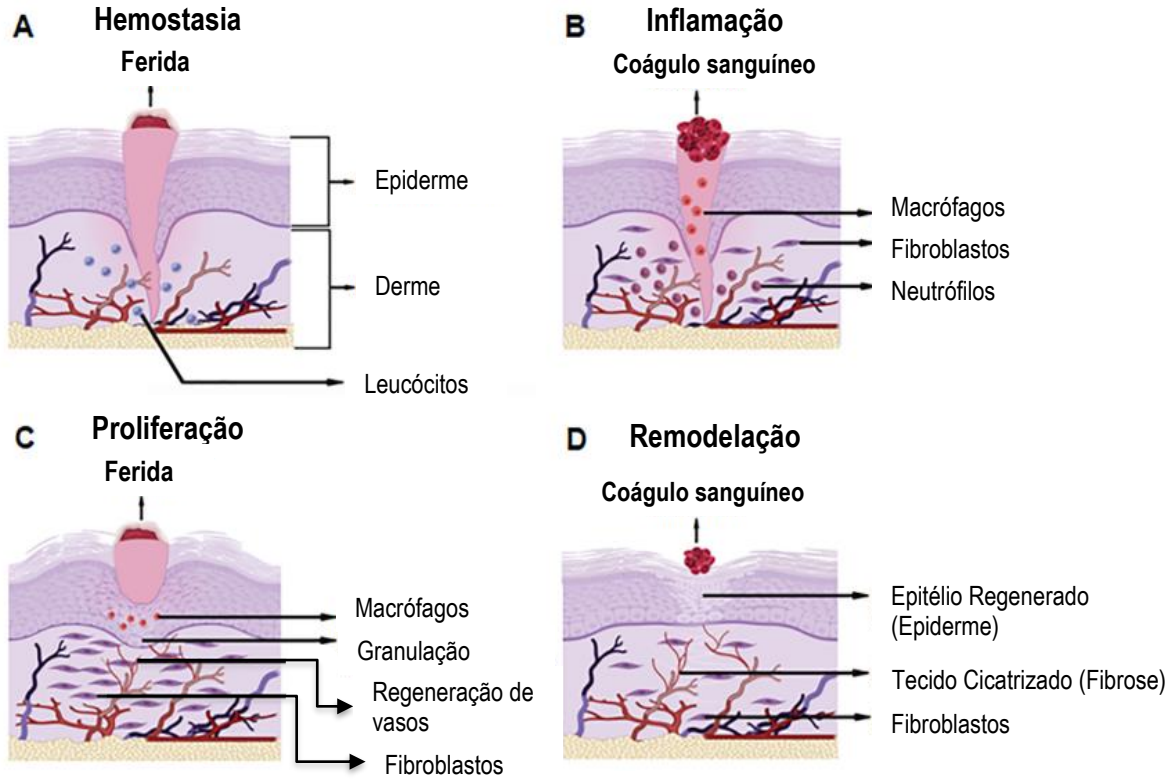


Figura 1: Fases de cicatrização de uma ferida: A-Hemostasia; B-Inflamação; C-Proliferação; D-Remodelação (adaptado de Firlar et al., 2022).

Após o aparecimento da ferida, as duas primeiras fases de cicatrização sucedem-se quase imediatamente (hemostasia e inflamação). A hemostasia é a primeira resposta do corpo que pode durar entre uns minutos até algumas horas, desde o trauma inicial, e envolve a contração vascular para reduzir a perda de sangue, ativação de plaquetas (formação de coágulo e estímulo à inflamação) e desgranulação. A inflamação ocorre imediatamente após a hemostasia, demorando entre 2 e 3 dias, e acontece quando as células imunitárias entram em ação, levando à infiltração de neutrófilos, de

monócitos e à diferenciação em macrófagos (Raziyeva et al., 2021). Além disso, nesta fase, citocinas pró-inflamatórias e fatores de crescimento que promovem a migração de fibroblastos para o local da ferida (produção de muitos componentes da matriz extracelular e sintetização de tecidos de granulação) são libertados para o tecido circundante (Firlar et al., 2022). Numa fase posterior (proliferação), com duração de uns dias até a um mês (Raziyeva et al., 2021), há um aumento da síntese de componentes da matriz extracelular e a angiogénese (que induz o crescimento de uma nova rede de vasos sanguíneos no tecido granulado), na presença de um ambiente apropriado de humidade e oxigénio, e também a reepitelização (as células epiteliais migram das bordas da ferida para cobrir o local afetado). Numa fase final ocorre a remodelação, durante a qual a matriz extracelular é reconstituída para se assemelhar ao tecido saudável, havendo uma diminuição do tecido granulado e o colagénio, o principal componente da matriz extracelular, que é sintetizado e acumulado no tecido de granulação para restaurar a resistência à tração e a elasticidade normal do tecido. Ocorre ainda a apoptose de células provisórias que migraram para a área afetada, sendo restaurada a densidade vascular da ferida (Firlar et al., 2022).

As feridas podem ser classificadas considerando vários aspetos, como por exemplo, a integridade da pele, gravidade, profundidade do corte, características morfológicas e tempo de cicatrização da ferida. Em termos clínicos, as feridas são classificadas de acordo com a duração das fases de cicatrização, até que a ferida seja curada tanto anatomicamente como funcionalmente. Se cada fase ocorrer de maneira ordenada e organizada, a ferida estará completamente cicatrizada num espaço de três meses, sendo estas classificadas como não crónicas (agudas). No entanto, quando ocorre algum tipo de atraso em alguma das fases de cicatrização (ex., trauma repetido, pressão elevada, presença de microrganismos, etc.), sendo mais frequente na fase inflamatória, a ferida tende a ultrapassar esse período e a prolongar o tempo de cicatrização ou sendo mesmo incapaz de cicatrizar, gerando-se uma ferida crónica. Estas feridas podem ser classificas ainda em três grandes categorias: úlceras vasculares (venosas e arteriais), úlceras diabéticas e úlceras de pressão (Firlar et al., 2022).

Feridas crónicas representam um problema grave para a saúde dos pacientes, sendo dolorosas e sensíveis ao toque, geralmente drenando e emitindo odores (Eriksson et al., 2022). Pacientes com este tipo de feridas podem sentir dor crónica, perda de funções e mobilidade, aumento de stress social, depressão, ansiedade, hospitalização prolongada e um risco elevado de morbilidade e mortalidade (Järbrink et al., 2016).

2.2. Pensos

A cicatrização de feridas é um processo organizado e complexo. Em todo o mundo, os pensos

desempenham um papel importante no mercado médico e farmacêutico de cuidados de feridas. Os primeiros materiais utilizados para pensos remontam à civilização Suméria onde eram utilizadas cataplanas de lama, leite e plantas para promover a cicatrização de feridas. Desde esse período que os pensos convencionais (Figura 2) têm evoluído, apesar de continuarem a apresentar os mesmos objetivos (proteger e cicatrizar a ferida) e limitações (combater infeções) (Homaeigohar e Boccaccini, 2020).

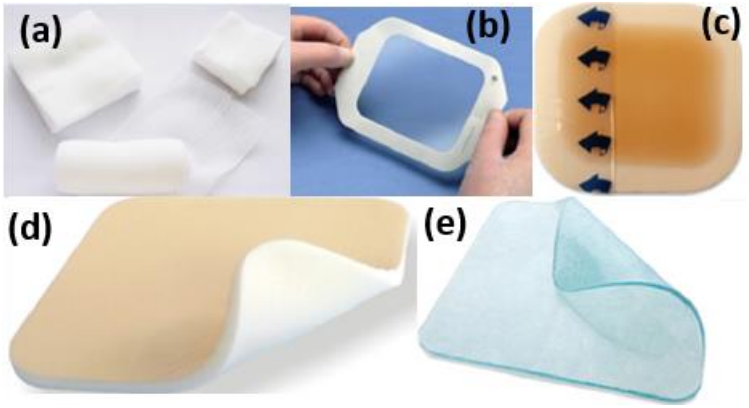


Figura 2: Pensos comerciais, (a) gases; (b) filmes transparentes; (c) hidrocloides; (d) espumas e (e) hidrogéis (adaptado de Laurano et al., 2022).

Atualmente é esperado que os pensos sejam multifuncionais, isto é, que não sejam só capazes de proteger a área afetada de ataques do meio externo, mas também que sejam capazes de acelerar o processo de cicatrização, prevenindo deteriorações futuras da ferida ao mesmo tempo que mantém um ambiente estéril (Felgueiras, 2023 e Teixeira et al., 2020). É portanto essencial desenvolver novas formulações capazes de assegurar um ambiente propício à regeneração da pele, nomeadamente: (1) absorver ou eliminar o excesso de fluídos, exsudatos e componentes tóxicos presentes na superfície da ferida; (2) criar e manter um nível de humidade ótima na ferida; (3) permitir a troca de gases entre a ferida e o meio externo (oxigenação); (4) proteger contra invasões microbianas e sujidade do exterior (ex., através de acabamentos antimicrobianos), além de potenciais traumas; (5) fornecer isolamento térmico; (6) permitir a sua fácil remoção para evitar dor e danos no tecido recém-formado; (7) manter as células viáveis (biocompatíveis) e diminuir a necrose da superfície; (8) aliviar a dor da ferida (analgésico); e (9) ser economicamente viável (Firlar et al., 2022 e Homaeigohar e Boccaccini, 2020).

Considerando que há diferentes tipos de feridas, é de esperar que também haja uma grande variedade de pensos disponíveis, uma vez que um tipo de penso não é adequado para todos os tipos de feridas. Geralmente, os pensos podem ser divididos em diferentes categorias, de acordo com a sua função, tipo de material utilizado na sua produção e aspeto físico (Firlar et al., 2022). Pensos oclusivos são conhecidos por aumentarem a proliferação e a atividade celular ao manterem um nível ótimo de

exsudatos da ferida. Filmes, hidrocolóides e hidrogéis são os grupos mais importantes entre os pensos oclusivos e são os mais usados atualmente. Os filmes são formados por uma camada fina de material polimérico, são flexíveis e semipermeáveis (permitem trocas gasosas), e são frequentemente usados como uma barreira contra contaminações e danos do meio exterior (Firlar et al., 2022 e Homaeigohar e Boccaccini, 2020). No entanto, a remoção/troca deste tipo de penso da ferida pode causar danos no tecido recém-formado e, como o filme não consegue absorver e/ou remover fluídos da ferida, pode comprometer a cicatrização (Firlar et al., 2022). Pensos hidrocolóides são macios e confortáveis, impermeáveis ao vapor de água e ao ar, o que permite criar um ambiente húmido e isolado que pode proteger feridas não infetadas, estimulando, ao mesmo tempo as enzimas naturais do corpo a melhorar a qualidade e a formação de tecido (Firlar et al., 2022 e Homaeigohar e Boccaccini, 2020). Estes pensos apresentam um período de vida longo, podendo permanecer no local lesado por vários dias (Homaeigohar e Boccaccini, 2020). Por outro lado, podem estimular excessivamente a formação de tecido e com isso facilitar a drenagem de fluidos que frequentemente vem acompanhada de um cheiro desagradável (Firlar et al., 2022). Por sua vez, hidrogéis consistem numa rede tridimensional (matriz) de polímeros hidrofílicos, que podem conter até 96% de água, sendo alguns capazes de conter até 99% de água. Oferecem um ambiente húmido, que promove a regeneração dos tecidos lesados. Devido à sua flexibilidade e propriedades reguláveis, pensos em hidrogel podem ser dotados de propriedades funcionais através da adição de células, agentes antimicrobianos, antivirais e antifúngicos, fatores de crescimento e biomoléculas capazes de acelerar a cicatrização (Firlar et al., 2022). Este tipo de penso pode ainda oferecer um efeito calmante e refrescante, aliviando a dor. Contudo, devido à sua elevada capacidade de absorção de fluídos pode causar maceração (Homaeigohar e Boccaccini, 2020).

2.3. Pensos multicamada

Dadas as limitações dos pensos convencionais, a investigação de novas estratégias para o tratamento de feridas crónicas tem aumentado. Pensos em multicamada e multifuncionais, que resultam da combinação de mais do que uma tipologia de penso, numa tentativa de ultrapassar problemas individuais, têm demonstrado um grande potencial em biomedicina, em particular nas áreas de tratamento de feridas e da libertação controlada de fármacos (Teixeira et al., 2021).

Nos últimos tempos, estruturas híbridas que combinam fibras e hidrogéis têm vindo a ser exploradas no tratamento de feridas graças à sua grande versatilidade e proximidade com a estrutura e organização da pele. A combinação de fibras com hidrogéis pode ser alcançada por vários métodos. As formas mais comuns são a empilhada, com as fibras e o hidrogel a formar camadas (compósitos laminados) (Xu et

al. 2010); o encapsulamento, com as fibras a serem inseridas na matriz do hidrogel (Teixeira et al., 2021); e os compósitos injetáveis, em que pequenos fragmentos de fibras individuais são adicionados à solução de hidrogel, resultando numa estrutura encapsulada e injetável (Li et al., 2019). A formação empilhada ou em camadas é das mais simples. Em biomedicina, é frequente a produção das fibras ser feita por eletrofiação, graças à capacidade desta técnica em mimetizar a organização e propriedades estruturais da matriz extracelular (Jain et al., 2020).

2.3.1. Produção de nanofibras por eletrofiação

A nanotecnologia tem revolucionado vários ramos da ciência, tendo sempre em vista a melhoria da vida do ser humano e da economia. Nano-materiais podem ser encontrados nas mais diversas áreas da ciência e setores da indústria: área biomédica, eletrónica e mecânica, indústria têxtil e alimentar, no setor da energia, iluminação, cosméticos, embalagens, etc. A nanotecnologia é caracterizada pela escala nano (aproximadamente entre 1 e 100 nm), maior área superficial e por isso maior área de reação/interação, porosidade controlada, morfologia adaptável às necessidades, e grande estabilidade física e química. As nanofibras exibem um grande potencial para aplicação em engenharia de tecidos, dispositivos médicos, libertação de fármacos, tratamentos de cancro, de feridas, etc., graças à razão elevada entre área de superfície e volume, versatilidade de produção e aplicação, elevada porosidade contrastante com a presença de poros de dimensões reduzidas (garantindo adsorção e absorção de líquidos), transferências gasosas, e barreira contra a penetração de microrganismos e sujidade (Jain et al., 2020).

A produção de nanofibras pode ser realizada por diversas técnicas: *drawing, melt blown, template synthesis, phase-separation, self-assembly, wet-spinning, melt-spinning, dry-spinning* e eletrofiação (do inglês: *electrospinning*). Entre os métodos referidos, a eletrofiação é considerada uma das técnicas mais usadas e versáteis por apresentar baixos custos e ser capaz de gerar fibras contínuas e de ser possível controlar a estrutura morfológica das nanofibras quanto ao seu tamanho, área de superfície, diâmetro e porosidade (Jain et al., 2020).

O equipamento é formado por três componentes principais (Figura 3): (1) a fonte de energia elétrica; (2) a utilização de um *spinneret* (a agulha através da qual a solução polimérica é ejetada para formar a nanofibra); e (3) o coletor (Liu et al., 2021). Resumidamente, na técnica de eletrofiação, uma solução polimérica é preparada no solvente(s) apropriado e introduzida numa seringa ligada diretamente ao *spinneret*. O passo seguinte é a aplicação de potencial elétrico (kV) entre a agulha e o coletor. Quando o campo elétrico aplicado excede a tensão superficial da gotícula, um fio carregado de solução polimérica

é ejetado pela ponta da agulha. A solução à saída da agulha é chamada de cone de Taylor, que adquire a forma de cone à medida que é ejetada, formando um fio mais longo e mais fino, dependendo da voltagem aplicada, e que acaba por ser recolhida a uma distância ideal, terminando na solidificação do polímero graças à evaporação do solvente. Desta forma, nanofibras são continuamente depositadas num coletor até formar um filme com a espessura desejada para o uso pretendido (Liu et al., 2021 e Jain et al, 2020).

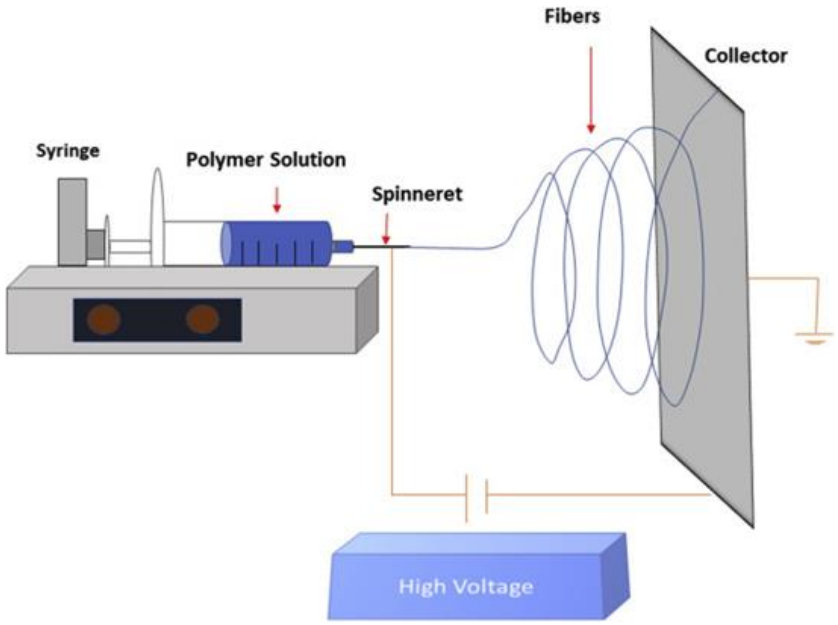


Figura 3: Esquema representativo do equipamento de eletrofiação (Jain et al., 2020).

Produzir nanofibras por eletrofiação pode ser um processo desafiante. Existem parâmetros, tanto processuais como do meio circundante, que precisam ser controlados e otimizados para se obterem filmes fibrosos com uma boa orientação das fibras, e morfologia e topografia específicas, nomeadamente: a voltagem aplicada, o fluxo de deposição/caudal, a distância da seringa ao coletor, e a humidade e temperatura ambientais (Jain et al., 2020).

A voltagem aplicada afeta o diâmetro das fibras. Quanto mais alta é a voltagem maior é o volume da solução polimérica ejetada, o que leva à formação de uma fibra de maior diâmetro. A um fluxo de deposição elevado, a taxa de evaporação dos solventes é reduzida, sendo que as fibras não têm tempo suficiente para secar antes de atingirem o coletor. Isto torna as fibras maiores e com maior probabilidade de formação de "*beads*" (defeitos). A distância da seringa ao coletor exerce também uma grande influência, dado que se for muito perto ou muito longe as fibras obtidas podem igualmente apresentar "*beads*", devendo essa distância ser otimizada para garantir a formação de fibras finas e para favorecer a evaporação dos solventes. O controlo da temperatura e da humidade são igualmente fundamentais na

produção de nanofibras por eletrofiação. Segundo Jain et al. com o aumento da temperatura, a viscosidade da solução polimérica decresce, gerando fibras com menor diâmetro. Já a humidade pode influenciar a formação de poros e a velocidade de evaporação dos solventes. Quanto maior a humidade, mais pequenos são os poros formados nas fibras. A uma humidade baixa, os solventes evaporam muito depressa, podendo interromper o fluxo na ponta da seringa, formando coágulos (Jain et al., 2020).

2.3.2. Hidrogéis

Os hidrogéis são redes tridimensionais (3D) (Figura 4) de polímeros hidrofílicos capazes de absorver e reter quantidades consideráveis de líquidos. Estas estruturas têm grande potencial para apresentar propriedades multifuncionais, nomeadamente biocompatibilidade, biodegradabilidade, adesividade e hidratação. Além disso podem ser funcionalizadas com aditivos que conferem ao sistema propriedades antimicrobianas, anti-inflamatórias e pró-angiogénicas, essenciais para promover a cicatrização de feridas crónicas (Tavakoli e Klar, 2020 e Firlar et al., 2022).



Figura 4: Hidrogéis aplicados no tratamento de feridas, (a) tubos de hidrogel e (b) filmes de hidrogel.

A maioria dos hidrogéis degradam facilmente em sistemas biológicos ou em contacto com soluções aquosas. Por esse motivo, processos de reticulação (*crosslinking*) podem ser implementados para melhorar a estabilidade do hidrogel, a força mecânica, e a rigidez da rede de polímeros; este processo pode ser realizado por métodos físicos e/ou químicos (Ahmed, 2015 e Vasile et al., 2020). A reticulação por métodos físicos (ex., ligações iónicas, ligações de hidrogénio, interações hidrofóbicas, interações *host-guest*) é bastante dinâmica, sendo a estabilidade estrutural do material muito dependente do ambiente exterior; hidrogéis formados por estes métodos tendem a exibir baixa força mecânica e normalmente são instáveis. Por outro lado, na reticulação com métodos químicos (ex., fotopolimerização, *crosslinking* enzimático, *crosslinking* molecular e *crosslinking* polímero-polímero), as redes de polímeros ganham junções permanentes, o que lhes confere uma maior integridade estrutural (aumenta o tempo

de degradação) (Ahmed, 2015 e Teixeira et al., 2021).

Os hidrogéis podem ser produzidos a partir de diferentes polímeros sintéticos e/ou naturais. Hidrogéis que derivam de polímeros naturais têm locais de reconhecimento molecular e são biodegradáveis. Em particular, os hidrogéis obtidos de polissacarídeos, como o alginato e o quitosano, são bastante apelativos para aplicações na área biomédica devido à sua hidrofibicidade, biocompatibilidade e baixa toxicidade. No entanto, estes polímeros possuem algumas desvantagens, nomeadamente uma baixa estabilidade em meios aquosos, reduzidas propriedades mecânicas e rápida degradação. Em contrapartida, hidrogéis formados por polímeros sintéticos (ex., álcool polivinílico (PVA) e PCL) podem ser facilmente controlados em termos de propriedades físicas e químicas e reprodutibilidade. No entanto, estes têm menor afinidade celular, devido à ausência de locais de ligação/reconhecimento celular, e não possuem atividade antimicrobiana (Tsou et al., 2016 e Vasile et al., 2020).

Os hidrogéis podem ser usados como material de apoio para as células durante a regeneração do tecido, para proteger a ferida contra invasões patogénicas e para prevenir a contaminação e a proliferação de microrganismos (Teixeira et al, 2021). Estes têm ainda capacidade de armazenar e libertar fármacos de uma forma controlada, o que é vantajoso no tratamento de feridas. É de salientar que esta propriedade está muitas vezes relacionada com o tipo de polímero utilizado (perfil de degradação), o nível de porosidade e a localização e o tamanho das moléculas do fármaco.

2.4. Polímeros

2.4.1. Policaproclactona (PCL)

O PCL é um polímero sintético linear, biodegradável, hidrofóbico, semi-cristalino, e com grande elasticidade (Figura 5) (Teixeira et al, 2021). Este polímero é sintetizado quimicamente com base em unidades de caprolactona, e pode ser produzido por duas vias: polimerização por abertura de anel de caprolactona ou polimerização por abertura de anel via radical livre 2-metileno-1-3-diosepano. A sua biodegradabilidade está associada à ligação éster alifática, suscetível á hidrólise.

O PCL é um polímero bastante apelativo para aplicações biomédicas e na área farmacêutica (Mandal e Shunmugam, 2021) devido à sua biocompatabilidade, boa solubilidade, baixo ponto de fusão e à sua compatibilidade com outros polímeros (Miranda et al., 2020). Adicionalmente, é seguro para usos em humanos tendo sido aprovado pela *Food and Drug Administration* (em inglês, FDA) (Malikmammadov et al, 2018).

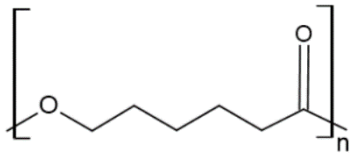


Figura 5: Estrutura química genérica do polímero PCL.

Este polímero tem uma estrutura semi-cristalina à temperatura ambiente e à temperatura do corpo humano. Possui uma temperatura de transição vítrea abaixo da temperatura ambiente, por volta dos –60 °C e uma temperatura de fusão de cerca de 60 °C. À temperatura ambiente, as cadeias amorfas estão num estado de borracha, o que garante liberdade de movimento e faz com que o PCL se comporte como um plástico flexível (Malikmammadov et al, 2018 e Arrieta et al, 2020). Nestas condições, o PCL é solúvel num largo espetro de solventes orgânicos tais como: di-clorometano, clorofórmio, dimetilformamida (DMF), benzeno, tolueno, etc., mas é insolúvel em etanol (Manda e Shunmugam, 2021). Alterando as condições de síntese (temperatura, duração da polimerização, tipos e concentração de catalisadores, razão entre solvente e monómero) é possível produzir PCL com diferentes pesos moleculares (530 a 120.000 Da), taxas de degradação e forças mecânica (Malikmammadov et al, 2018 e Doyle et al, 2021).

2.4.2. Polietilenoglicol (PEG)

Os PEGs podem ser sintetizados por polimerização, utilizando como reagentes o etilenoglicol e o óxido de etileno, em catálise básica. A sintetização é feita por polimerização aniónica de abertura do anel de óxido de etileno, que tem início no ataque nucleofílico de um ião hidróxido no anel peróxido (Pereira, 2018). Na Figura 6 encontra-se representada a estrutura química genérica do PEG.

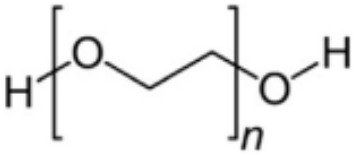


Figura 6: Estrutura química genérica do PEG (Zarrintaj et al., 2020).

Os PEGs podem ser sintetizados com vários pesos moleculares (200 – 35.000 Da, a nível comercial), e consequentemente diversas propriedades. O PEG com baixo peso molecular é normalmente sintetizado através da adição de uma subunidade de óxido de etileno, com dadores de grupo hidroxilo (água ou

qualquer outro dióil) na presença de catalisadores alcalinos. Já o PEG com alto peso molecular é preparado usando suspensões poliméricas de forma a permitir a produção em grande escala. De acordo com o grau de polimerização e o peso molecular, o polímero apresenta diferentes estados e temperaturas de fusão (proporcionais ao seu peso molecular). Os PEGs de baixo peso molecular (100 – 700 Da) apresentam a forma de líquidos viscosos e sem cor, enquanto que os de peso molecular entre os 1.000 e 2.000 Da são sólidos suaves, e os de alto peso molecular (> 2.000 Da) são sólidos cerosos e brancos (Ibrahim et al, 2022).

O PEG é um polímero versátil que pode apresentar diferentes estruturas: ramificada, em estrela e em macromoléculas, e tem um grande impacto na biologia e na medicina. Este é o agente polimérico "furtivo" mais utilizado e é considerado um polímero seguro e não tóxico, ganhando esse título graças a entidades como a FDA e a Agência Europeia do Medicamento. PEGs de baixo peso molecular (entre 200 e 600 M) são frequentemente utilizados na formulação de biomateriais graças a propriedades como bioestabilidade, polidispersão de baixo peso molecular e repulsão bacteriana (Dardeer et al., 2022), e ainda na ausência de toxicidade, alta solubilidade (água, etanol, nitrilo de acetona, benzeno e di-clorometano) sem perder as suas propriedades bioativas, capacidade de estabelecer interações com proteínas e outras biomoléculas, por ser de baixo custo, e pelas suas propriedades como solvente, surfactante, base e lubrificante (Ratner, 2012, Zarrintaj et al, 2020 e Padín-González et al, 2022).

2.4.3. Alginato de sódio (SA)

O SA é um polissacárido natural aniónico e é um derivado de algina, que contém monómeros β-D-ácido manurónico (M) e α-L-ácido gulurónico (G) ligados por ligações-(1-4) (Figura 7) (Gutiérrez-luna et al., 2022). O alginato pode ser extraído da parede celular das algas castanhas, sendo composto entre 30 e 60% de ácido algínico. É com base na conversão deste ácido para SA que a solubilidade em água é garantida (Gutiérrez-luna et al., 2022).

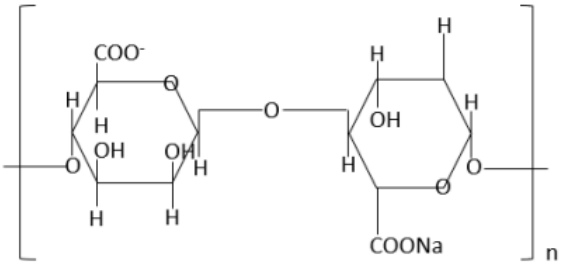


Figura 7: Estrutura química do SA.

O SA é ainda caracterizado pela excelente biocompatibilidade, não toxicidade, biodegradabilidade e baixo custo. As suas propriedades físicas e mecânicas dependem do seu peso molecular e da proporção do bloco de guluronato dentro da cadeia polimérica. A maioria dos alginatos podem ser processados na forma de hidrogéis, micropartículas e nanopartículas; podem ser preparados por vários métodos de reticulação de forma similar à matriz extracelular de um tecido *vivo*, o que os torna apelativos para aplicações em tratamento de feridas e transplantes celulares. O SA possui outras propriedades que o tornam atrativo em curativos para feridas, sendo o principal a sua capacidade de absorção de água, a libertação controlada de fármacos, a taxa de transmissão de vapor de água, a sua conformabilidade e propriedades antissépticas (Sun e Tan, 2013 e Miranda et al., 2020).

2.5. Antibióticos

Os antibióticos são fármacos utilizados para tratar ou prevenir infeções bacterianas à mais de um século (Kourkouta L. et al, 2018 e Al-Tawfiq et al, 2021). O termo antibiótico refere-se a uma substância produzida por vários microrganismos (bactérias ou fungos) capaz de inibir o crescimento de outros microrganismos (Kourkouta L. et al, 2018). A descoberta dos antibióticos mudou drasticamente a medicina moderna porque, para além de tratar doenças infeciosas (pneumonias, meningites ou tuberculose), permitiu a realização de procedimentos cirúrgicos complexos, incluindo o combate ao cancro, transplante de órgãos, e cirurgias de coração aberto (Hutching et al, 2019). No entanto, o uso indevido destes compostos, isto é, consumo excessivo de antibióticos e a falta ou o acesso limitado a antibióticos essenciais, em países de baixo ou médio rendimento, a dosagem sub-ótima e a fraca qualidade farmacêutica, contribuíram para o desenvolvimento e propagação da resistência microbiana a estes agentes, e que tem vindo a crescer continuamente nos últimos anos (Hutching et al, 2019, Browne et al, 2021e Al-Tawfiq et al, 2021).

Os antibióticos são muitas vezes administrados oralmente e por isso são de ação não localizada. Ao terem uma ação menos localizada, podem perder eficácia após a sua administração, devido a terem de percorrer o corpo até atingir o alvo, o que leva ao seu uso sistemático. Isto tende a desencadear resistência antimicrobiana (Adepu e Ramakrishna, 2021). Para combater a resistência e reverter a perda de eficiência dos antibióticos é essencial garantir uma melhor supervisão do consumo, desenvolver novas alternativas sintéticas, e passar à utilização de estratégias de administração local e de libertação controlada do fármaco ao longo do tempo (Hutching et al, 2019 e Al-Tawfiq et al, 2021).

2.5.1. Ampicilina (Amp)

A Amp (Figura 8) é um antibiótico bata-lactâmico, inserido no grupo das penicilinas classificado como aminopenicilinas (Bereda, 2022 e Peechakara et al, 2022). A Amp foi desenvolvida como forma de ultrapassar a resistência microbiana e assim alargar o campo de ação antimicrobiana das penicilinas. Á data, a Amp foi já utlizada no tratamento de febres entéricas, infeções do trato respiratório e urinário, e infeções da pele e dos tecidos moles (Kaushik et al. 2014 e Peechakara et al, 2022). Este antibiótico apresenta eficácia contra microrganismos Gram-positivos (*S. aureus*, *Streptococcus pneumoniae*, etc.) e Gram-negativos (*E. coli*, *Salmonella*, etc.) (Kaushik et al, 2014 e Bereda, 2022).

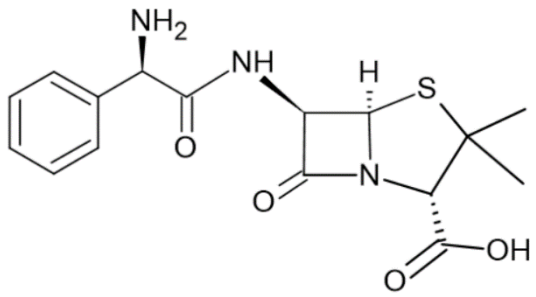


Figura 8: Estrutura química da ampicilina.

O mecanismo de ação da Amp consiste em não permitir a síntese da parede bacteriana. O modo de ação dos antibióticos beta-lactâmicos pode ser considerado um processo de dois passos: no primeiro passo, o fármaco liga-se a recetores primários chamados de proteínas de ligação à penicilina (PLP) ligadas à membrana. Estas proteínas têm um papel fundamental no ciclo de vida da célula; formação da estrutura peptidoglicano da parede celular. O segundo passo compromete o passo final da síntese da parede celular, ou seja, impede a transpeptidação do peptidoglicano (componente que mantém a integridade da parede bacteriana), deste modo impedindo a biossíntese da parede celular e consequentemente levando à lise e morte bacteriana (Bereda, 2022 e Peechakara et al, 2022).

3. Objetivos

As feridas crónicas são consideradas uma epidemia que tem vindo a aumentar, causando impacto na qualidade de vida de milhões de pessoas em todo o mundo. As feridas crónicas podem ser causadas por diferentes fatores como, doenças crónicas especificas, insuficiência vascular, má nutrição e envelhecimento e são muitas vezes associadas a infeções bacterianas. A estratégia, utilizada para gerir ou tratar feridas crónicas é através de pensos. No entanto, os pensos convencionais são limitados na sua ação, oferecendo apenas uma barreira protetora.

Este trabalho tem como principal objetivo o desenvolvimento de um sistema multifuncional em sanduíche. O sistema é composto por três camadas: uma camada exterior em filme fibroso de policaprolactona (PCL) que atua como barreira para prevenir a entrada de microrganismos e impurezas; uma camada intermédia, formada por um hidrogel de alginato de sódio (SA) carregado com um agente antimicrobiano modelo, a ampicilina (Amp), para manter o ambiente húmido, absorver exsudatos e libertar a carga antimicrobiana de forma controlada; e uma camada interna também na forma de filme fibrosos composto por PCL e polietileno glicol (PEG) para facilitar a integração e reconhecimento celular (reduzindo a hidrofobicidade) e promover efeitos antimicrobianos complementares. O sistema foi otimizado e caracterizado por forma a perceber o seu potencial como estratégia no combate de infeções em feridas crónicas.

Este trabalho surge da colaboração entre dois centros de investigação, o Centro de Ciência e Tecnologia Têxtil (2C2T), onde o trabalho foi maioritariamente realizado, e do Centro de Engenharia Biológica (CEB), ambos da Universidade do Minho.

4. Materiais e métodos

Neste capítulo serão descritos os procedimentos experimentais utilizados no desenvolvimento do projeto, incluindo os reagentes e os equipamentos usados.

4.1. Materiais

Os polímeros policaprolactona (PCL; 80.000 M) e polietileno glicol (PEG; 300 Da; d=1.125 g/mL) foram adquiridos à *Sigma-Aldrich, Merck KGaA* (Alemanha) e os reagentes N,N-dimetilformamida (DMF; d=0,948 kg/L) e clorofórmio (CHF; solubilidade de 8 g/L em água ou H_2O) foram obtidos da *PanReac AppliChem, ITW Reagents* (Itália). Estes foram utilizados na preparação das soluções poliméricas para a produção dos filmes fibrosos. O alginato de sódio (SA) e o antibiótico ampicilina (Amp), foram adquiridos da *Sigma-Aldrich Merck KGaA* (Alemanha) e foram usados para a produção dos hidrogéis. O cloreto de cálcio ($CaCl_2$) adquirido da *ChemLabs* (Africa do Sul) foi utilizado como banho de coagulação para a formação dos hidrogéis. Caldo *Mueller Hinton* (*Mueller Hinton Broth*, MHB, a 21 g/L), adquirido da *Pronadisa* (*Condalab*, Espanha), caldo de soja tipticase (*trypticase soy broth*, TSB, a 30 g/L) e agar de soja tipticase (*trypticase soy agar*, TSA) adquirido da *HiMedia Laboratories*, (Alemanha) foram utilizados como meio de cultura para crescimento de bactérias. *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538) e *Escherichia coli* (ATCC 25922), as estripes bacterianas de referência, foram obtidas da *American Type Culture Collection* (ATCC, USA). Tampão fosfato-salino (PBS) utilizado nos testes microbiológicos foi preparado a pH 7.4 (ajustado com 1 M de ácido clorídrico) a partir da combinação de cloreto de sódio (8,00 g/L), cloreto de potássio (0,20 g/L), fosfato de sódio dibásico (1,44 g/L) e fosfato monopotássico (0,24 g/L), todos obtidos da *Sigma-Aldrich*. Os reagentes e polímeros foram todos utilizados como comercialmente disponíveis, sem modificações químicas adicionais.

4.2. Métodos

4.2.1. Avaliação do caracter antimicrobiano dos agentes ativos

4.2.1.1. Preparação de pré-inóculos

Pré-inóculos de *S. aureus* e de *E. coli* foram preparados em 20 mL de TSB, respetivamente, a partir de 2 a 3 colónias de cada bactéria e foram incubados a 37 °C com agitação orbital a 120 rpm, por um período de ≈ 18 h.

4.2.1.2. Determinação das concentrações mínima inibitória e mínima bactericida (MIC e MBC)

A concentração mínima inibitória (MIC) determina a concentração mais baixa de agente ativo necessária para inibir o crescimento das bactérias. Aqui, o ensaio de micro diluição descrito por Wieang et al. (2008), que é uma adaptação do método normalizado publicado pelo *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI) e pelo *European Committee on Natimicrobial Susceptibility Testin* (EUCAST), foi utilizado.

Soluções stock de Amp e de PEG foram preparadas às concentrações de 4,096 mg/mL e de 10,240 mg/mL em água destilada (dH_2O), respetivamente. 100 µL de cada solução foram adicionados à primeira coluna de uma placa de 96 poços (em triplicado). Posteriormente, diluições seriadas (1/2 v/v) foram realizadas em MHB, atingindo um volume de 50 µL por poço. A suspensão bacteriana preparada em MHB à concentração de 1×10^6 unidades formadoras de colónias (*colony forming units*, CFUs)/mL foi depois adicionada a cada poço (50 µL; concentração final de bactérias de 5×10^6 CFUs/mL). Como controlos foram utilizados o MHB (negativo) e a suspensão de bactérias sem Amp ou PEG (positivo). As absorbâncias foram lidas a 600 nm num espectrofotómetro (EZ READ 2000 Microplate Reader, Biochrom, Cambridge, UK), antes (t 0h) e depois de 24 h de incubação a 37 °C e 120 rpm. A concentração MIC foi identificada pelas diferenças nas leituras de absorbância. Por sua vez, o MBC foi determinado pela cultura da solução bacteriana a MIC e nas suas proximidades (antes de depois do valor de MIC). Para tal, alíquotas foram recolhidas, diluídas serialmente em PBS (diluições de 10^1 a 10^4), plaqueadas em placas de petri (90 mm de diâmetro) preenchidas com TSA, e por fim incubadas a 37 °C por 18-24 h, momento em que as colónias cultivadas foram observadas e contadas.

4.2.2. Preparação do hidrogel antibacteriano

4.2.2.1. Hidrogéis

Hidrogéis foram produzidos a partir de soluções de SA, gelatina (GN) e SA/GN com os rácios de 70/30, 80/20, 90/10 e 100/0 (v/v). Soluções de SA (2 % m/v) e GN (1 % m/v) foram preparadas em dH_2O a 50 °C a uma agitação de 150 rpm, e deixadas a dissolver durante a noite. Após dissolução completa, a solução de GN foi adicionada à solução de SA e misturada a uma agitação lenta (50 rpm) até que uma solução homogénea fosse obtida (3 a 4 h).

Para a produção dos hidrogéis, as soluções de SA e SA/GN foram transferidas para placas de petri de vidro (55 mm de diâmetro), a diferentes volumes (20 a 60 mL), e deixadas à temperatura ambiente por um período mínimo de 1 h para remover bolhas de ar. Subsequentemente, as placas contendo as

soluções poliméricas foram divididas em grupos e colocadas a 37, 45 ou 50 °C ou deixados à temperatura ambiente (≈ 21 °C) por 0, 24, 48, 72, 96, 120 ou 144 h. Após cada um destes períodos, o banho de coagulação (2 % $CaCl_2$) foi adicionado (ponto de partida volume idêntico ao da solução polimérica), para induzir a coagulação. O banho foi deixado a atuar por diferentes tempos, até um máximo de 18 h. Após coagulação, os hidrogéis foram destacados e lavados com dH_2O a 150 rpm por 5 min (processo repetido 3 vezes), para remover qualquer presença dos sais do banho.

4.2.2.2. Hidrogéis carregados com Amp

Depois de otimizada a produção dos hidrogéis procedeu-se à sua funcionalização. Para tal, a Amp foi dissolvida em dH_2O às concentrações de MBC, 2×MBC, 10×MBC, 50×MBC e 100×MBC. A solução de Amp foi adicionada à solução polimérica pré-preparada e já à temperatura ambiente, e deixadas a homogeneizar por 1 h.

O teste "shake flask", adaptado da norma ASTM-E2149-01, foi utilizado para determinar a concentração ótima de Amp nos hidrogéis, capaz de eliminar eficazmente as bactérias. O teste "shake flask" ou o perfil antibacteriano dos sistemas sanduíche foi avaliado contra suspensões de *S. aureus* e de *E. coli*, preparadas em TSB a 1×10^5 CFUs/mL. Amostras dos hidrogéis de 6 cm de diâmetro foram emersas em 500 µL de suspensão bacteriana e incubadas a 37 °C e 120 rpm por 24 h. Após este período, alíquotas de 20 µL de suspensão bacteriana foram retiradas e diluídas serialmente em PBS (10^1 a 10^6), plaqueadas em placas de petri (90 mm de diâmetro) preenchidas com TSA, e incubadas a 37 °C por 18-24 h. As colónias crescidas foram contadas, e os resultados foram expressos em percentagem de redução bacteriana.

4.2.3. Produção das camadas fibrosas interna e externa por eletrofiação

A técnica de eletrofiação foi utlizada para a produção de filmes fibrosos de PCL e PCL/PEG, com deposição no coletor (folha de papel de alumínio) de 1 h.

As soluções poliméricas de PCL foi preparada a 14 % (m/v) e para otimização foram preparadas em rácios diferentes de CHF/DMF, uma foi preparada em 90/10 % e outra em 70/30 % a uma agitação constante de 150 rpm, a 50 °C durante 4 h. Por sua vez, a solução de PCL/PEG foi preparada a partir de uma solução de PCL a 14 % (preparada tal como descrito anteriormente), á qual foi adicionado o PEG à concentração MBC determinada contra as bactérias *S. aureus* e a *E. coli*. A solução contendo os dois polímeros foi deixada a dissolver por 1 h a ≈ 30 °C a uma agitação constante de 150 rpm. Para ambas as soluções, a viscosidade foi determinada por um viscosímetro Brookfield DV-II+Pro (Hadamar-

Steinbach, Alemanha) com eixo 21, a 15 rpm, a ≈ 20 °C durante 10 min, com recolha de pontos a cada 30 s. A condutividade foi determinada num Thermo Scientific Benchtop Meter (Orion Versa Star Pro, Waltham, MA, USA) como descrito em Domingue et al., 2021.

Para a produção das camadas fibrosas interna e externa por eletrofiação, parâmetros de voltagem (12-20 kV), velocidade de fluxo (0,7-1,0 mL/h) e distância da agulha ao coletor (10-15 cm) foram igualmente otimizados. Tanto para as soluções de PCL como PCL/PEG uma agulha com 18 Gauge de diâmetro interno foi usada. Durante a produção dos filmes, as condições ambientais foram controladas, mantendo a temperatura entre os 20 e os 22 °C e a humidade relativa entre os 60 e os 65 %.

4.2.4. Caracterização física, química, térmica e mecânica

Cada unidade do sistema (filmes fibrosos interno e externo e hidrogel) foi avaliada individualmente (controlos) e em combinação (as três camadas juntas no sistema sanduíche final) pelos seguintes métodos: microscopia de campo claro, microscopia eletrónica de varrimento (SEM), espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier acoplada a um equipamento de reflexão total aumentada (ATR-FTIR), termogravimetria (TGA), molhabilidade, capacidade de hidratação, perfil de degradação, adesividade, e libertação de Amp (espectroscopia de UV-visível).

A nomenclatura das amostras foi definida mediante a composição de cada camada, sendo que o símbolo "/" foi utilizado para evidenciar combinações de elementos dentro da mesma camada, enquanto que o símbolo "+" foi utilizado para demarcar a união de camadas, transmitindo a ideia de junção. Assim, os controlos dos filmes externo e interno foram designados de PCL e PCL/PEG; os controlos da camada intermédia feita exclusivamente de hidrogel como SA e SA/Amp; os controlos da sanduíche foram identificados como PCL+SA+PCL (sem aditivos bioativos), PCL+SA/Amp+PCL (com antibiótico mas sem PEG) e PCL+SA+PCL/PEG (sem antibiótico mas com PEG); e finalmente a sanduíche final (e principal objeto de estudo) que conjugou todos os elementos, PCL+SA/Amp+PCL/PEG.

4.2.4.1. Morfologia

A morfologia dos filmes de PCL e PCL/PEG foi inicialmente avaliada por microscopia de campo claro, utilizando um microscópio Leica DM IL LED invertido (*Leica microsystems*, *Wetzlar*, Alemanha), com as objetivas de 5×, 10× e 20×. Esta etapa foi necessária para a otimização das condições de eletrofiação.

Os filmes poliméricos fibrosos otimizados foram posteriormente avaliados por SEM (NOVA 200 Nano SEM, *FEI Company*, Texas, EUA), recolhendo micrografias com recurso a uma coluna dupla de emissão de campo de ultra-alta resolução aliada a uma tensão de aceleração de 10 kV. Esta técnica tem a

resolução de ≈ 2 nm. Os filmes foram inicialmente revestidos com uma película fina (10 nm) de Au-Pd (80-20 % m/m) usando um aplicador de alta resolução 208HR (*Cressington Company*, *Watford* WD19 4BX, Reino Unido) acoplado a um controlador de espessura de alta resolução (MTM-20 *Cressington*). A distribuição de diâmetros das fibras obtidas de cada filme foi determinada fazendo 100 medições do diâmetro das fibras em três imagens de cada tipo de composição, simulando a distribuição de diâmetros. As imagens usadas foram as de magnitude de 10 000× e foram processadas com o software ImageJ (versão 1.54d).

4.2.4.2. Composição química

Amostras dos filmes de PCL e PCL/PEG, hidrogéis de SA e de SA/Amp, e as sanduíches de PCL+SA+PCL, PCL+SA/Amp+PCL, PCL+SA+PCL/PEG e PCL+SA/Amp+PCL/PEG (composição final) foram analisadas por ATR-FTIR utilizando um espectrofotómetro IRAffinity-1S, SHIMADZU (Kyoto, Japão), acoplado com um acessório HETR 10 contendo um cristal de diamante. Os espectros foram obtidos numa faixa de comprimentos de onda de 400-4000 cm^{-1}, realizando 200 scans e uma resolução de 2 cm^{-1}.

4.2.4.3. Resposta térmica

As propriedades térmicas dos controlos e sanduíche final foram analisadas no equipamento TGA 7200 Hitavchi (Fukuoka, Japão). As amostras foram colocadas em cadinhos de platina e as medições foram realizadas numa faixa de temperatura dos 25 a 500 °C com aumento de 10 °C/min, sob uma atmosfera de azoto a 200 mL/min.

4.2.4.4. Molhabilidade

Ângulos de contacto foram determinados para os filmes fibrosos de PCL e PCL/PEG, utilizando um goniómetro OCA 200, Data Physics (Filderstadt, Alemanha) e seguindo a norma ASTM-D7334-08 (adaptada). Gotas de 5,0 µL de dH_2O, depositadas a uma velocidade de 2,0 µL/s, foram utilizadas para medir a molhabilidade dos filmes pelo método da gota séssil. Seis medições foram realizadas por amostra. Devido à elevada afinidade com a água, as restantes amostras (hidrogéis e sanduíches) não foram analisadas.

4.2.4.5. Capacidade de hidratação

O grau de hidratação dos filmes poliméricos, dos hidrogéis e do sistema sanduíche foi determinado

medindo o peso das amostras antes e depois de 4, 6, 8 e 24 h de incubação em PBS a 37ºC. Previamente à pesagem, o excesso de PBS foi retirado da superfície com recurso a *kimwipes* (Kimtech). O grau de hidratação foi calculado utilizando a seguinte equação (Equação 1) e obtido em %:

$$Grau\ hidratação\ (\%) = \frac{m_m - m_s}{m_m} \times 100\ ,\quad \text{Equação 1}$$

onde, m_m (mg) é a massa das amostras molhadas após as horas de incubação e m_s (mg) é a massa das amostras secas.

4.2.4.6. Perfil de Degradação

O perfil de degradação dos filmes poliméricos, dos hidrogéis e do sistema sanduíche foi monitorizado em PBS, com amostras de 6 mm de diâmetro a serem incubadas em 500 µL de PBS a 37 ºC, por um período máximo de 7 dias. O teste foi conduzido em modo estático. Inicialmente as amostras foram colocadas em 500 µL de PBS durante 24 h no frigorifico, para pré-hidratação, sendo este o ponto de partida (t 0h). Após este período, o meio líquido foi retirado e novo PBS foi adicionado. No final de 1, 2, 3, 5, 6 e 7 dias de incubação, o excesso de PBS foi retirado da superfície das amostras com recurso a *kimwipes* e as amostras foram pesadas. A degradação (%), medida em perda de massa, foi calculada usando a seguinte equação (Equação 2):

$$\text{Perda de massa (\%)} = \frac{m_{ti} - m_{tf}}{m_{ti}} \times 100\ ,\quad \text{Equação 2}$$

onde m_{ti} (mg) é a massa da amostra no dia 0 (após 24 h em hidratação) e m_{tf}(mg) é a massa da amostra após cada período de incubação.

4.2.4.7. Adesividade

A adesividade das amostras foi avaliada com base nos testes de adesão descritos por Gao et al., 2019 e Cagnetta et al., 2023, utilizando papel cavalinho como superfície de contacto. O teste foi realizado num TA.HDplus Texture Analyses de Dias de Sousa (Maia, Portugal), com uma célula de carga de ≈ 50 N (5 Kg) e uma taxa de deslocamento de 10 mm/min. As garras foram colocadas a uma distância de 12 cm. Amostras dos hidrogéis controlo (SA e SA/Amp) e dos sistemas sanduíche controlo (PCL+SA+PCL, PCL+SA/Amp+PCL, PCL+SA+PCL/PEG) e final (PCL+SA/Amp+PC/PEG) foram cortadas com ≈ 1 cm de diâmetro e com ≈ 2 mm de espessura, com apoio de um puncher. As amostras foram depois

posicionadas entre duas tiras de papel cavalinho (2 cm de largura por 8 cm de comprimento) e um peso de 500 g foi colocado sobre as amostras, para impulsionar o contacto íntimo e assegurar a ligação com o papel, por 2 min. Medições foram efetuadas em triplicado.

4.2.4.8. Libertação de Amp

O teste de libertação controlada de Amp (sem sobreposição de absorbâncias máximas entre os diferentes compostos) foi realizado por espectroscopia de UV-visível (UV-2600, SHIMADZU, Japão) a um comprimento de onda de 200 nm. Uma curva de calibração da Amp em PBS para concentrações entre 1,0 e 12,5 μg/mL foi inicialmente realizada. Os sistemas sanduíche carregados com Amp foram incubados em PBS por 1, 2, 4, 6 e 24 h a 37°C e a 120 rpm. A cada ponto, alíquotas de 50 μL foram retiradas e as absorbâncias foram lidas entre 190 e 400 nm. Amostras controlo sem Amp foram também utilizadas para eliminar a influência dos polímeros, SA, PCL e/ou PEG dos resultados de libertação finais.

4.2.5. Avaliação *in vitro* do sistema sanduíche

4.2.5.1. Teste "shake flask"

O perfil antibacteriano dos sistemas sanduíche (PCL+SA+PCL, OCL+SA+PCL/PEG, PCL+SA/Amp+PCL e PCL+SA/Amp+PCL/PEG) foi avaliado tal como descrito na secção 4.2.2.2, após 1, 2, 4, 6, e 24 h de incubação. Avaliações foram realizadas em triplicado (três medições foram feitas em três réplicas, com a média a ser obtida com base em nove valores).

5. Resultados e discussão

5.1. Avaliação do caracter antimicrobiano dos agentes ativos

5.1.1. Determinação dos MIC e MBC

MIC e MBC foram determinados para os agentes Amp e PEG contra duas bactérias, a *S. aureus* (em representação das bactérias Gram-positivas) e a *E. coli* (em representação das bactérias Gram-negativas). Os resultados são apresentados na Tabela 1. No sistema desenvolvido, o antibiótico ampicilina (Amp) funciona como um "antibiótico modelo" que no futuro poderá ser substituído por outros, mediante o propósito e aplicação pretendida.

Tabela 1: Determinação de MIC e MBC para Amp e PEG contra as bactérias, a *S. aureus* e a *E. coli*

	S. aureus		*E. coli*	
	MIC (mg/mL)	MBC (mg/mL)	MIC (mg/mL)	MBC (mg/mL)
Amp	0,004	0,004	0,128	0,064
PEG	64,0	128,0	256,0	256,0

Os resultados da Tabela 1 demonstram a eficácia do antibiótico Amp contra as bactérias testadas. Apesar de ser possível encontrar um MIC e MBC significativos contra a bactéria *E. coli*, é contra a *S. aureus* que os resultados são mais relevantes. Isto acontece porque as bactérias Gram-positivas e Gram-negativas apresentam diferentes estruturas e composições na parede celular. As bactérias Gram-positivas (como a *S. aureus*) possuem uma parede composta por uma camada espessa de peptidoglicanos formada por cadeias lineares de polissacarídeos que estabelecem ligações cruzadas com péptidos, para gerar uma estrutura rígida tridimensional. Por outro lado, a parece celular nas bactérias Gram-negativas (como a *E. coli*) é mais complexa estrutural e quimicamente, com uma camada fina de peptidoglicanos adjacente à membrana citoplasmática e uma membrana exterior lipopolissacarídea. Adicionalmente, a penetração de agentes ativos dá-se através de poros (porinas) ao longo da membrana externa, que limitam a dimensão das moléculas que podem passar (Coelho et al., 2017). O mecanismo de ação da Amp consiste na ligação a recetores primários das proteínas de ligação à penicilina (PLP) presentes na membrana, comprometendo o passo final da síntese da parede celular, ou seja, a transpeptidação do peptidoglicano. Deste modo impede a biossíntese da parede celular e induz a morte da bactéria (Bereda, 2022 e Peechakara et al, 2022). Considerando que a camada densa de peptidoglicanos é a principal barreira de acesso ao conteúdo intracelular das bactérias Gram-positivas e o Amp atua sobre a transpeptidação dos peptidoglicanos para induzir a morte destes microrganismos, é compreensível a eficácia deste antibiótico contra a bactéria *S. aureus* (MIC e MBC mais baixos).

Relativamente ao polímero PEG, foi possível também determinar MIC e MBC contra as duas bactérias.

Contudo, como esperado, o seu nível de atuação é inferior ao da Amp, cujo propósito é exclusivamente antibacteriano (sendo um antibiótico). Tal como a Amp, também o PEG foi mais eficiente contra a bactéria Gram-positiva. Apesar do PEG ser frequentemente descrito como inerte biologicamente e não-antimicrobiano, o PEG de baixo peso molecular pode muitas vezes funcionar como um escudo protetor à penetração de microrganismos (função repelente) (Valuckaite et al., 2009). Considerando a concentração elevada requerida para induzir a morte das bactérias em teste, é espectável que este polímero, quando utilizado sozinho, isole as bactérias, rodeando-as, e assim impedindo a troca de nutrientes e consequentemente levando a sua morte.

Com base na informação e nos dados da Tabela 1, para garantir que ambas as bactérias poderão ser eliminadas depois dos agentes serem incorporados no sistema, as concentrações escolhidas foram as de MBC associado à bactéria para a qual é necessária uma concentração mais elevada de agente para induzir a sua eliminação. Assim, foi determinado que a concentração de Amp a incorporar nos hidrogéis seria de 0,064 mg/mL e de 256 mg/mL de PEG para incorporar no filme fibroso de PCL/PEG.

5.2. Hidrogéis antibacterianos

5.2.1. Otimização das condições de produção

Diversas condições de produção foram testadas para obter hidrogéis antibacterianos. A produção foi iniciada com soluções de SA/GN, tendo por base trabalhos anteriores da equipa (Miranda et al., 2021). Foram testadas soluções com diferentes rácios de SA/GN (70/30, 80/30, 90/10 e 100/0) a diferentes volumes entre 5 e 60 mL. Para a otimização da produção foram testadas diferentes condições de secagem, com temperaturas a variar entre os 21 e os 50 °C e tempos de 0 a 144 h; e diferentes condições para o banho de coagulação, com volumes a ir de 5 a 60 mL e tempos de contacto ente 0 e 18 h, tal como apresentado na Tabela 2.

Tabela 2: Otimização da produção de hidrogéis, SA/GN (70/30, 80/20, 90/10 e 100/0), com variação no volume de solução (5-60 mL), nas condições de secagem (T=21-50 °C e t=0-144 h) e de banho de coagulação (v=5-60 mL e t=0-18 h)

Volume (mL)	Hidrogel (SA/GN v/v)	Condições de secagem		Condições de banho de coagulação	
		Temperatura (°C)	Tempo (h)	Volume (mL)	Tempo (h)
20	70/30	-	0	20	18
20	70/30	50	24	20	2
30	70/30	-	0	30	18
30	70/30	50	24	30	2
30	70/30	50	24	40	2
30	70/30	50	24	50	2
30	70/30	50	24	60	2
40	70/30	-	0	40	18
40	70/30	50	24	40	2
40	70/30	50	24	50	2
40	70/30	50	24	60	2
40	70/30	50	24	70	2
50	70/30	50	24	60	2
50	70/30	50	24	70	2
50	70/30	50	24	80	2
60	70/30	50	24	70	2
60	70/30	50	24	80	2
60	70/30	50	24	90	2
20	70/30	50	48	20	2
30	70/30	50	48	30	2
40	70/30	50	48	20	2
20	70/30	50	72	20	2
30	70/30	50	72	30	2
40	70/30	50	72	40	2
20	70/30	45	24	20	0:15
20	70/30	45	72	20	1
20	70/30	37	24	20	0:15
20	70/30	37	72	20	0:15
20	70/30	37	72	20	1
20	70/30	21	96	20	2
20	70/30	21	120	20	2
20	70/30	21	144	20	2
20	80/20	21	96	20	1
20	90/10	21	96	20	1
20	80/20	21	120	20	2
20	90/10	21	120	20	1
20	80/20	21	144	20	2
20	90/10	21	144	20	1
20	90/10	21	24	20	1
20	100/0	21	24	20	1

20	90/10	21	48	20	1
20	100/0	21	48	20	1
20	90/10	21	72	20	1
20	100/0	21	72	20	1
20	100/0	21	24	20	1
20	100/0	21	24	20	2
20	100/0	21	48	20	1
20	100/0	21	48	20	2
20	100/0	21	144	20	1
20	100/0	21	144	20	2

Numa fase inicial, as soluções poliméricas de SA/GN vertidas para os moldes (placas de petri de 55 mm de diâmetro) foram colocados numa estufa à temperatura de 50 °C, por períodos variáveis entre as 24 h e as 72 h. Pelas observações, concluiu-se que a temperatura de 50 °C secava em demasia os hidrogéis, e que mesmo com a adição de volumes crescentes de solução polimérica e/ou banho de coagulação não era possível destacar o hidrogel da placa (Figura 9a). Como tal, temperaturas mais baixas foram selecionadas para os testes subsequentes, 45 °C, 37 °C e temperatura ambiente (20-26 °C), e o volume de 20 mL foi estabelecido como o ideal. Esta escolha recaiu sobre a espessura do hidrogel obtido, que deveria ser relativamente fina para que o seu impacto no sistema sanduiche não se sobrepusesse em demasia aos filmes poliméricos fibrosos das camadas interna e externa.

Ensaios com temperaturas de secagem da solução de SA/GN a variar entre os 45 °C e a temperatura ambiente foram realizados com diferentes tempos de incubação e contacto com banho de coagulação. Foi possível perceber que um tempo de secagem maior a uma temperatura mais baixa que os 50 °C ajudava com a coagulação do hidrogel, contudo sem eficácia a 100 %. O hidrogel tendia a colapsar (sem estabilidade física) ou apresentava zonas não coguladas. Os melhores resultados foram obtidos para uma temperatura de secagem a 21 °C por 144 h e banho de coagulação aplicado por 2 h. Estas condições permitiram que os hidrogéis fossem formados e removidos da placa de *petri* mais facilmente. No entanto, continuavam a não atingir uma coagulação completa, existindo partes notoriamente mais secas (e completamente desidratadas quando temperaturas mais elevadas eram utilizadas) e reticuladas pelo banho de coagulação (Figura 9b) e outras ainda na forma de solução polimérica. Considerando que o banho coagulante era direcionado para a reticulação do SA, rácios poliméricos contendo uma percentagem menor de GN foram testados: 80/20, 90/10 e 100/0 v/v, à temperatura ambiente.

Com a diminuição da quantidade de GN na solução polimérica, a formação de hidrogéis com uma estrutura mais uniforme foi alcançada (Figura 9c). Contudo, foi apenas com 100 % de SA que a produção de hidrogéis foi obtida com zero defeitos. Relativamente aos tempos de secagem pré-banho de

coagulação, 24, 48 e 144 h, verificou-se que a uniformidade do hidrogel e coagulação não eram afetados, e como tal um tempo menor de produção foi o selecionado, nomeadamente 24 h de secagem a 21 °C, seguido de contacto com banho de coagulação por 1 h (Figura 9d).

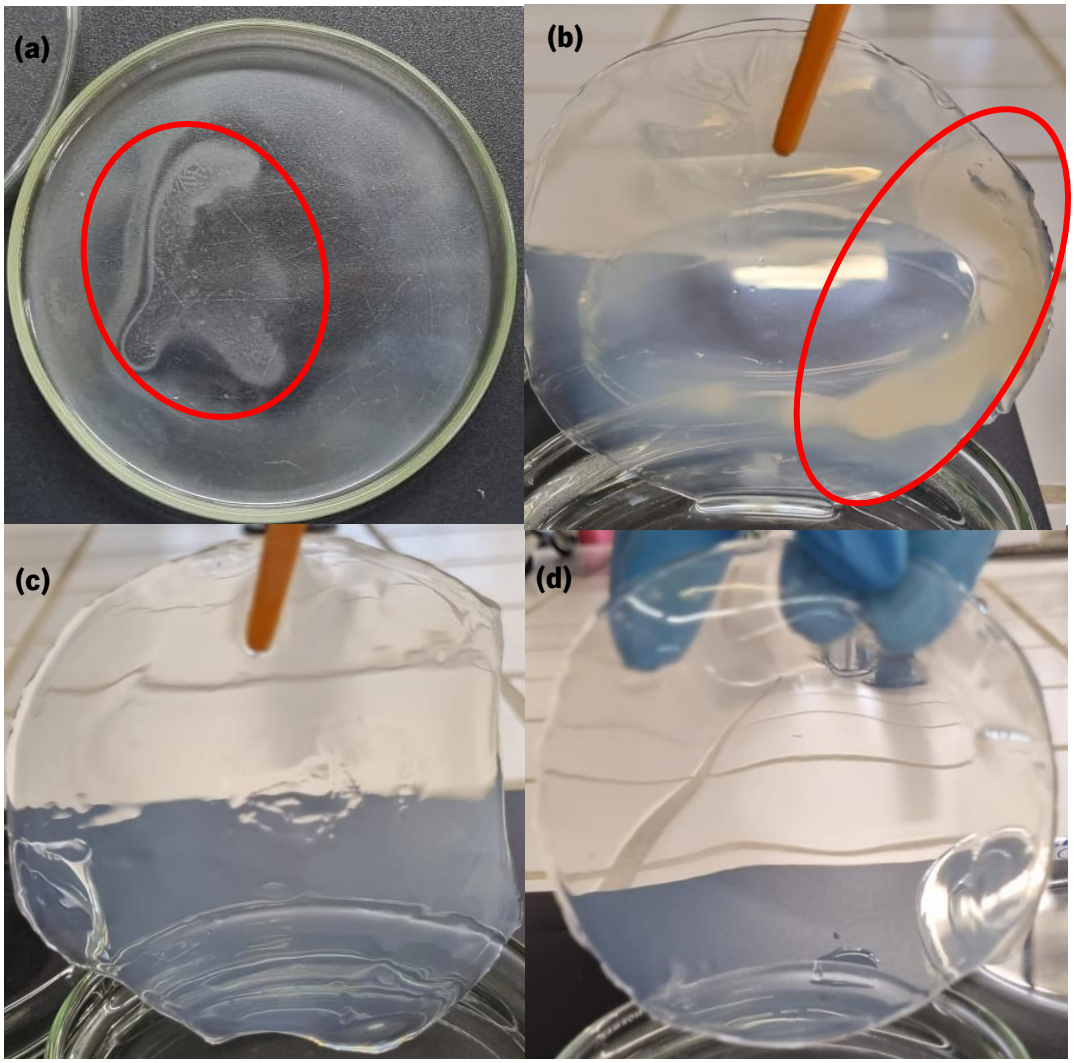


Figura 9: (a) Exemplo de hidrogel 70/30 SA/GN processado com secagem a 50°C. Realce a vermelho de região heterogénea, onde o líquido parece ter evaporado de forma diferente da área restante (hidrogel impossível de ser destacado da placa de petri). (b) Exemplo do hidrogel de 70/30 SA/GN processado 21°C por 144 h e banho de coagulação aplicado por 2 h. Destaque a vermelho de região notoriamente mais seca. (c) Hidrogel de 90/10 SA/GN após 24 h de secagem a 21 °C e 1 h em banho de coagulação. (d) Hidrogel de 100% SA após 24 h de secagem a 21°C e 1 h em banho de coagulação.

5.2.2. Hidrogéis com ação antibacteriana

Hidrogéis antibacterianos foram produzidos a partir de uma solução de 2 % de SA modificada com o agente antibacteriano (Amp) a concentrações de 2×, 10×, 50× e 100× MBC (0,128 mg/mL, 0,640 mg/mL, 3,20 mg/mL e 6,40 mg/mL, respetivamente). Esta etapa de investigação foi realizada para determinar a concentração ótima de Amp a adicionar ao hidrogel por forma a garantir ação

antibacteriana contra a *S. aureus* e a *E. coli*. Múltiplos cada vez mais elevados do MBC foram testados, uma vez que em trabalhos anteriores se verificou que hidrogéis tendem a reter agentes ativos no seu interior (Antunes et al., 2021). Análises antibacterianas foram realizadas através do teste "shake flask", por 24 h de incubação, obtendo-se o gráfico da Figura 8.

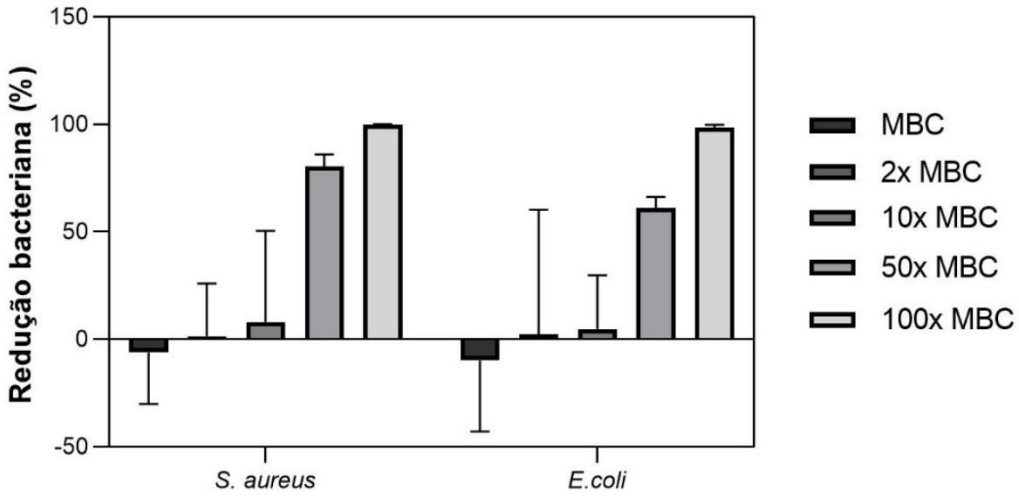


Figura 10: Redução do número de colónias de *S. aureus* e a *E. coli* após 24 h de incubação com hidrogéis de SA carregados com Amp a diferentes concentrações.

Os dados da Figura 10 demonstram que a concentrações mais baixas (MBC, 2×MBC e 10×MBC), a viabilidade bacteriana prevalece (ação antibacteriana praticamente inexistente). Por outro lado, à concentração de 50×MBC reduções bacterianas entre ≈ 60 e 80 % foram detetadas; contudo, ainda não ao nível pretendido para a adição no sistema sanduíche – é de relembrar que o sistema sanduiche contém duas camadas sobre as faces do hidrogel que poderão condicionar a libertação de Amp. À concentração de 100×MBC, a eliminação da bactéria *S. aureus* foi total (100 %), enquanto que a *E. coli* se aproximou dos ≈ 98 %. Estes dados confirmam a maior suscetibilidade da *S. aureus* à ação da Amp. Adicionalmente, demonstram que a Amp poderá estar a ser eliminada do hidrogel com as limpezas pós-coagulação (para eliminar a presença de sais) ou a estabelecer interações com o polímero ficando encapsulada e retida no interior do hidrogel, logo impedindo a sua libertação com o tempo para eliminar as bactérias. Para confirmar estas possibilidades, procedeu-se à leitura de absorbâncias de alíquotas do banho de coagulação e das águas de lavagem por espectroscopia UV-visível, e concluiu-se que apenas ≈ 0,0383 mg/mL de Amp ficava retida no hidrogel com 50× MBC. Assim, confirmou-se que a melhor concentração de trabalho seria a de 100×MBC.

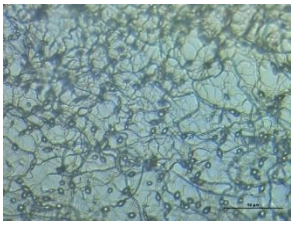
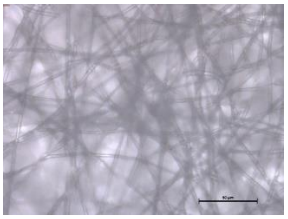
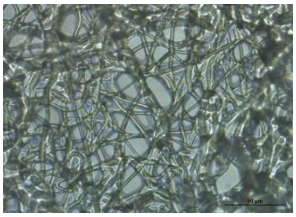
5.3. Filmes fibrosos interno e externo

A camada interna e externa do sistema sanduíche foi obtida por eletrofiação, sendo necessário otimizar as condições de processamento das soluções de PCL e PCL/PEG.

5.3.1. Camada externa de PCL

Para a produção da camada externa de PCL, uma solução com viscosidade de 1,012 Pa.s e condutividade de 1,105 μS/cm foi utlizada. Três 3 condições de produção definidas com base em trabalhos anteriores (Domingues et al, 2022 e Ribeiro et al., 2022) foram testadas: (1) solvente CHF/DMF 90/10 (v/v), fluxo de 0,7 mL/h com uma voltagem de 23 kV e a uma distância de 26 cm; (2) solvente CHF/DMF 90/10 (v/v), fluxo de 0,7 mL/h com uma voltagem de 12 kV e a uma distância de 17 cm; e (3) solvente CHF/DMF 70/30 (v/v), fluxo de 0,8 mL/h, com uma voltagem de 25 kV e a uma distância de 18 cm. Numa fase inicial, a deteção de defeitos foi realizada por microscopia de campo claro, tal como apresentado na Tabela 3.

Tabela 3: Otimização da produção de fibras de PCL (camada externa)

PCL (14%)	**Condição (1)**	**Condição (2)**	**Condição (3)**
Solvente CHF/DMF	90/10 (v/v)	90/10 (v/v)	70/30 (v/v)
Voltagem	12 Kv	12 Kv	25 Kv
Fluxo	0,7 mL/h	0,7 mL/h	0,8 mL/h
Distância	26 cm	17 cm	18 cm
Imagem			
	50×	50×	50×

Como é possível observar pelas imagens da Tabela 3, as condições definidas em (1) levaram à formação de *beads* (defeitos; acumulação de polímero nas fibras) e de fibras descontínuas de diâmetro mais reduzido. Aqui, a distância mais elevada entre agulha e coletor foi o fator condicionante destas observações. É sabido que quanto maior a distância entre estes dois pontos mais finas são as fibras produzidas (Hekmati et al., 2013). Os resultados demonstraram que a uma distância de 26 cm, as fibras tornam-se heterogéneas e os pontos de interrupção na ejeção contínua dos polímeros são preenchidos por gotas ou *beads*. Posto isto, esta condição foi de imediato excluída. Nas condições (2) e (3), a homogeneidade e continuidade das fibras é mais evidente; a ausência de *beads* é também notória.

Contudo, nas amostras obtidas com (3), é clara a presença de solvente não evaporado. Nesta condição, o volume de DMF é três vezes superior ao usado em (1) e (2). O CHF (pressão parcial de vapor de 21.2 kPa) é um solvente orgânico mais volátil que o DMF (pressão parcial de vapor de 0.36 kPa), logo aumentando o rácio de DMF o tempo de evaporação do solvente também aumenta (Golecki et al., 2014). Adicionalmente, a voltagem e a velocidade do fluxo são também mais elevadas, o que pode aumentar o volume da solução polimérica ejetada e consequentemente de solvente. A voltagens mais baixas, o volume da solução polimérica ejetada é menor, levando à formação de fibras com diâmetros também menores (Jain et al., 2020). Atendendo a esta informação e aos resultados da Tabela 3 a condição definida como ótima foi a (2).

O filme fibroso obtido em (2), após 1 h de deposição, foi posteriormente analisado por SEM. Esta técnica é utilizada para estudar a morfologia e topografia das fibras. Na Figura 11, micrografias das fibras de PCL capturadas a 500× e 10.000× de ampliação podem ser observadas.

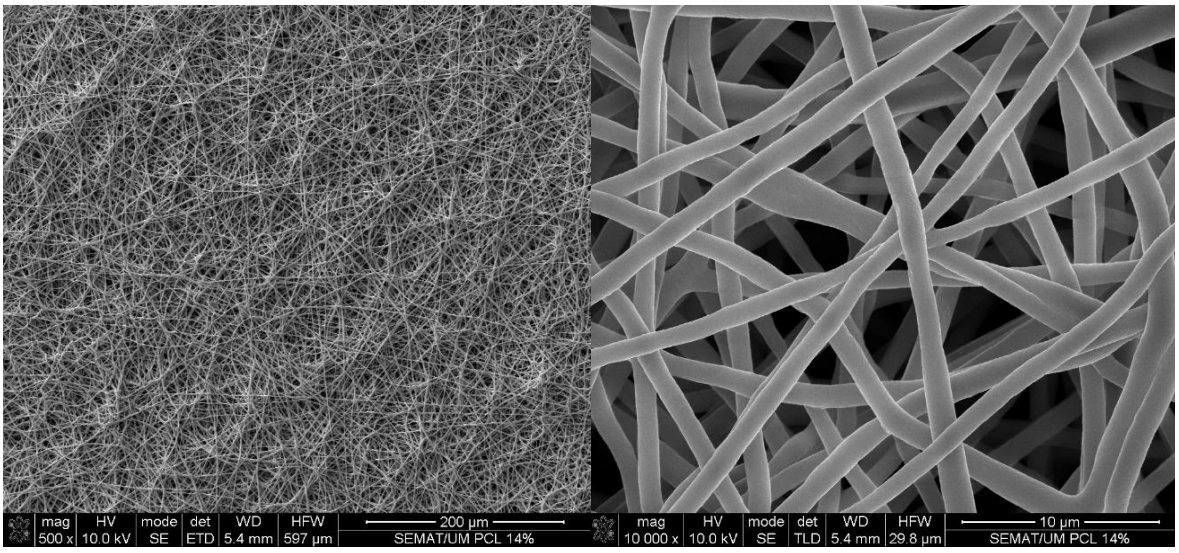


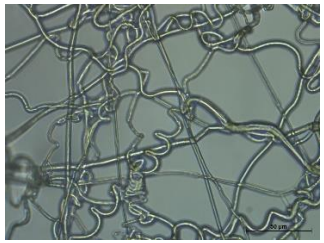
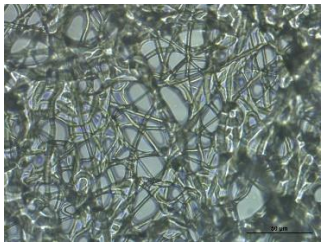
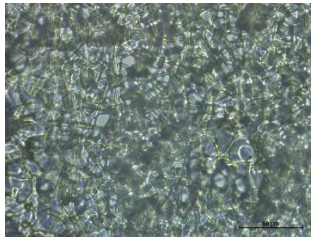
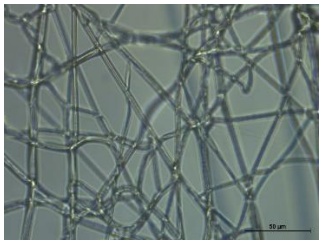
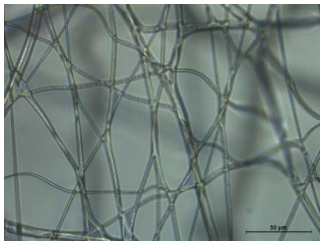
Figura 11: Micrografias dos filmes de 14% de PCL processados por eletrofiação durante 1 h, com voltagem de 12 kV, fluxo de 0,7 mL/h e 17 cm de distância entre agulha (18 Gauge) e coletor. Imagens foram capturadas a 500× (esquerda; escala 200 µm) e 10.000× (direta; escala 10 µm) de ampliação.

As imagens (Figura 11) comprovam a produção bem-sucedida de fibras de PCL contínuas, homogéneas e sem defeitos. Recorrendo ao software ImageJ, os diâmetros médios das fibras de PCL foram determinados em 1,112 ± 0,108 µm, indicando que as fibras se encontram na microescala. Estes resultados são corroborados pelos dados publicados por Alfro De Pra et al., 2020 e Domingues et al., 2022.

5.3.2. Camada interna de PCL/PEG

Para a produção da camada interna em PCL/PEG, a partir de uma solução com viscosidade de 0,722 Pa.s e condutividade de 4,108 µS/cm, foi igualmente necessário otimizar as condições de eletrofiação. Os testes iniciais foram delineados com base nas investigações realizadas por Kheilnezhad e Hadjizadeh (2022), Alfro De Pra et al., 2020 e Pan et al. (2022): (1) fluxo de 1 mL/h, com voltagem de 20 kV e distância de 15 cm; (2) fluxo de 1 mL/h, com voltagem de 15 kV e distância de 10 cm; (3) fluxo de deposição de 1 mL/h, voltagem de 15 kV e distância de 15 cm. Devido à instabilidade do feixe polimérico, a condição (3) foi imediatamente rejeitada e três novas condições, derivadas da condição ótima encontrada para o PCL (secção 5.3.1.), incluídas: (4) fluxo de 0,7 mL/h, voltagem de 15 kV e distância de 17 cm; (5) fluxo de 0,7 mL/h, voltagem de 20 kV e distância de 17 cm; e (6) fluxo de 0,7 mL/h, voltagem de 12 kV e distância de 17 cm. Após produção dos filmes por um período de 1 h e subsequente evaporação do solvente, estes foram observados ao microscópio ótico. As imagens obtidas são apresentadas na Tabela 4.

Tabela 4: Otimização da produção de fibras de PCL/PEG (camada interna)

PCL/PEG	Condição (1)	Condição (2)	Condição (4)	Condição (5)	Condição (6)
Voltagem	20 Kv	15 Kv	15 Kv	20 Kv	12 Kv
Fluxo	1,0 mL/h	1,0 mL/h	0,7 mL/h	0,7 mL/h	0,7 mL/h
Distância	15 cm	10 cm	17 cm	17 cm	17 cm
Imagem					
	50×	50×	50×	50×	50×

Considerando que a adição de PEG à solução de PCL aumenta a mobilidade das cadeias poliméricas, graças ao seu efeito plasticizante que induz a separação intermolecular das cadeias de PCL, reduzindo a sua força, e substituindo interações PCL-PCL por PCL-PEG (mais fracas), que levaram a uma redução da viscosidade e aumento da condutividade (Alfro De Pra et al., 2020), seria espectável que novas condições de eletrofiação fossem requeridas. No entanto, pela análise da Tabela 4, são as condições (5) e (6), mais próxima e idêntica (respetivamente) à otimizada para o PCL (secção 5.3.1), que melhores resultados originaram. Em ambos os casos, fibras uniformes, contínuas e homogéneas, livres de defeitos foram detetadas. Por sua vez, nas condições (2) e (4) é notória a existência de solvente não evaporado e na (1) as fibras apresentam um formato em espiral e grande heterogeneidade. Estas três condições foram desconsideradas para testes futuros. Com base nos dados adquiridos, a condição (6) foi a selecionada como ótima, tornando assim a comparação de resultados entre PCL e PCL/PEG mais fácil.

Posteriormente, o filme polimérico otimizado foi analisado pela técnica SEM. Na Figura 12 são apresentadas micrografias das fibras de PCL/PEG a diferentes ampliações (500× e 10.000×), que comprovam as observações do microscópio ótico de campo claro (Tabela 4).

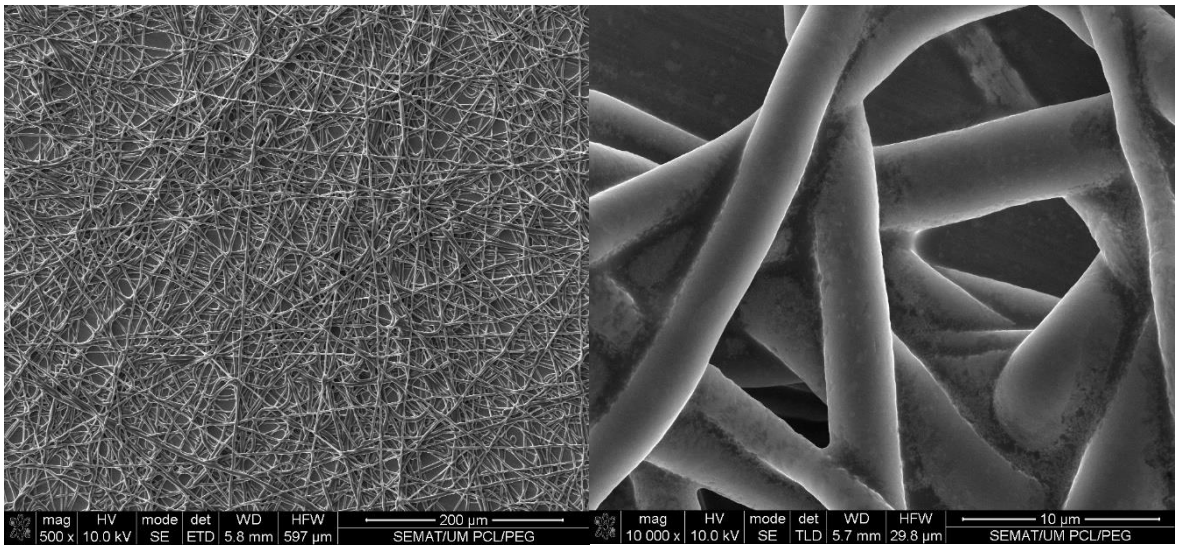


Figura 12: Micrografias dos filmes de PCL/PEG processados por eletrofiação durante 1 h, com voltagem de 12 kV, fluxo de 0,7 mL/h e 17 cm de distância entre agulha (18 Gauge) e coletor. Imagens foram capturadas a 500× (esquerda; escala 200 µm) e 10.000× (direta; escala 10 µm).

Com recurso ao software ImageJ, o diâmetro médio das fibras de PCL/PEG foi determinado em 2,786 ± 0,419 µm. Comparativamente com os diâmetros das fibras de PCL (secção 5.3.1), verifica-se um incremento para o dobro. Este justifica-se com o aumento da flexibilidade das cadeias poliméricas, graças à inclusão do PEG (Alfro De Pra et al., 2020). Adicionalmente, o PEG, sendo um polímero hidrofílico, tende a migrar na direção de ambientes com maior humidade, neste caso o exterior dos filmes fibrosos. Com isto, as cadeias de PCL são "levadas" a expandir-se na direção do exterior da fibra, graças às ligações estabelecidas com o PEG (Pan et al., 2022).

5.4. Caracterização química, física e mecânica

5.4.1. Morfologia do sistema sanduíche

O esquema da Figura 13 mostra os componentes individuais do sistema e o sistema sanduíche na sua forma final. O sistema foi cortado transversalmente e a presença das diferentes unidades (três; Figura 13e) analisada. As imagens apresentadas na Figura 13 foram recolhidas com recurso a um telemóvel (iPhone 14 pro) posicionado uma distância de 5 cm do sistema sanduíche. A imagem do corte transversal do sistema foi recolhida sobre uma base preta e com flash.

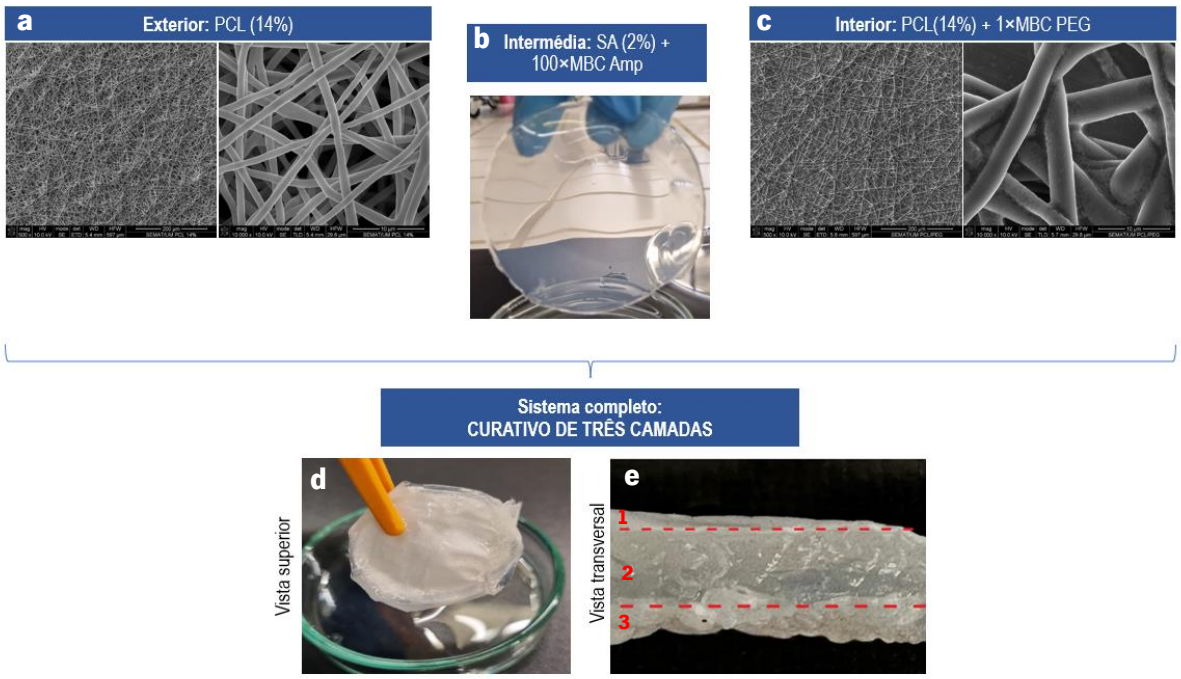


Figura 13: Esquema da produção do sistema sanduíche: (a) imagem SEM do filme fibroso exterior de PCL; (b) camada intermédia - hidrogel carregado com Amp; (c) imagem SEM do filme fibroso interior de PCL/PEG; (d) visão superior do sistema sanduíche; (e) visão transversal do sistema sanduíche. A linha vermelha tracejada demonstra a divisão entre as três camadas (1 – filme fibroso de PCL; 2 – hidrogel carregado com Amp; 3 – filme fibroso de PCL/PEG).

Como se pode verificar pela Figura 13e existe um contacto íntimo entre camadas, o que leva a concluir que a produção do sistema sanduíche foi bem-sucedida. É, contudo, necessário referir que a zona inferior (Figura 13e-3) tende a ser mais rugosa e a zona superior (Figura 13e-1) mais lisa. Isto acontece porque durante a formação do hidrogel é impossível manter esta camada 100 % esticada (está dependente das velocidades com que a solução polimérica de SA e do banho de coagulação são vertidos, e ainda da ligação estabelecida com a placa de petri utilizada como molde). Por sua vez, a camada superior sofre apenas a influência da colocação do banho, que tende a ser mais controlável do que a deposição da solução de SA para a produção do hidrogel (mais viscosa). Independentemente disso, três secções individuais são visualizadas na estrutura sanduiche final, que apresenta uma espessura total média de ≈ 2 mm.

5.4.2. Composição química (ATR-FTIR)

O ATR-FTIR é uma técnica utilizada para obter a absorção ou emissão no espectro infravermelha de um sólido, líquido ou gás. A espectroscopia de FTIR recolhe informação de alta resolução sobre uma ampla faixa do espectro, entre os 400 e os 4000 cm^{-1}. O objetivo desta análise é quantificar quanta luz uma amostra absorve em cada frequência do espectro (Fadlelmoula et al., 2022). Os espectros ATR-

FTIR das amostras controlo e sanduiche final podem ser observados na Figura 14. Os picos característicos de cada componente do sistema foram também identificados.

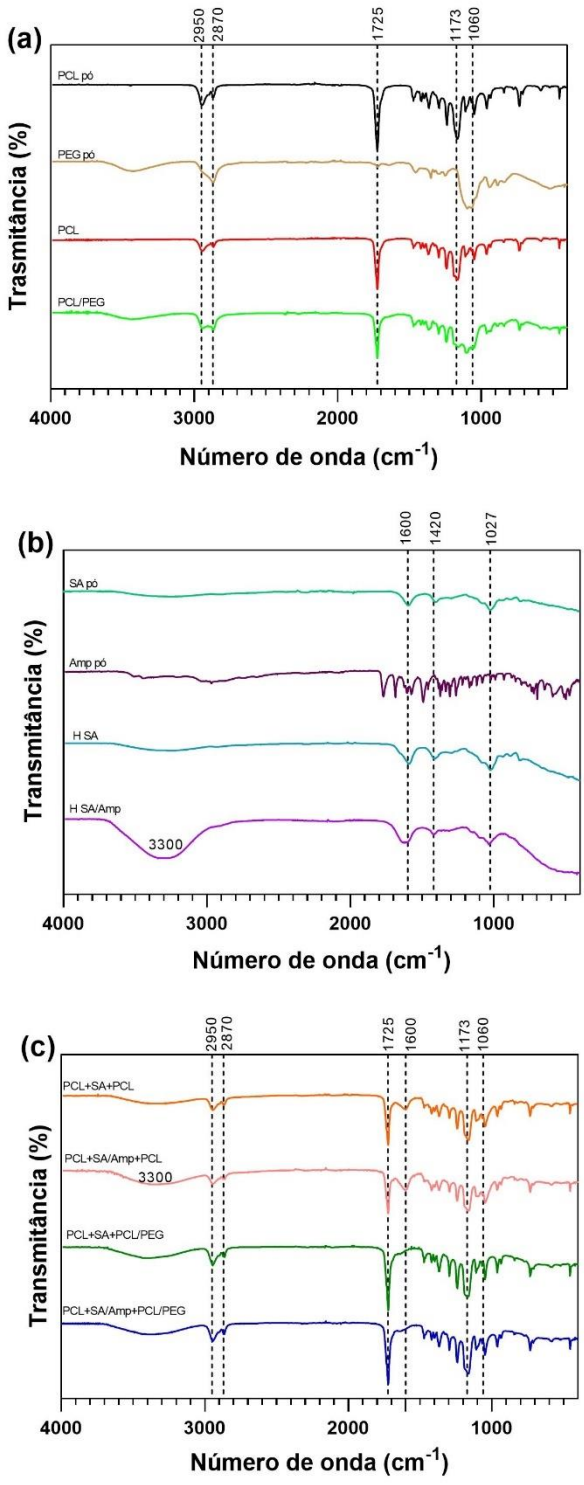


Figura 14: Espectros ATR-FTIR de (a) PCL, PEG e fibras de PCL e PCL/PEG, (b) SA, Amp e hidrogéis de SA e SA/Amp e (c) sistema sanduíche de PCL+SA+PCL, PCL+SA/Amp+PCL, PCL+SA+PCL/PEG e PCL+SA/Amp+PCL/PEG.

Nos filmes de PCL (Figura 14a e 14c), o pico a 1725 cm^{-1} relacionado com a vibração de ligações C=O (grupo carbonilo), os picos a 2950 e 2870 cm^{-1} característicos das ligações C-H, e o pico a 1173 cm^{-1} associado às vibrações das ligações C-O-C confirmam a presença deste polímero (Addelraze et al, 2016 e Shkarina et al., 2015). Por sua vez, a presença do SA (Figura 14b e 14c) foi corroborada pela existência de dois picos a 1600 e a 1420 cm^{-1} atribuídos às vibrações das ligações COO^-. Além disso, também se observou um pico a 3300 cm^{-1} que é característico dos grupos OH dos ácidos carboxílicos presentes neste polímero (Pereira et al., 2011 e Dalal et al., 2021). Nos espectros dos polímeros PEG e PCL (Figura 14a e 14c) observou-se um pico a 2870 cm^{-1} correspondente às ligações C-H, e um pico na banda dos 1060 cm^{-1} característico das ligações C-O-H (Pan et al., 2022), confirmando assim a presença do PEG. No caso da Amp, como a concentração usada é baixa, logo facilmente mascarada pelos polímeros que se encontram a um rácio muito superior, não foi possível verificar a sua presença através da análise de ATR-FTIR. No gráfico dos sistemas sanduíche (Figura 14c) observam-se os picos 1725 cm^{-1}, 2950 cm^{-1}, 2870 cm^{-1}, 1173 cm^{-1} e 1060 cm^{-1} que evidenciam a presença dos polímeros PCL e PEG (Addelraze et al, 2016, Shkarina et al., 2015 e Pan et al., 2022). O pico 1600 cm^{-1} relativo ao SA é observado apenas nas amostras de PCL+SA+PCL e PCL+SA/Amp+PCL, e o pico 3300 cm^{-1}, também relativo ao SA, embora menos significativo, também é observado em todas as amostras. No entanto, é notório que os picos relativos ao SA (1600 cm^{-1}, 1420 cm^{-1} e 3300 cm^{-1}) ficam menos evidentes com a presença do PCL e/ou do PEG. Isto pode dever-se ao facto do hidrogel se encontrar entre dois filmes poliméricos, que podem restringir a sua absorção da luz, consequentemente mascarando a sua presença.

5.4.3. Resposta térmica (TGA)

A análise termogravimétrica (TGA) é um dos principais ensaios térmicos para a caracterização de materiais. Este ensaio mede a variação de massa (perda ou ganho) de uma amostra em função do aumento da temperatura num ambiente controlado. Neste projeto, componentes individuais e o sistema sanduíche completo foram analisados por TGA, tal como reportado na Figura 15. As amostras foram secas a 50 °C antes de se iniciarem os testes, para tentar eliminar a presença de humidade.

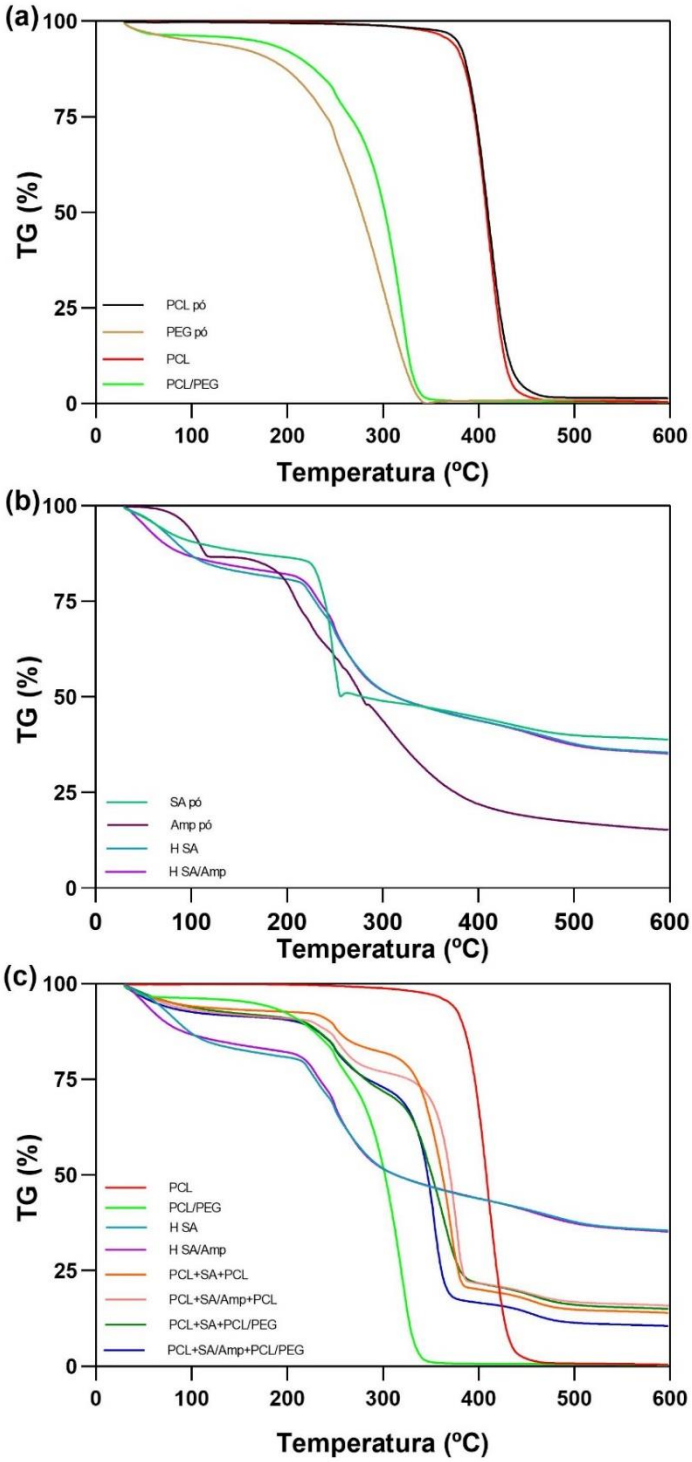


Figura 15: Espectros TGA de (a) pó de PCL e PEG e fibras de PCL e PCL/PEG; (b) SA e Amp pó e hidrogel de SA e SA/Amp e (c) fibras de PCL e PCL/PEG, hidrogel de SA e SA/Amp, e sistema sanduíche de PCL+SA+PCL, PCL+SA/Amp+PCL, PCL+SA+PCL/PEG e PCL+SA/Amp+PCL/PEG, obtidos sob atmosfera de azoto a 200 mL/min.

A Figura 15a apresenta as curvas de TGA do PCL na forma de pó e na sua forma processada por eletrofiação. Ambas se sobrepõem e experimentam uma perda de massa de quase 100 % com o

aumento da temperatura. Foi ainda possível constatar que a eletrofiação do PCL não afeta a sua estabilidade térmica (mantém-se contante; aproximadamente entre os 25 e os 360 °C). Este comportamento é característico do PCL. A partir dos ≈ 360 °C e até os ≈ 440 °C, a degradação térmica tem como alvo a estrutura polimérica principal do PCL, começando com a degradação das cadeias laterais e progredindo em direção à cisão da cadeia principal. A partir daqui e até aos 600 °C, a perda de peso é praticamente vestigial (Elzein et al., 2004). No polímero PEG ocorre uma primeira perda de massa de cerca de 5 % a partir dos ≈ 60 °C). Isto dá-se porque o PEG é um polímero com grande afinidade para a água (Ratner, 2012, Zarrintaj et al, 2020 e Padín-González et al, 2022), podendo esta primeira degradação estar associada à evaporação de moléculas de água que se possam ter ligado ao polímero depois da secagem (Domingues et al., 2022). Após essa perda inicial, o polímero mantém estabilidade térmica até aos ≈ 190 °C, ocorrendo posteriormente uma perda progressiva de massa até aos ≈ 350 °C. Os filmes fibrosos de PCL/PEG, produzidos por eletrofiação, apresentam uma curva de degradação térmica mais semelhante à do polímero PEG: perda inicial de moléculas de água, seguida de degradação polimérica (cadeias laterais e principal). Isto acontece porque, tal como referido anteriormente, o PEG estabelece interações químicas com o PCL (ligações éster), aumentando a flexibilidade das cadeias, expondo-as mais para o exterior da fibra e, consequentemente, reduzindo a sua proteção (inerente a uma estrutura mais compacta). Adicionalmente, como o PEG está maioritariamente no exterior, a afinidade com a água aumenta (Kheilnezhad e Hadjizadeh, 2022). No entanto, é de referir que o segundo nível de degradação térmica ocorre mais próximo dos 200 °C, denotando a maior resistência térmica oferecida pela presença de PCL.

Na Figura 15b, a curva de degradação térmica do SA em pó e do SA em hidrogel, com e sem Amp, são muito semelhantes. Graças à sua afinidade com a água do meio ambiente, o polímero experimenta uma redução significativa de massa, entre 35 e 40 %, a partir dos 50 °C. A cerca de 220 °C, a decomposição térmica do polímero é intensificada, sendo associada a reações de degradação, desidratação e despolimerização dos grupos carboxílicos do SA. A degradação da cadeia principal do polímero é evidenciada maioritariamente a partir dos 300 °C, sendo a perda de massa gradual (Miranda et al., 2023). Devido à sua concentração baixa, a presença de Amp no hidrogel não causou qualquer alteração significativa na curva de degradação térmica.

Na Figura 15c é possível verificar que as curvas relativas ao sistema sanduíche (PCL+SA+PCL, PCL+SA/Amp+PCL, PCL+SA+PCL/PEG e PCL+SA/Amp+PCL/PEG) apresentam um comportamento térmico semelhante, independentemente da presença dos aditivos, com perda inicial de massa atribuída à afinidade com a água (maioritariamente influenciada pela presença de SA), seguida de uma

estabilidade térmica relativa até aos ≈ 240 °C, e, subsequentemente, de uma perda de massa significativa (em média de ≈ 73 %). É importante referir que a presença de PCL reduziu a perda de massa inicial introduzida pelo PEG e SA, protegendo-os, enquanto que o efeito contrário (PEG e SA sobre PCL) foi sentido na perda total de massa a altas temperaturas (conservação de cerca de 30 % dos polímeros na sanduiche face à eliminação total observada para os filmes de PCL e PCL/PEG). Mais uma vez, a adição do antibiótico Amp não interferiu com a degradação dos sistemas.

Os resultados confirmam a interferência mútua dos componentes das três camadas no sistema final, demonstrando uma intimidade nas ligações e partilha de propriedades. Mais importante que isso, o sistema apresentou resistência térmica a temperaturas mais elevadas do que as corporais (>200 °C), logo garantindo a sua estabilidade em contacto com feridas.

5.4.4. Molhabilidade

Análises da molhabilidade são feitas através da medição dos ângulos de contacto, sendo o mais utilizado a medição de ângulo de contacto estático. Esta análise indica se uma superfície tem comportamento hidrofóbico ou hidrofílico: se o ângulo de contacto obtido é ≥150°, a superfície é considerada superhidrofóbica; ângulos entre 90° a 150°, referem-se a uma superfície hidrofóbica; e ângulos < 90° a uma superfície hidrofílica (Lößlein et al., 2022). As análises da molhabilidade, foram apenas conduzidas nos filmes fibrosos de PCL e PCL/PEG. Devido à sua elevada afinidade com a água, os hidrogéis e o sistema sanduíche não foram avaliados.

As amostras de PCL reportaram um valor médio de 124,56 ± 7,64°, enquanto as amostras de PCL/PEG obtiveram um valor médio de 28,76 ± 5,01°. Estes dados confirmaram os filmes de PCL como hidrofóbicos. Por sua vez, os filmes de PCL/PEG apresentaram comportamento hidrofílico (Kheilnezhad e Hadjizadeh, 2022). Como o PEG é um polímero naturalmente hidrofílico (Kheilnezhad e Hadjizadeh, 2022 e Pan et al., 2022) a sua adição ao PCL leva a que o polímero hidrofóbico se direcione para o interior das fibras, enquanto o hidrofílico migra em direção ao ambiente com maior humidade, o exterior dos filmes fibrosos (Pan et al., 2022). Este resultado é considerado bastante positivo, uma vez que a camada mais próxima da ferida deve permitir a passagem do antibiótico do hidrogel para a ferida, ao mesmo tempo que deixa passar os exsudatos para serem absorvidos pelo hidrogel. Adicionalmente, o caracter hidrofóbico da camada externa de PCL é desejável para impedir a entrada de impurezas (em estado líquido).

5.4.5. Capacidade de hidratação

O grau de hidratação dos filmes fibrosos, dos hidrogéis e do sistema sanduíche foi determinado medindo as alterações de massa após a incubação dos materiais a 37 °C até à sua saturação (24 h). O teste foi realizado em PBS para que o meio se assemelhasse às condições osmóticas e iónicas dos fluidos biológicos humanos (Miranda et al., 2023). As amostras foram pesadas em diferentes períodos (4, 6, 8 e 24 h) para detetar o momento em que o equilíbrio era atingido (Tabela 5).

Tabela 5: Grau de hidratação das amostras imersas em PBS após 4, 6, 8 e 24 h de incubação a 37 °C

Amostra	Grau de Hidratação (%)			
	4 h	6 h	8 h	24 h
PCL	43,75 ± 0,62	-5,88 ± 0,24	16,28 ± 0,24	2,70 ± 0,25
PCL/PEG	81,08 ± 0,62	70,83 ± 0,41	80,00 ± 0,50	78,79 ± 0,51
H SA	98,64 ± 24,19	97,38 ± 12,58	96,75 ± 9,88	95,44 ± 6,68
H SA/Amp	98,71 ± 24,65	98,29 ± 21,04	97,38 ± 12,69	94,91 ± 5,96
PCL+SA+PCL	47,78 ± 6,37	40,49 ± 5,49	41,20 ± 5,26	33,48 ± 3,81
PCL+SA+PCL/PEG	62,67 ± 2,79	49,70 ± 2,18	46,15 ± 1,89	6,67 ± 1,79
PCL+SA/Amp+PCL	69,98 ± 6,33	68,62 ± 6,01	67,29 ± 5,69	65,34 ± 5,66
PCL+SA/Amp+PCL/PEG	73,21 ± 1,43	68,09 ± 1,12	68,09 ± 1,07	74,36 ± 1,45

É possível observar que todas as amostras apresentam uma hidratação inicial elevada (> 40 %). A partir das 4 h de incubação ocorrem ligeiras flutuações nas massas até às 24 h, momento a partir do qual constância parece aumentar.

Os hidrogéis de SA e SA/Amp foram as amostras que apresentaram os maiores graus de hidratação, de 98,64 ± 24,19 % e 98,71 ± 24,64 %, respetivamente, apenas nas primeiras 4 h de contacto com o PBS. Às 24 h de incubação, os valores obtidos são ligeiramente mais baixos, nomeadamente 95,44 ± 6,68 % e 94.91 ± 5,96 %; no entanto, continuaram a ser os maiores obtidos para todas as condições. Considerando que as amostras estão imersas em PBS e não apenas em água, flutuações nas massas podem resultar da ligação entre grupos os -OH do SA e sais pertencentes ao PBS. A ligação oposta, libertação de sais para ligação com água, pode também ocorrer graças à longevidade do contacto e à afinidade entre amostras e meio (Homem N. et al., 2021). Adicionalmente, isto confirma a afinidade do SA com a água (Gutiérrez-luna et al., 2022). É ainda possível verificar que a Amp, como é adicionada em pequena quantidade, não afeta significativamente o grau de hidratação dos hidrogéis. Por sua vez, os filmes de PCL foram os que apresentaram os graus mais baixos de hidratação: às 4 h obtiveram 43,75 ± 0.62 % e às 24 h reportaram 2,70 ± 0.25 %. Isto reflete a hidrofobicidade característica do PCL, o que limita as interações das moléculas de água por repulsão eletroestática (Miranda et al., 2020). Já

nos filmes de PCL/PEG, o grau de hidratação obtido às 4 h foi bastante superior, 81,08 ± 0,62 %. Estes dados confirmam as observações de molhabilidade e demostram, mais uma vez, o caracter hidrofílico do PEG e a sua influência sobre o PCL hidrofóbico (Patner, 2012, Zarrintag et al 2020 e Padin-González et al., 2022).

Nos sistemas sanduíche controlo, após 4 h de incubação, a amostra de PCL+SA+PCL reportou um grau de hidratação na ordem dos 47,78 ± 6,37 % enquanto a amostra de PCL+SA+PCL/PEG garantiu 62,67 ± 2,79 %. Esta ligeira diferença de ≈ 15 % pode dever-se à presença do polímero PEG, que sendo mais hidrofílico permite uma absorção maior de moléculas de água. Também após as 4 h de incubação, as amostras do sistema PCL+SA/Amp+PCL e PCL+SA/Amp+PCL/PEG também são semelhantes entre si, 69,98 ± 6,33 % e 73,21 ± 1,43 %, respetivamente, mas apresentam valores superiores em comparação com os sistemas controlo. Mais uma vez, a diferença entre sistemas (≈ 3 %) poderá estar relacionada com o polímero PEG. É ainda importante referir que erros poderão ter ocorrido durante as medições, considerando que o excesso de PBS foi retirado com o apoio de *kimwipes* momentos antes da pesagem, sendo que o tempo de limpeza poderá não ter sido mantido constante entre medições. Com este ensaio verificou-se que o sistema sanduíche tem a capacidade para absorver exsudatos, enquanto em contacto com a ferida.

5.4.6. Perfil de degradação

A estabilidade do sistema em PBS foi avaliada até 7 dias de incubação a 37 °C. O perfil de degradação foi traçado através de medições nas alterações de massa ao longo do tempo, tal como apresentado na Tabela 6.

Tabela 6: Perfil de degradação das amostras ao longo de sete dias de incubação em PBS a 37 °C

Amostra	Perda de massa (%)					
	Dia 1	Dia 2	Dia 3	Dia 5	Dia 6	Dia 7
PCL	-13,33 ± 0,07	-46,67 ± 0,23	-60,00 ± 0,17	-46,67 ± 0,15	-60,00 ± 0,17	-60,00 ± 0,17
PCL/PEG	14,71 ± 0,22	5,88 ± 0,31	14,71 ± 0,24	8,82 ± 0,21	17,65 ± 0,23	23,53 ± 0,23
H SA	48,08 ± 14,32	82,46 ± 22,09	90,45 ± 24,04	94,02 ± 24,94	96,95 ± 20,65	94,87 ± 25,14
H SA/Amp	22,19 ± 6,83	89,47 ±24,96	94,50 ± 26,39	96,17 ± 26,83	95,87 ± 26,75	97,49 ± 27,20
PCL+SA+PCL	35,44 ± 10,12	50,37 ± 12,29	61,85 ± 14,41	63,49 ± 14,79	65,79 ±15,15	74,49 ± 16,41
PCL+SA+PCL/PEG	51,40 ± 5,89	65,99 ± 7,46	66,30 ± 7,43	75,16 ± 8,33	76,71 ± 8,48	80,43 ± 8,88
PCL+SA/Amp+PCL	27,94 ± 8,91	39,68 ± 8,97	47,57 ± 8,91	61,74 ± 9,32	63,97 ± 9,41	71,05 ± 9,67
PCL+SA/Amp+PCL/PEG	38,66 ± 7,03	55,53 ± 7,19	54,07 ± 7,06	56,69 ± 7,11	62,50 ± 7,27	67,73 ± 7,42

Os dados da Tabela 6 revelam que os hidrogéis de SA e SA/Amp são as menos estáveis ao longo do tempo. Após 3 dias de incubação em PBS, os hidrogéis sofrem uma perda de massa de mais de 90 % o que comprometeu a medição exata da massa os tempos seguintes. Esta observação era esperada uma vez que a hidratação nos hidrogéis, tal como visto na secção 5.4.5, é mais elevada nas primeiras horas de contacto (> 90 %). Logo ao estabelecerem-se mais ligações com a água e os sais de PBS, a estrutura polimérica pode sofrer alterações que condicionam a sua estabilidade a longo prazo. É possível ainda observar que a adição do antibiótico ao hidrogel não introduz diferenças significativas nos resultados.

Curiosamente, os filmes de PCL registaram um aumento de massa com a exposição ao PBS; isto acontece devido às ligações geradas entre o PCL e os sais do PBS. Aqui, o grupo carbonilo do PBS que apresenta alta nucleofilicidade, causada pela polaridade de um grupo éster, gera fortes ligações de hidrogénio com os grupos metileno do PCL, explicando assim o aumento em massa verificado (Huang et al., 2016). Os filmes de PCL/PEG, que na secção 5.4.5, reportaram maior capacidade de hidratação, neste teste registaram perdas de massa relativamente baixas, sendo a maior no dia 7 de 23,53 ± 0,23 %. Graças à compatibilidade do PEG com a água, e consequente solubilidade (Ratner, 2012, Zarrintaj et al, 2020 e Padín-González et al, 2022), degradação perda de massa foi aumentada em relação ao PCL. No entanto, como o PEG é também um polímero com bioestabilidade (Dardeer et al., 2022), as perdas não ultrapassaram os 25 %. Estes dados mostram que a degradação se sobrepõe às ligações entre o PCL e o PBS nos filmes fibrosos de PCL/PEG.

Nos sistemas sanduíche, as diferenças são mínimas entre amostras controlo (PCL+SA+PCL, PCL+SA+PCL/PEG e PCL+SA/Amp+PCL) e o sistema final (PCL+SA/Amp+PCL/PEG). Perdas de massa variaram entre os 30 e os 80 %. Atendendo que a camada intermédia do hidrogel apresenta o maior contributo para a dimensão da sanduiche (Figura 13), seria espectável que o comportamento de degradação se aproximasse ao dos hidrogéis, cuja desintegração é iniciada logo ao dia 2. Os dados da Tabela 6 comprovam a capacidade protetora das camadas fibrosas, que mantêm a estabilidade do sistema por mais tempo, demonstrando assim a intimidade das relações entre as três unidades do sistema e a partilha de propriedades. Estes resultados indicam que o sistema multifuncional desenvolvido não poderá ser utilizado por mais de 2/3 dias, devido ao incremento contínuo da degradação em ambiente fisiológico, perdendo assim a sua efetividade.

5.4.7. Adesividade

A adesão do penso a uma ferida pode comprometer o tecido celular novo no momento da remoção. Como tal, a força de adesão dos hidrogéis e dos sistemas sanduíche foi determinada utilizando a papel cavalinho (utilizado para simular a pele). A adesão foi potenciada com um peso de 500 g por 2 min, sendo a foça necessária para destacar as duas partes reportada na Figura 16. Os filmes fibrosos foram excluídos deste teste por não aderirem ao papel quando utilizados individualmente; os filmes de PCL não aderiam e os filmes de PCL/PEG só aderiam ao papel de um lado. Em paralelo aos testes com papel, avaliações com pele de porco foram realizadas (Anexo B). Contudo, a adesividade entre as partes era nula ou quase nula, independente da tipologia de amostra, sendo as avaliações mecânicas impossíveis de serem concretizadas.

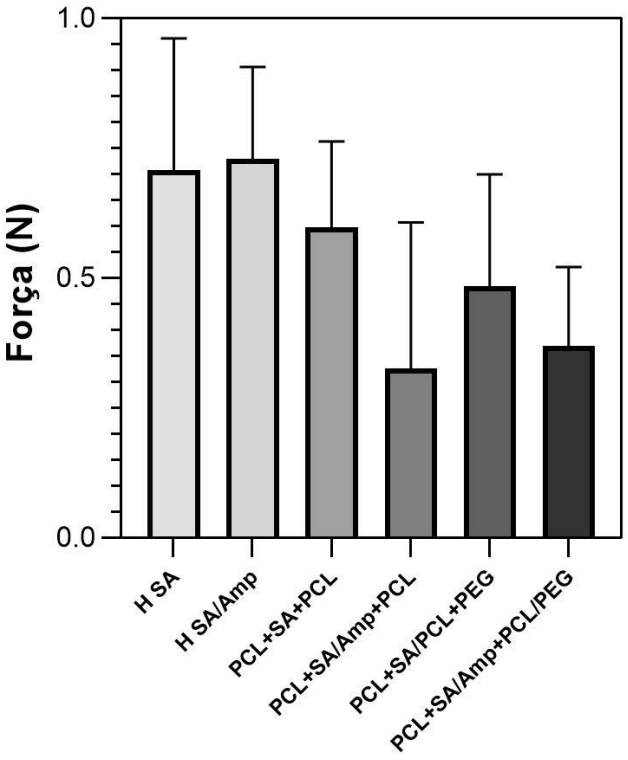


Figura 16: Força (N) necessária para promover a separação entre o papel cavalinho e as amostras dos hidrogéis SA e SA/Amp e das sanduíches PCL+SA+PCL, PCL+SA+PCL/PEG, PCL+SA/Amp+PC e PCL+SA/Amp+PCL/PEG.

Os resultados da Figura 16 mostram que os hidrogéis de SA e SA/Amp geram uma força de adesão superior com o papel, nomeadamente de 0,707 ± 0,207 N e 0,730 ± 0,144 N, respetivamente. Estes resultados vão de encontro às observações de Gao et al, 2019 e Cagnetta et al., 2023. Por outro lado, considerando a presença de filmes de PCL e PCL/PEG nas duas faces do hidrogel que formam os sistemas sanduíche era espectável uma redução na força de adesão; essa redução variou entre 15 e 65 %. Aqui, a presença de Amp nas sanduiches provocou alterações importantes no desempenho das amostras. Sempre que presente, a Amp reduziu a força de adesão. Apesar de não existirem evidências significativas do seu impacto nas propriedades físicas do sistema, amostras carregadas com Amp provocaram um ligeiro aumento do grau de hidratação (Tabela 5). Graças à maior afinidade com a água é espectável que estas moléculas (muito presentes na pele) bloqueiem os pontos de adesão do sistema, criando uma interface hidratada, que reduz a adesão da amostra (molha mais, mas cola menos). O sistema sanduíche final necessitou de 0,370 ± 0,124 N para ser destacado do papel. Klode et al., 2011 testaram a adesividade de 56 tipos diferentes de pensos contra metal e pele. As adesividades obtidas variaram entre os 0,15 N e os 4,29 N. Aqui, o valor mais alto obtido foi de ≈ 0,730 N, muito dentro dos valores praticados por pensos comerciais. Com base nestes dados, concluiu-se que o sistema sanduíche

final é seguro para utilização, sem requerer forças demasiado elevadas para ser destacado no momento da troca (Gao et al, 2019).

5.4.8. Libertação de Amp

A libertação de Amp incorporada nas amostras PCL+SA/Amp+PCL e PCL+SA/Amp+PCL/PEG foi seguida até 24 h de incubação a 37 °C e 120 rpm em PBS (Figura 15). Os períodos de avaliação da libertação coincidiram com os do ensaio de inibição bacteriana ("shake flask"), sendo os dados recolhidos após 1, 2, 4, 6 e 24 h de incubação. Primeiramente, uma curva de calibração para a Amp que relacionasse a concentração com a absorbância foi realizada (Anexo C). Os dados da Figura 17 foram obtidos pela diferença da absorbância entre sistemas carregados com Amp (PCL+SA/Amp+PCL e PCL+SA/Amp+PCL/PEG) e sistemas não carregados (PCL+SA+PCL e PCL+SA+PCL/PEG) por forma a eliminar a influência da potencial degradação de SA e/ou PCL e/ou PEG durante as medições (Miranda et al., 2023). Valores negativos indicam que a libertação de Amp não se sobrepõe à degradação dos outros componentes no sistema.

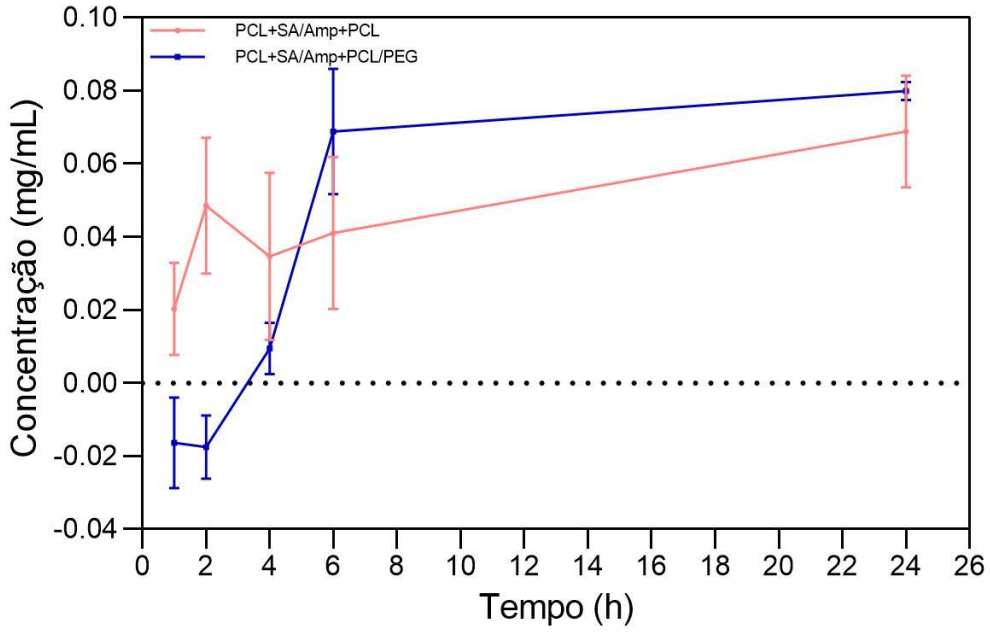


Figura 17: Perfil de libertação da Amp incorporada no sistema sanduíche PCL+SA/Amp+PCL e PCL+SA/Amp+PCL/PEG após 1, 2, 4, 6, e 24 h de incubação em PBS.

A Figura 17 indica que ambos os sistemas apresentam libertação inferiores a 0,1 mg/mL. As amostras atingem um pico de libertação às 24 h de incubação, sendo a sanduíche de

PCL+SA/Amp+PCL/PEG a que apresenta a maior libertação (≈ 0,08 mg/mL). Tendo em conta os resultados da hidratação e degradação (secção 5.4.5 e 5.4.6, respetivamente), os valores obtidos vão de encontro ao esperado. À medida que a degradação é maior, é de esperar que a libertação da Amp também seja maior, tal como podemos ver na Figura 17. No entanto, comparativamente à concentração de Amp carregada no sistema (6,4 mg/mL), a concentração libertada é muito baixa. Estes dados confirmam a capacidade de retenção/encapsulação do hidrogel sobre a Amp, condicionando assim a libertação e consequente atuação (como evidenciada na secção 5.2.2).

5.5. Avaliação *in vitro* do sistema sanduíche

5.5.1. Ensaio "shake flask"

O teste "shake flask" é um método dinâmico de avaliação de atividade antimicrobiana (Teufel e Redl, 2006 e Ristić et al., 2011). Neste teste, quatro amostras, PCL+SA+PCL, PCL+SA+PCL/PEG, PCL+SA+PCL/PEG e PCL+SA/Amp+PCL/PEG, foram analisadas pela sua atividade antibacteriana contra as bactérias *S. aureus* e a *E. coli*. Os controlos individuais de cada camada do sistema foram desconsiderados desta análise uma vez que a influência das diferentes partes sobre o sistema na sua totalidade foi já comprovada nos ensaios anteriores. Os resultados das Figuras 18 revelam a atividade das sanduiches desenvolvidas contras as duas bactérias após 1, 2, 4, 6 e 24 h de cultura.

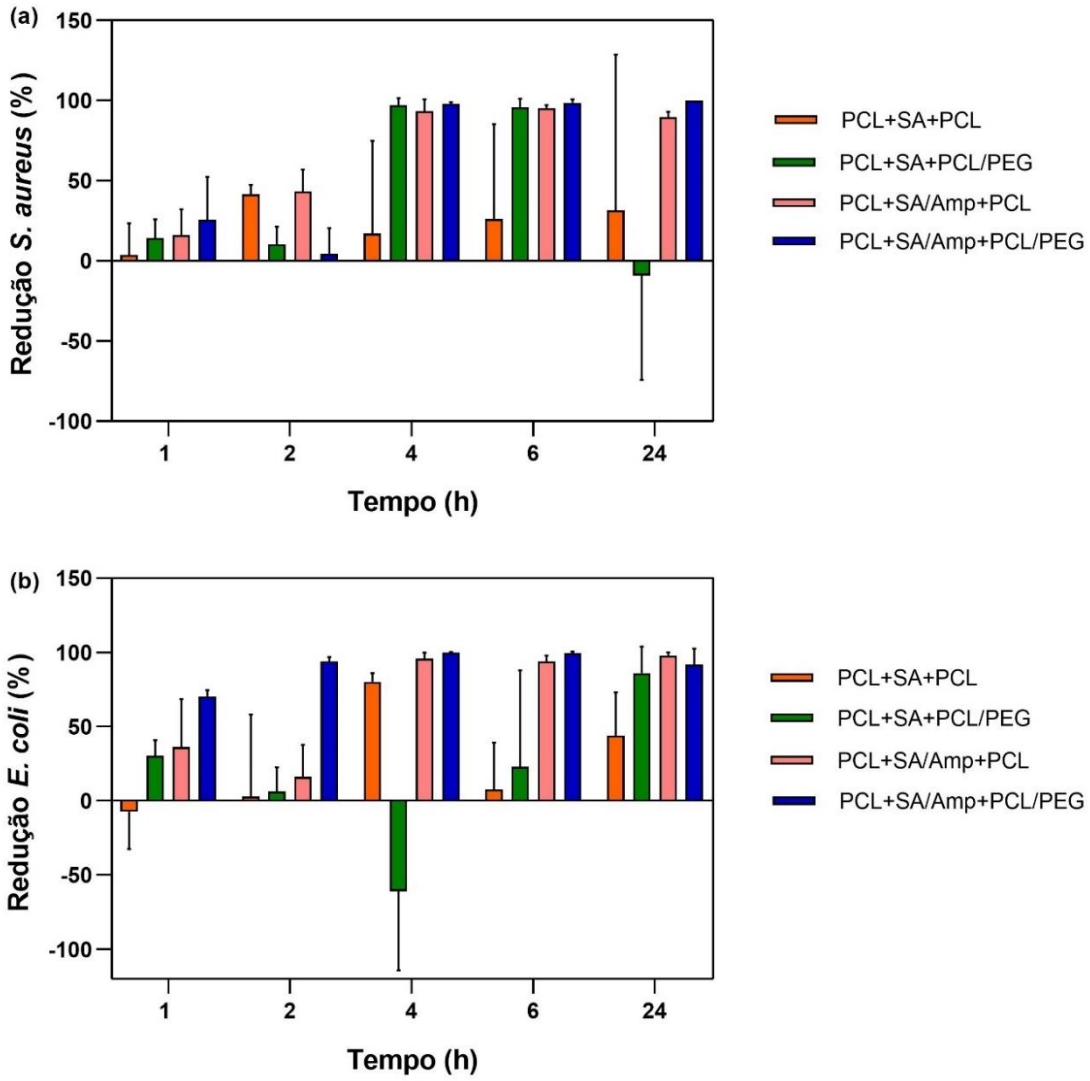


Figura 18: Redução do número de colónias das bactérias (a) *S. aureus* e (b) *E. coli*, após 1-24 h de incubação a 37 °C com os sistemas sanduiche controlo e final.

Nos primeiros instantes de contacto com as amostras, a redução de *S. aureus* é inferior a 15 % (Figura 18a). Contudo, à medida que a libertação de Amp ocorre, a redução bacteriana aumenta para valores superiores a 90 %, sendo o sistema completo capaz de eliminar 100% das colónias de *S. aureus* após 24 h de incubação. Apesar da elevada ação às 4 e 6 h de cultura, a sanduiche PCL+SA+PCL/PEG perde a sua efetividade com o tempo. É espectável que estes momentos iniciais se tenham potenciado pela degradação/libertação do PEG das amostras, que poderá atuar como uma barreira protetora, rodeando as bactérias e impedindo as trocas de nutrientes essenciais à sua viabilidade (Valuckaite et al., 2009). Contudo, ao fim de 24 a quantidade de PEG disponível não consegue mais impedir a proliferação de *S. aureus*.

No caso da bactéria *E. coli* (Figura 16b), nos primeiros momentos de contacto da amostra, a redução bacteriana é superior a 20 % exceto para a amostra de PCL+SA+PCL em que não houve redução (ausência de aditivos com potencial antibacteriano). Contudo, ao longo do tempo, com a libertação da Amp, particularmente a partir das 4 h, a redução bacteriana aumenta também para valores acima dos 90 %. No entanto, contrariamente ao que acontece com a *S. aureus*, o sistema completo não é capaz de eliminar 100 % das colónias da *E. coli*. A pesar da falta de ação às 4 h de cultura, a sanduiche PCL+SA+PCL/PEG é capaz de eliminar cerca de 80 % das colónias de *E. coli* até às 24 h de incubação. Isto pode dever-se à degradação/libertação do PEG das amostras e este dotar o sistema de uma ação mais eficaz contra estas bactérias.

Os resultados observados vão de encontro aos valores obtidos pelo teste da libertação (secção 5.4.8). para as amostras PCL+SA/Amp+PCL e PCL+SA/Amp+PCL/PEG em que se registou uma maior libertação a partir das 4 h de incubação e, consequentemente, uma maior ação contra as bactérias estudadas. É possível também verificar que, ainda assim, a Amp tem uma ação superior contras as bactérias *S. aureus*. Este resultado vai de encontro ao esperado, pois como já referido e observado pelas determinações dos MICs e MBCs (secção 5.1.1), a Amp tem um mecanismo de ação mais eficaz contras bactérias Gram-positivas (Bereda, 2022 e Peechakara et al, 2022).

Apesar do PEG ser determinante na ação bacteriana na ausência da Amp, na sua presença a influência nos resultados não é cumulativa. Considerando que pouco ou nada se sabe sobre os potenciais mecanismos de ação protetora e repelente do PEG contra bactérias, é possível que ocorra um confronto de atividades entre os dois compostos, inibindo-se mutuamente. Independente disso, foi possível comprovar a eficácia antibacteriana do sistema desenvolvido contra dois dos principais microrganismos presentes em infeções cutâneas.

6. Conclusões finais

As feridas crónicas são um problema de saúde cada vez mais comum e preocupante, onde terapias convencionais (pensos) têm um papel passivo no combate a infeções. Considerando esta problemática, foi proposto desenvolver um sistema multifuncional em sanduíche, modificado com agentes bioativos, capaz de manter a humidade local, absorver exsudados, proteger a ferida de invasores externos e inibir a ação de bactérias prevalentes em infeções cutâneas, tudo isto sem comprometer o local afetado o momento da substituição ou remoção do penso.

O sistema sanduiche foi idealizado em três camadas: externa e interna em filme eletrofiado e intermédia em forma de hidrogel. Cada elemento da sanduiche foi caracterizado individualmente e em conjunto. Imagens de SEM comprovaram a produção de filmes fibrosos à microescala, preenchidos com fibras contínuas, homogéneas e sem defeitos. A presença de PEG nas fibras da camada interna aumentou o diâmetro comparativamente à externa (apensa de PCL) e também a compatibilidade do filme com a água (aumento da hidrofibicidade). Em contrapartida, a degradação deste filme foi potenciada relativamente ao de PCL. Como seria de esperar, a afinidade do hidrogel com moléculas de água foi comprovada, na presença e ausência de 100×MBC Amp. Devido ao rácio elevado de polímero comparativamente à de Amp, a sua presença no hidrogel e nas sanduiches foi apenas detetada indiretamente a partir de testes de adesividade, libertação controlada e atividade antibacteriana.

A partir de comportamentos físicos (morfologia, hidratação, degradação, etc.) e térmicos foi possível concluir que a produção da sanduiche foi bem-sucedida. De facto, influências mútuas foram observadas na resistência à degradação térmica e, principalmente, em ambiente fisiológico, onde a presença das camadas interna e externa atrasou a degradação dos hidrogéis. A adesividade foi também influenciada por estas camadas, reduzindo a força necessária para destacar o sistema da superfície teste (papel). Por último, foi comprovada a capacidade antibacteriana do sistema sanduiche idealizado, promovendo uma eliminação das bactérias, a *Staphylococcus aureus* e a *Escherichia coli* acima dos 90 % a partir das 6 h de incubação. Este foi também um período de grande libertação de Amp, que impulsionou a ação das sanduiches contra as bactérias.

Em suma, após o desenvolvimento do sistema multifuncional sanduíche, e da respetiva caracterização e análise de resultados, é possível concluir que o sistema multifuncional sanduíche apresenta propriedades adequadas para uma possível aplicação no tratamento de feridas crónicas. No entanto é de realçar que as bactérias e o antibiótico utilizado são modelos, podendo ser o antibiótico substituído por outro ou por outra tipologia de agente ativo. Futuramente, deverá analisar-se a atividade

antimicrobiana de diferentes agentes contra uma maior variedade de bactérias infeciosas presentes em feridas crónicas. Avaliar a ação dos agentes e do sistema sanduíche contra biofilmes. Testar o sistema multifuncional em ambiente característico de feridas crónicas (pH, multi-microbiano, presença de níveis elevados de enzimas proteolíticas, etc.) e analisar seus os níveis de citotoxicidade. E verificar a possível existência de efeitos sinérgicos entre os aditivos antimicrobianos pelo teste *checkboard*.

O trabalho desenvolvido durante o projeto de tese foi apresentado na conferência "8th International Polysaccharide Conference (EPNOE 2023)" na Áustria como comunicação Oral, e nas conferências online "The 2th International Electronic Conference on Microbiology (ECM 2023)" e "The 3th International Electronic Conference on Antibiotics; Rise of Antibiotic Resistance: Mechanisms Involved and Solutions to Tackle It (ECA 2023)", organizadas pela MDPI-SciForum, sob a forma de Poster.

Bibliografia

Abdelrazek E.M., Hezma A.M., El-khodary A., Elzayat A.M., Spectroscopic studies and thermal properties of PCL/PMMA biopolymer blend, *Egyptian Journal of Basic and Applied Sciences*. 2016, Vol. 3, p. 10-15 https://doi.org/10.1016/j.ejbas.2015.06.001

Abdo, J.M, Sopko, N.A, Milner, S.M.. The applied anatomy of human skin: A model for regeneration, *Wound Medicine*, 2020. Vol. 28 https ://doi.org/10.1016/j.wndm.2020.100179. Disponivél online: https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2213909520300033 (acedido a 30 de julho de 2023)

Adepu, S., & Ramakrishna, S. Controlled Drug Delivery Systems: Current Status and Future Directions. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 2021. Vol. 26(19), p. 5905. https://doi.org/10.3390/molecules26195905

Ahmed E. M. Hydrogel: Preparation, characterization, and applications: A review. *Journal of advanced research*, 2015. Vol. *6*(2), p. 105–121. https://doi.org/10.1016/j.jare.2013.07.006

Alfaro De Pra M., Coelho D.S., Ribeiro-do-Valle R.M., Lopes-da-Silva J.A., Maraschin M., and Veleirinho B. The Effect of Polyethylene Glycol on Polycaprolactone Electrospun Scaffolds: Morphology, Mechanical Properties, and Nerve Growth Factor Delivery Profile. *Nano Prog.*, 2020. Vol. 2(4), p. 24-31. https://doi.org/10.36686/Ariviyal.NP.2020.02.04.015

Al-Tawfiq J.A., Momattin H., Al-Ali A.Y., Eljaaly K., Tirupathi R., Haradwala M.B., Areti S., Alhumaid S., Rabaan A.A., Mutair A.A. e Schlagenhauf P. Antibiotic in the pipeline: a literature review (2017-2020), *Infection* 50, 2021. p. 553–564. https://doi.org/10.1007/s15010-021-01709-3

Antunes J. C., Tavares T. D., Teixeira M. A., Teixeira M. O., Homem N. C., Amorim M. T. P., e Felgueiras H. P. Eugenol-Containing Essential Oils Loaded onto Chitosan/Polyvinyl Alcohol Blended Films and Their Ability to Eradicate *Staphylococcus aureus* or *Pseudomonas aeruginosa* from Infected Microenvironments. *Pharmaceutics*, 2021. Vol. 13 (2). https://doi.org/10.3390/pharmaceutics13020195.

Arrieta M.P., Gil A.L., Yusef M., Kenny J.M. e Peponi L. Electrospinning of PCL-Based Blends: Processing Optimization for Their Scalable Production, *Materials (Basel).* 2020. Doi: 10.3390/ma13173853

Bellio P., Fagnani L., Nazzicone L., Celenza G. New and simplified method for drug combination stucies by checkerboard assay, *MethodsX*, 2021. https://doi.org/10.1016/j.mex.2021.101543

Bellio P., Fagnani L., Nazzicone L., Celenza G., New and simplified method for drug combination studies by checkerboard assay. *MethodsX*, 2021. Vol. 8 https://doi.org/10.1016/j.mex.2021.101543. Disponível online: https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2215016121003356 (acedido a 31 de janeiro de 2023).

Bereda G. Clinical Pharmacology of Ampicilin, *Journal of Pharmaceutical Research & Reports*, 2022. Doi: 10.47363/JPRSR/2022(3)129

Browne A.J., Chipeta M.G., Haines-Woodhouse G., Kumaran E.P.A., Hamadani B.H.K., Sabra Zaraa S., Henry N.J., Deshpande A., Reiner Jr R.C., Prof Day N.P.J., Prof Lopez A.D., Prof Dunachie S., Moore D.ER., Prof Stergachis A., Prof Hay S.I., Dolecek C. Global antibiotic consumption and usage in humans, 2000-18: a spatial modelling study, *The Lancet Planetary Health*, 2021. https://doi.org/10.1016/S2542-5196(21)00280-1

Cagnetta G.E., Martinez S.R., Ibarra L.E., Gallastegui A., Martucci J.F., Palacios R.E., Chesta C.A e Gómez M.L. New reusable antimicrobial anbiotic-free dressings obtain ny photopolymerization. *Biomater Adv*, 2023. 10.1016/j.bioadv.2023.213399

Coelho D., Sampaio A., Silva C.J.S.M., Felgueiras H.P., Amorim M.T.P. e Zille A. AntibacterialElectrospunPoly(vinylalcohol)/EnzymaticSynthesized Poly(catechol)NanofibrousMidlayerMembraneforUltrafiltration. *ACS Appl. Mater. Interfaces*, 2017.

Volume 9, p. 33107-33118. https://doi.org/10.1021/acsami.7b09068

Dalal, S.R., Hussein, M.H., El-Naggar, N.EA. *et al.* Characterization of alginate extracted from *Sargassum latifolium* and its use in *Chlorella vulgaris* growth promotion and riboflavin drug delivery. *Sci Rep*. 2021. Vol. 11. https://doi.org/10.1038/s41598-021-96202-0

Dardeer H.M., Toghan A., Zaki M.E.A., Elamary R.B. Design, Synthesis and Evaluation of Novel Antimicrobial Polymers Based on the Inclusion of Polyethylene Glycol/TiO_2 Nanocomposites in Cyclodextrin as Drug Carriers for Sulfaguanidine. *Polymers*, 2022, Vol. *14*, p. 227. https://doi.org/10.3390/polym14020227

Domingues J.M., Teixeira M.O., Teixeira M.A., Freitas D., Silva S.F.d., Tohidi S.D., Fernandes R.D.V., Padrão J., Zille A., Silva C., Antunes J.C., Felgueiras H.P. Inhibition of Escherichia Virus MS2, Surrogate of SARS-CoV-2, via Essential Oils-Loaded Electrospun Fibrous Mats: Increasing the Multifunctionality of Antivirus Protection Masks. *Pharmaceutics*, 2022. Vol. 14. https://doi.org/10.3390/pharmaceutics14020303 Disponível online: https://www.mdpi.com/1999-4923/14/2/303 (acedido a 1 de fevereiro de 2023).

Doyle S.E., Henry L., McGennisken E., Onofrillo C., Bella C. D., Duchi S., O'Connell C. D., e Pirogova, E. Characterization of Polycaprolactone Nanohydroxyapatite Composites with Tunable Degradability Suitable for Indirect Printing. *Polymers (Basel)*, 2021. Vol. 13(295) doi: 10.3390/polym13020295

Elzein T., Nasser-Eddine M., Delaite C., Bistac S. e Dumas P., FTIR study of polycaprolactone chain organization at interfaces, *Journal of Colloid and Interface Science*, 2004. Vol. 273, p. 381-387. https://doi.org/10.1016/j.jcis.2004.02.001

Eriksson E., Liu P.Y., Schultz G.S., Martins-Green M.M., Tanaka R., Weir D., Gould L.J., Armstrong D.G., Gibbons G.W., Wolcott R., Olutoye O.O., Kirsner R.S., Gurtner G.C.. Cronic wounds: Treatmente consensos. *Wound Repair and Regeneration*, 2022. Vol. 30 (2), p. 156-171. https://doi.org/10.1111/wrr.12994. Disponível online: https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/wrr.12994 (acedido a: 20 de janeiro de 2023).

Fadlelmoula A., Pinho D., Carvalho V.H., Catarino, S.O., Minas G. Fourier Transform Infrared (FTIR) Spectroscopy to Analyse Human Blood over the Last 20 Years: A Review towards Lab-on-a-Chip Devices. Micromachines, 2022. Vol. 13, p. 187. https://doi.org/10.3390/mi13020187

Felgueiras H.P. Emerging Antimicrobial and Immunomodulatory Fiber-Based Scaffolding Systems for Treating Diabetic Foot Ulcers. *Pharmaceutics*, 2023, Vol. 15, p. 258. https://doi.org/10.3390/pharmaceutics15010258 Disponível online: https://www.mdpi.com/1999-4923/15/1/258 (acedido a 2 de fevereiro de 2023).

Felgureiras H.P., Amorim M.T.P. Functionalization of electrospun polymeric wound dressings with antimicrobial peptides, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 2017. http://dx.doi.org/10.1016/j.colsurfb.2017.05.001

Firlar I.; Altunbek, M.; McCarthy C.; Ramalingam M.; Camci-Unal G. Functional Hydrogels for Treatment of Chronic Wounds. *Gels*, 2022. Vol. 8 (2), p. 127. https://doi.org/10.3390/gels8020127 Disponível online: https://www.mdpi.com/2310-2861/8/2/127 (acedido a: 19 de janeiro de 2023).

Gao L., Zhou Y., Peng J., Xu C., Xu Q., Xing M. e Chang J. A novel dual-adhesive and bioactive hydrogel actived by bioglass for wound healing, *MPG Asia Materials*, 2019. Vol. 11, p. 66. https://doi.org/10.1038/s41427-019-0168-0

Gentry L. O. Antimicrobial activity, pharmacokinetics, therapeutic indications and adverse reactions of ceftazidime. *Pharmacotherapy*, 1985. Vol. 5. https://doi.org/10.1002/j.1875-9114.1985.tb03424.x.

Golecki H. M., Yuan H., Glavin C., Potter B., Badrossamay M. R., Goss J. A., Phillips M. D. e Parker K. K. Effect of solvent evaporation on fiber morphology in rotary jet spinning. *Langmuir : the ACS journal of surfaces and colloids*, 2014. Vol. 30(44), p. 13369–13374. https://doi.org/10.1021/la5023104

Gutiérrez-luna K., Ansorena D., Astiasarán I. Use of hydrocolloids and vegetable oils for the formulation of a butter replacer: Optimization and oxidative stability. *LWT*, 2022. Vol. 153,

https://doi.org/10.1016/j.lwt.2021.112538. Disponível online: https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0023643821016911 (acedido a 3 de fevereiro de 2023).

Han G., & Ceilley R. Chronic Wound Healing: A Review of Current Management and Treatments. *Advances in therapy*, 2017, Vol. 34(3) https://doi.org/10.1007/s12325-017-0478-y Disponível online: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5350204/ (acedido a 2 de fevereiro de 2023).

Hekmati A.H., Rashidi A., Ghazisaeidi R. e Drean J.Y, Effect of needle length, electrospinning distance, and solution concentration on morphological properties of polyamide-6 electrospun nanowebs, *Textile Research Journal*, 2013. Vol. 83, p. 1452-1466. 10.1177/0040517512471746

Homaeigohar S., Boccaccini A. R., Antibacterial biohybrid nanofibers for wound dressings, *Acta Biomaterialia*, 2020. Vol. 107, p. 25-49, https://doi.org/10.1016/j.actbio.2020.02.022 Disponível online: https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S174270612030101X (acedido a 24 de janeiro de 2023).

Homem N. C., Tavares T. D., Miranda C. S., Antunes J. C., Amorim M. T. P., e Felgueiras, H. P. Functionalization of Crosslinked Sodium Alginate/Gelatin Wet-Spun Porous Fibers with Nisin Z for the Inhibition of *Staphylococcus aureus*-Induced Infections. *International journal of molecular sciences*, 2021. Vol. 22(4), p. 1930. https://doi.org/10.3390/ijms22041930

Homem N.C., Miranda C.A.F.d.S, Antunes J.I.d.C., de Amorim M.T.S.P., Felgueiras, H.P.. Modification of Ca^{2+}-Crosslinked Sodium Alginate/Gelatin Films with Propolis for an Improved Antimicrobial Action. *Proceedings*, 2021. Vol. 69. https://doi.org/10.3390/CGPM2020-07180 Disponível online: https://www.mdpi.com/2504-3900/69/1/4 (acedido a 19 de janeiro de 2023).

Huang J., Cui C., Yan G., Huang J., Zhang M. A Study on Degradation of Composite Material PBS/PCL, *Polymers and Polymer Composites*. 2016. Vol. 24(2) p. 143-148. https://doi.org/10.1177/096739111602400209

Hutchings M.I., Truman A.W. e Wilkinson B. Antibiotics: past, present and future, *Current Opinion in Microbiology*, 2019. https://doi.org/10.1016/j.mib.2019.10.008

Ibrahim M., Ramadan E., Elsadek N.E., Emam S.E., Shimizu T., Ando H., Ishima Y., Elgarhy O.H., Sarhan H.A., Hussein A.K. e Ishida T., Polyethylene glycol (PEG): The nature, immunogenicity, and role in the hypersensitivity of PEGylated products, *Journal of Controlled Release*. 2022. Vol. 351, p. 215-230. https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2022.09.031

Jain R., Shetty S., Yadav K.S., Unfolding the electrospinning potential of biopolymers for preparation of nanofibers, *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, 2020. Vol. 57. https://doi.org/10.1016/j.jddst.2020.101604 Disponível online: https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1773224720301453 (acedido a 25 de janeiro de 2023).

Järbrink K., Ni G., Sönnergren H., Schmidtchen A., Pang C., Bajpai R., & Car J.. Prevalence and incidence of chronic wounds and related complications: a protocol for a systematic review. *Systematic reviews*, 2016. Vol. 5(1), p. 152. https://doi.org/10.1186/s13643-016-0329-y Disponível online: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5017042/ (acedido a 2 de fevereiro de 2023).

Jiang X., Abedi K., Shi J., Polymeric nanoparticles for RNA delivery. Reference Module in Materials Science and Materials Engineering, *Elsevier*, 2021. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-822425-0.00017-8. Disponível online: https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780128224250000178 (acedido a 2 de fevereiro de 2023).

Kadam S., Nadkarni S., Lele J., Sakhalkar S., Mokashi P. e Kaushik K.S. Bioengineered Platforms for Chronic Wound Infection Studies: How Can We Make Them More Human-Relevant?, *Front Bioeng Biotechnol*, 2019. Doi: 10.3389/fbioe.2019.00418

Kamali E., Jamali A., Izanloo A., Ardebili A.. In vitro activities of cellulase and ceftazidime, alone and

in combination against *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *BMC Microbiol*, 2021. Vol. 21. https://doi.org/10.1186/s12866-021-02411-y Disponível online: https://link.springer.com/article/10.1186/s12866-021-02411-y (acedido a: 1 de fevereiro de 2023).

Kaushik D., Mohan M., Borade D.M. e Swamicorresponding O.C. Ampicillin: Rise Fall and Resurgence, *J Clin Diagn Res.*, 2014. doi: 10.7860/JCDR/2014/8777.4356

Khalil H., Chen T., Riffon R., Wang R., Wang, Z.. Synergy between polyethylenimine and different families of antibiotics against a resistant clinical isolate of Pseudomonas aeruginosa. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 2008. Vol. 52(5), p. 1635–1641. https://doi.org/10.1128/AAC.01071-07.

Kheilnezhad B. and Hadjizadeh A. Ibuprofen-Loaded Electrospun PCL/ PEG Nanofibrous Menbranes for Preventing Postoperative Abdominal Adhesion. *ACS Applied Bio Materials*, 2022. Vol. 5 (4), p. 1766-1778 https://doi.org/10.1021/acsabm.2c00126

Klode, J., Schöttler, L., Stoffels, I., Körber, A., Schadendorf, D., & Dissemond, J. Investigation of adhesion of modern wound dressings: a comparative analysis of 56 different wound dressings. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology: JEADV*, 2011. Vol. 25(8), p. 933–939. https://doi.org/10.1111/j.1468-3083.2010.03886.x

Kourkouta L., Tsaloglidou A., Koukourikos K., Iliadis C., Plati P., Dimitriadou A., History of Antibiotics, *Sumerianz Journal of Medical and Healthcare*, 2018. Disponível em: https://www.researchgate.net/publication/327652398_History_of_Antibiotics

Landis S.J. Chronic Wound Infection and Antimicrobial Use. *Advances in Skin & Wound Care*, 2008. Vol. 21(11), p. 531–540. 10.1097/01.ASW.0000323578.87700.a5

Laurano R., Boffito M., Ciardelli G. e Chiono V., Wound dressing products: A translational investigation from the bench to the market, *Engineered Regeneration*, 2022. Vol. 3, p. 182-200. https://doi.org/10.1016/j.engreg.2022.04.002

Li X. Cho B. Seu M., Zhang C., Zhou Z., Choi J.S., Jiang X., Chen L., Walia G., Yan J. Callanan M., Liu H., Colbert K., Morrissette-Mcalmon J., Grayson W., Reddy S., Sacks J.M. e Mao HQ. Nanofiber-hydrogel composite–mediated angiogenesis for soft tissue reconstruction.*Sci. Transl. Med.* 2019, Vol. 11 p. 6210. Doi: 10.1126/scitranslmed.aau6210

LibreTexts. Table lists infrared spectroscopy absorptions by frequency regions. https://chem.libretexts.org/@go/page/22645

Liu X., Xu H., Zhang M., & Yu D. G.. Electrospun Medicated Nanofibers for Wound Healing: Review. *Membranes*, 2021. Vol. 11(10), 770. https://doi.org/10.3390/membranes11100770 Disponível online: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8537333/ (acedido a 2 de fevereiro de 2023).

Lößlein S.M., Merz R., Müller D.W., Kopnarski M. e Mücklich F. An in-depth evaluation of sample and measurement induced influences on static contact angle measurements. *Sci Rep* 2022. Volume 12, p. 19389 https://doi.org/10.1038/s41598-022-23341-3

Luraghu A., Peri F., Moroni L. Electrospinning for drug delivery applications: A review, *Journal of Controlled Release*, 2021. https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2021.03.033

Malikmammadov E., Tanir T.E., Kiziltay A., Hasirci V., Hasirci N. PCL and PCL-based materials in biomedical applications. *J Biomater Sci Polym Ed.*, 2018. Vol. 29(7-9) p. 863-893. Doi: 10.1080/09205063.2017.1394711

Mandal P. e Shunmugam R. Polycaprolactone: a biodegradable polymer with its application in the field of self-assembly study, *Journal of Macromolecular Science, Part A*, 2021, Vol. 58:2, p. 111-129, https://doi.org/10.1080/10601325.2020.1831392

Mariani E., Lisignoli G., Borzì R.M. e Pulsatelli L. Biomaterials: Foreign Bodies or Tuners for the Immune Response? *Int J Mol Sci.* 2019, Vol. 20(3) p.636. https://doi.org/10.3390/ijms20030636

Miranda C.S., Antunes J.C., Homem N.C., Felgueiras H.P. Controlled Release of Cinnamon Leaf Oil from Chitosan Microcapsules Embedded within a Sodium Alginate/Gelatin Hydrogel-Like Film for *Pseudomonas aeruginosa* Elimination. *Proceedings*, 2021, Vol. 69.

https://doi.org/10.3390/CGPM2020-07181

Miranda C.S., Silva A.F.G., Seabra C.L., Reis S., Silva M.M.P., Pereira-Lima S.M.M.A., Costa S.P.G., Homem N.C., Felgueiras H.P. Sodium alginate/polycaprolactone co-axial wet-spun microfibers modified with N-carboxymethyl chitosan and the peptide AAPV for Staphylococcus aureus and human neutrophil elastase inhibition in potential chronic wound scenarios. *Biomaterials Advances*, 2023. Vol. 151, p. 213488, https://doi.org/10.1016/j.bioadv.2023.213488

Oluwole D.O., Coleman L., Buchanan W., Chen T.,La Ragione R.M. e Liu L.X. Antibiotics-Free Compounds for Chronic Wound Healing, *Pharmaceutics*, 2022. https://doi.org/10.3390/pharmaceutics14051021

Padín-González E., Lancaster P., Bottini M., Gasco P., Tran L., Fadeel B., Wilkins T. e Monopoli M.P. Understanding the Role and Impact of Poly (Ethylene Glycol) (PEG) on Nanoparticle Formulation: Implications for COVID-19 Vaccines, *Front. Bioeng. Biotechnol.- Sec. Nanobiotechnology*. 2022, Volume 10. https://doi.org/10.3389/fbioe.2022.882363

Pan L., Yang J., and Xu L.. Preparation and Characterization of Simvastatin-Loaded PCL/PEG Nanofiber Membranes for Drug Sustained Release. *Molecules*, 2022, Vol. 27, p. 7158. https://doi.org/10.3390/molecules27217158

Patrulea V., Ostafe V., Borchard G., & Jordan O. Chitosan as a starting material for wound healing applications. Eur J Pharm Biopharm, 2015, https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2015.08.004.

Peechakara B.V., Basit H., Gupta M. Ampicillin, *StatPearls [Internet].* 2022 Disponível em: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK519569/

Pereira M. F. V. Caracterização de poli (etileno glicóis) – PEGs. Tese de mestrado, Instituto Superior de Engenharia de Lisboa, Lisboa, dezembro de 2018. Disponível online: https://repositorio.ipl.pt/bitstream/10400.21/9626/1/Disserta%C3%A7%C3%A3o.pdf (acedido a 10 de junho de 2023)

Pereira R., Tojeira A., Vaz D., Mendes A. E Bártolo P., Preparation and Characterization of Films Based on Alginate and Aloe Vera, *International Journal of Polymer Anal. Charact.* 2011, Vol. 16, p.449-464. https://www.researchgate.net/deref/http%3A%2F%2Fdx.doi.org%2F10.1080%2F1023666X.2011.599923

Ratner B.D. 9.21 - Polymeric Implants. In *Polymer Science: A Comprehensive Reference*; Krzysztof Matyjaszewski, Martin Möller,Publisher: Elsevier , 2012; p. 397-411. https://doi.org/10.1016/B978-0-444-53349-4.00230-2.

Raziyeva K., Kim Y., Zharkinbekov Z., Kassymbek K., Jimi S., Saparov A. Immunology of Acute and Chronic Wound Healing. *Biomolecules*, 2021, Vol. 11 (5), p. 700. https://doi.org/10.3390/biom11050700 Disponível online: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8150999/ (acedido a 24 de janeiro de 2023).

Ribeiro A.R., Teixeira M.A., Pereira-Lima S.M.M.A., Costa S.P.G. e Felgueiras H. Tiger 17 Peptide Loaded Polycaprolactona/Cellulosa Acetate Electrospun Nanofibrous Mats for A pplications in Cutaneous Wound Dressings, *Journal of Textiles and Engineer*, 2022. 10.7216/teksmuh.1222547

Ristić T., Zemljič L. F., Novak M., Kunčič, Sonjak S., Cimerman N.G. and Strnad S. Antimicrobial efficiency of functionalized cellulose fibres as potential medical taxtiles. *In book: Science against microbial pathogens: communicating current research and technological advances*, 2011. Disponivél online: https://www.researchgate.net/publication/268440955

Segatore B., Bellio P., Setacci D., Brisdelli F., Piovano M., Garbarino J.A., Nicoletti M., Amicosante G., Perilli M., Celenza G. In vitro interaction of usnic acid in combination with antimicrobial agents against methicillin-resistant Staphylococcus aureus clinical isolates determined by FICI and ΔE model methods, *Phytomedicine*, 2012. Vol. 19, p. 341-347. https://doi.org/10.1016/j.phymed.2011.10.012

Sharifi S., Hajipour M.J., Gould L., Mahmoudi M. Nanomedicine in Healing Chronic Wounds: Opportunities and Challenges. *Molecular Pharmaceutics*, 2021, 10.1021/acs.molpharmaceut.0c00346

Shkarina S., Surmeneva M.A. e Surmenev R.A., Fabrication and characterization of polycaprolactone cross- linked and highly-aligned 3-D artificial scaffolds for bone tissue regeneration via electrospinning technology, *IOP Conference Series Materials Sci.* 2015. 10.1088/1757-899X/98/1/012024

Sun J., & Tan, H. Alginate-Based Biomaterials for Regenerative Medicine Applications. *Materials (Basel, Switzerland)* 2013, Vol. 6(4), p. 1285–1309. https://doi.org/10.3390/ma6041285

Tavakoli, S., Klar, A.S. Advanced Hydrogels as Wound Dressings. *Biomolecules* 2020, 10, 1169. https://doi.org/10.3390/biom10081169

Teixeira M.A., Paiva M.C., Amorim M.T.P., Felgueiras H.P. Electrospun Nanocomposites Containing Cellulose and Its Derivatives Modified with Specialized Biomolecules for an Enhanced Wound Healing. *Nanomaterials*, 2020, Vol. 10, 557. https://doi.org/10.3390/nano10030557 Disponível online: https://www.mdpi.com/2079-4991/10/3/557 (acedido a 2 de fevereiro de 2023).

Teixeira M.O., Antunes J.C., Felgueiras H.P. Recent Advances in Fiber–Hydrogel Composites for Wound Healing and Drug Delivery Systems. *Antibiotics*, 2021, Vol. 10, p. 248. https://doi.org/10.3390/antibiotics10030248 Disponível online: https://www.mdpi.com/2079-6382/10/3/248 (acedido a 26 de janeiro de 2023).

Teufel L. and Redl B. Improved Methods for Investigation of the Interaction between Textiles and Microorganisms, *Lenzinger Berichte,* 2006, Vol. 85, p. 54-60. Disponivél online: https://www.researchgate.net/publication/242171405 (acedido a 28 de abril de 2023).

Tottoli E.M., Dorati R., Genta I., Chiesa E., Pisani S. e Conti B., Skin Wound Healing Process and New Emerging Technologies for Skin Wound Care and Regeneration. *Pharmaceutics*, 2020, 10.3390/pharmaceutics12080735

Tsou Y. H., Khoneisser J., Huang P. C., & Xu, X. Hydrogel as a bioactive material to regulate stem cell fate. *Bioactive materials*, 2016. Vol. *1*(1), p. 39–55. https://doi.org/10.1016/j.bioactmat.2016.05.001

Tzaneva V., Mladenova I., Todorova G. e Petkov D. Antibiotic treatment and resistance in chronic wounds of vascular origin, *Clujul Med.*, 2019. Doi: 10.15386/cjmed-647

Valuckaite V., Zaborina O., Long J., Hauer-Jensen M., Wang J., Holbrook C., Zaborin A., Drabik K., Katdare M., Mauceri H., Weichselbaum R., Firestone, M. A., Lee, K. Y., Chang, E. B., Matthews, J., & Alverdy, J. C. Oral PEG 15-20 protects the intestine against radiation: role of lipid rafts. *American journal of physiology. Gastrointestinal and liver physiology*, 2009. Vol. 297(6), p. G1041–G1052. https://doi.org/10.1152/ajpgi.00328.2009

Vasile C., Pamfil D., Stoleru E., e Baican M. New Developments in Medical Applications of Hybrid Hydrogels Containing Natural Polymers. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 2020. Vol. 25(7), p. 1539. https://doi.org/10.3390/molecules25071539

Wang, J., Windbergs, M. Functional electrospun fibers for the treatment of human skin wounds. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 2017, http://dx.doi.org/10.1016/j.ejpb.2017.07.001

Wiegande I., Hilpert K. e Hncock R.E.W. Agar and broth dilution methods to determine the minimal inhibitory concentration (MIC) of antimicrobial substances. *Nat Protoc*. 2008, Vol. 3(2) p.163-75. doi: 10.1038/nprot.2007.521

Xu W., Ma J. e Jabbari E., Material properties and osteogenic differentiation of marrow stromal cells on fiber-reinforced laminated hydrogel nanocomposites, *Acta Biomaterialia*. 2010, Vol. 6 (6), p 1992-2002. https://doi.org/10.1016/j.actbio.2009.12.003

Zarrintaj P., Saeb M.R., Jafari S.H. e Mozafari M. Chapter 18 - Application of compatibilized polymer blends in biomedical fields, *Compatibilization of Polymer Blends*. 2020, p. 511-537. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-816006-0.00018-9

Anexos

Anexo A) Dados complementares à análise FTIR

A Tabela A-1 apresenta as ligações estabelecidas entre compostos e os respetivos comprimentos de onda. Através destes dados é possível interpretar mais facilmente os picos evidenciados nos espectros de ATR-FTIR (Figura 12) e, consequentemente, comprovar a presença dos polímeros e agentes nos controlos e sistema sanduiche.

Tabela 7: Análise dos comprimentos de onda dos espectros de ATR-FTIR e ligações químicas inerentes (adaptada de LibreTexts)

Comprimento de onda (cm^{-1})	**Ligação**	**Grupo funcional**
3500–3200 (s, b)	Extensão O–H	Álcoois com ligação-H, fenóis
3300–2500 (m)	Extensão O–H	Ácidos carboxilos
3000–2850 (m)	Extensão C–H	alcanos
1760–1665 (s)	Extensão C=O	carbonilos (geral)
1760–1690 (s)	Extensão C=O	Ácidos carboxilos
1740–1720 (s)	Extensão C=O	Aldeídos, alifáticos saturados
1730–1715 (s)	Extensão C=O	Ésteres α, β–insaturados
1600–1585 (m)	Extensão C–C	Aromáticos(no-anel)
1500–1400 (m)	Extensão C–C	Aromáticos (no–anel)
1320–1000 (s)	Extensão C–O	álcoois, ácidos carboxilos, ésteres, éteres
1300–1150 (m)	C–H wag (–CH2X)	Halogenetos de alquilo
1210–1163 (s)	Extensão C–O	Ésteres
1210–1124 (s)	Extensão C–O	Álcool terciário
1085–1050 (s)	Extensão C–O	Álcool primário

m-médio; s-forte; w-fraco; n-pequeno; b-grande; sh-acentuado.

Pelo FTIR também foram analisadas as amostras PCL+SA+PCL/PEG e PCL+SA/Amp+PCL/PEG pelos dois lados (Figura A-1) para perceber se existem diferença na deteção dos picos característicos.

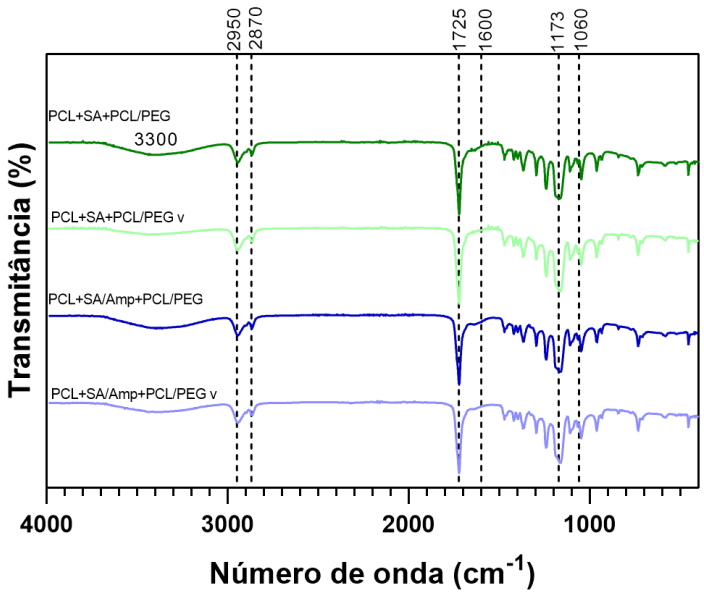


Figura 19: Espectros ATR-FTIR dos sistemas sanduíche de PCL+SA+PCL/PEG, PCL+SA+PCL/PEG virado (v), PCL+SA/Amp+PCL/PEG e PCL+SA/Amp+PCL/PEG v.

É possível observar que não há diferenças significativas entre as amostras, detetando-se os mesmos picos observados na secção 5.4.2.

Anexo B) Testes de adesão com a pele de porco

Os testes de adesão foram conduzidos com papel cavalinho e em paralelo, avaliações com a pele de porco foram realizadas. Para estes testes foi seguido o procedimento descrito por Gao et al., 2019 e Cagnetta et al., 2023. As amostras foram posicionadas entre duas tiras de pele de porco (Figura A-2a) (8 cm de largura por 8 cm de comprimento) e um peso de 500 g foi colocado sobre as amostras (Figura A-2b), para impulsionar o contacto íntimo e assegurar a ligação com a pele, por 10 min (mais tempo pela pele ser mais grossa).

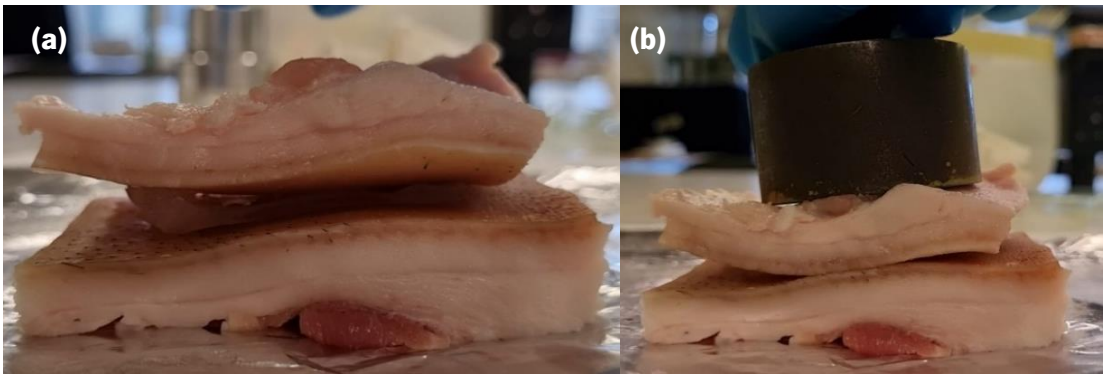


Figura 20: (a) amostra entre duas tiras de pele de porco; (b) peso sobre a amostra entre as tiras de pele de porco.

Passado os 10 min com o peso, observado observou-se que, contrariamente ao papel, com a pele de porco a amostra, quer da sanduíche quer do hidrogel, só mostravam adesão a uma das superfícies, destacando-se facilmente da outra (Figura A-3a, A3-b e A-3c).

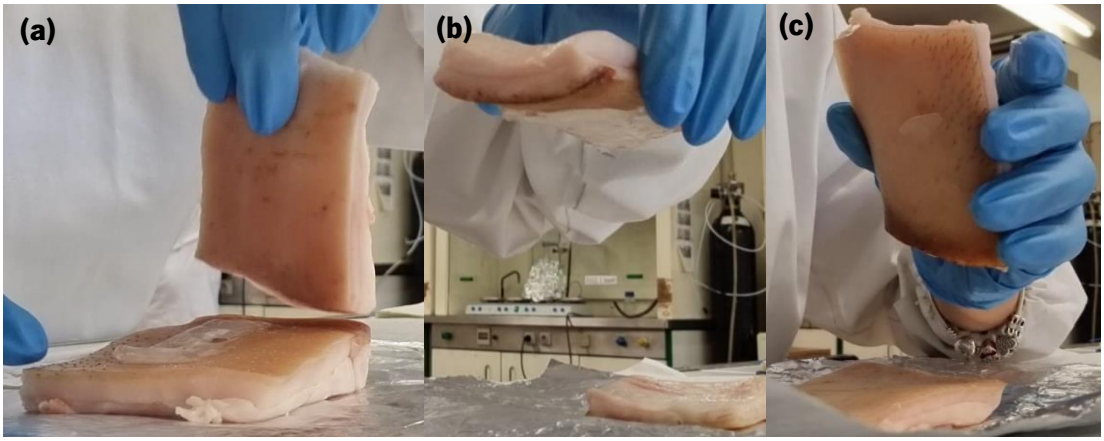


Figura 21: amostras após 10 min com peso entre a pele de porco (a) amostra do sistema sanduíche sem adesão à pele; (b) amostra do sistema sanduích com adesão a uma das peles; (c) amostra de hidrogel com adesão à pele superior.

Por outro lado, a amostra mostrou adesão a duas tiras de papel/cartão (Figura A-4a) e assim foi possível fazer a medição da força de adesão das amostras (Figura A-4b).

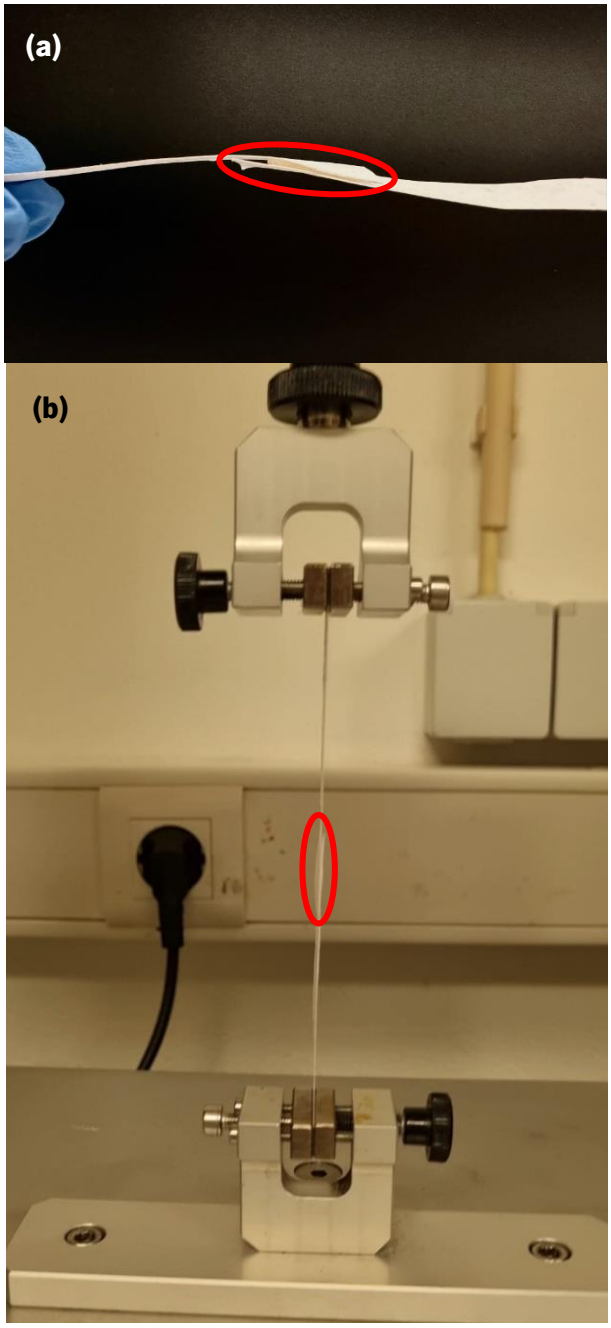


Figura 22: (a) amostra com aderência a duas tiras de papel cavalinho; (b) ensaio de adesão no texturómetro. Destacado a vermelho o local onde se encontra a amostra.

Anexo C) Determinação da equação para a analise da libertação da ampicilina

A curva de calibração da Amp foi obtida a um comprimento de onda de 200 nm. O antibiótico foi dissolvido em PBS a várias concentrações (1,0 e 12,5 µg/mL) e a absorbância foi medida, resultando na curva de calibração da Figura A-5. A Equação 3 que relaciona concentração de Amp com a absorbância foi obtida através da reta de tendência discriminada na Figura A-5.

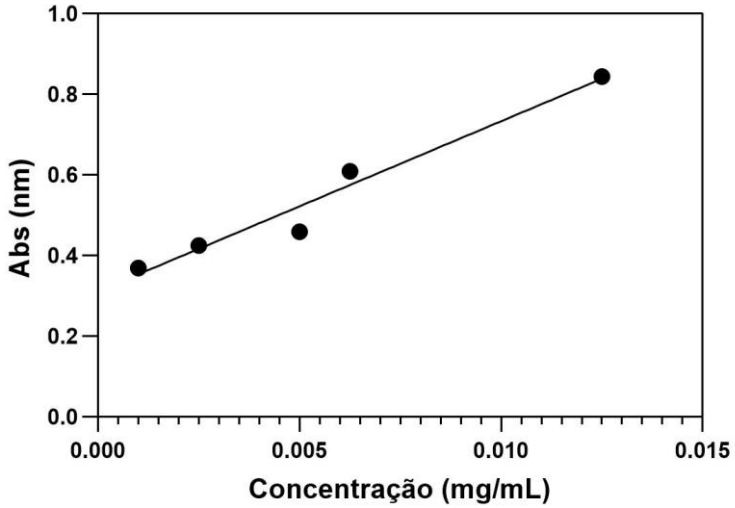


Figura 23: Curva de calibração de Amp.

$$Abs = 42{,}205 \times Concentração + 0{,}3108 \qquad \text{Equação 3}$$