



CATÓLICA
ESCOLA SUPERIOR DE BIOTECNOLOGIA

PORTO

TÊXTIL PARA APLICAÇÃO MÉDICA – O IMPACTO DA ORIGEM DOS
MATERIAIS NA CITOCOMPATIBILIDADE COM CÉLULAS HUMANAS

Por

Nuno Fernando Matos Sousa Fernandes

Outubro 2023



CATÓLICA
ESCOLA SUPERIOR DE BIOTECNOLOGIA

PORTO

TÊXTIL PARA APLICAÇÃO MÉDICA – O IMPACTO DA ORIGEM DOS
MATERIAIS NA CITOCOMPATIBILIDADE COM CÉLULAS HUMANAS

Relatório de Estágio apresentado à Escola Superior de Biotecnologia da Universidade
Católica Portuguesa para obtenção do grau de Mestre em Engenharia Biomédica

Por

Nuno Fernando Matos Sousa Fernandes

Supervisão

Orientadora (empresa): Doutora Maria Sousa

Co-orientador (empresa): Raphaël Canadas

Co-orientadora (Universidade Católica Portuguesa, ESB): Doutora Viviana Ribeiro

Outubro 2023

Este trabalho é dedicado à minha família – pelo amor, paciência e suporte.

*"If you set your goals ridiculously high and it's a failure, you will fail above everyone
else's success."*

James Cameron.

"You'll never achieve real success unless you like what you're doing."

Dale Carnegie.

Resumo

Atualmente, milhares de cirurgias são realizadas diariamente e, embora os avanços da ciência e tecnologia tenham permitido uma melhoria na qualidade da cirurgia e na recuperação dos doentes, os erros médicos continuam a ser um fator crítico que deve ser tido em consideração. Um dos erros médicos mais comuns e que pode ter consequências prejudiciais na vida de um doente é a retenção de materiais cirúrgicos, por exemplo gazes, no interior do corpo. Desta forma, este trabalho tem como objetivo explorar uma solução para esta problemática, com base na avaliação do impacto da impregnação de gazes com soluções bioativas. Para tal, foram testados dois tipos de gaze, nomeadamente tecido (T) e tecido não tecido (TNT), que foram posteriormente impregnadas com diferentes compostos bioativos, mais concretamente, quitosano e NaturALL, uma alternativa aos químicos convencionais desenvolvida pela start-up biotecnológica Tech4MED. Neste âmbito foram realizados ensaio de contacto direto e de lixiviados, antes e após submissão das gazes a um processo de envelhecimento. Para este estudo foram utilizadas duas linhagens celulares, nomeadamente, fibroblastos (BJ), células comumente encontradas na pele, e células do cólon (HCT-15). Deste modo, o objetivo desta tese é analisar a citotoxicidade de diferentes gazes com linhas celulares representativas de órgãos específicos, como são os casos da pele e do intestino, tendo em conta o meio em que estarão inseridos, tanto em situação controlo (meio basal neutro, pH=7.21) como em situação de inflamação aguda ou mesmo crónica (meio ácido, pH=6.04). Desta forma, antes da submissão ao processo de envelhecimento acelerado, verificou-se como a impregnação com NaturALL e com quitosano resultavam num aumento de viabilidade celular face ao controlo, sendo em determinadas condições superior a 70%, tendo sido desta forma obtida uma gaze biocompatível. Em particular, após submissão ao processo de envelhecimento tanto nos ensaios de contacto direto como nos ensaios de lixiviados a solução de NaturALL permitiu a obtenção de resultados promissores. Particularmente na situação de inflamação crónica por contato direto, o NaturALL resultou num aumento da viabilidade celular acima do valor aceitável para que um produto médico seja considerado citocompatível, 70 % de viabilidade celular. Desta forma, foi colocada a hipótese de o NaturALL ser um aditivo com a capacidade de melhorar a interação entre material e células, nomeadamente na capacidade proliferativa das células. Isto foi verificado tanto para a linhagem celular BJ como HCT-15. Em suma, conclui-se que a impregnação de gazes tanto de tecido como de tecido não tecido (compressas) com NaturALL permite a obtenção de um têxtil médico com maior biocompatibilidade. Apesar desta solução não evitar o esquecimento de objetos cirúrgicos no interior do corpo humano, os resultados obtidos no âmbito deste projeto de tese apresentam relevância. Neste projeto, foi desenvolvida uma alternativa às gazes tradicionais com o intuito de diminuir as eventuais consequências do esquecimento de uma gaze no interior do corpo humano.

Palavra-chave: citocompatibilidade; envelhecimento acelerado; gaze; NaturALL

Abstract

Nowadays, thousands of surgeries are performed daily and, although advances in science and technology have led to an improvement in the quality of surgery and patient recovery, medical errors remain a critical factor that must be taken into account. One of the most common medical errors that can have damaging consequences for a patient's life is the retention of surgical materials, such as gauze, inside the patient's body. The aim of the following work is to explore a solution to this problem, based on the evaluation of the impact of impregnating gauze with bioactive solutions. To this end, two types of gauze were tested, namely woven (W) and non-woven (NW), which were then impregnated with different bioactive compounds, specifically chitosan and NaturALL, an alternative to conventional chemicals developed by the biotechnology start-up Tech4MED. In this context, direct contact and leachate tests were carried out before and after subjecting the gauzes to an ageing process. For this study, two cell lines were used, namely fibroblasts (BJ), cells commonly found in the skin and other body parts, and colon cells (HCT-15). Thus, the aim of this thesis is to evaluate the cytotoxicity level of different gauzes and impregnation techniques on representative cell lines, considering the environment in which they will be inserted, both in a control situation (basal neutral environment, pH=7.21) and in a situation of acute and chronic inflammation (acidic environment, pH=6.04). Hereby, before being subjected to the ageing process, it was verified that impregnation with NaturALL and chitosan resulted in an increase in cell viability compared to the control, higher than 70 % under certain conditions, thus obtaining a biocompatible gauze. After being subjected to the ageing process in both the direct contact and leachate tests, the NaturALL solution produced promising results. Particularly in the case of chronic inflammation (direct contact), NaturALL resulted in an increase in cell viability above the acceptable value for a medical product to be characterized as cytocompatible, namely 70 % cell viability. NaturALL addition was therefore hypothesised to have the capacity to improve the interaction between material and cell proliferation. This capacity was verified for both the BJ and HCT-15 cell lines. In short, it can be concluded that the impregnation of woven and non-woven gauze (compresses) with NaturALL results in the production of a biocompatible medical textile. Although this does not eliminate the occurrence of retained surgical objects inside the human body, the produced results in this thesis project can be relevant. In this way, an alternative to traditional gauze was developed with the aim of reducing the possible consequences of retaining a gauze inside the human body.

Keywords: accelerated aging; cytocompatibility; gauze; NaturALL

Agradecimentos

Em primeiro lugar gostaria de agradecer à Tech4MED por me ter aceitado neste estágio e, de forma mais direta à Doutora Maria Sousa, minha orientadora, e Doutor Raphaël Canadas, co-orientador, pela oportunidade de realizar um estudo que realmente pode vir a fazer a diferença no mundo médico, pela ajuda, inserção e orientação neste que pode vir a ser o meu mundo de trabalho e pela partilha do seu conhecimento.

À Doutora Viviana Ribeiro e Doutor João Costa orientadores internos na faculdade, que me auxiliaram e propuseram as melhores condições possíveis para que num momento de aperto, o trabalho e eu mesmo seguissemos os melhores caminhos.

À Tuna da Universidade Católica Portuguesa – Porto e à família que criei dentro dela um grande obrigado, estes que sempre me puseram um sorriso na cara e me deram forças para continuar o trabalho que tinha de ser feito independentemente do esforço que tinha de ser feito.

Aos meus amigos, estes que me acompanham de tenra idade, e que me moldaram na boa pessoa que sou hoje.

À linda e carinhosa Rita, esta que por muitas vezes teve a vontade de perder a paciência comigo, mas ao invés disso apenas lutou a meu lado e me ajudou quando eu mais necessitava, mas acima de tudo me corrigia e fez o papel de melhor pilar do mundo.

Aos meus pais, irmã e avó que sempre acreditaram em mim, mesmo quando eu nunca o fiz, e me incentivaram a seguir os meus sonhos e não ter medo de errar no processo. Sempre foram a mão amiga que me levantou e a mão amiga que me empurrou no caminho correto.

Obrigado por acreditarem em mim e no meu verdadeiro potencial.

Lista de abreviaturas

AAF – Fator de Envelhecimento Acelerado
AAT – Tempo de Envelhecimento Acelerado
ASTM – American Society for Testing Materials
ATB – Antibiótico
ATCC – American Type Culture Collection
BJ – Fibroblastos Dérmicos Humanos
CHT – Quitosano
DMEM – Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DP – Desvio Padrão
EDTA – Ácido etilenodiamino tetra-acético
EUA – Estados Unidos da América
FBS – Soro fetal bovino
ISO – International Organization for Standardization
L – Litro
mg – Miligrama
mL – Mililitro
NAT – NaturALL
nm – nanómetro
Q₁₀ – taxa da reação química
ROS – Espécies de oxigénio reativas
RPMI – Rosewell Park Memorial Institute
RT – Tempo de prateleira
T – Tecido
T_{AA} – Temperatura de Envelhecimento Acelerado
TNT – Tecido não tecido
T_{RT} – Temperatura ambiente
UV – ultravioleta
V_f – Volume final
V_i – Volume inicial
V_t – Volume total
μL – microlitro

Índice

Resumo	VI
Abstract.....	VIII
Agradecimentos	X
Lista de abreviaturas	XII
Índice de Figuras	XVII
Índice de Tabelas	XX
Índice de equações.....	XXI
1. Introdução	1
1.1. Descrição do problema	1
1.2. Estado da arte: A importância da indústria têxtil na área biomédica.....	5
1.3. Materiais têxteis médicos	7
1.3.1. Propriedades dos materiais têxteis.....	7
1.3.2. Constituintes dos materiais têxteis	8
1.3.2.1. Fibras sintéticas versus fibras naturais	10
1.3.3. Materiais têxteis médicos: Gazes cirúrgicas.....	12
1.3.4. Avaliação da citotoxicidade e citocompatibilidade de um material têxtil médico.....	16
1.3.4.1. Linhagens celular utilizadas para avaliação de citocompatibilidade e citotoxicidade.....	17
1.3.5. Estratégias para aumentar a funcionalidade de materiais médicos.....	18
1.3.5.1. Aditivos têxteis antimicrobianos	19
1.4. Tech4MED: empresa que identificou o problema e que acolheu o projeto.....	21
1.5. Objetivos do trabalho	22
2. Materiais e Métodos	25
2.1. Linhas celulares e condições de crescimento	25

2.1.1.	Crescimento de fibroblastos dérmicos humanos normais (BJ)	25
2.1.2.	Crescimento de HCT-15	25
2.2.	Tratamento das gazes.....	26
2.2.1.	Imersão das gazes nas diferentes soluções	27
2.3.	Simulação da Condição controlo (meio de cultura basal)	27
2.4.	Simulação da Condição Inflamatória Aguda	27
2.5.	Ensaio de contacto direto.....	28
2.5.1.	Exposição prolongada durante 5 dias	31
2.6.	Simulação do envelhecimento das gazes em condição normal e em condição de inflamação crónica: Ensaio de envelhecimento acelerado	31
2.7.	Ensaio de lixiviados.....	33
2.8.	Análise Estatística	33
3.	Resultado e Discussão	35
3.1.	Escolha das linhagens celulares.....	35
3.2.	Quantificação da capacidade de absorção das gazes	35
3.3.	Ensaio Celular de Contacto Direto	37
3.3.1	Simulação da condição controlo em meio basal com linhagem BJ.....	38
3.3.2	Simulação condição de inflamação aguda com linhagem BJ.....	42
3.3.3	Simulação da condição saudável com linhagem BJ após 5 dias de exposição.....	45
3.3.4	Simulação condição de inflamação aguda com linhagem BJ após 5 dias de exposição.....	47
3.4.	Envelhecimento	49
3.4.1.	Ensaio de contacto direto.....	49
3.4.1.1.	Simulação da condição saudável (condição controlo com meio basal) com linhagem BJ	49
3.4.1.2.	Simulação da condição de inflamação crónica com linhagem BJ.....	52
3.4.2.	Ensaio lixiviados	54

3.4.2.1.	Simulação da condição saudável com linhagem BJ	55
3.4.2.2.	Simulação da condição de inflamação crónica com linhagem BJ.....	57
3.4.2.3.	Simulação da condição saudável (condição controlo com meio basal) com linhagem HCT-15	60
3.4.2.4.	Simulação da condição de inflamação crónica com linhagem HCT-15	62
4.	Conclusões e Trabalhos Futuros	64
	Referências	67

Índice de Figuras

Figura 1. 1 Processo de Transformação de um material têxtil médico (Qin, 2016a)	9
Figura 1. 2 Aplicabilidade das gazes cirúrgicas.	13
Figura 1. 3 - Propriedades de uma gaze cirúrgica	14
Figura 1. 4 Tech4MED – For Human Care logotipo.	21
Figura 2. 1 - Esquema de condições a testar.....	26
Figura 2. 2 - Goblé contendo a solução NaturAll.....	27
Figura 2. 3 - Esquema representativo da disposição das amostras na placa de 48 poços	28
Figura 2. 4 - Esquema representativo da disposição das amostras na placa de 96 poços	30
Figura 2. 5 - Correlação entre tempo e temperatura no envelhecimento acelerado (MiCom Laboratórios, 2023).....	32
Figura 2. 6 – Tubos de Falcon com as condições a testar (meio ácido e meio neutro) ..	33
Figura 3. 1 - Imagem de microscopia das gazes em estudo. A) Gaze de tecido com ampliação 4x; B) Gaze de tecido com ampliação 10x; C) Gaze não tecido com ampliação 4x; D) Gaze não tecido com ampliação 10x.....	37
Figura 3. 2 - Viabilidade celular (em %) da linhagem BJ num ensaio de contacto (2 ensaios com 3 réplicas cada) direto simulando a condição saudável.	38
Figura 3. 3 - Imagens de microscopia das gazes testadas. A) Controlo Negativo (condição padronizada que não resulta numa resposta citotóxica); B) TNT impregnada em água; C) TNT impregnada em quitosano; D) TNT impregnada em NaturALL; E) T impregnada em água; F) T impregnada em quitosano; G) T impregnado em NaturALL. Todas as imagens partilham a mesma escala (200µm) e ampliação(10x).	41
Figura 3. 4 - Viabilidade celular (em %) da linha BJ num ensaio de contacto direto simulando a condição de inflamação crónica	42
Figura 3. 5 - Imagens de microscopia das gazes testadas, numa condição inflamatória aguda (pH=6). A) Controlo Negativo; B) TNT impregnada em água; C) TNT impregnada em quitosano; D) TNT impregnada em NaturALL; E) T impregnada em água; F) T impregnada em quitosano; G) T impregnado em NaturALL. Todas as imagens partilham a mesma escala (200µm) e ampliação(10x).	44

Figura 3. 6 - Viabilidade celular (em %) da linhagem BJ num ensaio de contacto direto (1 ensaio com 3 réplicas para cada condição), simulando a condição saudável após 5 dias. Diferenças estatísticas assinaladas com * ($p < 0.05$).	45
Figura 3. 7 - Viabilidade celular (em %) da linhagem BJ num ensaio de contacto direto (1 ensaio com 3 réplicas por cada condição), simulando a condição de inflamação crónica após 5 dias. Diferenças estatísticas assinaladas com * ($p < 0.05$).	48
Figura 3. 8 - Viabilidade celular (em %) da linhagem BJ num ensaio de contacto direto (2 ensaios com 3 réplicas para cada condição), simulando a condição saudável após envelhecimento. Diferenças estatísticas assinaladas com * ($p < 0.05$).	50
Figura 3. 9 - Imagens de microscopia das gazes testadas, numa condição inflamatória aguda (pH=6). A) Controlo Negativo; B) TNT impregnada em água; C) TNT impregnada em quitosano; D) TNT impregnada em NaturALL; E) T impregnada em água; F) T impregnada em quitosano; G) T impregnado em NaturALL. Todas as imagens partilham a mesma escala (200µm) e ampliação(10x).	52
Figura 3. 10 - Viabilidade celular (em %) da linhagem BJ num ensaio de contacto (2 ensaios com 3 réplicas cada) direto simulando a condição inflamação crónica após envelhecimento.	53
Figura 3. 11 - Imagens de microscopia das gazes testadas, numa condição inflamatória aguda (pH=6). A) Controlo Negativo; B) TNT impregnada em água; C) TNT impregnada em quitosano; D) TNT impregnada em NaturALL; E) T impregnada em água; F) T impregnada em quitosano; G) T impregnado em NaturALL. Todas as imagens partilham a mesma escala (200µm) e ampliação(10x).	54
Figura 3. 12 - Viabilidade celular (em %) da linhagem BJ num ensaio de lixiviados (3 ensaios com 3 réplicas para cada condição) simulando a condição saudável após envelhecimento.	55
Figura 3. 13 - Imagens de microscopia das gazes testadas, numa condição inflamatória aguda (pH=6). A) Controlo Negativo; B) TNT impregnada em água; C) TNT impregnada em quitosano; D) TNT impregnada em NaturALL; E) T impregnada em água; F) T impregnada em quitosano; G) T impregnado em NaturALL. Todas as imagens partilham a mesma escala (200µm) e ampliação(10x).	57
Figura 3. 14 - Viabilidade celular (em %) da linhagem BJ num ensaio de lixiviados (2 ensaios com 3 réplicas cada) simulando a condição de inflamação crónica após envelhecimento.	58

Figura 3. 15 - Imagens de microscopia das gazes testadas, numa condição inflamatória aguda (pH=6). A) Controlo Negativo; B) TNT impregnada em água; C) TNT impregnada em quitosano; D) TNT impregnada em NaturALL; E) T impregnada em água; F) T impregnada em quitosano; G) T impregnado em NaturALL. Todas as imagens partilham a mesma escala (200µm) e ampliação(10x).	59
Figura 3. 16 - Viabilidade celular (em %) da linhagem HCT-15 num ensaio de lixiviados (2 ensaios com 3 réplicas cada) simulando a condição saudável após envelhecimento. 60	
Figura 3. 17 - Viabilidade celular (em %) da linhagem HCT-15 num ensaio de lixiviados (2 ensaios com 3 réplicas cada) simulando a condição de inflamação aguda após envelhecimento.....	62

Índice de Tabelas

Tabela 1. 1 Caso de Estudo sobre materiais cirúrgicos retidos entre 2014 e 2020.....	1
Tabela 1. 2 Categorias de têxteis médicos	6
Tabela 1. 3 Constituintes dos materiais têxteis médicos (Bartels et al., 2011).....	10
Tabela 1. 4 Vantagens e desvantagens dos diferentes tipos de fibra.....	12
Tabela 2. 1 – Condições de utilização para o ensaio de AlamarBlue®	29
Tabela 3.1 – Capacidade de absorção das gases tecido não tecido de diferentes soluções água destilada, quitosano, NaturALL	36
Tabela 3. 2 - Capacidade de absorção das gases tecido de diferentes soluções água destilada, quitosano, NaturALL	36

Índice de equações

Equação 1 – Cálculo da viabilidade celular em percentagem	30
Equação 2 - Fórmula para cálculo do envelhecimento acelerado	32
Equação 3 - Fórmula para o cálculo do tempo de envelhecimento acelerado.....	32

1. Introdução

1.1. Descrição do problema

O esquecimento de gases cirúrgicas no interior do corpo de um doente é um cenário mais recorrente do que o imaginado, sendo registado em pelo menos cada 1 de 5500 cirurgias que ocorrem em unidades de saúde nos Estados Unidos da América. Naturalmente, cirurgias classificadas como mais complicadas, prolongadas ou de emergência têm maior probabilidade de resultar num esquecimento da remoção destes materiais por parte da equipa médica (Susmallian et al., 2016). Apesar de se poder estender a outro tipo de objetos, a retenção de corpos estranhos no interior de cavidades intracorporais é muitas vezes definida como textiloma, já que estes são maioritariamente compressas, gases e outros materiais têxteis relacionados. Particularmente, avaliando a incidência de retenção de objetos cirúrgicos por localização anatómica, observa-se que a taxa mais elevada deste erro médico ocorre na cirurgia abdominal (Steelman et al., 2018). A título de exemplo, a incidência de textilomas em cirurgias abdominais é estimada entre 1/1000 a 1/1500 cirurgias. Como consequência, a ocorrência da retenção de objetos cirúrgicos no corpo humano pode resultar numa reentrada no bloco operatório ou num prolongamento da estadia hospitalar, e, em caso de esquecimento mais prolongado, em obstrução intestinal, perfuração visceral, infeção ou mesmo septicémia, podendo em casos de maior risco resultar na morte (Gawande et al., 2003; Lincourt et al., 2007).

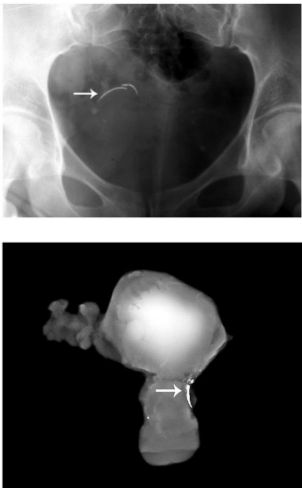
A retenção de objetos cirúrgicos pode ser classificada de acordo com variados fatores incluindo tipo de instrumento e localização anatómica. No caso particular das gases cirúrgicas, estas representam os objetos mais comumente retidos no corpo humano, seguido por agulhas, fórceps e retratores (instrumentos cirúrgicos metálicos) (Steelman et al., 2018). Dentro da classe gases cirúrgicas, observou-se ainda que 52.2% dos casos em estudo se tratava de gases de algodão/ gases de laparotomia, 34.0% gases com tamanho padrão e 6.9% toalhas cirúrgicas (Cima et al., 2008; Steelman et al., 2018).

Quando o objeto retido no corpo é feito de algodão, nomeadamente as gases de algodão, o textiloma também pode ser denominado como *gossipiboma* (Kucukyuruk et al., 2010; Williams et al., 1978). A palavra *gossipiboma* deriva de "gossypium", que em latim significa algodão, e "boma", que em Suaili significa uma massa escondida após a cirurgia (Alsuhaime et al., 2023; Susmallian et al., 2016). Textilomas e *gossipibomas* estão

relacionados e apesar de poderem passar despercebidos durante anos, a sua existência pode ser letal para o ser humano.

No entanto, apesar dos alertas que têm vindo a surgir, o número destas ocorrências tem vindo a aumentar, como reporta um artigo do The Guardian. Neste artigo é reportado que em Inglaterra foi registado um recorde de 291 casos relativos ao esquecimento de objetos cirúrgicos no interior do corpo dos doentes entre 2021 e 2022. O artigo enfatiza que este número tem vindo a crescer gradualmente desde 2003 e 2004, quando se verificaram 138 fenómenos, estimando-se a duplicação do número de casos num espaço de 20 anos (Gregory, 2023). Assim, com o número de casos de esquecimento de objetos cirúrgicos em crescimento ao longo das duas últimas décadas, diferentes relatórios têm vindo a público, evidenciando a importância de tornar este tema um alvo de estudo, abordando questões como dados do doente, manifestações clínicas e consequências da má-prática em questão, como demonstrado na Tabela 1.1.

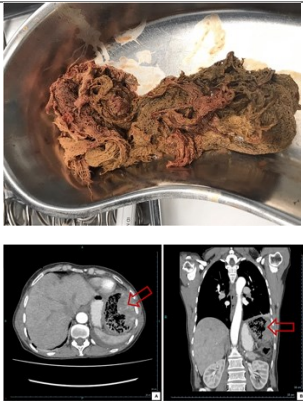
Tabela 1. 1 Caso de Estudo sobre materiais cirúrgicos retidos entre 2014 e 2020

Ano	Dados do doente	Manifestações	Consequências	Ilustração (se aplicável)	Referência
2014	Mulher de 43 anos, submetida a duas cesarianas em 1991 e 1995 e outras laparotomias.	A doente foi submetida a uma ressonância magnética devido a dores abdominais contínuas. Posteriormente, foi admitida no Departamento de Ginecologia devido a inflamação pélvica recorrente e a uma suspeita de agulha cirúrgica retida na zona pélvica.	No pós-operatório, a doente desenvolveu uma trombose venosa na veia ilíaca externa e comum esquerda, uma vez que apenas uma agulha de duas tinha sido removida. Somente após duas intervenções cirúrgicas (2015 e 2016) é que removeu os objetos retidos, nomeadamente, as agulhas e uma gaze.		Gavrić Lovrec et al., 2018

2014 Mulher de 30 anos, Foi submetida a uma laparotomia submetida a uma urgências devido a uma dor exploradora por suspeita de esterilização abdominal progressiva. A obstrução adesiva do intestino laparoscópica há 7 dor foi descrita como delgado. Durante a cirurgia, foi anos e a uma cólica, com duração de retirada uma esponja cirúrgica recanalização há um cerca de 4-5 minutos e 2-3 intraluminal do intestino delgado ano. episódios/dia, parcialmente distal. aliviada por analgésicos. Vários episódios de vômitos graves acompanhados de obstipação durante o mesmo período.



Patial et al.,
2018

2019	Mulher de 65 anos, autónoma, com adenocarcinoma mucocelular gástrico operada em 1999 e posteriormente submetida a quimioterapia	Admitida no serviço de urgência com um historial de dor intensa e edema do membro inferior direito. Apresentava sintomas de anorexia, perda de peso suores noturnos, febre e dores abdominais.	O doente apresentava uma infeção localizada, onde se encontrava a gaze esquecida da cirurgia que fez há mais de 20 anos. Doente submetida a ressecção cirúrgica com colectomia segmentar e tratada com antibióticos.		Nabais et al., 2022
------	---	--	---	---	---------------------

2019 Homem de 87 anos, Uma semana após a fusão, O doente teve de ser submetido a
apresentou um alto o doente reportou dor, cirurgia, sendo que o exame
na anca do lado hemorragia e drenagem anatomopatológico revelou tecido
direito que aumentara purulenta do local do mole em reação de corpo estranho
nos últimos 3 meses. enxerto. Foi tratado com e hemorragia, bem como pedaços
Face ao historial antibióticos em de material de esponja com fios
médico verifica-se ambulatório e permaneceu radiopacos amarelos.
que foi submetido a assintomático até notar
uma cirurgia de fusão uma massa na anca.
das vértebras
cervicais C3 e C4,
aproximadamente 45
anos antes, durante a
qual foi colhido um
enxerto ósseo da
crista ilíaca direita.



Koek, 2020

2020	Uma mulher de 30 anos, sem antecedentes médicos, foi submetida a uma cesariana há 2 meses.	A doente apresentou-se no serviço de urgência com queixas de dores abdominais contínuas na região umbilical que já faziam 2 dias.	Foi realizada adesiólise para remoção do granuloma, com ressecção e anastomose de um pequeno segmento do íleo. O conteúdo do granuloma era uma grande toalha cirúrgica abdominal proveniente de cirurgia prévia do doente.		Alsuhaimi et al., 2023
------	--	---	--	---	------------------------

Analisada a panóplia de exemplos apresentados e sabendo que a probabilidade de eliminar estes erros clínicos é escassa, é necessário encontrar alternativas para diminuir a seriedade das consequências que advêm da retenção de um objeto cirúrgico, nomeadamente das gazes cirúrgicas. Uma solução para este problema terá como base a melhoria das características dos materiais cirúrgicos para que as reações adversas sejam minimizadas e menos agressivas.

As gazes cirúrgicas podem ser constituídas por materiais de origem petroquímica (por ex. poliéster) ou naturais (por ex. algodão). Por serem as que maior número de eventos de esquecimento intracorporal registam globalmente, foi o caso de estudo selecionado. Assim, no âmbito deste projeto de mestrado estudar-se-á a toxicidade para células humanas, após contacto com gazes de diferentes tipos, usualmente aplicadas em ambiente cirúrgico. Simultaneamente, serão testados acabamentos (revestimentos) têxteis nas gazes em estudos com biomateriais, e investigados os seus efeitos na citotoxicidade resultante do contacto com as células humanas. Pretende-se assim perceber se é possível minimizar o impacto citotóxico resultante do esquecimento das gazes cirúrgicas dentro do corpo humano.

1.2. Estado da arte: A importância da indústria têxtil na área biomédica

A indústria têxtil desempenha um papel de extrema importância em diversas áreas e contextos, tanto sociais como económicos, com a produção de produtos têxteis para utilização não só no quotidiano como em situações de cariz profissional, desportivo e até médico, nomeadamente no fornecimento de equipamentos como, por exemplo, materiais implantáveis, produtos de higiene e de cuidados de saúde, ou materiais não implantáveis (Tabela 1.2) (Qin, 2016).

Os têxteis médicos constituem uma interface entre as disciplinas técnicas e as ciências da vida. Por um lado, o aspeto técnico abrange áreas como engenharia têxtil, a química dos materiais, o controlo dos processos, os ensaios e a certificação, sendo estas essenciais para a produção de têxteis médicos de elevada qualidade. Por outro lado, os têxteis médicos comprometem também as ciências da vida, nomeadamente a medicina e a

microbiologia, que são cruciais para desenvolvimento e melhoria da funcionalidade destes produtos (Qin, 2016).

Por têxteis médicos entende-se produtos e/ou estruturas à base de fibras utilizados no campo da biomédica, sendo que tem como fim tanto o tratamento de uma lesão, como a oferta de condições adequadas para o tratamento clínico de uma ferida e/ou doença. Existe uma grande oferta de têxteis médicos, sendo que estes abrangem desde produtos descartáveis de grande volume, como por exemplo fraldas de bebé, higiene feminina e incontinência de adultos, até produtos têxteis extremamente especializados e de elevado valor, que podem ser aplicados na filtragem de sangue, suturas cirúrgicas, próteses e, mais recentemente, scaffolds para o crescimento de novos tecidos biológicos (Qin, 2016). Os materiais à base de têxteis são utilizados numa variedade de aplicações médicas, incluindo batas cirúrgicas de proteção, produtos de higiene (como pensos higiénicos e fraldas para bebés), tecidos de compressão, pensos de compressão para feridas, pensos para feridas, suturas, dispositivos extracorporais e materiais próstéticos (ver Tabela 1.2).

Tabela 1. 2 Categorias de têxteis médicos

Categoria	Produto	Tipo de fibra
Produtos de cuidados de saúde e higiene	Bata cirúrgica	Algodão, poliéster, polipropileno
	Toalhetes	Raiom viscose
	Máscaras	Raiom viscose, vidro, poliéster
Produtos implantáveis	Suturas	Colagénio, poliéster, polipropileno, poliamida
	Implantes ortopédicos	Silicone, polietileno, cerâmica, carbono
	Implantes vasculares	Poliéster, Politetrafluoroetileno
Produtos não implantáveis	Pensos simples e elásticos	Algodão, viscose, poliamida, fibra elastomérica
	Gesso	Viscose, poliéster, polipropileno

	Gaze	Algodão, viscose, polipropileno, poliéster
--	------	--

Em suma, a indústria têxtil médica é essencial para o cuidado e bem-estar do doente durante o tratamento de qualquer tipo de patologia e/ou questão médica, sendo também essencial no quotidiano do ser humano para questões mais mundanas. A indústria têxtil caracteriza-se como uma rede complexa, sendo que o processo de produção de um material têxtil médico requer variados fatores, que irão ser discutidos pormenorizadamente no ponto seguinte (1.3. Materiais têxteis médicos).

1.3. Materiais têxteis médicos

1.3.1. Propriedades dos materiais têxteis

Os materiais têxteis/ poliméricos, em geral, têm inúmeras e distintas propriedades que as tornam adequadas para fins médicos, tais como resistência, extensibilidade, flexibilidade, permeabilidade ao ar que permite as trocas gasosas, disponibilidade de produzir em estruturas tridimensionais, variação do comprimento das fibras, forma da secção transversal, taxa de absorção variável, entre outras. Ainda assim, e como cada caso é um caso, dependendo do local e tipo de aplicação, são necessárias propriedades e requisitos específicos para cada um. Por conseguinte, é vital melhorar as qualidades de um produto com base na sua utilização/aplicação prevista (Rohani Shirvan & Nouri, 2020). Estes materiais também podem possuir biofuncionalidades, tais como propriedades mecânicas e físicas que lhes permitem a capacidade de libertar agentes ativos ou medicação. Outras características essenciais à aplicação destes materiais na biomédica, nomeadamente em meios intracorporais são a pureza das matérias-primas, a estabilidade do material quando em contacto com o doente, a esterilidade, a existência de uma barreira contra microrganismos/impurezas, a capacidade de absorver fluidos sem causar irritação e a fácil remoção sem causar dor (Bartels et al., 2011; Gad, 2023).

A produção de têxteis médicos pode diferir da utilizada para dos têxteis convencionais, sendo que para ambos os contextos podem ser utilizados os mesmos polímeros, diferindo, no entanto, na tipologia de processamento, no grau de pureza, na combinação com solventes (nos têxteis médicos devem ser menos agressivos) ou na tipologia de tratamento/ acabamento. Mais do que para qualquer outra aplicação, os materiais têxteis

médicos não devem ser compostos por elementos tóxicos ou passíveis de provocar reações alérgicas, devem ter capacidade de esterilização, boas propriedades mecânicas e específicas para a sua particular aplicação, durabilidade e biocompatibilidade. É de notar que a esterilidade é um requisito essencial para os produtos têxteis médicos, obrigando a que os polímeros suportem as condições físicas e químicas mais adversas que se verificam no processo e no tempo de esterilização (Qin, 2016). Não obstante, o processo de esterilização pode ser realizado de formas distintas, sendo estudado para cada caso, o melhor método de esterilização.

1.3.2. Constituintes dos materiais têxteis

Nos materiais têxteis, as fibras são o principal constituinte nos elementos estruturais. De uma forma geral, os constituintes dos materiais têxteis médicos incluem fibras, fios, tecidos e variados tipos de compósitos, que após processamento, originam os diferentes produtos têxteis médicos existentes. Desta forma, o constituinte base dos produtos têxteis médicos são os polímeros, que através de um processo de fabrico são transformados em fibras. A Figura 1.1 ilustra o processo de transformação de um material têxtil desde o seu produto base até ao produto final.

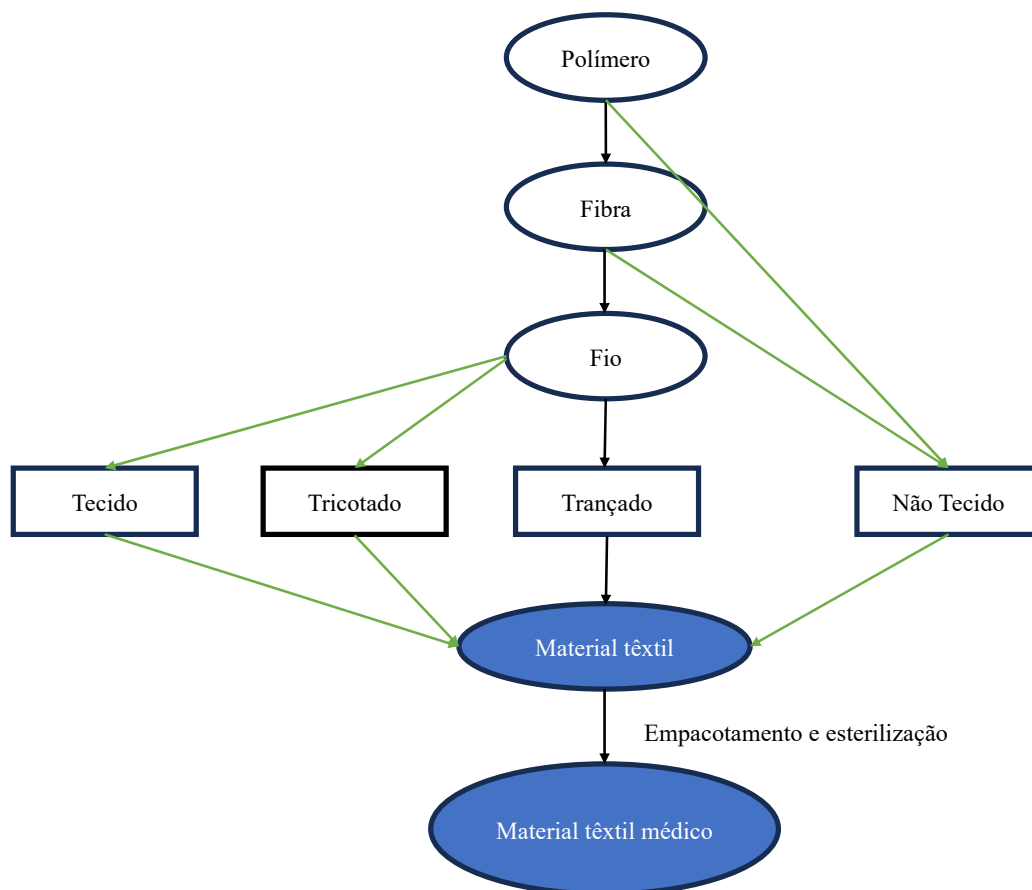


Figura 1. 1 Processo de Transformação de um material têxtil médico (Qin, 2016)

Dependendo da finalidade de aplicação, os principais requisitos dos têxteis médicos incluem também absorção, flexibilidade, suavidade, biocompatibilidade, bioestabilidade e/ou biodegradabilidade. Com o intuito de cumprir estes requisitos, são utilizados os polímeros adequados para posterior transformação em fibras e têxteis, cujas estruturas satisfaçam as necessidades do consumidor final (Qin, 2016).

Os materiais utilizados no fabrico têxtil podem ser distinguidos como orgânicos e inorgânicos e destes, como tecidos naturais ou sintéticos. O polímero natural mais utilizado é o algodão, e os sintéticos incluem o poliéster, poliamida, polipropileno, viscose e politetrafluorotileno (Bartels et al., 2011). Na seguinte tabela serão apresentadas as diferenças entre as fibras incluindo as suas origens:

Tabela 1. 3 Constituintes dos materiais têxteis médicos (Bartels et al., 2011)

Origem		Exemplos de fibras que podem ser originadas
Fibras naturais (isoladas da natureza)	Plantas (fibras vegetais)	Linho
		Algodão
	Animais	Cabelo, pêlo
		Seda
Fibras fabricadas	Polímeros naturais	Lã
		Alginato
		Ácido poliglicólico
		Ácido polilático
	Polímeros sintéticos	Viscose
		Elastina
		Poliamida
		Poliéster
		Polipropileno
		Politetrafluoretileno
	De origem inorgânica	Carbono
		Metal (ouro e prata)

1.3.2.1. Fibras sintéticas versus fibras naturais

Os materiais têxteis podem ser produzidos a partir de diversas fontes, variando das fibras de origem sintética às de origem natural.

As fibras sintéticas são obtidas através da síntese de materiais, os quais podem ser de origem não renovável, envolvendo na sua produção processos químicos. Exemplos de fibras sintéticas incluem poliéster, viscose, carbono, poliamida e polipropileno. (Parvin et al., 2020).

As fibras naturais, por outro lado, são obtidas a partir de fontes vegetais, animais e minerais (Kılınç et al., 2017). As fibras de origem animal originam do pelo de mamíferos ou invertebrados, como são os casos do bicho-da-seda ou aranhas. Entre as fibras de origem animal destacam-se as fibras de seda, lã e algodão, que se caracterizam como

fibras aparentemente muito distintas (Houck & Siegel, 2015; Kılınç et al., 2017). Diversos estudos têm vindo a demonstrar que a seda fabricada através de processos como não tecelagem e electrospinning pode ser utilizada para a produção de gazes para feridas (Altman et al., 2003; Omollo Oduor et al., 2021). Por sua vez, a fibra de lã pode ser utilizada em têxteis médicos com intuito de proteger a pele dos impactos da pressão, da fricção e da humidade, oferecendo uma excelente proteção (Singha et al., 2022). Por outro lado, as fibras vegetais apresentam, por norma, estruturas alongadas e de secção transversal arredondada (Kılınç et al., 2017; McNeil et al., 1984). Exemplos de fibras vegetais incluem o algodão, linho e fibra de casca (por exemplo, coco). Entre estas, o algodão destaca-se devido às suas numerosas propriedades favoráveis, nomeadamente o aspeto natural, a transferência de calor, o conforto de utilização, a absorção de humidade, o estatuto de produto renovável e o baixo custo (Zamora-Mendoza et al., 2022). Comumente, a celulose, macromolécula que constitui a fibra de algodão, por ser um polímero de origem natural com características como biocompatibilidade e elevada abundância, é utilizada para a produção dos mais variados têxteis médicos aplicados no tratamento de feridas (Gustaite et al., 2015; Salah et al., 2019). A gaze de algodão é à base de fibras celulósicas, sendo que apresenta várias aplicações clínicas, nomeadamente o tratamento de feridas cirúrgicas, queimaduras, feridas crónicas e/ou provenientes de consequências de patologias como diabetes (Lumbreras-Aguayo et al., 2019). As gazes em algodão apresentam inúmeras características que salientam a sua adequabilidade para a aplicação em feridas. Estas características incluem propriedades mecânicas adequadas, capacidade de oferecer um equilíbrio hídrico face à humidade existente na superfície da ferida, e a capacidade de criar um ambiente propício à ocorrência de trocas gasosas. Além destas, inúmeros estudos comprovaram que os materiais de base celulósica se caracterizam como não tóxicos, hemostáticos, não alérgicos, biocompatíveis e biodegradáveis (He et al., 2017; Salah et al., 2019).

A tabela seguinte apresenta um quadro-resumo com as vantagens e desvantagens dos diferentes tipos de fibra.

Tabela 1. 4 Vantagens e desvantagens dos diferentes tipos de fibra

Origem	Tipo de Fibra	Vantagem	Desvantagem
Animal	Seda Altman et al., 2003	Excelentes propriedades mecânicas	Questões de biocompatibilidade devido à sericina
		De fácil modificação química para melhoramento da matriz	Possível formação de granulomas
		Baixas taxas de degradação in vitro e in vivo	Possível resposta alérgica devido à fibroína aquando exposição
	Lã Allafi et al., 2022	Excelente flexibilidade Capacidade de retenção/controlo de humidade	Fraca elasticidade Elevado custo de produção
Vegetal	Algodão	Biodegradabilidade Baixa massa volúmica	Sensibilidade química Elevada absorção de humidade
	Zamora-Mendoza et al., 2022	Biodegradabilidade Abundância	Baixa estabilidade térmica
Sintéticas	Poliéster	Mecanismos antimicrobianos intrínsecos Elevada durabilidade	Custos de produção elevados
	Viscose	Elevada estabilidade térmica, elasticidade e durabilidade	Maior frequência de reações adversas e reações alérgicas
	Zamora-Mendoza et al., 2022		

1.3.3. Materiais têxteis médicos: Gazes cirúrgicas

Uma gaze define-se como um tecido fino e leve, normalmente poroso, utilizado para produção de vestuário, para curativos e outros procedimentos médicos e para separar sólidos de líquidos (Cambridge Dictionary, 2023). Por sua vez, gaze cirúrgica define-se como um penso feito normalmente de algodão, utilizado especificamente para incisões efetuadas durante uma cirurgia (Collins Dictionary, 2023). Uma gaze é selecionada com base no tipo, profundidade, localização e extensão da ferida, na quantidade de secreção,

possibilidade de infecção e aderência da ferida. A gaze cirúrgica absorve uma grande parte da humidade contida na ferida, contribuindo para uma melhoria no processo de cicatrização e numa diminuição da dor ao separar o penso, por exemplo (Rezvani Ghomi et al., 2019).

Os principais objetivos da utilização de gazes cirúrgicas incluem:

- 1) proporcionar uma barreira física protetora temporária;
- 2) absorver a drenagem da ferida;
- 3) proporcionar a humidade necessária para otimizar a reestruturação do epitélio (Obagi et al., 2019).

A aplicabilidade de gazes cirúrgicas é extensa e variada, podendo atuar desde a promoção da cicatrização até ao suporte na drenagem e redução da perda de calor. Algumas das aplicações dos pensos de gaze para feridas incluem a utilização como pensos secundários, para limpeza de feridas, para cuidados de higiene local de feridas cirúrgicas ou não cirúrgicas, para promoção de homeostasia e até como ligaduras. Como mencionado anteriormente, a aplicabilidade das gazes cirúrgicas é vasta, sendo que exemplos de aplicação se encontram resumidos no seguinte esquema (Figura 1.2) (AK, 2019).

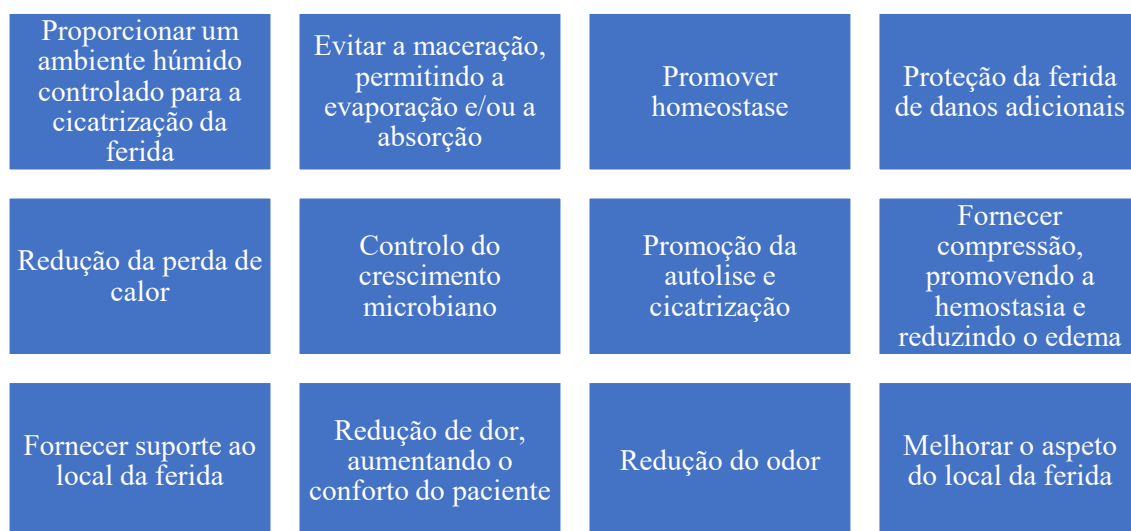


Figura 1. 2 Aplicabilidade das gazes cirúrgicas.

Uma gaze deve ter as seguintes propriedades de forma a otimizar a sua funcionalidade:

- ✓ Controlar a humidade à volta da ferida;
- ✓ Aumentar a migração epidérmica;
- ✓ Permitir a troca de gases entre o tecido ferido e o ambiente;
- ✓ Eliminar o excesso de exsudados;
- ✓ Proteger a ferida de infeções e crescimento anormal de microrganismos;
- ✓ Diminuir a necrose da superfície da ferida;
- ✓ Não deve ser aderente à ferida, podendo ser facilmente mudado e removido;
- ✓ Aliviar a dor da ferida;
- ✓ Boa relação custo-eficiência (Dhivya et al., 2015; Rezvani Ghomi et al., 2019).

O seguinte esquema sumariza as propriedades que uma gaze cirúrgica deve ter (Figura 1.3.) (Sood et al., 2014).

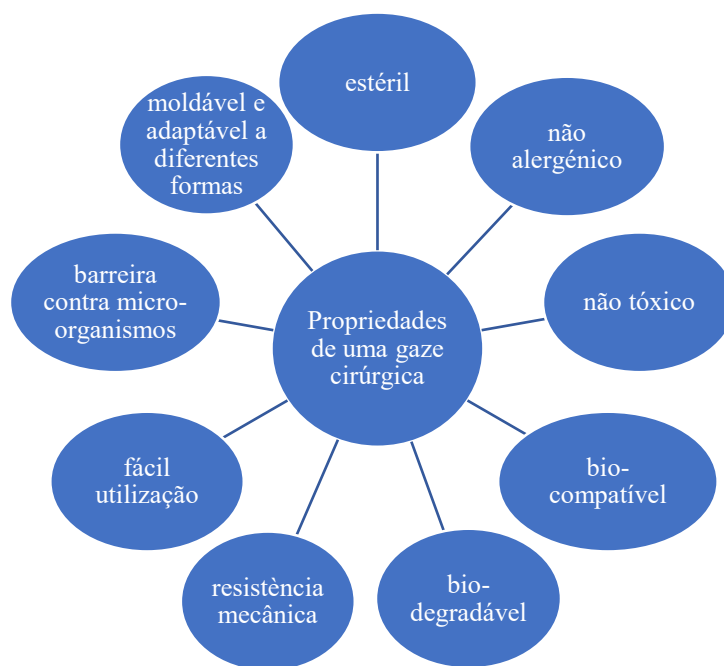


Figura 1. 3 - Propriedades de uma gaze cirúrgica

Face aos tipos de gazes existentes, verifica-se que a gama disponível é também vasta e variada, sendo que inclui exemplos como pensos de gaze e/ou gazes em rolo, entre outros, caracterizados pela sua elevada capacidade de absorção. As gazes são um material versátil que pode ser aplicado sozinho ou combinado com outras substâncias bioativas.

Dentro das classificações existentes, as gazes podem ser distinguidas em dois tipos principais de gaze, que são, a gaze de tecido e a gaze de não tecido. É importante salientar que as características físicas de ambos os tipos de gazes são semelhantes, sendo que a variabilidade de características se deve às fibras utilizadas para a sua produção (1.3.2.1. Fibras sintéticas versus Fibras naturais). Cada gaze tem as suas particularidades e instruções de aplicação. A gaze de tecido pode ser classificada como fina e macia ou muito solta e grossa (como um pano de algodão) dependendo da contagem de fios utilizados na sua produção (Morgan, 2017). De notar, que a gaze de tecido não deve ser cortada caso seja utilizada como penso primário (um penso aplicado diretamente numa ferida), uma vez que pode ocorrer a libertação de fibras que podem ficar presas na ferida e impedir e/ou comprometer a cicatrização. Por sua vez, a gaze não tecido é produzida de fibras prensadas, tornando-a, consequentemente, mais absorvente do que as gazes em tecido e menos suscetível à libertação de fiapos.

Outra classificação de tipologia de gazes refere-se à sua esterilidade, sendo que estas podem estar disponíveis em embalagens esterilizadas e não esterilizadas. No entanto, é de notar que apenas a gaze esterilizada é adequada para utilização como penso primário (Simply Medical, 2021) ou aplicação intracorporal. A esterilidade da gaze ajuda a prevenir o transporte e proliferação de possíveis patogénicos do material para o ambiente intracorporal.

Adicionalmente, os tipos de gazes podem ser distintos com base no seu formato, sendo que existem duas tipologias principais, nomeadamente as gazes enroladas e as moldadas. A gaze enrolada caracteriza-se como uma longa tira de gaze enrolada num cilindro cómodo, tornando a sua aplicação intuitiva e fácil. Além disto, a gaze enrolada é por norma de tecido (algodão) e não é elástica, o que a torna mais adequada para a utilização em partes rígidas do corpo, como, por exemplo, braços, pernas e/ou pulsos. Outras características deste tipo de gaze incluem a ausência de qualquer tipo de gordura na sua composição e a boa permeabilidade ao ar, permitindo uma boa respirabilidade e conforto e a uma menor acumulação de suor, evitando consequentemente possíveis infeções. De notar, que estas gazes contêm uma elevada capacidade de absorção, sendo por consequência frequentemente aplicadas para a limpeza e/ou absorção de sangue e/ou outros líquidos intra- e extracorporais (Olivia, 2023; Winner Medical, 2022a). Por outro lado, a gaze moldada é feita para proporcionar alguma elasticidade e uma ligeira compressão. A sua elasticidade permite uma maior adaptação aos contornos da parte do corpo em que é aplicada. Esta adaptação pode ser útil quando se trata de vestir áreas com

maior mobilidade ou maior irregularidade de superfície (Morgan, 2017; Simply Medical, 2021).

A escolha do tipo de gaze a utilizar está maioritariamente relacionada com o tipo de função que se pretende que desempenhe (Winner Medical, 2022b). Curiosamente, quando se fala em gaze no quotidiano, assume-se que esta é feita de tecido, habitualmente de algodão. Por outro lado, quando se fala em compressa assume-se uma composição tecido não tecido (TNT), que normalmente pode apresentar-se como uma mistura poliéster e viscose, poliamida, polipropileno ou poliéster, sendo uma opção muito mais barata que a gaze de tecido (Morgan, 2017). Comummente, a tomada de decisão para a gaze a ser utilizada tem em tudo a ver com o fator de risco e a relação custo/eficiência. Desta forma, sendo estes dois tipos de gaze, tecido e tecido não tecido, frequentemente aplicadas nos diferentes contextos médicos, estas foram selecionados como alvo de estudo do seguinte projeto de mestrado.

1.3.4. Avaliação da citotoxicidade e citocompatibilidade de um material têxtil médico

No campo da medicina, a escolha dos materiais aplicados na produção do têxtil é de elevada importância, uma vez que é necessário garantir não só a eficácia dos produtos, mas também a segurança para os utilizadores, nomeadamente a respetiva citocompatibilidade. Por citocompatibilidade compreende-se a capacidade de um material ser compatível com as células de um determinado organismo, normalmente o humano. Esta característica, é particularmente importante no caso de produtos têxteis médicos, que são colocados em contacto direto com os tecidos do corpo humano. A citocompatibilidade pode ser influenciada por vários fatores, nomeadamente pela origem dos materiais utilizados. É expectável que todos os materiais utilizados para fins médicos e para contacto direto com a componente celular dos tecidos vitais, expressem bons níveis fisiológicos de proliferação, migração e sobrevivência (J. Sanz et al., 2019; J. L. Sanz et al., 2020).

O estudo da citotoxicidade consiste na avaliação dos efeitos nocivos de agentes físico-químicos em células vivas, sendo que este estudo se caracteriza como fundamental no contexto da biomédica. A compreensão da citotoxicidade de diferentes gazes e/ou outros

instrumentos cirúrgicos em órgãos específicos torna-se indispensável para o estabelecimento de medidas preventivas e ambientais, de forma a garantir tanto a saúde do doente como a preservação do meio ambiente.

O termo citotoxicidade refere-se a critérios de avaliação negativos, nomeadamente relacionado com alterações celulares como a diminuição da proliferação celular e até a apoptose. Contrariamente, o conceito de citocompatibilidade é mais vago, sugerindo, no entanto, a avaliação de critérios de carácter positivo. Um material é, então, caracterizado como citocompatível caso a estrutura e as funções do tecido em questão permaneçam inalterados aquando contacto (direto ou indireto) com o biomaterial desejado. A manutenção destas funções depende diretamente das propriedades de superfície do material. Assim, por exemplo, um material pode induzir a reorganização de um tecido sem apresentar danos celulares, mas perdendo a estrutura e as funções anteriores (originais). Por conseguinte, a investigação e o desenvolvimento de biomateriais podem proporcionar propriedades de superfície do material que satisfaçam estes requisitos (Sigot-Luizard & Warocquier-Clerout, 1993).

1.3.4.1. Linhagens celular utilizadas para avaliação de citocompatibilidade e citotoxicidade

A análise da citotoxicidade envolve, então, a avaliação dos efeitos nocivos de substâncias químicas em linhas celulares representativas de órgãos específicos, possibilitando uma compreensão mais precisa e profunda dos mecanismos de toxicidade celular de determinados agentes e a identificação da tipologia de danos celulares específicos associados à exposição a determinadas gases. É importante salientar que, fatores como propriedades físicas e/ou mecânicas podem ter efeito na análise da citotoxicidade, podendo, por consequente alterar a reação entre células e materiais. Por linhas celulares representativas compreende-se células isoladas e cultivadas em laboratório, que mantêm características semelhantes às células presentes nos tecidos dos órgãos em estudo. Essas linhas celulares fornecem uma ferramenta poderosa de investigação, permitindo o estudo biológico controlado dos efeitos de determinado material.

Para o seguinte trabalho foram selecionadas duas linhas celulares como alvo de estudo, nomeadamente fibroblastos dérmicos humanos normais (BJ) e HCT-15.

Os fibroblastos dérmicos humanos (BJ) encontram-se não só na derme como também representam a maior fração de células presentes nos tecidos conjuntivos do corpo humano e nos espaços intersticiais dos órgãos. Os fibroblastos estão amplamente distribuídos em variados tipos de tecidos, como por exemplo o tendão, o ligamento e a pele. Estes são definidos como células produtoras de colagénio. Adicionalmente, são consideradas a fonte primária da maioria dos componentes da matriz extracelular. Face às suas funções os fibroblastos desempenham um papel fundamental na regulação do *turnover* da matriz extracelular e na cicatrização de feridas (Theerakittayakorn & Bunprasert, 2011).

A linha celular HCT-15 deriva de células de uma tipologia de cancro de cólon humano que teve a sua origem a partir de um paciente com um adenocarcinoma colorretal. As células HCT-15 têm a capacidade de se agruparem em aglomerados celulares, funcionando para este projeto de tese como as células representativas do intestino (AltogenLabs, 2023).

1.3.5. Estratégias para aumentar a funcionalidade de materiais médicos

Relativamente a materiais têxteis médicos, a engenharia biomédica atua no campo do desenvolvimento de novos têxteis médicos e da melhoria das características e funcionalidades dos têxteis médicos já existentes. Para isto, as características estruturais, químicas, mecânicas e físicas devem ser alteradas e adaptadas ao fim em mente, existindo diferentes abordagens que podem ser aplicadas. Algumas destas serão exploradas de seguida.

Uma das estratégias aplicadas para otimizar um material têxtil à sua aplicação médica tem como base a modificação da matéria-prima ou da sua superfície. Para tal existem várias metodologias que podem ser aplicadas, nomeadamente a introdução de novos grupos funcionais, o aumento da energia de superfície ou o aumento da capacidade de retenção de líquidos, o aumento da hidrofobicidade ou da hidrofiliabilidade e/ou a

substituição de químicos mais tóxicos por alternativas menos nocivas (Knittel & Schollmeyer, 2000; Rohani Shirvan & Nouri, 2020). Desta forma, a aplicação de técnicas de modificação da superfície permite a modificação físico-química de polímeros naturais e sintéticos, resultando, por consequência, em atividades químicas, físicas e biológicas melhoradas. As modificações das estruturas químicas de determinado material ou polímero podem ser efetuadas através da alteração da composição dos monómeros, da alteração da estrutura da cadeia principal por inclusão de cadeias laterais e/ou da conversão química de alguns grupos funcionais nas cadeias poliméricas (Ikada, 1994).

Para melhorar a funcionalidade de um material têxtil são utilizados diferentes processos de acabamento, como a foulardagem, revestimento e o esgotamento, podendo também estes acabamentos têxteis servir de base à modificação do material para aplicações médicas. Com o intuito de obter características funcionais específicas para diferentes aplicações, tais como materiais não implantáveis/implantáveis, produtos de cuidados pessoais, *scaffolds*, entre outros, o tipo e o método selecionado para acabamento podem variar de acordo com as especificações exigidas (Rohani Shirvan & Nouri, 2020). Os tipos de acabamento existentes mais utilizados para aplicação médica incluem o antibacteriano (Gulati et al., 2022), o anti odor (Bashari et al., 2018), o coagulante do sangue (Rouhani Shirvan et al., 2019), o anticoagulante do sangue (Degoutin et al., 2012), o aplicado para administração controlada de uma agente ativo ou medicamento (Qin, 2016b), o potenciador de absorção de água e/ou sangue (Ahmed, 2015) e o repelente de sangue (Bhargava & Bhargava, 2018).

No âmbito do presente projeto, a adição de compostos bioativos (*coatings*) antimicrobianos, como acabamento funcional têxtil, será aprofundada neste relatório sendo uma técnica amplamente utilizada no campo da biomédica (ponto 1.3.5.1).

1.3.5.1. Aditivos têxteis antimicrobianos

Os aditivos antimicrobianos usados em diferentes produtos, tanto em indústrias como a têxtil, de plásticos, de produtos de higiene e desinfecção, entre outras, têm grande impacto ambiental e toxicidade associada durante a sua produção, uso e eliminação. Existem diversos agentes com funcionalidades ativas antimicrobianas, sendo os mais conhecidos

as nanopartículas metálicas (nomeadamente nanopartículas de prata) e quaternários de amónia. Os revestimentos à base de nanopartículas são bastante comuns tanto em bases têxteis de origem natural como sintética (Gulati et al., 2022). Por exemplo, as nanopartículas de prata possuem uma forte toxicidade para uma vasta gama de microrganismos, e ainda embora sem grande toxicidade para as células humanas quando usadas de forma isolada/única, a sua bioacumulação acarreta toxicidade considerável quer para células humanas quer para animais (Shahid-ul-Islam et al., 2016). Para além da prata, outros metais e nanopartículas de óxidos metálicos, incluindo titânio, estanho, zinco, ouro e cobre, também são atualmente aplicados em diferentes bases têxteis. Os quaternários de amónia caracterizam-se como substâncias catiónicas com diversas aplicações, incluindo pesticidas, herbicidas e produtos de limpeza antimicrobiano (Bureš, 2019). Por sua vez, triclosan é um antimicrobiano não iónico de largo espetro utilizado como ingrediente em desinfetantes, sabão, detergente, pasta de dentes, elixir bucal, tecido, desodorizante, champô e aditivos para plásticos (Dann & Hontela, 2011). Todas as substâncias listadas acima apresentam efeitos nefastos para o ambiente, tanto a nível da bioacumulação como da toxicidade, resultando num desequilíbrio nos ecossistemas marinhos e terrestres (Bureš, 2019; Dann & Hontela, 2011; McGillicuddy et al., 2017).

Posto isto, atualmente há uma grande procura por soluções mais sustentáveis e amigas do ambiente e do ser humano. A partir da natureza, é possível extrair variados agentes ativos, que podem ser utilizados para desenvolver formulações antimicrobianas. Extratos de plantas, óleos essenciais e produtos de origem animal (como, por exemplo, mel) são reportados como promissores para aplicação em tecidos para ajudar no controlo do processo de cicatrização e de infeção de ferida (Gulati et al., 2022).

O processo de acabamento têxtil antimicrobiano pode então ser desenvolvido de uma forma mais sustentável, a partir da utilização de determinados compostos naturais como as ciclodextrinas (Singh & Sahu, 2019), a lenhina e o quitosano. A lenhina, por exemplo, é um componente presente nas plantas que proporciona resistência contra agentes microbianos. Sunthornvarabhas *et al.* desenvolveram um tecido revestido com lenhina e feito de bagaço de cana-de-açúcar que apresenta atividade antibacteriana contra *Staphylococcus epidermidis* (Sunthornvarabhas et al., 2019). O quitosano, por sua vez, é frequentemente utilizado no processamento de têxteis antimicrobianos devido às suas propriedades antimicrobianas e anti odor. Um estudo de 2019, demonstrou como a

aplicação de um hidrogel de quitosano em tecido celulósico conferiu atividade antibacteriana contra bactérias como *S. aureus*, *E. coli* e *Listeria monocytogenes* (Benltoufa et al., 2020). No entanto, este tipo de acabamento ainda suscita determinadas questões face à sua eficácia, uma vez que existem relatórios que sugerem que as propriedades antimicrobianas não sofrem alterações significativas aquando adição do quitosano em tecidos de algodão e poliéster (Chen et al., 2019).

Neste contexto, surge a necessidade de desenvolver um aditivo de base natural antimicrobiano, cuja eficácia seja elevada contra uma elevada gama de patogénicos, não só bactérias como outros tipos de microrganismos como vírus e fungos.

1.4. Tech4MED: empresa que identificou o problema e que acolheu o projeto



Figura 1. 4 Tech4MED – For Human Care logotipo.

A Tech4MED é uma start-up de biotecnologia que recorre a materiais de origem natural para obtenção de funcionalidades inteligentes, otimizadas pela própria natureza ao longo de milhares de anos. A start-up tem como objetivo efetuar a ponte entre os subprodutos/resíduos gerados pelas indústrias, como por exemplo florestais e do mar, e diferentes mercados técnicos, como o têxtil, da cosmética e dos produtos de higiene. A Tech4MED define a sua missão como a resolução de problemas urgentes da sociedade com o objetivo de aprimorar a saúde tanto do planeta como do ser humano, tendo como visão a inovação nos campos do cuidado médico e da sustentabilidade. A empresa opera sobre variados valores, destacando-se os seguintes: rigor (em toda a sua prática e relações), não-conformidade, cuidado (trabalhando sempre para o melhor do ser humano e da sociedade), e transparência (Tech4Med, 2020).

A empresa entrou no mercado ainda no decorrer do presente ano (2023), com o seu primeiro produto NaturALL-BS, uma formulação química antimicrobiana, mais concretamente bioestática, e antiviral, que pode ser aplicada no processo de impregnação têxtil. Caracteriza-se como uma formulação de origem natural e que surge como uma alternativa aos produtos químicos convencionais. Com este produto inovador, a start-up combina quatro dos princípios em que aposta, nomeadamente o recurso e a valorização da matéria-prima florestal e do mar, o desenvolvimento em biorrefinaria, a economia circular e a procura por uma indústria mais limpa e verde (*Tech4Med*, 2020). O NaturALL pode ser aplicado em variados contextos, como por exemplo no revestimento de gases, sendo esta a aplicação que irá ser estudada ao longo deste trabalho. Assim, este projeto de mestrado tem como base a integração tanto de compostos bioativos como de biomateriais em produtos de valor acrescentado. Para tal, efetuar-se-á o revestimento de gaze como NaturALL-BS e com um material de origem marinho, o quitosano, comparando, então, o efeito deste material em linhas celulares representativas.

1.5. Objetivos do trabalho

O presente projeto de estágio apresenta dois objetivos principais, sendo eles:

- 1) Dar resposta ao problema relativo ao esquecimento das gases dentro do corpo humano e perceber potenciais consequências que possam ocorrer, quer em condições normais quer em utentes em estado inflamatório;
- 2) Entender o impacto da adição de agentes bioativos de origem natural ao nível da biocompatibilidade das gases, e diminuir eventuais consequências que possam ocorrer aquando esquecimento do material no interior do corpo humano.

Com estes dois objetivos em mente, serão seleccionadas gases amplamente e especificamente utilizadas em ambiente hospitalar, nomeadamente gases de algodão estéreis e gases tecido não tecido (TNT) estéreis.

Primeiramente, pretende-se avaliar se a impregnação de qualquer um dos tipos alvo de gaze, nomeadamente algodão e TNT, tem impacto nas funcionalidades bioativas do material têxtil. Para tal, as gases em investigação serão impregnadas com formulações de base natural, cujas propriedades bioativas já se encontram comprovadas. As formulações

selecionadas para este estudo são NaturALL-BS, produto desenvolvido pela Tech4MED, e o quitosano. A solução NaturALL-BS, da Tech4MED, é uma alternativa aos produtos químicos convencionais, combinando princípios de valorização de resíduos florestais e do mar, de biorrefinaria, e economia circular. O objetivo foi utilizar compostos extraídos maioritariamente da floresta endémica portuguesa, como a bolota e a cortiça, para o desenvolvimento de uma alternativa antimicrobiana natural aos aditivos sintéticos atualmente usados. O NaturALL-BS é uma formulação líquida de base natural, que se apresenta como segura, não tóxica, ecológica, biodegradável e sustentável (Jornal de Notícias, 2022).

Posteriormente, serão realizadas análises de citotoxicidade dos diferentes tipos de gaze (algodão e TNT) não funcionalizados e funcionalizados, utilizando linhas celulares representativas do corpo humano e do contacto células humanas - gazes, como é o caso dos fibroblastos. Neste ponto, serão avaliados parâmetros como a viabilidade e a proliferação celular aquando exposição por contacto direto com os materiais em questão. Esta avaliação será efetuada tanto em situações em que o doente está no seu estado saudável, como em situações em que se encontra num estado inflamatório agudo (caracterizado por um pH mais ácido, nomeadamente 5.2-6.8 (Rajamäki et al., 2013)). Além disto, importa também perceber o que acontece com gazes esquecidas dentro do corpo humano durante um período prolongado, situação que será investigada após um ensaio de envelhecimento acelerado (teste adaptado para o propósito), comparando uma condição controlo com um estado mimético de inflamação crónica.

Desta forma, os resultados deste trabalho permitirão compreender melhor os processos desencadeados não só pela presença da gaze, mas também pelo seu esquecimento, podendo elucidar sobre os processos celulares que possivelmente serão afetados pelas diferentes gazes, pela presença ou não de princípios bioativos e pelo estado do doente, e as suas implicações na saúde humana. Os resultados obtidos durante este estágio poderão contribuir e para a avaliação de riscos e a definição de diretrizes regulatórias mais eficientes relacionadas ao uso e manuseio seguro de gazes em ambiente cirúrgicos, além de fornecer informações valiosas para o desenvolvimento de estratégias de incremento da biocompatibilidade destes materiais. Espera-se que os resultados obtidos possam orientar para novos estudos e conclusões que levem, no futuro breve, à implementação de novos materiais e/ou revestimentos como medidas preventivas e/ou mitigadoras de riscos de

inflamação e infecção agravadas aquando contacto ou esquecimento dos materiais no corpo humano durante curtos e longos períodos, visando não só a proteção da saúde humana, mas também do meio ambiente. Visa-se preencher uma lacuna de conhecimento no campo da citotoxicidade de gases, fornecendo uma análise abrangente e comparativa dos efeitos dessas substâncias em diferentes situações.

Assim, de modo geral, este estudo será conduzido com os seguintes passos: Testes de contacto direto e lixiviados (i), simulação de condição inflamatória aguda (ii), envelhecimento acelerado (iii), simulação de condição de inflamação crónica (iv). Os testes quer por contacto direto quer em lixiviados (por contacto indireto) podem ser usados em complementaridade e têm o interesse de permitir comparar o que pode acontecer por contacto direto nos tecidos e/ou por efeito indireto da lixiviação/degradação dos materiais noutros órgãos que não o de colocação cirúrgica. As linhas celulares BJ (fibroblastos da derme humana), como referido anteriormente, e HCT-15 (células epiteliais tumorais do intestino grosso) serão usadas para este estudo. Serão simuladas condições saudáveis e de inflamação com pH neutro (7.21) e a pH ácido (6.04) (pH típico em inflamação), respetivamente. Esta última condição pode acelerar a degradação da gaze e induzir alterações químicas nas mesmas, podendo ter impacto diferente na citotoxicidade/citocompatibilidade resultante.

O relatório está estruturado da seguinte forma: no capítulo 1 é apresentada uma revisão da literatura sobre o problema, as gases e as suas características, tais como os riscos e benefícios da utilização das mesmas, assim como os objetivos do trabalho para dar resposta ao problema. No capítulo 2 serão apresentados os materiais e métodos utilizados para realizar todos os processos e testes desenvolvidos durante o estágio e, no capítulo 3 serão apresentados e discutidos os resultados obtidos. Finalmente, no capítulo 4, serão apresentadas as conclusões e ideias para futuras investigações nesta área.

2. Materiais e Métodos

2.1. Linhas celulares e condições de crescimento

2.1.1. Crescimento de fibroblastos dérmicos humanos normais (BJ)

As células BJ foram obtidas da American Type Culture Collection (ATCC). Estas células foram cultivadas e mantidas em meio Dulbecco's Modified Eagle's (DMEM) a uma temperatura de 37 °C numa atmosfera humidificada com 5 % de CO₂. O DMEM com alto teor de glucose (PAN-Biotech; Germany) foi suplementado com 10 % de soro fetal de bovino (FBS, PAN-Biotech; Germany) e uma 1 % de uma solução de antibióticos contendo estreptomicina/penicilina (ATB, PAN-Biotech; Germany). As células BJ foram, de forma contínua, expandidas e passadas ao longo dos ensaios realizados. As células foram deixadas a crescer até se formar uma monocamada celular com cerca de 80 % confluência para fins experimentais. Os ensaios foram realizados com células nas passagens 21-30. Em cada passagem, as células não usadas foram congeladas em viais com 1x10⁶ células BJ/mL.

2.1.2. Crescimento de HCT-15

As células HCT-15 são células cancerígenas derivadas do intestino grosso, e foram obtidas da ATCC. Estas células foram cultivadas e mantidas em meio Rosewell Park Memorial Institute (RPMI 1640) suplementado com GlutaMAX a uma temperatura de 37 °C numa atmosfera humidificada com 5 % de CO₂. O RPMI 1640 + GlutaMAX foi suplementado com 10 % de FBS e 1 % ATB. As células foram deixadas a crescer para fins experimentais até se formar uma monocamada celular com cerca de 80% confluência. Os ensaios foram realizados com células nas passagens 25-30. Em cada passagem, as células não usadas foram congeladas em viais com 1x10⁶ células HCT-15/mL.

2.2.Tratamento das gazes

Para perceber o efeito da adição de domínios bioativos às gazes comerciais, foi realizado o seguinte protocolo. Gazes de tecido (Laboratoires Mercurochrome, França) e não tecido (Bastos&Viegas, Portugal) passaram por um banho de diferentes soluções a testar. Neste ensaio foram utilizadas as seguintes soluções (Figura 2.1):

- 1) Água destilada (branco)
- 2) Quitosano (Zhejiang AOXING Biotechnology, China) com uma concentração inicial de 25 mg/mL e posteriormente diluído 10x
- 3) NaturALL, posteriormente diluído 10x.

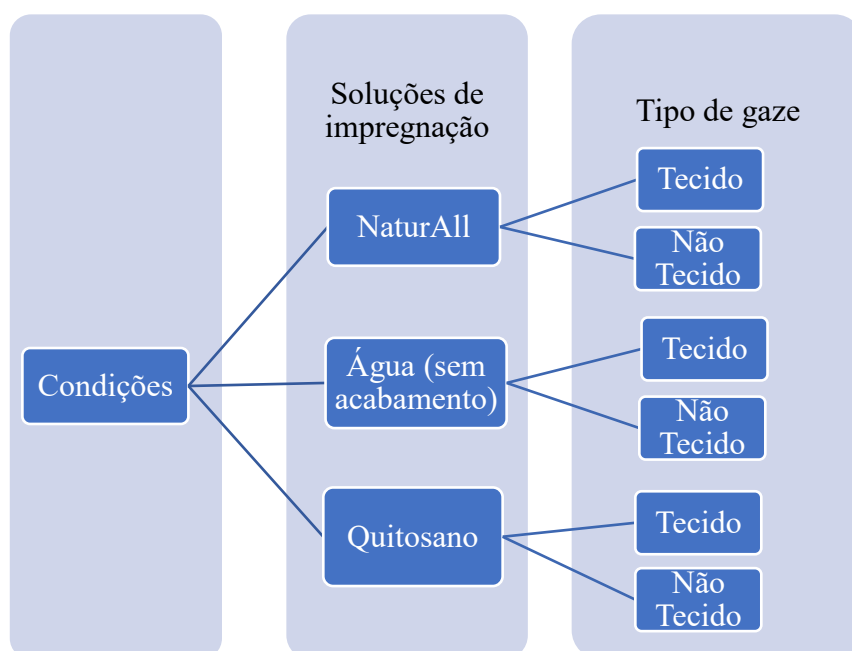


Figura 2. 1 - Esquema de condições a testar

Para cada condição foram processadas 5 gazes de cada categoria, nomeadamente 5 gazes em tecido e 5 gazes não tecido. As imersões nas diferentes soluções foram efetuadas em duplicado e o volume de absorção após cada imersão foi registado. Após imersão as gazes impregnadas foram colocadas a secar numa estufa (Binder, NY, EUA) a 45 °C durante 48 h.

Após secagem, as gazes foram recortadas de forma a obter um tamanho final de 2 cm x 2 cm. Antes de realizar os ensaios celulares, as gazes foram colocadas a esterilizar com recurso da lâmpada de UV no interior de uma câmara de segurança biológica (SafeFAST Elite, Techlab, EUA) durante 20 min de cada lado.

2.2.1. Imersão das gases nas diferentes soluções

A taxa de impregnação foi determinada a partir da diferença entre os volumes de solução antes e após imersão da gaze. A condição do branco foi preparada num goblé de 1 L devido à alta absorção observada para a água destilada sendo que esta observação foi feita para ambos os tipos de gaze, nomeadamente tecido e tecido não tecido. Por sua vez, nas condições de quitosano e NaturALL recorreu-se a goblés de 100 mL, como se pode observar na Figura 2.2.

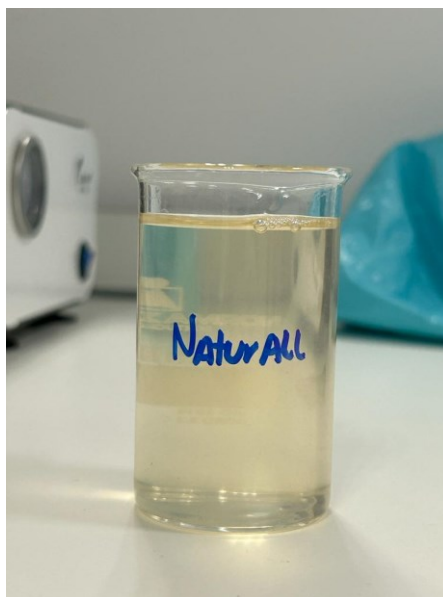


Figura 2. 2 - Goblé contendo a solução NaturAll

2.3. Simulação da Condição controlo (meio de cultura basal)

De forma a replicar a condição controlo, mimética de um ambiente normal corporal de um indivíduo saudável, o meio a utilizar para os testes de citotoxicidade foi preparado de um lote de DMEM suplementado com FBS e ATB cujo pH foi ajustado aproximadamente a 7.3 (pH = 7.29) (pH reportado como ideal para o crescimento das células em estudo). O ajuste do pH foi feito com recurso a uma solução de ácido clorídrico (Fisher Chemical, ThermoFisher, EUA) (2M).

2.4. Simulação da Condição Inflamatória Aguda

Uma vez que as gases são comumente aplicadas em locais de inflamação, é necessário replicar *in vitro* estas condições de inflamação. Para tal, foi preparado um lote adicional de DMEM suplementado com FBS e ATB cujo pH foi ajustado aproximadamente a 6

(pH reportado como um pH característico de um estado de inflamação). O ajuste do pH foi feito com recurso a uma solução de ácido clorídrico (2M).

Desta forma, todos os ensaios que se seguem foram efetuados para ambas as condições distintas nomeadamente condição normal/saudável (pH = 7.29, meio neutro) e condição inflamatória (pH = 6.05, meio ácido).

2.5. Ensaio de contacto direto

Para efetuar o ensaio de contacto direto, as células, após alcançarem o estado de confluência desejado, foram transferidas para uma placa de 48 poços (TPP, Suíça) na densidade ideal para o início do ensaio. Para tal, o meio de cultura foi removido, seguindo-se um passo de lavagem com solução estéril de Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline (Thermo Fisher Scientific, Massachussets, EUA). Posteriormente, a tripsina-EDTA (BIOWEST, France) foi adicionada e as células incubadas durante 5 min a 37 °C numa atmosfera humidificada com 5 % de CO₂. Após incubação, adicionou-se às células o meio adequado (pelo menos o dobro do volume de tripsina-EDTA de forma a neutralizar o seu efeito) para posterior centrifugação (Hettich Rotofix 32A, Germany) a 1300 rpm durante 5 min. Após centrifugação e adição de novo meio de cultura retirou-se 10 µL de suspensão celular e adicionou-se a uma câmara de Neubauer (Assistent, Alemanha) para posterior contagem.

Para o cultivo das células na placa de 48 poços, foram transferidas 15 000 células para cada poço, em 250 µL de meio adequado para cada linhagem celular em teste. Posteriormente, a placa foi incubada durante 24 h a 37 °C numa atmosfera humidificada com 5 % de CO₂.

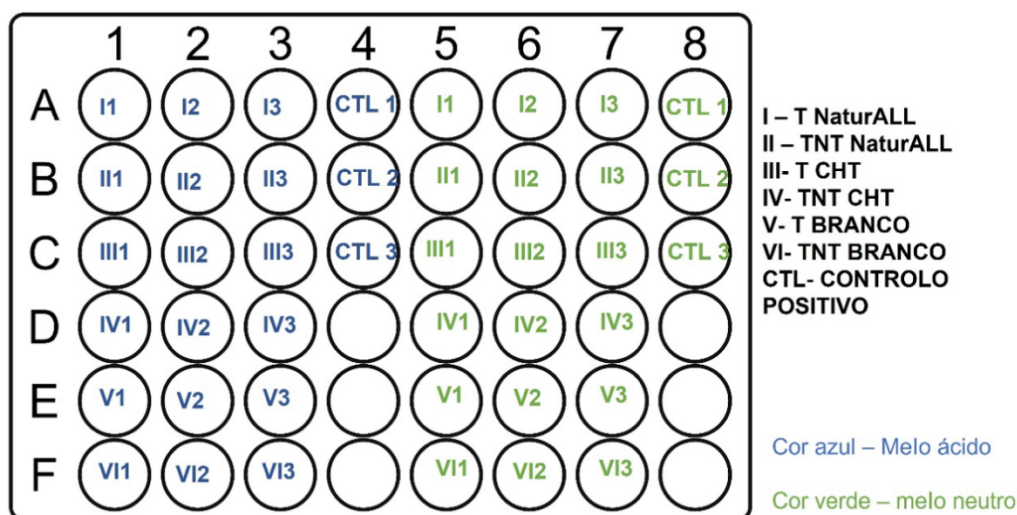


Figura 2. 3 - Esquema representativo da disposição das amostras na placa de 48 poços

Após a incubação de 24 h, onde as células cresceram de forma muito similar para todos os poços cultivados, foram colocadas no poço correspondente, as gazes previamente preparadas (secção 2.2). Simultaneamente, o meio de cultura foi removido e substituído por meio de cultura fresco (meios de condição normal e condição inflamatória aguda, como descrito nas seções 2.3 e 2.4), nomeadamente com um volume de 500 a 750 µL, prevenindo a adsorção de todo o meio pela gaze. Após 24 h a 37 °C numa atmosfera humidificada com 5 % de CO₂, a interação entre células e materiais foi visualizada num microscópio ótico com contraste de fase e diferentes objetivas (10x e 20x) (Zeiss, Alemanha). As fotos representativas da avaliação qualitativa de cada condição foram possíveis acoplando uma câmara (Zeiss, Alemanha) ao microscópio, e usando o programa PROVIEW (Optika, Itália).

Depois de realizada a avaliação qualitativa seguiu-se a análise quantitativa, conseguida através de um teste de viabilidade celular por determinação da atividade metabólica (fluorescência): Alamar blue[®]. Este é um composto que contém resazurina, cuja função se baseia na indicação da viabilidade celular, com base na capacidade redutora das células vivas. Ao penetrar nas células em estado ativo, a resazurina sofre uma reação de redução, transformando-se em resorufina, um composto intensamente fluorescente de coloração avermelhada.

Tabela 2. 1 – Condições de utilização para o ensaio de AlamarBlue[®] (ThermoFisher Scientific, 2023)

	AlamarBlue[®]
Emissão	560/590 nm
Absorvância	570 nm
Condições de armazenamento	4 °C

Para cada poço, foi removido o meio de cultura e o material e adicionado 500 µL de meio de cultura com Alamar Blue[®] (0.2 mg/mL em meio de cultura suplementado). É importante salientar, que previamente foi efetuado um teste de Alamar Blue[®] às membranas e ao material em questão, onde se verificou que a migração celular para estes era insignificante. Assim, decidiu-se que seria melhor a remoção destes antes da adição do Alamar Blue[®], anulando qualquer possível reação entre o este reagente e o material (reação esta que também verificamos acontecer). Após adição, a placa foi colocada a incubar durante 3 h a 37 °C numa atmosfera humidificada com 5 % de CO₂, protegido da luz.

Após 3 horas, o conteúdo de cada poço foi colocado em triplicado numa placa de 96-poços branca (ideal para ensaios de leitura de fluorescência, VWR, EUA). A fluorescência foi lida utilizando um leitor de placas de multideteção FLUOstar Omega (BGM Labtech, Ortenberg, Alemanha), sendo utilizados os softwares Omega-Control (Omega, EUA) e Omega-Data Analysis (Omega, EUA) para determinar as configurações da leitura da placa e visualização dos resultados.

Para determinar a viabilidade celular, com base nos resultados de atividade metabólica devolvidos pelos valores obtidos de fluorescência, foi utilizada a seguinte equação (Equação 1):

$$Viabilidade\ celular\ (\%) = \frac{URFa \times 100}{URFb},$$

Equação 1 – Cálculo da viabilidade celular em percentagem

URF a- Unidades relativas a fluorescência obtida para a amostra em análise;

URF b- Unidades relativas a fluorescência obtida para o controlo.

A condição controlo representa as células apenas em contato com o respetivo meio de cultura suplementado e foi denominada como controlo negativo (C-), já que é a condição que não apresenta efeito citotóxico.

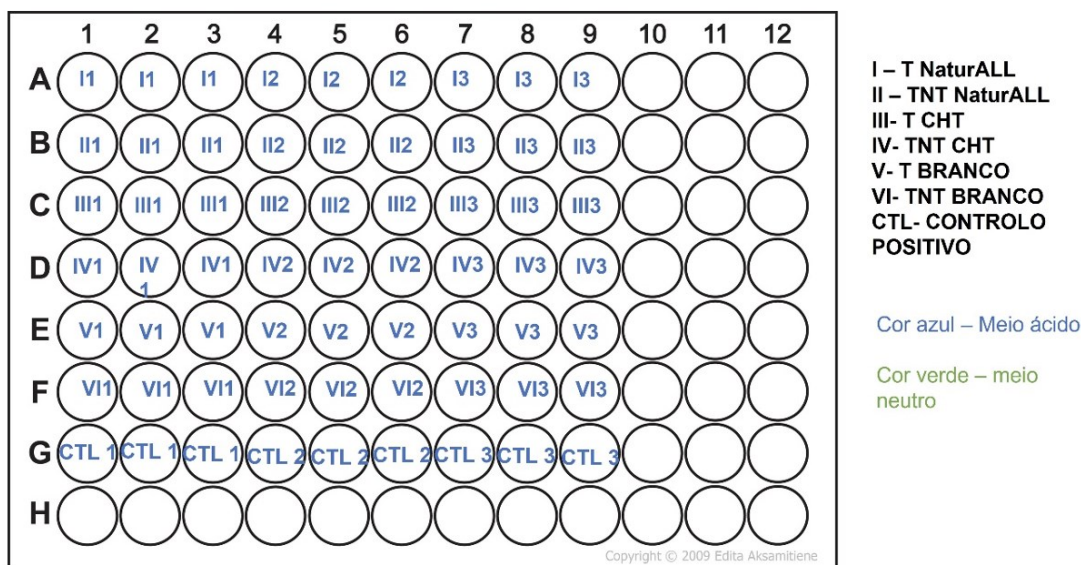


Figura 2. 4 - Esquema representativo da disposição das amostras na placa de 96 poços

2.5.1. Exposição prolongada durante 5 dias

A exposição prolongada foi feita numa estufa (Binder, NY, EUA), deixando as células em contacto com o meio na placa de 48 poços durante 5 dias de maneira a simular um contacto de curto prazo para ver a evolução e crescimento das células de maneira a mais tarde, ter um termo de comparação temporal intermédio. O ensaio para determinar a viabilidade celular qualitativamente e quantitativamente foi realizado com mesmo protocolo descrito no ponto 2.5.

2.6. Simulação do envelhecimento das gizes em condição normal e em condição de inflamação crónica: Ensaio de envelhecimento acelerado

Para mimetizar o que acontece a nível de interação células humanas - gaze a médio prazo (quando esquecido durante algum tempo dentro do corpo) foi investigado um protocolo que simulasse o estado da gaze após estar bastante tempo dentro do corpo sem que precisássemos desse tempo real para realizar este estudo. Para tal, usamos como base os ensaios de determinação de tempo útil de prateleira para dispositivos médicos, em que é sugerido o envelhecimento acelerado. Este método é determinante para simular a passagem do tempo e tem por base a premissa que a taxa de reação química se intensifica devido à variação de temperatura. Conforme a temperatura aumenta, a velocidade das reações também aumenta. O método do envelhecimento acelerado emprega assim temperaturas mais altas com o propósito de acelerar o processo de envelhecimento, simulando assim o envelhecimento real ao longo do tempo, mas de forma artificial (*Accelerated Aging Test*, 2023). Este ensaio baseia-se na equação de Arrhenius, que estabelece que um aumento de temperatura em 10 °C resulta numa duplicação da taxa de uma reação química. Esta função é expressa como um fator Q10, ou seja, a razão entre a taxa de uma reação a duas temperaturas com 10 °C de diferença. Se a velocidade da reação for duplicada, então $Q_{10} = 2$. Esta é a abordagem mais comum utilizada para efetuar o envelhecimento acelerado de dispositivos médicos, e pode ser consultado na norma ASTM F1980 (Pacific Biolabs, 2023).

$$AAF = Q_{10}^{[(T_{AA}-TRT)/10]},$$

Equação 2 - Fórmula para cálculo do envelhecimento acelerado

em que TAA – temperatura de envelhecimento acelerado, TRT – temperatura ambiente (°C), Q_{10} – taxa da reação química e AAF – fator de envelhecimento acelerado (ver Figura 2.4).

Depois de calculado o fator de envelhecimento acelerado (AAF), utiliza-se este valor para se calcular o tempo de envelhecimento acelerado (AAT) que se pretende simular, segundo a seguinte fórmula:

$$AAT = RT/AAF,$$

Equação 3 - Fórmula para o cálculo do tempo de envelhecimento acelerado

em que RT é o tempo de “prateleira”.

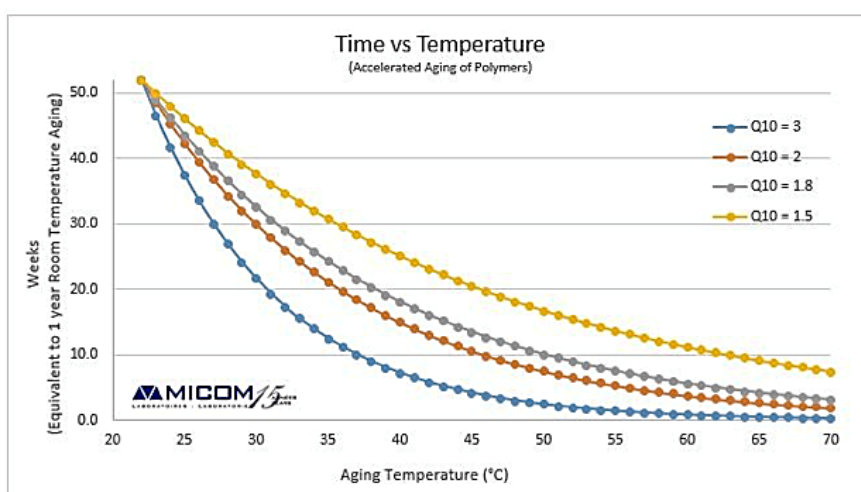


Figura 2. 5 - Correlação entre tempo e temperatura no envelhecimento acelerado (MiCom Laboratoires, 2023)

Posto isto, as gazes de tecido e tecido não tecido foram cortadas, com o intuito de obter, todas na mesma dimensão (2 x 2 cm dobrado 2 vezes). Posteriormente, colocaram-se estas a esterilizar com luz UV na câmara de segurança biológica por 20 min de cada lado (40 min no total). Após esterilização, foram adicionadas a Falcons de 15 mL com 15mL do respetivo meio, consoante a condição a simular, normal e inflamação, respetivamente. Na totalidade, foram preparados 12 Falcons, sendo que 6 continham meio neutro e destes 6 Falcons 3 continham gaze de tecido e os restantes 3 continham gaze de tecido não tecido (o mesmo esquema foi seguido para o meio inflamatório). Posteriormente, foram colocadas numa estufa a 60°C durante 60 dias.

2.7. Ensaio de lixiviados

Após 60 dias numa estufa a 60°C as amostras foram retiradas e sujeitas a um ensaio de citotoxicidade por contacto indireto (lixiviados).

Tirou-se as gazes dos Falcons e utilizou-se o chamado “lixiviado” (extrato do material em estudo) para se fazer o ensaio que ocorre de maneira similar ao contacto direto, mas usando uma solução líquida que entrará em contato com as células. Os lixiviados foram filtrados com filtro de 0.22 μm antes de iniciar os ensaios para assegurar a sua esterilidade. A partir deste momento repete-se os procedimentos efetuados no ensaio de contacto direto. (ver ponto 2.5.)

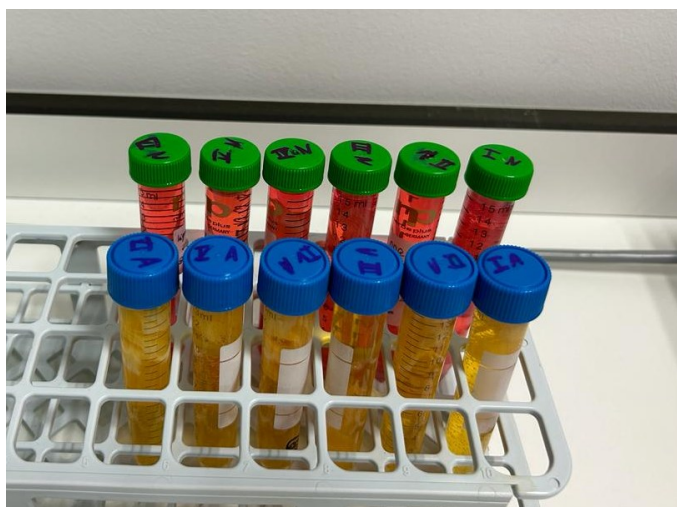


Figura 2. 6 – Tubos de Falcon com as condições a testar (meio ácido e meio neutro)

2.8. Análise Estatística

Os dados foram expressos como média $\pm$ desvio padrão (DP) das réplicas e analisados com o software de estatística presente no GraphPad (versão Prism 10) (Nova Iorque, NY, EUA). Na sua generalidade foram testadas 3 réplicas por condição, com cada ensaio a ser repetido 2 vezes.

Primeiramente, foi efetuada uma correção dos dados, em que os valores acima de 100% foram anulados e convertidos em 100%. Posteriormente, efetuou-se uma análise e consequente remoção dos outliers.

Foram executados testes paramétricos, assumindo-se uma distribuição normal de acordo com o teste de Shapiro-Wilk (teste de normalidade) para todos os dados. Para a análise estatística dos ensaios de contacto direto, envelhecimento e lixiviados também foi utilizado o teste ANOVA One-Way para amostras independentes tendo sido feito uma correção com o teste de Tukey. As diferenças estatísticas foram consideradas significativas com valores de $p < 0.05$ (*), $p < 0.01$ (**) e $p < 0.001$ (***).

3. Resultado e Discussão

3.1. Escolha das linhagens celulares

Primeiramente, é importante averiguar a adequação das linhagens celulares com base nos fins experimentais do seguinte projeto de mestrado.

Como referido na secção (ver secção 1.3.4.1), os fibroblastos caracterizam-se como células que se encontram amplamente distribuídas pelo corpo humano, sendo que podem ser encontrados em locais como a derme e variados tecidos humanos, incluindo o tendão, o ligamento e a pele. Especificamente, por serem encontrados em diversos locais do corpo humano, linhagens celulares de fibroblastos caracterizam-se como uma escolha apropriada para a tipologia de testes que se pretende aplicar. Como mencionando anteriormente, instrumentos médicos e materiais têxteis médicos, em particular gazes cirúrgicas, poderão ser esquecidas em qualquer localização do corpo dependendo da zona que se pretende operar/ intervir. Desta forma, é possível inferir como independente do local anatómico de esquecimento, o material em questão irá inevitavelmente estar em contacto com fibroblastos.

Por sua vez, as HCT-15 são células do cólon, que se encontram na região abdominal de um humano. Particularmente, esta linhagem celular lida com células tumorais, que, por sua vez, podem causar doenças graves no caso de ocorrência de mutações (Subramanian et al., 2016). Como explicado anteriormente, a região abdominal é um local extremamente vulnerável aquando da sua operação, sendo que grande percentagem das gazes esquecidas fica retida exatamente na zona abdominal (ver secção 1.1). Desta forma, estas células estarão suscetíveis a estarem num local inficionado podendo, por consequente, agravar a vida do doente. Por esta mesma razão, esta linhagem celular apresenta-se como uma boa escolha para os testes que serão aplicados.

3.2. Quantificação da capacidade de absorção das gazes

De modo a garantir a melhor absorção possível por parte das gazes, tanto de tecido como de não tecido, efetuou-se para cada gaze duas imersões por condição.

Como se pode observar na tabela 3.1 referente às gazes tecido não tecido (TNT), relativamente às soluções dos compostos bioativos, a quantidade de solução de quitosano absorvida ($V_t = 100$ mL) é substancialmente superior comparativamente ao volume da solução de NaturALL ($V_t = 80$ mL). Contrariamente na tabela 3.2 referente às gazes tecido, é possível observar como a solução de NaturALL ($V_t = 85$ mL) é absorvida em

maior quantidade em relação a solução de quitosano ($V_i = 60$ mL). Estes resultados podem ser importantes para explicar alguns valores obtidos para a viabilidade celular, que será apresentada e discutida de seguida.

Tabela 3.1 – Capacidade de absorção das gazes tecido não tecido de diferentes soluções água destilada, quitosano, NaturALL

Tecido não tecido (TNT)	Branco (água destilada)	Quitosano (*)	NaturALL
	250 mL	85mL	55 mL
1ª imersão	($V_i = 1000$ mL; $V_f = 750$ mL)	($V_i = 100$ mL; $V_f = 15$ mL)	($V_i = 100$ mL; $V_f = 45$ mL)
	50 mL	15 mL	25 mL
2ª imersão	($V_i = 750$ mL; $V_f = 700$ mL)	($V_i = 100$ mL; $V_f = 85$ mL)	($V_i = 45$ mL; $V_f = 20$ mL)
Pick-up final	30%	100%	80%

(*) – nesta condição foi necessário fazer nova solução devido à grande absorção registada neste tecido.

Tabela 3. 2 - Capacidade de absorção das gazes tecido de diferentes soluções água destilada, quitosano, NaturALL

Tecido (T)	Branco (água destilada)	Quitosano	NaturALL
	125 mL	35 mL	50 mL
1ª imersão	($V_i = 1000$ mL; $V_f = 875$ mL)	($V_i = 100$ mL; $V_f = 65$ mL)	($V_i = 100$ mL; $V_f = 50$ mL)
	30 mL	25 mL	35 mL
2ª imersão	($V_i = 1000$ mL; $V_f = 845$ mL)	($V_i = 65$ mL; $V_f = 40$ mL)	($V_i = 50$ mL; $V_f = 15$ mL)
Pick-up final	15,5%	60%	85%

De modo a entender a razão da maior absorção dos diferentes tipos de gaze quando impregnadas com determinados revestimentos, observou-se no microscópio tanto a disposição das fibras como a estrutura tridimensional (Figura 3.1). Desta forma, consegue-se observar como a estrutura das gazes de tecido (Figura 3.1 A) e B)) é muito

mais aberta e de porosidade mais organizada em relação as gazes de tecido não tecido (Figura 3.1 C) e D)). As gazes de tecido não tecido caracterizam-se pela sua estrutura relativamente mais desorganizada, comprimida e compactada, ou seja, existe uma menor porosidade entre fibras.

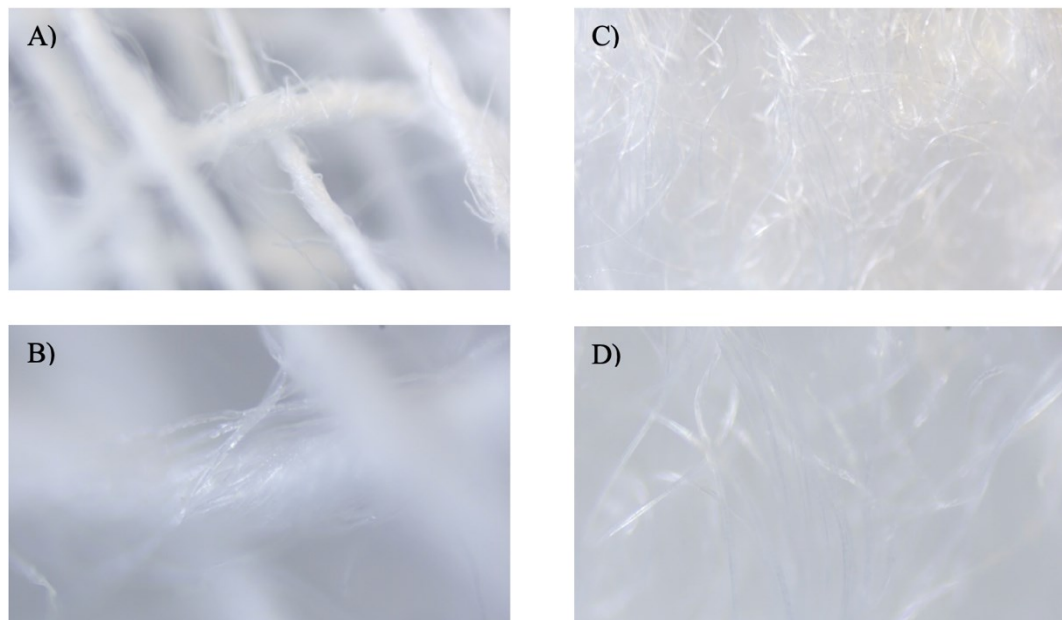


Figura 3. 1 - Imagem de microscopia das gazes em estudo. A) Gaze de tecido com ampliação 4x; B) Gaze de tecido com ampliação 10x; C) Gaze não tecido com ampliação 4x; D) Gaze não tecido com ampliação 10x.

Posto isto, é possível inferir que as gazes TNT têm, devido à sua estrutura tridimensional mais compacta, porém desorganizada, uma capacidade de absorção superior comparativamente às gazes tecido.

3.3. Ensaio Celular de Contacto Direto

O método de contato direto permite estabelecer uma interação imediata entre dispositivos médicos e células animais e/ou humanas cultivadas em ambiente controlado. Desta forma, a análise citotóxica envolve tanto a observação de eventuais alterações morfológicas das células como a quantificação das variações na viabilidade celular, permitindo uma avaliação direta do impacto destes materiais sobre as células (Frei et al., 1987; LI et al., 2015). Por sua vez, este método é baseado na norma ISO 10993-5:2009 que especifica as técnicas de ensaio para determinar a citotoxicidade dos dispositivos médicos *in vitro*.

Estas abordagens requerem a incubação de células cultivadas em contacto direto ou indireto com um dispositivo e/ou extratos de dispositivos (lixiviados) e têm como objetivo avaliar a resposta biológica das células de mamíferos *in vitro* através da utilização de critérios biológicos relevantes (ISO 10993-5:2009 - *Biological Evaluation of Medical Devices — Part 5: Tests for in Vitro Cytotoxicity*, 2022).

3.3.1 Simulação da condição controlo em meio basal com linhagem BJ

Na figura 3.2. observa-se a viabilidade da linha celular BJ aquando da exposição às 6 condições em estudo, nomeadamente o branco (água destilada), o quitosano (para fins comparativos) e o NaturALL nos diferentes substratos-base (tecido e TNT). O controlo negativo (controlo -) representa uma condição padrão de não citotoxicidade. Este ensaio foi efetuado com o intuito de simular a condição controlo em meio basal de um adulto.

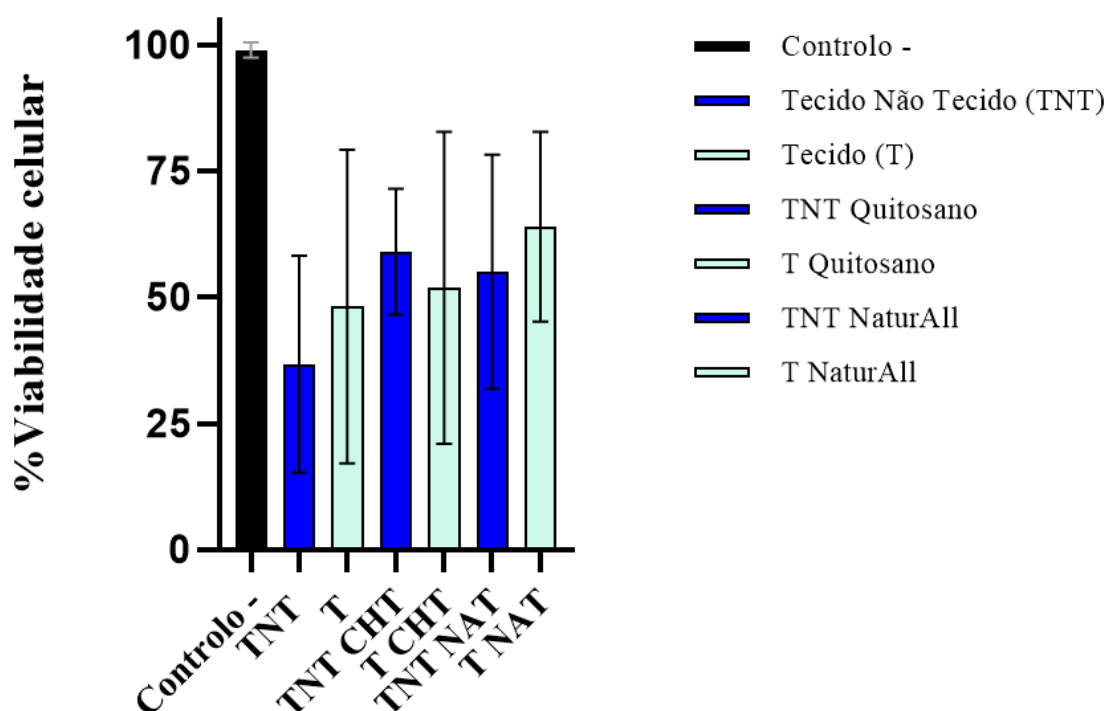


Figura 3. 2 - Viabilidade celular (em %) da linhagem BJ num ensaio de contacto (2 ensaios com 3 réplicas cada) direto simulando a condição saudável.

Primeiramente, verifica-se que a gaze não tecido e a gaze de tecido apresentam uma viabilidade semelhante quando impregnadas com água (branco), $36.7 \pm 21.5 \%$ e $48.1 \pm 31.1 \%$, respetivamente, ($p > 0.05$). Este resultado não é satisfatório, com os materiais a apresentarem um potencial citotóxico superior a 50% (viabilidade inferior a 50%). Estes resultados não vão ao encontro do esperado, assim como é possível observar num estudo realizado em 2019. Este, reporta uma análise do impacto dos diferentes tipos de gazes sobre a viabilidade celular de fibroblastos, demonstrando que tanto as gazes em algodão como as gazes em poliéster não apresentam um impacto significativo sobre a mesma (Wiegand et al., 2019). No entanto, as gazes testadas nesse estudo eram impregnadas com vaselina, quer para o algodão quer para o poliéster. Na realidade, quando se fala em aplicações pontuais da gaze (colocar e tirar no mesmo dia) uma viabilidade entre 50-70%

pode não ser impactante, no entanto, o mesmo não se pode dizer na ótica do esquecimento ou de utilização tópica prolongada (Huzum et al., 2021). Por tudo isto, é evidente a necessidade de desenvolver novas estratégias para aumentar a viabilidade e respetiva biocompatibilidade das gazes. A impregnação das gazes com quitosano poderia ser uma solução para incrementar a viabilidade celular, havendo inúmeros trabalhos a reportar a sua biodegradabilidade e biocompatibilidade com células humanas. Assim, analisando os resultados referentes ao quitosano, verifica-se que quando impregnada com o polissacarídeo, a gaze não tecido apresenta uma maior viabilidade ($59.1 \pm 12.5 \%$) face à gaze de tecido ($51.9 \pm 30.9 \%$). Apesar de haver uma maior viabilidade para a gaze não tecido impregnada com quitosano comparativamente à gaze de tecido, esta diferença não é estatisticamente significativa ($p > 0.05$), indicando que ambos os tipos de gaze permitem uma viabilidade celular acima de 50 %. Apesar de a citocompatibilidade ser superior à apresentada no controlo (gazes sem funcionalização), o objetivo é aproximar o valor de viabilidade ao limite de aceitação (70%). No âmbito deste projeto, a formulação de NaturALL é estudada como uma possível solução para o incremento da biocompatibilidade.

Relativamente à impregnação com NaturALL, através da Figura 3.2 é possível verificar que a gaze de tecido (em algodão) impregnada com a solução de NaturALL apresenta uma viabilidade celular superior de $64.0 \pm 18.8 \%$ comparativamente à gaze não tecido ($55.1 \pm 23.2 \%$). É de notar, que apesar desta diferença de aproximadamente 10 % em viabilidade, os resultados obtidos não são estatisticamente diferentes ($p > 0.05$), indicando, então, que há alguma variabilidade entre réplicas que aproxima a viabilidade celular obtida para ambos os tipos de gaze testado. Conclui-se que, após 1 dia de contacto material-células, ambos os tipos de gazes estudados aumentaram a percentagem de viabilidade celular quando impregnados com a solução inovadora NaturALL. Não obstante, são necessárias otimizações ao método de acabamento ou formulação, de forma a incrementar o aumento de citocompatibilidade. Apesar de não serem alcançados valores médios superiores a 70% de viabilidade celular, é importante realçar que a gaze de tecido apresenta uma percentagem de viabilidade celular próxima do limite aceitável ($64.0 \pm 18.8 \%$).

Posto isto, é necessário salientar como a viabilidade celular é aumentada aquando da impregnação das gazes com as soluções em questão. Tanto no caso de quitosano como no de NaturALL a viabilidade celular é superior a 50 %, contrariamente aos resultados obtidos para as duas gazes controlo (viabilidade inferior a 50 %). O aumento de

viabilidade aquando da impregnação com quitosano era expectável, uma vez que a sua capacidade de proliferação celular já se encontra reportada na literatura (Martín-López et al., 2013). Relativamente ao NaturALL, os ensaios realizados numa condição controlo em meio basal (não inflamatória) mostram um impacto positivo sobre a viabilidade celular, indo ao encontro do expectável dada a composição desta formulação. Uma das características da solução de NaturALL é a sua riqueza em compostos fenólicos. Por compostos fenólicos entendem-se compostos que contêm anéis aromáticos hidroxilados, estando o grupo hidroxil ligado diretamente ao fenilo, ao fenilo substituído ou a outro grupo arilo (Swanson, 2003). Os compostos fenólicos apresentam inúmeras características benéficas, uma vez que são antioxidantes, antidiabéticos, anticarcinogénicos, antihipertensivos, antibacterianos, entre outros. Um estudo conduzido por Merecz-Sadowska (2021) demonstrou uma correlação positiva entre a viabilidade e proliferação celular de fibroblastos e a presença de compostos fenólicos (Merecz-Sadowska et al., 2021). Desta forma, e tendo em conta os resultados apresentados, a presença de compostos fenólicos na composição da solução NaturALL poderá conduzir a uma viabilidade celular aumentada aquando do contacto direto com gazes impregnadas com a solução em estudo, sendo necessário ainda otimizações.

Curiosamente, e concretamente, no caso das gazes não tecido verifica-se que a impregnação com quitosano resulta numa viabilidade superior comparando com a impregnação com a solução NaturALL aquando do contacto direto. Isto pode dever-se a inúmeros fatores, sendo que por consequente se colocam as seguintes hipóteses:

- ✓ Menor permeabilidade da gaze TNT para o NaturALL (ver seção 3.2);
- ✓ Menor estabilidade das ligações entre a gaze e a solução em estudo.

Contrariamente, as gazes de tecido impregnadas com NaturALL apresentam uma viabilidade celular superior ($64.0 \pm 18.8 \%$) comparativamente à gaze com quitosano, e pode ser novamente relacionado com a permeabilidade. No caso das gazes de tecido, estas apresentam maior permeabilidade para o NaturALL em relação ao quitosano (ver seção 3.2).

Assim, a viabilidade celular das gazes varia de acordo com tipologia de gaze, muito devido a questões como a composição química e os grupos reativos disponíveis, a morfologia e a permeabilidade da gaze, que logicamente irá ter comportamentos diferentes consoante a solução de impregnação a utilizar.

Verifica-se, então, que as gazes não tecido apresentam maior viabilidade quando impregnadas com quitosano, enquanto para as gazes em algodão se observam resultados mais favoráveis aquando da impregnação com NaturALL.

Além da análise quantitativa, também se fez uma análise qualitativa pela observação da morfologia celular e interação de material e células no microscópio. Como se pode observar na figura 3.3 A), imagem representativa correspondente ao controlo negativo (condição padrão que não resulta num efeito citotóxico), as células apresentam-se bem alongadas na sua morfologia característica, a proliferar, representando um estado em que as células estão metabolicamente ativas e viáveis. Ao observar as imagens que representam as condições de TNT (B, C e D), vemos filamentos que se soltaram do tecido e as células apresentam uma morfologia pontiforme, saindo da sua morfologia normal, enquanto as condições de T (E, F e G) apresentam uma morfologia mais próxima do controlo (alongadas). É também de notar que, ao contrário dos resultados quantitativos, as células na condição TNT quitosano (figura 3.3 F)) apresentam-se morfologicamente alteradas, com alguns indícios de lise celular, relativamente ao T quitosano (figura 3.3 C)) o que pode sugerir que apesar de estarem metabolicamente ativas e apresentarem um bom resultado quantitativo, morfologicamente podem já apresentar algum stress oxidativo.

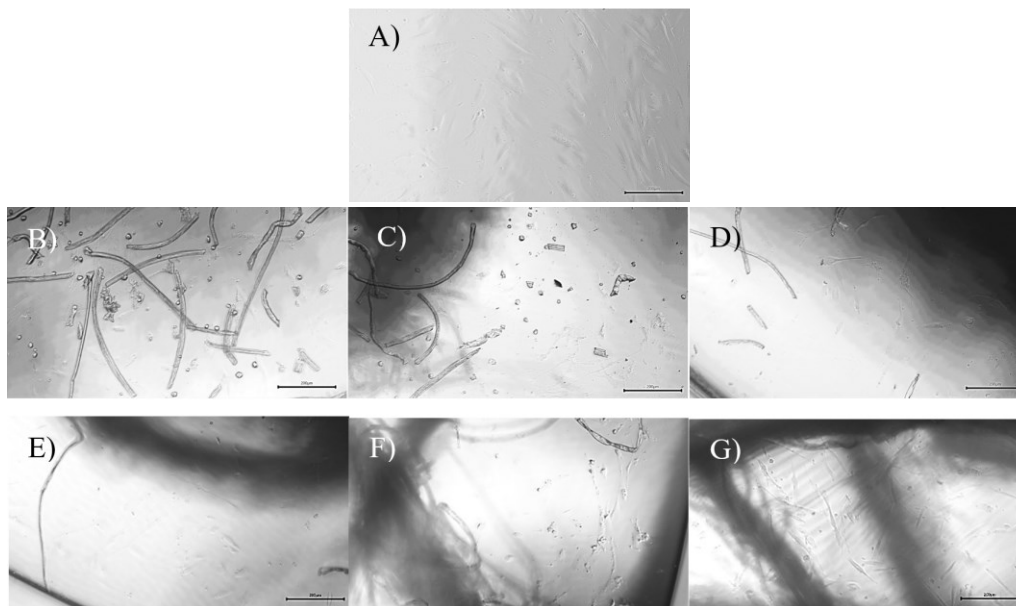


Figura 3. 3 - Imagens de microscopia das gazes testadas. A) Controlo Negativo (condição padronizada que não resulta numa resposta citotóxica); B) TNT impregnada em água; C) TNT impregnada em quitosano; D) TNT impregnada em NaturALL; E) T impregnada em água; F) T impregnada em quitosano; G) T impregnado em NaturALL. Todas as imagens partilham a mesma escala (200µm) e ampliação(10x).

3.3.2 Simulação condição de inflamação aguda com linhagem BJ

A partir da figura 3.4, é possível observar a tendência de viabilidade da linha celular BJ após exposição às 6 condições em estudo, sendo que neste ensaio foi simulada a condição de inflamação aguda.

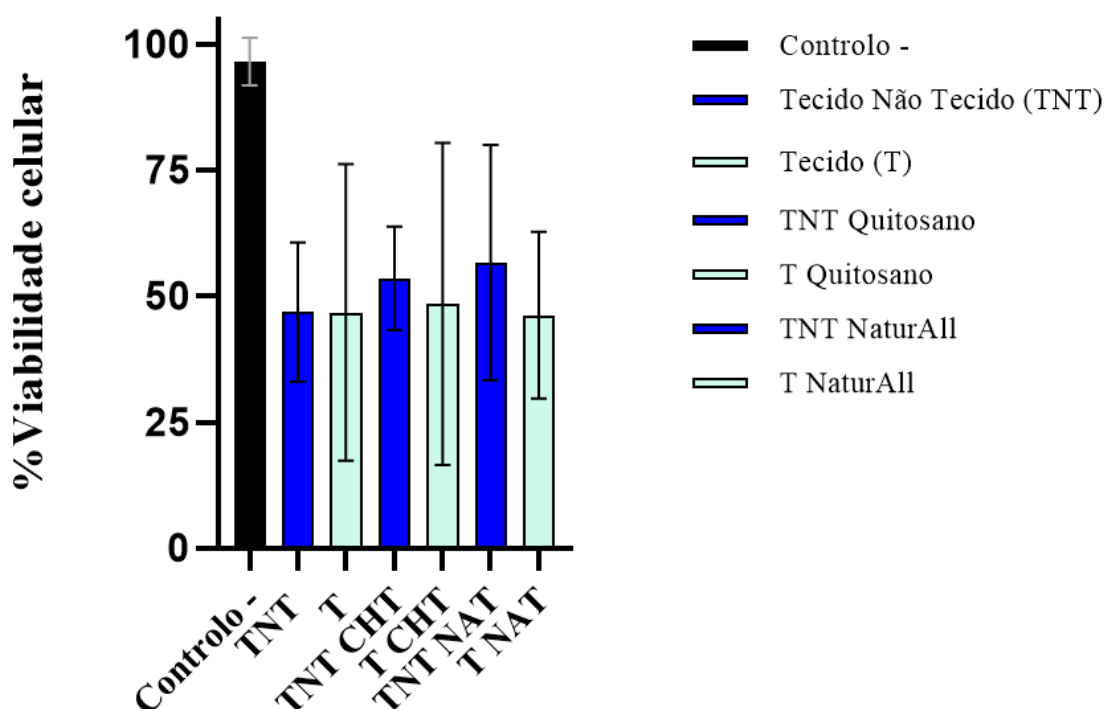


Figura 3. 4 - Viabilidade celular (em %) da linha BJ num ensaio de contacto direto simulando a condição de inflamação aguda.

Em primeiro lugar, observa-se como ambos os tipos de gaze (não tecido e tecido) revelam uma viabilidade celular semelhante quando submersas em água (branco), $46.9 \pm 13.8\%$ e $46.8 \pm 29.5\%$, respetivamente, ($p > 0.05$). Como mencionado anteriormente, é desejável alcançar uma viabilidade 70 % (Huzum et al., 2021), pelo que é sugerida a impregnação destes tecidos com soluções poliméricas e biocompatíveis alternativas.

Iniciando a discussão a partir da comparação entre os dois tipos de gazes impregnadas com quitosano, é possível observar na Figura 3.4 como a gaze não tecido ($53.6 \pm 10.3\%$) apresenta uma viabilidade celular superior face à gaze de tecido ($48.5 \pm 31.9\%$). No entanto, é de notar que as diferenças obtidas para ambos os tipos de gazes não são estatisticamente significativas ($p > 0.05$), indicando, mais uma vez a proximidade de resultados das condições em estudo. Comparando com a condição controlo (não inflamatória, pH fisiológico), verifica-se que o comportamento é semelhante, ou seja, a viabilidade celular aproxima-se de 50 % para ambas as condições. Ademais, o

comportamento observado por tipologia de gaze é idêntico em ambas as situações (saúdável e inflamação aguda), ou seja, a gaze não tecido apresenta uma viabilidade celular superior à gaze de tecido, sem diferenças significativas ($p > 0.05$). Desta forma, pode-se justificar o comportamento observado de forma semelhante à secção 3.3.1, em que é descrito como o quitosano tem propriedades benéficas a nível do crescimento e proliferação celular (Souza et al., 2019).

Avançando com a análise dos resultados obtidos após impregnação com o NaturALL, verifica-se que a gaze não tecido (56.6 ± 23.4 %) apresenta uma maior viabilidade relativamente à gaze de tecido (46.2 ± 16.5 %). Novamente, observa-se que apesar de ter sido obtida uma diferença de 10 % em viabilidade, estes resultados não são estatisticamente diferentes ($p > 0.05$), ou seja, a viabilidade celular é aproximada para ambos os tipos de gaze testados. Comparando o comportamento celular em condição controlo com meio basal e condição de inflamação aguda, verifica-se que na condição controlo a gaze de tecido impregnada com NaturALL (64.0 ± 18.8 %) apresenta uma maior viabilidade celular face à viabilidade obtida na condição de inflamação (46.2 ± 16.5 %). Este comportamento pode ser explicado através da seguinte hipótese: na condição de inflamação o pH está a níveis mais ácidos, sendo que esta alteração de pH pode alterar a reatividade química dos grupos disponíveis ou a sua configuração nas gazes impregnadas com o NaturALL e por conseguinte alterar a interação entre células e materiais. Como referido num estudo escrito por Kristo Nuutila (Kruse et al., 2017) o pH ácido tem efeitos prejudiciais para as células e consequentemente na sua viabilidade ainda que tenham estado dispostas ao meio por um tempo muito limitado. Além disto, e curiosamente, há alguns estudos que reportam que a presença de grupos fenólicos pode ajudar no tratamento de estados inflamatórios, inibindo a síntese de fatores pró-inflamação (Ambriz-Pérez et al., 2016). No entanto, como os compostos fenólicos são um grupo amplo e heterogéneo, a sua configuração no material é determinante para estes desempenharem um papel anti-inflamatório.

De notar, que contrariamente à condição controlo com meio basal, a viabilidade celular é pouco ou quase nada incrementada após impregnação das gazes com quitosano ou com NaturALL. Isto pode dever-se, hipoteticamente, à alteração de pH efetuada para simular a condição de inflamação aguda, sendo que um pH mais ácido impactará negativamente o crescimento celular (Kruse et al., 2017).

Como referido anteriormente um material para ser considerado citocompatível é necessária uma viabilidade superior a 70 %, algo que não acontece para nenhuma das

condições. Quando a aplicação da gaze é um processo pontual (colocar e tirar), um valor entre 50 e 70 % de viabilidade celular pode até ser considerado aceitável (Huzum et al., 2021), mas o mesmo não é possível quando consideramos o esquecimento do material no corpo humano por períodos indeterminados. Posto isto, se extrapolássemos estes resultados (após 1 dia de contacto) para situações de inflamação crónica o material não é citocompatível, ainda que sejam adicionados os compostos bioativos. Estes resultados serão discutidos mais adiante, com a simulação de uma condição de inflamação crónica. Tal como na seção anterior, e nas restantes, foi feita uma análise qualitativa para melhor compreensão dos resultados (Figura 3.5). Observa-se, no controlo negativo, que a morfologia das células não é a característica, não apresentando o mesmo nível de alongamento que apresentam no meio que simula a condição saudável. Ademais, algumas células até apresentam uma morfologia pontiforme, podendo indicar um início de apoptose celular. Ao contrário do que é observado na condição controlo com meio basal, onde se notam visivelmente diferenças de morfologia celular entre gazes de tecido e gazes TNT, para a condição de inflamação crónica isto não acontece. Aqui, todas as condições se assemelham, ainda que o número de células alongadas pareça ser superior quando as gazes são impregnadas com compostos bioativos. De notar que, apesar da visualização microscópica mostrar que as células proliferaram e grande parte delas estão alongadas, a quantificação pelo Alamar blue[®] não corresponde. Isto pode significar que, parte das células pode já estar em stress oxidativo, contribuindo para a diminuição da sua atividade metabólica.

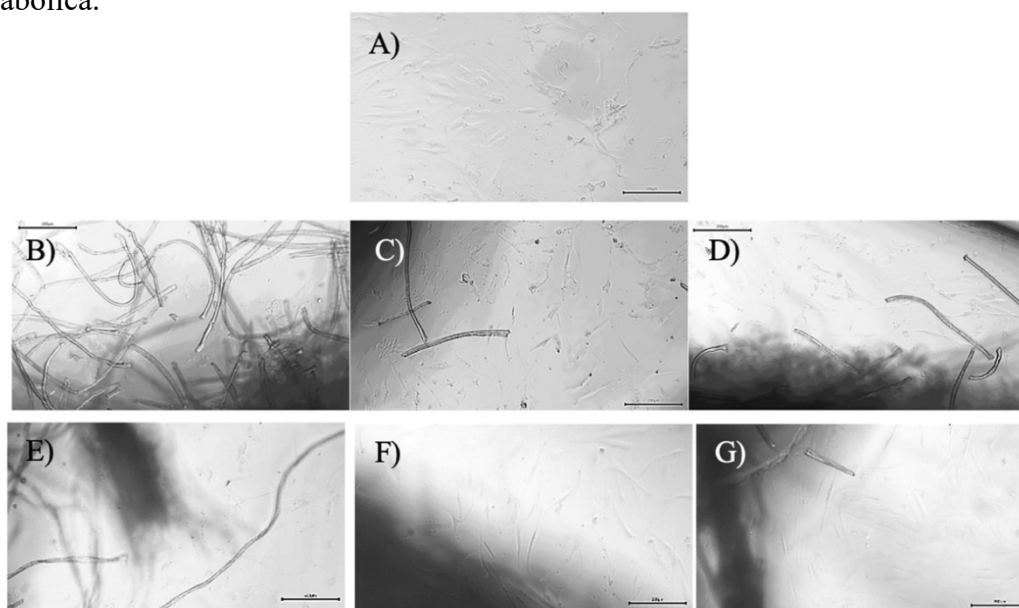


Figura 3. 5 - Imagens de microscopia das gazes testadas, numa condição inflamatória aguda (pH=6). A) Controlo Negativo; B) TNT impregnada em água; C) TNT impregnada em quitosano; D) TNT impregnada em NaturALL; E) T impregnada em água; F) T impregnada em quitosano; G) T impregnado em NaturALL. Todas as imagens partilham a mesma escala (200µm) e ampliação(10x).

3.3.3 Simulação da condição saudável com linhagem BJ após 5 dias de exposição

De forma a entender o impacto de um contacto a curto prazo com as gazes em estudo, efetuou-se uma exposição das células durante 5 dias e as diferentes gazes impregnadas com as 3 soluções em estudo durante o mesmo período, tendo avaliado a viabilidade celular no final do 5º dia (Figura 3.6).

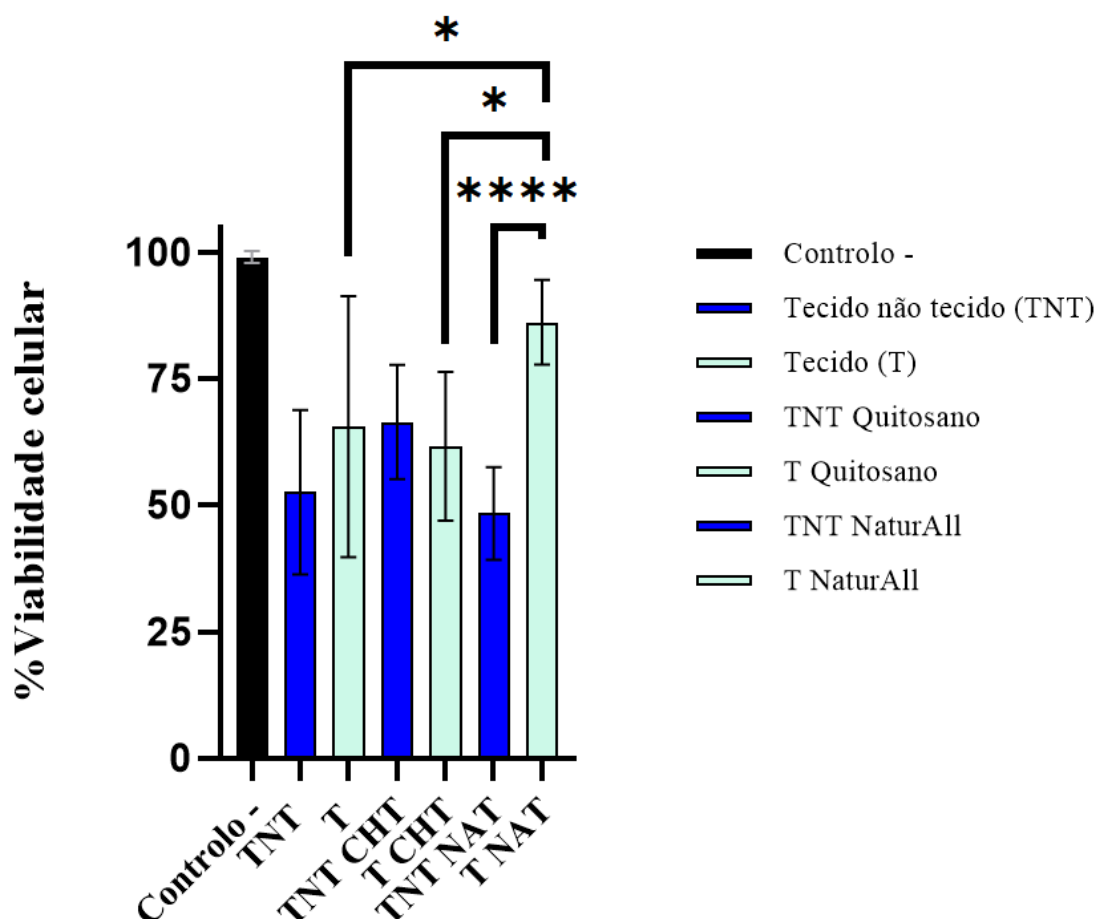


Figura 3. 6 - Viabilidade celular (em %) da linhagem BJ num ensaio de contacto direto (1 ensaio com 3 réplicas para cada condição), simulando a condição saudável após 5 dias. Diferenças estatísticas assinaladas com * ($p < 0.05$) e **** ($p < 0.001$).

De um modo geral, após 5 dias de contato entre material de células, a viabilidade celular aumenta, contra o expectável tendo em conta os resultados obtidos após um dia de contacto. Verifica-se ainda que a gaze de tecido apresenta uma viabilidade celular superior à gaze não tecido, $65.5 \pm 25.8 \%$ e $52.6 \pm 16.3 \%$, respetivamente. No entanto, as diferenças observadas não são estatisticamente significativas devido à grande variabilidade entre réplicas ($p > 0.05$). Apesar da viabilidade celular da gaze de tecido ser quase de 70% , este valor ainda se demonstra como insuficiente para a

citocompatibilidade, destacando mais uma vez a necessidade de uma impregnação adicional.

A partir da Figura 3.6, é possível observar que a gaze não tecido resulta numa viabilidade celular semelhante ($66.4 \pm 11.3 \%$) comparando com a gaze de tecido ($61.7 \pm 14.7\%$), quando impregnadas com quitosano (sem diferenças estatisticamente significativas) ($p > 0.05$). Ambos os resultados estão no limiar de citocompatibilidade, sendo que a variabilidade entre réplicas pode significar a necessidade de otimizar a formulação de impregnação ou método de aplicação. Avaliando o impacto da exposição nas gazes impregnadas com quitosano, verifica-se que não ocorre uma perda significativa da viabilidade entre ambos os pontos de amostragem, indicando, então, que a exposição prolongada a uma semana não afeta a viabilidade celular, sendo possível inferir que a resposta a curto prazo (1 semana) ao esquecimento das gazes não resulta em danos maiores para o utente. Isto vai de encontro ao expectável na literatura onde, para que ocorra um impacto significativo e prejudicial a nível celular aquando da exposição por contacto direto de uma gaze, a exposição necessitaria de ser mais longa (Paddle-Ledinek et al., 2006).

Analisando os resultados relativos ao NaturALL, verifica-se, então, que a gaze em algodão apresenta uma viabilidade celular significativamente superior de $86.2 \pm 8.4 \%$ comparativamente à gaze não tecido ($48.4 \pm 9.2 \%$), com diferenças estatisticamente significativas ($p < 0.001$). Assim, é possível concluir que a impregnação com NaturALL na gaze de tecido apresenta uma capacidade de proliferação celular aumentada aquando da exposição direta com as células. Comparando com os resultados obtidos no primeiro ponto de amostragem, é possível verificar que ocorre um aumento da viabilidade celular ao longo do tempo, aquando da exposição com a gaze de tecido impregnada com NaturALL. Isto pode dever-se às seguintes situações:

- ✓ a impregnação de NaturALL é mais eficiente para fibras naturais (gaze de tecido), onde os grupos reativos das fibras celulósicas se ligam quimicamente com alguns grupos reativos da formulação ao contrário das fibras sintéticas em que a ligação é apenas física;
- ✓ Após as primeiras horas no local onde é estabelecido o contato células-material, o material começa a libertar os seus componentes extratáveis no meio envolvente (lixiviados), criando uma resposta imediata por parte das células;
- ✓ Os lixiviados são transportados para os órgãos/tecidos responsáveis pela sua transformação e metabolização de forma a facilitar a sua excreção. Nesse

momento o material que continua em contacto com o mesmo tecido e células perde a maior parte dos compostos potencialmente tóxicos.

- ✓ Aí, no caso da gaze de tecido, os compostos fenólicos que estão quimicamente ligados ao material permitem a proliferação das células e o aumento da viabilidade celular.
- ✓ uma exposição a curto prazo (5 dias) à gaze de origem natural modificada com o NaturALL incrementa significativamente a proliferação e viabilidade celular, sendo um resultado importante para os desafios a que Tech4MED se propõe.

Posto isto, NaturALL apresenta-se como uma formulação viável para a impregnação de gazes, mais concretamente gazes em tecido (algodão).

Para além disto, é importante ressaltar que a reação entre compostos fenólicos e o material pode ser relativamente lenta. Estes grupos têm a capacidade de modular os níveis de espécies de oxigénio reativas (ROS) nas células, regulando a sua proliferação e sobrevivência. Para as restantes condições este aumento da viabilidade celular não é observado, o que reforça que a presença de compostos fenólicos (NaturALL) tem impacto positivo na biocompatibilidade das gazes de tecido.

Curiosamente, no caso das gazes não tecido verifica-se que a impregnação com quitosano resulta numa viabilidade superior comparativamente com a impregnada com NaturALL, embora as diferenças não se apresentem diferenças estatisticamente significativas ($p > 0.05$), sugerindo que o método de aplicação deve ser otimizado para gazes de não tecido, onde apenas há ligação física entre formulação e material.

Em suma, os resultados obtidos após exposição a curto prazo (5 dias) foram semelhantes ou superiores aos resultados obtidos na secção 3.3.1., indicando uma estabilização da viabilidade celular. No entanto, é de salientar o resultado obtido para a gaze de algodão impregnada com NaturALL, cujo resultado vai de encontro aos objetivos da presente tese.

3.3.4 Simulação condição de inflamação aguda com linhagem BJ após 5 dias de exposição

Como na secção anterior, pretendeu-se compreender o impacto nas BJ da exposição às gazes a curto prazo (5 dias), sendo que nesta secção se efetuou uma simulação da condição de inflamação aguda. Os resultados obtidos relativos à viabilidade celular podem ser observados na seguinte figura (Figura 3.7).

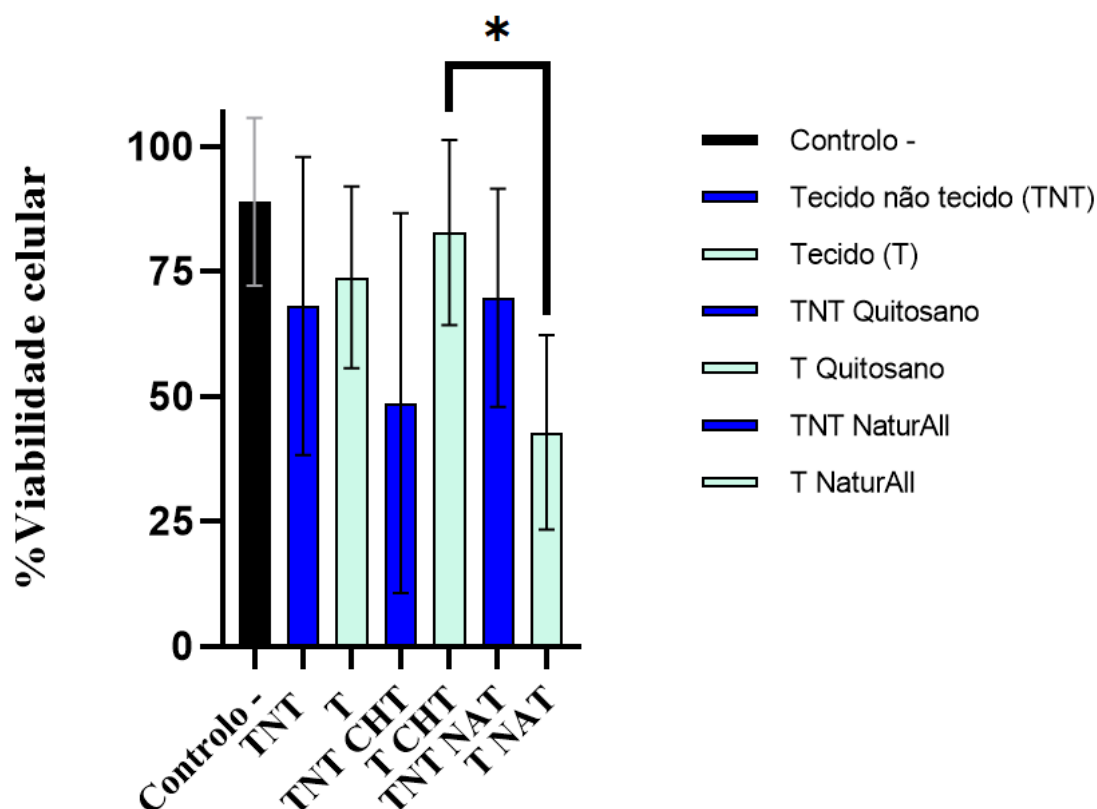


Figura 3. 7 - Viabilidade celular (em %) da linhagem BJ num ensaio de contacto direto (1 ensaio com 3 réplicas por cada condição), simulando a condição de inflamação crónica após 5 dias. Diferenças estatísticas assinaladas com * ($p < 0.05$).

Em primeiro lugar, observa-se como ambos os tipos de gaze (não tecido e tecido) resultam em valores de viabilidade celular similares, $68.1 \pm 29.8 \%$ e $73.9 \pm 18.2 \%$, respetivamente, ($p > 0.05$). Curiosamente ambos os materiais se encontram no limiar de citocompatibilidade, ao contrário dos resultados obtidos até agora.

A partir da Figura 3.7 é possível verificar que a gaze não tecido impregnada com quitosano ($48.6 \pm 38.0 \%$) apresenta uma viabilidade celular reduzida comparativamente à gaze de tecido impregnada com quitosano ($82.9 \pm 18.5 \%$). Já relativamente aos resultados obtidos após impregnação com o NaturALL, observa-se que a gaze não tecido ($69.8 \pm 21.8 \%$) apresenta uma maior viabilidade em comparação com a gaze de tecido ($42.9 \pm 19.5 \%$). As diferenças obtidas para ambos os tipos de gazes e soluções de impregnação não são estatisticamente significativas ($p > 0.05$), sendo que ambas as condições apresentam desvios padrões relevantes que correspondem a uma grande variabilidade entre réplicas. Comparando a viabilidade celular em condição controlo com meio basal e condição de inflamação aguda, é possível concluir que na condição controlo ($86.2 \pm 8.4 \%$) a gaze de tecido impregnada com NaturALL tem uma maior viabilidade celular face à viabilidade observada na condição de inflamação ($42.9 \pm 19.5 \%$). Este

fenómeno foi igualmente observado na secção 3.3.2, sendo que se aplica a mesma justificação para o comportamento celular.

Além disto, ao contrário dos resultados anteriores, a impregnação das gazes de tecido com quitosano resultou em valores viabilidade celular significativamente superiores aos obtidos para a gazes de tecido impregnadas com NaturALL ($p < 0.05$). Isto pode estar relacionado com a destabilização química provocada pelo pH. Assim, é possível inferir que o pH do meio é não só uma condicionante para a proliferação celular, mas também para a reatividade e configuração dos grupos químicos disponíveis na superfície da gaze.

3.4.Envelhecimento

O Teste de Envelhecimento Acelerado mimetiza o envelhecimento em tempo real, acelerando artificialmente o processo de envelhecimento utilizando temperaturas mais elevadas (NelsonLabs, 2023). Neste caso foi utilizada uma incubadora a uma temperatura de 60°C para fazer o envelhecimento no qual as gazes (normais, impregnadas com quitosano e impregnadas com NaturALL) foram envelhecidas durante 60 dias simulando 290 dias (9 meses e 17 dias) de envelhecimento normal (Keystone Compliance, 2023).

3.4.1. Ensaio de contacto direto

3.4.1.1. Simulação da condição saudável (condição controlo com meio basal) com linhagem BJ

A partir da figura 3.8 é possível observar o gráfico correspondente à viabilidade celular da linha celular BJ aquando da exposição às 6. É importante salientar que este ensaio foi efetuado com o intuito de simular a condição saudável de um adulto após um esquecimento da gaze a médio-longo prazo. A submissão a um processo de envelhecimento permitiu transpor obtidos em 60 dias para o que aconteceria em 9 meses e 17 dias de esquecimento intracorporal.

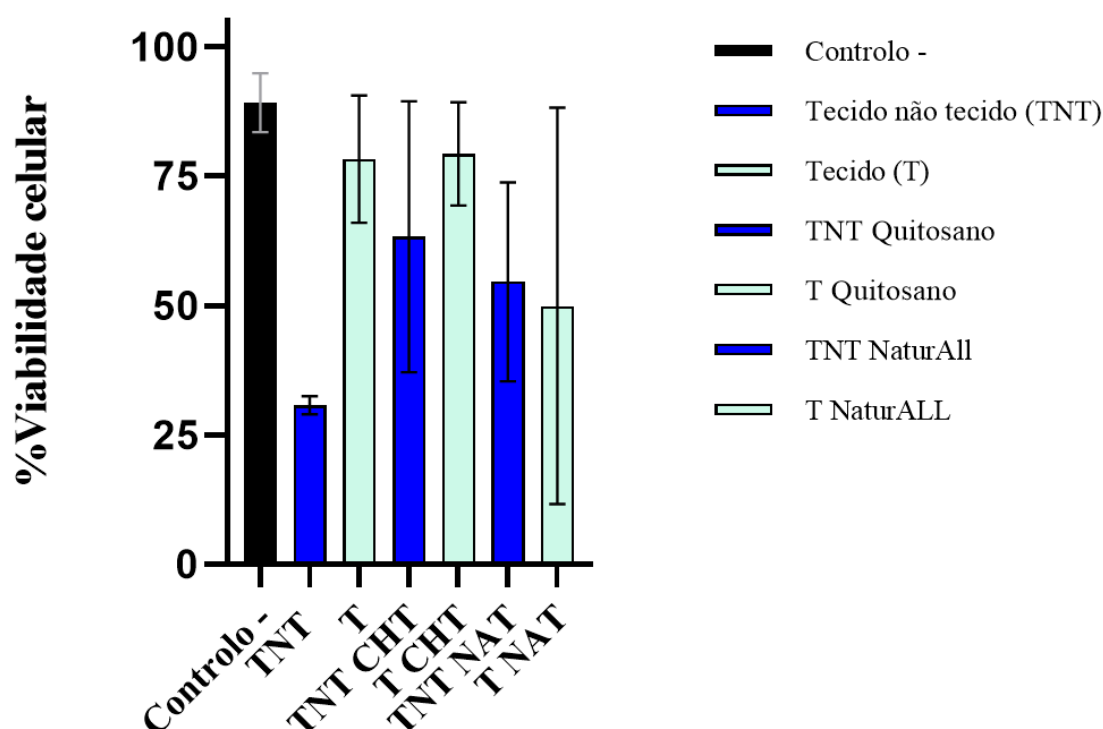


Figura 3. 8 - Viabilidade celular (em %) da linhagem BJ num ensaio de contacto direto (2 ensaios com 3 réplicas para cada condição), simulando a condição saudável após envelhecimento. Diferenças estatísticas assinaladas com * ($p < 0.05$).

Em primeiro lugar, verifica-se que a gaze de tecido apresenta uma viabilidade celular superior à gaze não tecido, com $78.3 \pm 12.3 \%$ e $30.8 \pm 1.8 \%$, respetivamente. Após 9 meses e 17 dias de contato com as células a gaze de tecido apresenta resultados com diferenças estatisticamente significativas relativamente à gaze TNT. Isto sugere que, ao longo do tempo, a composição da gaze ganha relevância, com as fibras celulósicas a apresentarem maior biocompatibilidade que as sintéticas. Segundo um estudo feito em 2021, é demonstrado que as fibras de algodão exibem uma notável citocompatibilidade e, de forma promissora, têm a capacidade de desencadear a diferenciação celular sem depender de agentes químicos indutores. Esses resultados sugerem um considerável potencial da nanofibra de algodão como um novo agente indutor de diferenciação, com amplas aplicações nas áreas de engenharia de tecidos e medicina regenerativa (Zanette et al., 2022). Naturalmente, ao longo do tempo, o material começa a degradar-se, porém as fibras naturais, ao contrário das sintéticas, são biodegradáveis reforçando a menor probabilidade de rejeição e infeção.

Na figura 3.8 é possível também observar que quando impregnada em quitosano a gaze de tecido apresenta uma viabilidade superior ($79.4 \pm 10.0 \%$) quando comparada com a gaze não tecido impregnada com quitosano ($63.3 \pm 26.2 \%$). Tal como referido

anteriormente, a impregnação com quitosano é umas das estratégias utilizadas para aumentar a citocompatibilidade, sendo este efeito mais visível no caso da gaze TNT. A gaze de algodão já apresenta de base uma boa compatilidade quando esquecida dentro do corpo durante 9 meses e 17 dias.

Relativamente à gaze de não tecido impregnada com NaturALL, esta apresenta uma viabilidade celular superior de $54.6 \pm 19.2 \%$ comparativamente à gaze de tecido ($50.0 \pm 38.3 \%$), sem diferenças estatisticamente significativas ($p > 0.05$), havendo alguma variabilidade entre réplicas. Sendo a viabilidade celular inferior a 70% para os dois tipos de gaze, podemos inferir que após 9 meses e 17 dias esquecidas dentro do corpo, as gazes impregnadas com NaturALL apresentam citotoxicidade. De notar, que antes do envelhecimento, ambas as condições (TNT NaturALL e T NaturALL) apresentavam um valor de viabilidade celular maior. Estes resultados indicam que a impregnação com o NaturALL tem impacto positivo para aplicações pontuais a curto prazo (colocar e tirar), não sendo indicada para uma utilização em contrário (longo prazo).

Em relação à análise qualitativa (Figura 3.9) podemos assistir a uma clara degradação na morfologia das células relativamente ao controlo negativo, para as gazes TNT, com exceção na condição de tecido não tecido impregnado com NaturALL. Curiosamente, esta condição apresenta células alongadas e uma boa proliferação celular, comparável ao controlo negativo. Esta diferença entre resultados quantitativos e qualitativos pode dever-se a uma má leitura do leitor de placas/pipetagem, já que além de a visualização do microscópio não corresponder, a variabilidade entre réplicas é enorme. No caso das condições relativas às gazes de tecido, os resultados qualitativos são concordantes com os quantitativos, sendo visível alguma inibição de crescimento na condição impregnada com NaturALL e alguns grânulos intracitoplasmáticos.

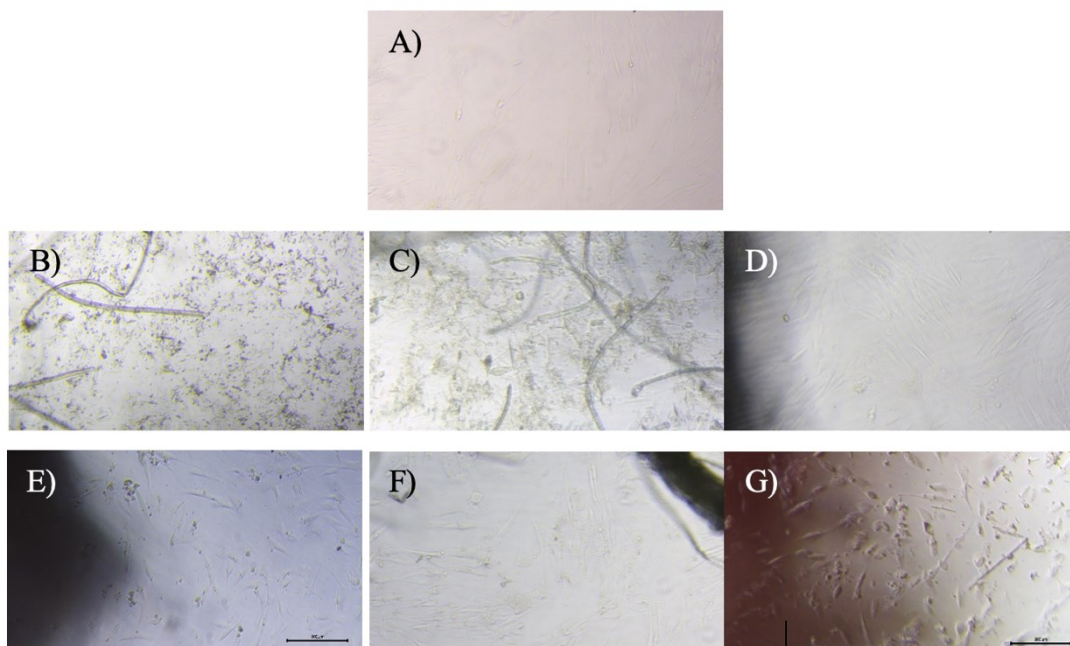


Figura 3. 9 - Imagens de microscopia das gazes testadas, numa condição inflamatória aguda (pH=6). A) Controlo Negativo; B) TNT impregnada em água; C) TNT impregnada em quitosano; D) TNT impregnada em NaturALL; E) T impregnada em água; F) T impregnada em quitosano; G) T impregnado em NaturALL. Todas as imagens partilham a mesma escala (200µm) e ampliação(10x).

3.4.1.2. Simulação da condição de inflamação crónica com linhagem BJ

Como na secção anterior, observou-se o impacto da exposição das gazes após um esquecimento a médio longo prazo correspondente a 9 meses e 17 dias, sendo que nesta secção se efetuou uma simulação da condição de inflamação crónica. Os resultados obtidos relativos à viabilidade celular podem ser observados na seguinte figura (Figura 3.10).

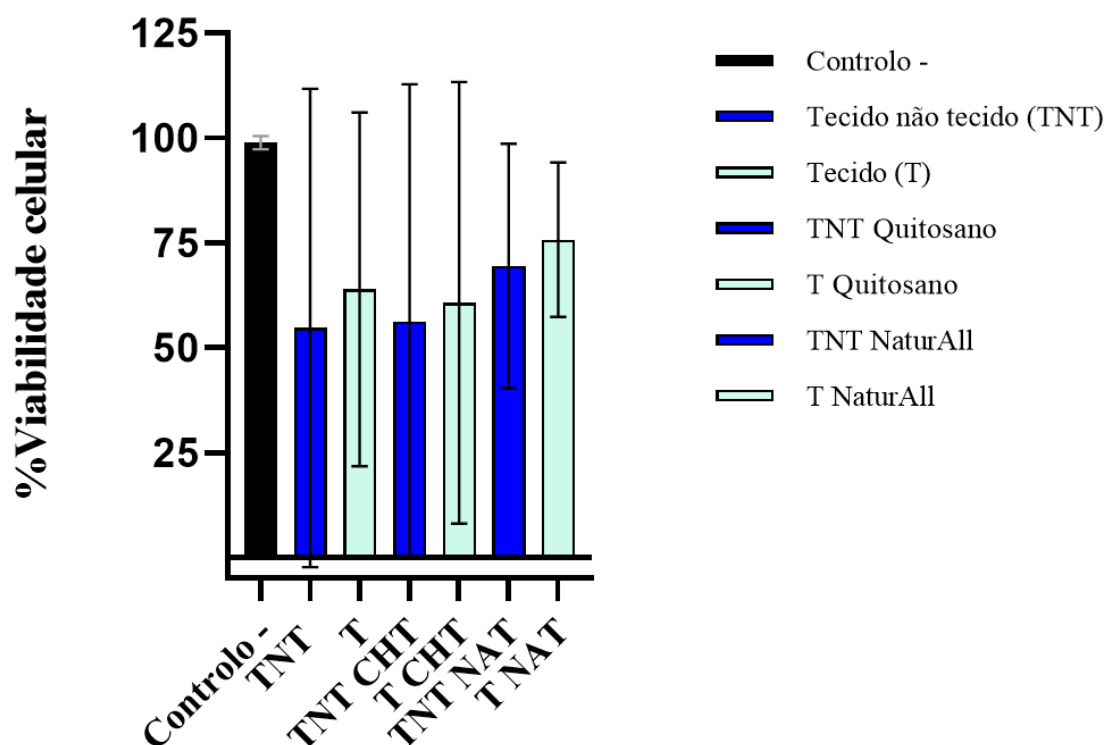


Figura 3. 10 - Viabilidade celular (em %) da linhagem BJ num ensaio de contacto (2 ensaios com 3 réplicas cada) direto simulando a condição inflamação crónica após envelhecimento.

Primeiramente, verifica-se como ambos os tipos de gaze (não tecido e tecido) revelam uma viabilidade celular similar, $54.7 \pm 57.0 \%$ e $63.9 \pm 42.1 \%$, respetivamente, ($p > 0.05$). No entanto, estes resultados são inferiores ao limiar de citocompatibilidade, podendo estes materiais provocarem situações de rejeição/infeção.

A partir da Figura 3.10 é também possível verificar que tanto a gaze não tecido ($56.2 \pm 56.6 \%$) como a gaze de tecido ($60.7 \pm 52.6 \%$), impregnadas com quitosano, apresentam uma viabilidade celular similar ($p > 0.05$).

Relativamente aos resultados obtidos com as gazes impregnadas com o NaturALL, verifica-se que a gaze de tecido ($75.8 \pm 18.5 \%$) apresenta uma maior viabilidade em comparação com a gaze não tecido ($69.5 \pm 29.1 \%$). Comparando as viabilidades celulares em condição saudável e condição de inflamação aguda, é curioso perceber que, contrariamente ao observado na condição saudável (condição controlo com meio basal), as gazes impregnadas com o NaturALL apresentam melhores resultados que as restantes (ambas acima do valor em que é aceite para ser um material citocompatível, 70%). A maior viabilidade celular na condição de inflamação aguda deve-se possivelmente ao efeito dos ambientes acídicos nos grupos reativos dos materiais. Em situações de um utente com infeção crónica, a médio-longo prazo, e ao contrário do que acontece numa

condição saudável e ao que acontece numa condição a curto prazo, o impacto positivo do NaturALL na viabilidade é sentido.

Posto isto podemos concluir que para esta simulação, o material mais citocompatível é a gaze de tecido impregnada com o NaturALL.

Em relação à análise qualitativa (Figura 3.11) podemos observar que as células se encontram alongadas, porém com algumas células redondas e alguma inibição de crescimento celular para qualquer condição, com exceção da gaze de tecido NaturALL. Esta vai de encontro aos resultados quantitativos, sendo a que apresenta mais células metabolicamente ativas e mais células alongadas.

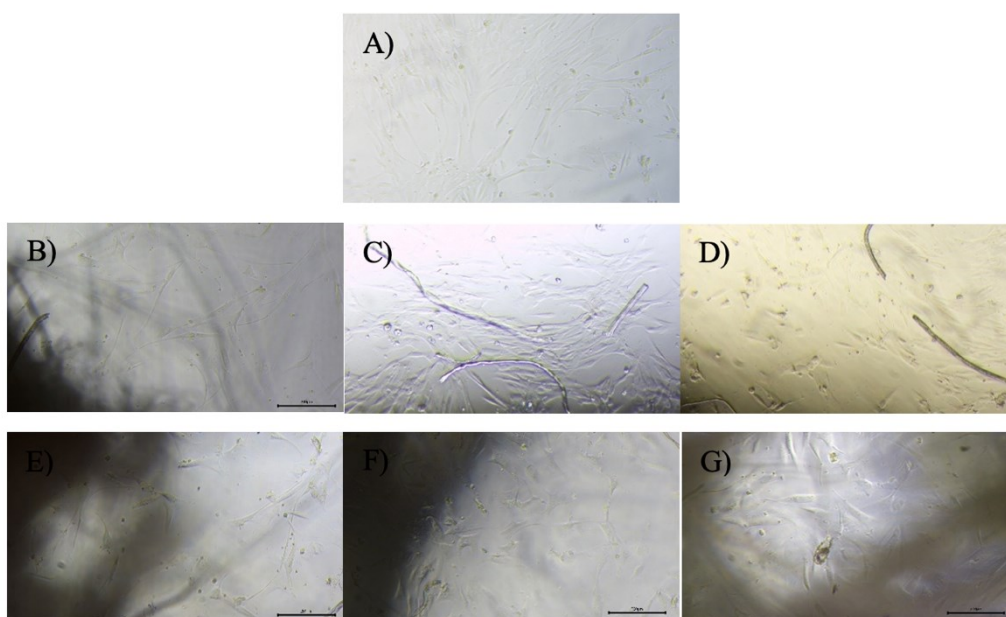


Figura 3. 11 - Imagens de microscopia das gazes testadas, numa condição inflamatória aguda (pH=6). A) Controlo Negativo; B) TNT impregnada em água; C) TNT impregnada em quitosano; D) TNT impregnada em NaturALL; E) T impregnada em água; F) T impregnada em quitosano; G) T impregnado em NaturALL. Todas as imagens partilham a mesma escala (200µm) e ampliação(10x).

3.4.2. Ensaio lixiviados

Um ensaio de lixiviação envolve o contacto de um material sólido com um lixiviante (contacto indireto) para determinar quais os componentes do sólido que se dissolvem na solução e criar uma solução lixiviante ou lixiviado. Os ensaios de lixiviação são normalmente utilizados para fornecer informações sobre a concentração de constituintes ou a libertação de constituintes de um material residual em condições de ensaio de referência, ou em condições que se aproximem mais do local de eliminação efetivo (*Chapter 14 - Leaching Tests*, 1997). Desta forma, para os ensaios de envelhecimento, os lixiviados são de extrema relevância.

3.4.2.1. Simulação da condição saudável com linhagem BJ

Nesta parte do trabalho, pretendeu-se observar de que forma um lixiviado (meio resultante do contacto com uma gaze) impacta a viabilidade celular da linhagem BJ, sendo que nesta secção se efetuou uma simulação da condição saudável (condição controlo com meio basal). Os resultados obtidos relativos à viabilidade celular podem ser observados na seguinte figura (Figura 3.12).

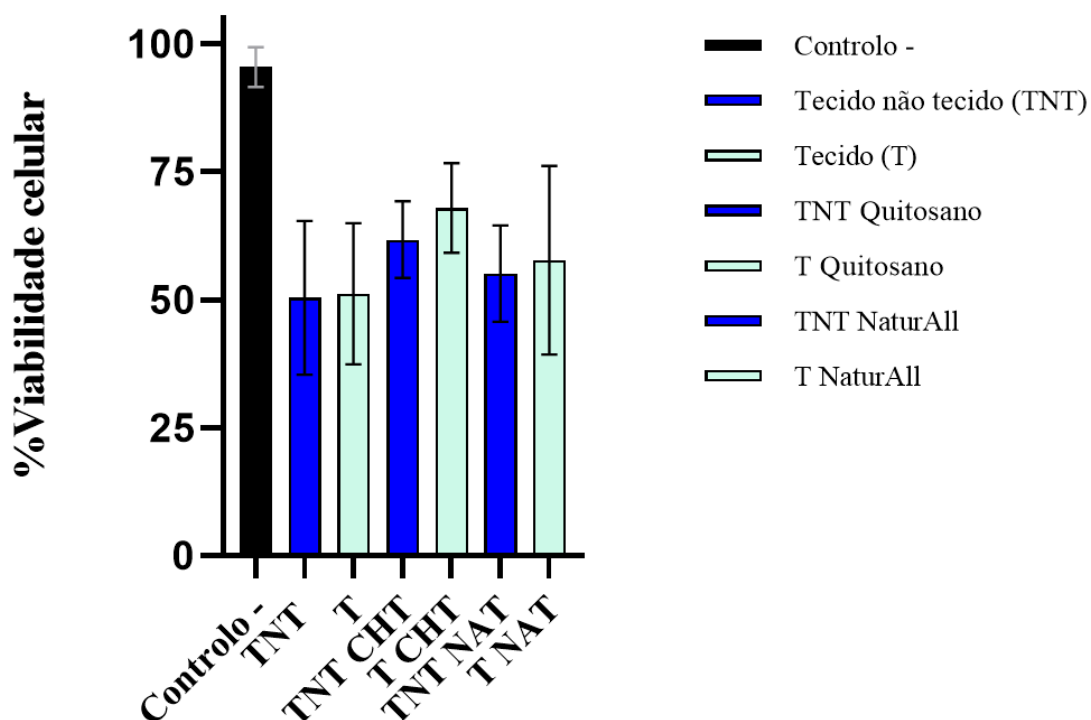


Figura 3. 12 - Viabilidade celular (em %) da linhagem BJ num ensaio de lixiviados (3 ensaios com 3 réplicas para cada condição) simulando a condição saudável após envelhecimento.

Em primeiro lugar, observa-se como ambos os tipos de gaze (tecido e não tecido) revelam uma viabilidade celular semelhante quando impregnadas com água (branco), 51.2 ± 13.8 % e 50.4 ± 15.0 %, respetivamente, ($p > 0.05$). Como mencionado anteriormente, é desejável alcançar uma viabilidade 70 % para que um material/ têxtil médico seja considerado citocompatível (Huzum et al., 2021), pelo que é essencial a impregnação destes tecidos com soluções alternativas.

Com base na Figura 3.12, é possível observar como tanto a gaze não tecido como a gaze de algodão, impregnadas com quitosano, apresentam uma viabilidade semelhante, 61.8 ± 7.48 % e 68.0 ± 8.76 %, respetivamente ($p > 0.05$). Estes valores estão no limiar de aceitação (70 % de viabilidade celular), no entanto é possível constatar que para uso pontual, este tipo de impregnação pode ser aplicado, como referido anteriormente. Num

estudo de 2019, os autores comprovaram como o quitosano tem propriedades benéficas a nível do crescimento e proliferação celular (Souza et al., 2019). Desta forma, verifica-se que já seria expectável uma maior viabilidade aquando da impregnação com a solução de quitosano.

Relativamente às gazes impregnadas com NaturALL, verifica-se então, a mesma tendência, ou seja, tanto a gaze de tecido como a gaze não tecido apresentam uma viabilidade celular semelhante/ idêntica. No entanto, o resultado obtido é menos satisfatório comparativamente aos valores obtidos após impregnação das gazes com quitosano.

Comparando a impregnação das gazes não tecido com a impregnação das gazes de tecido, é possível verificar como são obtidos valores próximos nas viabilidades celulares, sendo estas muito semelhantes entre si não variando mais que 10 %. Este fenómeno é observado tanto para a impregnação com quitosano como com NaturALL.

Avaliando as três condições testadas, nomeadamente submersão com água destilada e impregnação com quitosano ou NaturALL, é possível concluir como a impregnação com as soluções bioativas não aumenta significativamente a viabilidade celular, sendo que esta se mantém entre os 50-70% para ambos os tipos de gaze. Ainda que sem diferenças significativas ($p > 0.05$), a gaze de tecido impregnada com quitosano parece ser o material que menos impacta negativamente o funcionamento de outros tecidos vizinhos, após a interação destes com os lixiviados, que resultam do contato entre o meio e material.

Novamente, para um material ser considerado citocompatível é necessária uma viabilidade superior a 70 %, realidade que não é verificada nesta simulação. Quando a aplicação da gaze é um processo pontual, o valor de 50 % de viabilidade celular pode ser considerado aceitável. No entanto, quando se simula o esquecimento do material no corpo humano, este raciocínio não pode ser aplicado, sendo recomendado alcançar valores acima dos 70% de viabilidade celular. Posto isto, é possível concluir como neste tipo de simulação o material não pode ser considerado como citocompatível, mesmo após adição de compostos bioativos.

Por último, efetuou-se uma simples análise qualitativa, cujo objetivo se baseava na observação da morfologia celular de todas as condições testadas em relação ao controlo. A partir da figura 3.13, é possível observar como as células têm uma forma não alongada e como em todas as condições estas se apresentam maioritariamente em formato pontiforme. No entanto, é possível verificar como nas três seguintes condições, nomeadamente TNT quitosano (C), T quitosano (F) e T NaturALL (G), as células

apresentam uma morfologia mais adequada. Desta forma, é possível relacionar os resultados obtidos na viabilidade celular com a morfologia celular observada. Verifica-se, então, como as condições com uma viabilidade celular superior apresentam uma morfologia mais saudável (Figura 3.13).

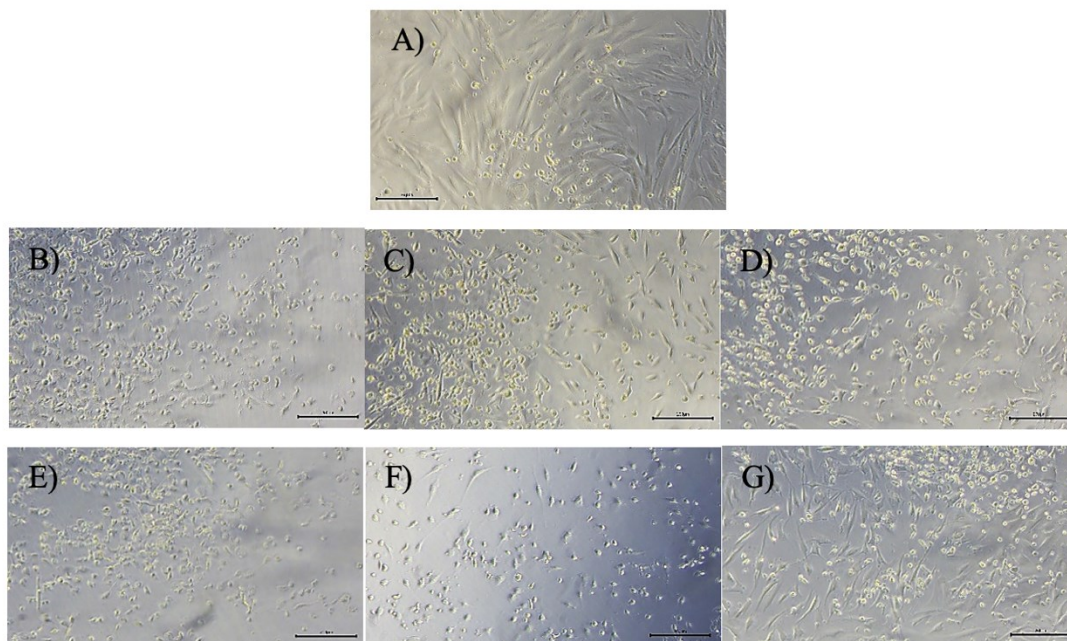


Figura 3. 13 - Imagens de microscopia das gazes testadas, numa condição inflamatória aguda (pH=6). A) Controlo Negativo; B) TNT impregnada em água; C) TNT impregnada em quitosano; D) TNT impregnada em NaturALL; E) T impregnada em água; F) T impregnada em quitosano; G) T impregnado em NaturALL. Todas as imagens partilham a mesma escala (200µm) e ampliação(10x).

3.4.2.2. Simulação da condição de inflamação crónica com linhagem BJ

Como mencionado anteriormente, nesta secção do trabalho laboratorial pretendeu-se avaliar de que forma um lixiviado (meio resultante do contacto com uma gaze) impacta a viabilidade celular da linhagem BJ, sendo que, neste ponto, se efetuou uma simulação da condição de inflamação crónica da linhagem BJ. Os resultados obtidos relativos à viabilidade celular podem ser observados na seguinte figura (Figura 3.14).

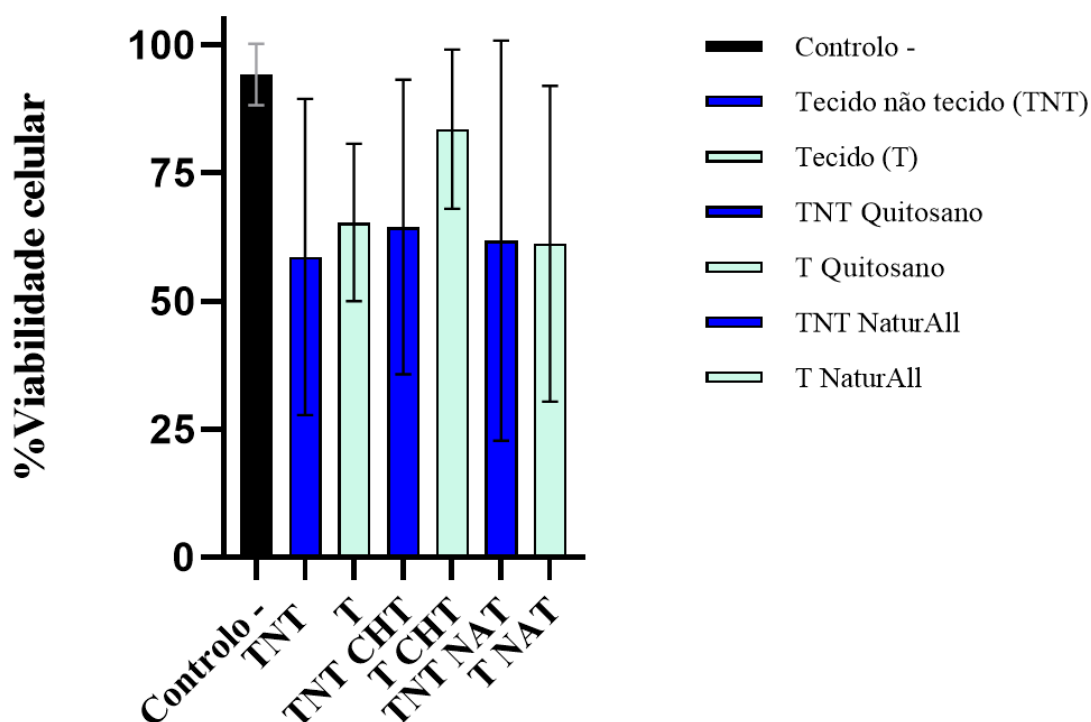


Figura 3. 14 - Viabilidade celular (em %) da linhagem BJ num ensaio de lixiviados (2 ensaios com 3 réplicas cada) simulando a condição de inflamação crónica após envelhecimento.

Primeiramente, observa-se como ambos os tipos de gaze (não tecido e tecido) revelam uma viabilidade celular semelhante quando impregnadas com água (branco), 58.6 ± 30.9 % e 65.3 ± 15.4 %, respetivamente ($p > 0.05$). No entanto, é de notar como é desejável alcançar uma viabilidade 70 %, pelo que é essencial a impregnação destes tecidos com soluções alternativas.

A partir da Figura 3.14, é possível observar como tanto a gaze não tecido como a gaze de algodão impregnadas com quitosano apresentam uma viabilidade díspar, 64.5 ± 28.8 % e 83.6 ± 15.5 %, respetivamente, embora com variabilidade entre réplicas ($p > 0.05$). Desta forma, verifica-se como a gaze de algodão impregnada com quitosano permite alcançar a viabilidade celular desejada (> 70 %), permitindo, então, afirmar que este têxtil e esta impregnação em específico permitem a obtenção de uma gaze citocompatível.

Relativamente às gazes impregnadas com NaturALL, não se verifica a mesma tendência, ou seja, a gaze não tecido e a gaze de tecido apresentam uma viabilidade celular semelhante/idêntica, 61.8 ± 39.0 % e 61.2 ± 30.8 %, respetivamente ($p > 0.05$). Conclui-se, então, que ambos os tipos de gazes impregnadas com NaturALL não são tão adequadas como as impregnadas com quitosano para uma exposição prolongada durante um processo de inflamação crónica, uma vez que não é alcançada a viabilidade celular desejada.

Avaliando as três condições testadas, nomeadamente branco, quitosano ou NaturALL, é possível concluir como a impregnação com as soluções bioativas não aumenta significativamente a viabilidade celular ($p > 0.05$), sendo que esta se mantém entre os 50-80% para ambos os tipos de gaze. Mesmo em situações de inflamação crónica, a gaze de tecido impregnada com quitosano parece ser o material que menos impacta o bom funcionamento de outros tecidos vizinhos, após o contacto destes com os lixiviados resultantes.

Na análise qualitativa (Figura 3.15), observa-se um bom crescimento das células neste meio, ainda que o meio não seja favorável para o crescimento celular devido ao pH que apresenta. Desta forma, verifica-se como as células, em todas as condições, apresentam uma estrutura alongada, característica destas mesmas. Adicionalmente, com base nos valores de viabilidade, é possível afirmar que se encontram metabolicamente ativas.

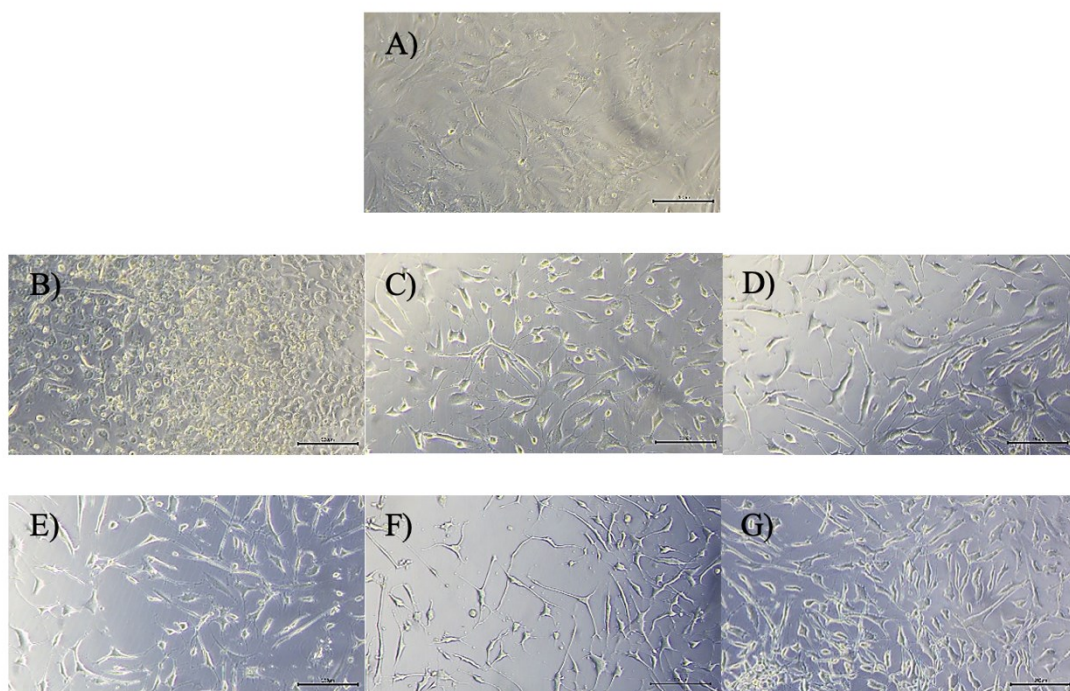


Figura 3. 15 - Imagens de microscopia das gazes testadas, numa condição inflamatória aguda (pH=6). A) Controlo Negativo; B) TNT impregnada em água; C) TNT impregnada em quitosano; D) TNT impregnada em NaturALL; E) T impregnada em água; F) T impregnada em quitosano; G) T impregnado em NaturALL. Todas as imagens partilham a mesma escala (200µm) e ampliação(10x).

3.4.2.3. Simulação da condição saudável (condição controlo com meio basal) com linhagem HCT-15

Por último, efetuou-se um ensaio paralelo no qual se pretendeu observar de que forma um lixiviado (meio resultante do contacto com uma gaze) impacta a viabilidade celular de uma segunda linhagem, nomeadamente HCT-15, de intestino. O objetivo específico passa por se perceber de que forma o lixiviado de uma gaze colocada num determinado órgão poderá afetar um segundo órgão. Em específico, nesta secção efetuou-se uma simulação da condição controlo (pH fisiológico). Os resultados obtidos relativos à viabilidade celular podem ser observados na seguinte figura (Figura 3.16).

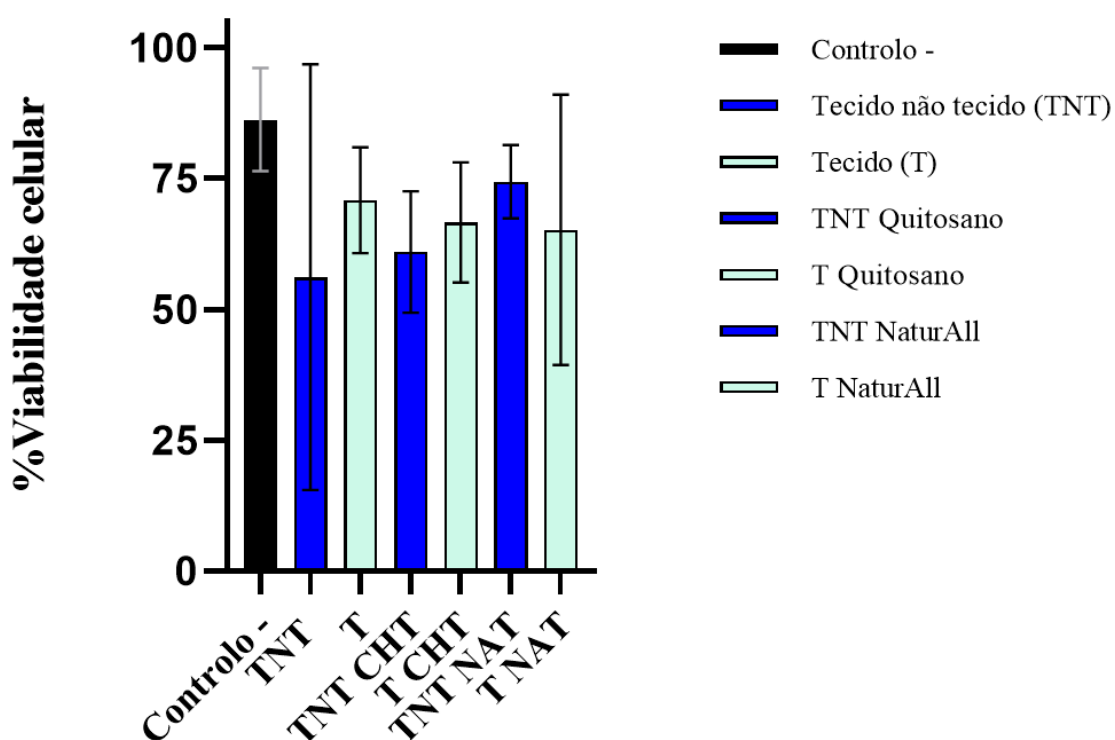


Figura 3. 16 - Viabilidade celular (em %) da linhagem HCT-15 num ensaio de lixiviados (2 ensaios com 3 réplicas cada) simulando a condição saudável após envelhecimento.

A princípio, observa-se como ambos os tipos de gaze (TNT e T) revelam uma viabilidade celular semelhante quando não estão em contacto com nenhum composto bioativo (branco), $56.2 \pm 40.6 \%$ e $70.9 \pm 10.1 \%$, respetivamente, ($p > 0.05$). Como mencionado anteriormente, é desejável alcançar uma viabilidade 70 %, pelo que é essencial a impregnação destes tecidos com soluções alternativas.

Na Figura 3.16 observa-se como tanto a gaze não tecido como a gaze de tecido impregnadas com quitosano apresentam uma viabilidade semelhante, $61.0 \pm 11.6 \%$ e $66.6 \pm 11.5 \%$, respetivamente ($p > 0.05$).

Relativamente às gazes impregnadas com NaturALL, verifica-se, a mesma tendência, tanto a gaze de tecido como a gaze não tecido apresentam uma viabilidade celular semelhante/ idêntica ($p > 0.05$), ainda que para a gaze não tecido a variabilidade entre réplicas seja muito inferior dando mais confiança aos seus resultados.

Observando a figura 3.16 conseguimos fazer uma comparação das linhas celulares em estudo. Avaliando as condições de branco e de quitosano de ambas as linhas celulares conseguimos concluir que a gaze T tem uma melhor prestação nas células visto a maior viabilidade registada. Na análise das células HCT-15, a condição de T branco manifestou-se com uma viabilidade celular de $70.9 \pm 10.1 \%$, valor este substancialmente maior comparando com o T branco nas células BJ, registando este último um valor de 51.2% . O mesmo não se vê quando se faz a análise das condições de não tecido e tecido das gazes impregnadas em quitosano, estas com uma viabilidade semelhante/idêntica (61.0% e 61.8% , e 66.6% e 68.0% nas linhas celulares de HCT-15 e BJ respetivamente). Em relação às gazes impregnadas com NaturALL há uma inversão da tendência, onde antes em ambas as linhas celulares as gazes de tecido apresentavam melhores viabilidades, aqui deixa de acontecer, tendo apresentado a linha celular HCT-15 uma maior viabilidade nas gazes de tecido não tecido ($74.5 \pm 7.0 \%$) comparativamente às gazes de tecido ($65.3 \pm 25.8 \%$). Avaliando as três condições testadas, nomeadamente impregnação com água destilada, quitosano ou NaturALL, é possível concluir como a impregnação com as soluções bioativas não aumenta significativamente a viabilidade celular, sendo que esta se mantém entre os $50\text{-}70 \%$ para ambos os tipos de gaze.

Posto isto, após 9 meses e 17 dias de esquecimento da gaze, os lixiviados que resultam da interação entre o meio e o material parecem impactar de forma semelhante a viabilidade celular de células intestinais. Não obstante, sendo as células em teste cancerígenas, é importante que a adição de agentes bioativos ao material não provoque a médio e longo prazo uma proliferação desregulada.

3.4.2.4. Simulação da condição de inflamação crónica com linhagem HCT-15

Nesta secção efetuou-se uma simulação da condição de inflamação crónica. Os resultados obtidos relativos à viabilidade celular podem ser observados na seguinte figura (Figura 3.17).

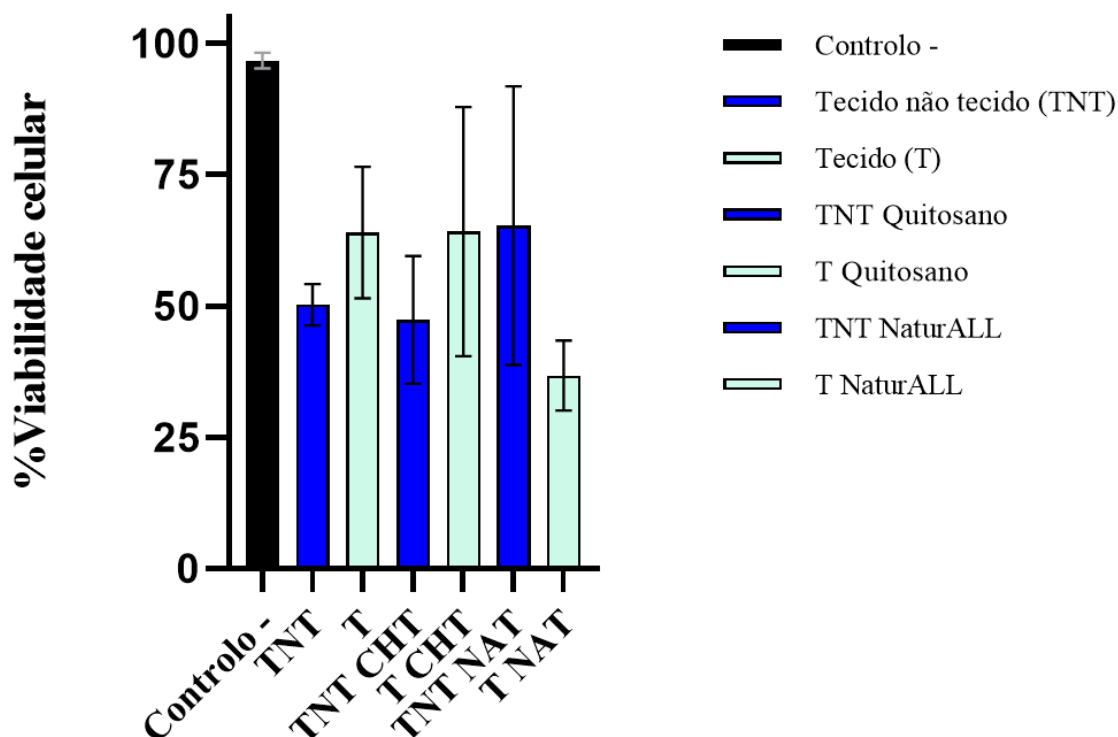


Figura 3. 17 - Viabilidade celular (em %) da linhagem HCT-15 num ensaio de lixiviados (2 ensaios com 3 réplicas cada) simulando a condição de inflamação aguda após envelhecimento.

Primeiramente, é possível observa-se como ambos os tipos de gaze (tecido e não tecido) revelam uma viabilidade celular semelhante quando impregnadas com água (branco), $50.3 \pm 3.9 \%$ e $64.0 \pm 12.5 \%$, respetivamente ($p > 0.05$). Será essencial a impregnação destes tecidos com soluções alternativas.

Na Figura 3.17 observa-se que a gaze não tecido e a gaze de tecido impregnadas com quitosano apresentam uma viabilidade de, $47.4 \pm 12.2 \%$ e $64.2 \pm 23.7 \%$, respetivamente ($p > 0.05$).

Relativamente às gazes impregnadas com NaturALL, verifica-se uma tendência contrária, onde a gaze de não tecido e a gaze tecido apresentam uma viabilidade celular de $65.3 \pm 26.5 \%$ e de $36.8 \pm 6.6 \%$ ($p > 0.05$), respetivamente. Para as gazes T NaturALL e TNT

quitosano, a variabilidade entre réplicas é muito inferior dando mais confiança aos seus resultados.

Observando a figura 3.17 conseguimos fazer uma comparação das linhas celulares em estudo, de maneira idêntica à secção 3.4.2.3. Numa primeira instância observa-se a clara superioridade nos valores de viabilidade das células pertencentes à linha BJ.

Avaliando as três condições testadas, nomeadamente impregnação com água destilada, quitosano ou NaturALL, é possível concluir como a impregnação com as soluções bioativas não aumenta significativamente a viabilidade celular, sendo que esta se mantém entre os 50-70 % para ambos os tipos de gaze.

Posto isto, após 9 meses e 17 dias de esquecimento da gaze (tempo equivalente obtido por envelhecimento acelerado), os lixiviados que resultam da interação entre o meio e o material parecem impactar de forma semelhante a viabilidade celular de células intestinais. Como referido anteriormente, sendo as células em teste cancerígenas, é importante que a adição de agentes bioativos ao material não provoque a médio e longo prazo uma proliferação desregulada nem morte celular.

4. Conclusões e Trabalhos Futuros

O seguinte projeto de mestrado teve como objetivo avaliar o impacto da impregnação de gazes com biomateriais e compostos bioativos, sendo o intuito final o desenvolvimento de gazes mais biocompatíveis. Desta forma, a obtenção de gazes mais biocompatíveis resulta numa diminuição das possíveis consequências para a saúde aquando esquecimento deste têxtil médico após intervenção cirúrgica. A tese em questão foi desenvolvida na start-up biotecnológica Tech4MED, sendo que o principal composto bioativo em estudo foi a solução NaturALL, uma alternativa aos químicos convencionais, desenvolvida pela própria empresa.

O NaturALL caracteriza-se como uma formulação bioativa composta por biomateriais enriquecidos com compostos fenólicos para revestimento têxtil. Esta solução inovadora apresenta resultados promissores no contexto médico, podendo vir a ser utilizada na proteção dos doentes, nomeadamente pelo seu caráter citocompatível, bacteriostático e biodegradável, sendo uma proposta alternativa a outros polímeros indicados na literatura como possíveis revestimentos têxteis médicos, como é o caso do quitosano.

Relativamente à linhagem celular BJ, em condição controlo em meio basal, é possível concluir como a impregnação de gazes de tecido com NaturALL resulta numa viabilidade celular que se aproxima a 70 %, sendo, então, aumentada a viabilidade celular relativamente ao material sem funcionalização. Ademais, após 5 dias em contacto com a gaze, o NaturALL resulta num aumento significativo dessa viabilidade (>70%), sendo possível inferir que a solução inovadora poderá ter uma possível atividade regenerativa.

No entanto, a impregnação de gazes não tecido com NaturALL leva a resultados menos promissores, nomeadamente uma diminuição da viabilidade, não sendo alcançado um valor desejável para um produto citocompatível. Em suma, é possível concluir como, para um curto espaço de tempo, a gaze (T) impregnada com o NaturALL é uma escolha mais promissora em relação à compressa (TNT), cujos melhores resultados foram obtidos após impregnação com quitosano.

Contrariamente, em ambiente ácido (simulação de ambiente inflamatório), a impregnação com NaturALL apresenta resultados significativamente piores em comparação com o quitosano, não sendo, então, aconselhável a sua aplicação em situações de inflamação, a curto prazo. Não obstante, a impregnação com quitosano permite a obtenção de um produto com características mais promissoras face à gaze tradicional.

A submissão a processos de envelhecimento acelerado permite a simulação do impacto do esquecimento de um têxtil médico durante longos períodos no interior do corpo do paciente. Os resultados obtidos neste estudo de envelhecimento acelerado (equivalente a 9 meses e 17 dias) de contacto direto em situação controlo em meio basal não foram de encontro ao esperado, uma vez que em nenhuma condição são obtidos valores de citocompatibilidade aceitáveis, ou seja, nenhum valor está acima de 70 %. Concretamente, verificou-se que tanto para a gaze como para a compressa (gaze TNT) o quitosano apresenta características mais promissoras comparativamente ao NaturALL. No entanto, é importante salientar como o quitosano só permite alcançar valores de citocompatibilidade aceitáveis para o caso da gaze, sendo que para a compressa só ocorre um ligeiro aumento de viabilidade celular, não sendo alcançados os valores almejados. No entanto, face à simulação da condição de inflamação aguda, na condição de inflamação crónica o revestimento com NaturALL apresenta resultados positivos, uma vez que ocorre um aumento significativo da viabilidade celular. Desta forma, é possível concluir que o NaturALL poderá ter efeitos benéficos a nível de proliferação celular em situações de inflamação crónica, mostrando-se como uma solução promissora para a aplicação em locais de feridas e/ou com uma inflamação/ infeção eminente.

Por último, foram efetuados ensaios de lixiviados, que permitiram o estudo do impacto da libertação dos compostos da gaze extracelular quando em contacto com células. Tanto para a simulação da condição normal como para a simulação da condição de inflamação crónica, os resultados obtidos foram satisfatórios, uma vez que a impregnação com NaturALL permitiu um aumento da viabilidade celular.

Relativamente à linhagem celular HCT-15 os resultados obtidos foram semelhantes, ou seja, o NaturALL permitiu um ligeiro aumento da viabilidade celular para níveis aceitáveis, em particular para as gazes não tecido.

Em suma, é possível concluir, que para intervenções em zonas sub-cutâneas, em contacto com a derme, a gaze de tecido impregnada com NaturALL se apresenta como a melhor solução, uma vez que permite a maior taxa de viabilidade celular. Por outro lado, para a zona do cólon, a compressa (gaze não tecido) impregnada com NaturALL permite a obtenção de um tecido mais citocompatível com o local do que a opção de compressa não revestida.

O trabalho de mestrado efetuado permitiu a obtenção de uma gaze de tecido e uma gaze não tecido com características melhoradas após impregnação com a solução NaturALL desenvolvida pela start-up Tech4MED. Desta forma, os resultados obtidos permitiram o

desenvolvimento de uma possível solução para diminuir o impacto do esquecimento das gazes no interior do corpo humano. Contudo, os resultados carecem de significância estatística, pelo que no futuro deverão ser repetidas rondas de testes com maior número de réplicas por forma a corroborar as tendências observadas neste trabalho de tese.

Não obstante, esta linha de trabalho ainda apresenta uma enorme potencialidade, podendo ser exploradas outras vertentes em trabalhos futuros. Desta forma, uma das sugestões para uma futura linha de inovação tem como base o desenvolvimento de um produto não só biocompatível como também biodegradável. Propõe-se, então, a combinação da impregnação de uma gaze com NaturALL, juntamente com uma solução ainda a desenvolver, que resulte na libertação de compostos de valor acrescido e benéfico, de forma a potencializar a cicatrização e regeneração celular do local de intervenção.

Referências

Accelareted Aging Test. (2023). WestPak.

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

AK, M. (2019). A Thoroughgoing Detail of Surgical Dressings. *Journal of Orthopaedics and Sports Medicine*, 01(01). <https://doi.org/10.26502/josm.5115001>

Allafi, F., Hossain, M. S., Lalung, J., Shaah, M., Salehabadi, A., Ahmad, M. I., & Shadi, A. (2022). Advancements in Applications of Natural Wool Fiber: Review. *Journal of Natural Fibers*, 19(2), 497–512. <https://doi.org/10.1080/15440478.2020.1745128>

Alsuhaimi, M. A., Alghamdi, H. S., Alshaiji, S. A., Fayi, M. A., & Aldhafeeri, S. M. (2023). Retained surgical item (Gossypiboma): a case report and literature review. *Annals of Medicine and Surgery* (2012), 85(7), 3717–3721. <https://doi.org/10.1097/MS9.0000000000000992>

Altman, G. H., Diaz, F., Jakuba, C., Calabro, T., Horan, R. L., Chen, J., Lu, H., Richmond, J., & Kaplan, D. L. (2003). Silk-based biomaterials. *Biomaterials*, 24(3), 401–416. [https://doi.org/10.1016/S0142-9612\(02\)00353-8](https://doi.org/10.1016/S0142-9612(02)00353-8)

AltogenLabs. (2023). *HCT-15 Xenograft Model*. AltogenLabs.

Bartels, V. T., Zins, H. M., Petrulyte, S., Petrulis, D., Ajmeri, J. R., Ajmeri, C. J., Rajedran, S., Anand, C., Doser, M., Planck, H., Mathis, R., Song, G., Mehling, A., Cao, W., & Cloud, R. M. (2011). *Handbook of medical textiles* (V. T. Bartels, Ed.). Woodhead Publishing Limited .

Bashari, A., Shakeri, M., Shirvan, A. R., & Najafabadi, S. A. N. (2018). Functional Finishing of Textiles via Nanomaterials. In *Nanomaterials in the Wet Processing of Textiles* (pp. 1–70). Wiley. <https://doi.org/10.1002/9781119459804.ch1>

Benltoufa, S., Miled, W., Trad, M., Slama, R. Ben, & Fayala, F. (2020). Chitosan hydrogel-coated cellulosic fabric for medical end-use: Antibacterial properties, basic mechanical and comfort properties. *Carbohydrate Polymers*, 227, 115352. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2019.115352>

Bhargava, D., & Bhargava, D. (2018). Blood Repellent finishes for Healthcare Textiles: An overview. *International Journal for Environmental Rehabilitation and Conservation*.

- Bureš, F. (2019). Quaternary Ammonium Compounds: Simple in Structure, Complex in Application. *Topics in Current Chemistry*, 377(3), 14. <https://doi.org/10.1007/s41061-019-0239-2>
- Cambridge Dictionary. (2023). *Gauze*.
Chapter 14 - Leaching tests (pp. 579–606). (1997). [https://doi.org/10.1016/S0166-1116\(97\)80020-9](https://doi.org/10.1016/S0166-1116(97)80020-9)
- Chen, G., Haase, H., & Mahltig, B. (2019). Chitosan-modified silica sol applications for the treatment of textile fabrics: a view on hydrophilic, antistatic and antimicrobial properties. *Journal of Sol-Gel Science and Technology*, 91(3), 461–470. <https://doi.org/10.1007/s10971-019-05046-8>
- Cima, R. R., Kollengode, A., Garnatz, J., Storsveen, A., Weisbrod, C., & Deschamps, C. (2008). Incidence and Characteristics of Potential and Actual Retained Foreign Object Events in Surgical Patients. *Journal of the American College of Surgeons*, 207(1), 80–87. <https://doi.org/10.1016/j.jamcollsurg.2007.12.047>
- Collins Dictionary. (2023). *Surgical Dressing*.
- Dann, A. B., & Hontela, A. (2011). Triclosan: environmental exposure, toxicity and mechanisms of action. *Journal of Applied Toxicology*, 31(4), 285–311. <https://doi.org/10.1002/jat.1660>
- Degoutin, S., Jimenez, M., Casetta, M., Bellayer, S., Chai, F., Blanchemain, N., Neut, C., Kacem, I., Traisnel, M., & Martel, B. (2012). Anticoagulant and antimicrobial finishing of non-woven polypropylene textiles. *Biomedical Materials*, 7(3), 035001. <https://doi.org/10.1088/1748-6041/7/3/035001>
- Dhivya, S., Padma, V. V., & Santhini, E. (2015). Wound dressings – a review. *BioMedicine*, 5(4), 22. <https://doi.org/10.7603/s40681-015-0022-9>
- Frei, K., Siepl, C., Groscurth, P., Bodmer, S., Schwerdel, C., & Fontana, A. (1987). Antigen presentation and tumor cytotoxicity by interferon- γ -treated microglial cells. *European Journal of Immunology*, 17(9), 1271–1278. <https://doi.org/10.1002/eji.1830170909>
- Gad, K. (2023). Medical textiles. In *Reference Module in Biomedical Sciences*. Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-824315-2.00870-8>
- Gavrić Lovrec, V., Cokan, A., Lukman, L., Arko, D., & Takač, I. (2018). Retained surgical needle and gauze after cesarean section and adnexectomy: a case report and literature review. *Journal of International Medical Research*, 46(11), 4775–4780. <https://doi.org/10.1177/0300060518788247>

- Gawande, A. A., Studdert, D. M., Orav, E. J., Brennan, T. A., & Zinner, M. J. (2003). Risk Factors for Retained Instruments and Sponges after Surgery. *New England Journal of Medicine*, 348(3), 229–235. <https://doi.org/10.1056/NEJMsa021721>
- Gregory, A. (2023). Rising number of foreign objects found in patients after surgery in England. *The Guardian*.
- Gulati, R., Sharma, S., & Sharma, R. K. (2022). Antimicrobial textile: recent developments and functional perspective. *Polymer Bulletin*, 79(8), 5747–5771. <https://doi.org/10.1007/s00289-021-03826-3>
- Gustaite, S., Kazlauske, J., Bobokalonov, J., Perni, S., Dutschk, V., Liesiene, J., & Prokopovich, P. (2015). Characterization of cellulose based sponges for wound dressings. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 480, 336–342. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2014.08.022>
- He, H., Xia, D.-L., Chen, Y.-P., Li, X.-D., Chen, C., Wang, Y.-F., Shen, L., Hu, Y.-L., & Gu, H.-Y. (2017). Evaluation of a two-stage antibacterial hydrogel dressing for healing in an infected diabetic wound. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*, 105(7), 1808–1817. <https://doi.org/10.1002/jbm.b.33543>
- Houck, M. M., & Siegel, J. A. (2015). Textile Fibers. In *Fundamentals of Forensic Science* (pp. 381–404). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-800037-3.00015-7>
- Huzum, B., Puha, B., Necoara, R., Gheorghevici, S., Puha, G., Filip, A., Sirbu, P., & Alexa, O. (2021). Biocompatibility assessment of biomaterials used in orthopedic devices: An overview (Review). *Experimental and Therapeutic Medicine*, 22(5), 1315. <https://doi.org/10.3892/etm.2021.10750>
- Ikada, Y. (1994). Surface modification of polymers for medical applications. *Biomaterials*, 15(10), 725–736. [https://doi.org/10.1016/0142-9612\(94\)90025-6](https://doi.org/10.1016/0142-9612(94)90025-6)
- ISO 10993-5:2009 - Biological evaluation of medical devices — Part 5: Tests for in vitro cytotoxicity. (2022).
- Jornal de Notícias. (2022). *NaturALL: um desinfetante inteligente*.
- Keystone Compliance. (2023). *Accelerated Aging Time Calculator*.
- Kılınç, A. Ç., Durmuşkahya, C., & Seydibeyoğlu, M. Ö. (2017). Natural fibers. In *Fiber Technology for Fiber-Reinforced Composites* (pp. 209–235). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-101871-2.00010-2>

- Knittel, D., & Schollmeyer, E. (2000). Technologies for a New Century. Surface Modification of Fibres. *Journal of the Textile Institute*, 91(3), 151–165. <https://doi.org/10.1080/004050000008659548>
- Koek, A. Y. (2020). Retained Surgical Sponge Presenting Four Decades Later as a Rapidly Growing Soft Tissue Mass. *Case Reports in Surgery*, 2020, 1–3. <https://doi.org/10.1155/2020/1230173>
- Kruse, C. R., Singh, M., Targosinski, S., Sinha, I., Sørensen, J. A., Eriksson, E., & Nuutila, K. (2017a). The effect of pH on cell viability, cell migration, cell proliferation, wound closure, and wound reepithelialization: In vitro and in vivo study. *Wound Repair and Regeneration*, 25(2), 260–269. <https://doi.org/10.1111/wrr.12526>
- Kruse, C. R., Singh, M., Targosinski, S., Sinha, I., Sørensen, J. A., Eriksson, E., & Nuutila, K. (2017b). The effect of pH on cell viability, cell migration, cell proliferation, wound closure, and wound reepithelialization: In vitro and in vivo study. *Wound Repair and Regeneration*, 25(2), 260–269. <https://doi.org/10.1111/wrr.12526>
- Kucukyuruk, B., Biceroglu, H., Abuzayed, B., Ulu, M. O., & Kafadar, A. M. (2010). Paraspinal gossybipoma: A case report and review of the literature. *Journal of Neurosciences in Rural Practice*, 01(02), 102–104. <https://doi.org/10.4103/0976-3147.71725>
- LI, W., ZHOU, J., & XU, Y. (2015). Study of the in vitro cytotoxicity testing of medical devices. *Biomedical Reports*, 3(5), 617–620. <https://doi.org/10.3892/br.2015.481>
- Lincourt, A. E., Harrell, A., Cristiano, J., Sechrist, C., Kercher, K., & Heniford, B. T. (2007). Retained Foreign Bodies After Surgery. *Journal of Surgical Research*, 138(2), 170–174. <https://doi.org/10.1016/j.jss.2006.08.001>
- Lumbreras-Aguayo, A., Meléndez-Ortiz, H. I., Puente-Urbina, B., Alvarado-Canché, C., Ledezma, A., Romero-García, J., & Betancourt-Galindo, R. (2019). Poly(methacrylic acid)-modified medical cotton gauzes with antimicrobial and drug delivery properties for their use as wound dressings. *Carbohydrate Polymers*, 205, 203–210. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2018.10.015>
- Martín-López, E., Nieto-Díaz, M., & Nieto-Sampedro, M. (2013). Influence of chitosan concentration on cell viability and proliferation in vitro by changing film topography. *Journal of Applied Biomaterials & Functional Materials*, 11(3), 151–158. <https://doi.org/10.5301/JABFM.2012.10449>
- McGillicuddy, E., Murray, I., Kavanagh, S., Morrison, L., Fogarty, A., Cormican, M., Dockery, P., Prendergast, M., Rowan, N., & Morris, D. (2017). Silver nanoparticles

- in the environment: Sources, detection and ecotoxicology. *Science of The Total Environment*, 575, 231–246. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2016.10.041>
- McNeil, M., Darvill, A. G., Fry, S. C., & Albersheim, P. (1984). STRUCTURE AND FUNCTION OF THE PRIMARY CELL WALLS OF PLANTS. *Annual Review of Biochemistry*, 53(1), 625–663. <https://doi.org/10.1146/annurev.bi.53.070184.003205>
- Merecz-Sadowska, A., Sitarek, P., Kucharska, E., Kowalczyk, T., Zajdel, K., Cegliński, T., & Zajdel, R. (2021). Antioxidant Properties of Plant-Derived Phenolic Compounds and Their Effect on Skin Fibroblast Cells. *Antioxidants*, 10(5), 726. <https://doi.org/10.3390/antiox10050726>
- MiCom Laboratoires. (2023). *Standard Guide for Accelerated Aging of Sterile Barrier Systems and Medical Devices*. ASTM F1980.
- Morgan, N. (2017). *Medical gauze 101*. Wound Care Advisor.
- Nabais, I., Tinoco Magalhães, R., Gonçalves Correia, R., Saraiva de Melo, N., & Cruz, D. (2022). Iatrogenic Abdominal Pain: A Case Report of a Retained Surgical Item Detected 20 Years After Surgery. *Cureus*. <https://doi.org/10.7759/cureus.26962>
- NelsonLabs. (2023). *Accelerated & Real-Time Aging*.
- Obagi, Z., Damiani, G., Grada, A., & Falanga, V. (2019). Principles of Wound Dressings: A Review. *Surgical Technology International*, 35, 50–57.
- Olivia. (2023, March 3). *What are the characteristics of medical gauze bandages?* JinHong Medical.
- Omollo Oduor, E., Wanjiru Ciera, L., & Kamalha, E. (2021). Applications of Silk in Biomedical and Healthcare Textiles. In *Textiles for Functional Applications*. IntechOpen. <https://doi.org/10.5772/intechopen.96644>
- Pacific Biolabs. (2023). *Medical Device Shelf Life/ Aging Studies*. Medical Device Aging Studies.
- Parvin, F., Islam, S., Urmy, Z., & Ahmed, S. (2020). A Study on The Textile Materials Applied in Human Medical Treatment . *European Journal of Physiotherapy and Rehabilitation Issues*, 1(1), 56–80.
- Patil, T., Rathore, N., Thakur, A., Thakur, D., & Sharma, K. (2018). Transmigration of a retained surgical sponge: a case report. *Patient Safety in Surgery*, 12(1), 21. <https://doi.org/10.1186/s13037-018-0168-y>
- Qin, Y. (2016a). An overview of medical textile products. In *Medical Textile Materials* (pp. 13–22). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-100618-4.00002-9>

- Qin, Y. (2016b). Medical textile materials with drug-releasing properties. In *Medical Textile Materials* (pp. 175–189). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-100618-4.00013-3>
- Rajamäki, K., Nordström, T., Nurmi, K., Åkerman, K. E. O., Kovanen, P. T., Öörni, K., & Eklund, K. K. (2013). Extracellular Acidosis Is a Novel Danger Signal Alerting Innate Immunity via the NLRP3 Inflammasome. *Journal of Biological Chemistry*, 288(19), 13410–13419. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.426254>
- Rezvani Ghomi, E., Khalili, S., Nouri Khorasani, S., Esmaeely Neisiany, R., & Ramakrishna, S. (2019). Wound dressings: Current advances and future directions. *Journal of Applied Polymer Science*, 136(27), 47738. <https://doi.org/10.1002/app.47738>
- Rohani Shirvan, A., & Nouri, A. (2020). Medical textiles. In *Advances in Functional and Protective Textiles* (pp. 291–333). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-820257-9.00013-8>
- Rouhani Shirvan, A., Shakeri, M., & Bashari, A. (2019). Recent advances in application of chitosan and its derivatives in functional finishing of textiles. In *The Impact and Prospects of Green Chemistry for Textile Technology* (pp. 107–133). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-102491-1.00005-8>
- Salah, F., El Ghouli, Y., Alminderej, F. M., El Golli-Bennour, E., Ouanes, Z., Maciejak, O., Jarroux, N., Majdoub, H., & Sakli, F. (2019). Development, characterization, and biological assessment of biocompatible cellulosic wound dressing grafted Aloe vera bioactive polysaccharide. *Cellulose*, 26(8), 4957–4970. <https://doi.org/10.1007/s10570-019-02419-8>
- Sanz, J. L., Forner, L., Llena, C., Guerrero-Gironés, J., Melo, M., Rengo, S., Spagnuolo, G., & Rodríguez-Lozano, F. J. (2020). Cytocompatibility and Bioactive Properties of Hydraulic Calcium Silicate-Based Cements (HCSCs) on Stem Cells from Human Exfoliated Deciduous Teeth (SHEDs): A Systematic Review of In Vitro Studies. *Journal of Clinical Medicine*, 9(12), 3872. <https://doi.org/10.3390/jcm9123872>
- Sanz, J., Rodríguez-Lozano, F., Llena, C., Sauro, S., & Forner, L. (2019). Bioactivity of Bioceramic Materials Used in the Dentin-Pulp Complex Therapy: A Systematic Review. *Materials*, 12(7), 1015. <https://doi.org/10.3390/ma12071015>
- Shahid-ul-Islam, S.-I., Butola, B. S., & Mohammad, F. (2016). Silver nanomaterials as future colorants and potential antimicrobial agents for natural and synthetic textile

- materials. *RSC Advances*, 6(50), 44232–44247. <https://doi.org/10.1039/C6RA05799C>
- Sigot-Luizard, M. F., & Warocquier-Clerout, R. (1993). In Vitro Cytocompatibility Tests. In *Test Procedures for the Blood Compatibility of Biomaterials* (pp. 569–594). Springer Netherlands. https://doi.org/10.1007/978-94-011-1640-4_48
- Simply Medical. (2021, October 21). *Types of Gauze: Buying Guide*. Simply Medical Blog.
- Singh, N., & Sahu, O. (2019). Sustainable cyclodextrin in textile applications. In *The Impact and Prospects of Green Chemistry for Textile Technology* (pp. 83–105). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-102491-1.00004-6>
- Singha, K., Pandit, P., & Maity, S. (2022). Wool composites for hygienic/medical applications. In *Wool Fiber Reinforced Polymer Composites* (pp. 387–406). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-824056-4.00007-8>
- Sood, A., Granick, M. S., & Tomaselli, N. L. (2014). Wound Dressings and Comparative Effectiveness Data. *Advances in Wound Care*, 3(8), 511–529. <https://doi.org/10.1089/wound.2012.0401>
- Souza, J. M., Henriques, M., Teixeira, P., Fernandes, M. M., Fangueiro, R., & Zille, A. (2019). Comfort and Infection Control of Chitosan-impregnated Cotton Gauze as Wound Dressing. *Fibers and Polymers*, 20(5), 922–932. <https://doi.org/10.1007/s12221-019-9053-2>
- Steelman, V. M., Shaw, C., Shine, L., & Hardy-Fairbanks, A. J. (2018). Retained surgical sponges: a descriptive study of 319 occurrences and contributing factors from 2012 to 2017. *Patient Safety in Surgery*, 12(1), 20. <https://doi.org/10.1186/s13037-018-0166-0>
- Subramanian, A. P., Jaganathan, S. K., Mandal, M., Supriyanto, E., & Muhamad, I. I. (2016). Gallic acid induced apoptotic events in HCT-15 colon cancer cells. *World Journal of Gastroenterology*, 22(15), 3952. <https://doi.org/10.3748/wjg.v22.i15.3952>
- Sunthornvarabhas, J., Liengprayoon, S., Lerksamran, T., Buratcharin, C., Suwonsichon, T., Vanichsriratan, W., & Sriroth, K. (2019). Utilization of Lignin Extracts from Sugarcane Bagasse as Bio-based Antimicrobial Fabrics. *Sugar Tech*, 21(2), 355–363. <https://doi.org/10.1007/s12355-018-0683-2>

- Susmallian, S., Raskin, B., & Barnea, R. (2016). Surgical sponge forgotten for nine years in the abdomen: A case report. *International Journal of Surgery Case Reports*, 28, 296–299. <https://doi.org/10.1016/j.ijscr.2016.10.026>
- Swanson, B. G. (2003). TANNINS AND POLYPHENOLS. In *Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition* (pp. 5729–5733). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B0-12-227055-X/01178-0>
- Tech4Med. (2020).
- Theerakittayakorn, K., & Bunprasert, T. (2011). Differentiation Capacity of Mouse L929 Fibroblastic Cell Line Compare With Human Dermal Fibroblast. *World Academy of Science, Engineering and Technology*.
- ThermoFisher Scientific. (2023). *alamarBlue Assays for Cell Viability Protocol, for Microplates*. Technical Reference Library.
- Wiegand, C., Abel, M., Hipler, U.-C., & Elsner, P. (2019). Effect of non-adhering dressings on promotion of fibroblast proliferation and wound healing in vitro. *Scientific Reports*, 9(1), 4320. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-40921-y>
- Williams, R. G., Bragg, D. G., & Nelson, J. A. (1978). Gossypiboma—The Problem of the Retained Surgical Sponge. *Radiology*, 129(2), 323–326. <https://doi.org/10.1148/129.2.323>
- Winner Medical. (2022a, January 10). *What are the characteristics of Gauze Rolls?* Winner Medical.
- Winner Medical. (2022b, December 3). *Functions and Material Types of Gauze Bandage*. Winner Medical .
- Zamora-Mendoza, L., Guamba, E., Miño, K., Romero, M. P., Levoyer, A., Alvarez-Barreto, J. F., Machado, A., & Alexis, F. (2022). Antimicrobial Properties of Plant Fibers. *Molecules*, 27(22), 7999. <https://doi.org/10.3390/molecules27227999>
- Zanette, R. de S. S., Fayer, L., de Oliveira, E. R., Almeida, C. G., Oliveira, C. R., de Oliveira, L. F. C., Maranduba, C. M. C., Alvarenga, É. C., Brandão, H. M., & Munk, M. (2022). Cytocompatibility and osteogenic differentiation of stem cells from human exfoliated deciduous teeth with cotton cellulose nanofibers for tissue engineering and regenerative medicine. *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition*, 33(5), 627–650. <https://doi.org/10.1080/09205063.2021.2008787>

