



UNIVERSIDADE D
COIMBRA

Priscila Isabel Martins Martins

DESENVOLVIMENTO DE MATERIAIS
FOTO-RETICULÁVEIS PARA APLICAÇÃO
BIOMÉDICA

Dissertação no âmbito do Mestrado Integrado em Engenharia
Química orientada pela Doutora Paula Cristina Nunes Ferreira
Calvinho e pela Doutora Patrícia de Jesus Pinto Alves e apresentada
ao Departamento de Engenharia Química da Faculdade de Ciências
e Tecnologias da Universidade de Coimbra.

Setembro de 2019

Priscila Isabel Martins Martins

**DESENVOLVIMENTO DE MATERIAIS
FOTO-RETICULÁVEIS PARA APLICAÇÃO BIOMÉDICA**

Dissertação no âmbito do Mestrado Integrado em Engenharia Química orientada pela Doutora Paula Cristina Nunes Ferreira Calvinho e pela Doutora Patrícia de Jesus Pinto Alves e apresentada ao Departamento de Engenharia Química da Faculdade de Ciências e Tecnologias da Universidade de Coimbra.

Supervisores:

Doutora Paula C. N. Ferreira Calvinho

Doutora Patrícia de Jesus Pinto Alves

Setembro de 2019

1 2  9 0

UNIVERSIDADE D
COIMBRA

"If you get tired learn to rest, not to quit"

Banksy

AGRADECIMENTOS

A realização deste trabalho deve-se também a um leque de pessoas que me foram acompanhando ao longo dos últimos anos e sem as quais seria impossível assinalar a conclusão deste ciclo.

Em primeiro lugar, à Doutora Paula Ferreira pelo voto de confiança que depositou em mim e por toda a disponibilidade demonstrada durante a elaboração da dissertação. À Doutora Patrícia Alves por embarcar igualmente neste projecto que, sem ela, não seria possível.

À Teresa Cernadas por todo o apoio, orientação, amizade e incentivo dado nos últimos meses, de forma a que eu desse o melhor de mim, confiando sempre nas minhas capacidades. Não existem palavras suficientes para te agradecer por tudo o que fizeste. À Marta Santos por ser o meu “braço direito” no laboratório, por me ajudar em todas as tarefas e se certificar que tudo corria bem, quando eu não podia estar presente. À Filipa Dinis pelo apoio, por me auxiliar na compreensão de conceitos químicos e na análise RMN. Sem elas não teria sido possível, de todo, concluir este trabalho no tempo estipulado. O meu obrigada por tornarem aquele laboratório o sítio mais acolhedor do DEQ, cheio de boa música e boa disposição.

A todas as pessoas que partilharam o B31 comigo, pelo ótimo ambiente e entreaajuda, o meu obrigada.

A todas as pessoas que partilharam comigo os últimos meses, mas também os últimos anos, que contribuíram para que me sentisse a pessoa mais feliz e sortuda do Universo. Aos que me acompanham desde criança, mas também àqueles que Coimbra me deu.

Às FANS, a minha casa em Coimbra, uma família que me deu tudo o que de melhor Coimbra me poderia ter dado. Por todas as horas de trabalho, todas as horas de cansaço, mas sobretudo, por todas as horas de amizade, nos bons e , principalmente, nos maus momentos. Obrigada por nunca me deixarem desistir e pelas pessoas que levo comigo para a vida.

“Deixo o meu quarto um dia, para lá não mais voltar, mas sempre na minha vida, de ti me hei-de lembrar”

À Ná, que certamente diria “finalmente, miúda!”, com o maior sorriso de orgulho.

Às melhores amigas que podia ter: Mariana Carvalho, Rita Lopes, Ana Alves, Joana Barros, Sara Coimbra e Rita Carvalho. Não posso deixar de expressar a admiração que tenho por vocês, muito obrigada por fazerem parte de mim. Sei que estarão ao meu lado, para o resto da minha vida.

À Rita, ao porto seguro, ao abraço que me segura nas horas de maior ansiedade. Obrigada por estares sempre, mesmo quando não podia estar. Obrigada pela confiança, pelo amor e pelas horas que também tu perdeste com a realização deste trabalho. És brilhante e inspiras isso em mim. Obrigada nunca será suficiente.

Aos meus avós, que tantas vezes foram pais e estiveram sempre na linha da frente a amparar as minhas quedas. Nunca existirá um carinho como o vosso nem agradecimento possível pelo que fizeram por nós e pela mãe. Obrigada por todos os mimos, por todo o pão quente na mesa e por tratarem tão bem da vossa princesa. Ao meu irmão, companheiro de vida e de aventuras, amigo e muitas vezes pai, por ser o homem protector da casa e por ter ajudado sempre que era preciso, com o pouco que muitas vezes tinha. Ao Nuno, o pai que veio tardio, mas de forma tão especial, obrigada por fazeres a nossa mãe tão feliz. Aos restantes familiares que apoiaram esta jornada com o maior sorriso e força.

Por fim, mas o agradecimento mais importante. A ti mãe, por seres uma guerreira, por teres dado tudo, sem nunca pedir nada em troca. Por abdicares de tanto por nós, por não me teres deixado desistir, quando achava que não havia outra saída, por me transmitires os melhores valores, quando a vida era tão injusta contigo. Nunca conseguirei exprimir a gratidão que carrego, mas posso prometer que dedicarei a minha vida a retribuir tudo o que fizeste, da melhor forma que conseguir. És o amor maior e, sem dúvida, o meu maior exemplo. Amo-te.

A todos vós, o meu maior e mais sincero obrigada.

RESUMO

O interesse e a investigação na área médica e biomédica tem permitido o aparecimento de meios de encerramento de incisões alternativos. Um exemplo disso é o aparecimento de novos biomateriais, como os adesivos cirúrgicos que atuam como dispositivos médicos, possibilitando a aproximação das extremidades das feridas e assim, ajudando na sua cicatrização. Características como a sua biodegradabilidade, biocompatibilidade, rapidez de aplicação, resultados estéticos muito favoráveis, mas também o conforto oferecido ao paciente, tornam estes materiais numa alternativa atrativa e eficaz. No mercado estão disponíveis adesivos e selantes de origem sintética e natural, com as mais variadas propriedades, possibilitando o seu uso em diferentes contextos cirúrgicos. No entanto, existem ainda limitações associadas ao uso de adesivos cirúrgicos como fracas propriedades mecânicas, risco de transmissão de doenças e libertação de produtos tóxicos, que acabam por limitar a sua utilização. A solução para colmatar as limitações apresentadas pelos bioadesivos já disponíveis no mercado passa pelo desenvolvimento de adesivos à base de polímeros biocompatíveis, biodegradáveis e foto-reticuláveis. Polímeros foto-reticuláveis conferem aos materiais maior rapidez de cura e um maior controlo da temperatura de polimerização permitindo, conseqüentemente, um maior controlo das propriedades finais do polímero.

A elaboração do presente trabalho consistiu no desenvolvimento adesivos, tendo sido sintetizados para tal copolímeros a partir de oligómeros de ácido láctico e policaprolactona (PCL), ambos funcionalizados com acrilato de 2-isocianoetil (AOI), nas proporções 1:1, 1:2 e 2:1. Posteriormente, foi feita a caracterização dos materiais disponíveis, avaliando dois tempos de reticulação - 30 segundos e 2 minutos - delimitando as suas potenciais propriedades. Deste modo, obtiveram-se membranas flexíveis e resistentes, com diferentes características que apontavam para a aplicabilidade pretendida.

A análise termogravimétrica aferiu que todos os adesivos desenvolvidos seriam termicamente estáveis, a altas temperaturas.

Os adesivos com 30 segundos de reticulação apresentam menores valores de teor de gel, contendo assim, um menor grau de reticulação. Estes filmes são caracterizados por uma maior capacidade de absorção de água, comparativamente aos restantes, resultando numa maior taxa de degradação. Contrariamente, os adesivos com tempo de cura de 2 minutos correspondem a valores mais elevados de teor de gel e, por isso, maior grau de reticulação. Esta propriedade confere-lhes uma matriz polimérica tridimensional mais compacta que reduz a capacidade de absorção de água e, conseqüentemente, a degradação dos materiais. O tempo a que os adesivos estiveram expostos a irradiação UV tem também influencia na biocompatibilidade dos

materiais, sendo que aos 30 segundos correspondem percentagens de viabilidade celular e capacidade bactericida mais reduzidas, no caso dos copolímeros. No entanto, todos os copolímeros mostraram ser biocompatíveis e biodegradáveis.

Quanto à sua composição, adesivos de mLA4 apresentaram um menor grau de reticulação, o que se traduz numa maior capacidade de absorção de água e, conseqüentemente, uma maior degradação hidrolítica. Já a polímeros de mPA4, estão associados elevados graus de reticulação, e percentagens de absorção de água bastante inferiores, quando comparados com os referidos anteriormente. A proporção dos macrómeros nos polímeros tem impacto nas propriedades dos mesmos sendo que, os filmes com maior quantidade de mLA (L2P1) apresentam-se com valores mais baixos de reticulação e maior taxa de degradação, ao contrário do que se verifica nos polímeros de mPA4 (L1P2), que demonstraram um carácter mais hidrofóbico e, com isso, menores taxas de degradação hidrolítica. O mesmo acontece com as propriedades biológicas, onde o aumento da quantidade de mPA4, resulta na diminuição da viabilidade celular e na capacidade antibacteriana dos adesivos.

Adesivos à base de copolímeros de PCL e ácido láctico, revelaram-se uma escolha viável no desenvolvimento de adesivos para aplicação cirúrgica, dado os resultados obtidos na sua caracterização.

Palavras-chave: Adesivo cirúrgico, polímeros foto-reticuláveis, ácido láctico, policaprolactona, biodegradabilidade.

ABSTRACT

Increasing interest and research in both medical and biomedical fields have allowed the emergence of new alternative wound closure methods. A case in point is the appearance of new biomaterials, such as new surgical adhesives that act as medical devices, enabling the approximation of both sides of the wounds, thus helping their healing. Properties like their biodegradability, their biocompatibility, their speed of application, their ability to provide favorable aesthetic results, as well as them being comfortable for the patient, make these materials an attractive and effective option. There are both synthetic and natural adhesives and sealants available in the market, with a wide range of properties, allowing their use in different surgical contexts. However, there are still some restrictions regarding the use of these adhesives, such as weak mechanical properties, risk of disease transmission and release of toxic products, which ultimately limit their use. The solution to overcome the gaps presented by bioadhesives already available in the market is the development of biocompatible, biodegradable and photo-crosslinkable polymer-based adhesives. Photo-crosslinkable polymers give materials faster cure time and greater polymerization temperature control, thus allowing a better control of the final properties of the polymer.

The elaboration of this work consisted in the development of copolymers synthesized from oligomers of lactic acid and polycaprolactone (PCL), both functionalized with 2-isocynoethyl acrylate (AOI) in 1:1, 1:2 and 2:1 ratios. Subsequently, the available materials were characterized by evaluating two cross-linking times - 30 seconds and 2 minutes - and their potential properties were delimited. As follows, flexible and resistant membranes were obtained, with different characteristics that pointed to the intended applicability.

The thermogravimetric analysis verified that all developed adhesives would be thermally stable at high temperatures.

Adhesives crosslinked for 30 seconds showed lower gel content results, thus containing a lower degree of crosslinking. These adhesives are characterized by a higher water absorption capacity compared to the others, resulting in a higher degradation rate. On the other hand, those crosslinked for 2 minutes have higher gel content values, therefore having a higher degree of crosslinking. Such property gives them a more compact polymeric matrix that reduces their water absorption capacity and, consequently, the material degradation. The crosslinking time also influences materials biocompatibility, with 30-second crosslinking times corresponding to lower cell viability percentages and bactericidal capacity. However, all adhesives have been shown to be biocompatible and biodegradable

When it comes to their composition, mLA4 adhesives showed a lower degree of crosslinking, which translates into a higher water absorption capacity and, consequently, into a greater hydrolytic degradation. Elseways, mPA4 polymers are associated with higher degrees of crosslinking and much lower percentages of water absorption., when compared to those previously mentioned. The macromers proportion in the polymers has an impact on their properties. While adhesives with higher amounts of mLA (L2P1) have lower crosslinking values and higher degradation rate, mPA4 polymers (L1P2) showed more hydrophobic properties and, thus, lower degradation rates. The same happens for biological properties, where increasing the amount of mPA4 results in decreased cell viability and antibacterial ability of the adhesives.

Adhesives composed by PCL and lactic acid copolymers, proved to be a viable choice in the development of adhesives for surgical application, given the results obtained in their characterization.

Keywords: surgical adhesive, photo-crosslinkable polymers, lactic acid, polycaprolactone, biodegradability.

ÍNDICE

Objetivos e estrutura da Tese	1
1 Introdução	3
1.1 Técnicas de encerramento de incisões	4
1.1.1 Técnicas convencionais	4
1.1.2 Adesivos cirúrgicos	9
1.2 Foto-reticulação	14
1.2.1 Adesivos foto-reticuláveis	16
2 Materiais e Métodos	18
2.1 Materiais	18
2.2 Métodos de síntese	19
2.2.1 Síntese de pré-polímeros por modificação com acrilato de 2-isocianatoetilo ..	19
2.3 Métodos de caracterização	23
2.3.1 Espectroscopia de infravermelho com reflexão total atenuada	23
2.3.2 Ressonância magnética nuclear	24
2.3.3 Determinação do teor de gel	24
2.3.4 Capacidade de absorção da água	25
2.3.5 Degradação hidrolítica em solução de PBS	25
2.3.6 Análise termogravimétrica	26
2.3.7 Biocompatibilidade	26
3 Discussão e Resultados	29
3.1 Análise por ATR-FTIR	30
3.2 Análise de RMN	32
3.3 Determinação do teor de gel	34
3.4 Avaliação da capacidade de absorção de água	36
3.5 Degradação hidrolítica em solução de PBS	38
3.6 Análise Termogravimétrica	40
3.7 Biocompatibilidade	46
3.7.1 Estudo da viabilidade celular	46
3.7.2 Estudo da atividade bacteriana	49
4 Conclusões	53
5 Perspetivas Futuras	55
6 Referências	57
Anexos	67
Anexo A. Suturas absorvíveis e não absorvíveis	67
Anexo B. Adesivos cirúrgicos presentes no mercado	68

Anexo C. Principais reagentes utilizados	70
Anexo D. Representação da montagem do sistema experimental	71
Anexo E. Análise termogravimétrica	72
Anexo F. Biocompatibilidade	75

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.1 - Classificação dos fios de sutura.....	5
Figura 1.2 - Estrutura de um fio de sutura multifilamentado (Esquerda) e monofilamentado (Direita).....	7
Figura 1.3 - Mandíbulas da formiga <i>Eciton burchelli</i>	8
Figura 1.4. - Estrutura química do Irgacure® 2959.	16
Figura 2.1 - Reação de síntese de oligómeros de ácido láctico.	20
Figura 2.2 - Síntese do macrómero de ácido láctico, através da reação funcionalização do OligLA com AOI.	20
Figura 2.3 - Metodologia de síntese de mLA4.....	21
Figura 2.4 - Síntese do macrómero de ácido láctico, através da reação funcionalização da PCL com AOI.....	22
Figura 2.5 - Metodologia de síntese de mPA4.	22
Figura 3.1 - Estrutura do mLA4 (Em baixo) e do mPA4 (Em cima)	29
Figura 3.2 - Espectro de ATR-FTIR correspondente ao AOI, a PCL, ao mPA4 e ao mPA4 reticulado durante 30 segundos e 2 minutos.....	31
Figura 3.3 - Espectro de ATR-FTIR correspondente ao AOI, ao OligLA, ao mLA4 e ao mLA4 reticulado durante 30 segundos e 2 minutos.....	32
Figura 3.4 - Espectro de ¹ H RMN do AOI(1), do OligLA (2) e do mLA4 (3).	33
Figura 3.5 - Espectro de ¹ H-RMN do AOI (1), do PCL (2) e do mPA4 (3).	34
Figura 3.6 - Capacidade de absorção de água dos diferentes adesivos, com tempos de reticulação 30 segundos e 2 min, após 24 e 72 horas de incubação, em atmosfera saturada.	37
Figura 3.7 - Perda de massa (%) dos diferentes adesivos, com tempos de reticulação 30 segundos e 2 minutos, ao longo de 5 semanas, numa solução de PBS (pH=7 e T=37°C)...	39
Figura 3.8 - Curvas termogravimétricas do AOI, PCL e OligLA e dos macrómeros funcionalizados, mLA4 e mPA4.	41
Figura 3.9 - Curvas termogravimétricas dos copolímeros líquidos (Linha contínua) e reticulados, durante 2 minutos (Linha tracejada).....	42
Figura 3.10 - Curvas das derivadas de TGA dos copolímeros líquidos (Linha contínua) e reticulados durante 2 minutos (Linha tracejada).....	43
Figura 3.11 - Avaliação da viabilidade celular na presença dos adesivos mLA4 e mPA4, num período de contacto de 1, 3 e 7 dias. K ⁺ e K ⁻ correspondem ao controlo positivo e negativo, respetivamente.	46
Figura 3.12 - Avaliação da viabilidade celular na presença dos adesivos L1P1-2min, L1P2-2min, L1P1-30s, L1P2-30s, L2P1-30s e L2P1-2min, num período de contacto de 1, 3 e 7 dias. K ⁺ e K ⁻ correspondem ao controlo positivo e negativo, respetivamente.	47

Figura 3.13 - Halos inibitórios e fotografias SEM da estirpe <i>E.coli</i> , em contacto com os adesivos desenvolvidos.	50
Figura 3.14 - Halo inibitório dos adesivos desenvolvidos para a <i>E.coli</i> (em cima) e <i>S.aureus</i> (em baixo).....	51
Figura 3.15 - Halos inibitórios e fotografias SEM da estirpe <i>S.aureus</i> , em contacto com os adesivos desenvolvidos.	52

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 2.1 - Reagentes utilizados na preparação, funcionalização, reticulação e caracterização.	18
Tabela 3.1 - Valores percentuais do teor de gel dos adesivos desenvolvidos, para diferentes tempos de reticulação.....	35
Tabela 3.2 - Temperatura de degradação derivada de TGA para o AOI, OligLA e PCL.....	44
Tabela 3.3 - Temperatura de degradação derivada de TGA para os macrómeros e copolímeros líquidos.	44
Tabela 3.4 - Temperatura de degradação derivada de TGA para os macrómeros e reticulados.	45

NOMENCLATURA

AOI	Acrilato de 2-isocianoetil
ATR-FTIR	Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier com reflexão total atenuada
BD	1,4-butanodiol
BSE	<i>Bovine Spongiform Encephalopathy</i> (Encefalopatia Espongiforme Bovina)
CD	Clorofórmio-deuterado
CFU	<i>Colony Forming Unit</i>
DMEM-F12	<i>Dulbeccos's modified Eagle's médium</i> (Meio Eagle modificado por Dulbecco)
DTG	1ª derivada da curva TGA
ED	Éter dietílico
FBS	<i>Fetal Bovine Serum</i> (Soro Fetal de Bovino)
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
GRF	Gelatina reticulada com resorcinol- formaldeído
HIV	<i>Human Immunodeficiency Virus</i> (Vírus da Imunodeficiência Humana)
IEMA	Metacrilato de 2-isocianoetilo
ISO	<i>International Organization for Standardization</i>
LA	Ácido láctico
MTS	<i>3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium</i>
PBS	<i>Phosphate Buffer Solution</i>
PCL	Policaprolactona diol
PEG	Polietileno glicol
PGA	Poli(ácido glicólico)
PGSA	Acrilato de poli (glicerol sebacato)
PLA	Poli(ácido láctico)
PLGA	Poli(ácido láctico-co- glicólico)
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
SEM	<i>Scanning Electron Microscopy</i> (Microscopia Eletrônica de Varrimento)
T_d	Temperatura de degradação (°C)
TDI	Diisocianato de tolueno
T_g	Temperatura de transição vítrea (°C)
TGA	Análise termogravimétrica
UBI	Universidade da Beira Interior
UV	Ultravioleta
W_f	Peso final (g)
W_h	Peso hidratado (g)

W_i Peso inicial (g)

W_s Peso seco (g)

OBJETIVOS E ESTRUTURA DA TESE

A ciência tem evoluindo no sentido de proporcionar uma melhoria contínua da qualidade de vida das populações. O interesse do avanço médico tem vindo a aumentar, por esse mesmo motivo, tendo-se conseguido alcançar metodologias que proporcionam maior eficácia, rapidez e conforto, quer para utentes, quer para profissionais. Neste sentido, uma melhoria das práticas cirúrgicas passa pela procura de novos biomateriais, que aprimorem o encerramento de incisões como adesivos cirúrgicos.

O desenvolvimento de adesivos cirúrgicos é impulsionado pelas lacunas associadas às técnicas convencionais de encerramento de incisões, como suturas e agrafos. Problemas associados a inflamações, processos de cicatrização relativamente longos, necessidade de remoção pós-cirúrgica, em alguns casos, e fracas propriedades mecânicas são características associadas aos métodos já existentes no mercado que podem ser colmatados com o uso de adesivos cirúrgicos.

Os adesivos cirúrgicos permitem a aproximação das extremidades das feridas, ajudando na sua cicatrização. Estes materiais subdividem-se em três categorias - naturais, sintéticos e biomiméticos - oferecendo uma alternativa quase personalizável, uma vez que existe uma vasta gama de materiais, com várias propriedades, ideais para diferentes tipos de aplicação. Um exemplo de material com grande potencial de aplicação biomédica são os polímeros foto-reticuláveis, presentes na constituição de novos biomateriais com propriedades biológicas, físicas e químicas adequadas à aplicação cirúrgica.

A motivação da elaboração deste trabalho passa pelo desenvolvimento de adesivos que preencham requisitos necessários para todo o tipo de incisões, avaliando assim o seu potencial como técnica de encerramento de incisões, visto não existir ainda uma solução indicada a todo o tipo de ferimentos. Assim sendo, recorreu-se a materiais poliméricos como oligómeros de ácido lático e policaprolactona, que possuem bons resultados de biocompatibilidade e biodegradabilidade e avaliou-se o seu potencial de aplicação em diferentes práticas cirúrgicas.

O presente trabalho encontra-se organizado em cinco capítulos principais. No **Capítulo 1**, Introdução, é feito um enquadramento geral do tema, onde são apresentados alguns conceitos em torno das variadas técnicas de encerramento de incisões, desde as convencionais aos adesivos cirúrgicos. Neste seguimento, em primeiro são apresentados os diferentes métodos conhecidos, enunciando os principais materiais utilizados e, de seguida, introduzem-se os adesivos cirúrgicos, apresentando-se as principais vantagens e desvantagens dos materiais utilizados na produção dos mesmos. Nesse âmbito, fez-se uma reflexão mais detalhada com

base em artigos de trabalhos já desenvolvidos na área dos polímeros foto-reticuláveis, abordando-se particularmente os materiais que irão ser usados na presente dissertação, como a policaprolactona diol e oligómeros de ácido lático funcionalizados, como também estratégias de síntese e de modificação. É feita uma abordagem ao conceito de foto-reticulação, atendendo à sua importância na produção de materiais biodegradáveis para aplicação biomédica. Em suma, este capítulo permite uma melhor compreensão do tema, no seguimento do trabalho.

No **Capítulo 2**, são listados os materiais utilizados ao longo do trabalho e é também feita uma descrição mais detalhada dos procedimentos experimentais adoptados na síntese dos pré-polímeros e na foto-reticulação dos materiais. Neste capítulo, é feita uma descrição dos métodos de caracterização usados na aferição das propriedades físicas, químicas, mecânicas e biológicas dos adesivos.

No **Capítulo 3**, são apresentados todos os resultados obtidos e é feita uma discussão dos mesmos, o que permite redigir algumas conclusões parciais acerca dos materiais e adesivos produzidos.

No **Capítulo 4**, são reunidas as conclusões gerais decorrentes do trabalho, sendo também feita uma reflexão às limitações e obstáculos encontrados no seu desenvolvimento. Finalmente, no **Capítulo 5**, reúnem-se algumas sugestões para um futuro desenvolvimento do mesmo trabalho e estratégias que poderão potenciar as capacidades dos adesivos desenvolvidos.

1 INTRODUÇÃO

O avanço científico na medicina e na área biomédica tem permitido o desenvolvimento das técnicas de cuidado médico. Milhares de pessoas, todos os dias, sofrem ferimentos e recorrem a variados procedimentos para o seu tratamento. Este tipo de ferimentos inclui não só feridas superficiais, como também resultantes de interrupções cirúrgicas ou traumas em órgãos, tecido conjuntivo, músculos e tendões.

Estas feridas são interrupções da continuidade de qualquer tecido do corpo e uma cicatrização natural está associada não só a um processo longo e doloroso, como também a uma cicatriz permanente. Desta forma, a ciência evoluiu no sentido de solucionar este problema, proporcionando diversas técnicas de encerramento de feridas¹.

A tentativa de tratamento e a recuperação do corpo humano tem vários anos de história e surge na civilização egípcia em 2500-3000 A.C. Os ancestrais egípcios foram uma das primeiras civilizações a estudar e documentar conhecimentos médicos que eram realmente eficazes. Um desses documentos foi em 1986, adquirido por Edwin Smith, egiptólogo americano que se dedicou a decifrar e traduzi-lo, resultando no Papiro Cirúrgico de Edwin Smith. É, então, pelas mãos do mesmo que são pela primeira vez mencionadas suturas cirúrgicas no tratamento de feridas abertas no crânio^{2,3}.

Por volta de 600 A.C, foram também mencionados por Sushruta procedimentos para tratamento de cataratas e reconstrução nasal⁴.

Na Roma Antiga, Cornelius Celsus (25 A.C. a 50 D.C.) escreveu uma enciclopédia, na qual constam conteúdos médicos sobre cirurgia, onde é sugerido unir os limites de feridas por meio de suturas, para promover a sua cicatrização⁴⁻⁶.

A utilização de adesivos é mais recente, datando de há vários séculos atrás, onde se utilizavam, por exemplo, partes de animais, como ossos, cartilagem e tendões para fazer uma gelatina que serviria como cola, ou mesmo sangue e clara de ovo para serem usados como adesivos biológicos^{5,7}.

Por volta dos anos 50, passaram a ser usados adesivos cuja composição era à base de cianoacrilatos e fibrina^{7,8}. Estes materiais são atualmente utilizados em práticas cirúrgicas, apesar de existirem algumas contraindicações associadas, como problemas de citotoxicidade dos cianoacrilatos e o risco de transmissão de doenças da fibrina^{5,9}.

1.1 TÉCNICAS DE ENCERRAMENTO DE INCISÕES

Milhares de procedimentos cirúrgicos são realizados em todo o mundo e o número continua a crescer a cada ano¹⁰. Estima-se que em 2012, mais 300 milhões de cirurgias foram realizadas, correspondendo a um aumento de 36% em comparação aos 8 anos anteriores. A procura de novas alternativas para encerramento de incisões é uma constante e é possível contar com um extenso leque de materiais, com diferentes propriedades e modos de aplicação. Desta forma, é necessária uma avaliação prévia especializada do estado clínico do paciente, nomeadamente o local de aplicação, extensão da incisão, idade e estado de saúde¹¹⁻¹³.

1.1.1 Técnicas convencionais

As técnicas mais usadas para encerramento de incisões são as suturas e agrafos, estando ambas, no entanto, associadas a diversas desvantagens. Tanto as suturas como os agrafos estão relacionados com episódios de infeção e formação de cicatrizes e, por vezes, a sua utilização é contraindicada⁵. De salientar outras desvantagens, tais como a necessidade de posterior remoção na maioria dos casos, bem como a dor associada ao uso destas práticas, que pode até exigir recurso a anestésicos^{1,14}.

1.1.1.1 Suturas

A aplicação de suturas está presente em vários procedimentos cirúrgicos, desde lacerações cutâneas que surgem no dia-a-dia, a complexas cirurgias como transplantação de órgãos⁵, dado que estes biomateriais possuem capacidade de ser utilizados na junção de vasos sanguíneos^{15,16}. O principal objetivo da aplicação de suturas cirúrgicas é aproximar duas extremidades do tecido lesado, permitindo um processo de cicatrização mais eficaz, reduzindo o risco de infeção e prevenindo o sangramento^{11,17}.

Para que a sua aplicação seja adequada, prevêm-se algumas características obrigatórias, tais como uma reação tecidual mínima, boas propriedades mecânicas (fácil manuseamento, flexibilidade, elasticidade e uma resistência à tração que não seja maior que a do tecido), ser adequado para esterilização, não devendo causar reações alérgicas, não ser cancerígeno e ser biocompatível¹⁸⁻²⁰.

Apesar do seu uso ser apelativo, estes materiais ainda apresentam algumas lacunas, como a necessidade de anestesia, o uso de agulhas que provocam danos permanentes nos tecidos, uma taxa de infeção relativamente alta e a necessidade de uma remoção pós-cirúrgica em alguns casos^{11,12,18,19}.

Introdução

A classificação das suturas é feita, geralmente, quanto à origem do material que a constitui, dividindo-se em natural ou sintética, e quanto à sua permanência no organismo – biodegradabilidade, categorizando-se como reabsorvível ou não-reabsorvível^{11,16,19}. Poderão ser também diferenciadas segundo o número de filamentos que as constituem, dividindo-se assim em monofilamentadas ou multifilamentadas^{11,15,16,19}.

A Figura 1.1 representa, esquematicamente, a classificação de suturas.

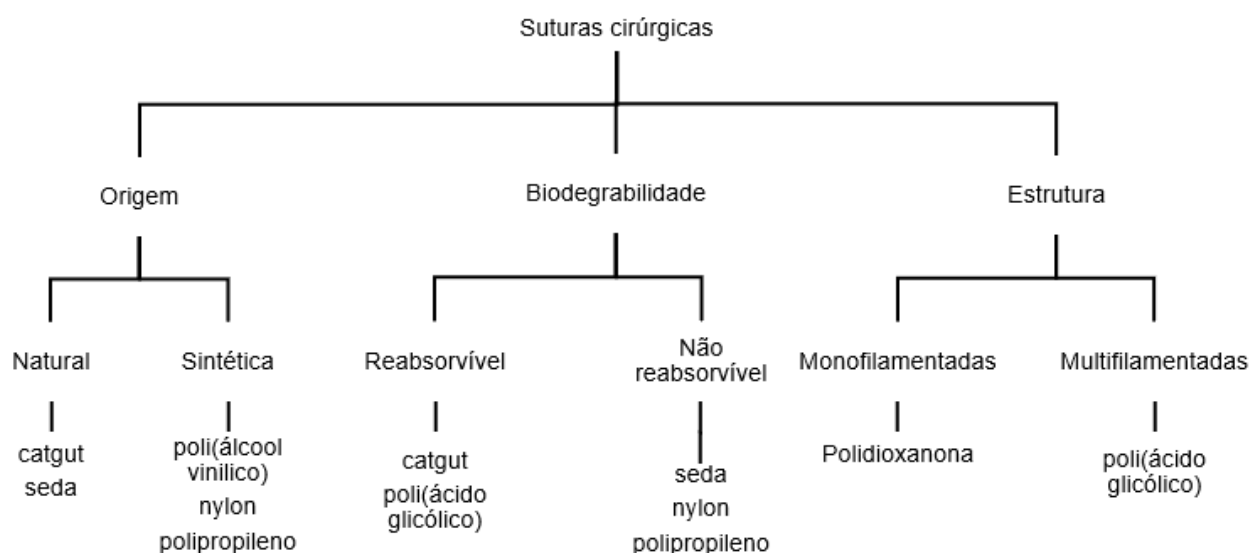


Figura 1.1 - Classificação dos fios de sutura.

A biodegradabilidade de uma sutura varia consoante a origem do material que a compõe, podendo dar-se por degradação enzimática ou por hidrólise. A rutura de suturas de origem natural dá-se através de degradação enzimática, ao passo que as suturas de origem sintética se degradam por processos de hidrólise, em que a água penetra de forma gradual nos filamentos, originando uma deterioração da cadeia polimérica^{5,11,16,21,22}.

As suturas reabsorvíveis definem-se pela rápida degradação nos tecidos, perdendo a sua resistência à tração em 60 dias. A maioria destes materiais são usados para aproximar as extremidades da ferida temporariamente, reduzindo a tensão no ferimento até que exista cicatrização suficiente para suportar a tensão normal^{5,16}. Esta característica evita segundas intervenções cirúrgicas, uma vez que a sutura não precisa de ser removida, evitando-se assim possíveis complicações^{5,11}. Tajirian e Goldberg (2010), consideram que a utilização de suturas reabsorvíveis de origem natural se relacione com transmissão de doenças, sendo que é mais adequado o uso de materiais absorvíveis de origem sintética¹³. Este facto é justificado por um maior controlo no processo de fabrico e degradação, sendo assim mais segura a sua utilização^{13,15,23}.

O *catgut* foi o primeiro material de origem natural a ser utilizado em suturas e baseia-se em colagénio proveniente do intestino e tecido conjuntivo de animais saudáveis. Dada a sua origem, riscos associados à mesma e seu valor de resistência à tração relativamente baixo, a sua aplicação é obsuleta^{13,24}.

No que diz respeito a fios de sutura reabsorvíveis de origem sintética, a sua utilização foi iniciada por materiais constituídos por poli(ácido glicólico) (PGA) e posteriormente por poli(ácido láctico-co-glicólico) (PLGA), conhecidos pelos nomes comerciais Dexon[®] e Vicryl[®], respetivamente. Estes materiais sintéticos foram os impulsionadores do desenvolvimento e fabrico de outros materiais, permitindo a existência de uma vasta gama de opções no mercado, cujo processo de fabrico e degradação são passíveis de ser controlados^{11,15,16,19,23}.

Por sua vez, as suturas reabsorvíveis apresentam, também, algumas limitações. Certos fatores, como a condição geral do paciente, podem acelerar o processo de degradação, fazendo com que se perca, prematuramente, a força de tensão. Um aumento da temperatura corporal do paciente ou a existência de uma infeção poderão ser outras condições determinantes dessas alterações no desempenho do material. Além disso, aquando do seu manuseamento, ainda antes da aplicação nos tecidos, pode ocorrer uma degradação do material, caso este entre em contacto com alguma fonte de humidade^{5,11}.

Contrariamente às suturas já descritas, as suturas não-reabsorvíveis, geralmente, mantêm a sua resistência à tração por mais de 60 dias. Não sendo digeridas por enzimas corporais nem hidrolisadas no tecido do corpo, devem ser removidos no pós-operatório^{11,16}.

Os materiais usados são também classificados segundo a sua origem em natural ou sintética. As suturas não-reabsorvíveis de origem natural são divididas em três classes, segundo a *United States Pharmacopeia*¹¹:

Classe I: seda ou fibras sintéticas, mono ou multifilamentadas;

Classe II: Fibras de algodão ou linho, ou fibras naturais ou sintéticas revestidas, cujo revestimento apenas confere espessura à sutura sem adicionar resistência;

Classe III: fios metálicos, mono ou multifilamentados.

Suturas não-reabsorvíveis de origem natural são normalmente constituídas por seda, fibras de algodão e linho. As de origem sintética acabam por surgir nos anos 40 com uma constituição baseada em fios de *nylon* e são as suturas sintéticas não-reabsorvíveis mais comumente usadas, até hoje⁹. Mais tarde surgem as fibras de polipropileno, material usado também atualmente^{5,9,23}.

Introdução

As suturas compostas por um único fio, monofilamentadas, possuem uma estrutura mais frágil, exigindo um manuseamento ainda mais delicado, de forma a evitar a sua rutura. Estes materiais são indicados em cirurgias vasculares, já que conferem menor resistência à sua passagem nos tecidos. Pelo contrário, as suturas multifilamentadas, isto é, compostas por mais do que um fio, apresentam maior flexibilidade, elasticidade e resistência à tração. Tal resistência nem sempre é vantajosa, recorrendo-se à aplicação de um revestimento, de forma a facilitar a sua passagem pelos tecidos^{5,11}. Na Figura 1.2 pode ver-se representada a estrutura destes dois tipos de suturas.

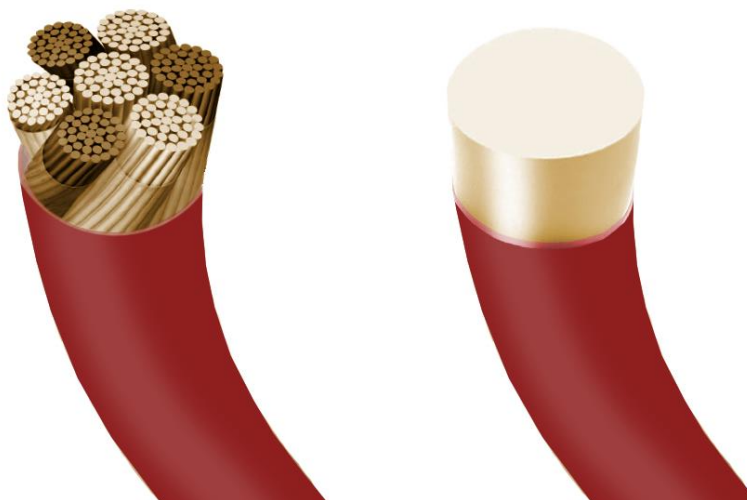


Figura 1.2 - Estrutura de um fio de sutura multifilamentado (Esquerda) e monofilamentado (Direita)

Em síntese, é possível constatar uma enorme variedade de materiais, com diferentes propriedades físicas, químicas e mecânicas apenas no âmbito das suturas. As suturas existentes no mercado, bem como algumas das suas propriedades, podem ser consultadas na Tabela A.1 e na Tabela A.2, do Anexo A.

1.1.1.2 Agrafos

Como alternativa às suturas, o uso de agrafos é muitas vezes um método muito eficaz, no encerramento de incisões²². A aplicação de técnicas com uso de agrafos leva-nos às civilizações Hindu, onde mandíbulas de formigas da espécie *Eciton burchelli* (Figura 1.3) eram usadas para aproximar extremidades de feridas^{25,26}. A formiga era posicionada sobre a incisão e, assim que as mandíbulas se encerravam, o seu corpo era removido, ficando as mandíbulas a exercer função de agrafos.



Figura 1.3 - Mandíbulas da formiga *Eciton burchelli*.

A aplicação de agrafos é ideal em feridas ou incisões de grandes dimensões, desde que afastados de zonas cujos nervos ou tendões não se encontrem próximos da superfície, como face e mãos, e preferencialmente em sítios onde seja necessário um material com grande resistência à tração, como a zona torácica, abdominal e couro cabeludo.

Atualmente, a aplicação de agrafos executa-se com o auxílio de um aplicador automático, cujos agrafos são geralmente de aço inoxidável ou titânio^{5,11,22}. A sua remoção depende da eficácia da cicatrização e do local onde é feita a aplicação, podendo ser feita entre 7 e 14 dias após a sua aplicação¹¹. Com o avanço da medicina e da engenharia de materiais, é, hoje em dia, vasta a quantidade de agrafos e dispositivos que estão disponíveis no mercado^{11,26}.

As vantagens do uso de agrafos para encerramento de incisões assenta na sua rápida e fácil aplicação mas, principalmente, na taxa de infeção baixa e no custo reduzido que lhe está associado^{5,11,26}.

Como em todos os materiais, existem também alguns problemas que advêm da utilização desta metodologia. Enumera-se a utilização de materiais metálicos, que interferem com técnicas como a ressonância magnética e a tomografia computadorizada, a necessidade de equipamento de aplicação e remoção adequados, a remoção extremamente dolorosa para o paciente, o facto de causar danos permanentes no tecido circundante e a possibilidade de causar cicatrizes permanentes se não forem aplicados devidamente^{5,12,26}.

Avanços da área biomédica e da engenharia dos materiais, permitiram a descoberta de soluções biodegradáveis que combatem algumas destas lacunas, tendo sido desenvolvidos agrafos de base polimérica. Os agrafos biodegradáveis mais utilizados são constituídos por copolímeros de poli(ácido lático-co-glicólico) (PGLA), que são gradualmente degradados pelo organismo, em alguns meses, por hidrólise⁵. Mais recentemente, em 2016, foram desenvolvidos e estudados agrafos biodegradáveis de magnésio ultra puro, mostrando-se ser uma alternativa

Introdução

biocompatível, biodegradável e com força de tensão suficiente, para aplicação gástrica²⁷. O *Inisorb*[®] da *Incisive Surgical Incorporation* é um exemplo deste tipo de materiais, exigindo uma manipulação da ferida muito reduzida, proporcionando assim um maior conforto ao paciente. A sua aplicação é subcutânea, resultando numa cicatrização menos dolorosa para o paciente e resultados estáticos mais favoráveis^{28,29}.

1.1.1.3 Fitas adesivas cirúrgicas

Face às limitações apresentadas pela utilização de suturas e agrafos, como a necessidade anestésica e a introdução da agulha na pele são propulsoras da busca de meios alternativos, surgem técnicas como as fitas adesivas cirúrgicas que têm a capacidade de aproximar as extremidades de lacerações ou auxiliar na cicatrização de incisões^{11,26}.

Em contacto com a pele, as fitas adesivas cirúrgicas caracterizam-se por uma baixa taxa de infeção e estão associadas a processos de aplicação rápidos e indolores, de custo reduzido, sem necessidade de utilização de instrumentos auxiliares e anestésias. Não se conhecem efeitos nocivos na pele e a duração da sua utilização é indicada por longos períodos de tempo^{5,11,18,26,30}.

Este método é oportuno em feridas cujas extremidades se encontrem próximas, como ferimentos de menor dimensão e baixa profundidade e, essencialmente, em zonas de baixa humidade, já que este fator diminui a sua capacidade de adesão aos tecidos. Outros aspetos que limitam a aplicação de fitas adesivas cirúrgicas é a sua implementação em zonas sujeitas a constantes movimentos de extensão e/ou flexão ou em zonas pilosas, e a fácil remoção, ainda que accidental, por parte dos pacientes^{5,11,18,26,30}. Além disso, este método não apresenta resultados hemostáticos positivos⁵.

As características mencionadas levam a definir esta metodologia não só como uma alternativa eficaz quando as desvantagens a ela associadas não são fatores críticos, mas também como complemento ao uso de suturas ou agrafos⁵.

1.1.2 Adesivos cirúrgicos

O uso de métodos como agrafos e suturas, pelas desvantagens associadas, levaram à necessidade de cooperação entre áreas científicas como a engenharia, a medicina e a biologia, de forma a desenvolver uma alternativa às técnicas convencionais. A junção destes conhecimentos quer a nível das propriedades físico-químicas quer biológicas permitiu o desenvolvimento de técnicas eficazes e biocompatíveis^{1,31-34}. Entenda-se como biocompatibilidade a capacidade de um material e os seus produtos de degradação não provocarem respostas adversas que danifiquem os tecidos e/ou os órgãos envolventes³⁵.

Em busca de alternativas às técnicas convencionais, surgem os adesivos cirúrgicos, como uma solução mais segura e eficaz. Ao contrário dos métodos tradicionais, os adesivos são uma metodologia que, além de eficaz na aproximação dos tecidos, representa uma alternativa de aplicação indolor e de rapidez considerável em meios internos ou externos, não necessitando de administração de anestésicos ou utilização de instrumentos auxiliares como agulhas. Estes benefícios tornaram-nos muito atrativos para os cirurgiões^{1,31,32,36}. Esta técnica tem a capacidade de reaproximar duas extremidades da incisão, possibilita uma cicatrização e aplicação mais rápidas, cómodas e menos dolorosas, reduz do tempo de cirurgia e permite que se evitem deslocamentos do paciente a uma unidade de saúde, uma vez que não é necessária uma remoção pós-cirúrgica^{1,12,31}. Adesivos cirúrgicos apresentam-se também como sistemas de libertação controlada de fármacos, desde antibióticos, a analgésicos e quimioterapia, auxiliando assim a terapêutica pós-cirúrgica do paciente^{1,9,32}. Às propriedades já mencionadas, juntam-se a baixa taxa de infeção associada ao seu uso e os resultados estéticos positivos obtidos. Contudo, esta metodologia apresenta uma força de tensão, significativamente menor que a das suturas.

Uma vez que se destina a aplicações no corpo humano, estes adesivos devem conferir algumas propriedades físico-químicas e biológicas que possibilitem a sua implementação.

Em suma, considera-se que um adesivo ideal deve ter propriedades de adesão aos tecidos biológicos favoráveis (segurar dois tecidos enquanto for necessário), ter propriedades hemostáticas, ser biodegradável e biocompatível, ter um tempo de solidificação relativamente baixo para evitar vazamentos e ser de fácil e rápida aplicação, em contexto clínico e cirúrgico. É extremamente importante que o adesivo possua uma conformidade mecânica e garanta uma estabilidade estrutural para que facilite o processo de cicatrização^{1,37,38}. A elevada eficiência do processo de polimerização e a elevada capacidade de adesão em superfícies húmidas são, também, características a ter em conta aquando do desenvolvimento deste tipo de materiais^{7,37}. A sua biodegradabilidade é definida pela capacidade de excreção dos produtos resultantes da sua degradação pelo sistema renal, evitando a sua acumulação e possível toxicidade e/ou efeito alérgico ou cancerígeno³⁷.

Os adesivos são, então, a solução mais favorável para encerramento de feridas e incisões, o que leva a um grande interesse e procura de materiais e formulações que sejam o mais ideais possível. Existem alguns adesivos cirúrgicos no mercado e é possível dividi-los em três categorias: naturais, sintéticos/semisintéticos e biomiméticos. As diferenças são muitas, entre cada categoria, o que oferece aos profissionais um variado leque de opções, quase personalizado, para cada procedimento cirúrgico.

1.1.2.1 Adesivos cirúrgicos naturais

Os adesivos naturais são todos aqueles constituídos por polímeros naturais, extraídos de fontes biológicas, como o sangue humano ou proteínas isoladas de origem animal e vegetal, o que os torna uma alternativa de baixo custo, não tóxica, biocompatível e biodegradável. Foram estes materiais que deram início à era dos adesivos cirúrgicos^{34,39}. A sua biodegradabilidade é a característica que mais valoriza a sua utilização, face aos adesivos de origem sintética¹⁹.

Apesar da suas propriedades biológicas, polímeros naturais como a fibrina, colagénio e alguns polissacarídeos apresentam algumas desvantagens como a baixa resistência mecânica^{1,19}, a elevada probabilidade de transmissão de doenças através da corrente sanguínea e reações alérgicas, fatores que têm contribuído para a sua substituição por materiais sintéticos, ainda que não por completo¹². De seguida, irão ser sucintamente descritos alguns dos materiais de origem natural mais utilizados, sendo que se apresentam alguns dos adesivos naturais já existentes no mercado, na Tabela B.1 do Anexo B.

Os adesivos à base de gelatina derivam do colagénio, um polímero biodegradável, solúvel em água e com diversas aplicações que passam desde a indústria farmacêutica, à biomédica e à química, dada a sua biocompatibilidade^{9,40,41}. Exemplos da sua utilização são o desenvolvimento de microesferas para sistemas de libertação controlada de fármacos, a produção de hidrogéis biodegradáveis para tratamento de queimaduras e aplicação como selante^{40,42}. Este tipo de adesivos é sensível a meios aquosos e microbianos e, apesar de não serem tóxicos, requerem um pré-tratamento (modificação química com um agente de reticulação), de modo a que seja possível controlar as suas taxas de adesão e degradação¹. O primeiro adesivo à base de gelatina surge em 1979, com o nome de *GRF glue*, uma mistura de gelatina com um agente reticulante e formaldeído, tendo-se obtido uma taxa de sobrevivência elevada entre os pacientes em que foi utilizado^{9,43}. Mais tarde, viria a ser de uso restrito, comprovando-se ser causador de problemas a longo prazo, devido ao seu agente de reticulação, o formaldeído⁴⁴. Outras alternativas foram surgindo como o uso de glutaraldeído, que se revelou também citotóxico⁴⁵, e de outros agentes como carbodiamidas e genipina, que foram testadas *in vitro*^{46,47}.

Na última década tem-se verificado um aumento do interesse na procura de fontes alternativas de obtenção de gelatina, uma vez que, na sua maioria, esta é obtida a partir de pele e ossos de espécies mamíferas, mais especificamente suínos e bovinos, com surtos associados. A alternativa encontrada passa pela obtenção de gelatina a partir de espécies marinhas. No entanto, tendo em conta a sua produção limitada com custos elevados esta possibilidade não é apelativa relativamente à gelatina convencional⁴⁸.

Os adesivos à base de fibrina resultam de uma combinação de vários componentes sanguíneos, entre os quais o fibrinogénio, a trombina e o fator XIII, intervenientes na coagulação, e também aprotinina e cloreto de cálcio^{1,49}. A formação da fibrina dá-se a partir do fibrinogénio por uma reação catalisada pela trombina na presença de íões cálcio. De seguida, a fibrina é polimerizada, formando-se um coágulo estável, que será posteriormente reticulado pelo fator XIII ativado. Em suma, estes componentes, todos juntos, são capazes de replicar as fases finais de coagulação do sangue^{1,12}. São usados em diversas aplicações, nomeadamente cirurgias reconstrutivas, oftalmológicas, torácicas e cardiovasculares, sendo também combinados com técnicas convencionais. Estas aplicações surgem da sua capacidade de redução de perdas ou vazamentos de sangue e das suas propriedades hemostática e não inflamatória dos tecidos. Uma vez que são de origem natural, possuem uma maior biocompatibilidade e biodegradação. No entanto, este facto representa também um risco; como são extraídos de um dador, exige-se uma maior segurança devido ao risco elevado de transmissão de doenças, como o HIV, Hepatite B e BSE^{1,49}. Adicionalmente, adesivos à base de fibrina revelam-se mais dispendiosos e limitados à oferta, dada a necessidade de transfusão, tornando-os menos apelativos, comparando com materiais sintéticos¹². Existem vários adesivos fibrínicos no mercado, entre eles o Beriplast-P^{®50}.

1.1.2.2 Adesivos sintéticos

Apesar de na prática serem utilizados tanto adesivos sintéticos como naturais, os adesivos sintéticos possibilitam uma grande variedade de vantagens. O seu estudo e desenvolvimento baseia-se na capacidade de controlo relativamente^{1,19,34}:

- i. à finalidade;
- ii. à sua estrutura 3D e composição, fazendo ajustes nos grupos funcionais que interagem com tecidos biológicos;
- iii. ao seu peso molecular, garantindo a sua excreção pelo sistema renal.

O desenvolvimento destes materiais tem também como objetivo resolver as lacunas de resistência mecânica associadas aos adesivos de origem natural e melhorar a capacidade de adesão¹².

Uma das soluções sintéticas são os adesivos à base de cianoacrilatos. No entanto, apesar de possuírem uma boa capacidade de adesão em meios húmidos e terem uma reação de polimerização bastante rápida, degradam-se em meios aquosos formando formaldeído e estando associados a toxicidade, respostas inflamatórias, reações alérgicas e potenciais fontes carcinogéneas e mutagénicas^{1,9,19,39}.

Introdução

As suas limitações levaram a que a *Food and Drugs Administration* (FDA) tivesse alguma dificuldade em aceitar bioadesivos de base cianoacrilatos nos Estados Unidos da América, ainda que estes possuíssem uma elevada capacidade hemostática e de adesão⁵. Ainda assim, estes adesivos são vulgarmente utilizados no encerramento de pequenos cortes e lacerações dermatológicas e em cirurgias plásticas e oftalmológicas^{1,19,34,39}.

Surgiram outras soluções de forma a preencher todas as características necessárias, como os adesivos à base de poliuretano.

As poliuretanas pertencem a uma das famílias de polímeros mais versáteis, uma vez que podem ser adaptados a várias propriedades e, conseqüentemente, a várias aplicações. Encontram-se em implantes mamários, válvulas cardíacas, isolante de ligações de *pacemakers*, próteses vasculares e bioadesivos^{1,51}. As suas excelentes propriedades mecânicas, térmicas e biológicas, aliadas à sua capacidade de integração de outros grupos funcionais como por exemplo éster, éter e ureia, justificam a escolha destas matérias nas mais diversas aplicações^{9,39}. O seu potencial biomédico assenta na presença de grupos isocianato livres na sua constituição que, ao reagir com os grupos amina presentes nos tecidos humanos, formam ligações ureia e assim possibilitam a adesão nos mesmos³⁹.

Os pré-polímeros de poliuretana foram usados, pela primeira vez, em 1959 com o objetivo de fundir fragmentos ósseos. Foi usado um adesivo de nome comercial Ostamer[®], juntamente com um catalisador e a reação demorou entre 25 a 30 min, tendo uma duração máxima no paciente de dois dias, resultados estes que foram considerados inadequados⁵².

Lipatova (1986), Sheikh *et al.* (2001) e Ferreira (2008), vieram a desenvolver outros adesivos à base de poliuretano, mas apesar de bons resultados de adesão, o tempo de cura não se adequava às necessidades cirúrgicas^{36,37,53}.

O mais estudado acabou por ser o KL-3 que conjuga um pré-polímero de diisocianato de toluileno (TDI, uma mistura dos isómeros 2,4 e 2,6) com polioxipropileno glicol com um excesso de TDI. Posteriormente, é adicionado dimetiltri (aminometil) fenol como acelerador de cura. Existe uma reação com a água presente na ferida, formando grupos ureia e libertando dióxido de carbono. Estas reações levam à formação de uma estrutura porosa fina, na superfície da aplicação. No entanto, estão também associados a inflamações locais, citotoxicidade e fraca biocompatibilidade¹.

No anexo A, Tabela A.1, encontram-se os principais polímeros usados em adesivos sintéticos.

1.1.2.3 Adesivos biomiméticos

Os adesivos biomiméticos surgem como tentativa de resolução das dificuldades apresentadas pelos adesivos descritos anteriormente. Uma dessas dificuldades é a sua adesão em superfícies húmidas, uma vez que a água enfraquece as forças de *van der Waals*, forças responsáveis pela adesão na interface^{39,54}. Desta forma, surge a necessidade de desenvolver polímeros biodegradáveis de maior resistência e com tempo de degradação adequado ao tempo de cicatrização⁵⁴. É graças a esta necessidade que muitos investigadores procuram espécies existentes na natureza como modelo base, de forma a potencializar os materiais já utilizados em adesivos à base de cianoacrilatos e fibrina^{39,54}. A sua nova via de investigação inspirou-se na capacidade de fixação das lagartas, superfícies verticais, e também de algumas espécies marinhas como algas, estrelas-do-mar e mexilhões^{39,54}. Esta propriedade de fixação deve sempre servir como complemento às propriedades requeridas a adesivos cirurgicos⁵⁴.

A observação e estudo do comportamento e dos materiais que permitem aos mexilhões a sua adesão a superfícies húmidas, permitiu adaptar esses materiais para desenvolvimento de bioadesivos resistentes à água, biodegradáveis e biocompatíveis, sem historial de respostas inflamatórias e de citotoxicidade³⁹.

O resultado de todo o estudo das propriedades acima referidas foi o desenvolvimento de um adesivo sintético à base de acrilato de poli (glicerol sebacato) (PGSA), que apresenta biocompatibilidade, que promove reticulação por ligações covalentes em tecidos húmidos, que é biodegradável e que tem elevada elasticidade. Este adesivo resulta da recriação da capacidade de adesão vertical das lagartas e pode ser utilizado como complemento a outras técnicas de encerramento de incisões como suturas e agrafos⁵⁵.

1.2 FOTO-RETICULAÇÃO

Os polímeros foto-polimerizáveis têm na sua constituição um fotoiniciador que absorve a energia no comprimento de onda do ultravioleta (UV) e sofre excitação, originando radicais livre que darão início à polimerização de monómeros líquidos ou soluções de macrómeros. Estes possuem na sua estrutura grupos funcionais que, sob incidência de luz UV, sofrem reações dando origem à sua reticulação. A interacção entre estes grupos funcionais e os radicais livres provenientes do fotoiniciador originam ligações intermoleculares entre as cadeias que compõem o polímero e assim inicia-se o processo de reticulação³².

Os poliésteres são um grupo de polímeros que possuem na sua cadeia o grupo funcional éster e são obtidos através de poliesterificação entre ácidos funcionais e álcoois. A poliesterificação consiste numa reação de policondensação reversível onde são não só obtidos

Introdução

poliésteres, como também subprodutos de baixo peso molecular. De forma a se obter apenas o produto desejado, é necessário garantir que a reação se dá apenas no sentido direto, removendo os subprodutos com técnicas como destilação azeotrópica⁵⁶.

As propriedades dos poliésteres dependem essencialmente dos monómeros usados na sua síntese e respetiva proporção. A manipulação destes parâmetros irá definir as propriedades dos polímeros⁵⁷.

Poliésteres alifáticos possuem ligações éster biodegradáveis e uma boa biocompatibilidade, que os torna o grupo de polímeros mais utilizado na área biomédica, destacando-se o PLA, PGA e a policaprolactona (PCL)⁵⁸.

Contudo, as propriedades mecânicas e térmicas associadas a estes polímeros não são satisfatórias, o que leva à elaboração de estratégias de modificação destes poliésteres de forma a combater essas limitações⁵⁹. Essas modificações, atualmente, baseiam-se essencialmente na utilização de métodos de síntese otimizados (mais eficazes e vantajosos), combinação dos poliésteres com outros materiais e a utilização de aditivos após a síntese dos mesmos⁶⁰.

A estratégia de modificação que será abordada no presente trabalho é a da combinação dos poliésteres com outros materiais, tendo já sido realizados trabalhos de desenvolvimento de copolímeros (utilização de mais do que um monómero) e polímeros combinados com poliuretanas^{33,51,61}.

Na literatura são também encontrados variados estudos já realizados em que é feita uma funcionalização dos poliésteres. Esta funcionalização consiste na incorporação de grupos funcionais durante a síntese dos polímeros. Desta forma, é possível potenciar um melhoramento das propriedades do poliéster, como a sua degradabilidade e comportamento hidrolítico. Compostos como acrilatos e metacrilatos são os mais utilizados nestas modificações^{36,39,62,63}.

O PLA tem sido muito popular na preparação de *scaffolds*, suturas reabsorvíveis e sistemas de libertação controlada de fármacos. Caracterizam-se por serem materiais de síntese fácil e com taxas de degradação elevadas⁵⁹.

A polímeros de PCL associam-se taxas de degradação mais reduzidas, em relação ao PLA e PGA, o que os torna ideais para aplicações mais prolongadas, como implantes de longa duração. No entanto, este polímero é muito hidrofóbico, fator que pode prejudicar as suas propriedades de adesão⁵⁹.

Posto isto, para este trabalho considerou-se interessante o desenvolvimento de copolímeros de PLA e PCL funcionalizados com acrilato de 2-isocianatoetilo (AOI), em diferentes proporções.

A eficiência da reação de polimerização depende essencialmente dos monómeros, do comprimento de onda do feixe de luz e do fotoiniciador. O fotoiniciador é o composto que tem mais influência em diversos parâmetros da reação desde a velocidade de reação, à estabilidade e fotossensibilidade, ao espectro no qual ocorre a reação^{32,33}.

Na escolha do fotoiniciador deve ter-se em conta a aplicação final do produto e sendo, neste caso, para aplicação biomédica, é importante que este seja biocompatível³². Foi estudada por Williams *et al.* (2005), a biocompatibilidade de três fotoiniciadores diferentes, já conhecidos na produção de biomateriais: (2-hidroxi-1-[4-(2-hidroxietoxi)fenil]-2-metil-1-propanona, 1-hidroxiciclohexil-1-fenil cetona e 2,2-dimetoxi-2-fenilacetofenona (Irgacure[®] 2959, Irgacure[®] 184 e Irgacure[®] 651, respetivamente). Os resultados obtidos nesse estudo, demonstraram que o Irgacure[®] 2959 apresentava uma tolerância celular superior, em concentrações elevadas e em diferentes tipos de células⁶⁴. Para que se obtenha uma maior taxa de reticulação, é necessário que oligómeros sejam, na maioria dos casos, funcionalizados com grupos que contenham ligações duplas de carbono, com derivados de metacrilatos e acrilatos, para que se obtenham macrómeros.

Para o presente trabalho foi escolhido o Irgacure[®] 2959 (Figura 1.4), como fotoiniciador, pelos motivos referidos anteriormente.

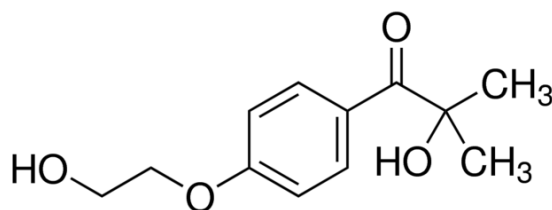


Figura 1.4. - Estrutura química do Irgacure[®] 2959.

1.2.1 Adesivos foto-reticuláveis

Os adesivos compostos por polímeros foto-reticuláveis, por irradiação de luz UV, têm despertado um maior interesse por parte dos investigadores, dadas as vantagens que estes apresentam para processos de cura mais rápidos, à temperatura ambiente. Estes polímeros possibilitam um controlo da sua elasticidade, elevado grau de estabilidade em armazenamento e são ideais para aplicações em tecidos doentes e enfraquecidos^{32,65}. Este fenómeno é possível devido à presença de grupos funcionais que sofrem reações por incidência de radiação, reticulando-se. É, no entanto, necessária a presença de um fotoiniciador, cujas moléculas absorvem a luz UV, sofrendo excitação e dando origem a radicais livres. Estes radicais vão servir como iniciadores do mecanismo de polimerização³².

Introdução

Kao *et al.* (1997) foi responsável pela preparação de bioadesivos foto-reticuláveis por ação de irradiação UV, que apresentavam propriedades mecânicas adequadas, e um tempo de cura de cerca de 3 minutos, tempo esse que foi considerado passível de melhoria⁶⁶.

Ferreira *et al.* (2008) estudou a síntese de uretanos baseada em policaprolactona para produção de bioadesivos, considerando de fácil reticulação, através de luz UV. Da mesma investigação, resultou um adesivo de uma mistura de PCL com metacrilato de 2-isocianoetilo (IEMA) Irgacure[®] 2959, obtendo-se tempos de cura na ordem dos 60 segundos. Foram também realizados vários testes de absorção de água, resistência térmica, tensão e energia superficial, análise microscópica eletrônica, biodegradabilidade em plasma sanguíneo humano e hemocompatibilidade. Os resultados obtidos revelaram uma morfologia porosa, hemocompatível, com carácter trombogénico e uma adesão suficiente (sujeito a diferentes tensões), apesar da taxa de degradação ser baixa. Foi também testado em animais e os resultados não apresentavam sinais de necrose ou inflamação nos órgãos onde foi feita a aplicação³⁶.

Uma outra classe de adesivos sintéticos são os baseados num hidrogel produzido à base de polietileno glicol (PEG). Trata-se de um polímero de estrutura simples, mas possui algumas propriedades favoráveis que o tornam promissor em sistemas fisiológicos: é solúvel em água e solventes orgânicos¹, biocompatível, biodegradável, tem boa adesão em ambientes húmidos, evita o reconhecimento do sistema imunológico e, talvez uma das mais interessantes, tem capacidade, quando combinado covalentemente com outras moléculas, de imprimir nelas as suas características, por exemplo, tornar uma molécula tóxica numa não tóxica^{1,67}. Estes adesivos foram aprovados pela FDA para várias aplicações, inclusive biomédicas, sendo vastamente usado em sistemas de libertação de fármacos e proteínas⁶⁸⁻⁷⁰. São vários os produtos no mercado à base de PEG, entre eles *FocalSeal*[™], *CoSeal* e *DurelSeal*[™].

Ainda assim, é possível apontar algumas limitações dos adesivos à base de PEG, que limitam a sua utilização. Além de serem de difícil manuseamento, apresentam um tempo de preparação e aplicação elevados, para além das suas fracas propriedades mecânicas. Por último, a elevada capacidade de absorção deste hidrogel, limita a sua aplicação, pois pode comprometer a integridade dos tecidos circundantes⁹.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

Neste capítulo é feita uma descrição detalhada dos procedimentos experimentais adotados no decorrer do projeto, assim como também das técnicas de caracterização utilizadas, de modo a tornar mais clara a apresentação dos resultados obtidos, para cada material preparado, no Capítulo 3.

Depois de uma reflexão sobre os trabalhos já realizados e todas as referências estudadas, foram escolhidos a PCL e oligômeros de ácido lático (OligLA), ambos funcionalizados, como materiais base do presente trabalho.

2.1 MATERIAIS

Na Tabela 2.1 são enumerados os materiais utilizados no decorrer do trabalho, quer para a preparação dos copolímeros, como para a foto-reticulação e caracterização.

Tabela 2.1 - Reagentes utilizados na preparação, funcionalização, reticulação e caracterização.

Função	Nome	Abreviatura	Peso Molecular (g.mol ⁻¹)	Pureza (%)	Fornecedor	
Preparação de copolímeros	Poliéster alifático	Policaprolactona	PCL	530	-	<i>Sigma-Aldrich</i>
	Monómero	Ácido lático L(+)	LA	90,08	80,0	<i>Sigma-Aldrich</i>
	Monómero	1,4-butanodiol	BD	90,12	99,0	<i>ACROS organics</i>
	Monómero	Acrilato de 2-isocianoetilo	AOI	141,13	>98,0	<i>Tokio Chemical Industry</i>
	Solvente	Éter dietílico	ED	74,12	99,0	<i>ACROS organics</i>
Reticulação fotoquímica	Fotoiniciador	Irgacure®2959	Ir2959®	224,3	-	<i>Ciba Specialty Chemicals</i>
Caracterização	Solvente	Clorofórmio-deuterado	CD	119,38	99,0	<i>Merck</i>

2.2 MÉTODOS DE SÍNTESE

2.2.1 Síntese de pré-polímeros por modificação com acrilato de 2-isocianatoetilo

2.2.1.1 Síntese de oligómeros de base ácido láctico

Nesta fase, foi feita a síntese do oligómero, através de uma destilação do ácido láctico L(+) (LA) (Figura 2.1). O procedimento experimental foi feito de acordo com a metodologia desenvolvida por Marques *et al.* (2016)⁶³.

De acordo com a metodologia experimental mencionada, uma policondensação direta do LA leva à obtenção de um polímero no estado líquido, com baixa viscosidade, propriedades favoráveis para a sua posterior cura. Os polímeros resultantes apresentam também baixo peso molecular, conduzindo a materiais com tempos de degradação menores em ambiente biológico, o que é desejável para as aplicações pretendidas⁶³.

O procedimento experimental consiste em introduzir uma solução aquosa de LA, num balão redondo de 250 mL, com três tubuladuras. De seguida, calculou-se a quantidade de 1,4-butanodiol, de acordo com a estequiometria da reação (6:1) e as massas molares dos reagentes, que foram adicionadas ao balão.

Posto isto, a tubuladura central do balão foi fechada, na da esquerda colocou-se uma corrente contínua e constante de azoto, de forma a garantir um ambiente inerte e, por fim, na da direita foi colocado um adaptador de redução, com o objetivo de se remover a água do sistema reacional. A reação decorreu com o balão mergulhado num banho de óleo a 150°C, com agitação mecânica, durante 9h.

Passado o tempo de reação, o produto final foi devidamente identificado e armazenado, num local fresco e seco para posterior funcionalização.

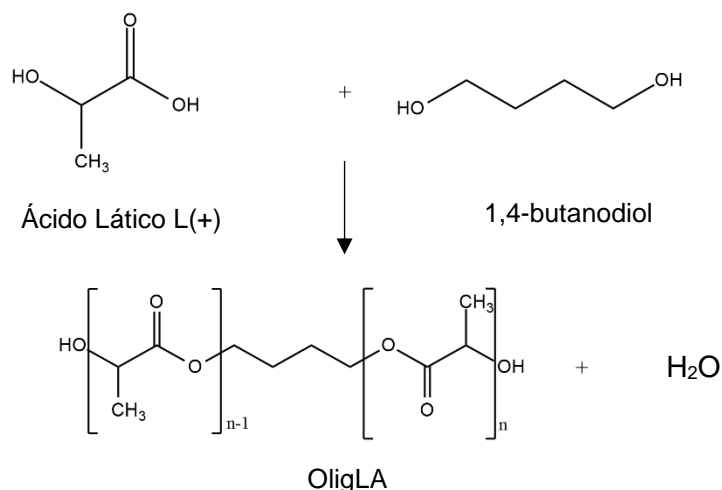


Figura 2.1 - Reação de síntese de oligómeros de ácido láctico.

2.2.1.2 Funcionalização do oligómero de ácido láctico

Para a funcionalização do oligómero obtido anteriormente, voltou-se a adotar a metodologia desenvolvida por Marques *et al.* (2016), apenas com a alteração do grupo funcional⁷¹. Esta funcionalização foi feita com AOI, de acordo com razão equimolar com os grupos terminais de OH do pré-polímero, tendo sido adicionadas duas moles de AOI por cada mol de oligómero (2:1) (Figura 2.2).

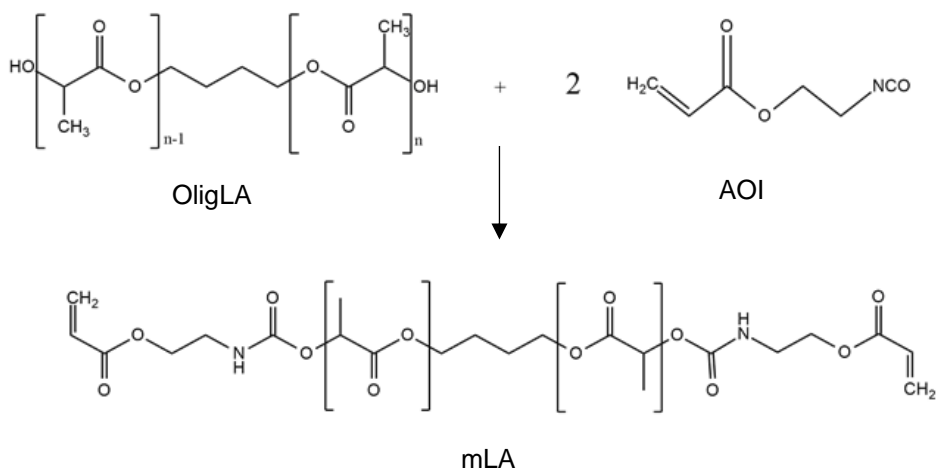


Figura 2.2 - Síntese do macrómero de ácido láctico, através da reação funcionalização do OligLA com AOI.

Num balão volumétrico de três tubuladuras, com 100 mL de capacidade, foi inserido o OligLA e 10 mL de éter dietílico, um solvente com baixa toxicidade e uma baixa temperatura de ebulição, que irá promover a mistura entre o oligómero e o AOI. Dada a alta volatilidade do solvente, foi inserido na tubuladura central um condensador, com o intuito de promover o refluxo do solvente. No topo do condensador, foi inserida uma torre de secagem, com cloreto

Materiais e Métodos

de cálcio, de forma a que não existisse entrada de humidade no sistema reacional. Quanto às duas tubuladuras laterais, numa foi inserida uma corrente contínua de azoto, inertizando o sistema, enquanto a outra tubuladura permaneceu fechada, durante toda a reação, de forma a evitar a perda de solvente por evaporação. A adição do AOI ($\approx 0,02$ mol) foi feita de seguida, de forma rápida, mas cuidada, uma vez que este reage fortemente com a água, sendo de evitar a entrada de humidade para o balão. O contacto do AOI com a água levaria à perda dos grupos isocianato, essenciais para a existência de ligações duplas nas extremidades do oligómero. A reação de funcionalização ocorreu durante 24 horas, a uma temperatura constante de 60°C , e o balão foi coberto com um revestimento de algodão, forrado com papel de alumínio para diminuir as perdas de calor e a entrada de luz. Findada a reação, foi adicionado o fotoiniciador Ir2959[®], numa quantidade correspondente a 4% em relação ao número de moles de ligações duplas existentes na molécula modificada. Esta introdução foi feita sob agitação até que o Ir2959[®] se dissolvesse por completo. Completado este processo, o pré-polímero resultante, que irá ser designado ao longo do trabalho por mLA4, foi transferido para um frasco devidamente protegido da luz.

Para melhor perceção da estratégia adotada, pode ser consultada a Figura D.1. do Anexo D.

A Figura 2.3 ilustra a metodologia simplificada da síntese do OligLA e posterior funcionalização.

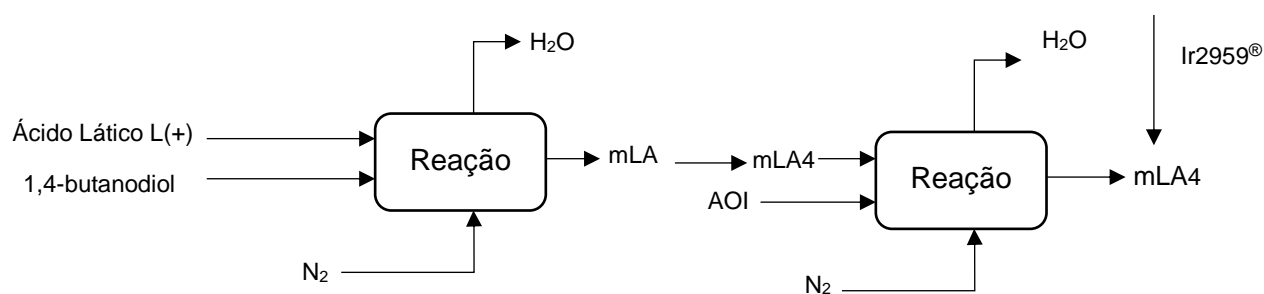


Figura 2.3 - Metodologia de síntese de mLA4.

2.2.1.3 Síntese dos macrómeros de policaprolactona diol

Para que o material seja foto-reticulável, são necessárias ligações duplas de carbono nas extremidades da molécula. Isto pode ser feito sintetizando grupos uretana a partir de PCL, através de modificação dos grupos hidroxilo do polímero com o monómero AOI (Figura 2.4). Desta forma, obteve-se uma nova molécula com ligações duplas de carbono nas extremidades.

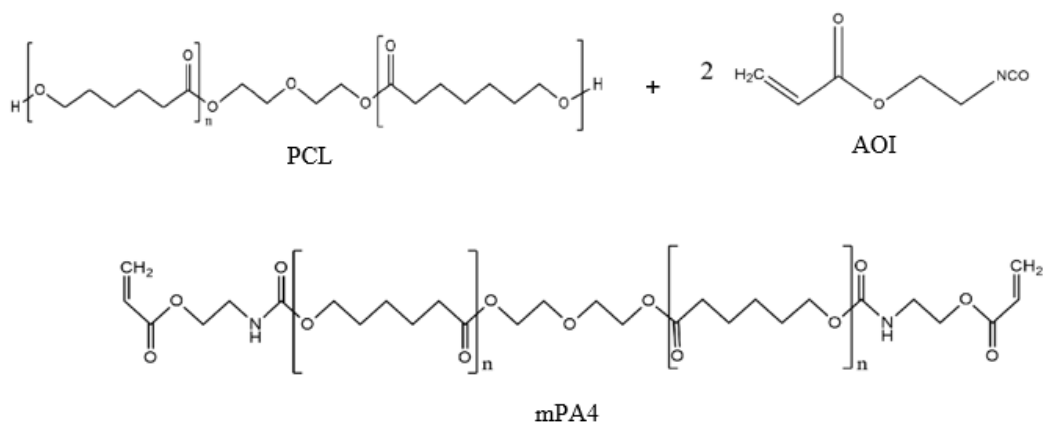


Figura 2.4 - Síntese do macrómero de ácido láctico, através da reação funcionalização da PCL com AOI..

O procedimento experimental desta modificação é semelhante ao adotado na funcionalização do oligómero de ácido láctico. A quantidade de reagentes utilizados foi na proporção de 2 moles de AOI para 1 mol de PCL. Feitos os cálculos, foram então introduzidos no balão 0,0189 moles de PCL, 0,0378 moles de AOI e 10 mL de éter dietílico.

Ao fim das 24 horas, foi então adicionado o fotoiniciador Ir2959[®] à solução sintetizada, na percentagem de 4%, em relação ao número de moles de ligações de carbono duplas existentes. Completado este processo, o pré-polímero resultante, que irá ser designado ao longo do trabalho por mPA4, foi transferido para um frasco devidamente protegido da luz.

A Figura 2.5 ilustra a metodologia de síntese simplificada de mPA4.

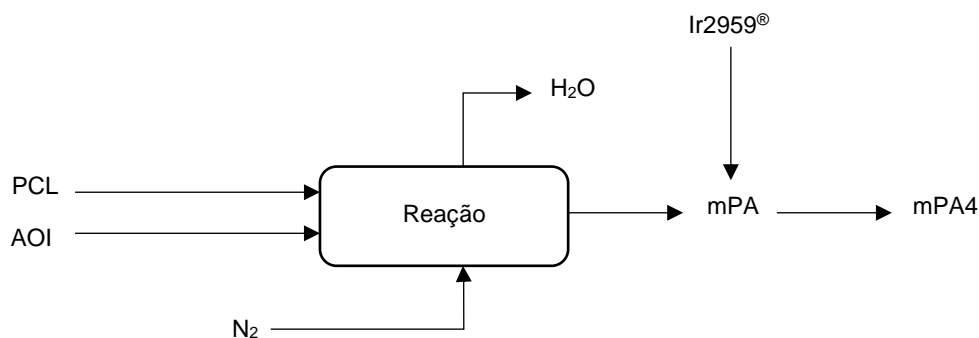


Figura 2.5 - Metodologia de síntese de mPA4.

2.2.1.4 Preparação dos copolímeros de mLA4 e mPA4

Para a preparação dos copolímeros foi feita uma mistura homogênea do mLA4 com o mPA4, em diferentes proporções mássicas resultando em 5 objetos de estudo:

- mLA4: macrómero de ácido láctico funcionalizado com AOI e com 4% de Ir2959[®];

Materiais e Métodos

- mPA4: macrómero de policaprolactona funcionalizada com AOI e com 4% de Ir2959[®];
- mLA4 + mPA4 (1:1) – L1P1: mistura dos macrómeros mLA4 e mPA4, em quantidades iguais;
- mLA4 + mPA4 (1:2) – L1P2: mistura dos macrómeros mLA4 e mPA4, contendo uma quantidade de mPA4 duas vezes superior à quantidade de mLA4;
- mLA4 + mPA4 (2:1) – L2P1: mistura dos macrómeros mLA4 e mPA4, contendo uma quantidade de mLA4 duas vezes superior à quantidade de mPA4.

2.2.1.5 Foto-reticulação

Uma vez obtidos os copolímeros, procedeu-se à a sua foto-reticulação, onde foi possível obter filmes transparentes e flexíveis.

A reticulação fotoquímica foi feita com recurso a uma lâmpada de UV, modelo UVGL-58, *Multiband U.V-254/366NM*, da *MineralLight*[®], sendo que a quantidade de fotoiniciador (Ir2959[®]) utilizada foi de 4%, em relação ao número de moles de ligações de carbono duplas existentes. A adição do fotoiniciador foi feita nos macrómeros no final da sua reação de síntese, pelo que, a quantidade de Ir2959[®] presente nos *blends* é a já existente nos macrómeros.

O procedimento consistiu em colocar cerca de 2 mL de solução dos macrómeros (mLA4 e mPA4) e dos copolímeros (L1P1, L1P2, L2P1) em placas de vidro, devidamente limpa, seca e marcada com as medidas pretendidas. Para que as membranas ficassem o mais semelhantes possível, recorreu-se a um espalhador, garantindo assim uma espessura constante. As placas foram posteriormente inseridas numa câmara selada onde estava inserida a lâmpada UV e foram testados diferentes tipos de reticulação: 30 segundos, 1 minuto, 2 minutos, 3 minutos e 5 minutos.

Foram obtidos filmes transparentes, com diferentes propriedades mecânicas e rendimentos de reticulação.

2.3 MÉTODOS DE CARACTERIZAÇÃO

2.3.1 Espectroscopia de infravermelho com reflexão total atenuada

A técnica de espectroscopia de infravermelho com reflexão atenuada, ou ATR-FTIR (*Fourier Transform Infrared Spectroscopy*) possibilita a identificação de grupos funcionais presentes nas amostras e também acompanhar com maior precisão as reações e a sua eficácia. A ATR é usada como um intensificador de sinal e permite examinar de forma fácil, rápida e precisa amostras líquidas, sólidas ou gasosas⁷²⁻⁷⁴.

O seu modo de aplicação consiste em fazer incidir um feixe de luz infravermelho na amostra, cuja energia é absorvida, seletivamente, pelos grupos funcionais da mesma. A restante energia é refletida dando origem a um espectro^{72,75,76}.

A cada grupo funcional corresponde um comprimento de onda cujo conhecimento prévio permite a leitura dos resultados. A análise ATR-FTIR do presente trabalho foi realizada com o espectrofotómetro *Frontier FT-NIR/MIR Spectrometer*, da Perkin Elmer. Os espectros foram registados com 64 scans, com uma resolução de 4 cm⁻¹. O programa *Spectrum* da Perkin Elmer permitiu analisar e interpretar os resultados obtidos.

2.3.2 Ressonância magnética nuclear

Outra prática usada para identificação de estruturas sólidas ou soluções, é a ressonância magnética nuclear (RMN). Neste tipo de análise, a amostra é sujeita a um campo magnético, cuja radiação eletromagnética é absorvida e emitida novamente, pelos núcleos dos átomos existentes na amostra, permitindo a sua quantificação e posterior representação sob a forma de um espectro característico de RMN⁷⁷.

No âmbito deste trabalho, esta análise permitiu complementar a análise de ATR-FTIR, confirmando a eficácia do procedimento experimental. Ao contrário do que acontece com a análise ATR-FTIR, a análise de RMN permite-nos caracterizar quantitativamente as amostras.

Dissolveu-se uma amostra de 2 mg de cada material (mLA4, mPA4, L1P1, L1P2 e L2P1), em 2 µL de clorofórmio-deuterado e introduziu-se a mesma num tubo de RMN de paredes grossas. Preparada a amostra a analisar, esta foi enviada ao Laboratório de RMN do Centro de Química de Coimbra e analisada num espectrómetro de 9.4 Tesla, com uma sonda TXI de 5 mm.

2.3.3 Determinação do teor de gel

A determinação do teor de gel, mais comumente mencionada por *gel content*, foi realizada a fim de conhecer o grau de reticulação dos filmes desenvolvidos. Foram analisados os valores de teor de gel para todos os tempos de reticulação de 30s, 1, 2, 3 e 5 minutos. De forma a aferir os erros associados, foram usadas 3 amostras de cada um dos adesivos. Seguidamente, os filmes foram secos, até peso constante, pesados (W_i) e colocados em frascos fechados com éter dietílico, durante 24 horas. A função do solvente é a dissolução do pré-polímero líquido, levando a que qualquer quantidade residual presente nas membranas seja dissolvida no mesmo. Passado esse tempo, as amostras foram secas, à temperatura ambiente, e pesadas até se obter um valor constante (W_f). Tendo todos os valores necessários, o teor de gel foi então determinado através da Equação 2.1.

$$Gel\ content\ (\%) = \frac{W_f}{W_i} \times 100 \quad (\text{Equação 2.1})$$

2.3.4 Capacidade de absorção da água

A capacidade de absorção de água, ou *swelling*, define-se pelo aumento do volume dos adesivos, resultante da absorção de humidade. Esta propriedade permite conhecer o comportamento dos adesivos em ambientes húmidos, como o organismo humano. Para esta análise, foram usados 10 adesivos: um de cada copolímero, para os tempos de reticulação de 30s e 2 min (mLA4-30, mLA4-2, mPA4-30, mPA-2, L1P1-30, L1P1-2, L1P2-30, L1P2-2, L2P1-30 e L2P1-2). Cada filme foi então dividido em 3 amostras, de modo a aferir os erros associados. Estas amostras, depois de secas e pesadas (W_s). Posteriormente estas foram inseridas num exsiccador, que nele continha uma solução saturada de sulfato de cobre pentahidratado, com uma humidade relativa de 95%.

Para a determinação da capacidade de absorção de água dos adesivos, determinaram-se os pesos hidratados das amostras após 24h, 72h e 1, 2, 3, 4 e 5 semanas. Com os valores dos pesos determinados e com recurso à Equação 2.2, obtiveram-se então os valores da capacidade de absorção de água das membranas.

$$Swelling\ (\%) = \left(\frac{W_h - W_s}{W_h} \right) \times 100 \quad (\text{Equação 2.2})$$

2.3.5 Degradação hidrolítica em solução de PBS

Tendo em conta a aplicação final dos bioadesivos desenvolvidos, a biodegradação do material é uma das propriedades que merece mais atenção neste trabalho. Desta forma, é possível avaliar a variação de massa dos filmes e aferir a sua estabilidade até ao final do tempo de tratamento.

A análise temporal foi feita de forma semelhante à da capacidade de absorção de água: os 10 adesivos desenvolvidos (mLA4-30, mLA4-2, mPA4-30, mPA-2, L1P1-30, L1P1-2, L1P2-30, L1P2-2, L2P1-30 e L2P1-2) foram divididos em 3 amostras para cada tempo de incubação pré-definido (24h, 72h, 1, 2, 3, 4 e 5 semanas), de maneira a ser conhecido o desvio padrão dos resultados. Uma vez prontas as amostras, estas foram secas, pesadas ($W_{s,i}$) e inseridas em tubos de *falcon*, devidamente fechados e identificados. O passo seguinte foi a preparação de uma solução de PBS (tampão fosfato com pH de 7,4), permitindo assim uma simulação da concentração salina do plasma sanguíneo. Posteriormente inseriram-se 5 mL da solução de PBS

em cada um dos tubos de *falcon* e estes foram colocados na estufa a 37°C -temperatura fisiológica do corpo humano -, iniciando-se assim o estudo de biodegradação. A cada tempo pré-determinado, as amostras correspondentes são removidas da estufa, a solução de PBS é retirada e são colocadas numa câmara a vácuo, a 37°C. Após uma semana, as amostras são retiradas da câmara e pesadas, obtendo-se assim o peso seco final ($W_{s,t}$).

A degradação hidrolítica traduz-se na perda de massa percentual da amostra ao fim de um certo tempo e é dada pela Equação 2.3.

$$\text{Degradação hidrolítica (\%)} = \left(\frac{W_{s,i} - W_{s,t}}{W_{s,i}} \right) \times 100 \quad (\text{Equação 2.3})$$

2.3.6 Análise termogravimétrica

A análise termogravimétrica (TGA) permite avaliar a variação da massa em função da temperatura e/ou do tempo, enquanto as amostras são submetidas a um aumento controlado da temperatura. Foi então possível estudar a estabilidade dos materiais e determinar a temperatura de degradação (T_d), temperatura a partir da qual o material começou a sofrer uma variação de massa considerável. Uma representação da derivada desta variação de massa pode complementar a análise termogravimétrica, uma vez que se obtém uma curva designada por DTG que permite analisar a taxa de degradação.

Foram realizadas análises de TGA ao mLA4, ao mPA4 e aos *blends*, antes e depois de serem reticuladas, obtendo-se os perfis de degradação de todas as amostras analisadas, para posterior comparação das estabilidades térmicas dos diferentes materiais. Para esta análise, recorreu-se ao equipamento SDT Q500 da *Thermal Analysis (TA) Instruments*, tendo sido utilizadas quantidades amostrais de 5 a 10 mg. As amostras foram, então, aquecidas até aos 600°C, com uma taxa de aquecimento de 10°C/min, em atmosfera de azoto a um fluxo de 100 mL/min. Para processamento dos dados recorreu-se ao software da *TA Instruments, Universal Analysis 2000*.

2.3.7 Biocompatibilidade

O termo biocompatibilidade é aplicado para traduzir a capacidade de um material implementado e os seus produtos de degradação não provocarem reações inflamatórias ou imunológicas nos tecidos e órgãos envolventes, propriedade esta que é fundamental em materiais usados na área biomédica^{35,78,79}. No caso específico dos adesivos, é importante que estes não comprometam os processos de vascularização e cicatrização⁹. Com o objetivo de

Materiais e Métodos

avaliar o potencial dos adesivos desenvolvidos, para a aplicação pretendida, foram realizados dois testes de biocompatibilidade. O primeiro teste realizado foi o da viabilidade celular, permitindo avaliar citotoxicidade dos materiais, expondo os adesivos a culturas celulares de fibroblastos humanos; o segundo teste permitiu avaliar o crescimento bacteriano na presença dos adesivos, onde foi possível quantificar a ação antibacteriana dos materiais empregues nos adesivos (as bactérias usadas foram a *E.coli* e a *S.aureus*). Os testes em questão foram realizados na Universidade de Beira Interior (UBI), segundo protocolos experimentais previamente estabelecidos.

2.3.7.1 Estudo da viabilidade celular na presença dos adesivos

Para avaliar a proliferação e adesão de células de fibroblastos humanos, quando estas estão em contacto direto com os adesivos, foi feito o estudo da viabilidade celular que permitiu o estudar o perfil citotóxico dos adesivos produzidos. Este procedimento foi realizado através da técnica 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium (MTS), seguindo a norma ISO 10993-5 e metodologias desenvolvidas nos laboratórios da UBI. As técnicas colorimétricas para avaliação da citotoxicidade de materiais, como a MTS, são as mais utilizadas, uma vez que se definem como versáteis, rápidas e muito reprodutíveis. O primeiro passo foi a esterilização dos adesivos por incidência contínua de luz UV. De seguida, foram preparadas as culturas de células de fibroblastos humanos, em contacto direto com os adesivos, numa densidade de 10×10^3 células por amostra, contidas em placas com 96 poços, durante períodos de incubação de 1, 3 e 7 dias. O meio de cultura usado foi o DMEM-F12, com suplemento de FBS(10% v/v), 100 µg/mL de estreptomicina e 100 µg/mL de gentamicina.

Ao longo do teste, as enzimas mitocondriais das células viáveis foram convertendo o MTS num produto denominado formazan, originando uma solução com tonalidade púrpura, solúvel em água. Ao fim de cada período de incubação, o meio de cultura em cada poço foi removido e substituído por 100 µL de meio fresco com 20 µL de solução reagente MTS/PMS. De seguida, é feita uma incubação das células a 37°C, durante 4 horas, numa atmosfera húmida com 5% de CO₂. Finalmente, é medida a absorvância da solução colorida, através de um leitor de microplacas *Anthos 2020 (Safoni, Diagnostics Pauster)*.

Foram preparados simultaneamente os controlos negativos, K-, e positivos, K+, que correspondem à cultura de células na ausência dos materiais e à adição etanol (96%) às células cultivadas nos poços, respetivamente. Os resultados foram obtidos pela monotorização por meio de um microscópio ótico Olympus CX41, equipado com uma câmara digital Olympus SP-500 UZ.

2.3.7.2 Microscopia eletrônica de varrimento (SEM) das amostras

Depois de incubadas, nas condições descritas anteriormente, as amostras foram lavadas com solução de PBS e fixadas durante a noite com 2,5 % (v/v) de glutaraldeído. De seguida, estas foram lavadas três vezes em PBS e desidratadas com soluções de etanol graduais (50, 60, 70, 80, 90 e 99,9%). Posteriormente, os materiais foram congelados em azoto líquido e liofilizadas durante 3 horas. Por fim, as amostras foram revestidas com ouro por meio de um revestidor por crepitação (Quorum Q150R ES). As imagens de microscopia eletrônica de varrimento foram adquiridas a diferentes amplitudes, a uma tensão elétrica de 20 kV, usando para o efeito um microscópio eletrônico de varrimento Hitachi S3400N.

2.3.7.3 Estudo da atividade antibacteriana

O acontecimento de infeções bacterianas aquando da utilização de biomateriais *in vivo* é uma das principais desvantagens da sua utilização. Desta forma, é imperativo o estudo de crescimento bacteriano na presença dos materiais utilizados, uma vez que é essencial o seu conhecimento no processo de cicatrização⁸⁰. No estudo da atividade bacteriana foi importante caracterizar bactérias gram-negativas e gram-positivas. Para controlo de bactérias gram-positivas, usaram-se bactérias *S.aureus*, estirpe com elevado interesse de estudo, uma vez que é uma das grandes responsáveis pela ocorrência de infeções bacterianas no organismo, em situações de utilização de biomateriais com os fluidos e tecidos biológicos. Já para controlo de bactérias gram-negativas, utilizou-se a bactéria *E.coli*, uma vez que esta está normalmente presente no organismo humano^{81,82}. A realização deste estudo foi feita por método de difusão em ágar, tendo sido as estirpes (10×10^8 CFU/mL) cultivadas em placas de ágar, e os adesivos colocados na parte superior das mesmas, durante 24h, a uma temperatura constante de 37°C. Após as 24h, observou-se o halo inibitório, através de imagens SEM, com o objetivo de avaliar a formação de biofilme na superfície dos materiais^{42,83}.

3 DISCUSSÃO E RESULTADOS

O trabalho foi iniciado com a síntese de macrómeros a partir de ácido láctico e PCL, preparando-se posteriormente os copolímeros com diferentes proporções mássicas: L1P1, L1P2 e L2P1.

A Figura 3.1 permite uma melhor visualização dos macrómeros produzidos.

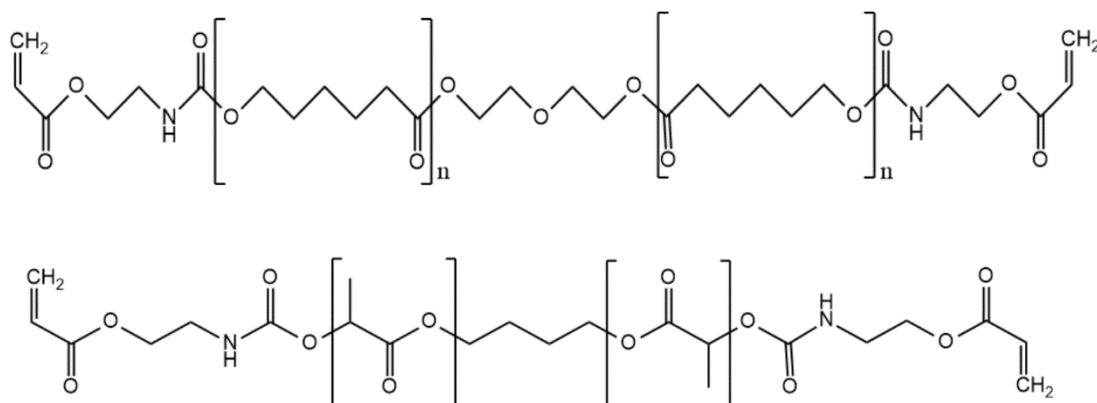


Figura 3.1 - Estrutura do mLA4 (em baixo) e do mPA4 (em cima)

Seguidamente, procedeu-se à foto-reticulação dos materiais, que permitiu observar que, em alguns casos, existia uma pequena quantidade de líquido na parte inferior da membrana. Este facto pode dever-se à existência de material não reticulado e/ou de solvente que não terá sofrido evaporação por estar preso na estrutura da própria membrana. Foi também possível averiguar que membranas com maior quantidade de mLA4 eram mais flexíveis e membranas com maior quantidade de mPA4 eram mais resistentes, embora mais quebradiças. Ainda que houvesse diferentes resultados visíveis consoante a quantidade de cada macrómero presente nos filmes, consideraram-se satisfatórios as características para os tempos de reticulação considerados.

Nas secções seguintes, os adesivos irão ser abordados com a seguinte nomenclatura, atendendo aos tempos de reticulação a que foram expostos:

- mLA4, com 30 segundos de reticulação – mLA4-30s;
- mLA4, com 2 minutos de reticulação – mLA4-2min;
- mPA4, com 30 segundos de reticulação – mPA4-30s;
- mPA4, com 2 minutos de reticulação – mPA4-2min;
- L1P1, com 30 segundos de reticulação – L1P1-30s;
- L1P1, com 2 minutos de reticulação – L1P1-2min;
- L1P2, com 30 segundos de reticulação – L1P2-30s;
- L1P2, com 2 minutos de reticulação – L1P2-2min;
- L2P1, com 30 segundos de reticulação – L2P1-30s;
- L2P1, com 2 minutos de reticulação – L2P1-2min.

A razão pela qual se optou por esta nomenclatura será abordada posteriormente, na Secção 3.3, relativa à determinação do teor de gel.

3.1 ANÁLISE POR ATR-FTIR

A primeira técnica de análise a que os materiais foram sujeitos foi a espectroscopia de infravermelho com reflexão total atenuada (ATR-FTIR), com o intuito de identificar os grupos funcionais presentes na amostra. Desta forma, é possível verificar a eficácia das reações através da conversão dos reagentes. Na literatura podem encontrar-se valores característicos de alguns grupos funcionais⁸⁴.

Para melhor comparação, decidiu-se analisar os materiais usados em cada uma das reações de funcionalização. Desta forma, foram obtidas duas figuras: a Figura 3.2 apresenta os espectros de ATR-FTIR do AOI, da PCL, do mPA4, do mPA4-30s e do mPA4-2min e a Figura 3.3 representa os espectros de ATR-FTIR do AOI, do OligLA, mLA4, do mLA4-30s e do mLA4-2min.

Uma vez que a análise de FTIR é apenas qualitativa, considerou-se irrelevante realizá-la às amostras de copolímeros (L1P1, L1P2 e L2P1), já que os espectros esperados seriam compostos pelos grupos funcionais já identificados nos espectros dos macrómeros o mLA4 e mPA4 e muito semelhantes entre si.

Na Figura 3.2, no que diz respeito ao AOI, este apresenta uma banda típica, correspondente à elongação dos grupos isocianato (NCO), que se encontra visível na zona de 2262 cm^{-1} .

Discussão e Resultados

No espectro referente à PCL, é visível uma banda correspondente à elongação da ligação C=O dos grupos éster, numa frequência de 1731 cm^{-1} (**a**), e também uma banda correspondente à elongação dos grupos hidroxilo (OH), na frequência 3443 cm^{-1} (**b**).

A observação do espectro do mPA4, permite-nos verificar o desaparecimento ou diminuição da banda característica dos grupos hidroxilo da PCL e dos grupos isocianato do AOI. É também observável o aparecimento de ligações duplas de carbono (C=C), na banda típica de $1600\text{-}1680\text{ cm}^{-1}$ (**d**), no espectro do pré-polímero mPA4, que irá permitir a foto-reticulação dos materiais. O espectro permite-nos verificar o desaparecimento da banda característica dos grupos isocianato (**c**), presente no AOI. A ocorrência de reação entre os grupos hidroxilo e isocianato é confirmável pelo aparecimento da banda correspondente à elongação da ligação C-N e à deformação da ligação N-H, características dos grupos uretana, que pode ser observado na frequência 1531 cm^{-1} (**e**) do espectro do mPA4. Estes resultados permitem comprovar a eficácia da reação de funcionalização.

Após a reticulação, seria espectável o desaparecimento da banda correspondente às ligações C=C, sendo que o seu total desaparecimento corresponderia a um adesivo totalmente reticulado. Analisando os espectros correspondentes aos materiais reticulados em 30 segundos e 2 minutos, mPA4-30s e mPA4-2min, respetivamente, é possível verificar o desaparecimento da banda de $1600\text{-}1680\text{ cm}^{-1}$. Desta forma, pôde concluir-se que os tempos usados foram suficientes para uma boa reticulação do material.

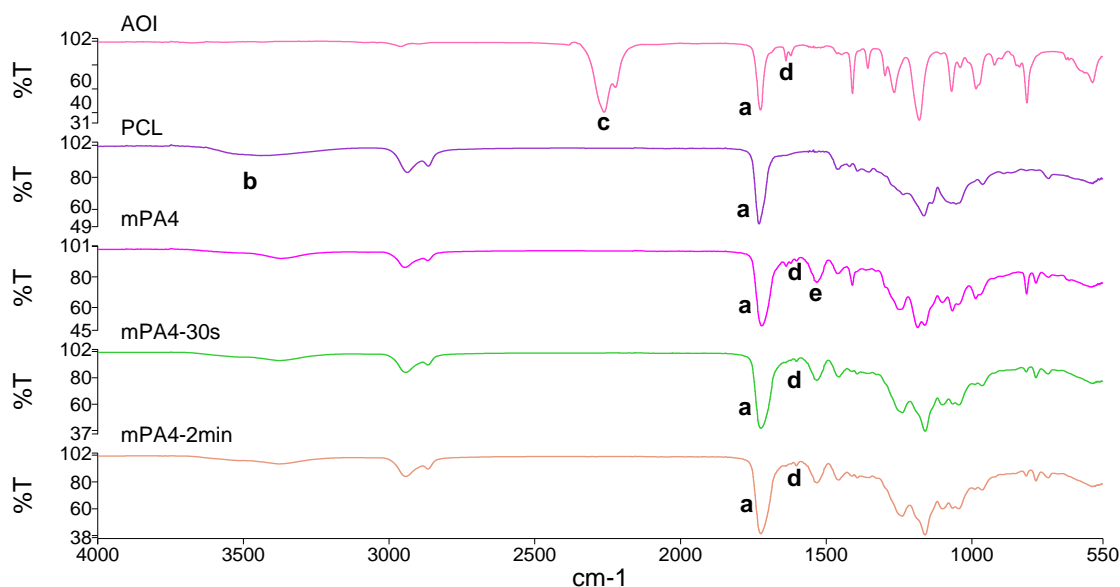


Figura 3.2 - Espectro de ATR-FTIR correspondente ao AOI, a PCL, ao mPA4 e ao mPA4 reticulado durante 30 segundos e 2 minutos.

De seguida, é feita uma análise aos espectros correspondentes ao OligLA, mLA4 e aos adesivos de mLA4 reticulados, mLA4-30s e mLA4-2min (Figura 3.3).

No que diz respeito ao espectro do oligómero de ácido láctico (OligLA), é possível verificar a existência da banda de alongação dos grupos OH na zona de frequência 3442 cm^{-1} (**f**) e também a presença de uma banda correspondente à alongação da ligação C=O dos grupos éster, numa frequência de 1727 cm^{-1} (**g**).

O espectro correspondente ao mLA permite-nos verificar o desaparecimento da banda característica dos grupos isocianato (**h**), presente no AOI. Existe também o aparecimento da banda correspondente à alongação da ligação C-N e à deformação da ligação N-H, características dos grupos uretana nos pré-polímeros modificados, observável na frequência 1538 cm^{-1} (**e**) do espectro do mLA4. No entanto, a diminuição da banda de frequência correspondente aos grupos OH, no espectro do macrómero funcionalizado mLA4, foi pouco significativa, sugerindo que a reação de funcionalização do oligómero de ácido láctico poderá não ter ocorrido com a eficácia desejada.

Analisando os materiais reticulados, mLA4-30s e mLA4-2min, verificou-se uma ligeira diminuição da banda de $1600\text{-}1680\text{ cm}^{-1}$ (**i**), correspondente aos valores das ligações C=C, diminuição essa que se torna mais acentuada com o aumento do tempo de cura. No entanto, a diferença de valores de transmitância das bandas não é significativa, o que revela a fraca eficácia do processo de reticulação. Desta forma, podemos concluir que o tempo máximo de cura, 2 minutos, não é suficiente para produzir filmes totalmente reticulados.

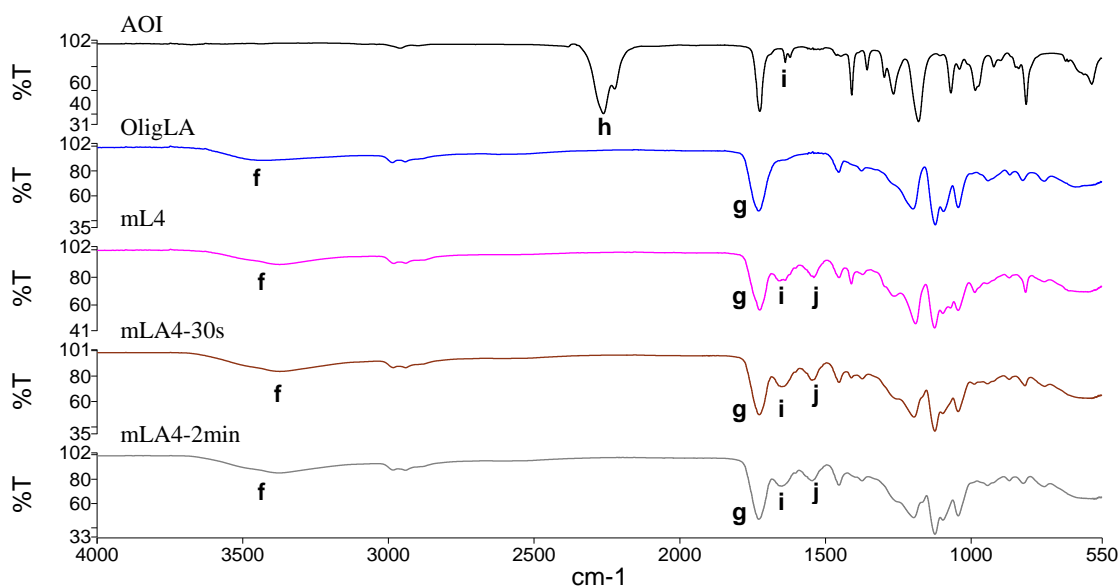


Figura 3.3 - Espectro de ATR-FTIR correspondente ao AOI, ao OligLA, ao mLA4 e ao mLA4 reticulado durante 30 segundos e 2 minutos.

3.2 ANÁLISE DE RMN

A análise ^1H RMN possibilita a identificação dos compostos presentes nas amostras, através da interação eletrônica dos prótons presentes. Esta metodologia serve como

Discussão e Resultados

complemento à informação obtida através da análise ATR-FTIR, no sentido de monitorizar e confirmar a modificação dos polímeros e, assim, verificar a eficácia das reações. Na Figura 3.4 estão presentes os espectros referentes ao OligLA, AOI e mLA4.

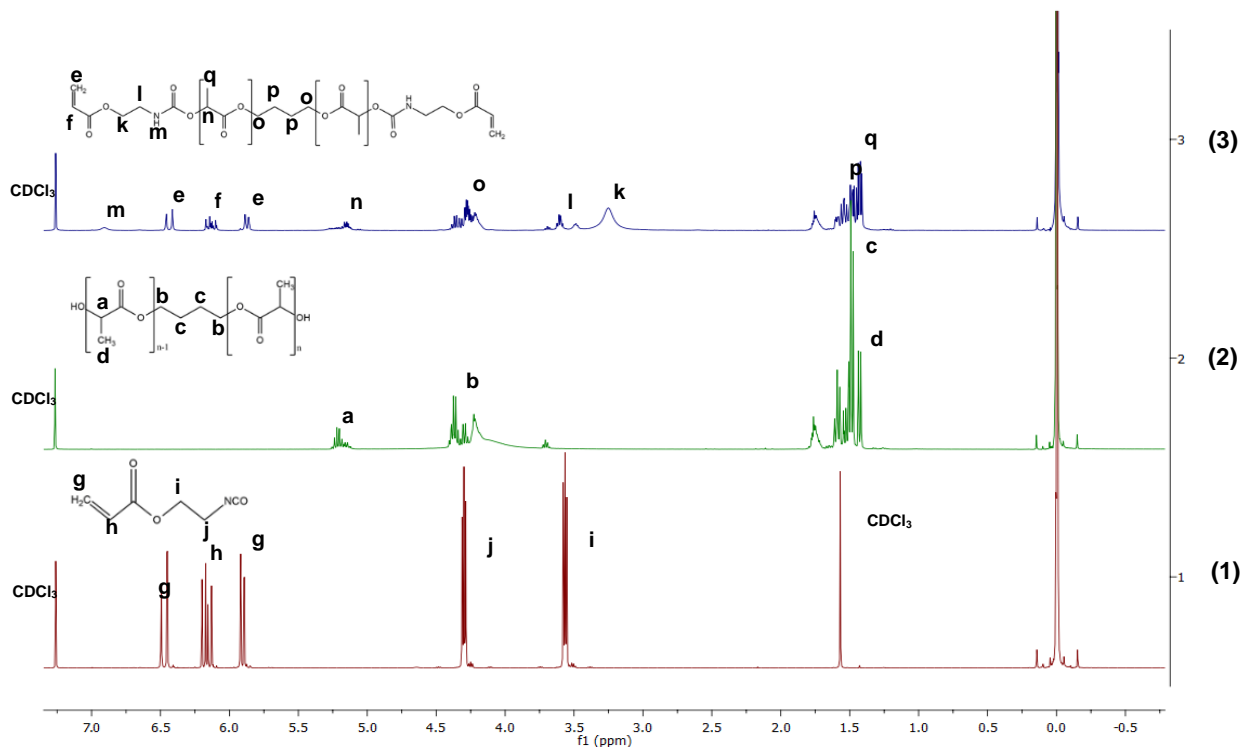


Figura 3.4 - Espectro de ^1H RMN do AOI(1), do OligLA (2) e do mLA4 (3).

Observando a Figura 3.4 verifica-se que o espectro do mLA4, apresenta dois dupletos relativos às ligações $\text{C}=\text{CH}_2$ a 6,45 e 5,86 ppm (**e**) e um multipletto, característico do próton $\text{HC}=\text{C}$, a 6,12 ppm (**f**), também observáveis no espectro do AOI (1), representados pelas letras (**g**) e (**h**), respetivamente. A letra (**n**) do espectro do mLA4 (3), relativa ao pico que se encontra a 5,15 ppm, é referente à ligação $\text{C}-\text{CH}_3$, coincidente com o pico representado por (**a**) no espectro do OligLA (2). Ainda provenientes do OligLA, surgem no espectro de mLA4 três picos nos valores de 1,44 ppm (**q**), 1,47 ppm (**p**) e 4,30 ppm (**o**), correspondentes às ligações $-\text{CH}_3$, CH_2CH_2 e $\text{O}-\text{CH}_2$, respetivamente. São também observáveis os picos (**k**) no valor de 3,25 ppm e (**l**) no valor de 3,49 ppm, representativos das ligações $\text{O}-\text{CH}_2$ e $\text{CH}_2-\text{N}=\text{C}=\text{O}$ que provêm na funcionalização com AOI - (**i**) e (**j**). A ligação $\text{N}-\text{H}$ resultante da funcionalização da OligLA com AOI, pode ser identificada no pico a 6,09 ppm (**m**) do espectro (3).

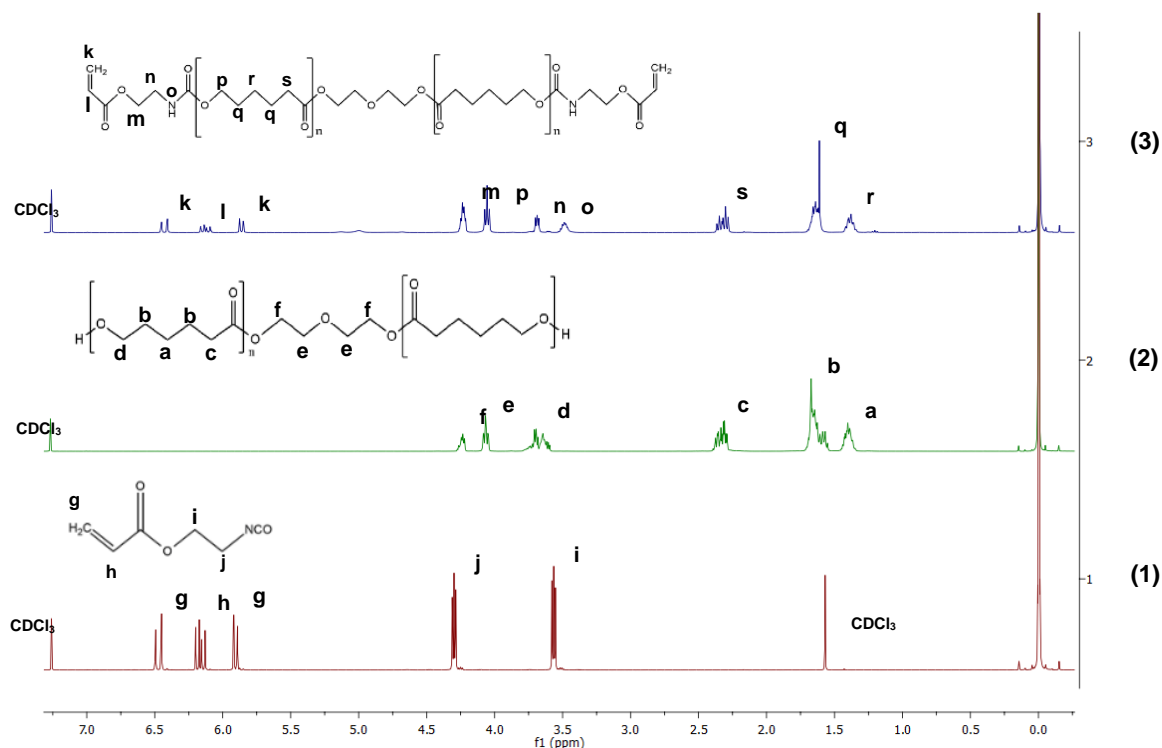


Figura 3.5 - Espectro de ^1H -RMN do AOI (1), do PCL (2) e do mPA4 (3).

A Figura 3.5 apresenta os espectros de ^1H RMN do mPA4 (3), da PCL (2) e do AOI (1). No espectro do mPA4, existem picos entre 3,63 e 3,43 ppm - **(n)** e **(o)** - referentes aos grupos uretana resultantes da reação entre os grupos hidroxilo e os grupos isocianato. Identificam-se ainda dois picos a 6,36 e 5,82 ppm **(k)**, que correspondem ao próton $\text{C}=\text{CH}_2$, e um pico da ligação $\text{HC}=\text{C}$ a 6,16 ppm **(l)**. Os picos situados entre 1,30 e 2,23 ppm - **(r)**, **(q)** e **(s)** – referem-se às ligações $-\text{CH}_2$ e $\text{CH}_2=\text{O}$, provenientes da PCL.

3.3 DETERMINAÇÃO DO TEOR DE GEL

A determinação do teor de gel surge com o objetivo de avaliar o grau de reticulação dos adesivos desenvolvidos. Resultados de 100% de teor de gel, correspondem a adesivos nos quais se verifica uma conversão total das ligações duplas de carbono⁸⁵. O tempo de reticulação, ou seja, o tempo de incidência de irradiação UV nos filmes é, como pode ser facilmente compreendido, um fator determinante no grau de reticulação dos mesmos.

Desta forma, estudou-se a influência que o tempo de reticulação teria na percentagem de gel dos diferentes adesivos, sendo de esperar que maiores tempos de irradiação UV, correspondessem a uma melhor reticulação dos materiais^{85,86}.

Tabela 3.1 - Valores percentuais do teor de gel dos adesivos desenvolvidos, para diferentes tempos de reticulação.

Adesivo	Tempo reticulação (min)	gel content (%)
mLA4	0,5	55,2 ± 0,92
	1	59,1 ± 1,70
	2	70,9 ± 1,18
	3	71,8 ± 0,85
	5	75,4 ± 1,41
mPA4	0,5	96,7 ± 0,40
	1	96,6 ± 0,59
	2	97,4 ± 0,63
	3	95,2 ± 0,22
	5	94,9 ± 0,24
L1P1	0,5	64,2 ± 3,40
	1	74,5 ± 0,50
	2	77,6 ± 0,27
	3	76,9 ± 0,19
	5	77,3 ± 0,11
L1P2	0,5	68,9 ± 0,45
	1	76,8 ± 0,38
	2	79,5 ± 0,31
	3	84,3 ± 0,18
	5	84,7 ± 0,27
L2P1	0,5	47,8 ± 1,78
	1	56,4 ± 0,41
	2	68,1 ± 0,14
	3	70,6 ± 0,55
	5	70,7 ± 0,34

Assim que foi realizada a foto-reticulação dos materiais, foi possível observar diferentes graus de rigidez consoante o tempo que estiveram expostos à luz UV, o que já seria indicativo do seu grau de reticulação. Analisando a Tabela 3.1, é possível destacar que, quanto maior o tempo de reticulação, maior a percentagem de teor de gel. Verificou-se também que, os adesivos de mPA4 apresentam maiores percentagens de *gel content*, que os adesivos de mLA. Assim, é de prever que *blends* de adesivos com maiores quantidades de mPA4 apresentem maiores percentagens de teor de gel, dados que podem ser confirmados pelos da Tabela 3.1.

Estes resultados sugerem que a contribuição dos diferentes macrómeros é diferente, sendo que o mPA4 atribui mais ligações duplas ao copolímero que o mLA4, atente-se ao caso do copolímero L2P1.

Outro comportamento que é importante realçar no copolímero L2P1, é o facto da sua percentagem de teor de gel ser inferior à do macrómero mLA4. Ainda que seja composto na sua maioria por mLA4, seria de esperar que a contribuição do mPA4 fizesse aumentar este valor. Este facto desperta a ideia de que os macrómeros possam ter comportamentos diferentes quando misturados.

Na análise de ATR-FTIR, é visível a presença de ligações duplas que não sofreram reticulação, nos espectros correspondentes aos adesivos constituídos por mLA4.

No final da determinação de teor de gel, considerou-se que o estudo posterior de apenas dois dos tempos de reticulação seria suficiente, de forma a poder avaliar a influencia que o tempo de cura e consequente *gel content* teriam nas propriedades dos materiais. Foram então escolhidos os tempos 30 segundos e 2 minutos. O primeiro foi escolhido por ser um tempo mínimo, considerado bastante satisfatório para aplicações cirúrgicas. Uma vez que não existiam grandes alterações do valor de teor de gel entre os 2, 3 e 5 minutos, optou-se pelos 2 minutos já que a aplicação final dos adesivos procura o menor tempo de cura possível. O descarte dos resultados para 1 minuto de reticulação baseou-se na diferença considerável na percentagem de teor de gel, relativamente aos 2 minutos.

3.4 AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE DE ABSORÇÃO DE ÁGUA

O papel dos adesivos biológicos no encerramento de incisões implica um apoio mecânico de aproximação das extremidades da ferida, promovendo a cicatrização da mesma. Assim sendo, é importante avaliar a capacidade de absorção de água dos adesivos pois, uma vez que esta capacidade se traduz num aumento do volume dos mesmos, um aumento demasiado acentuado pode provocar danos nos tecidos circundantes. No entanto, um aumento de volume, dentro de um valor ótimo, pode favorecer propriedades hemostáticas⁵.

A realização deste estudo serve como avaliador da capacidade de absorção de água dos adesivos desenvolvidos, a fim de aferir o carácter hidrofílico ou hidrofóbico dos mesmos. Os resultados obtidos vão determinar a sua eficácia em ambientes húmidos, como acontece no corpo humano.

Os valores de *swelling* foram obtidos segundo a metodologia descrita na Secção 2.3.4: três amostras de cada um dos adesivos foram colocadas num exsiccador em atmosfera saturada e, ao fim de períodos pré-definidos, as amostras foram pesadas e os valores de *swelling* foram

Discussão e Resultados

determinados pela Equação 2.2. Inicialmente, foi estipulado avaliar a capacidade de absorção de água dos adesivos nos períodos de 24, 72 horas, 1, 2, 3, 4 e 5 semanas. No entanto, a capacidade máxima de absorção de água foi atingida ao fim de 72 horas, período a partir do qual as amostras apresentaram menores resultados de *swelling*, chegando mesmo a obter-se valores de peso húmido inferiores aos de peso seco.

Na Figura 3.6 podem observar-se os resultados de *swelling* obtidos.

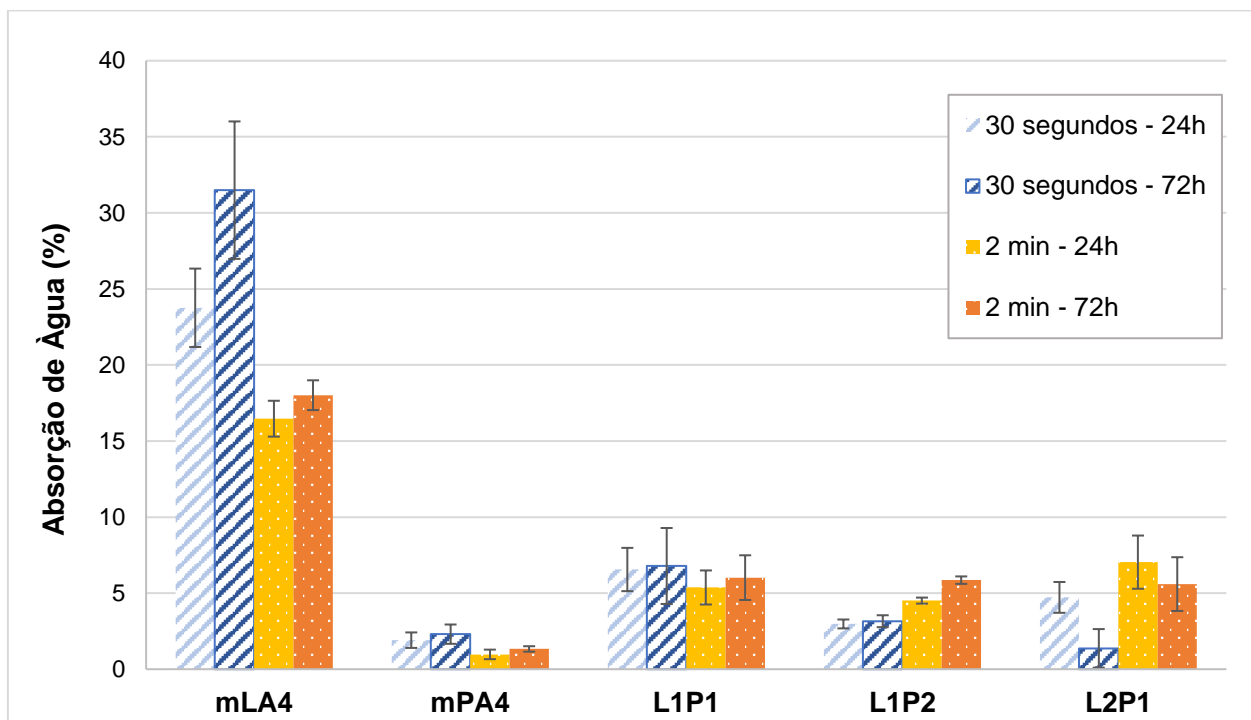


Figura 3.6 - Capacidade de absorção de água dos diferentes adesivos, com tempos de reticulação 30 segundos e 2 min, após 24 e 72 horas de incubação, em atmosfera saturada.

Existem três grandes fatores que devem ser considerados nesta análise: o tempo de reticulação dos adesivos, as quantidades dos diferentes macrómeros, mLA4 e mPA4, nos adesivos e o tempo de incubação.

Iniciando a análise dos resultados obtidos em relação ao tempo de reticulação, é possível verificar que os adesivos com tempos de reticulação de 2 minutos apresentam valores de *swelling* inferiores aos dos que foram reticulados em 30 segundos. Estes resultados, completam os obtidos na avaliação de *gel content*, e permite-nos verificar que, quanto maior o grau de reticulação, menor será a sua capacidade de absorção de água, uma vez se formam redes tridimensionais quimicamente estáveis e insolúveis. Além disso, quanto mais reticulado estiver o adesivo, mais compacta será a sua estrutura, logo menor será o espaço livre disponível no interior da sua matriz. Assim sendo, os adesivos com maior quantidade mLA4 (mLA4 e L2P1) - que apresentam valores de *gel content* inferiores - irão absorver mais água que os restantes adesivos.

Um outro aspeto a realçar é que, no caso do adesivo mLA4, se verificam valores de *swelling* mais elevados ($31,49 \pm 4,52\%$ e $18,01 \pm 0,98\%$, para tempos de reticulação de 30 segundos e 2 minutos, respetivamente). No entanto, ao fim de 72h, estes foram também os adesivos que apresentaram uma perda de capacidade de absorção mais acentuada. Os adesivos de L2P1 atingiram o seu valor máximo de absorção de água às 24h, observando-se uma descida no seu valor de peso húmido, logo após esse período. Este apresenta valores de *swelling* inferiores ao do mLA4, devido à influência hidrofóbica da PCL, como espectável. Em contrapartida, verifica-se que polímeros com maior grau de reticulação - mPA4, L1P1 e L1P2 - apresentam menores valores de *swelling*, dado o carácter hidrofóbico da policaprolactona, sendo o adesivo mPA4 o que possui o valor mais reduzido ($2,30 \pm 0,64\%$ e $1,33 \pm 0,18\%$, para tempos de reticulação de 30 segundos e 2 minutos, respetivamente).

No decorrer das 5 semanas de incubação, foram registados alguns acontecimentos que poderão ter influenciado alguns dos valores apresentados. A partir da primeira semana, foi possível observar uma corrosão na superfície de suporte dos adesivos que continham mL4. Esta observação, juntamente com a diminuição da capacidade de absorção de água apresentada pelos adesivos, logo após as 72h, sugere que existiu uma degradação por hidrólise⁸⁷. Assim é possível que o ácido láctico presente nos adesivos, aquando da degradação dos mesmos, possa ter corroído o papel de alumínio.

Tendo em conta a aplicação dos adesivos, pretende-se uma capacidade de absorção ideal moderadamente baixa, de modo a que a força de compressão exercida pelo adesivo húmido não seja suficiente para ocorrerem danos graves nos nervos e nos vasos sanguíneos⁹. Os valores de referência de *swelling* nos adesivos variam entre autores. Estudos realizados a um adesivo sintético já comercializado, o *FocalSeal*[®], obtiveram valores de *swelling*, ao fim de 24h, na ordem dos 300%⁸⁸. Outro estudo realizado a um selante de nome comercial *FloSeal Matrix*[®], apresentou resultados de *swelling* na ordem dos 20%, valor este que, segundo o mesmo estudo, permite que o material exerça pressão sobre o ferimento, resultando num melhor comportamento hemostático⁸⁹.

3.5 DEGRADAÇÃO HIDROLÍTICA EM SOLUÇÃO DE PBS

Como foi referido na Secção 1.1.2, os adesivos cirúrgicos são vistos como dispositivos médicos de aplicação temporária e, assim, a biodegradabilidade é um aspeto importante a ter em conta no desenvolvimento dos mesmos. Se a aplicação de um adesivo for cutânea, assim que termine o período de cicatrização do ferimento, este pode ser removido ou soltar-se naturalmente, o que torna este parâmetro menos preocupante. No entanto, se a sua aplicação for

Discussão e Resultados

interna, a taxa de biodegradação do material torna-se um desafio, uma vez que este valor irá determinar a sua durabilidade.

Tal como no *swelling*, a avaliação da degradação hidrolítica dos adesivos realizou-se ao longo de 5 semanas, tendo sido registados os valores correspondentes aos períodos de 24 e 72 horas, 1, 2, 3, 4 e 5 semanas. O procedimento experimental seguido encontra-se descrito na Secção 2.6 e foram utilizadas três amostras de cada um dos cinco adesivos reticulados. Ao fim de cada período pré-estipulado, as amostras foram secas e pesadas, obtendo-se a percentagem de perda de massa, através da Equação 2.3. Os resultados obtidos podem ser observados na Figura 3.7.

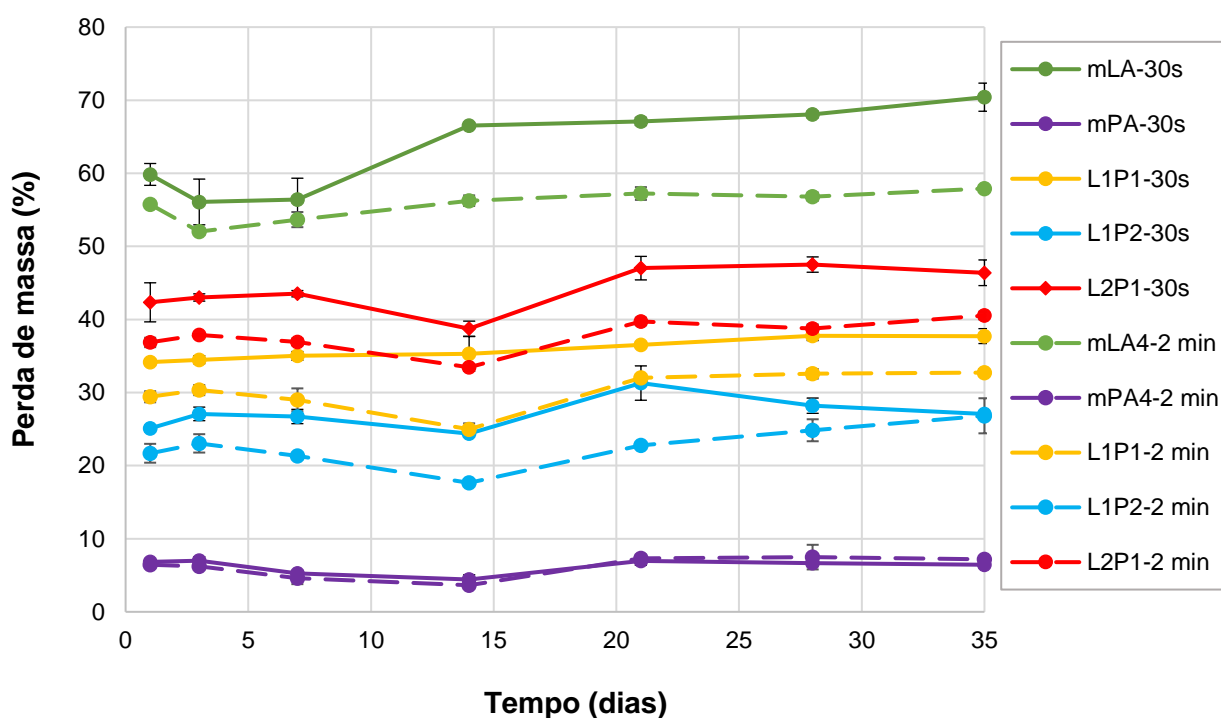


Figura 3.7 - Perda de massa (%) dos diferentes adesivos, com tempos de reticulação 30 segundos e 2 minutos, ao longo de 5 semanas, numa solução de PBS (pH=7 e T=37°C).

Analisando a Figura 3.7, verifica-se que o mLA-30s foi o que sofreu maior degradação ao longo do tempo, com uma percentagem de massa perdida de $59,85 \pm 1,49\%$, em apenas 24 horas. Este resultado pode ser complementado com o obtido na análise de *gel content*, sendo também este o filme com menor percentagem de gel na sua constituição. O resultado é igualmente corroborado com o obtido na análise de *swelling*, uma vez que, sendo o adesivo com maior percentagem de absorção de água, irá sofrer mais degradação. Deste modo, o resultado da análise de degradação hidrolítica pode ser justificado com a presença de material não reticulado e de éter dietílico (solvente) residual⁶². A perda de massa deste adesivo tende a

estabilizar ao fim de 2 semanas, atingindo um valor máximo de perda de massa de $70,42 \pm 1,93\%$, no final das 5 semanas.

Os adesivos mPA4-30s e mPA4-2min foram os que apresentaram valores mais baixos de degradação hidrolítica, sendo claro que o tempo de reticulação, neste caso, não alterou o comportamento dos materiais. A sua perda de massa foi praticamente constante ao longo tempo, o que vem indicar que, graças ao caráter hidrofóbico da PCL, estes adesivos apresentam uma estabilidade elevada, aquando da presença de uma solução aquosa. A percentagem de degradação obtida pode dever-se a material polimérico que não reticulou, uma vez que a percentagem de teor de gel destes adesivos não foi de 100%.

Relativamente aos adesivos compostos pela mistura dos dois macrómeros, pôde verificar-se que, quanto maior a quantidade de mLA4 no adesivo, maior será a sua perda de massa, como seria de esperar. Qualquer um dos copolímeros apresenta valores de perda de massa percentual relativamente satisfatórios, visto que, no final de 5 semanas, o valor mais elevado corresponde ao adesivo L2P1-30s, e é de $46,39 \pm 1,75\%$. Destacam-se os adesivos das proporções de 1:1 e 1:2 que, quer para tempo de cura de 30 segundos como 2 minutos, apresentam valores de degradação na gama de $26,82 \pm 2,40\%$ a $37,73 \pm 1,02\%$.

É possível verificar que, à exceção dos adesivos mPA4-30s e mPA4-2min, o tempo de cura influencia ligeiramente a perda de massa dos materiais. No entanto, o padrão de perda de massa ao longo do tempo (dias) é bastante semelhante.

Relacionando a degradação hidrolítica dos adesivos com a sua capacidade de absorção de água e, conseqüentemente, com o seu teor de gel, é possível afirmar que existe uma relação entre estas três propriedades. Os adesivos mPA4-30s e mPA4-2min, apresentavam maiores percentagens de teor de gel, sendo assim os adesivos mais reticulados e por isso, aqueles que possuem uma matriz mais densa.

Observados os diferentes resultados para os adesivos produzidos, verifica-se uma perda de massa considerável, à exceção dos adesivos mPA4-30s e mPA4-2min. Consideram-se positivos os resultados obtidos, uma vez que uma das propriedades mais desejadas para adesivos cirúrgicos é a sua biodegradação.

3.6 ANÁLISE TERMOGRAVIMÉTRICA

Para avaliar a sua estabilidade térmica, os materiais foram submetidos a uma análise termogravimétrica (TGA). Nesta análise foi definida a perda de massa dos materiais com o aumento da temperatura, com uma taxa de aquecimento de $10^\circ/\text{min}$, até 600°C . A Figura 3.8 apresenta as curvas termogravimétricas associadas ao AOI, PCL e OligLA e aos macrómeros

Discussão e Resultados

mLA4 e mPA4. Considerou-se que a temperatura imediatamente antes da descida abrupta da curva como a temperatura inicial ($T_{d,inicial}$) e a temperatura final ($T_{d,final}$) como a temperatura a partir da qual o perfil começa a estagnar. De seguida foram obtidos os valores da temperatura de degradação, dadas pelos picos das derivadas da curva de TGA. A Tabela 3.2 contém as temperaturas de degradação (T_g) e a perdas de massa associadas. A análise de TGA permite-nos também verificar a resistência dos materiais a mecanismos de esterilização a temperaturas elevadas e a sua estabilidade à temperatura fisiológica (37°C).

A análise da Figura 3.8 permite-nos constatar que, tal como seria de esperar, a temperatura de degradação inicial dos macrómeros mLA4 e mPA4 é superior à dos materiais usados para a sua síntese.

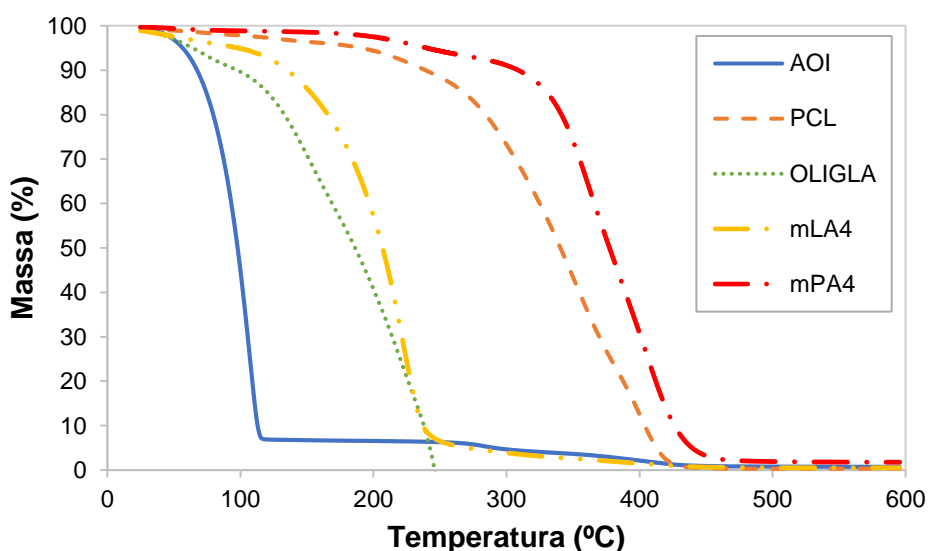


Figura 3.8 - Curvas termogravimétricas do AOI, PCL e OligLA e dos macrómeros funcionalizados, mLA4 e mPA4.

Após a análise dos perfis dos copolímeros preparados líquidos e reticulados em 30 segundos e 2 minutos, separadamente, e pôde concluir-se que os perfis dos materiais reticulados não são influenciados pelo tempo de cura dos mesmos (Figuras E.1, E.2, E.3, E.4, e E.5 do Anexo E).

Desta forma, construiu-se a Figura 3.9, onde se apresentam os perfis de todos os materiais líquidos e reticulados em 2 minutos.

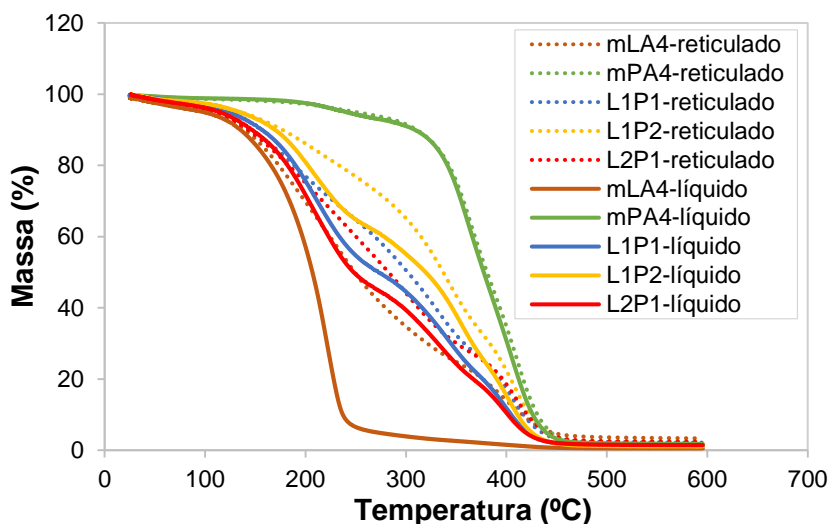


Figura 3.9 - Curvas termogravimétricas dos copolímeros líquidos (Linha contínua) e reticulados, durante 2 minutos (Linha tracejada).

A degradação dos materiais aumenta, com o aumento da quantidade de mPA4, presente na mistura. É possível verificar que os materiais mLA4-líquido e mLA4 reticulado apresentam uma temperatura de degradação inicial perto dos 150°C e os materiais mPA4-líquido e mPA4-reticulado apresentam uma temperatura de degradação inicial perto dos 350°C. Analisando a Figura 3.9 e as Tabelas 3.3 e 3.4, constata-se que a foto-reticulação tornou os materiais termicamente mais estáveis, quer no início, quer no fim do processo de degradação. Na gama de temperatura analisada, nenhum dos copolímeros se degradou totalmente.

Discussão e Resultados

Na Figura 3.10 é possível observar as curvas das derivadas de TGA, cujos picos correspondem ao valor de DTG.

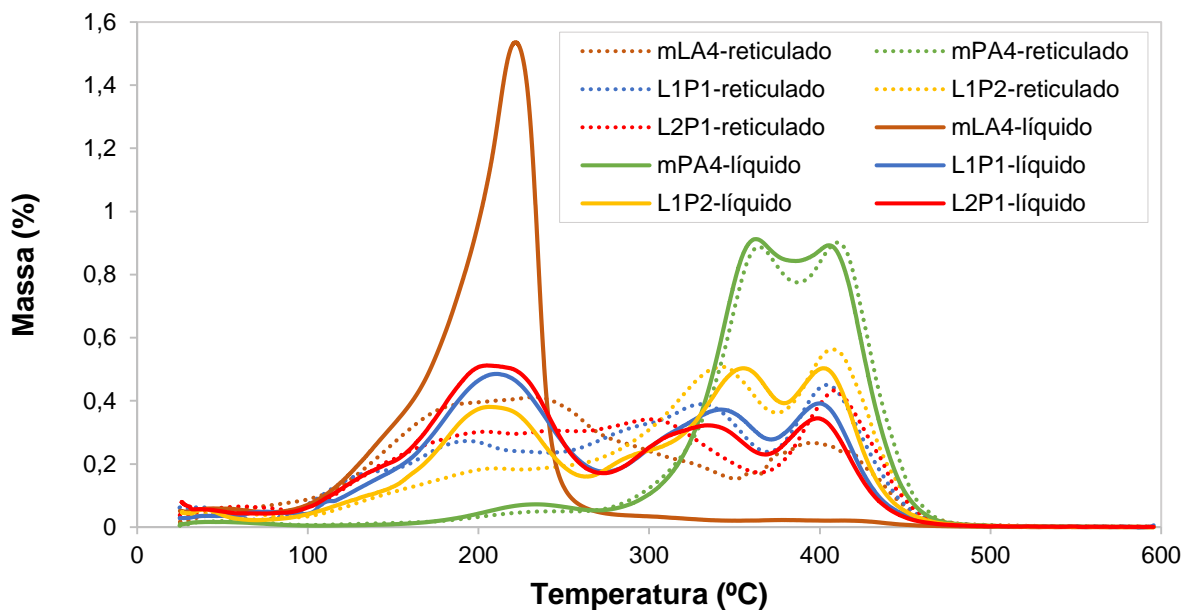


Figura 3.10 - Curvas das derivadas de TGA dos copolímeros líquidos (Linha contínua) e reticulados durante 2 minutos (Linha tracejada).

Tal como referido anteriormente, quanto maior a quantidade de mPA4 nos materiais, maior será a sua temperatura de degradação. Assim sendo, é espectável que aconteça o mesmo quanto aos valores de DTG.

Algumas curvas da derivada de TGA apresentam mais do que um pico. Este facto deve-se às várias fases de degradação dos copolímeros, correspondentes a diferentes percentagens de perda de massa.

As Tabelas 3.2, 3.3 e 3.4 apresentam os valores de DTG para cada um dos copolímeros, líquidos e reticulados, assim como a perda de massa associada.

Tabela 3.2 - Temperatura de degradação derivada de TGA para o AOI, OligLA e PCL.

Material	Perda de massa (%)	DTG (°C)
AOI	72,25	106,27
	6,51	73,21
OligLA	30,94	153
	75,99	221,29
PCL	58,09	352,12
	88,08	401

Tabela 3.3 - Temperatura de degradação derivada de TGA para os macrómeros e copolímeros líquidos.

Estado físico	Material	Perda de massa (%)	DTG (°C)
Líquido	mLA4	69,89	221,29
	mPA4	36,5	362,18
		73,93	405,31
	L1P1	29,81	211,22
		69,24	342,77
	L1P2	88,13	399,86
		30,73	204,75
	L2P1	71	334,26
		89,1	398,84
		21,44	206,19
		55,52	335,71
		85,47	401,75

Discussão e Resultados

Tabela 3.4 - Temperatura de degradação derivada de TGA para os macrómeros e reticulados.

Estado físico	Tempo de reticulação/s	Material	Perda de massa (%)	DTG (°C)
Reticulado	30	mLA4	50,91	225,60
			88,96	390,21
		mPA4	36,69	365,06
			74,84	411,06
		L1P1	23,16	206,41
			57,51	321,92
	L1P2	84,48	405,31	
		15,44	211,22	
	120	L1P2	53,37	345,65
			81,80	408,19
		L2P1	39,02	242,85
			61,49	309,70
		mLA4	86,80	408,90
			44,37	234,94
120	mPA4	84,16	393,09	
		38,47	367,21	
	L1P1	74,83	409,62	
		21,43	193,97	
	L1P2	65,73	331,27	
		84,15	403,15	
L2P1	15,27	207,63		
	54,00	344,93		
L2P1	82,18	408,19		
	25,47	201,88		
L2P1	56,44	301,80		
	84,51	407,47		

3.7 BIOCOMPATIBILIDADE

A avaliação da biocompatibilidade permite aferir se um material, neste caso um adesivo, tem capacidade de regeneração e reconstrução dos tecidos biológicos⁵. De forma a avaliar a biocompatibilidade dos adesivos produzidos, foram realizados estudos de viabilidade celular e estudos de atividade bacteriana.

3.7.1 Estudo da viabilidade celular

Como referido na Secção 2.2.7.2, os estudos de viabilidade celular foram realizados na UBI, através de um ensaio de MTS, avaliando o comportamento de células de fibroblastos humanos, quando estão em contacto com a superfície dos adesivos. O estudo foi realizado num período de incubação de 1, 3 e 7 dias, período no qual as células viáveis têm capacidade de transformar o MTS em *formazan*, dando origem a uma solução com enzimas mitocondriais. Esta solução adquire uma coloração púrpura, cuja leitura da absorvância irá quantificar os cristais de *formazan* na solução, que são proporcionais ao número de células viáveis. Isto é, quanto maior o valor de absorvância obtido, maior o número de células viáveis^{62,80,87}.

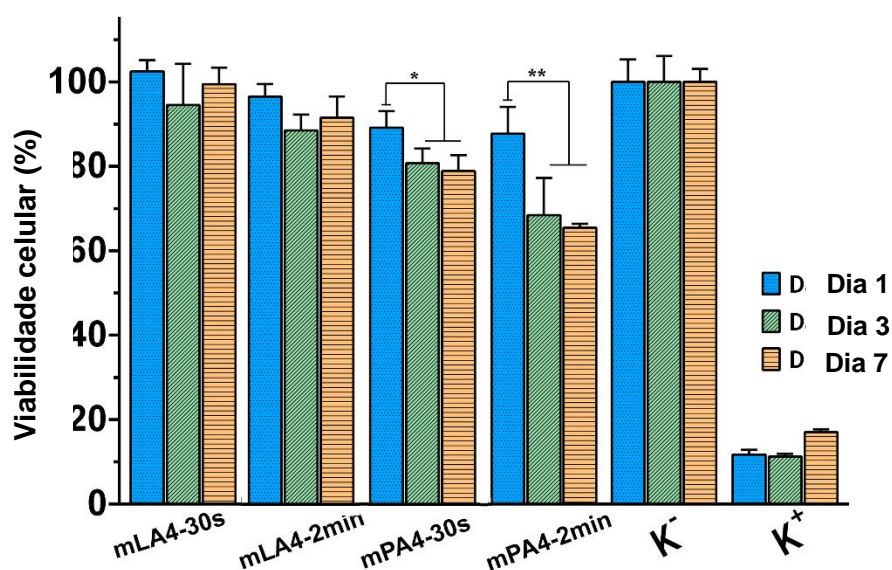


Figura 3.11 - Avaliação da viabilidade celular na presença dos adesivos mLA4 e mPA4, num período de contacto de 1, 3 e 7 dias. K⁺ e K⁻ correspondem ao controlo positivo e negativo, respetivamente.

A Figura 3.11 e a Figura 3.12 possibilitam a observação do perfil citotóxico dos materiais.

Iniciando a análise pelos adesivos compostos unicamente pelos macrómeros, mLA4 e mPA4 (Figura 3.11), facilmente se observa que após o contacto direto entre as células e os fibroblastos, humanos, por períodos de 1, 3 e 7 dias, os materiais se revelam biocompatíveis. Em relação aos adesivos mLA-30s e mLA-2min, pode ser verificada uma semelhança com os valores apresentados no controlo negativo, que representa 100% de células viáveis. Na amostra

Discussão e Resultados

mLA4-30s, obtiveram-se resultados de viabilidade celular média superiores a 100%, o que pode ser justificado com uma variação do valor da absorvância provocada pela interação do material com a sonda de MTS.

No caso dos adesivos mPA-30s e mPA-2min, existe uma percentagem de células viáveis ligeiramente mais baixa, em comparação com os adesivos anteriormente referidos. Ainda assim, o valor mais baixo de viabilidade celular está a cerca de 65%, o que não é um mau resultado. Nestes adesivos é possível observar uma diferença mais acentuada do primeiro dia para os restantes, na ordem dos 20%. Esta diferença pode estar relacionada com a libertação de compostos que induzam a destruição das células.

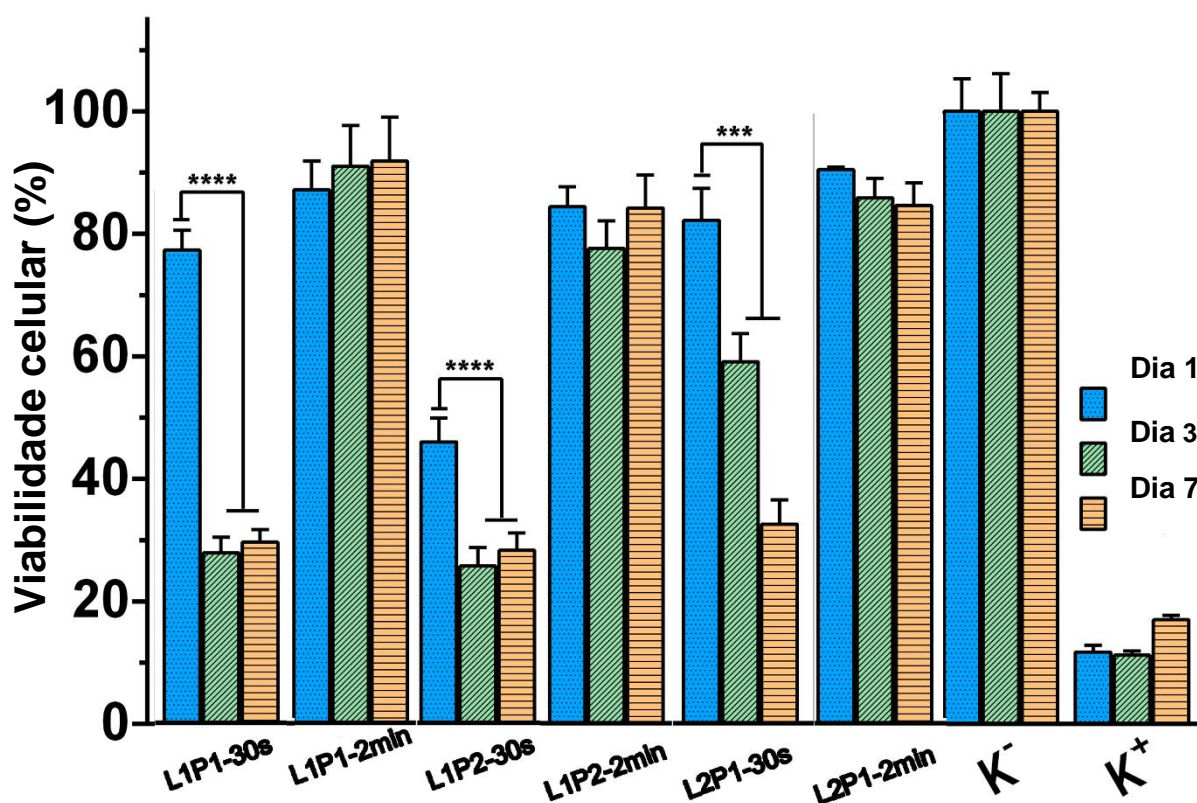


Figura 3.12 - Avaliação da viabilidade celular na presença dos adesivos L1P1-2min, L1P2-2min, L1P1-30s, L1P2-30s, L2P1-30s e L2P1-2min, num período de contacto de 1, 3 e 7 dias. K⁺ e K⁻ correspondem ao controlo positivo e negativo, respetivamente.

Atendendo à Figura 3.12, que diz respeito aos resultados de viabilidade celular para os adesivos produzidos a partir da mistura dos macrómeros mLA4 e mPA4, em diferentes proporções, podemos constatar que as células apresentam comportamentos diferentes, consoante a proporção da mistura. Isto é, adesivos com maior percentagem de mLA4 (L2P1-30s e L2P1-2min) apresentam uma percentagem de células viáveis ligeiramente superior aos adesivos com maior percentagem de mPA4 (L1P2-30s e L1P2-2min.), para o mesmo tempo de reticulação. No entanto, esta diferença não é significativa. Os resultados apresentados indicam

que, neste caso, o fator que demonstra ter mais influência no carácter citotóxico dos adesivos é o seu tempo de reticulação. É constatável que adesivos com 30 segundos de reticulação (L1P1-30s, L1P2-30s e L2P1-30s) apresentam uma menor viabilidade celular que adesivos com mais tempo de reticulação (L1P1-2min, L1P2-2min e L2P1-2min).

Atendendo à Figura 3.12 e como foi mencionado nas Secções 3.3 e 3.5, é possível observar que os adesivos reticulados ao fim de 2 minutos, apresentam valores de viabilidade celular mais estáveis ao longo dos 7 dias.

Em contrapartida, a Figura 3.12 demonstra que um menor grau de reticulação (adesivos expostos a 30 segundos de irradiação UV), indica uma maior taxa de degradação dos filmes e, conseqüentemente, a uma clara diminuição da viabilidade celular (que em dois dos casos - L1P1-30s e L2P1-30s - foi na ordem dos 50%). É importante destacar o comportamento do adesivo L1P2-30s que, embora não tenha apresentado uma diminuição tão acentuada ao longo dos 7 dias, foi aquele que apresentou uma menor percentagem de viabilidade celular inicial de cerca de 45%.

A presença de matéria não reticulada a acumulação e libertação de subprodutos de carácter ácido no meio de cultura, com características fatais para as células, podem ser responsáveis pela diminuição do número de células viáveis, em períodos de incubação superiores⁸⁷. Os resultados obtidos sugerem que terá ocorrido uma situação semelhante à referida anteriormente.

Os valores de viabilidade celular obtidos são concordantes com os resultados obtidos nas técnicas de caracterização referidas nos capítulos anteriores. As análises de ATR-FTIR e ¹H RMN, sugerirem que a reação de funcionalização dos oligómeros de ácido láctico não ocorreu com uma eficácia muito elevada, o que confirmaria a presença de ácido láctico nos filmes e, conseqüentemente, uma viabilidade celular inferior nos adesivos com este composto.

Posto isto, é possível concluir que os tempos de reticulação superiores (2 minutos) permitem a obtenção de adesivos mais biocompatíveis, isto no caso dos copolímeros.

Outra forma de comprovar o sucesso dos adesivos desenvolvidos é através das imagens captadas por microscopia ótica. As Figuras F.1 e F.2, do Anexo F, apresentam as fotografias microscópicas dos adesivos produzidos, bem como as dos controlos positivo (K⁺) e negativo (K⁻). Pela observação das imagens dos controlos, é possível verificar a morfologia das células vivas e mortas, sendo que as primeiras apresentam uma morfologia fusiforme e fibrosa, ao passo que as segundas são esféricas.

Todos os adesivos apresentam um elevado número de células vivas ao fim de 24h, altura a partir da qual se notam as diferenças entre eles. Nos adesivos mPA4-30s, mPA4-2min, mLA4-30s e mLA4-2 min (Figura F.1.), observa-se a presença de células vivas, ao longo dos 7 dias,

sendo que no caso dos adesivos de mPA4 existe um aparecimento de células mortas mais acentuado, ao fim desse período.

À semelhança do constatado anteriormente através das Figuras 3.10 e 3.11, as células de fibroblastos humanos em contacto com os adesivos L1P1-2min, L1P2-2min e L2P1-2min foram capazes de se proliferar e de se manter vivas, ao longo dos 7 dias (Figura F.2. do Anexo F). Contrariamente, os adesivos L1P1-30s, L1P2-30s e L2P1-30s apresentam um carácter mais citotóxico, impedindo que as células se mantivessem vivas ao longo do tempo de estudo.

3.7.2 Estudo da atividade bacteriana

Tendo em conta a aplicação final dos adesivos produzidos, é essencial que estes não provoquem reações adversas no paciente. Tal como referido na Secção 1.1.2, uma das grandes limitações da aplicação de adesivos em contexto cirúrgico está associada à ocorrência de infeções, resultantes de uma proliferação de bactérias na zona da intervenção e nos tecidos circundantes. Um caso comum é a adesão de bactérias após a cirurgia, que pode conduzir ao agravamento do estado de saúde do paciente e/ou à realização de mais intervenções cirúrgicas, aumentando o risco de complicações. Uma limpeza cuidada, uma esterilização do ambiente e instrumentos cirúrgicos e o uso de agentes anti-inflamatórios e de antibióticos poderão diminuir o risco de infeções. No entanto, nenhum destes métodos é totalmente eficaz, continuando a existir casos de infeções pós-cirúrgicas⁴².

Posto isto, foi feito um estudo ao carácter bactericida dos adesivos desenvolvidos, de forma a estudar a influência que a sua utilização pode ter na prevenção de adesão e proliferação de diferentes bactérias.

Foram usadas duas bactérias distintas: a *Escherichia coli* e a *Staphylococcus aureus*. A primeira é uma bactéria gram-negativa, de morfologia bacilar, normalmente presente no organismo humano. Relativamente à *S.aureus* trata-se de uma bactéria gram-positiva, de morfologia esférica que está presente na pele e mucosas nasais. É apontada como a principal bactéria responsável por infecções durante e após a cirurgia, quando são utilizados biomateriais^{42,83}. As Figuras 3.12 e 3.14 apresentam imagens dos halos inibitórios dos adesivos, bem como as fotografias SEM da superfície dos mesmos.

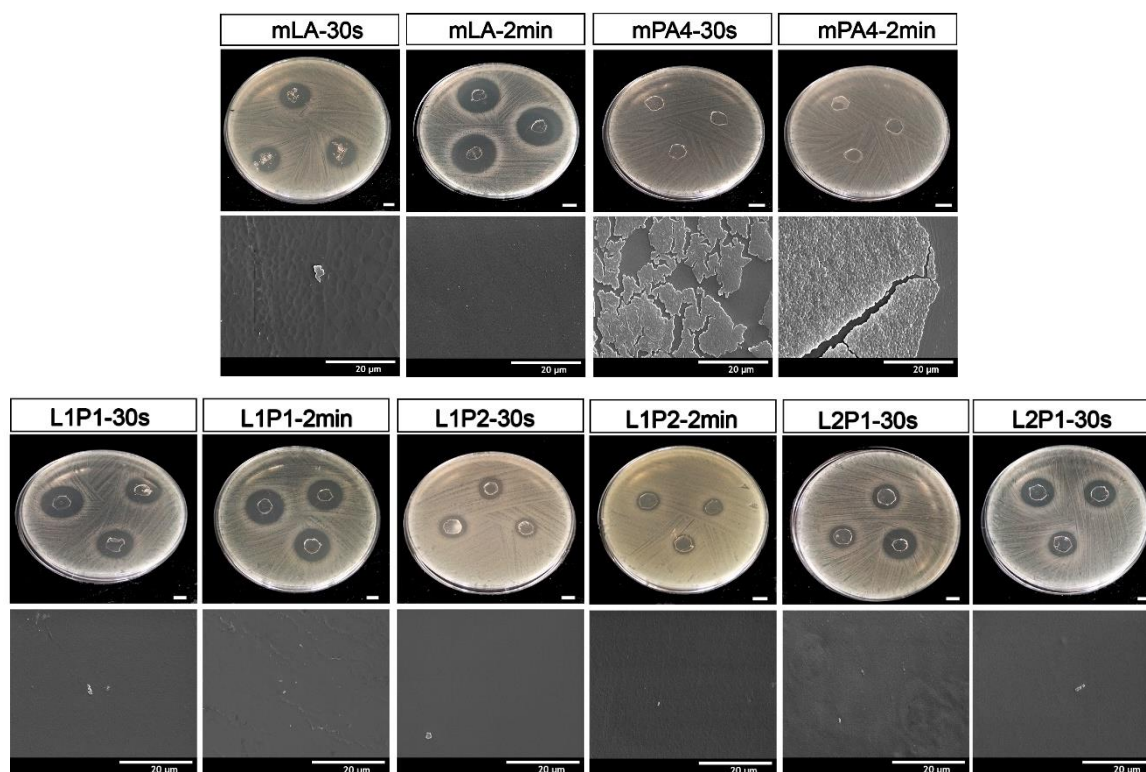


Figura 3.13 - Halos inibitórios e fotografias SEM da estirpe *E.coli*, em contacto com os adesivos desenvolvidos.

Em relação à bactéria *E.coli*, a avaliação das imagens apresentadas na Figura 3.12, permite avaliar o carácter bactericida dos macrómeros mLA4 e mPA4 e a diferença entre eles não poderia ser mais evidente. Os adesivos de mLA4, quer para tempos de reticulação de 30 segundos, como para os de 2 minutos, apresentam um forte carácter bactericida, apresentando halos inibitórios de tamanhos muito satisfatórios, com uma área de inibição de 90% e 85%, respetivamente (Figura 3.13). Contrariamente, os adesivos de mPA4 possuem, para os dois tempos de reticulação, um elevado número de bactérias na sua superfície e áreas circundantes, apresentando uma área de inibição de cerca de 0% (Figura 3.13).

Como seria de esperar, o tamanho dos halos inibitórios dos adesivos resultantes da mistura dos dois macrómeros irá depender da sua proporção. Sendo possível concluir que a área

Discussão e Resultados

inibitória característica de cada adesivo, será tão maior quanto a quantidade de mLA4 nele presente e, por conseguinte, mais satisfatório será o seu comportamento bactericida.

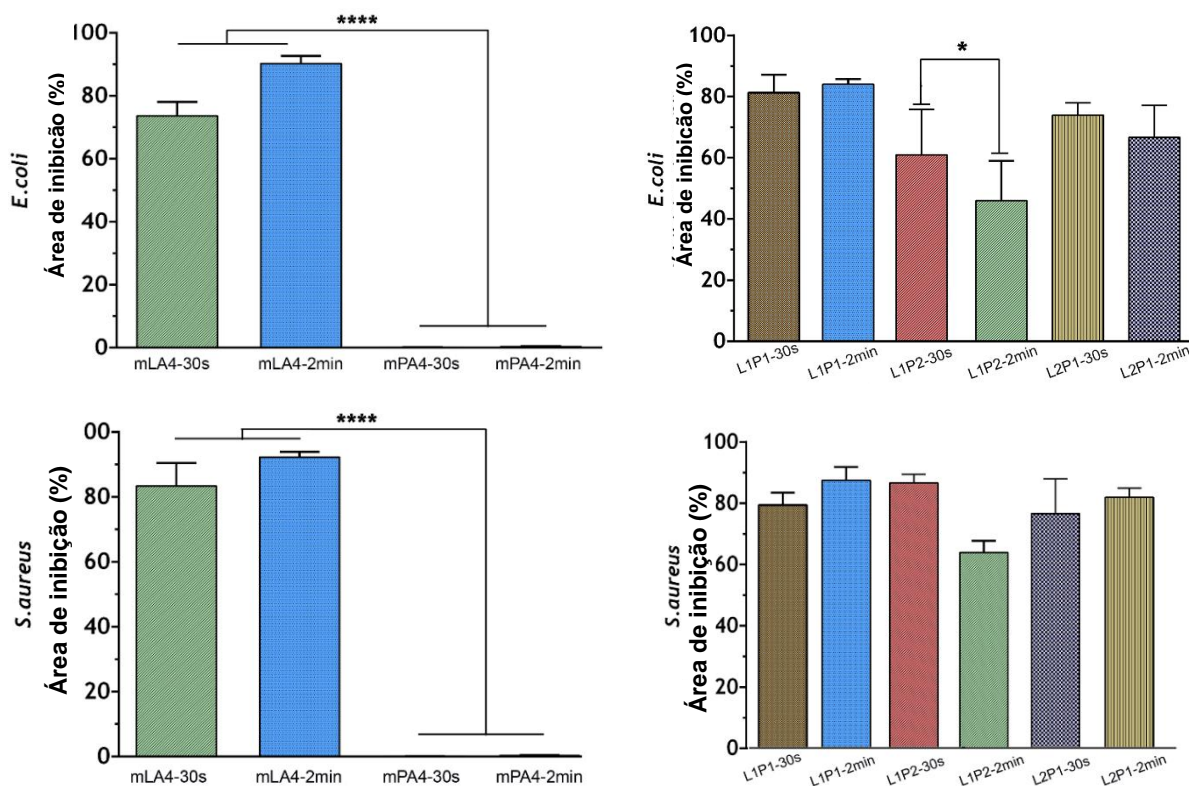


Figura 3.14 - Área percentual dos halos inibitórios dos adesivos desenvolvidos para a *E. coli* (Em cima) e *S. aureus* (Em baixo).

Assim, pela análise da Figura 3.14 constata-se que os adesivos com maior quantidade de mPA4 (L1P2-30s e L1P2-2min) apresentam uma menor área de inibição que os restantes adesivos, no valor de 60% e 45%, respetivamente. Contudo, o erro associado a estes adesivos é considerável, o que poderá uniformizar as capacidades bactericidas em relação aos restantes adesivos.

À exceção dos adesivos L1P2-30s e L1P2-2min, existe uma relação entre a área de inibição e o tempo de reticulação dos adesivos, sendo que aqueles que possuem um grau de reticulação superior (2 minutos) apresentam um halo inibitório maior, na maior parte dos casos.

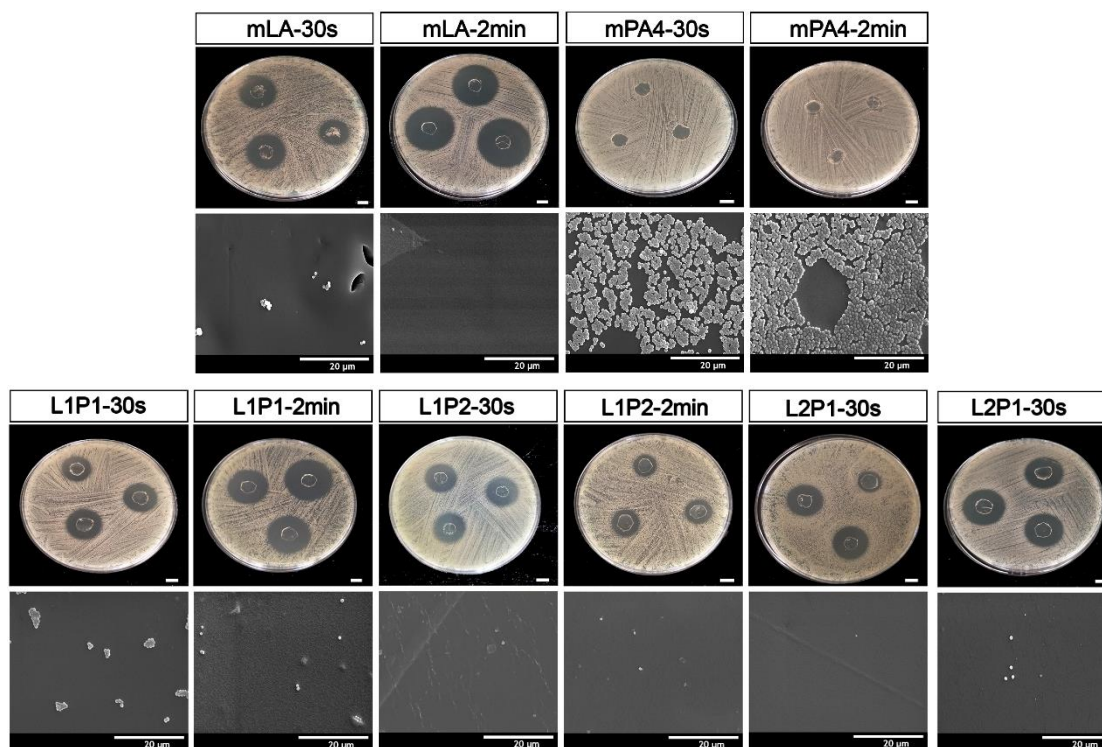


Figura 3.15 - Halos inibitórios e fotografias SEM da estirpe *S.aureus*, em contacto com os adesivos desenvolvidos.

O comportamento das bactérias da espécie *S.aureus* é bastante semelhante ao das *E.coli*, no sentido em que a proporção dos macrómeros nos adesivos e o tempo de reticulação dos mesmos irão ter influência na capacidade antibacteriana dos materiais. No entanto, é possível verificar um crescimento da área inibitória de todos os adesivos, sendo que o valor mais baixo corresponde igualmente ao adesivo L1P2-2min, com um valor de 65% (Figura 3.14).

Como já foi referido, alguns dos materiais possuem uma percentagem considerável de matéria não reticulada e, no caso do mLA4, atendendo aos resultados obtidos na análise de ATR-FTIR, torna este comportamento espectável. Desta forma, a libertação de subprodutos, a presença de solvente e a presença de ácidos pode estar por detrás de algumas discrepâncias de valores e erros associados. Todos os adesivos apresentam um halo inibitório superior para tempos de reticulação de 2 minutos do que para 30 segundos, à exceção dos adesivos L1P2-2min e L1P2-30s. Esta exceção pode acontecer devido às misturas de macrómeros apresentarem comportamentos diferentes após foto-reticulação.

As fotografias SEM, para as duas bactérias, são concordantes com a área de inibição correspondente a cada material desenvolvido. Estas imagens permitem igualmente verificar que, apesar de apresentarem graus de reticulação díspares, todos os adesivos demonstram ser homogêneos, uniformes e compactos.

4 CONCLUSÕES

A preparação de polímeros foto-reticuláveis com aplicabilidade biomédica foi alcançada por meio da síntese de poliésteres de base ácido láctico e policaprolactona, funcionalizados com AOI (mLA4 e mPA4) e por preparação de copolímeros em diferentes proporções (L1P1, L1P2 e L2P1). A sua foto-reticulação à temperatura ambiente resultou em matrizes poliméricas transparentes e uniformes, ao fim de 30 segundos e de 2 minutos de reticulação.

O foco do trabalho foi entender qual a influência que os tempos de exposição à irradiação UV e que as quantidades dos macrómeros poderiam ter nas propriedades finais dos adesivos.

Os processos de síntese foram acompanhados pelas análises de ATR-FTIR e ¹H RMN, de maneira a averiguar a eficácia das reações. A análise ATR-FTIR permitiu verificar a diminuição ou desaparecimento das bandas referentes aos grupos característicos dos materiais utilizados e também o aparecimento de grupos uretana resultantes da reação entre os grupos isocianato do AOI e os grupos hidroxilo dos oligómeros de ácido láctico e da PCL funcionalizados. O estudo ¹H RMN permitiu identificar e localizar prótons específicos e assim identificar estruturas que confirmassem a modificação dos compostos.

Posto isto, para melhor entendimento das ideias aqui mencionadas, a presente Conclusão irá ser dividida em duas considerações: em primeiro será abordada a influência dos tempos de cura e, de seguida, a contribuição de cada um dos macrómeros nas propriedades dos materiais.

Os materiais com tempo de reticulação de 30 segundos apresentaram menores valores de teor de gel e, conseqüentemente, um menor grau de reticulação. Estes resultados traduziram-se numa maior absorção de água e, conseqüentemente, a uma maior taxa de degradação. Exemplo disso é o adesivo mLA4-30s que apresenta o menor valor de teor de gel, $55,23 \pm 0,92\%$, e também os valores mais elevados de absorção de água e degradação hidrolítica ($31,49 \pm 4,52\%$ e $70,42 \pm 1,93\%$, respectivamente). Em contrapartida, os adesivos com 2 minutos de reticulação apresentam maior grau de reticulação e, desta forma, uma capacidade de absorção e de degradação inferior. Um exemplo disso é o adesivo mLA4-2min que apresentou um valor de teor de gel mais elevado, $71,51 \pm 1,18\%$, assim como menores valores de absorção de água e de degradação hidrolítica, $18,01 \pm 0,98\%$ e $57,91 \pm 0,26\%$, respectivamente.

Foi possível concluir que o tempo a que os adesivos estiveram expostos à irradiação UV tem também influência na biocompatibilidade dos mesmos. Um exemplo disso é o facto de o sendo que aos 30 segundos correspondem a menores percentagens de viabilidade celular e capacidade bactericida, no caso dos copolímeros.

Quanto à composição dos adesivos, pôde verificar-se que os que continham maiores quantidades de mLA4 levariam a menores valores de teor de gel e, conseqüentemente, a valores

de capacidade de absorção de água e degradação hidrolítica mais acentuados. Por outro lado, os filmes com maior percentagem de mPA4 resultam em materiais com maior grau de reticulação, o que lhes confere menor capacidade de absorção e menores taxas de degradação. Isto pode ser confirmado, comparando os valores do adesivo mLA4-2min, referidos acima, com os do adesivo mPA4-2min. Este último apresentou um teor de gel de $97,37 \pm 0,63\%$ e valores de *swelling* e biodegradação de $1,3 \pm 0,18\%$ e $7,20 \pm 0,036\%$, respectivamente.

Ao contrário da linearidade dos comportamentos observados nas caracterizações anteriores, verificou-se que a biocompatibilidade não seguiu o mesmo perfil. Ou seja, enquanto que os resultados para os copolímeros indicaram uma diminuição da viabilidade celular, ao longo do tempo, para os adesivos de 30 segundos, o mesmo não se verificou nos resultados dos macrómeros (mLA4 e mPA4), para o mesmo tempo de reticulação, chegando estes a apresentar valores ligeiramente mais satisfatórios que os de 2 minutos. Os adesivos constituídos apenas pelo macrómero de mPA4 mostram não ter qualquer capacidade anti-bacteriana, contudo, esta propriedade pode ser melhorada com a manipulação das quantidades de mLA nos copolímeros.

Em suma, dado que a medicina requer a preparação de materiais com características facilmente manipuláveis, pode-se concluir que os materiais utilizados neste trabalho representam um bom ponto de partida para futuras aplicações na área médica.

5 PERSPETIVAS FUTURAS

O desenvolvimento de adesivos foto-reticuláveis para aplicação biomédica é um processo que ainda apresenta alguns obstáculos até que possa ser implementado. Apesar dos resultados promissores obtidos na elaboração deste trabalho, ainda existe um longo caminho a percorrer, desde a síntese dos materiais poliméricos, à implementação do adesivo no contexto para o qual está destinado. De seguida, é feita uma listagem de sugestões de forma a serem ultrapassadas algumas lacunas e a poder serem compreendidas algumas características não estudadas na elaboração deste trabalho, que poderão ser uma mais valia no futuro.

1. **Utilização de diferentes tipos de materiais para produção de copolímeros:** procurar materiais que possam colmatar as lacunas nas propriedades mecânicas, químicas e biológicas dos adesivos.
2. **Avaliar a influência da espessura dos filmes reticulados:** desenvolver uma estratégia mais eficaz para uniformização dos adesivos e estudar adesivos com diferentes valores de espessura.
3. **Estudar aprofundadamente a foto-reticulação:** estudar a influência de diferentes quantidades de fotoiniciador, da intensidade de luz e da distância da lâmpada aos adesivos.
4. **Caracterizar adesivos com diferentes tempos de reticulação.** Caracterizar filmes com um tempo de reticulação intermédio.
5. **Realizar uma caracterização mais variada:** avaliar a adesão a tecidos biológicos, avaliação à resistência, alongamento e tração dos adesivos; análise termo dinâmico-mecânica e determinação da temperatura vítrea; testes de hemocompatibilidade e ensaios de trombose.
6. **Incorporação de um fármaco de interesse:** poderá influenciar a biocompatibilidade do material e tendo em conta a aplicação final, poderá ser interessante a libertação controlada de antibióticos, anti-inflamatórios e outros fármacos que possam auxiliar o processo de cicatrização.

6 REFERÊNCIAS

1. Ferreira, P., Gil, M., & Alves, P. (2013). An overview in surgical adhesives. *Biomedical Polyurethane-Based Materials*, pp.2-14.
2. Feldman, R. P., & Goodrich, J. T. (1999). The Edwin Smith Surgical Papyrus. Em *Classics in Pediatric Neurosurgery* (Vol. 4, pp. 281–284).
3. Saber, A. (2010). Ancient Egyptian surgical heritage. *Journal of Investigative Surgery*, 23(6), 327–334. <https://doi.org/10.3109/08941939.2010.515289>
4. Lazzeri, D., Agostini, T., Figus, M., Nardi, M., Spinelli, G., Pantaloni, M., & Lazzeri, S. (2012). The contribution of Aulus Cornelius Celsus (25 B.C.50 A.D.) to eyelid surgery. *Orbit*, 31(3), 162–167. <https://doi.org/10.3109/01676830.2011.648816>
5. Ferreira, P. (2007). *Preparação e caracterização de adesivos de base uretana*. Tese de Doutorado, Universidade de Coimbra, Portugal.
6. Köckerling, F., Köckerling, D., & Lomas, C. (2013). Cornelius Celsus - Ancient encyclopedist, surgeon-scientist, or master of surgery? *Langenbeck's Archives of Surgery*, 398(4), 609–616. <https://doi.org/10.1007/s00423-013-1050-0>
7. Donkerwolcke, M., Burny, F., & Muster, D. (1998). Tissues and bone adhesives-historical aspects. *Biomaterials*, 19(16), 1461–1466.
8. Coover, H. W. (1954). United States Patent Office. Em *Journal of the American Society for Naval Engineers* (Vol. 39, pp. 620–622). <https://doi.org/10.1111/j.1559-3584.1927.tb04229.x>
9. Bouten, P. J. M., Zonjee, M., Bender, J., Yauw, S. T. K., Van Goor, H., Van Hest, J. C. M., & Hoogenboom, R. (2014). The chemistry of tissue adhesive materials. *Progress in Polymer Science*, 39(7), 1375–1405. <https://doi.org/10.1016/j.progpolymsci.2014.02.001>
10. Bhagat, V., & Becker, M. L. (2017). Degradable Adhesives for Surgery and Tissue Engineering. *Biomacromolecules*, 18(10), 3009–3039. <https://doi.org/10.1021/acs.biomac.7b00969>
11. Dunn, D. L., & Phillips, J. (2005). *Wound Closure Manual*. Ethicon.
12. Sanders, L., & Nagatomi, J. (2014). Clinical applications of surgical adhesives and sealants. *Critical Reviews in Biomedical Engineering*, 42(3–4), 271–292.
13. Tajirian, A. L., & Goldberg, D. J. (2010). A review of sutures and other skin closure materials. *Journal of Cosmetic and Laser Therapy : Official Publication of the European Society for Laser Dermatology*, 12(6), 296–302. <https://doi.org/10.3109/14764172.2010.538413>

14. Quinn, J. V., Drzewiecki, A., Li, M., Stiell, I. G., Sutcliffe, T., Elmslie, T., & Wood, W. E. (1993). A randomized, controlled trial comparing a tissue adhesive with suturing in the repair of pediatric facial lacerations. *Annals of Emergency Medicine*, 22(7), 1130–1135. [https://doi.org/10.1016/S0196-0644\(05\)80977-1](https://doi.org/10.1016/S0196-0644(05)80977-1)
15. Chu, C., Von Fraunhofer, J. A., & Greisler, H. P. (1997). *Wound Closure Biomaterials and Devices*. CRC PRESS.
16. Kojić, D., Budinski-Simendic, J., Tanasic, L., Erceg, T., Pavličević, J., Teofilović, V., & Vukić, N. (2017). Structuring of polymer materials for absorbable surgical sutures.
17. Benicewicz, B. C., & Hopper, P. K. (1990). Polymers for Absorbable Surgical Sutures. *Journal of Bioactive and Compatible Polymers*, 5(4), 453–472. <https://doi.org/10.1177/088391159000500407>
18. Dunn, David J. (2003). *Adhesives and Sealants: Technology, Applications and Market*. Rapra Tchnology Limited.
19. Suzuki, S., & Ikada, Y. (2012). *Biomaterials for Surgical Operation*. Japan: Humana Press.
20. Pillai, C. K. S., & Sharma, C. P. (2010). Review paper: Absorbable polymeric surgical sutures: Chemistry, production, properties, biodegradability, and performance. *Journal of Biomaterials Applications*, 25(4), 291–366. <https://doi.org/10.1177/0885328210384890>
21. Byrne, M., & Aly, A. (2019). The surgical suture. *Aesthetic Surgery Journal*, 39, S67–S72. <https://doi.org/10.1093/asj/sjz036>
22. Moy, R. L., Waldman, B., & Hein, D. W. (1992). A Review of Sutures and Suturing Techniques. *The Journal of Dermatologic Surgery and Oncology*, 18(9), 785–795. <https://doi.org/10.1111/j.1524-4725.1992.tb03036.x>
23. Barros, M., Gorgal, R., Machado, A. P., Correia, A., & Montenegro, N. (2011). Princípios básicos em cirurgia: Fios de sutura. *Acta Medica Portuguesa*, 24(SUPPL.4), 1051–1056.
24. Kettle, C., Dowswell, T., & Ismail, K. (2010). Absorbable suture materials for primary repair of episiotomy and second degree tears (Review). *Cochrane Database of Systematic Reviews*, (6).
25. Gottrup, F., & Leaper, D. (2004). Chapter 21: Wound healing: Historical Aspects. *European Wound Management Association Journal*, 4(2).
26. Singer, A. J., Hollander, J. E., & Blumm, R. M. (2011). *Skin and soft tissue injuries and infections : a practical evidence based guide*. Shelton, CT: People’s Medical Publishing House–USA.

Referências

27. Wu, H., Zhao, C., Ni, J., Zhang, S., Liu, J., Yan, J., ... Zhang, X. (2016). Research of a novel biodegradable surgical staple made of high purity magnesium. *Bioactive Materials*, 1(2), 122–126. <https://doi.org/10.1016/j.bioactmat.2016.09.005>
28. Innocutis. Innocutis Medical Signs Exclusive Marketing Agreement for INSORB Absorbable Skin Stapler. Disponível em: <http://innocutis.com/news/innocutis-medical-signs-exclusive-marketingagreement-for-insorb-absorbable-skin-stapler> no dia 14 de Maio de 2019.
29. Insorb, Absorbable skin stapler. The revolutionary new patient-centric skin closure modality. Disponível em: [http://www.insorb.com./](http://www.insorb.com/) no dia 14 de Maio de 2019.
30. Bennett, R. G. (1938). Continuing medical education: Selection of wound closure materials. *Journal of the American Academy of Dermatology*, 18(4), 619–637.
31. Cooper, C. W., & Falb, R. D. (1968). Surgical Adhesives. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 146(1), 214–224. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.1968.tb20284.x>
32. Ferreira, P., Coelho, J. F. J., Almeida, J. e Gil, M. H. (2011). Photocrosslinkable Polymers for Biomedical Applications. Em *Biomedical Engineering-Frontiers and Challenges*, Prof. Reza Fazel (Ed.) (p. 13). Rijeka, Croácia: InTech. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.5772/57353>
33. Ferreira, P., Pereira, R., Coelho, J. F. J., Silva, A. F. M., & Gil, M. (2007). Modification of the biopolymer castor oil with free isocyanate groups to be applied as bioadhesive. *International Journal of Biological Macromolecules*, 40(2), 144–152. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2006.06.023>
34. Silva, L. F. M., Ochsner, A., & Adams, R. D. (2011). *Handbook of Adhesion Technology* (1st ed.). Springer-Verlag Berlin Heidelberg.
35. Williams, D. F. (2008). On the mechanisms of biocompatibility. *Biomaterials*, 29(20), 2941–2953. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2008.04.023>
36. Ferreira, P., Coelho, J. F. J., & Gil, M. (2008). Development of a new photocrosslinkable biodegradable bioadhesive. *International Journal of Pharmaceutics*, 352(1–2), 172–181. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2007.10.026>
37. Lipatova, T. E. (1986). Medical polymer adhesives. Em *Biopolymers/Non-Exclusion HPLC* (pp. 65–93). Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg.
38. Mehdizadeh, M., & Yang, J. (2013). Design Strategies and Applications of Tissue Bioadhesives. *Macromolecular Bioscience*, 13(3), 271–288. <https://doi.org/10.1002/mabi.201200332>

39. Duarte, A. P., Coelho, J. F. J., Bordado, J. C., Cidade, M. T., & Gil, M. (2012). Surgical adhesives: Systematic review of the main types and development forecast. *Progress in Polymer Science*, 37(8), 1031–1050. <https://doi.org/10.1016/j.progpolymsci.2011.12.003>
40. Cohen, B., Shefy-Peleg, A., & Zilberman, M. (2014). Novel gelatin/alginate soft tissue adhesives loaded with drugs for pain management: Structure and properties. *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition*, 25(3), 224–240. <https://doi.org/10.1080/09205063.2013.849904>
41. Rose, J. B., Pacelli, S., El Haj, A. J., Dua, H. S., Hopkinson, A., White, L. J., & Rose, F. R. A. J. (2014). Gelatin-based materials in ocular tissue engineering. *Materials*, 7(4), 3106–3135. <https://doi.org/10.3390/ma7043106>
42. Kim, K., Luu, Y. K., Chang, C., Fang, D., Hsiao, B. S., Chu, B., & Hadjiargyrou, M. (2004). Incorporation and controlled release of a hydrophilic antibiotic using poly(lactide-co-glycolide)-based electrospun nanofibrous scaffolds. *Journal of Controlled Release*, 98(1), 47–56. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2004.04.009>
43. Bachet, J., Goudot, B., Dreyfus, G., Banfi, C., Ayle, N. A., Aota, M., Guilmet, D. (1997). The proper use of glue: a 20-year experience with the GRF glue in acute aortic dissection. *Journal of Cardiac Surgery*, 12(2 Suppl), 243–245.
44. Tsukui, H., Aomi, S., Nishida, H., Endo, M., & Koyanagi, H. (2001). Ostial stenosis of coronary arteries after complete replacement of aortic root using gelatin-resorcinol-formaldehyde glue. *Annals of Thoracic Surgery*, 72(5), 1733–1735. [https://doi.org/10.1016/S0003-4975\(01\)02566-8](https://doi.org/10.1016/S0003-4975(01)02566-8)
45. Erasmi, A. W., Sievers, H. H., & Wohlschläger, C. (2002). Inflammatory response after bioglue application. *The Annals of Thoracic Surgery*, 73(3), 1025. [https://doi.org/10.1016/s0003-4975\(01\)03524-x](https://doi.org/10.1016/s0003-4975(01)03524-x)
46. Liang, H. C., Chang, W. H., Liang, H. F., Lee, M. H., & Sung, H. W. (2004). Crosslinking structures of gelatin hydrogels crosslinked with genipin or a water-soluble carbodiimide. *Journal of Applied Polymer Science*, 91(6), 4017–4026. <https://doi.org/10.1002/app.13563>
47. Sung, H., Huang, D., Chang, W., Huang, R., & Hsu, J. (1998). *Evaluation of gelatin hydrogel crosslinked with various crosslinking agents as bioadhesives : In vitro study*.
48. Gomez-Guillen, M. C., Gimenez, B., Lopez-Caballero, M. E., & Montero, M. P. (2011). Functional and bioactive properties of collagen and gelatin from alternative sources: A review. *Food Hydrocolloids*. Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2011.02.007>
49. Jackson, M. R. (2001). Fibrin sealants in surgical practice: An overview. *American*

Referências

- Journal of Surgery*, 182(2 SUPPL. 1). [https://doi.org/10.1016/S0002-9610\(01\)00770-X](https://doi.org/10.1016/S0002-9610(01)00770-X)
50. Aventis. Beriplast® P/Combi-Set, Fibrin Sealant Disponível em: http://www.cslsurgery.com/international/beriplast/product/pdf/Wounded_Healing_8_9.pdf no dia 20 de Abril de 2019.
 51. Alves, P., Ferreira, P., & Gil, H. (2012). Biomedical Polyurethane-Based Materials. Em *Polyurethane: Properties, Structure and Applications* (1st ed.). New York, USA: Alves, P., Ferreira, P. and Gil M. H. (2012) Polyurethane: Properties, Structure and Applications: Biomedical Polyurethane-Based Materials (1st ed). NY, US: Nova Science Publishers, Inc.
 52. Heiss, C., Kraus, R., Schluckebier, D., Stiller, A. C., Wenisch, S., & Schnettler, R. (2006). Bone adhesives in trauma and orthopedic surgery. *European Journal of Trauma*. <https://doi.org/10.1007/s00068-006-6040-2>
 53. Sheikh, N., Mirzadeh, H., Katbab, A. A., Salehian, P., Daliri, M., & Amanpour, S. (2001). Isocyanate-terminated urethane prepolymer as bioadhesive material: evaluation of bioadhesion and biocompatibility, in vitro and in vivo assays. *Journal of Biomaterials Science. Polymer Edition*, 12(7), 707–719.
 54. Langer, R., Vacanti, J., Carter, D., & Borenstein, J. (2007). *Biomimetic Nanostructured Medical Adhesives*. NSF Nanoscale Science and Engineering Grantees Conference.
 55. Mahdavi, A., Ferreira, L., Sundback, C., Nichol, J. W., Chan, E. P., Carter, D. J. D., ... Karp, J. M. (2008). A biodegradable and biocompatible gecko-inspired tissue adhesive. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*,
 56. Rogers, M. E., Long, T. E., & Turner, S. R. (2003). Introduction to Synthetic Methods in Step-Growth Polymers. Em *Synthetic Methods in Step-Growth Polymers*. Hoboken, NJ: John Wiley & Sons, Ltd.
 57. Gunatillake, P. A., Adhikari, R., & Gadegaard, N. (2003). Biodegradable synthetic polymers for tissue engineering. *European Cells and Materials*, 5, 1–16. <https://doi.org/10.22203/eCM.v005a01>
 58. Guo, K., & Chu, C. C. (2007). Biodegradation of unsaturated poly(ester-amide)s and their hydrogels. *Biomaterials*, 28(22), 3284–3294. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2007.03.031>
 59. Finne, A., & Albertsson, A. C. (2004). New Functionalized Polyesters to Achieve Controlled Architectures. *Journal of Polymer Science, Part A: Polymer Chemistry*, 42(3), 444–452. <https://doi.org/10.1002/pola.10805>
 60. Edlund, U., & Albertsson, A. C. (2003). Polyesters based on diacid monomers.

Advanced Drug Delivery Reviews, 55(4), 585–609. [https://doi.org/10.1016/S0169-409X\(03\)00036-X](https://doi.org/10.1016/S0169-409X(03)00036-X)

61. Rodriguez-Galan, A., Franco, L., & Puiggali, J. (2011). Degradable poly(ester amide)s for biomedical applications. *Polymers*, 3(1), 65–99. <https://doi.org/10.3390/polym3010065>
62. Cernadas, T. M., Gonçalves, F. A. M. M., Alves, P., Miguel, S. P., Cabral, C., Correia, I. J., & Ferreira, P. (2019). Preparation of biodegradable functionalized polyesters aimed to be used as surgical adhesives. *European Polymer Journal*, 117(March), 442–454. <https://doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2019.05.019>
63. Marques, D. S., Santos, J. M. C., Ferreira, P., Correia, T. R., Correia, I. J., Gil, M., & Baptista, C. M. S. G. (2016). Functionalization and photocuring of an L-lactic acid macromer for biomedical applications. *International Journal of Polymeric Materials and Polymeric Biomaterials*, 65(10), 497–507. <https://doi.org/10.1080/00914037.2015.1129962>
64. Williams, C. G., Malik, A. N., Kim, T. K., Manson, P. N., & Elisseeff, J. H. (2005). Variable cytocompatibility of six cell lines with photoinitiators used for polymerizing hydrogels and cell encapsulation. *Biomaterials*, 26(11), 1211–1218. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2004.04.024>
65. Benson, R. S. (2002). Use of radiation in biomaterials science. Em *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research, Section B: Beam Interactions with Materials and Atoms* (Vol. 191, pp. 752–757). [https://doi.org/10.1016/S0168-583X\(02\)00647-X](https://doi.org/10.1016/S0168-583X(02)00647-X)
66. Kao, F. J., Manivannan, G., & Sawan, S. P. (1997). UV curable bioadhesives: Copolymers of N-vinyl pyrrolidone. *Journal of Biomedical Materials Research*, 38(3), 191–196. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-4636\(199723\)38:3<191::AID-JBM2>3.0.CO;2-K](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-4636(199723)38:3<191::AID-JBM2>3.0.CO;2-K)
67. Peppas, N. A., Keys, K. B., Torres-Lugo, M., & Lowman, A. M. (1999). Poly(ethylene glycol)-containing hydrogels in drug delivery. *Journal of Controlled Release*, 62(1–2), 81–87. [https://doi.org/10.1016/S0168-3659\(99\)00027-9](https://doi.org/10.1016/S0168-3659(99)00027-9)
68. Popat, K. C., Mor, G., Grimes, C., & Desai, T. A. (2004). Poly (ethylene glycol) grafted nanoporous alumina membranes. *Journal of Membrane Science*, 243(1–2), 97–106. <https://doi.org/10.1016/j.memsci.2004.05.030>
69. Ludwig, A. (2005). The use of mucoadhesive polymers in ocular drug delivery. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 57, 1595–1639. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2005.07.005> 105(7), 2307–2312. <https://doi.org/10.1073/pnas.0712117105>
70. Khandare, J., & Minko, T. (2006). Polymer-drug conjugates: Progress in polymeric prodrugs. *Progress in Polymer Science (Oxford)*, 31(4), 359–397.

Referências

- <https://doi.org/10.1016/j.progpolymsci.2005.09.004>
71. Marques, D. S., Santos, J. M. C., Ferreira, P., Correia, T. R., Ilídio, J., Gil, M. H., ... Functionalization, C. M. S. G. B. (2016). International Journal of Polymeric Materials and Functionalization and photocuring of an L-lactic acid macromer for biomedical applications, 4037(August). <https://doi.org/10.1080/00914037.2015.1129962>
 72. Nicolet, T., & All, C. (2001). Introduction to Fourier Transform Infrared Spectrometry, 199(1), 1–8.
 73. Smith, B. C. (2011). *Fundamentals of Fourier Transform Infrared Spectroscopy* (2.^a ed.). New York: CRC Press.
 74. Ramer, G., & Lendl, B. (2013). Attenuated Total Reflection Fourier Transform Infrared Spectroscopy. *Encyclopedia of Analytical Chemistry*. <https://doi.org/10.1002/9780470027318.a9287>
 75. Bach, M. (2012). *Near Infrared Laser Sensor System for In-Line Detection of Conversion in UV-Cured Polymer Coatings*. <https://doi.org/10.5445/ksp/1000027435>
 76. Grdadolnik, J. (2002). ATR-FTIR spectroscopy: Its advantages and limitations. *Acta Chimica Slovenica*, 49(3), 631–642.
 77. Sandler, R. S., Karo, W., Bonesteel, J.-A., & Pearce, E. M. (1998). *Polymer Synthesis and Characterization. The British Journal of Psychiatry* (Vol. 111). Academic Press. <https://doi.org/10.1192/bjp.111.479.1009-a>
 78. Williams, D. F. (2019). Biocompatibility in clinical practice: predictable and unpredictable outcomes. *Progress in Biomedical Engineering*, 1(1), 013001. <https://doi.org/10.1088/2516-1091/ab22cc>
 79. Rihova, B. (1996). Biocompatibility of biomaterials: hemocompatibility, immunocompatibility and biocompatibility of solid polymeric materials and soluble targetable polymeric carriers. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 21(2), 157–176.
 80. Alves, P., Cardoso, R., Correia, T. R., Antunes, B. P., Correia, I. J., & Ferreira, P. (2014). Surface modification of polyurethane films by plasma and ultraviolet light to improve haemocompatibility for artificial heart valves. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 113, 25–32. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2013.08.039>
 81. An, Y. H., & Friedman, R. J. (2001). *Handbook of Bacterial Adhesion: Principles, Methods, and Applications* (Vol. 48). Totowa, New Jersey: Humana Press. <https://doi.org/10.1053/jhin.2001.0816>
 82. Bazaka, K., Jacob, M. V., Crawford, R. J., & Ivanova, E. P. (2011). Plasma-assisted surface modification of organic biopolymers to prevent bacterial attachment. *Acta*

Biomaterialia, 7(5), 2015–2028. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2010.12.024>

83. Miguel, S. P., Ribeiro, M. P., Brancal, H., Coutinho, P., & Correia, I. J. (2014). Thermoresponsive chitosan-agarose hydrogel for skin regeneration. *Carbohydrate Polymers*, 111, 366–373. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2014.04.093>
84. Coates, J. (2000). Interpretation of Infrared Spectra , A Practical Approach Interpretation of Infrared Spectra , A Practical Approach. In *Encyclopedia of Analytical Chemistry* (pp. 10815–10837). John Wiley & Sons Ltd, Chichester.
85. Hakala, R. (2013). Crosslinked poly(ester anhydrides) for controlled drug delivery. Aalto University, Finland.
86. Jansen, J. (2012). *Photo-crosslinked biodegradable polymer networks for controlled intraocular drug delivery*. University of Twente, Enschede, The Netherlands. <https://doi.org/10.3990/1.9789036532914>
87. Marques, D. (2012). Studies on high molecular weight poly(lactic acid) synthesis. Tese de Doutoramento, Universidade de Coimbra, Portugal.
88. Torchiana, D. F. (2003). Polyethylene Glycol Based Synthetic Sealants: Potential Uses in Cardiac Surgery. *Journal of Cardiac Surgery*, 18(6), 504–506. <https://doi.org/10.1046/j.0886-0440.2003.00305.x>
89. Monocryl. Monocryl® (poliglecaprone 25) Suture. Disponível em: <http://www.ethicon.com/healthcareprofessionals/products/wound-closure/absorbable-sutures/monocryl-poliglecaprone-25/> no dia 7 de Abril de 2019
90. Ethilon. (2019). Ethilon® Nylon Suture. Disponível em: <http://www.ethicon.com/healthcareprofessionals/products/wound-closure/non-absorbable-sutures/ethilon-nylon> no dia 7 de Abril de 2015.
91. Dermalon. Dermalon®, Dermalon sutures by Covidien.. Disponível em: <http://www.medline.com/product/Dermalon-Sutures-by-Covidien/Z05-PF38197> no dia 20 de Maio de 2019.
92. Prolene. Prolene® Polypropylene Suture. Disponível em: <http://www.ethicon.com/healthcareprofessionals/products/wound-closure/non-absorbable-sutures/prolene-polypropylene#!description-and-specs> no dia 20 de Maio de 2019.
93. Mersilene. Mersilene® Polyester Fiber Suture. Disponível em: <http://www.ethicon.com/healthcareprofessionals/products/wound-closure/non-absorbable-sutures/mersilene-polyester-fiber> no dia 7 de Abril de 2015.
94. Ferdous, J., Romito, E., Doviak, H., Moreira, A., Uline, M. J., Spinale, F. G., & Shazly,

Referências

T. (2017). Isoreactive Manipulation of Bioadhesive Polymers Impacts Tissue-Specific Interactions. *Journal of Biomedical Science and Engineering*, 10(05), 287–303. <https://doi.org/10.4236/jbise.2017.105022>

ANEXOS

ANEXO A. SUTURAS ABSORVÍVEIS E NÃO ABSORVÍVEIS

Tabela A.1 - Suturas absorvíveis existentes no mercado e respectivas classificações.

Nome comercial	Material	Origem	Número de fios	Absorção completa	Referência
Monocryl®	Copolímero de glicolídeo e ϵ -caprolactona	Sintética	Monofilamentada	91-110	90
PDS®	Polidioxanona	Sintética	Monofilamentada	180	13
Maxon®	Carbonato de poli-trimetileno	Sintética	Monofilamentada	180-120	13
Vicryl®	Ácido polilático (PLA)	Sintética	Multifilamentada	60-90	13,23
Dexon®	Ácido poliglicólico	Sintética	Multifilamentada	90-120	13

Tabela A.2 - Suturas não absorvíveis existentes no mercado e respectivas classificações.

Sutura	Material	Origem	Número de fios	Referência
Ethilon®	Nylon 6 e nylon 6,6	Sintética	Monofilamentada	13,91
Dermalon®	Nylon 6 e nylon 6,6	Sintética	Monofilamentada	92
Prolene®	Poliiolefina linear	Sintética	Monofilamentada	13,93
Mersilene®	Politereftalato de etileno	Sintética	Monofilamentada	13,94
Novafil®	<i>Polybutester</i>	Sintética	Monofilamentada	13

ANEXO B. ADESIVOS CIRÚRGICOS PRESENTES NO MERCADO

Tabela B.1 - Adesivos cirúrgicos de origem natural, existentes no mercado e respetivas características, vantagens e desvantagens^{38,95}.

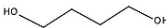
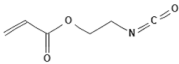
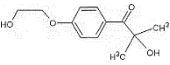

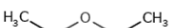

Material Base	Produto	Aplicação	Vantagens	Desvantagens
Fibrina	Tissel VH (Baxter)	Complemento a suturas para evitar fugas de ar ou fluidos. Aplicado em procedimentos ao colon e tórax ^{9,12} .		
	Evicel (Ethicon/Johnson & Johnson)	Como complemento para o fechamento de colostomias ^{12,38} .		Risco de transmissão de doenças sanguíneas; risco de reações alérgicas e infeções; elevado tempo de preparação; requer equipamento auxiliar; Baixa força de adesão
	Beriplast-P® (Centeon)	Suporte em todas as áreas cirúrgicas para execução de adesão de tecido; Suporte para sutura; Hemostasia; cuidado da ferida cirúrgica; selagem de cavidades corporais e espaços subaracnoides.	Elevada velocidade de cura; Elevada biocompatibilidade; ; Elevada biodegradabilidade	
	Hemasteel APR (Haemacure Corp.)	Complemento de cicatrização de feridas e estancar sangramentos ^{9,38} .		
	Vitagel (Stryker)	Auxiliar de coagulação ⁹ .		
Colagénio	CoStatis® (Cohesion Technologies, Inc)	Promotor de agregação e adesão de plaquetas e activador de fatores de coagulação ^{12,39} .	Baixo custo; Baixo risco de transmissão de doenças.	Agente reticulante tóxico; Biocompatibilidade moderada.
Albumina	<i>Bioglue</i> (CryoLife)	Selante vascular complementar às suturas ^{12,38} .	Elevada velocidade de polimerização;	Agente reticulante tóxico;
	<i>ProGel</i> (NeoMend)	Selante pós-operatório de fugas de ar no tecido pulmonar ^{9,12} .	Força de adesão moderada.	Biocompatibilidade moderada.

Tabela B.2 - Adesivos cirúrgicos de origem sintética, existentes no mercado e respectivas características, vantagens e desvantagens^{38,95}.

Material Base	Produto	Aplicação	Vantagens	Desvantagens
Cianoacrilato	<i>Dermabond</i> (2-Octyl cyanoacrylate) (Ethicon Inc., Johnson & Johnson)	Complemento às suturas para tratamento de feridas superficiais.	Rápida polimerização; Elevada força de adesão; Fácil manuseamento; Relativamente barato	Produtos de degradação com toxicidade elevada.
	<i>Indermil</i> (n-Butyl-2-cyanoacrylate) (Covidien Inc.)	Complemento às suturas para tratamento de feridas superficiais.		
	<i>Histoacryl and Histoacryl Blue</i> (n-Butyl-2-cyanoacrylate) (B.Braun Medical Inc.)	Tratamento endoscópico; tratamento de feridas cutâneas.		
Polietileno glicol (PEG)	<i>CoSea</i> [®] (Baxter)	Estancar sangramento nos limites da sutura ¹² .	Rápida formação de gel; Rápida hemostasia; Elevada biocompatibilidade; Moderada força de adesão.	Difícil controlo de <i>swelling</i> ; Risco de alergia; Relativamente caro.
	<i>SprayGel</i> [®] (Covidien)	Procedimentos colo-rectal e ginecológicos ³⁹ .		
	<i>DuraSea</i> [®] (Covidien)	Encerramento de incisões de cirurgias vasculares; Complemento a suturas ⁹ .		
	<i>TissuGlue</i> [®]	Prevenção de formação de seroma ⁹ .		
	<i>FocalSea</i> [®] (Focal Inc.)	Impedir fugas de ar nos pulmões ⁹ .		
	<i>OcuSeal</i> [®] (Hyperbranch Medical Technology)	Lacerações e transplantação de córnea ⁹		

ANEXO C. PRINCIPAIS REAGENTES UTILIZADOS

Tabela C.1 - Fórmulas, estruturas e propriedades dos principais reagentes utilizados

Substância	Fórmula química	Estrutura química	Peso molecular (g.mol ⁻¹)	Massa volúmica (g.mL ⁻¹)	Temperatura de fusão (°C)	Temperatura de ebulição (°C)
1,4-butanodiol	C ₄ H ₁₀ O ₂		90,12	1,209	16	230
Acrilato de 2-isocianoetilo	C ₆ H ₇ NO ₃		141,13	1,1	-	200
Irgacure® 2959	C ₁₂ H ₁₆ O ₄		224,30	ND	88-90	ND
Ácido láctico (L+)	C ₃ H ₆ O ₃		90,08	1,209 (ebulição a 80%)	53	122 (a 12 mmHg)
Éter dietílico	C ₄ H ₁₀ O		74,12	0,710	-116	34,6
Policaprolactona diol	(C ₆ H ₁₀ O ₂) _n		530	1,073	60	ND

ANEXO D. REPRESENTAÇÃO DA MONTAGEM DO SISTEMA EXPERIMENTAL

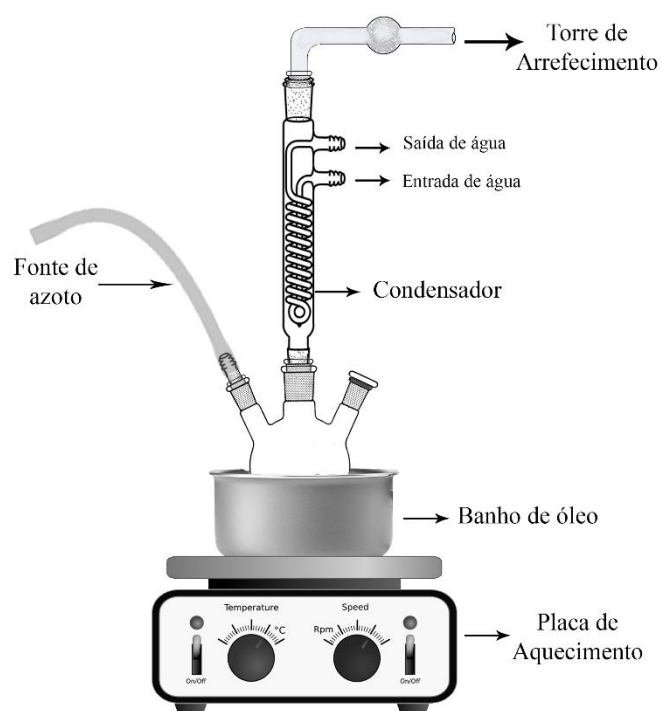


Figura D.1 - Esquema da montagem experimental para a síntese de mLA4 e mPA4

ANEXO E. ANÁLISE TERMOGRAVIMÉTRICA

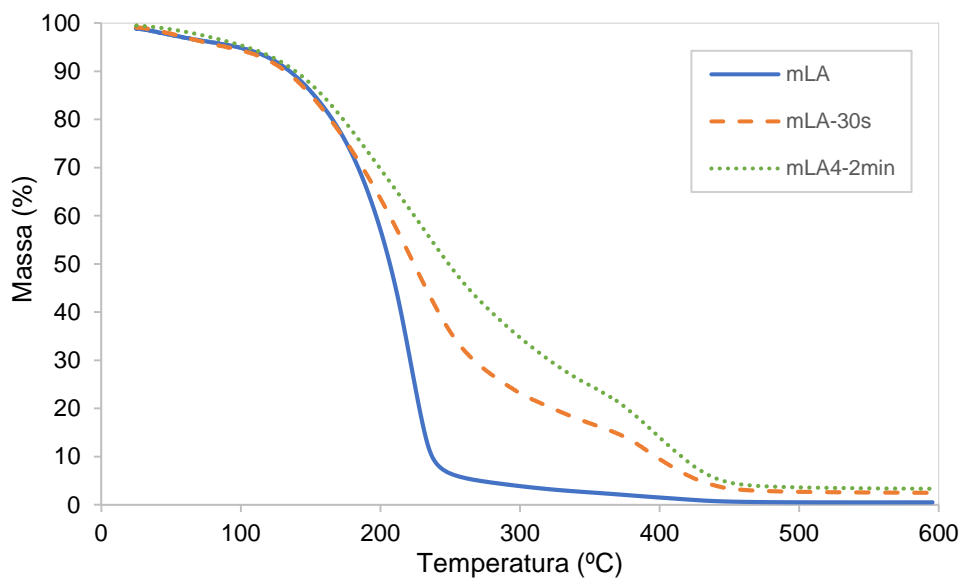


Figura E.1 - Curvas termogravimétrica do mLA4 e dos adesivos reticulados mLA-30s e mLA-2min.

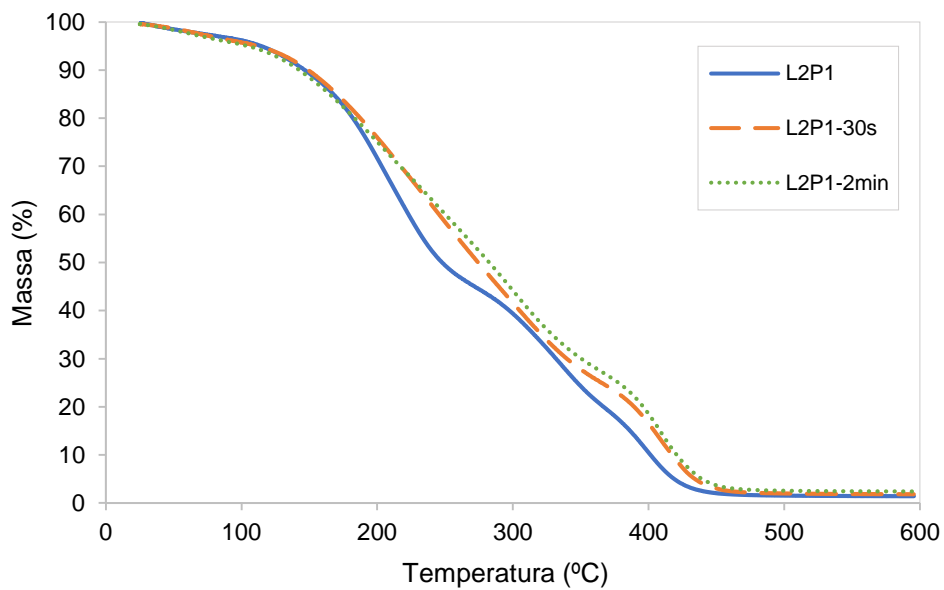


Figura E. 2 - Curvas termogravimétrica do L2P1 e dos adesivos reticulados L2P1-30s e L2P1-2min.

Anexos

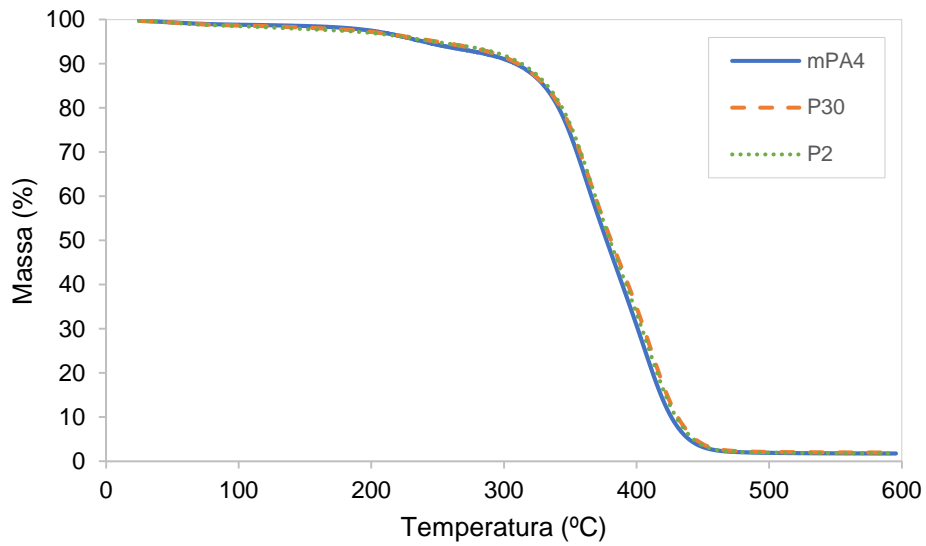


Figura E.3 - Curvas termogravimétrica do mPA4 e dos adesivos reticulados mPA-30s e mPA-2min.

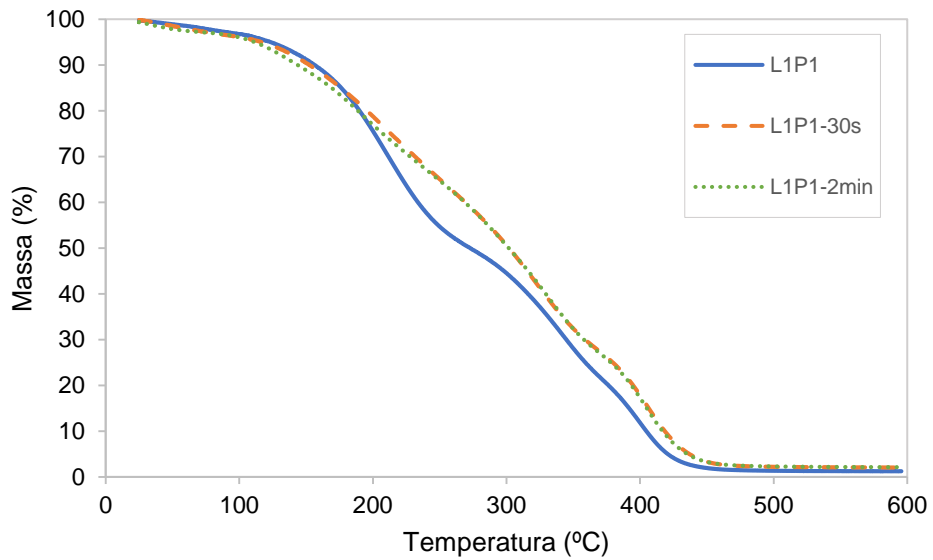


Figura E.4- Curvas termogravimétricas do L1P1 e dos adesivos reticulados L1P1-30s e L1P1-2min.

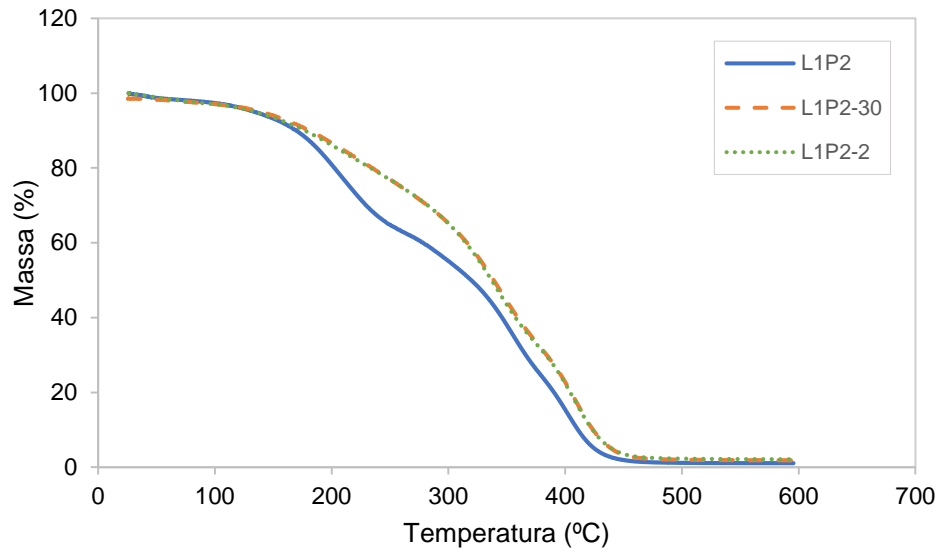


Figura E.5 - Curvas termogravimétricas do L1P2 e dos adesivos reticulados L1P2-30s e L1P2-2min.

ANEXO F. BIOCOMPATIBILIDADE

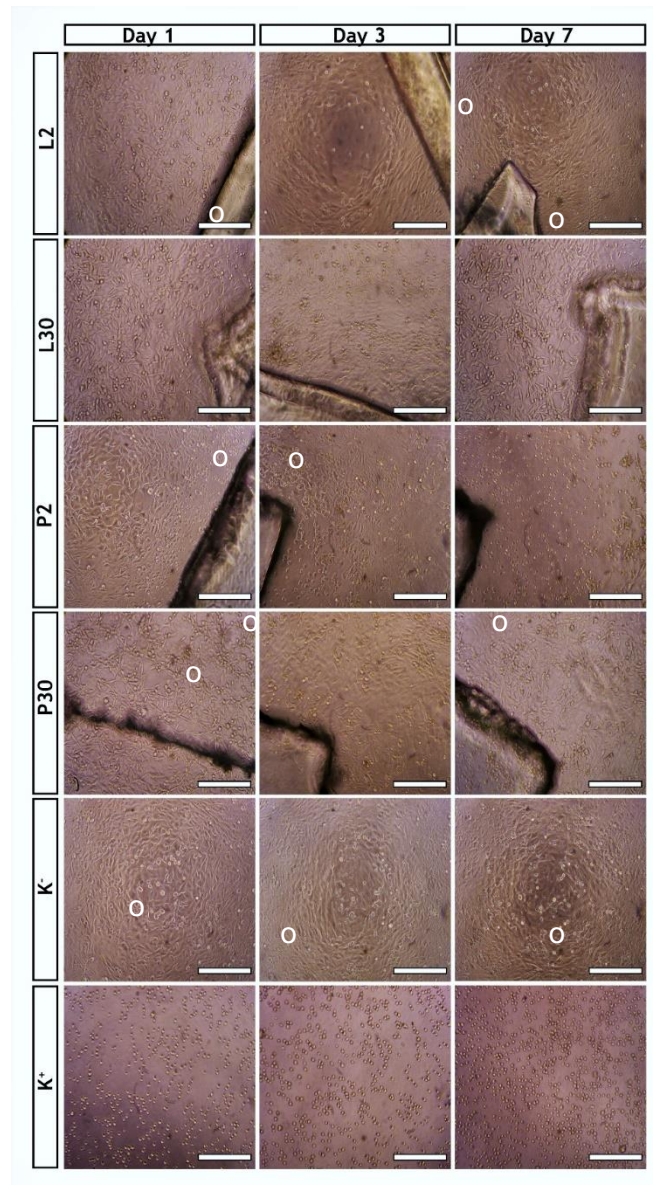


Figura F.1. - Fotografias microscópicas das células de fibroblastos humanos na presença dos adesivos (o), por períodos de incubação de 1, 3 e 7 dias. Para comparação: controlo positivo (K+), correspondente a células mortas e controlo negativo (K-), correspondente a células vivas

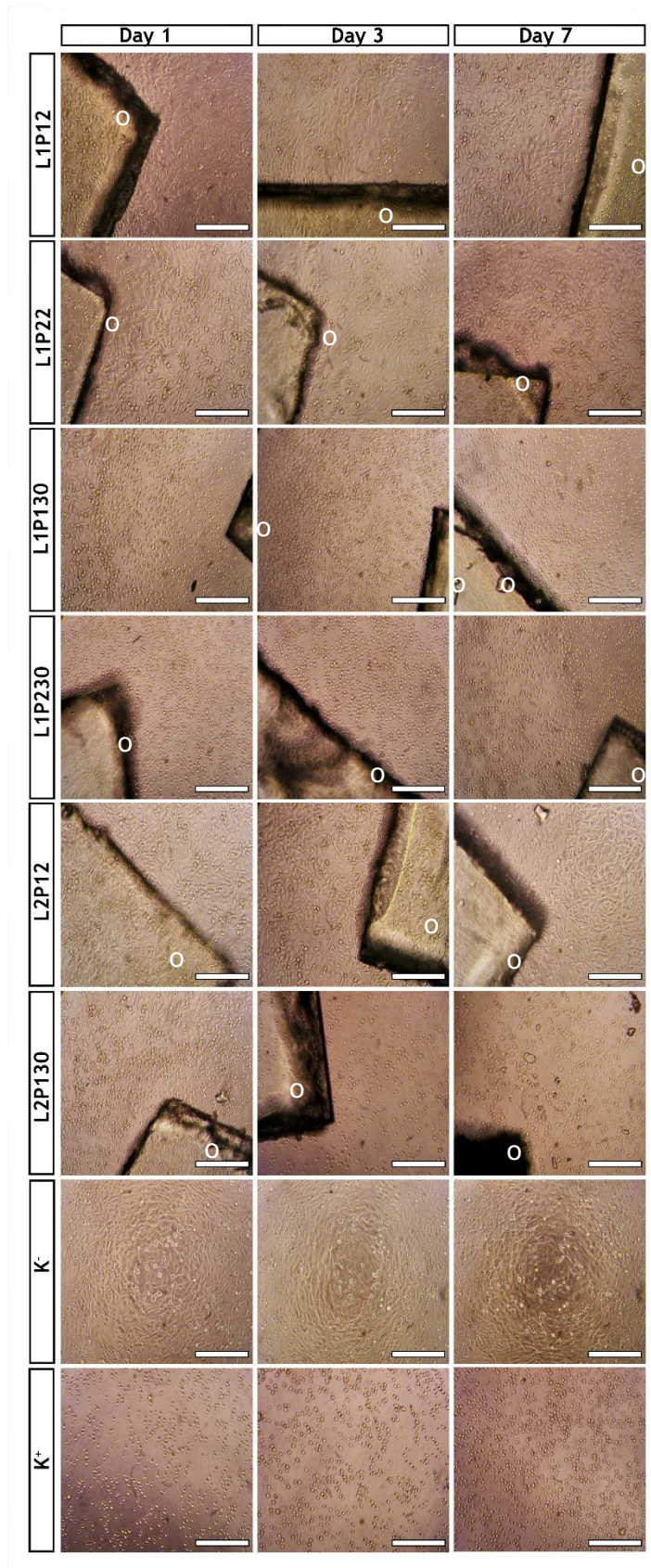


Figura F.2 - Fotografias microscópicas das células de fibroblastos humanos na presença dos adesivos (o), por períodos de incubação de 1, 3 e 7 dias. Para comparação: controle positivo (K+), correspondente a células mortas e controle negativo (K-), correspondente a células vivas