

João Miguel Carrageta dos Santos

PREPARAÇÃO DE BIOADESIVOS A PARTIR DE ÁCIDO LÁTICO

Dissertação de Mestrado Integrado em Engenharia Química, especialização em Biosistemas, apresentada ao Departamento de Engenharia Química da Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade de Coimbra.

Supervisores:

Professora Doutora Cristina Maria dos Santos Gaudêncio Baptista

Instituições:

Departamento de Engenharia Química

Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade de Coimbra

Coimbra, 2014



UNIVERSIDADE DE COIMBRA

(Re)comecei...assim que pude, sem angústias mas com pressa. Os passos que dei, neste caminho duro do futuro, dei-os em liberdade. Não descansei enquanto não alcancei. Da síntese de materiais, não quis apenas metade. E, nunca saciado, fui sempre transformando as dificuldades em ilusões, sempre a sonhar e vendo, acordado, o sucesso da aventura.

Fui homem, não me esqueci, só foi minha a loucura. Onde, com lucidez, me reconheci!

(Santos, 2014)

inspirado em Miguel Torga

Para ti, Maria.

AGRADECIMENTOS

Um caminho poderá ser traçado sozinho, mas se formos acompanhados, chegamos mais longe. Por muitos que sejam os agradecimentos nunca conseguirei expressar o sincero reconhecimento por todos os que, direta ou indiretamente, me ajudaram na realização deste trabalho.

Quero começar por agradecer à Professora Doutora Cristina Gaudêncio, minha orientadora, por me ter dado a oportunidade de trabalhar neste projeto, por ter confiado em mim e nas minhas ideias, pela orientação que sempre me proporcionou, pelos meios que disponibilizou para que conseguíssemos chegar aos fins pretendidos, pelos conselhos e palavras de coragem, pela sua experiência e conhecimento, por toda a paciência e disponibilidade demonstrada ao longo destes meses, otimismo e amizade. Quero também deixar o meu agradecimento à Doutora Dina Marques, criadora deste projeto, com quem tive o privilégio de contactar na fase inicial do trabalho. Os seus conselhos e a disponibilidade que sempre demonstrou foram essenciais no decorrer do projeto. Quero também deixar o meu apreço ao Dr. Filipe Aguiar por ter tornado este projeto possível e pelas suas ideias que foram sempre bem-vindas.

Quero fazer um agradecimento especial à Doutora Paula Ferreira, por toda a formação que me deu em laboratório, pela ajuda incansável e inteira disponibilidade, pela partilha de ideias, por todos os conhecimentos que me transmitiu, por ter contribuído para este trabalho como se fosse seu. A sua experiência em bioadesivos foi extremamente importante na concretização deste projeto. Obrigado pelas palavras amigas, pela amizade, simpatia, força e otimismo que sempre me incutiu. Obrigado por todo o tempo que dispensou para me ajudar nos ensaios de síntese e caracterização dos materiais. Quero também agradecer à Professora Doutora Helena Gil pela simpatia com que sempre me recebeu, por toda a experiência que me transmitiu, pelos seus conselhos e entusiasmo, por me incutir o espírito de inovar e querer sempre melhorar enquanto aluno. Agradeço ainda à Doutora Patrícia Alves, pela simpatia, pela ajuda incansável na realização dos testes de hemocompatibilidade, pela partilha dos protocolos e por todos os conselhos que me prestou. À Doutora Patrícia Coimbra que me ajudou sempre que foi preciso e pelos seus conselhos. Agradeço também à Doutora Maria João pela paciência e por todo o esforço e trabalho realizado nas análises de TGA e DSC. Quero ainda deixar uma palavra de apreço ao Doutor Jorge Coelho e à Engenheira Cátia Costa pela realização das análises de DMTA, por todos os conselhos prestados e pela ajuda e disponibilidade que sempre demonstraram. Agradeço ainda à Doutora Mara Braga, ao Doutor Hermínio Sousa e a toda a equipa de investigação na área de Engenharia de Tecidos pela disponibilidade que sempre manifestaram. A equipa de investigação de polímeros é igualmente agradecida.

Quero agradecer ao Doutor Fernando Cruz pelas ideias e conhecimentos que me transmitiu. Ao Doutor Tiago Correia, que sob a supervisão do Doutor Ilídio Correia, realizou os testes de biocompatibilidade na Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade da Beira Interior e disponibilizou os protocolos executados na realização dos estudos. Aos Engenheiros Valente de Almeida e Filipe Ferreira pela concretização dos ensaios de tração no CTCV. Ao Engenheiro António Fonseca pela imagens SEM que foram obtidas no IPN. Um agradecimento especial ao Departamento de Engenharia Química, na pessoa do Professor Doutor Jorge Rocha, por todos os meios que são disponibilizados aos profissionais e alunos para que executem os seus trabalhos, pela preocupação com a segurança e bem-estar de todos os que pretendem dar o seu contributo na investigação.

Quero ainda agradecer a todos os colegas que partilharam comigo o laboratório, pelo espírito de equipa e bom ambiente, por toda a ajuda e incentivo demonstrados. Agradeço assim à Engenheira Paula Egas, Eva Domingues, Ana Sousa, Carolina Pinheiro e Ana Leonor. Um agradecimento especial para o David Ribeiro por todo o apoio facultado na síntese dos materiais e nos estudos de caracterização, pela troca de ideias e conhecimentos. Agradeço também ao Sr. Amado, Sr. José e D. Dulce por todo o apoio que sempre me disponibilizaram em laboratório, pela paciência e ajuda incansável. À Sandra por todo o apoio, amizade e paciência.

A todos os meus amigos que me acompanharam ao longo do curso e deste projeto. Sem eles nada teria sido possível. Em especial o meu grande obrigado ao Fábio Branco, André Gonçalves, Rui Churro, José Lobo, Teresa Marques, Marco Ferreira, Rafael Monteiro pelo apoio, por acreditarem em mim, pela grande amizade, pessoas com quem sempre poderei contar. À Rita Vaz pelo apoio fundamental, por toda a paciência, pelas minhas ausências, por acreditar em mim ao longo de todo o percurso, sempre com palavras de encorajamento.

Finalmente quero agradecer à minha mãe, que permitiu que eu tivesse tudo o que tenho hoje e que fez de mim quem sou. A sua exigência pautou pela frase “Hoje em dia não basta ser bom, tens que ser muito bom”. Obrigado por tudo, por toda a ajuda, pelo apoio fundamental e incansável, por quererem sempre o melhor, pelo sentimento incondicional que nos une e por viveres para mim e por mim. Nunca conseguirei retribuir em palavras ou atos o meu agradecimento. Obrigado ao meu pai por acreditar sempre em mim, por todos os conselhos, pela preocupação e incentivo, por tudo o que me consegue dar à distância. À minha avó, aos meus tios e primos pelas suas palavras de força, pelos sorrisos e por quererem sempre o melhor para mim. Maria, minha avó, que teria o maior orgulho em ver-me a concretizar esta etapa.

A todos, o meu sincero obrigado,

João Miguel Carrageta dos Santos

RESUMO

Bioadesivos apresentam-se como ferramentas de valor indubitável no tratamento e regeneração de tecidos orgânicos lesados. Ao longo dos anos, têm vindo a revolucionar em cirurgia, procurando ser úteis em processos de cicatrização de feridas incisais. Como principais vantagens destaca-se a redução do trauma sobre os tecidos e a rapidez e o maior conforto na aplicação. Terminado o tratamento, e dependendo da sua biodegradabilidade, poderão soltar-se ou ser absorvidos pelo organismo. Existem no mercado alguns adesivos aprovados pela FDA de origem sintética ou natural para diferentes aplicações clínicas, contudo as suas limitações restringem a utilização por parte dos profissionais. A toxicidade de alguns subprodutos e o fraco desempenho mecânico comprometem a eficácia dos tratamentos, sendo imprescindível a investigação e o desenvolvimento de novos adesivos que sejam biocompatíveis e bioabsorvíveis. Polímeros biodegradáveis, sintéticos ou naturais, com grupos terminais fotoreticuláveis têm demonstrado ser promissores e úteis em aplicações *in situ*. Um dos polímeros mais usados na área biomédica explorado na preparação de suturas cirúrgicas, *scaffolds* e sistemas de libertação controlada de fármaco é o poli(ácido láctico) (PLA). Recentemente foi avaliada a potencialidade deste polímero na produção de bioadesivos para aplicações biomédicas, partindo de PLA de baixo peso molecular funcionalizado com ligações de carbono duplas pelos monómeros anidrido metacrílico (MAA) e metacrilato de 2-isocianoetilo (IEMA). Após adição de um fotoiniciador biocompatível (Irgacure® 2959), a fotoreticulação permitiu a produção de filmes flexíveis e uniformes considerados promissores em contexto clínico.

Nesta dissertação pretendeu-se explorar a síntese desses adesivos com base nos protocolos experimentais, complementando a sua caracterização com particular relevância para a viabilidade de utilização em cirurgia. Além destes métodos de funcionalização, foram testados novos monómeros na modificação do PLA, com o objetivo de ampliar a gama de bioadesivos. O Laromer® LR 9000 (LAR) e o 3-isopropenil- α , α -dimetilbenzil isocianato (TMI) (ambos da família dos isocianatos) foram as moléculas escolhidas. Na modificação do PLA com o monómero LAR foram testadas duas proporções estequiométricas, sendo a de 1:1 a mais promissora. Todos os pré-polímeros sintetizados deram origem a filmes de aspeto homogéneo com tempos de reticulação iguais ou inferiores a 2 minutos, excetuando o caso do TMI que foi afastado do estudo por só ter reticulado termicamente. A análise ATR-FTIR permitiu acompanhar o sucesso das reações de funcionalização e fotoreticulação. Para os materiais sintetizados foram avaliadas propriedades químicas, físicas, térmicas, mecânicas e biológicas.

Os resultados obtidos indicam que todos os adesivos produzidos apresentaram uma capacidade de absorção de água moderada, dependente do pH do meio, do monómero funcional utilizado e do grau de reticulação das matrizes. A técnica SEM permitiu verificar que os materiais apresentavam estruturas coesas, uniformes e compactas. Para o adesivo de PLA modificado com LAR na proporção de 1:1 (PLA-LAR1:1), a variação do tempo de irradiação UV conduziu a um aumento na porosidade do material. A análise TGA mostrou que os materiais são termicamente mais estáveis após fotoreticulação, com estabilidade à temperatura fisiológica e exibindo temperaturas de degradação de 205 a 251°C. A técnica DSC permitiu verificar que a temperatura de transição vítrea de todos os pré-polímeros no estado líquido é negativa, logo favorável ao processo de fotopolimerização, sendo superior nos polímeros reticulados. A técnica DMTA permitiu também identificar as transições térmicas nestes materiais. Todos os adesivos demonstraram ser hidroliticamente instáveis quando incubados em PBS, em função do estado de

reticulação das matrizes, do monómero funcional utilizado e da capacidade de absorção de água. Esta instabilidade permitiu concluir que os materiais são biodegradáveis, com potencial de absorção pelo organismo. Nos estudos de adesão *in vitro* verificou-se que todos os polímeros aderiram eficazmente ao substrato, com exceção de um produto. A energia de superfície de todos estes bioadesivos é inferior às das superfícies alvo (pele e sangue), o que permitiu concluir que serão capazes de aderir quando implantados no organismo. Nos ensaios de hemólise registou-se um carácter hemolítico, pelo que se sugere a realização de novos testes. Todavia os materiais apresentaram um carácter trombogénico, extremamente útil no processo de coagulação e cicatrização tecidual. Os estudos de viabilidade celular permitiram finalmente concluir que o melhor produto foi o PLA-LAR1:1, com valores de viabilidade celular acima de 85% nos tempos de incubação mais longos, pelo que se considerou biocompatível. O estudo da adesão bacteriana revelou que a maioria dos materiais apresentou características bactericidas, úteis na minimização de infeções.

Face os resultados pode-se concluir que os adesivos de PLA sintetizados apresentam características promissoras para utilização em cirurgia. Em alguns casos serão necessários novos testes de caracterização biológica para confirmar a biocompatibilidade. De entre todos, o PLA-LAR1:1 teve o melhor desempenho em todas as propriedades avaliadas, considerando-se extremamente promissor para as aplicações pretendidas. O Laromer® LR 9000, que até ao momento nunca esteve associado à área médica, poderá vir a ter um futuro muito promissor em diferentes contextos clínicos quando associado ao PLA ou a outros biopolímeros.

PALAVRAS-CHAVE: Bioadesivos, poli (ácido láctico), fotoreticulação, Laromer® LR 9000, biodegradabilidade, biocompatibilidade, cirurgia, cicatrização.

ÍNDICE

	Pág.
OBJETIVOS E ESTRUTURA DA TESE	1
CAPÍTULO 1	
1. INTRODUÇÃO	3
1.1. Biomateriais	3
1.1.1. Biocompatibilidade e Hemocompatibilidade	4
1.2. Polímeros Biodegradáveis	4
1.2.1. Poliésteres alifáticos	6
1.3. Fotoreticulação	7
1.4. Aplicações Biomédicas de polímeros fotoreticuláveis	9
1.4.1. Bioadesivos – Aplicações cirúrgicas	9
1.4.2. Sistemas de libertação controlada de fármaco	12
1.4.3. Engenharia de Tecidos	12
1.5. Poli (Ácido Lático) (PLA) – Breve Introdução	14
1.5.1. Ácido Lático – A matéria-prima	15
1.5.2. Produtores, Mercado e Aplicações do PLA	17
1.5.3. Vantagens, limitações, características e propriedades do PLA	18
1.5.4. Síntese e Modificação do PLA	20
1.6. Aplicações do PLA na área biomédica	22
CAPÍTULO 2	
2. ESTRATÉGIAS E METODOLOGIAS	27
2.1. Introdução	27
2.2. Trabalho desenvolvido: descrição detalhada do processo	27
2.3. Metodologia Experimental	30
2.3.1. Reprodução da síntese e caracterização dos adesivos de base ácido lático	30
2.3.2. Seleção de monómeros funcionais, produção e caracterização de novos adesivos de base ácido lático	31
CAPÍTULO 3	
3. MATERIAIS E MÉTODOS	33
3.1. Materiais	33
3.2. Síntese	33
3.2.1. Síntese do pré-polímero de base ácido lático	33
3.2.2. Funcionalização do pré-polímero	34
3.2.2.1. Modificação com Anidrido Metacrílico (MAA)	34
3.2.2.2. Modificação com Metacrilato de 2-Isocianoetilo (IEMA)	35

3.2.2.3.	Modificação com Laromer® LR 9000 (LAR)	35
3.2.2.4.	Modificação com 3-isopropenil- α , α -dimetilbenzil isocianato (TMI)	37
3.2.3.	Reticulação fotoquímica dos polímeros funcionalizados	37
3.3.	Caracterização	38
3.3.1.	Espetroscopia de infravermelho com reflexão total atenuada (ATR-FTIR)	38
3.3.2.	Teor de gel (<i>gel content</i>)	39
3.3.3.	Avaliação da capacidade de absorção de água (<i>Swelling</i>)	39
3.3.4.	Microscopia eletrônica de varrimento (SEM)	39
3.3.5.	Propriedades Térmicas – TGA, DSC, DMTA	40
3.3.6.	Degradação hidrolítica em solução PBS	41
3.3.7.	Testes de adesão em folhas de gelatina	42
3.3.8.	Determinação das energias de superfície por medição de ângulos de contacto	42
3.3.9.	Hemocompatibilidade	43
3.3.9.1.	Determinação do índice hemolítico	43
3.3.9.2.	Avaliação da trombogenicidade	44
3.3.10.	Biocompatibilidade	45
3.3.10.1.	Materiais	45
3.3.10.2.	Avaliação da biocompatibilidade	45
3.3.10.2.1.	Cultura celular de fibroblastos humanos na presença dos filmes	45
3.3.10.2.2.	Estudo da viabilidade celular na presença dos filmes de PLA	46
3.3.10.2.3.	Microscopia eletrônica de varrimento (SEM) das amostras	46
3.3.10.3.	Estudo da atividade antibacteriana dos filmes de PLA	46

CAPÍTULO 4

4.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	47
4.1.	Preparação dos Bioadesivos	47
4.1.1.	Síntese dos pré-polímeros modificados e reticulação fotoquímica	47
4.1.2.	Esquemas Reacionais da modificação e fotoreticulação do PLA	50
4.1.3.	Caracterização por ATR-FTIR	53
4.2.	Avaliação de propriedades dos adesivos e pré-polímeros	56
4.2.1.	Teor de gel e capacidade de absorção de água	56
4.2.2.	Microscopia eletrônica de varrimento (SEM)	60
4.2.3.	Propriedades térmicas	62
4.2.3.1.	Análise Termogravimétrica (TGA)	62
4.2.3.2.	Análise por calorimetria diferencial de varrimento (DSC) e análise térmica dinâmico-mecânica (DMTA)	66
4.2.4.	Degradação hidrolítica em solução PBS	69
4.2.5.	Adesão aos substratos	73

4.2.5.1.	Testes de adesão em folhas de gelatina	73
4.2.5.2.	Energias de superfície por medição de ângulos de contacto	75
4.2.6.	Hemocompatibilidade	76
4.2.6.1.	Determinação do índice hemolítico	77
4.2.6.2.	Avaliação da trombogenicidade	79
4.2.7.	Biocompatibilidade	80
4.2.7.1.	Estudo da viabilidade celular	81
4.2.7.2.	Estudo da atividade antibacteriana	84
4.3.	Resumo das propriedades dos adesivos	86
CAPÍTULO 5		
5.	CONCLUSÕES	87
5.1.	Conclusão geral	87
5.2.	Principais contribuições	90
5.3.	Perspetivas futuras	90
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS		
ANEXOS		
<i>Anexo A</i>	<i>– Classificação dos Biomateriais e dos Polímeros Biodegradáveis</i>	101
<i>Anexo B</i>	<i>– Degradação hidrolítica e Erosão</i>	103
<i>Anexo C</i>	<i>– Aplicações biomédicas de polímeros biodegradáveis</i>	106
<i>Anexo D</i>	<i>– Aplicações de polímeros biodegradáveis em diversas áreas</i>	106
<i>Anexo E</i>	<i>– Adesivos comercializados à base de cianoacrilatos, fibrina, colagénio e albumina</i>	107
<i>Anexo F</i>	<i>– Propriedades físico-químicas do Ácido Lático</i>	108
<i>Anexo G</i>	<i>– Fornecedores globais de PLA</i>	108
<i>Anexo H</i>	<i>– Propriedades físicas e químicas do poli (ácido lático) (PLA)</i>	109
<i>Anexo I</i>	<i>– Síntese e Modificação de PLA</i>	109
<i>Anexo J</i>	<i>– Seleção de novos monómeros funcionais</i>	111
<i>Anexo K</i>	<i>– Propriedades e Estruturas químicas dos principais reagentes utilizados</i>	112
<i>Anexo L</i>	<i>– Processo de produção, montagem experimental, condições de operação e fatores em consideração</i>	115
<i>Anexo M</i>	<i>– Protocolos dos Ensaios de Hemocompatibilidade</i>	119
<i>Anexo N</i>	<i>– Espectros de ATR-FTIR de reagentes utilizados</i>	124
<i>Anexo O</i>	<i>– Propriedades térmicas (DSC e DMTA)</i>	126
<i>Anexo P</i>	<i>– Degradação hidrolítica em solução PBS</i>	128
<i>Anexo Q</i>	<i>– Teste de adesão em folhas de gelatina (ensaio de tração)</i>	129

ÍNDICE DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1.1 Estruturas químicas dos poliésteres sintéticos mais comuns: PGA, PLA, PLGA e PCL, respetivamente (adaptado de [21]).	6
Figura 1.2 Representação esquemática do processo de reticulação fotoquímica (por irradiação de luz UV) obtendo-se uma matriz polimérica tridimensional (baseado em [24]).	8
Figura 1.3 Perfis de concentração de fármaco no plasma sanguíneo para dois tipos de sistema de libertação de fármaco: convencional e controlado, respetivamente (adaptado de [21]).	12
Figura 1.4 Bioadesivo em Engenharia de Tecidos – aplicação de um adesivo de base quitosano modificado, promovendo a adesão e integração entre o hidrogel utilizado como biomaterial e o tecido nativo (em [30]).	13
Figura 1.5 Estrutura química do PLA (adaptado de [1]).	14
Figura 1.6 Estrutura dos dois isómeros do ácido láctico L(+) e D(-), respetivamente (adaptado de [47]).	15
Figura 1.7 Representação esquemática das duas vias de produção do ácido láctico: a) Síntese química; b) Fermentação microbiana (adaptado de [50]).	16
Figura 1.8 Diferentes vias de síntese de PLA (adaptado de [36, 37]).	20
Figura 2.1 Mecanismo geral da reação de policondensação direta do ácido láctico: estratégia de produção sem catalisadores [12] (representação esquemática da reação em [40]).	28
Figura 2.2 Mecanismo geral da reação de um grupo isocianato com um grupo hidroxilo, formando-se uma ligação uretana [4].	29
Figura 2.3 Exemplo de um processo de fotopolimerização (adaptado de [73]).	30
Figura 2.4 Estruturas químicas dos novos monómeros funcionais: a) LAR; b) TMI.	32
Figura 3.1 Representação esquemática da reação de síntese de PLA de estrutura linear, por policondensação do ácido láctico.	34
Figura 3.2 Representação esquemática da reação de funcionalização do PLA com MAA.	34
Figura 3.3 Representação esquemática da reação de funcionalização do PLA com IEMA.	35
Figura 3.4 Representação esquemática da reação de funcionalização do PLA com LAR: 1) Adição de 2 moles de PLA por cada 1 mol de LAR; 2) Adição de 1 mol de PLA por cada 1 mol de LAR.	36
Figura 3.5 Representação esquemática da reação de funcionalização do PLA com TMI.	37
Figura 4.1 Aparência visual dos bioadesivos produzidos após fotoreticulação das soluções líquidas, por um tempo de exposição UV de 2 minutos: a) PLA-MAA; b) PLA-IEMA; c) PLA-LAR2:1 e d) PLA-LAR1:1A.	50

Figura 4.2	Metodologia de síntese dos bioadesivos PLA-MAA e PLA-IEMA – Esquemas reacionais da modificação do PLA: a) com MAA e b) com IEMA e subsequente irradiação UV originando matrizes reticuladas.	51
Figura 4.3	Metodologia de síntese dos bioadesivos PLA-LAR2:1 e PLA-LAR1:1 – Esquemas reacionais da modificação do PLA: com a) LAR (2:1); com b) LAR (1:1) e subsequente irradiação UV originando matrizes reticuladas. Demonstração da reticulação térmica do PLA-TMI0, c) .	52
Figura 4.4	Espectro de ATR-FTIR do Ácido láctico L(+) e do PLA sintetizado.	53
Figura 4.5	Espectros de ATR-FTIR do PLA e PLA modificado por IEMA, MAA, LAR e TMI.	54
Figura 4.6	Espectros de ATR-FTIR das membranas formadas após adição de 6% de Ir 2959 e fotoreticulação por um período de exposição a UV de 2 minutos (exceto para os produtos PLA-LAR1:1B e PLA-LAR1:1C).	55
Figura 4.7	Valores de capacidade de absorção de água (%) para os adesivos sintetizados – imersão em água destilada (pH 7,0) e em solução PBS (pH=7,4) . Tempo de incubação: 6h . Temperatura: 37°C .	57
Figura 4.8	Fotografias de SEM (ampliação de 5000×) da secção transversal dos adesivos PLA-IEMA, PLA-MAA e PLA-LAR2:1, respetivamente (espessura de 1mm; 2 min de irradiação UV).	60
Figura 4.9	Fotografias de SEM (ampliação de 5000×): a) da superfície e b) secção transversal dos adesivos PLA-LAR1:1A, PLA-LAR1:1B e PLA-LAR1:1C, respetivamente (espessura de 1mm). Avaliação do efeito do tempo de irradiação UV.	61
Figura 4.10	Perfil de degradação térmica do pré-polímero sintetizado (PLA), $M_w = 500 \text{ g.mol}^{-1}$, obtido por análise termogravimétrica (rampa de aquecimento de $10^\circ\text{C min}^{-1}$).	63
Figura 4.11	Traços termogravimétricos obtidos para os pré-polímeros modificados com 6% de Ir 2959 no estado líquido (---) e após 2 minutos de irradiação UV (——), com rampa de aquecimento de $10^\circ\text{C min}^{-1}$.	63
Figura 4.12	Traços termogravimétricos obtidos para os adesivos PLA-LAR1:1A, B ou C, com rampa de aquecimento de $10^\circ\text{C min}^{-1}$. Avaliação do efeito do tempo de irradiação UV na estabilidade térmica dos materiais.	65
Figura 4.13	Traços de $\tan \delta$ em função da temperatura (à frequência de 1 Hz) para os adesivos PLA-LAR2:1 e PLA-LAR1:1A. Avaliação do efeito de diferentes proporções de LAR na modificação do PLA.	68
Figura 4.14	Traços de $\tan \delta$ em função da temperatura (à frequência de 1 Hz) para os adesivos PLA-LAR1:1A, B e C. Avaliação do efeito do tempo de irradiação UV.	68
Figura 4.15	Perda de massa dos adesivos PLA-MAA, PLA-IEMA, PLA-LAR2:1 e PLA-LAR1:1A, 1mm, por hidrólise em solução PBS, a 37°C , durante 6 semanas.	69

Figura 4.16	Fotografias de SEM (ampliação de 5000×) para os adesivos resultantes de um tempo de irradiação UV de 2 minutos assim que sintetizados e após 6 semanas de degradação (PLA-MAA e PLA-IEMA) e 72 horas de degradação (PLA-LAR2:1 e PLA-LAR1:1A).	72
Figura 4.17	Valores de força máxima registados para cada amostra (testes realizados à temperatura ambiente, velocidade de afastamento de 5mm min ⁻¹).	74
Figura 4.18	Valores de índice hemolítico obtidos para os adesivos PLA-IEMA, PLA-LAR2:1 e PLA-LAR1:1 por contacto indireto e para as soluções de extração (PBS) de cada material.	78
Figura 4.19	Formação dos coágulos nas superfícies das membranas, após contacto de 40 minutos.	79
Figura 4.20	Valores de massa (%) dos trombos formados na superfície das membranas, após 40 minutos de contacto com o sangue. Valores obtidos representam a média de três amostras; K ⁺ , controlo positivo.	79
Figura 4.21	Avaliação da atividade celular após 24, 48 e 72 horas de contacto com os adesivos de PLA. K ⁻ , controlo negativo; K ⁺ , controlo positivo. Resultados apresentados são a média de três experiências independentes.	81
Figura 4.22	Fotografias de SEM da cultura celular de fibroblastos humanos na presença dos adesivos PLA-LAR1:1 (*) para tempos de incubação de 24, 48 e 72 horas. Controlo positivo (K ⁺) – células mortas; Controlo negativo (K ⁻) – células vivas.	83
Figura 4.23	Halos inibitórios para as estirpes <i>S. aureus</i> e <i>E. coli</i> em contacto com os adesivos.	85
Figura 4.24	Fotografias de SEM das estirpes bacterianas em contacto com os adesivos.	85

ÍNDICE DE TABELAS

	Pág.
Tabela 1.1	Características, propriedades e vantagens/desvantagens da aplicação de bioadesivos em contexto cirúrgico [4, 11, 12, 24, 26, 28 – 31]. 10
Tabela 1.2	Estudos de desenvolvimento de materiais poliméricos fotoreticuláveis (e outros) para produção de adesivos, hidrogéis, <i>scaffolds</i> com aplicação em cirurgia, liberação controlada de fármaco e regeneração/reparação de tecidos [11, 12, 24, 30]. 13
Tabela 1.3	Vantagens e desvantagens do PLA e motivações da sua exploração/utilização em aplicações clínicas e outras [36, 39 – 41, 44, 45]. 18
Tabela 1.4	Estudos e aplicações do PLA e seus copolímeros em contexto clínico [12, 36, 40, 58]. 23
Tabela 4.1	Formulações de PLA e PLA modificado, peso molecular, estado físico e aparência visual dos materiais. 49
Tabela 4.2	Resumo das condições de produção, tempos de reticulação testados, estado de cura e aparência visual dos bioadesivos produzidos. 49
Tabela 4.3	Valores de <i>gel content</i> e capacidade de absorção de água (<i>swelling</i>) para adesivos de 1mm. 59
Tabela 4.4	Temperaturas de degradação dos materiais sintetizados: PLA, PLA modificado e PLA reticulado [116]. 64
Tabela 4.5	Temperaturas de transição vítrea dos materiais sintetizados, determinadas por DSC e DMTA. 67
Tabela 4.6	Valores de energia de superfície e correspondentes componentes dispersivas e polares para os adesivos de PLA sintetizados, gelatina, pele e sangue. 76
Tabela 4.7	Resumo das propriedades avaliadas no estudo – comparação do desempenho dos bioadesivos. 86

LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

Símbolos/Abreviaturas	Definição
ΔH_m	Entalpia de fusão (KJ/mol)
C_p	Capacidade Calorífica (J/K)
E'	Módulo de armazenamento (Pa)
E''	Módulo de perda (Pa)
g	Energia de superfície (mN/m)
$m_{s,0}$	Massa seca inicial (g)
$m_{s,t}$	Massa seca ao fim do tempo t (g)
θ	Ângulo de contacto (°)
R_i	Taxa de iniciação
R_p	Taxa de polimerização
R_t	Taxa de terminação
T_c	Temperatura de Cristalização (°C)
T_d	Temperatura de degradação (°C)
T_g	Temperatura de transição vítrea (°C)
T_m	Temperatura de fusão (°C)
W_h	Peso hidratado (g)
W_s	Peso seco (g)
γ_s^P	Componente polar da energia de superfície (mN/m)
γ_s^D	Componente dispersiva da energia de superfície (mN/m)
$T^{95\%}$	Temperatura de perda de massa de 5%
$T^{90\%}$	Temperatura de perda de massa de 10%
$T^{50\%}$	Temperatura de perda de massa de 50%
5-FU	<i>5-fluorouracil</i>
AL	Ácido láctico
AMPS	Metilbenzenossulfónico 1-propano 2-acrilamido
ASTM	<i>American Society for Testing and Materials</i>
ATR-FTIR	Espectroscopia de infravermelho com reflexão total atenuada por transformada de <i>Fourier</i>
BD	1,4-Butanodiol
CIEPQPF	Centro de Investigação em Engenharia dos Processos Químicos e Produtos da Floresta
CQ	<i>Camphorquinone</i>
CS	Quitosano
DDLA	<i>D,L-Lactide</i>
DDS	<i>drug delivery systems</i> (libertação controlada de fármaco)
DMEM-F12	Meio Eagle modificado por <i>Dulbecco</i>
DMPT	<i>N,Ndimethyl-p-toluidine</i>
DMTA	Análise térmica dinâmico-mecânica
DNA	Ácido desoxirribonucleico

DO	Densidade ótica
DSC	Análise por calorimetria diferencial de varrimento
DTG	Primeira derivada da curva TGA
ED	Éter dietílico
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
FAME	<i>Fumaric acid monoethyl ester</i>
FBS	<i>Fetal bovine serum</i> (soro fetal de bovino)
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
GA	Acrilato de glicidilo
GRAS	<i>Generally recognized as safe</i>
GRF	Gelatina reticulada com resorcinol-formaldeído
Hb	Hemoglobina
hFib	Células de fibroblastos humanos
IBU	Ibuprofeno
IEMA	Metacrilato de 2-isocianoetilo
Ir 2959	Irgacure® 2959
ISO	<i>International Organization for Standardization</i>
IV	Infravermelho
LAB	Bactérias ácido-láticas
LAR	Laromer® LR 9000
MAA	Anidrido Metacrílico
mPET	Pentaeritritol
MTS	<i>3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium</i>
NHDF	<i>Normal human dermal fibroblasts adult</i>
NVP	N-vinil pirrolidona
OH	Grupo hidroxilo
PBO	Peróxido de benzoílo
PBS	<i>Phosphate Buffer Solution</i>
PBSs	Poli (butileno succinato)
PCL	Policaprolactona
PDLA	Poli (ácido láctico-D)
PDLLA	Poli (ácido láctico-D,L)
PDLLA-PPG	Poli (D,L-ácido láctico-propileno glicol)
PE	Polietileno
PEG	Polietileno glicol
PET	Politereftalato de etileno
PGA	Poli (ácido glicólico)
PHA's	Polihidroxialcanoatos
PLA	Poli (ácido láctico)
PLA-M	Membrana de poli (ácido láctico) resultante da modificação com o monómero M
PLA-M0	Pré-polímero modificado a partir do monómero funcional M, antes da etapa de solubilização do fotoiniciador
PLGA	Poli (ácido láctico-co-glicólico)

PLLA	Poli (ácido láctico-L)
PS	Poliestireno
PSD	Poli (sulfadimetoxina metacrilófilo)
RNA	Ácido ribonucleico
ROP	<i>Ring Opening Polymerization</i> (Polimerização por Abertura de Anel)
SEM	Microscopia Eletrónica de Varrimento
TA	<i>Thermal Analysis</i>
TAT	<i>Trans-Activator of Transcription</i>
TGA	Análise termogravimétrica
THF	Tetraidrofurano
TMC	Carbonato de trimetileno
TMI	3 - isopropenil - α , α -dimetilbenzil isocianato
UBI	Universidade da Beira Interior
UV	Radiação ultravioleta

OBJETIVOS E ESTRUTURA DA TESE

Nas últimas décadas, o desenvolvimento de novos materiais nas áreas médico-farmacêuticas tem contribuído significativamente para a melhoria de técnicas e práticas de saúde, enquadradas num mundo onde é cada vez mais pertinente a exploração de soluções práticas, simples, confortáveis, e económica e ambientalmente benéficas [1 – 5]. Atualmente são muitos os estudos de investigação com diferentes materiais, para que estes possam ser usados nas mais diversas formas: em aplicações descartáveis (como por exemplo seringas, cateteres, bolsas de sangue, etc.), produtos de suporte em técnicas cirúrgicas (fios de sutura, vedantes e adesivos), implantes ou próteses para substituição e/ou regeneração de tecidos (produção de implantes dentários, substituição de cartilagens, lentes intraoculares, etc.) e ainda no desenvolvimento de órgãos artificiais de ação temporal ou permanente [2, 6].

Os polímeros, biodegradáveis e não-biodegradáveis, têm recebido particular atenção por parte de investigadores, sobretudo nas áreas de Engenharia de Tecidos, dadas as suas excelentes propriedades [1, 7]. Hoje em dia, com os avanços existentes nesta área, muitos materiais são utilizados de forma que anteriormente não era possível [2]. Vários são os conceitos que interessa referir e ter em conta no que diz respeito à utilização de biomateriais nos organismos vivos, nomeadamente: biocompatibilidade, hemocompatibilidade, propriedades químicas, físicas e mecânicas adequadas, esterilização, eficácia, baixo peso, tecnologia de fabrico e custo razoável [2, 3, 6]. Os polímeros biodegradáveis (naturais ou sintéticos) são de particular importância neste âmbito, uma vez que da sua degradação podem resultar produtos não tóxicos para o organismo, quando terminada a sua função. Para além disso são facilmente processáveis, adaptando-se as propriedades a uma determinada aplicação [4, 6]. De entre os polímeros biodegradáveis sintéticos, uma família importante e alvo de estudo dada a diversidade e versatilidade é a dos poliésteres [8, 9]. No que diz respeito ao modo de preparação, a reticulação fotoquímica demonstra ser eficaz e fiável, com potenciais aplicações em cirurgia, libertação controlada de fármaco e Engenharia de Tecidos [10, 11].

Materiais poliméricos fotoreticuláveis têm sido bastante explorados como adesivos cirúrgicos nos últimos quinze anos, a fim de ultrapassar os problemas com os adesivos existentes no mercado, nomeadamente: libertação de subprodutos tóxicos, inflamação e irritação dos tecidos, risco de transmissão de doenças sanguíneas e/ou infecciosas, propriedades mecânicas limitadas, degradação lenta no organismo, duração de aplicação e preço elevado. Polímeros naturais (como o quitosano ou a agarose) e poliésteres como a policaprolactona (PCL) demonstraram ser promissores [4, 11]. Contudo, o esforço persiste na procura por novos materiais capazes de alcançar as propriedades requeridas, tendo por base a definição de novas estratégias de síntese e a exploração de novas moléculas. O poli (ácido lático) (PLA), considerado o material mais atrativo e promissor no mercado dos biopolímeros, parece a ser um potencial candidato no mercado dos bioadesivos.

Assim, este trabalho pretende explorar novos métodos de preparação de bioadesivos a partir de PLA. O foco principal está em conhecer as suas propriedades e potencialidades, contribuindo com resultados importantes na síntese de materiais poliméricos fotoreticuláveis e na sua aplicabilidade em contexto clínico. As aplicações são diversas e serão reconhecidas e aprofundadas.

O projeto passará pelo estudo, preparação e desenvolvimento de bioadesivos de base ácido lático por fotoreticulação e posterior caracterização, com vista à sua possível utilização na reparação/regeneração de

tecidos orgânicos ou como alternativa de sutura às técnicas convencionais. Também o estudo como possível sistema de libertação controlada de fármaco será alvo de pesquisa e interesse. Os métodos de produção foram inicialmente testados por Marques [12], no âmbito de dissertação de Doutoramento. Sem catalisadores, PLA de baixo peso molecular é obtido por policondensação direta do ácido lático L(+), de seguida funcionalizado com diferentes monómeros e posteriormente reticulado por irradiação da luz UV na presença de um fotoiniciador biocompatível. Solventes de baixa toxicidade são também utilizados, a fim de garantir a não-toxicidade dos materiais. Neste âmbito, pretende-se continuar a explorar a síntese dos adesivos, a fim de caracterizar devidamente os materiais obtidos [12]. Novos métodos de funcionalização (com novos monómeros) serão também testados de modo a alargar a gama de adesivos, bioabsorvíveis e biocompatíveis, a partir do ácido lático.

A Dissertação encontra-se organizada em cinco capítulos principais. No **Capítulo 1** pretende-se fazer um enquadramento teórico sobre o tema, no qual se faz referência aos diversos biomateriais existentes, à importância que os polímeros biodegradáveis têm nesse âmbito, e aos conceitos a estes inerentes. Discute-se ainda a importância da fotoreticulação na produção de polímeros biodegradáveis e na sua aplicação na área médica, convergindo posteriormente para o PLA, onde são abordadas diversas questões: matéria-prima, produtores, mercado e aplicações, propriedades, vantagens/desvantagens, métodos de síntese e modificação (e estudos na área). Finalmente apresentam-se os principais estudos desenvolvidos com o PLA na área médica (revisão do estado de arte), com particular interesse nos mais recentes, apresentando a relevância dos resultados. Possíveis produtos a implementar (ou já implementados) no mercado são também revistos.

No **Capítulo 2** é feito o enquadramento prático do trabalho, apresentando-se a descrição detalhada do processo de produção dos bioadesivos a partir do ácido lático e os elementos tidos em consideração. Partindo do trabalho de síntese já desenvolvido, define-se ainda a metodologia experimental seguida (constituída por uma parte de reprodução de materiais e outra de nova síntese), onde se estabelecem os objetivos práticos a atingir. Foca-se o essencial deste trabalho: exploração de novos monómeros e caracterização de todos os materiais sintetizados.

No **Capítulo 3** começa-se por listar os materiais utilizados e por descrever os métodos de síntese do pré-polímero, sua funcionalização com os diferentes monómeros testados (MAA, IEMA, LAR e TMI) e reticulação fotoquímica dos pré-polímeros modificados com o fotoiniciador Irgacure® 2959. De seguida, apresentam-se os procedimentos experimentais de caracterização e motivações da sua realização: caracterização por ATR-FTIR, avaliação da capacidade de absorção de água, microscopia eletrónica de varrimento (SEM), caracterização térmica (TGA, DSC e DMTA), degradação hidrolítica em solução PBS, adesão *in vitro* em folhas de gelatina, determinação das energias de superfície por medição de ângulos de contacto, testes de biocompatibilidade (avaliação da citotoxicidade e da adesão bacteriana) e testes de hemocompatibilidade (índice hemolítico e trombogenicidade) foram os estudos efetuados, a fim de conhecer os materiais produzidos e a sua potencialidade como adesivos cirúrgicos. No **Capítulo 4** apresentam-se todos os resultados obtidos e a sua discussão de acordo com a aplicação.

No **Capítulo 5** chega-se às conclusões gerais de todo o trabalho experimental. Reflete-se sobre as limitações encontradas, procurando alternativas e soluções para as mesmas. Finalmente, face aos resultados obtidos, apresentam-se algumas recomendações do trabalho a desenvolver e das linhas/estratégias de investigação a seguir no futuro.

CAPÍTULO I

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

I. INTRODUÇÃO

I.1. Biomateriais

A área dos biomateriais resulta do compromisso entre quatro grandes áreas e disciplinas: “as ciências da vida, medicina, ciência dos materiais e engenharia” [7]. Um biomaterial pode ser definido como o material que é sintetizado para substituição de um sistema vivo ou para execução de uma função em contacto íntimo com os tecidos vivos [2]. De forma mais rigorosa, e de encontro com a literatura, é considerado como um produto farmacologicamente inerte, um material não-vivo (de origem sintética ou natural), com intenção de ser utilizado para efeitos médicos (diagnósticos, terapêuticas, aplicações protéticas e de armazenamento) em contacto com os sistemas vivos, ou seja, capaz de interagir de forma benéfica com os sistemas e fluidos biológicos [1, 2, 4].

A utilização de biomateriais como implantes não foi bem-sucedida na sua fase inicial, como resultado da ocorrência de infeções e inflamações [2, 13]. Atualmente, graças aos importantes avanços na Engenharia e na Biotecnologia, são muitas as aplicações em suturas, implantes, próteses, suportes (ou *scaffolds*), adesivos, entre outros, com um valor de mercado global em 2011 na ordem dos 37,6 mil milhões de dólares e com uma perspetiva para 2017 de aproximadamente 83,9 mil milhões de dólares, representando assim um mercado em forte crescimento¹, no qual a procura por novos produtos (mais práticos e eficazes) é recorrente [2, 3, 6]. Os biomateriais, uma vez em contacto com o organismo, deverão apresentar propriedades físicas e biológicas que sejam compatíveis com os tecidos para os quais se destinam, sendo por isso não-tóxicos (biocompatíveis), esterilizáveis e devidamente eficazes na sua função. Estes poderão ser classificados em quatro grandes grupos: metálicos, cerâmicos, poliméricos ou materiais compósitos [1, 4]. A fim de sistematizar as diferentes categorias, apresenta-se no Anexo A, Figura A.1, os diferentes materiais, aplicações e suas vantagens/limitações. A classificação dos biomateriais poderá também ser feita tendo em conta a sua função, podendo assim ser temporários (ajudam na recuperação de uma dada lesão e a sua função e permanência no organismo terminam quando o tratamento é conseguido) ou então podem-se designar de permanentes (substituindo um órgão, um tecido, ou qualquer função no organismo que esteja alterada ou até mesmo ausente) [13].

Os materiais que são utilizados em aplicações clínicas deverão ser diferentes dos restantes materiais comercializados para outros fins, preenchendo um conjunto mínimo de requisitos que interessa aqui destacar. De acordo com a literatura, para que um material possa ser utilizado na área médica e em contacto com o organismo, deverá [1 – 3, 6, 14]: 1) Ser não tóxico, ou seja, não deverá causar infeções e/ou inflamações indesejáveis uma vez implantado no organismo vivo, a não ser que tenha sido produzido com essa função; 2) Ser um material facilmente processável, apresentando propriedades mecânicas e físicas adequadas ao local de aplicação; 3) Tempo de vida útil deverá ser adequado, deverá ser eficaz, tendo um bom desempenho e durabilidade; 4) Deverá ser não-alérgico, não-carcinogénico, biológica e mecanicamente compatível; 5) Se se pretender que seja degradável, deverá ser concebido para que os subprodutos resultantes da sua degradação sejam não tóxicos e não interfiram com o processo de tratamento, e a sua degradação corresponda ao tempo de tratamento; 6) Face à degradação do material no organismo, este deverá ser metabolizado, sendo por isso bioabsorvível.

¹ De acordo com descrição de “*Biomaterials – A Global Market Overview*” – industry-experts.com, consultado a 30 de Maio de 2014.

Para que os materiais preencham estes requisitos, são muitas vezes necessárias modificações ao nível da sua superfície, para que não sejam rejeitados pelo organismo [4]. Um dos principais requisitos mencionados é a biocompatibilidade do material, contudo este conceito, assim como outros, deverão ser clarificados.

1.1.1. Biocompatibilidade e Hemocompatibilidade

A compatibilidade de um material refere-se às interações entre este e os tecidos vivos, dependendo das especificações do mesmo [3]. Na literatura, o conceito de biocompatibilidade não é claro. Poderá ser entendida com base no (in)sucesso e (in)eficácia do material num dado local. A hemocompatibilidade, por sua vez, define-se como a capacidade que um material tem em permanecer em contacto com o sangue, sem que haja alteração dos constituintes do plasma sanguíneo [3, 14]. A biocompatibilidade remete para a ausência de reações adversas por parte não só do sangue, mas também dos outros tecidos [3]. Contudo um material pode não provocar reação adversa num dado tecido, mas ser inflamatório noutra [14, 15].

A biocompatibilidade de um material, como resultado das suas interações com os tecidos, depende não só das propriedades intrínsecas ao mesmo (peso molecular, forma e estrutura do implante, energia de superfície, capacidade de absorção de água e de degradação, hidrofobicidade vs. hidrofiliicidade, etc.), mas também das circunstâncias em que é implantado no organismo, nomeadamente a técnica usada, as condições de assepsia e esterilização e o próprio estado do paciente [1, 3, 13, 15].

Neste trabalho, tendo como objetivo a produção de bioadesivos com possibilidade de aplicação em inúmeros contextos clínicos, é importante deixar claro estes conceitos, identificando-se a pertinência da realização de testes de biocompatibilidade e hemocompatibilidade aos materiais finais obtidos.

Um dos principais problemas de diversos materiais em aplicações médicas é exatamente a reduzida biocompatibilidade, com relevância sobretudo em aplicações permanentes no organismo [6]. Por isso mesmo, entre os biomateriais apresentados na Figura A.1, os que atualmente apresentam maior interesse por parte da investigação são os polímeros, não só graças à sua diversidade, mas também à facilidade em serem modificados e processados de modo a garantir a sua elevada biocompatibilidade. Uma vez que os adesivos produzidos neste trabalho têm por base um polímero sintético biodegradável (o PLA) importa esclarecer também o conceito de biodegradabilidade.

1.2. Polímeros Biodegradáveis

Antes de mais, os polímeros são definidos como macromoléculas constituídas por inúmeras unidades de repetição, ligadas por ligação covalente [16]. Poderão ser classificados quanto à natureza (naturais, sintéticos ou artificiais), quanto ao tipo de monómeros ou estrutura química (se apenas por um monómero – homopolímeros; se por vários – copolímeros), quanto à forma molecular (lineares, ramificados ou reticulados), quanto à cristalinidade (em cristalinos, semi-cristalinos ou amorfos), quanto ao comportamento mecânico (divididos em plásticos, elastómeros e fibras) e ainda de acordo com o comportamento térmico (termoplásticos ou termo rígidos) [4, 16].

Quanto à degradação, os polímeros obtidos a partir de combustíveis fósseis, e que resistam à ação microbiana em ambientes biológicos, designam-se de não-biodegradáveis. Já os polímeros naturais e os

sintéticos, que se degradam através da ação enzimática e/ou por degradação química associada aos organismos vivos, designam-se de biodegradáveis [9, 17]. A degradação dos mesmos ocorre através da ruptura das cadeias principais ou das cadeias laterais do polímero, devido à sua oxidação, fotólise, radiólise, hidrólise ou ativação térmica [6, 9]. Biodegradação é assim definida como a degradação do polímero em ambiente biológico (dependente de condições como temperatura, humidade, pH, oxigénio) que resulta em alterações na estrutura química, perda das propriedades estruturais e mecânicas, transformando-se em produtos mais simples, água, dióxido de carbono, minerais, etc. [17]. Os investigadores na área médica fazem muitas vezes a distinção entre dois conceitos importantes, e que geralmente se juntam num só: biodegradabilidade e bioreabsorbilidade.

Entende-se assim por polímeros biodegradáveis aqueles que se decompõem no organismo, permanecendo os subprodutos da sua degradação por longos períodos de tempo. Por sua vez, consideram-se polímeros reabsorvíveis os que, a partir do momento em que são implantados, se degradam em produtos não-tóxicos, absorvidos pelo organismo e eliminados através da atividade metabólica [6, 9, 18]. Este processo divide-se em duas etapas. Na primeira, o polímero vai-se degradando através da quebra de ligações na cadeia principal, resultando num polímero com um peso molecular cada vez menor, transformando-se em moléculas mais simples (hidrólise). Na segunda etapa, as moléculas resultantes da degradação são processadas e metabolizadas pelo organismo (como acontece com o PLA) [6, 9, 18].

Os polímeros biodegradáveis representam um papel muito importante hoje em dia, dadas as preocupações sociais, económicas e sobretudo ambientais em torno dos resíduos e dos desperdícios de polímeros não-biodegradáveis de origem petroquímica [9, 19]. Na área médica têm particular interesse essencialmente por duas razões: 1) a biocompatibilidade é importante, mas não indispensável, uma vez que permanecem pouco tempo no organismo, resultado da sua progressiva degradação no meio; 2) por sua vez, representam uma alternativa eficaz aos biomateriais de ação permanente no organismo (que podem facilmente provocar infeções/inflamações), facilitando os tratamentos com conforto para os pacientes [6]. A degradação hidrolítica e enzimática são os mecanismos de degradação mais importantes em contexto clínico. No Anexo B apresenta-se um conjunto de informações pertinentes de forma a compreender estes mecanismos e os fatores de que dependem.

No Anexo C, Tabela C.1, apresenta-se uma sistematização de aplicações gerais e teóricas (em contexto cirúrgico e farmacêutico) destes polímeros [6]. As aplicações são inúmeras e transversais a todos os setores (como os de embalagens e agricultura); libertação controlada, matrizes de imobilização de enzimas, próteses temporárias, suportes (*scaffolds*) com diferentes porosidades para a área de Engenharia de Tecidos, suturas absorvíveis, embalagens de conservação de alimentos, produtos sanitários, etc. são apenas exemplos da diversidade de produtos, atualmente existentes e comercializados [8, 9, 19]. No Anexo D, Tabela D.1, apresenta-se uma lista de aplicações em diversas áreas.

Relativamente à classificação, esta pode ser de acordo com a aplicação, origem, o método de síntese, a composição química, a importância económica, entre outros. Neste trabalho, e de acordo com o que já foi referido anteriormente, a classificação será feita tendo em conta a natureza/origem, em naturais ou sintéticos. Na Figura A.2 representa-se esquematicamente essa classificação (adaptada de [19]). De entre os polímeros sintéticos biodegradáveis, destacam-se os poliésteres, poliamidas (e poliéster amidas), polianidridos, poli (orto ésteres) ou poli (cianoacrilatos de alquilo) como exemplos dos que se degradam por hidrólise, com quebra da ligação principal. Por outro lado, polímeros como as poliureias ou as poliuretanas são exemplos dos que se degradam pela ação de microrganismos/enzimas [1, 9].

Os poliésteres podem-se classificar em dois grandes grupos: termoplásticos (elastómeros, lineares aromáticos, líquidos cristalinos, poli (alcanoatos de hidroxilo), “*engineering plastics*” e os alifáticos, tais como o poli (ácido glicólico) (PGA), o poli (ácido lático) (PLA) ou a policaprolactona (PCL)), e os insaturados [20].

1.2.1. Poliésteres alifáticos

Resultado da sua diversidade, os poliésteres alifáticos são das famílias de polímeros biodegradáveis mais estudadas, com grande importância em aplicações biomédicas [7 – 9, 19, 20]. Existem múltiplos monómeros que poderão ser utilizados na produção de poliésteres por policondensação (se se pretender obter polímeros de baixo peso molecular) ou então através de polimerização por abertura de anel (onde se consegue atingir elevados pesos moleculares) [9, 19, 21]. Distinguem-se essencialmente dois grupos de poliésteres alifáticos: 1) sintetizados a partir de hidroxiácidos, como o PLA e o PGA; 2) ou obtidos a partir da policondensação de ácidos dicarboxílicos e dióis, como o poli (butileno succinato) (PBSs) [9].

O facto de serem, na sua maioria, polímeros bioabsorvíveis, torna-os fortes candidatos em aplicações clínicas, uma vez que se degradam em produtos capazes de ser metabolizados pelo organismo, sem que haja toxicidade associada [1]. Para além disso, as boas propriedades mecânicas, aliadas à relativa facilidade de síntese e processabilidade, são vantagens claras [21]. Para além da área médica, os poliésteres estão bastante associados a aplicações de revestimento, sendo tradicionalmente conhecidos como resinas alquídicas [20]. Estes polímeros são caracterizados pela presença de grupos éster funcionais na sua cadeia principal [19]. A sua biodegradabilidade é exatamente resultado da presença dos grupos éster, que são hidrolisáveis [9, 21]. Contudo, os poliésteres alifáticos apresentam propriedades térmicas e mecânicas inferiores, quando comparados aos poliésteres aromáticos (como é o caso do PET). Para melhorar essas propriedades, são possíveis modificações físicas e químicas por *bulk modification* (modificação *bulk*) ou *surface modification* (modificação de superfície) [1]. Os aromáticos, apesar das vantagens identificadas, demonstram ser resistentes ao ataque microbiano, sendo por isso não-biodegradáveis [19]. Os alifáticos ao serem instáveis (na degradação hidrolítica) revelam-se de grande importância para implantes biodegradáveis, bioabsorvíveis e biocompatíveis [7, 19].

O PGA e o PLA são os poliésteres mais comuns e os que têm sido mais usados em contexto clínico (em suturas degradáveis), aprovados pela *Food and Drug Administration* (FDA) e classificados como *generally recognized as safe* (GRAS) [1, 7, 9, 19]. O PLA degrada-se em ácido lático, naturalmente presente no organismo humano. Já o PGA, por hidrólise, é convertido no seu monómero: o ácido glicólico [7, 19]. Ambos, após degradação, são facilmente digeridos por metabolitos e/ou outros mecanismos, sendo eliminados através da urina.

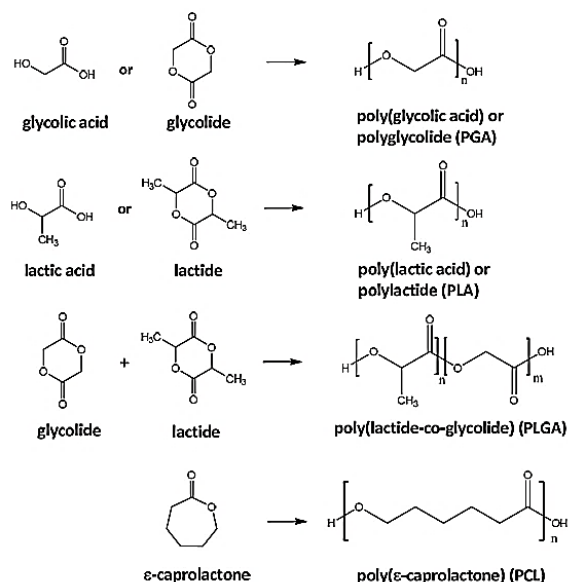


Figura 1.1 Estruturas químicas dos poliésteres sintéticos mais comuns: PGA, PLA, PLGA e PCL, respetivamente (adaptado de [21]).

Após estudos realizados, *Vert et al.* (1984) referiram que não foi encontrada a presença significativa de produtos resultantes da degradação do PLA nos órgãos vitais do organismo. Já *William and Mort* (1977) mencionaram que, para além da hidrólise, o PGA pode ser degradado por determinadas enzimas [8]. Os dois polímeros são, desde há muito tempo, utilizados em conjunto na produção de copolímeros de PLA/PGA. Segundo *Metha et al.* (2005) a primeira combinação do PLA com o PGA resultou num material de sutura, tendo sido comercializado pelo nome *Vicryl* nos E.U.A, em 1974 [19]. Ao longo dos anos, o PLA, PGA e seus copolímeros, têm demonstrado biocompatibilidade em aplicações médicas. Contudo existem algumas preocupações relativamente às alterações de pH nas zonas de degradação dos materiais, resultado da libertação dos componentes mais simples (de origem ácida) que poderão provocar irritações ou outras reações adversas no organismo [7, 8].

Apesar de degradáveis em ambiente biológico, esta depende de diversos fatores, nomeadamente da configuração estrutural do polímero (ou copolímero), do rácio do copolímero, da morfologia, cristalinidade, peso molecular, porosidade, e não menos importante, do local onde é implantado (Anexo B) [8, 21]. De referir que o PLA é muito mais hidrofóbico que o PGA, o que resulta numa degradação muito mais lenta. Tipicamente, o tempo de degradação do PLA pode ir de 1 a 2 anos, enquanto o PGA se degrada em poucas semanas [7]. A motivação da produção de copolímeros de PLA/PGA advém da necessidade de alterar, melhorar e/ou adaptar propriedades do material final. Manipulando as proporções de um polímero e de outro, pode-se chegar a materiais com propriedades mecânicas diferentes e com tempos de degradação diferentes, o que é relevante em Engenharia de Tecidos, mas também em sistemas de libertação controlada [7, 21].

Este trabalho não teve como objetivo a produção de copolímeros de PLA e PGA, contudo estes dois polímeros são geralmente associados um ao outro no contexto das aplicações em estudo. Mais adiante será feita uma breve revisão do polímero de interesse neste trabalho (PLA) e de alguns estudos na área e dos avanços atingidos nos últimos anos (com o PLA, PGA e outros poliésteres) em aplicações como adesivos cirúrgicos e sistemas de libertação controlada.

1.3. Fotoreticulação

A modificação de um determinado polímero poderá ser obtida através da sua reticulação, processo através do qual se formam redes poliméricas tridimensionais específicas, com diversas aplicações na área médica [21, 22]. A reticulação, conhecida na literatura por “*crosslinking*”, poderá ser realizada por diferentes métodos, nomeadamente por polimerização radicalar-livre, e nesta de três formas distintas: 1) quimicamente; 2) por ação da temperatura; 3) ou por irradiação de luz UV (reticulação fotoquímica ou também conhecida por fotoreticulação) [21]. Esta última é a via mais utilizada na produção de redes poliméricas biodegradáveis, a partir de monómeros multifuncionais (também designados de oligómeros ou pré-polímeros), apresentando claras vantagens face à reticulação química e térmica [11, 21, 23, 24].

Exatamente por isso, os materiais fotopolimerizáveis têm sido alvo de grande interesse e estudo ao longo dos últimos anos, explorando-se a sua aplicação na área industrial (revestimentos, películas, placas de impressão) e nas áreas biomédicas e farmacêuticas, no estudo e desenvolvimento de suturas cirúrgicas, sistemas de libertação controlada de fármaco, compósitos, dispositivos de fixação interna, *scaffolds* para regeneração de tecidos, biossensores, modificações de superfície em materiais para controlo da adesão celular, aplicações dentárias *in situ*, entre outras [24]. Redes poliméricas de base ácido lático e de base

caprolactona têm sido frequentemente estudadas para a produção de *scaffolds* ou hidrogéis, depois dos polímeros base serem funcionalizados com diferentes monómeros (acrilatos, metacrilatos, anidridos, isocianatos), a fim de serem introduzidas ligações duplas de carbono nos terminais das suas moléculas, para que ocorra posterior reticulação [22]. No que respeita à produção de biomateriais injetáveis, a aplicação da fotopolimerização no desenvolvimento de adesivos para aplicação médica é cada vez mais recorrente e usufrui de diversas vantagens intrínsecas à própria técnica, como é reportado em trabalhos anteriores [11, 12, 21, 25, 26]. Neste trabalho, o PLA será funcionalizado com diferentes monómeros, seguindo-se a sua fotoreticulação, para obter matrizes poliméricas tridimensionais, que podem ser aplicadas como adesivos, para diversos fins.

Polímeros (poliésteres) preparados por fotoreticulação apresentam como vantagens na sua aplicação: 1) um controlo preciso da taxa de reticulação (conseguido através de diferentes estruturas dos monómeros/precursores, número de ligações duplas existentes, fonte de luz, temperatura e concentração de iniciador em causa); 2) uma elevada velocidade de reação de cura em condições ambientais; 3) controlo das propriedades do material manipulando o tempo de reticulação a que este é exposto; 4) possibilidade de ausência de solventes; 5) controlo de elasticidade; 6) controlo do aumento da temperatura durante o processo exotérmico de fotoreticulação; 7) elevada estabilidade depois de armazenados, entre outras [11, 21, 24]. Com isto, a fotoreticulação revela-se um método eficaz e cada vez mais importante para aplicações *in situ* [21]. Para que o processo de fotoreticulação se inicie, é necessária a presença de um fotoiniciador, sensível a um comprimento de onda específico dentro da gama de radiação ultravioleta (UV). A taxa de iniciação irá depender de fatores como a eficiência do iniciador, a sua concentração e ainda a intensidade de luz [23]. As moléculas de fotoiniciador, sob a radiação UV, ficam excitadas, dando origem a radicais reativos que iniciam reações consecutivas nas moléculas dos oligómeros fotopolimerizáveis [11, 23, 24]. A velocidade de reação de cura, o comprimento de onda em que ocorre a reação, assim como a resistência à luz e a estabilidade dos materiais finais obtidos depois de armazenados, são questões que dependem da natureza do fotoiniciador utilizado [11]. Na Figura 1.2 apresenta-se um esquema do processo de fotopolimerização², culminando com a formação de uma matriz polimérica [24].

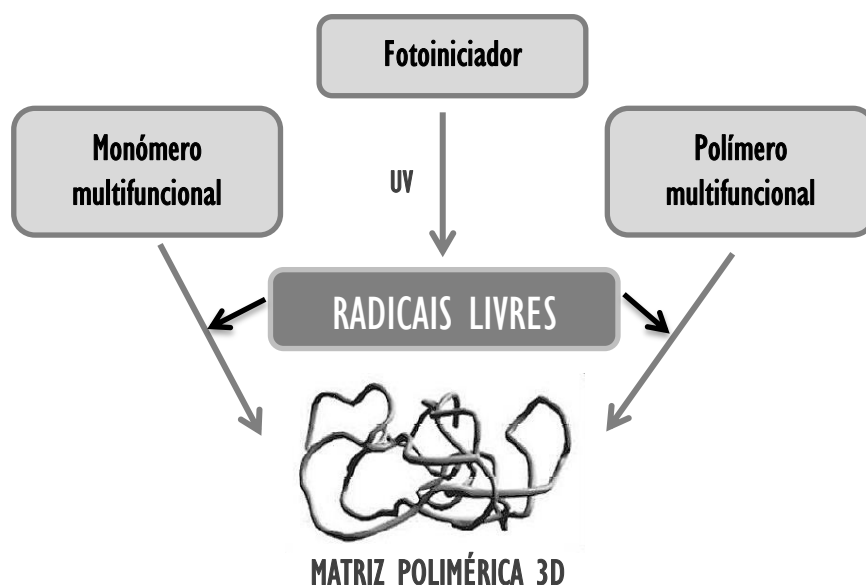


Figura 1.2 Representação esquemática do processo de reticulação fotoquímica (por irradiação de luz UV) obtendo-se uma matriz polimérica tridimensional (baseado em [24]).

² Fotopolimerização ou Fotoreticulação pretendem ter o mesmo significado, razão pela qual, neste trabalho, são utilizados ambos os termos.

No processo de fotoreticulação é importante garantir a conversão total de ligações duplas de carbono (que nem sempre é conseguida), assim como a inexistência de monômero não reagido. Caso contrário, a presença de grupos funcionais livres na rede polimérica formada poderá ter consequências negativas, no que diz respeito às propriedades mecânicas e biocompatibilidade (uma vez que se poderão libertar compostos tóxicos e/ou reativos que danificarão a curto/ longo prazo os tecidos envolventes) [12, 23].

Um dos problemas associados à fotopolimerização *in situ* ou *in vivo* diz respeito ao aumento de temperatura durante a polimerização radicalar, uma vez que se trata de um processo exotérmico, o que poderá ser resolvido ou minimizado, controlando o tempo da fotoiniciação [21, 23].

O fotoiniciador deve ser tido também em conta, para que não haja toxicidade associada [11, 12, 23]. Na literatura, são distinguidas duas categorias básicas de fotoiniciadores (Tipo I – derivados de acetofenonas e α -hidroxialquil fenonas e Tipo II - benzofenonas) [4, 11, 27] e vários são os estudos relativamente à toxicidade associada aos mesmos para com diferentes tecidos do organismo [11, 23]. Nesses estudos, um fotoiniciador amplamente utilizado na produção de hidrogéis, de nome *2-hidroxi-1-[4-(2-hidroxiétoxi)fenil]-2-metil-1-propanona* (Tipo I), conhecido comercialmente por Irgacure® 2959, revelou ser bem tolerado em diversas linhas celulares, em diferentes concentrações testadas, comparativamente a outros [11, 23]. Exatamente por esta razão tem sido bastante utilizado no estudo e desenvolvimento de diferentes materiais para aplicações biomédicas, e por isso escolhido por Marques [12] no desenvolvimento de bioadesivos a partir de ácido láctico. Este continuará a ser usado no trabalho experimental desenvolvido, dada a sua biocompatibilidade.

1.4. Aplicações Biomédicas de polímeros fotoreticuláveis

Como mencionado, os polímeros fotoreticuláveis apresentam um importante papel em duas grandes áreas: médica e ecológica [1, 6]. A fotoreticulação revela-se uma importante estratégia na modificação de propriedades dos materiais poliméricos, melhorando a biocompatibilidade e hemocompatibilidade [24]. Para além disso, podem-se produzir redes poliméricas (adesivos, hidrogéis, *scaffolds*) com bastante interesse para encapsulamento/incorporação de proteínas, fatores de crescimento, células e outras substâncias (como anti-inflamatórios e antibióticos) [6, 12, 21 – 24]. Neste trabalho pretende-se destacar a produção, aplicação e relevância dos bioadesivos em diversas áreas clínicas, nomeadamente: implantes e cirurgia, farmacêutica (libertação controlada de fármacos), e Engenharia de Tecidos. Produtos (atualmente existentes no mercado) serão revistos, assim como os estudos que têm vindo a ser desenvolvidos na área dos materiais poliméricos fotoreticuláveis.

1.4.1. Bioadesivos – Aplicações cirúrgicas

Materiais de sutura representam a primeira grande aplicação de poliésteres biodegradáveis, com produtos comercialmente conhecidos pelos nomes Vicryl® e Dexon® [1, 19]. Contudo, no que diz respeito a técnicas cirúrgicas, os bioadesivos (também obtidos a partir de polímeros biodegradáveis) constituem uma clara inovação face às técnicas tradicionais e invasivas de sutura ou de tratamento de feridas incisivas [4, 6, 11, 12, 24, 26, 28 – 31]. A maior parte das técnicas existentes (fios de sutura, agrafos) têm como desvantagens a possibilidade de infeções, devido a reações adversas do organismo ou a condições de esterilização reduzidas. Para além disso, é necessária a sua remoção (provocando desconforto e dor ao paciente), sendo necessário na maioria dos casos o uso de anestésias [4, 6, 24, 29, 30, 31].

O uso de adesivos na forma líquida (ou gelificada) que promovam a hemóstase, vedação e adesão dos tecidos é cada vez mais objeto de estudo [6, 28 – 30]. A sua aplicação é feita diretamente no local da incisão (*in situ*) com posterior reticulação, para se obter num curto período de tempo um filme/membrana que seja flexível e resistente. Terminada a sua função, os adesivos deverão ser biodegradáveis e bioabsorvíveis, de forma a serem naturalmente absorvidos e metabolizados pelo organismo [6, 28 – 30]. Na Tabela 1.1 resume-se um conjunto de características/propriedades, assim como as vantagens e desvantagens da sua utilização em ambiente cirúrgico.

Tabela 1.1 Características, propriedades e vantagens/desvantagens da aplicação de bioadesivos em contexto cirúrgico [4, 11, 12, 24, 26, 28 – 31].

BIOADESIVOS PARA APLICAÇÕES CIRÚRGICAS	
CARACTERÍSTICAS E PROPRIEDADES REQUERIDAS	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Fácil e forte adesão aos tecidos; ▪ Propriedades mecânicas adequadas (elevada capacidade de deformação, flexibilidade e resistência à tensão); ▪ Manter as propriedades mecânicas requeridas durante o processo de cicatrização; ▪ Apresentar adequada viscosidade antes da aplicação; ▪ Promover hemóstase e coagulação local; ▪ Promover um forte encerramento dos tecidos durante o processo de cura; ▪ Degradar-se em produtos não tóxicos que sejam reabsorvidos pelo organismo; ▪ Elevada biocompatibilidade (baixa toxicidade); ▪ Tempo de cura deverá ser rápido e o calor resultante da polimerização não deverá ser prejudicial ao tratamento; ▪ Deverá apresentar características de cura e regeneração dos tecidos; ▪ Solidificar rapidamente em condições fisiológicas, de modo a reduzir os tempos de cirurgia, minimizando hemorragias/sangramentos; ▪ Apresentar um custo razoável; ▪ Possibilitar a incorporação de fármacos (anti-inflamatórios e analgésicos), proteínas e fatores de crescimento.
VANTAGENS	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Elevada velocidade de cura (rápida aplicação); ▪ Redução do trauma provocado sobre os tecidos fragilizados; ▪ Redução do tempo cirúrgico; ▪ Não é necessária anestesia; ▪ Dor significativamente reduzida (maior conforto e mais práticos); ▪ Não é necessária a remoção de pontos ou agrafos; ▪ Estabilidade à temperatura ambiente; ▪ Menor risco de infeção; ▪ Maior eficácia no tratamento.
DESVANTAGENS	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Força de tensão menor comparativamente aos fios de sutura.

Os bioadesivos deverão assim resultar do compromisso entre facilidade de aplicação, eficácia e biocompatibilidade [11]. As propriedades requeridas para adesivos cirúrgicos dependem fortemente da aplicação e procedimento cirúrgico a que se destinam [31]. São vários os adesivos atualmente disponíveis no mercado com aplicação em diferentes contextos clínicos, classificados em três categorias: 1) naturais ou biológicos; 2) sintéticos ou semi-sintéticos; 3) e bio miméticos [6, 12, 26, 29, 31]. Na literatura estes adesivos são alvo de um estudo aprofundado [26, 28 – 31], pelo que neste trabalho a sua referência será sucinta.

Adesivos à base de cianoacrilatos (comercialmente conhecidos por produtos como o Dermabond® e o Liquiband®) são exemplo de adesivos sintéticos, considerados bastante atrativos para a fixação de tecidos, dada a sua capacidade de ligação em ambientes húmidos [29, 31]. Estes tendem a solidificar rapidamente em contacto com os tecidos e fluidos biológicos, como resultado de uma polimerização exotérmica que ocorre à temperatura ambiente, garantindo uma forte adesão aos tecidos e propriedades

mecânicas adequadas [31]. Contudo, um dos produtos da sua degradação em ambiente biológico é o formaldeído, associado a toxicidade, podendo este ser carcinogénico e mutagénico [26, 29, 31]. Apesar de amplamente utilizados em cirurgia estética e cosmética, a toxicidade dos subprodutos resultantes da sua degradação pode assim induzir o risco de infeções graves, necrose tecidual, não sendo aplicável em cirurgias internas (uma vez que induzem respostas inflamatórias intensas quando entram em contacto com superfícies não-cutâneas) [31].

Adesivos de gelatina reticulada com resorcinol-formaldeído (GRF) e pré-polímeros de base uretana são outros exemplos de adesivos semi-sintéticos e sintéticos, respetivamente. Os primeiros apresentam valores de resistência à tensão inferiores (tipicamente de 0,050 – 0,170 MPa) quando comparados com os cianoacrilatos (1 – 3 MPa), tornando-os limitados e inadequados em aplicações onde é necessária uma forte adesão aos tecidos [26, 29]. Também a toxicidade causada por agentes reticulantes, como o formaldeído, representa um entrave à sua aplicação [4, 26, 30, 31]. Os adesivos de base uretana são materiais promissores face aos anteriores, dada a possibilidade de serem biocompatíveis e biodegradáveis (se sintetizados a partir de fontes naturais, tais como o óleo de castor) [24, 31]. Estes pré-polímeros com grupos terminais isocianato, em contacto com o ambiente biológico, dão origem a redes poliméricas. Estas, por sua vez, vão aderir por ligações covalentes aos tecidos (através da formação de uma ligação ureia entre um grupo isocianato livre e proteínas aminas presentes no organismo) [30]. Apesar de proporcionarem bons resultados de adesão aos tecidos, estudos referem que os tempos de cura são relativamente longos (aproximadamente 10 minutos) para poderem ser aplicados em cirurgia. Também os produtos resultantes da sua degradação são alvo de preocupação, dada a sua toxicidade [24, 30, 31].

Adesivos naturais à base de fibrina e colagénio são uma alternativa aos referidos anteriormente, eficazes em diversas aplicações. Porém, apresentam fracas propriedades mecânicas e de adesão aos tecidos, com valores de resistência à tensão de 0,002 – 0,040 MPa [24, 26, 29, 31]. Para além disso, têm um custo elevado e requerem uma preparação intensiva em laboratório, antes de aplicados [31]. Apesar de proporcionarem bons resultados na cicatrização e controlo de hemorragias, têm como grande desvantagem a possibilidade de transmissão de doenças sanguíneas e infeções virais [26, 29, 31]. Na Tabela E.1, Anexo E, apresenta-se um resumo dos produtos no mercado (aprovados pela FDA), assim como as suas aplicações clínicas, vantagens e limitações.

Com o objetivo de ultrapassar as limitações identificadas nos adesivos mencionados, torna-se relevante estudar e testar novas formulações, assim como desenvolver métodos de produção (a partir de diferentes polímeros) que permitam chegar a novos produtos, económica e comercialmente viáveis. Os materiais poliméricos com grupos terminais fotoreticuláveis apresentam claras vantagens face aos sistemas de pré-polímeros, nomeadamente [24, 31]: elevadas velocidades de cura à temperatura fisiológica e controlo sobre a temperatura da polimerização, ideais para aplicação como adesivos no tratamento, reparação e regeneração de tecidos enfraquecidos [12]. Nos últimos anos, tem-se registado um esforço significativo na preparação e desenvolvimento de bioadesivos (de base natural e sintética) por fotoreticulação, não-tóxicos, biodegradáveis, eficazes, resistentes e com boa adesão aos tecidos. Para além da biocompatibilidade desejada, uma questão bastante pertinente prende-se com o tempo de reação de cura do material. No contexto das aplicações referidas, interessa que esse tempo seja o menor possível [11, 12].

Poliésteres alifáticos e seus copolímeros (modificados por diferentes monómeros) apresentam um futuro promissor na produção de adesivos que satisfaçam os requisitos desejados, como já referido. Também

outros polímeros de origem natural e sintética têm sido alvo de investigação na produção de adesivos para aplicações cirúrgicas. Este trabalho pretende ser uma mais-valia na síntese de adesivos a partir do PLA, de forma rápida e eficaz, que permitam satisfazer os requisitos necessários para um bom desempenho em contexto cirúrgico (na reparação e regeneração de tecidos), sem que a biocompatibilidade seja comprometida. Uma revisão dos estudos nesta área será apresentada mais à frente neste capítulo.

1.4.2. Sistemas de libertação controlada de fármaco

Novas tecnologias têm vindo a ser concebidas como alternativa aos sistemas convencionais de administração de fármaco no organismo, nomeadamente os sistemas de libertação controlada (*drug delivery systems*, DDS) [1, 6, 21, 24]. As principais motivações destes sistemas são: possibilidade de administração de um dado fármaco numa quantidade ótima por um período de tempo desejado, direcionamento do fármaco para o local em que é necessário, e libertação do mesmo de forma simples e eficaz através da pele e/ou das membranas mucosas [6]. A eficiência ótima da terapêutica é assim atingida através do controlo dos níveis do fármaco e da sua distribuição no organismo [6, 21, 24].

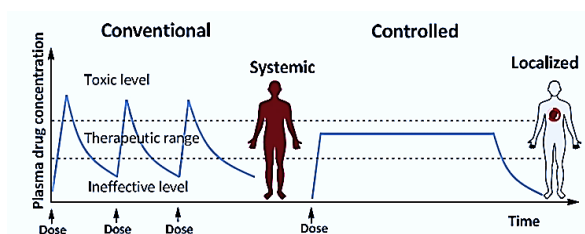


Figura 1.3 Perfis de concentração de fármaco no plasma sanguíneo para dois tipos de sistema de libertação de fármaco: convencional e controlado, respetivamente (adaptado de [21]).

Nos sistemas convencionais, a concentração de fármaco no plasma sanguíneo aumenta assim que o paciente toma o medicamento, voltando a diminuir até que este faça uma próxima administração (Figura 1.3). Em terapêuticas/tratamentos a longo prazo, a concentração de fármaco no organismo irá estar sempre dependente do cumprimento (ou não) do paciente. Neste sentido, a libertação controlada não só permite uma administração a longo prazo, mantendo-se sempre a concentração de medicamento desejada, como facilitará o cumprimento do tratamento por parte do doente [1, 6]. De forma sucinta, os DDS têm como vantagens [1, 21]: 1) libertação localizada de fármaco; 2) diminuição do número de doses; 3) toxicidade do fármaco reduzida, diminuindo-se os efeitos colaterais; 4) maior conforto do doente; 5) e ainda menor necessidade de acompanhamento. Na literatura, a libertação controlada de fármaco através de materiais poliméricos injetáveis é considerada bastante atrativa. Para tal, os materiais poliméricos em causa deverão ser biodegradáveis e bioabsorvíveis, pois deixam de ser necessários a partir do momento em que o medicamento foi administrado [1, 6, 21]. Micro e nanoesferas bioabsorvíveis, discos e cilindros são preparados a partir de polímeros biodegradáveis para libertação controlada [6]. Aplicações de destaque: oftalmologia (na qual os bioadesivos, como matrizes poliméricas reticuladas, representam um futuro promissor), aplicações dermatológicas (onde os hidrogéis têm maior destaque). Ferreira *et al.* [24] apresentam uma excelente revisão dos estudos realizados neste âmbito.

1.4.3. Engenharia de Tecidos

Os bioadesivos, além de utilizados em cirurgia (hemostasia e tratamento de feridas incisas) e na área farmacêutica (como sistemas de incorporação de fármaco), são também aplicados na área de Engenharia de Tecidos, na regeneração ou substituição de tecidos defeituosos, fragilizados ou inexistentes [6, 30]. *Scaffolds* com diferentes porosidades são utilizados como estruturas que permitem a proliferação de células, com o objetivo de reconstruir e tratar tecidos destruídos, que não conseguem ser tratados por

administração de fármacos [1, 6]. Um dos grandes problemas e desafios destes na reparação de tecidos consiste na descontinuidade existente na interface biomaterial/tecido, que pode resultar na sua não-integração [30]. Para evitar que tal situação aconteça, suturas e adesivos demonstram ser eficazes (Figura 1.4). De referir que, consoante o tecido, as necessidades/propriedades requeridas num adesivo poderão ser completamente diferentes [30]. De entre os adesivos apresentados anteriormente, os mais investigados nesta área são os adesivos à base de fibrina, sendo reportado o seu uso em tecido cardíaco, que beneficiou da aplicação do adesivo como suporte para facilitar a integração do enxerto e a regeneração do tecido, sem problemas de inflamações/irritações [30]. Outra aplicação dos adesivos, mais em contexto cirúrgico, consiste na prevenção da formação de seroma [30]. Os materiais poliméricos fotoreticuláveis e bio injetáveis, dadas as suas vantagens, são de extrema importância nas aplicações referidas. Assim, apresenta-se na Tabela 1.2 um conjunto de estudos que têm vindo a ser desenvolvidos nas três áreas de aplicação descritas, de forma a perceber a importância que as matrizes poliméricas fotoreticuláveis (bioadesivos) têm tido neste âmbito.

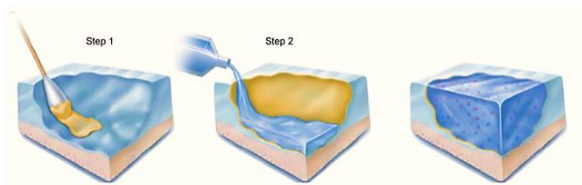


Figura 1.4 Bioadesivo em Engenharia de Tecidos – aplicação de um adesivo de base quitosano modificado, promovendo a adesão e integração entre o hidrogel utilizado como biomaterial e o tecido nativo (em [30]).

Tabela 1.2 Estudos de desenvolvimento de materiais poliméricos fotoreticuláveis (e outros) para produção de adesivos, hidrogéis, *scaffolds* com aplicação em cirurgia, libertação controlada de fármaco e regeneração/reparação de tecidos [11, 12, 24, 30].

BIOADESIVOS			
Polímero	Estudo/Aplicação	Resultados/Conclusões	Referências
Copolímeros de N-vinil pirrolidona (NVP)	<ul style="list-style-type: none"> - Síntese de adesivos de base N-vinil pirrolidona, modificado por monómeros de base acrilato: Metilbenzenossulfónico 1-propano 2-acrilamido (AMPS), <i>vinyl succinimide</i> (VS), acrilato de glicidilo (GA) e metacrilato de 2-isocianoetilo (IEMA); - Fotoreticulação dos copolímeros na presença de Irgacure-184 (I-184) como fotoiniciador. 	<ul style="list-style-type: none"> - Materiais obtidos apresentaram um tempo de reticulação médio de aproximadamente 3 min, considerado adequado para aplicações <i>in situ</i>; - Bioadesivos apresentaram diferentes características: muito suaves (NVP/AMPS), duros (NVP/GA) e flexíveis/resistentes (NVP/VS); - Testes de adesão em tecido de intestino demonstraram uma melhor adesão comparativamente a cinco bioadesivos comerciais (citotoxicidade não foi avaliada); - Apresentaram uma capacidade de absorção de água elevada, considerando-se promissores na produção de hidrogéis e adesivos para aplicação médica; 	Kao <i>et al.</i> [32]
Quitosano (CS)	<ul style="list-style-type: none"> - Síntese de adesivos fotoreticuláveis de base quitosano; - Avaliação da sua viabilidade e utilização em aplicações cirúrgicas. 	<ul style="list-style-type: none"> - A sensibilidade à radiação UV e consequente reticulação do material dependeu da introdução de grupos azida na molécula de quitosano; - Realização de testes <i>in vivo</i> de forma a perceber a eficácia do material e resposta do organismo à sua presença demonstraram que o CS permaneceu no organismo durante 30 dias (no local do implante, após cirurgia), tendo-se desenvolvido tecido fibroso; - Aparecimento de células inflamatórias. 	Ono <i>et al.</i> [33, 34]
Poli (caprolactona) (PCL)	<ul style="list-style-type: none"> - Preparação de adesivos fotoreticuláveis, a partir da modificação da PCL comercial com IEMA; - Fotoreticulação da PCL funcionalizada na presença de Irgacure® 2959 como fotoiniciador; - Avaliação da sua viabilidade e utilização em cirurgia. 	<ul style="list-style-type: none"> - Testadas diferentes percentagens de iniciador (2, 3 e 4%) e diferentes tempos de irradiação UV (60, 70, 80 s) de modo a perceber a sua influência na estrutura, morfologia e comportamento dos materiais finais obtidos (os filmes obtidos com 4% de iniciador revelaram maior eficácia de adesão em testes <i>in vitro</i>); - Materiais apresentaram estabilidade térmica à temperatura fisiológica (antes e após reticulação); - Testes de biodegradação durante 6 semanas revelaram que os adesivos resultantes de um tempo de irradiação de 60s foram os que sofreram maior degradação (aproximadamente 10% de perda de massa) – degradação lenta; - Testes de hemocompatibilidade (com plasma sanguíneo) demonstraram um carácter ligeiramente hemolítico em contacto direto, por parte das membranas. Esse carácter deixou de existir quando estas foram incubadas em solução de PBS; - Ensaio <i>in vivo</i> demonstraram a biocompatibilidade do material, já que em nenhum tecido/órgão se detetou sinais de necrose ou inflamações. 	Ferreira [11]

Tabela 1.2 (cont.)

SISTEMAS DE LIBERTAÇÃO CONTROLADA			
Polímero	Estudo/Aplicação	Resultados/Conclusões	Referências
Amido	<ul style="list-style-type: none"> - Grupos terminais hidroxilo presentes na molécula de amido foram modificados com IEMA, de modo a obter ligações duplas de carbono nos seus terminais; - Fotoreticulação na presença de Irgacure® 2959; - Bioadesivos para aplicações oftalmológicas (incorporação dos fármacos <i>timolol maleate</i> e <i>sodium flurbiprofen</i>) por adsorção dentro da matriz polimérica. 	<ul style="list-style-type: none"> - Determinada a capacidade de absorção de fluido lacrimal artificial. Apesar dos grupos hidroxilo terem sido modificados, a matriz polimérica demonstrou ser hidrofílica; - Testes de biodegradação <i>in vitro</i> foram realizados durante 6 semanas, tendo-se verificado uma degradação constante das amostras ao longo desse período; - A incorporação de fármaco foi controlada a partir do comportamento de absorção do polímero; - Os perfis de libertação foram traçados por experimentação <i>in vitro</i> durante 10 dias. A libertação por difusão variou consoante o fármaco incorporado. 	Vieira <i>et al.</i> [35] (adaptado em parte de [24])
ENGENHARIA DE TECIDOS			
Sulfato de condroitina	<ul style="list-style-type: none"> - Preparação de adesivos com base num polissacarídeo (sulfato de condroitina) para promover a integração de <i>scaffolds</i> na reparação de tecidos de cartilagem; - Modificação com metacrilatos e posterior fotoreticulação e reticulação química de grupos aldeído. 	<ul style="list-style-type: none"> - Os grupos modificados por metacrilatos estabeleceram ligação com o hidrogel utilizado como suporte na reparação dos tecidos. Os grupos aldeído reagiram com proteínas dos tecidos, promovendo a adesão aos mesmos; - Estabelecida uma ponte entre o biomaterial e os tecidos. Concluiu-se que o uso de bioadesivos, em simultâneo com o hidrogel, melhorou significativamente os defeitos existentes na cartilagem, contribuindo assim para um tratamento mais eficaz. 	Em [30]

1.5. Poli (Ácido Lático) (PLA) – Breve Introdução

O poli (ácido lático) (PLA) é um poliéster alifático biodegradável, obtido a partir de uma fonte completamente renovável (o ácido lático), e convertido no mesmo por degradação hidrolítica [1, 12, 36, 37]. Devido às excelentes propriedades físicas e químicas (aliadas à biocompatibilidade e biodegradabilidade), ao seu desempenho mecânico elevado (semelhante a polímeros convencionais como o polietileno (PE), poliestireno (PS) e PET) e à sua elevada facilidade de processamento e modificação, o PLA é considerado um dos melhores candidatos à substituição dos polímeros não-biodegradáveis de origem petroquímica, com aplicação em inúmeros setores, desde a área médica (na preparação e desenvolvimento de suturas cirúrgicas, *scaffolds*, implantes/próteses e sistemas de libertação controlada de fármaco), a áreas como a agricultura (libertação controlada de fertilizantes ou pesticidas), área alimentar (embalagens de conservação de alimentos, garrafas, películas e adesivos para embalagens), aplicações eletrónicas, entre outras, revelando-se assim uma importante *commodity* no Mercado global (aprovado pela FDA para o contacto direto com os fluidos biológicos e considerado como GRAS) [12, 19, 36 – 40].

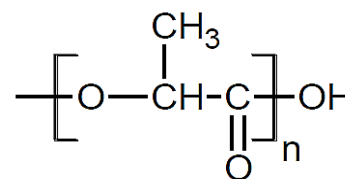


Figura 1.5 Estrutura química do PLA (adaptado de [1]).

Segundo Auras *et al.* [37], o PLA é considerado o pioneiro, o mais atrativo e com melhor disponibilidade no mercado dos bioplásticos. Exatamente por isso tem sido dos polímeros mais estudados e investigados ao longo das últimas décadas, com o objetivo de se otimizar os processos de produção (de modo a permitir que o seu preço seja mais atrativo e competitivo) e de se sintetizar diferentes materiais (explorando, adaptando e alterando as suas propriedades) para inúmeras aplicações [37, 41].

Conhecido desde 1845 (com uma intensa história comercial a partir de 1990), o PLA pode ser produzido essencialmente por três vias: 1) polimerização por policondensação direta (diretamente a partir do ácido

lático, derivado da fermentação de açúcares a partir de inúmeras fontes de hidratos de carbono, como o milho e cana de açúcar); 2) por policondensação direta em solução azeotrópica; 3) e ainda através de polimerização por abertura de anel (ROP), na presença de um dado catalisador (via de produção mais comum industrialmente) [37, 39 – 42]. Independentemente do processo de produção, um controlo rigoroso sobre as condições de operação (temperatura, pressão e pH) é exigido. Geralmente, na produção do PLA utilizam-se catalisadores e elevados tempos de reação. É considerado dos poucos polímeros em que a estrutura estereoquímica é facilmente modificada por polimerização, através do controlo da mistura dos isómeros L(+) e D(-), de forma a obter-se PLA na sua forma cristalina ou amorfa, com elevados rendimentos [1, 36, 39]. Dada a sua estabilidade térmica, é facilmente processado por diversas técnicas convencionais, nomeadamente: 1) Moldagem por injeção; 2) Termoformação; 3) Moldagem por sopro de extrusão; 4) por espuma de extrusão; 5) ou por fiação (*melt spinning*), com vantagem sobre outros biopolímeros, explorando-se a sua utilização em aplicações de longa duração [12, 39, 40, 43].

São inúmeros os artigos científicos e trabalhos de investigação, com revisões excelentes e aprofundadas sobre síntese, modificação, processamento, propriedades e aplicações do PLA [36 – 45, 55]. Também Marques [12] apresenta uma revisão geral e completa sobre o PLA, com foco na sua produção, propriedades e modificação [12]. Neste trabalho, pretende-se também fazer uma revisão geral, referindo propriedades, características, aplicações clínicas e estudos realizados neste âmbito.

1.5.1. Ácido Lático – A matéria-prima

O ácido lático (também conhecido por ácido 2-hidroxi-propanóico) é um ácido α -hidroxi simples, com um grupo hidroxilo e um grupo carboxilo ligado a um carbono quiral, existindo sob a forma de dois isómeros óticos ou estereoisómeros (o ácido lático L(+) e o ácido lático D(-), Figura 1.6). Estes diferem na sua forma conformacional, o que resulta em propriedades físicas diferentes, como por exemplo a solubilidade [12, 36, 37, 46]. O ácido lático foi descoberto por *C. W. Scheele*, em 1780, no soro do leite, considerado na época

uma mistura de compostos conhecidos. Posteriormente, *Berzellius* concluiu tratar-se de um composto simples, encontrado também no leite fresco, sangue e outros fluidos de origem animal [37, 46]. Em 1881, *Fermi* produziu ácido lático por fermentação, o que levou mais tarde à sua produção industrial [47]. O ácido lático L(+) é um isómero biológico, representando um papel muito importante em inúmeros processos bioquímicos. No corpo humano, é resultado do normal metabolismo do organismo e da prática de exercício físico. Pode assim ser encontrado nos músculos, sangue, pele e cabelo. Sendo o único estereoisómero produzido no corpo humano e capaz de ser metabolizado pelo mesmo, o ácido lático L(+) apresenta um enorme interesse comercial, principalmente em aplicações médicas e nas áreas alimentares. Contrariamente, a produção do estereoisómero D(-) tem baixo interesse comercial [12, 46, 47]. O comportamento químico do ácido lático depende das suas propriedades físico-químicas, nomeadamente: 1) do carácter ácido manifestado em solução aquosa; 2) da reatividade bifuncional (associada à presença dos grupos hidroxilo e carboxilo); 3) e ainda da atividade ótica assimétrica do segundo carbono da molécula [47]. Propriedades físico-químicas do ácido lático são apresentadas na Tabela F.1., no Anexo F. Resultado de propriedades como a leve acidez, a estabilidade térmica e química, a biodegradabilidade e a não-toxicidade até em doses consideráveis, o ácido lático encontra aplicação em diversos setores,

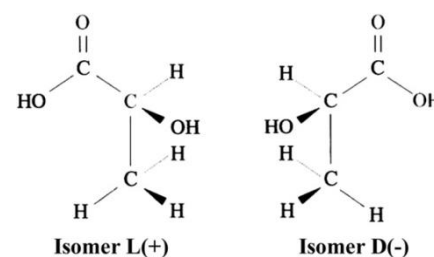


Figura 1.6 Estrutura dos dois isómeros do ácido lático L(+) e D(-), respetivamente (adaptado de [47]).

revelando-se uma importante *commodity*, com um volume global de mercado³ esperado para 2015 de 328,9 kt/ano. Encontra assim grande aplicação no setor alimentar como acidulante, tamponante, aromatizante ou agente inibidor de bactérias deteriorantes num conjunto variado de alimentos [12, 46, 48, 49]. Na indústria farmacêutica, é amplamente utilizado na produção de lactatos solúveis em água a partir de ingredientes ativos insolúveis, dada a sua capacidade de retenção de água. Na cosmética é utilizado como agente de controlo de acidez, apresentando um papel importante na produção de loções e outros produtos de cuidado pessoal (dadas as suas propriedades de hidratação, regulação de pH e clareamento da pele). Na indústria química, é uma importante matéria-prima na produção de ésteres e sais derivados de ácido lático (utilizados como solventes, plastificantes, emulsificantes) e ainda de etanol, propilenoglicol, ácido acrílico, ácido propiônico, acetaldéidos, entre outros [12, 46]. Atualmente o ácido lático tem como principal aplicação a produção de PLA e espera-se que a sua produção mundial, em 2020, chegue a 1 milhão de toneladas por ano [48].

Distinguem-se essencialmente duas vias de produção do ácido lático à escala industrial: síntese química e síntese biológica (fermentação láctica) (Figura 1.7). A primeira consiste essencialmente na hidrólise da lactonitrila (que é um derivado petroquímico), não sendo possível a partir desta controlar a composição em isómeros, obtendo-se no final uma mistura racémica dos isómeros L(+) e D(-) [46, 47]. Outras formas de produzir ácido lático por síntese química são

também possíveis, nomeadamente através da oxidação do propilenoglicol ou do propileno, da hidrólise do ácido 2-cloropropiônico, ou ainda por degradação controlada de açúcares [46, 47]. Apesar da síntese química ser uma via praticável e viável, é geralmente mais cara, devido aos preços elevados das matérias-primas [46]. Por sua vez, a fermentação láctica (via utilizada por cerca de 80% dos produtores mundiais)⁴ consiste na conversão anaeróbica parcial de hidratos de carbono, nomeadamente a glicose [48]. De acordo com Marques [12] trata-se de um processo relativamente rápido, com elevados rendimentos e altamente seletivo na produção de ambos os estereoisómeros L(+) e D(-) puros (desde que seja feita a seleção correta e adequada dos microrganismos, da composição do meio de cultura e das condições ambientais em que é feita a incubação, nomeadamente a temperatura, pH, arejamento e agitação) [12, 47].

Na literatura, os microrganismos produtores de ácido lático mais mencionados são as bactérias ácido-láticas (LAB) (em particular a *Lactobacillus*) e os fungos filamentosos (como os *Rhizopus*) [37, 48 – 53]. Como matérias-primas, destacam-se: os hidratos de carbono refinados (com grande disponibilidade no mercado, porém mais caros), amido, materiais celulósicos (provenientes de resíduos agrícolas, urbanos e industriais, consideravelmente mais baratos), melaços e soro do leite e queijo (ricos em lactose) [12, 37, 46, 47]. Importante mencionar que o mercado do PLA exige um elevado grau de pureza do ácido lático. Contudo, as soluções de ácido lático comercializadas atualmente apresentam uma coloração amarelada devido a impurezas resultantes do processo de fermentação [12]. Todavia é ainda difícil, através dos processos fermentativos, obter-se ácido lático puro, que garanta uma produção de PLA sempre com a mesma qualidade. Muitas vezes, para se conseguirem elevados rendimentos de fermentação, são

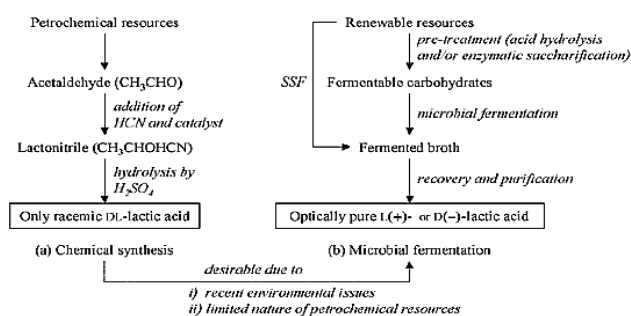


Figura 1.7 Representação esquemática das duas vias de produção do ácido lático: a) Síntese química; b) Fermentação microbiana (adaptado de [50]).

³ De acordo com relatório da *Global Industry Analysts* (2011). Referência: <http://www.prweb.com/releases/2011/1/prweb8043649.htm>, consultado a 30 de Maio de 2014.

⁴ Referência: <http://finance.yahoo.com/news/research-report-chinas-lactic-acid-093900108.html>, consultado a 30 de Maio de 2014.

adicionados suplementos nutricionais que dificultam as etapas de purificação e recuperação do ácido lático, resultando num produto final também ele mais caro (50% do custo do ácido lático deve-se aos custos de purificação) [51, 54]. Torna-se assim necessário a investigação e desenvolvimento de estratégias que permitam uma melhor purificação do ácido lático, da forma mais competitiva possível, para que o mercado do PLA seja também ele mais competitivo [12]. Os principais produtores de ácido lático são atualmente: *Archer Daniels Midland Company* e *NatureWorks LLC*, nos EUA; *Purac*, na Holanda e *Galactic S.A.*, na Bélgica [47].

1.5.2. Produtores, Mercado e Aplicações do PLA

O PLA tem uma história no mercado desde 1893, quando as primeiras fórmulas de produção de lactídeos foram publicadas por *Bischoff* e *Walden* [44]. Em 1932, *Carothers* e colaboradores (*DuPont*) produziram pela primeira vez PLA de baixo peso molecular por policondensação direta do ácido lático (a elevadas temperaturas e sob vácuo), contudo inapropriado para aplicações específicas [12, 36, 44]. Mais tarde, em 1954 a *DuPont* produziu e patenteou o processo de obtenção de PLA de elevado peso molecular, por polimerização por abertura de anel (ROP) [36, 44]. Nessa mesma altura, a *DuPont* e a *Ethicon, Inc.* deram início à comercialização de PLA para aplicações médicas [44]. Já em 1992, no Japão, as companhias *Shimadzu Corporation* e *Kanebo Gohsen Ltd.*, testaram em laboratório a produção de fibras de PLA, por *melt spinning*, tendo a *Kanebo* iniciado a sua comercialização em 1994, com o nome de *Lactron*. Fibras de PLA foram também produzidas e comercializadas pela *Fiberweb France S.A.* a partir de 1997, conhecidas no mercado pelo nome *Deposa* [44].

Mais tarde, em 2001/2002, a *Cargill Dow* apostou fortemente na produção de PLA e na sua comercialização (designando-se de *NatureWorks LLC*), com o arranque de uma instalação industrial a larga escala com capacidade de produção de 140 kt/ano [12, 41, 44]. Atualmente, a *Cargill* é a única acionista da *NatureWorks LLC*, sendo esta a maior fornecedora e produtora de PLA vendido sob o nome *IngeoTM* [12, 41, 42, 44]. Para além disso, existem outros fabricantes importantes, sediados nos E.U.A., China, Japão, e Europa empenhados no desenvolvimento e produção de PLA, aplicável a inúmeros setores industriais, nomeadamente: eletrónica, automóveis, dispositivos médicos, produtos alimentares e agrícolas, entre outras *commodities* [42]. Na Tabela G.1, Anexo G, é apresentada uma lista dos maiores fornecedores de PLA. Dado o facto de este ser um polímero bioabsorvível e biocompatível, em contacto com o organismo humano, o PLA tem sido utilizado ao longo do tempo no desenvolvimento de inúmeros produtos em contexto clínico, como já referido [36, 42, 44]. Para além disso, as aplicações do PLA em produtos do dia-a-dia são inúmeras devido às suas características excelentes (que serão discutidas mais à frente), nomeadamente: biodegradabilidade, renovabilidade, transparência e boas propriedades mecânicas [44]. *Dannon* e *McDonald's* (Alemanha) foram pioneiras na utilização de PLA como material para embalagens (em copos de iogurte e talheres) [44]. Por sua vez, a *NatureWorks LLC* tem disponibilizado um conjunto variado de produtos de base PLA para inúmeras aplicações em embalagens (filmes, adesivos, papéis revestidos, etc.) [44]. No setor alimentar, tem ainda aplicação em utensílios de mesa, garrafas de água, copos, bandejas, películas de proteção, entre outros [42]. Recentemente, dada a sua elevada facilidade de processamento, são produzidas fibras de PLA para roupas de desporto e diversos tecidos [42]. Apesar de apresentar elevada resistência térmica e boas propriedades mecânicas, comparativamente aos restantes biopolímeros, a utilização do PLA em aplicações eletrónicas é limitada, assim como outras aplicações de engenharia. Ainda assim, a *NEC Corporation*, no Japão, desenvolveu PLA com fibras de carbono, com melhores propriedades térmicas e propriedades retardantes de chama.

Por sua vez, a *Fujitsu* (também no Japão) desenvolveu uma mistura de policarbonato com PLA, para produzir caixas de computadores [42]. Diversos estudos têm sido feitos neste sentido, de modo a alargar ainda mais a gama de produtos a partir de PLA. Contudo, as aplicações mais exploradas continuam a ser sem dúvida na indústria de embalagens e nas áreas médico-farmacêuticas (e são estas que se pretende aprofundar mais à frente neste trabalho) [44]. Resultado da aplicação do PLA em inúmeros setores, o seu mercado tem apresentado um forte crescimento ao longo dos anos, de acordo com os esforços para diminuir o seu preço, de modo a torná-lo mais competitivo. Ainda assim, espera-se que o volume global do mercado para o poli (ácido lático), em 2016, corresponda a um valor de 2,6 mil milhões de dólares, esperando-se que em 2020 possa chegar aos 5,2 mil milhões de dólares.⁵

1.5.3. Vantagens, limitações, características e propriedades do PLA

O PLA apresenta inúmeras vantagens que fazem de si um polímero bastante promissor em diferentes setores do mercado, como já foi constatado. Pretende-se apresentar na Tabela 1.3 as suas principais características, que o tornam tão cobiçado na síntese de novos materiais para aplicações clínicas (e outras), justificando assim o interesse e escolha no âmbito deste trabalho, assim como as suas limitações (e formas existentes de contornar as mesmas).

Tabela 1.3 Vantagens e desvantagens do PLA e motivações da sua exploração/utilização em aplicações clínicas e outras [36, 39 – 41, 44, 45].

VANTAGENS DO PLA		
CARACTERÍSTICAS	COMENTÁRIOS/ESTUDOS	
Renovabilidade	Obtido a partir de recursos renováveis (como o trigo, milho, arroz, cana de açúcar, melaços e resíduos agrícolas), o PLA é um polímero biodegradável e reciclável (com uma degradação de 6 meses a 2 anos no ambiente, comparativamente a 500 – 1000 anos de degradação para os plásticos convencionais como o PE, PS e PET). Trata-se de um polímero amigo do ambiente (<i>eco-friendly</i>).	
Biocompatibilidade	Estudos de Biocompatibilidade do PLA em diversas aplicações <i>in vivo</i> (Adaptado de <i>Rasal et al. [44]</i>) ⁶	
	APLICAÇÕES	RESULTADOS
	Suturas em ratos e porcos da Índia	Revelou-se não tóxico; ausência de reações adversas por parte dos tecidos.
	Suturas em músculo de ratos	As suturas degradadas induziram reação adversa por parte das células.
	Reparação do osso da tíbia em ratos	Não houve reações adversas por parte dos tecidos.
	Implantes subcutâneos em ratos	Ligeiras reações adversas, dada a presença de um corpo estranho.
	Libertação de fármaco em tecidos enfraquecidos de ratos	O material (PLA) demonstrou ser biocompatível para com os tecidos.
	Fixação óssea em ratos (implantes)	Ausência de inflamações ou reações adversas por parte do organismo.
	Tecidos enfraquecidos/córnea de coelho	Não-tóxico e considerado seguro.
Fixação em fraturas no tornozelo em humanos	Seguro, efetivo e eficaz, sem demonstrar complicações no tratamento.	
A degradação do PLA, em ambiente biológico (nomeadamente no organismo humano), dá-se por hidrólise dos grupos éster e os produtos ácido lático, água, dióxido de carbono são não-tóxicos para o mesmo. Estes são facilmente metabolizados e eliminados pelo organismo, o que faz com que o PLA seja considerado um excelente material para aplicações biomédicas, por ser bioabsorvível (com interesse em suturas, implantes, adesivos e DDS), aprovado pela FDA para o contacto direto com os fluidos biológicos. A sua utilização em contexto clínico e os estudos realizados têm demonstrado resultados satisfatórios relativamente à sua biocompatibilidade e não-toxicidade para com os organismos vivos.		

⁵ Referência: http://www.bread4pla-life.eu/detalle_noticia.php?no_id=2106, consultado a 30 de Maio de 2014.

⁶ *Rasal et al. [44]* apresentam estes e outros estudos com o PLA na área biomédica, com referência aos principais resultados da sua biocompatibilidade. As referências bibliográficas desses estudos poderão ser encontradas no seu trabalho de revisão, Tabela 1. Neste trabalho, apenas se apresentam alguns exemplos.

Tabela I.3 (cont.)

VANTAGENS DO PLA	
Processabilidade	O PLA apresenta uma estabilidade térmica superior (quando comparado aos PHA's, PEG, PCL, etc.), o que permite que seja processado por inúmeras técnicas conducentes a diferentes materiais, possibilitando aplicação em setores da indústria como embalagens e têxteis. Degrada-se a temperaturas acima dos 200 ° C (por hidrólise, ruptura da ligação principal por oxidação ou por reações de transesterificação inter ou intramoleculares), dependente de fatores como: peso molecular, impurezas, tempo.
Menor consumo de energia (<i>Energy saving</i>)	A produção exige um consumo de apenas 25 a 55% da energia que é consumida na produção de polímeros na petroquímica, podendo esse consumo ser de apenas 10% no futuro. O consumo de água para a produção de PLA revela-se também competitivo face aos polímeros derivados dos combustíveis fósseis, o que se traduz numa clara vantagem económica, social e ambiental, para as indústrias de produção e comercialização de PLA.
DESVANTAGENS DO PLA	
CARACTERÍSTICAS	COMENTÁRIOS/ESTUDOS
Degradação lenta	O processo de hidrólise do PLA poderá demorar alguns anos, o que é uma clara desvantagem para aplicações biomédicas e alimentares. Segundo <i>Rasal et al.</i> [44], em contexto clínico, foi reportada uma segunda cirurgia para remoção de um implante de base PLA três anos após ter sido implantado no organismo, uma vez que este ainda não se tinha degradado. A degradação do PLA ocorre por hidrólise passado alguns meses de exposição num ambiente húmido. Na primeira etapa, ocorre a quebra de ligações dos grupos éster (processo não-enzimático), resultando numa redução gradual do seu peso molecular. Numa segunda etapa, o peso molecular é reduzido até que o ácido lático e oligómeros de baixo peso molecular sejam naturalmente metabolizados por microrganismos, dando origem a água e dióxido de carbono. Contudo, se o PLA permanecer em ambientes com pouca humidade e a baixas temperaturas, permanece estável por muito tempo. A taxa de degradação do polímero é dependente de diversos fatores, nomeadamente do peso molecular, morfologia, concentração residual de ácido lático, percentagem do isómero D(-), cristalinidade, difusão de água através do polímero, impurezas resultantes dos catalisadores utilizados na sua produção, etc., sendo um critério bastante importante e a ter em conta em aplicações biomédicas. Sabe-se que, as taxas de degradação mais elevadas são obtidas com PLA de baixo peso molecular.
Baixa resistência	Com uma elongação tipicamente inferior a 10%, o PLA é quebradiço, apresentando assim limitações em inúmeras aplicações que exijam um elevado desempenho mecânico dos materiais. Apesar da sua força de tensão e módulo de elasticidade serem idênticos ao PET, este deverá ser devidamente modificado para que seja aplicável em inúmeros contextos, apresentando assim o desempenho mecânico desejado.
Hidrofobicidade	O PLA é hidrofóbico (ou seja, apresenta baixa afinidade com a água), podendo por isso implicar reações inflamatórias por parte dos tecidos vivos quando em contacto direto com os mesmos. Assim, poderá apresentar diversos problemas na sua aplicação como implante/suporte em Engenharia de Tecidos.
Permeabilidade aos gases	As limitações do PLA, no que diz respeito às suas propriedades de barreira aos gases, poderão representar um claro entrave à sua aplicação nas indústrias alimentares e de embalagens. Em embalagens de conservação de alimentos, por exemplo, é requerida uma baixa permeabilidade ao oxigénio (e também ao dióxido de carbono), para que não ocorra a oxidação dos alimentos. A cristalinidade das fibras do material é um fator importante, pois a rede de fibras formada será mais densa, e consequentemente a permeabilidade ao gás será menor.
Falta de grupos laterais reativos	O PLA é um produto quimicamente inerte, com grupos terminais hidroxilo ou carboxilo, tendo por isso falta de grupos reativos, o que faz com que as suas propriedades <i>bulk</i> (propriedades mecânicas e hidrofobicidade) e de superfície (rugosidade, energia de superfície, etc.) sejam um importante desafio, principalmente quando se pretende que este seja aplicado na área biomédica.

No que diz respeito às suas propriedades, os homopolímeros de ácido lático são conhecidos por serem um pó branco à temperatura ambiente com uma temperatura de transição vítrea (T_g) de 55°C e uma temperatura de fusão (T_m) de 175°C. Por sua vez, PLA de elevado peso molecular apresenta-se como um líquido incolor, brilhante e/ou um material rígido, duro e quebradiço [12, 40]. Uma vez que o ácido lático

é uma molécula quiral, o PLA apresenta estereoisómeros, nomeadamente: 1) o poli (ácido lático-L) (PLLA), semicristalino, obtido a partir do isómero L(+) puro; 2) o poli (ácido lático-D) (PDLA), cristalino, obtido a partir do isómero D(-) puro; 3) e ainda o poli (ácido lático-D,L) (PDLLA), de estrutura amorfa, obtido a partir da mistura de ambos os isómeros [40, 45]. Com composições de PLLA acima de 90%, o PLA é cristalino, enquanto que o PLA óticamente menos puro é geralmente amorfo [36, 45]. Na literatura, referem que os valores de T_g e T_m decrescem com a diminuição da quantidade de PLLA. Propriedades físicas como a capacidade calorífica, densidade, e o comportamento reológico e mecânico do material vão estar dependentes das suas temperaturas de transição (T_g e T_m) [36]. A cristalinidade do polímero é assim de extrema importância pois vai influenciar inúmeras propriedades (dureza, rigidez, módulo e resistência à tensão, entre outras) [41]. A Tabela H.1., Anexo H, apresenta um conjunto de propriedades físicas e químicas dos estereoisómeros do PLA, com destaque para a sua solubilidade e para o tempo de degradação em ambiente salino [40].

1.5.4. Síntese e Modificação do PLA

Conhecem-se diversas vias de produção de PLA (Figura 1.8), já mencionadas anteriormente, nomeadamente:

1) Polimerização por policondensação direta (*direct polycondensation* ou *self-condensation*);

nesta via, o PLA é obtido em condições de vácuo e elevadas temperaturas, para que a água produzida seja removida por condensação. Podem

ser utilizados solventes orgânicos capazes de dissolver o PLA sem interferirem com a reação (*solution polycondensation*), ou sem adição de solvente (*melt polycondensation*), desde que a temperatura de reação permaneça acima da temperatura de fusão do polímero [36, 40, 45]. Os processos de produção de PLA por condensação representam a via menos dispendiosa e de controlo mais fácil, contudo é difícil obterem-se elevados pesos moleculares num sistema livre de solvente. Muitos são os parâmetros operatórios a ter em conta, nomeadamente: tempo de reação, catalisadores, temperatura, pressão, etc. [40]. A produção de PLA por *self-condensation* resulta em produtos de baixo peso molecular, com uma concentração equimolar dos grupos hidroxilo e carboxilo terminais. O baixo peso molecular é resultado essencialmente da viscosidade do polímero fundido, da presença de água e impurezas, da ausência de grupos terminais reativos, etc. [39, 40]. Para aumentar o peso molecular do PLA obtido por esta via, são usados agentes de acoplamento ou promotores de esterificação, o que acaba por encarecer o processo, tornando-o também mais complexo [39]. Outra estratégia para aumentar o peso molecular é a adição de agentes de transferência de cadeia, que reagirão preferencialmente com os grupos hidroxilo ou carboxilo [36, 39]. *Garlotta* [39] refere um conjunto de vantagens e desvantagens de cada uma dessas estratégias. Como agentes de transferência de cadeia poder-se-á ter isocianatos, epóxidos, peróxidos, anidridos, cloretos, fumáricos, etc. A desvantagem da utilização de isocianatos poderá ser a toxicidade associada aos grupos livres hidrolisáveis [39]. Trata-se de uma via de produção que, devido ao seu baixo custo, tem vindo a ser considerada cada vez mais promissora [40]. Na literatura, *Achmad et al.* (2009) demonstraram e reportaram a síntese de PLA por policondensação direta, sem catalisadores, solventes e iniciadores, com variações de temperatura de 150 a 250°C e variações de pressão (de atmosférica até vácuo), com um tempo de reação de 96h [36].

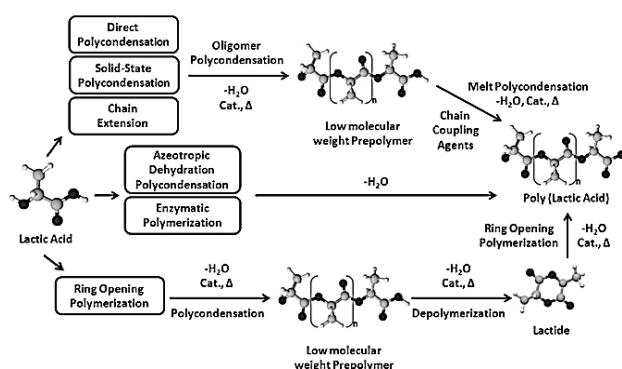


Figura 1.8 Diferentes vias de síntese de PLA (adaptado de [36, 37]).

2) Policondensação direta em solução azeotrópica ou condensação por desidratação azeotrópica (*azeotropic dehydrative condensation*): neste caso, pretende-se obter PLA de elevado peso molecular sem necessidade de usar agentes de acoplamento/ esterificação ou de transferência de cadeia. Contudo, as impurezas resultantes da utilização de catalisadores, e conseqüentemente a toxicidade associada aos mesmos, representam um claro obstáculo no processamento do PLA e na sua utilização em aplicações biomédicas [39].

3) Polimerização por abertura de anel, ROP (*ring-opening polymerization*): A produção de PLA por ROP dá origem a materiais com elevado peso molecular, recorrendo a catalisadores e iniciadores, sob uma atmosfera inerte (sendo esta a via mais utilizada comercialmente) [39, 40]. Com o controlo do tempo de reação e da temperatura em conjunto com o tipo de catalisador e sua concentração, é possível controlar a quantidade dos isómeros L(+) e D(-) no polímero final obtido. De referir que a polimerização por abertura de anel poderá ser aniónica ou catiónica (efetuadas geralmente na presença de solventes com graus de pureza bastante elevados), e ainda de coordenação (mais estudada pela investigação e comercialmente aplicada a larga-escala) ou radical-livre, consoante o sistema catalítico empregue no processo de produção [12, 36, 40]. O catalisador mais comum e utilizado a nível comercial é o octoato de estanho (e outros à base de estanho) por se conseguirem elevados pesos moleculares, e por este apresentar elevada solubilidade no estado fundido e estabilidade a temperaturas superiores [12]. Os catalisadores à base de estanho estão aprovados pela FDA, para aplicações biomédicas e de embalagens. No entanto, estes têm sido associados a problemas de toxicidade para com os tecidos nervosos e cerebrais, tornando-se inconvenientes nas aplicações referidas [12]. Existe assim um claro esforço de investigação de novos iniciadores e catalisadores à base de outros componentes que possam ser usados no processo em causa, a fim de garantir a biocompatibilidade dos materiais obtidos [12, 39, 40]. A produção de PLA por esta via requer ainda etapas de purificação do polímero obtido, por precipitação em solventes (geralmente tóxicos), o que mais uma vez não é desejável, pois será bastante difícil obter um material com as características desejadas para uso em contexto clínico. *Auras et al.* [37] apresentam uma importante revisão sobre as diversas vias de produção de PLA e os fatores a ter em conta.

Outros métodos (processos enzimáticos, polimerização assistida por micro-ondas e fluidos supercríticos) têm vindo a ser estudados para produzir PLA, contudo sem desenvolvimentos a nível industrial [12, 36, 37, 40]. Vantagens e desvantagens dos vários métodos de produção referidos poderão ser consultadas na Tabela I.1., Anexo I [40]. Resultado das desvantagens apresentadas na Tabela 1.3., e do seu preço também elevado comparativamente aos plásticos convencionais, não é surpreendente que *Xiao et al.* [40] mencionem que o PLA não tem tido o destaque que merece e a devida importância em determinadas aplicações. Contudo, a investigação tem tido um papel preponderante no sucesso da utilização do PLA em bens de consumo e em aplicações biomédicas. Esse sucesso, não depende apenas das propriedades mecânicas serem comparáveis (ou até melhores) face a polímeros como o PET, PE e PS, mas depende também das suas propriedades de superfície, nomeadamente: da rugosidade do material, hidrofobicidade e da sua reatividade funcional [44]. Uma vez que o PLA puro poderá causar respostas inflamatórias quando implantado nos tecidos vivos, é extremamente importante a sua modificação, para que se desenvolvam biomateriais com as propriedades requeridas [40]. Estratégias de modificação *bulk* têm sido estudadas e desenvolvidas para melhorar propriedades como a dureza do material e a sua taxa de degradação. Por sua vez, modificações ao nível da superfície (para melhorar propriedades como a hidrofobicidade e a introdução de grupos reativos nas moléculas de PLA) revelam-se de extrema importância para aplicações biomédicas [40, 44]. *Rasal et al.* [44] e *Xiao et al.* [40] apresentam assim excelentes revisões sobre os

estudos desenvolvidos até ao momento de modificação do PLA. No Anexo I, Tabela I.2., são apresentadas de forma sucinta as estratégias de modificação existentes e alguns estudos efetuados na área.

1.6. Aplicações do PLA na área biomédica

No setor industrial, algumas empresas produzem PLA para aplicações clínicas, nomeadamente: a *Polysciences Inc.*, a *Hycail, V. B.*, a *Boeringer Ingelheim* e a *Purac Biomaterials* [12]. A *Purac* é considerada a mais importante nesta área, com a produção de PLA sob o nome comercial PURASORB[®], com aplicações em suturas cirúrgicas biodegradáveis, implantes e dispositivos médicos, *scaffolds*, produtos de cosmética, sistemas de libertação controlada, entre outros (www.purac.com). Como adesivo, o PLA tem encontrado aplicação na indústria de embalagens e empacotamento, com alguns produtos conhecidos no mercado. *Rohm and Haas* representa uma das principais companhias neste setor, tendo introduzido no mercado dois tipos de adesivos de base PLA: um adesivo de base aquosa (Robond[™]PLA-WB) e outro de base num solvente (Adcote[™] PLA-SB) [25]. Também a *Dow* tem desenvolvido diferentes produtos/adesivos com aplicação em diferentes contextos: a gama ADCOTE[™] (adesivos de laminação e revestimentos para alimentos, aplicações médicas, industriais e de impressão) e a MOR-FREE[™] (www.dow.com). A *BASF Corporation*, por sua vez, comercializa uma gama de adesivos/filmes de base PLA de nome comercial Ecovio[®] e a *Natureworks LLC* apresenta diversos adesivos e filmes de PLA sob o nome Ingeo[™], destinados a aplicações alimentares e de empacotamento [25].

Na área biomédica, a aplicação do PLA como bioadesivo aplicado *in situ* em cirurgia e/ou regeneração de tecidos não tem sido alvo de um estudo muito exaustivo [12]. Tal facto deve-se a algumas propriedades que o PLA comercial (de elevado peso molecular) apresenta, nomeadamente: 1) uma temperatura de transição vítrea (T_g) relativamente elevada; 2) e baixa solubilidade em solventes não tóxicos, tornando assim limitado o seu uso como adesivo em contexto clínico [12, 26]. Assim, para que seja possível o desenvolvimento de bioadesivos não tóxicos, com elevado desempenho mecânico e com tempos de cura reduzidos à temperatura ambiente a partir do PLA (que é um material tão promissor), é necessário proceder-se à sua modificação a partir de monómeros funcionais, ou à formação de copolímeros (a partir de outros polímeros), de modo a atingir as propriedades desejadas [12, 26].

Para que os adesivos apresentem uma elevada velocidade de cura, à temperatura ambiente, é necessário sintetizar materiais com temperatura de transição vítrea relativamente baixa [11, 12, 26]. Como já mencionado, materiais com grupos terminais fotopolimerizáveis apresentam diversas vantagens face aos restantes [26]. Têm sido alguns os estudos de investigação e desenvolvimento de matrizes poliméricas, por reticulação térmica, química ou fotoquímica, a partir do ácido lático e seus copolímeros. Na preparação de adesivos, os estudos realizados focaram a avaliação de propriedades químicas, físicas e mecânicas dos materiais, colocando de parte a biocompatibilidade. Contudo, a preparação de matrizes poliméricas para aplicação em libertação controlada de fármaco ou para utilização em Engenharia de Tecidos (como *scaffolds*, hidrogéis, cápsulas) tem sido muito mais explorada.

Pretende-se assim reunir, na Tabela 1.4, alguns estudos realizados no âmbito do desenvolvimento de materiais de base PLA para aplicação como adesivos, apresentando os resultados mais significativos (e identificando limitações/lacunas a ser colmatadas). Também os estudos (e suas motivações) em sistemas de libertação controlada de fármaco e na área de Engenharia de Tecidos são revistos, fundamentando a enorme aplicabilidade do PLA na área médica.

Tabela 1.4 Estudos e aplicações do PLA e seus copolímeros em contexto clínico [12, 36, 40, 58].

BIOADESIVOS			
Polímero	Estudo/Aplicação	Resultados/Conclusões	Referências
PDLLA	<ul style="list-style-type: none"> - Síntese de pré-polímeros de base ácido lático (em forma de estrela), através de polimerização por abertura de anel (ROP); - Modificação com MAA e reticulação térmica a 90°C, por um período de 24h. 	<ul style="list-style-type: none"> - Obtenção de matrizes altamente reticuladas; - Necessária temperatura elevada devido à elevada T_g do oligómero funcionalizado, impossibilitando a sua aplicação como adesivo; - Para ser possível fotoreticulação (à temperatura fisiológica) foi usado como diluente 30% (m/m) de <i>dimethacrylated butanediol</i>. 	Helminen <i>et al.</i> [56]
PDLLA	<ul style="list-style-type: none"> - Síntese de pré-polímeros de poli (D,L-ácido lático) em forma de estrela, na presença de Sn(Oct)₂; - Funcionalização dos pré-polímeros com MAA e IEMA, a 120°C e 70°C, respetivamente; - Fotoreticulação na presença de <i>2,2-dimethyl-2-phenylacetophenone</i> (fotoiniciador). 	<ul style="list-style-type: none"> - Material com aspeto de um sólido vítreo à temperatura ambiente, com um peso molecular acima de 2000 g mol⁻¹; - Utilizado tolueno, THF e clorofórmio como solventes (considerados bastante tóxicos); - Biocompatibilidade dos materiais não foi investigada; - <u>Propriedades mecânicas:</u> <ul style="list-style-type: none"> ▪ <u>PDLLA-IEMA:</u> força de tensão de 19MPa e módulo de Young de 113-354 MPa; ▪ <u>PDLLA-MAA:</u> força de tensão de 7MPa e módulo de Young de 17 MPa; 	Karikari <i>et al.</i> [26]
PDLLA-PPG	<ul style="list-style-type: none"> - Síntese de oligómeros de poli (D,L-ácido lático-propileno glicol); - Funcionalização dos oligómeros com diferentes metacrilatos; - Fotoreticulação na presença de <i>camphorquinone</i> (CQ) e <i>N,N-dimethyl-p-toluidine</i> (DMPT). 	<ul style="list-style-type: none"> - Testadas diferentes quantidades de fotoiniciador. Materiais obtidos demonstraram elevada velocidade de cura (e uma reticulação completa); - Os materiais exibiram uma boa estabilidade (relativamente à sua degradação hidrolítica), com uma perda de massa de 19% em 14 semanas. Materiais considerados promissores para aplicação como adesivos injetáveis de longa duração; - Biocompatibilidade não foi investigada. 	Ho <i>et al.</i> [57]
PLA	<ul style="list-style-type: none"> - Síntese de oligómeros de poli (ácido lático) (lineares e em forma de estrela) por condensação direta, sem catalisadores; - Funcionalização dos oligómeros com MAA e IEMA, a 130 e 60°C respetivamente. - Fotoreticulação dos pré-polímeros funcionalizados na presença de Irgacure® 2959. 	<ul style="list-style-type: none"> - Testada uma quantidade de 6% de fotoiniciador (do número de moles de ligações de carbono duplas dos pré-polímeros modificados); - Materiais obtidos com valores de T_g considerados aceitáveis para aplicação como bioadesivos; - Tempos de reticulação considerados aceitáveis para aplicações <i>in situ</i> (2 min para pré-polímeros lineares e 3 min para pré-polímeros ramificados); - Todos os filmes revelaram ser hidroliticamente instáveis (adesivos PLA-MAA perderam aprox. 60% da sua massa, em 45 dias; adesivos PLA-IEMA perderam cerca de 20 a 30% da sua massa, no máximo, também em 45 dias); - Adesivos de PLA demonstraram uma capacidade de absorção de água moderada (<u>via IEMA:</u> 4% e 6% para linear e ramificado, respetivamente; <u>via MAA:</u> 10 e 29%, linear e ramificado respetivamente); - Todos os filmes demonstraram ser biocompatíveis em testes realizados <i>in vitro</i>, sem efeitos citotóxicos significativos (pré-polímeros funcionalizados com IEMA apresentaram ligeira citotoxicidade ao fim de 72h); - Não foram avaliadas propriedades mecânicas e de adesão a folhas de gelatina, nem se determinou a tensão superficial e energia de superfície das membranas por medição de ângulos de contacto; - Testes de adesão bacteriana, de hemocompatibilidade e ensaios <i>in vivo</i> também não foram realizados. - Propriedades térmicas não foram exploradas. 	Marques [12]

Tabela 1.4 (cont.)

SISTEMAS DE LIBERTAÇÃO CONTROLADA

Motivações:

A biocompatibilidade, biodegradabilidade, processamento a elevadas temperaturas e solubilidade em solventes orgânicos, aliados ao elevado desempenho mecânico, fazem do PLA um material de grande importância na produção de comprimidos, micro e nano cápsulas, entre outros sistemas (tridimensionais) que permitam a liberação controlada e específica de fármaco, proteínas, RNA/DNA, etc. Dado o perfil de degradação do PLA, a liberação poderá ocorrer num período de dias até anos. A grande desvantagem/limitação está na fraca funcionalidade química que impede uma melhor interação material/células e na sua hidrofobicidade, que limita a liberação de substâncias hidrofílicas, como proteínas. Baixa eficiência no encapsulamento e/ou elevada liberação de fármaco nas primeiras horas/dias são problemas comuns (devido essencialmente à desorção à superfície de moléculas hidrofílicas que apresentem fracas interações com o polímero). Estudos de introdução de grupos funcionais nos materiais tornam-se assim relevantes.

- Principais tipos de sistemas: Micro e nanopartículas e nanocompósitos, para tratamento de doenças como o cancro e úlceras. Têm sido estudados sistemas com respostas induzidas por alterações de temperatura, pH, substâncias químicas, sinais elétricos, etc..

Aplicações:

- Estudos de interesse (adaptado de [58] em parte):

- Preparação de nanopartículas de base PLGA para liberação controlada de ácidos nucleicos (DNA) como agentes terapêuticos em doenças genéticas, com melhorias na eficácia de liberação em locais específicos [40];
- Incorporação de *Daunorubicin* (fármaco anticancerígeno) em nanofibras de PLA (com nanopartículas de TiO₂), apresentando excelentes resultados na liberação controlada e específica em células de leucemia (k562);
- Incorporação de um novo fármaco (*Paclitaxel*) em nanopartículas de PLLA-PGA para quimioterapia do cancro de mama;
- Incorporação de *Cisplatin* (fármaco anticancerígeno de grande interesse) em microsferas de PLGA para patologia específica em pulmões, demonstrando uma boa liberação controlada;
- Preparação de microsferas de PLGA contendo *isopropylmyristate* apresentaram vantagens em tratamentos de quimioterapia, com liberação direcionada sobre o tumor;
- Incorporação de *Aclacinomycin* (também um fármaco anticancerígeno, com diversos efeitos secundários) em microsferas de PLA, que apresentaram uma liberação controlada durante 35 dias (em testes realizados *in vitro*);
- *Adriamycin* e *cisplatin* incorporados em micro formulações de PLA e PLGA demonstraram, segundo diversos investigadores, liberação controlada durante 30 a 57 dias (em testes *in vitro*) e 21 a 42 dias (em testes *in vivo*);
- Incorporação de diversos antibióticos em microsferas de PLGA tem sido estudada. Também diversos anti-inflamatórios têm sido alvo de estudo.

(Adaptado de [40] em parte)

Polímero	Estudo/Aplicação	Resultados/Conclusões	Referências
PLA-PEG	- Síntese de um sistema transportador de toxóide tetânico (usado para prevenir o tétano).	- O transporte foi melhorado através da mucosa nasal de ratos.	Vila <i>et al.</i> [59]
PLA	- Síntese de micro e nanoesferas de PLA para liberação de um fármaco anticancerígeno (o <i>Paclitaxel</i> , nome comercial: Taxol®) com aplicação em tumores do pulmão, ovários, mama, cérebro e garganta.	- Material proporcionou reduzida inflamação reumática em coelhos.	Jie <i>et al.</i> [60]
PLLA, PEG, PSD	- Desenvolvimento de um sistema de liberação controlada para tumores sólidos acídicos com dois componentes: uma micela polimérica com um núcleo de base PLLA e uma proteção hidrofílica de base PEG combinada com um peptídeo (TAT); e um copolímero de base PSD.	- O transportador final revelou-se capaz de proteger as micelas num nível de pH mais ácido (6,6), semelhante ao do tumor, comparativamente ao pH de 7,4; - O TAT penetrou dentro das células malignas e chegou mesmo à superfície do núcleo.	Sethuraman <i>et al.</i> [61]
PLA-CS	- Síntese de nanopartículas de base PLA revestidas com quitosano para aplicações tópicas oculares, com incorporação de <i>5-fluorouracil</i> (fármaco anticancerígeno), fazendo uso de diferentes concentrações e de PLA de diferentes pesos moleculares, para regular o tamanho das partículas.	- Experiências <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> (em olho de coelho); - As nanopartículas demonstraram uma liberação controlada de 5-FU, com uma concentração de fármaco no organismo maior, comparativamente a solução livre de 5-FU.	Nagarwal <i>et al.</i> [62]
PLA-PEG	- Síntese de nanopartículas de base PLA-PEG como sistemas transportadores de DNA para tratamento de doenças genéticas.	- As nanopartículas apresentaram uma eficiente e rápida internalização no organismo.	Liu <i>et al.</i> [63]

Tabela 1.4 (cont.)

Polímero	Estudo/Aplicação	Resultados/Conclusões	Referências
PLA-CS	<ul style="list-style-type: none"> - Síntese de nanopartículas a partir da combinação de PLA com quitosano como transportador de fármaco anticancerígeno em células humanas HepG2; - Precipitação do ácido lático em solução de quitosano por <i>dropping</i>. 	<ul style="list-style-type: none"> - Partículas de 100 a 200 nm; - Ensaios <i>in vitro</i> para estudar a liberação do fármaco; - Liberação controlada e contínua durante 10 dias, influenciada pelo pH do meio; - Citotoxicidade do fármaco para com as células malignas foi garantida: danos ocorridos na membrana da mitocôndria das células-alvo e morte celular por necrose; - Materiais sintetizados confirmaram uma forte atividade anti tumoral nos testes <i>in vitro</i>, sendo considerados promissores para um tratamento mais eficaz. 	Jeevitha <i>et al.</i> [64]
FILMES/ADESIVOS DE LIBERTAÇÃO CONTROLADA			
<p>Motivações: As micro e nanopartículas de base PLA ou PLGA têm sido bastante exploradas, porém existem algumas desvantagens, nomeadamente: capacidade de incorporação de fármaco reduzida, polidispersividade e fácil agregação [65]. Neste âmbito, filmes/adesivos para liberação controlada revelam-se potenciais candidatos no colmatar dessas limitações.</p>			
Polímero	Estudo/Aplicação	Resultados/Conclusões	Referências
PLGA	<ul style="list-style-type: none"> - Produção de filmes de PLGA incorporados com Ibuprofeno (ingrediente de elevada permeabilidade, mas reduzida solubilidade), por difusão do polímero na solução do fármaco; - Dissolução do PLGA e IBU em THF. 	<ul style="list-style-type: none"> - Controlo da razão ponderal do polímero e do fármaco permitiu obter diversos filmes com diferentes cargas incorporadas; - Ensaios <i>in vitro</i> confirmaram a viabilidade das películas produzidas para liberação controlada de fármaco; - Liberação de IBU dependente de diversos fatores: carga de fármaco e pH do meio; - Materiais considerados promissores para incorporação de outras substâncias. Método de produção considerado de fácil <i>scale-up</i>. 	Pang <i>et al.</i> [65]
ENGENHARIA DE TECIDOS			
<p>Motivações: Apesar das excelentes propriedades mecânicas que tornam os materiais metálicos úteis em diversos contextos clínicos (como implantes), a sua não-biodegradabilidade em ambiente biológico revela-se uma clara desvantagem para aplicações como <i>scaffolds</i>. Por sua vez, materiais cerâmicos, dada a sua reduzida processabilidade, também não são os mais adequados na produção de estruturas porosas em Engenharia de Tecidos. O PLA apresenta-se como uma alternativa eficaz, com propriedades muito importantes capazes de colmatar as necessidades identificadas, revelando-se de grande importância na produção de suportes (<i>scaffolds</i>), implantes e dispositivos internos [40]. As desvantagens são a sua hidrofobicidade e degradação lenta. Na maioria dos casos são necessárias estratégias de modificação [36, 40].</p>			
Polímero	Estudo/Aplicação	Resultados/Conclusões	Referências
PDLLA, PCL	<ul style="list-style-type: none"> - Foram sintetizadas macromoléculas fotopolimerizáveis, fazendo reagir polímeros com grupos terminais hidroxilo (PDLLA, PCL e TMC) com FAME, na presença de <i>N,N-dicyclohexylcarbodiimide</i> e <i>4-dimethylamino pyridine</i>, à temperatura ambiente. 	<ul style="list-style-type: none"> - Clorofórmio como solvente; - Material com uma consistência de líquido viscoso ou de um sólido pegajoso, à temperatura ambiente; - Propriedades térmicas, químicas e mecânicas avaliadas. Biocompatibilidade não foi investigada; - As redes poliméricas obtidas apresentaram um elevado teor de gel (até 96%) tendo sido consideradas promissoras em aplicações de Engenharia de Tecidos. 	Grijpma <i>et al.</i> [66]
PLGA	<ul style="list-style-type: none"> - Síntese de <i>scaffolds</i> de base PLGA para suportar a proliferação e diferenciação osteogénica dos osteoblastos. 	<ul style="list-style-type: none"> - Realizados testes <i>in vitro</i> para avaliar a regeneração óssea em coelhos; - Nos testes realizados, os suportes implantados permitiram a formação de novo tecido ósseo e a sua maturação ao longo de um período de 24 semanas. 	Ge <i>et al.</i> [67]
PLLA	<ul style="list-style-type: none"> - Síntese de um <i>scaffold</i> fibroso 3D de base PLLA (utilizando técnicas de <i>electrospinning</i>), seguindo-se um processo de expansão mecânica; - Utilização para proliferação dos osteoblastos. 	<ul style="list-style-type: none"> - Foram realizados testes <i>in vivo</i> que demonstraram a proliferação de células e formação de osso após 2 a 4 semanas do material implantado (tendo sido utilizado em coelhos). 	Shin <i>et al.</i> [68]
PDLLA	<ul style="list-style-type: none"> - Síntese de oligómeros PDLLA com grupos terminais hidroxilo por ROP, a 130°C, 40h, com 1,6-hexanodiol como iniciador e octoato de estanho como catalisador; - Funcionalização dos oligómeros com MAA; - Fotoreticulação dos oligómeros funcionalizados na presença de <i>Lucirin TPO-L</i> como fotoiniciador. 	<ul style="list-style-type: none"> - Materiais obtidos exibiram um perfil de degradação linear. As propriedades mecânicas foram preservadas por um período de tempo aceitável; - Considerados promissores em aplicações ortopédicas e regeneração de tecido ósseo. 	Melchels <i>et al.</i> [22]

Como foi observado, são muitos os estudos de síntese de diferentes materiais de base PLA como sistemas de libertação controlada de fármaco e como suportes em Engenharia de Tecidos. Em geral, a síntese dos materiais visa uma aplicação específica, que se pretende estudar e aprofundar. Ainda assim, a maioria das aplicações são testadas em ensaios *in vivo* em animais ou ensaios *in vitro*, sendo difícil extrapolar os resultados para o organismo humano [40]. Por sua vez, no que diz respeito à produção de adesivos de base PLA, os estudos desenvolvidos ao longo dos anos centraram-se essencialmente na síntese e avaliação de algumas propriedades, como já referido, sem associar aplicação terapêutica.

Em 2005, *Karikari et al.* [26] (Tabela 1.4) salientaram a necessidade de sintetizar materiais de base PLA com elevadas velocidades de cura à temperatura fisiológica, manifestando o interesse em aplicações cirúrgicas. Referiram ainda a importância do uso de plastificantes biocompatíveis na tentativa de diminuir a T_g dos materiais, reportando o PEG como o plastificante mais usado. Contudo, também destacaram que a mistura de PEG com PLA resultou em materiais altamente cristalinos, e por isso indesejáveis para aplicação como adesivos (baseando-se em estudos realizados por *McCarthy* e colaboradores). Desta forma, destacaram o estudo de *Hillmyer* e sua equipa na produção de copolímeros de ácido lático com óxido de etileno, resultando numa plastificação efetiva do PLA. Na síntese de pré-polímeros de PDLLA em forma de estrela, partiram assim do pentaeritritol etoxilato como iniciador, de modo a tirar partido das unidades de óxido de etileno (consideradas biocompatíveis, não-tóxicas, não-imunogénicas e solúveis em água), chegando a materiais que consideraram adequados para aplicação como líquidos viscosos [26]. A síntese do pré-polímero de PDLLA passou pela adição de DDLA juntamente com o pentaeritritol etoxilato num ambiente inerte, a 120°C, com adição do $\text{Sn}(\text{Oct})_2$ como catalisador, previamente dissolvido em tolueno. A reação de síntese decorreu durante 24h, procedendo-se posteriormente à dissolução do polímero em clorofórmio e precipitado diversas vezes em hexano/metanol [26]. Nas etapas de modificação do pré-polímero final, com os monómeros funcionais reativos IEMA e MAA, o tolueno ou o THF foram utilizados como solventes, envolvendo a posterior precipitação dos polímeros finais obtidos em hexano. Na adição do fotoiniciador aos pré-polímeros modificados, o solvente adicionado foi o clorofórmio. Em 2006, *Ho et al.* [57] sintetizaram adesivos de PDLLA-PPG (Tabela 1.4) para contribuírem com mais uma alternativa de adesivos de base ácido lático e glicol. Os pré-polímeros foram sintetizados numa atmosfera inerte, a 150°C, durante 6h, utilizando o octoato de estanho como catalisador. No final, foram dissolvidos em propano-2-ol, filtrados, secos e novamente dissolvidos em diclorometano, seguindo-se a funcionalização com cloreto de metacrilóilo, a uma temperatura de 0°C. Após 24h, foram sujeitos a purificação: lavagem em acetona, evaporação rotativa e extração em hexano. Apesar das estratégias mencionadas (utilizando solventes tóxicos), a biocompatibilidade dos materiais nunca foi questionada. Como tal, considera-se que a caracterização realizada foi insuficiente para inferir a possível utilização dos materiais em contexto clínico, sem problemas de toxicidade associados.

Em 2012 surgiu o desenvolvimento de novas estratégias de síntese e modificação do PLA (mais simples e eficazes) onde o objetivo máximo foi evitar a toxicidade dos materiais finais, podendo estes ser explorados na área médica como adesivos. Algumas técnicas de caracterização foram abordadas, no sentido de perceber a potencialidade dos adesivos produzidos em contexto clínico (*Marques* [12], Tabela 1.4.). Contudo, ainda há que complementar a avaliação de propriedades. Explorar novas vias de modificação do PLA revela-se também de grande importância. Desta forma, este trabalho surge, projetase e constrói-se com o objetivo de ser um contributo na investigação e desenvolvimento de materiais injetáveis e biocompatíveis, com a consciência do longo caminho a percorrer no estudo de aplicações específicas, até à possível implementação de novos produtos no mercado dos biomateriais.

CAPÍTULO 2

ESTRATÉGIAS E METODOLOGIAS

2. ESTRATÉGIAS E METODOLOGIAS

2.1. Introdução

A estratégia de investigação atualmente mais adotada na produção de materiais poliméricos fotopolimerizáveis para aplicação como adesivos assenta fundamentalmente em três etapas:

1. Seleção ou produção de um determinado polímero, sintético ou natural (com grupos terminais hidroxilo ou carboxilo);
2. Funcionalização dos grupos terminais do polímero com ligações de carbono duplas a partir de monómeros/oligómeros funcionais facilmente reativos que apresentem: 1) ligações de carbono duplas fotopolimerizáveis; 2) e grupos funcionais terminais;
3. Adição de um fotoiniciador e sua solubilização nos polímeros modificados, obtendo-se produtos líquidos, de adequada viscosidade, capazes de reticular quando sujeitos a radiação UV.

O principal objetivo no processo de produção deve centrar-se na tentativa de minimizar a toxicidade dos materiais finais obtidos. Assim, o desenvolvimento de estratégias e métodos de produção mais simples, sem catalisadores, solventes tóxicos e sem necessidade de etapas de purificação, torna-se um desafio cada vez mais importante e uma alternativa promissora face aos estudos experimentais já realizados. Contudo, é importante salientar que a biocompatibilidade dos materiais não está apenas relacionada com a sua composição química. Inúmeros fatores poderão interferir na interação material/células (como já referido na secção 1.1.1., do Capítulo 1). Ainda assim, cabe ao investigador tentar conceber formulações de modo a que a composição química dos materiais não seja um entrave às aplicações pretendidas.

Neste capítulo, apresenta-se de forma mais aprofundada o trabalho de síntese já desenvolvido e um conjunto de fundamentos práticos e aspetos pertinentes tidos em consideração na conceção do processo de produção dos adesivos a partir do ácido láctico, desde a síntese do polímero que constitui a formulação do adesivo até à sua fotoreticulação. No seguimento, definem-se os objetivos, motivações e metodologias do estudo experimental realizado nesta dissertação.

2.2. Trabalho desenvolvido: descrição detalhada do processo

Face aos estudos realizados, Marques [12] refletiu sobre diversas questões e decidiu contribuir com novas estratégias de síntese de oligómeros de base ácido láctico, sua posterior funcionalização e fotoreticulação, de modo a explorar a síntese de bioadesivos fotoreticuláveis, como já mencionado anteriormente. Desta forma, partiu dos conhecimentos e da colaboração do grupo de investigação do CIEPQPF, na área de Engenharia de Tecidos.

A primeira etapa do processo consistiu na produção do polímero base da formulação (PLA) a partir de ácido láctico, refletindo sobre a melhor estratégia de produção a adotar: 1) se por policondensação direta do ácido láctico; 2) ou se por abertura do anel do seu dímero cíclico na presença de um catalisador metálico (ROP). A maioria das publicações refere como principal desvantagem da policondensação do ácido láctico a obtenção de PLA de baixo peso molecular, apesar da simplicidade do processo de produção e dos custos reduzidos, como já discutido anteriormente [36 – 45]. Assim, referem o interesse na obtenção de PLA de elevado peso molecular por ROP, por se conseguir um polímero com melhores propriedades mecânicas e com maior versatilidade em diferentes aplicações [39, 40, 69]. Todavia, a modificação de

PLA de elevado peso molecular resultaria à partida num sólido vítreo à temperatura ambiente e inadequado para a sua utilização como bioadesivo, com um valor de T_g superior ao pretendido [26, 56]. A síntese de PLA de baixo peso molecular por policondensação pareceu preferível, obtendo-se um polímero no estado líquido, de baixa viscosidade. Para além disso, PLA de baixo peso molecular conduziria a materiais com tempos de degradação menores em ambiente biológico, considerado útil nas aplicações pretendidas [12, 44].

Assim, a estratégia implementada consistiu na obtenção de pré-polímeros tequélcos de baixo peso molecular com diferentes formas/arquiteturas (linear e ramificada) por policondensação direta do ácido láctico L(+) em solução aquosa, sem a presença de iniciadores, catalisadores e solventes tóxicos, operando apenas com temperaturas mais elevadas e maiores tempos de reação [12]. Ambos os isómeros do ácido láctico (L(+) ou D(-)) poderiam ter sido utilizados no processo. Porém, o isómero D(-) apresenta baixa compatibilidade com o organismo, contrariamente ao isómero L(+), razão pela qual se escolheu este último na síntese dos pré-polímeros [12, 39].

A estrutura molecular dos oligómeros obtidos foi controlada através do tipo de co-monomero utilizado (que se adicionou à solução de ácido láctico no início da polimerização). Os co-monomeros poderiam ser qualquer composto com pelo menos dois grupos funcionais, capazes de reagir por condensação com o ácido láctico, a fim de se obter um polímero com grupos terminais hidroxilo ou carboxilo, sem que fosse necessária a presença de catalisadores ou houvesse libertação de subprodutos tóxicos para a mistura. Da diversidade de co-monomeros existentes que contêm dois grupos hidroxilo, utilizou-se o 1,4-Butanodiol (BD) na preparação de oligómeros de estrutura linear (PLA). Por sua vez, na obtenção de oligómeros ramificados (StarPLA), utilizou-se o Pentaeritritol (mPET), que apresenta quatro terminais hidroxilo [12, 21]. O fator preponderante na extensão da reação e no controlo do peso molecular dos polímeros esteve na remoção de água do sistema [12, 38]. Na Figura 2.1 apresenta-se o mecanismo geral da reação de policondensação direta do ácido.

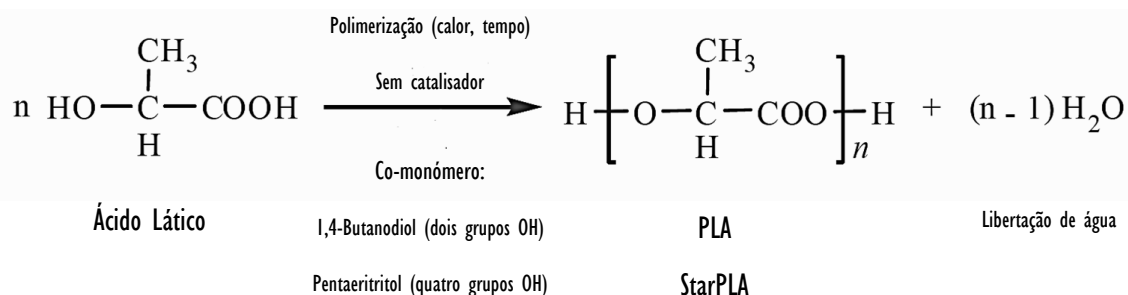


Figura 2.1 Mecanismo geral da reação de policondensação direta do ácido láctico: estratégia de produção sem catalisadores [12] (representação esquemática da reação em [40]).

Após a remoção total de água do sistema, os oligómeros obtidos foram funcionalizados com ligações de carbono duplas, através da adição de diferentes monómeros funcionais. Nesta etapa, a preferência deve ser dada a monómeros altamente reativos com os grupos terminais dos oligómeros de ácido láctico, usufruindo o máximo da temperatura e do tempo, evitando também catalisadores. Alterando a funcionalidade dos grupos terminais dos pré-polímeros, consegue-se manipular a estrutura dos mesmos, o peso molecular e a sua reatividade [70]. A polimerização ocorre por reação covalente gradual (ou em

etapas), entre os monómeros bifuncionais. Como agentes de funcionalização, constatou-se a forte exploração e utilização de derivados de acrilatos, metacrilatos e fumáricos [70].

Da diversidade de monómeros existentes, observou-se que os mais comuns nos estudos revistos eram o anidrido metacrílico (MAA) da família dos anidridos, e o metacrilato de 2-isocianoetilo (IEMA), da família dos isocianatos, que conduzem a elevados rendimentos, geralmente com um consumo total de monómero. Deste modo, utilizou-se os dois monómeros referidos nas reações de funcionalização. Mais uma vez não foram usados catalisadores, com sacrifício dos tempos de reação. As temperaturas das reações foram estabelecidas tendo por base a investigação de *Karikari et al.* [26] e os pontos de ebulição dos monómeros funcionais em causa. No caso em que o monómero funcional se revelou insolúvel no pré-polímero, foi adicionado um solvente orgânico (éter dietílico, de baixa toxicidade), para promover uma mistura adequada [12].

Na reação de modificação do MAA com cada terminal OH presente nos oligómeros de ácido lático, esperou-se a obtenção do ácido metacrílico, que sofreu uma reação de esterificação com outros terminais OH disponíveis, introduzindo-lhes também ligações de carbono duplas. Com a libertação de água no sistema reacional, foram definidas condições de temperatura adequadas e uma montagem experimental, conducentes a um rendimento de reação elevado. Na reação de modificação dos oligómeros com o IEMA, os grupos isocianato reagiram com os grupos hidroxilo sob o aumento de temperatura, formando-se ligações uretanas nos pré-polímeros, Figura 2.2. Uma vez que os isocianatos reagem violentamente com a água, foram também estabelecidos os cuidados adequados, para evitar a entrada de humidade no sistema reacional.

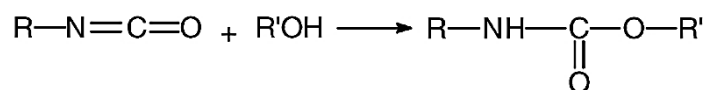
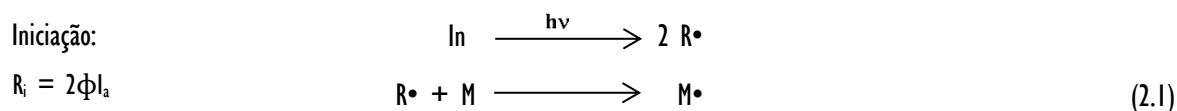


Figura 2.2 Mecanismo geral da reação de um grupo isocianato com um grupo hidroxilo, formando-se uma ligação uretana [4].

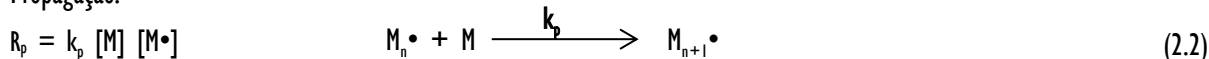
Os fatores considerados preponderantes nesta fase do processo foram por isso: 1) o estabelecimento de condições de temperatura e pressão adequadas ao monómero em causa; 2) o tempo da reação de modificação; 3) solvente utilizado no processo (se necessário, de baixa toxicidade); 4) quantidade de solvente a adicionar; 5) e viscosidade do produto obtido.

Introduzidas as ligações duplas nos terminais dos pré-polímeros, estes foram finalmente fotoreticulados, obtendo-se materiais com elevada velocidade de reação de cura em condições ambientais, assegurando utilidade em aplicações *in situ* [12]. Para tal, utilizou-se o Irgacure® 2959 (Ir 2959) como fotoiniciador.

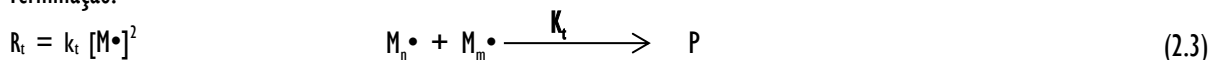
A fotopolimerização radicalar-livre permitiu que os pré-polímeros modificados (com alguma viscosidade) se transformassem em matrizes sólidas tridimensionais, num curto período de tempo. O processo seguiu as características de uma polimerização em cadeia, envolvendo três etapas: fotoiniciação, propagação e terminação, tal como é apresentado nas Equações 2.1 a 2.3, respetivamente [23, 70 – 72].



Propagação:



Terminação:



O fotoiniciador absorveu energia na presença de luz UV e excitou-se, dando origem a radicais que quebraram consecutivamente as ligações duplas de carbono existentes nos oligómeros de base ácido lático fotopolimerizáveis, formando-se longas cadeias reticuladas (Capítulo 1, secção 1.3.) [23, 70]. A taxa de polimerização (R_p) como medida da taxa de consumo das ligações duplas durante a polimerização, depende da concentração de ligações de carbono duplas existentes e da concentração de radicais [23]. A modificação dos pré-polímeros base com diferentes monómeros influenciou assim a concentração final de ligações duplas existentes (dependendo do rendimento das reações de modificação), assim como a quantidade adicionada de fotoiniciador influenciou a concentração de radicais existente, quando os produtos foram irradiados por UV. O tempo de irradiação considerou-se um fator preponderante na terminação do processo de fotopolimerização, Figura 2.3. Em cada etapa foram obtidos produtos líquidos com alguma viscosidade (adequada à aplicação). Na escolha do solvente a adicionar, a baixa toxicidade foi mais uma vez uma prioridade, utilizando-se novamente éter dietílico. Não houve necessidade de etapas de purificação aos materiais finais obtidos. Posto isto, os aspetos considerados fundamentais no processo de fotopolimerização foram: 1) quantidade de fotoiniciador utilizada (da qual dependeu a taxa de iniciação e de polimerização); 2) tempo de irradiação UV a que se sujeitou o material; 3) e monómero funcional utilizado (de modo a prever a quantidade de ligações duplas presente nos pré-polímeros modificados) [23].

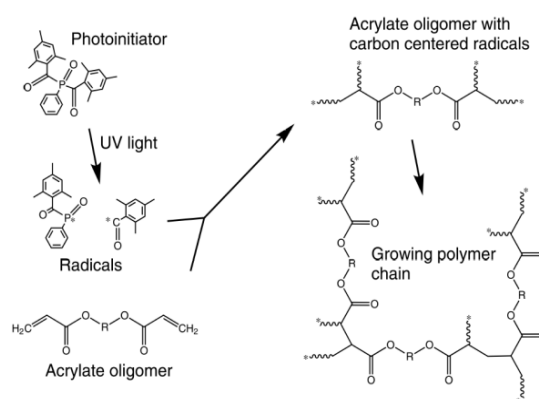


Figura 2.3 Exemplo de um processo de fotopolimerização (adaptado de [73]).

2.3. Metodologia Experimental

Com base nas estratégias implementadas de síntese de bioadesivos a partir de ácido lático surgiu a necessidade de explorar melhor as suas propriedades e, se possível, alargar a gama de adesivos, desenvolvendo novas estratégias de modificação dos pré-polímeros sintetizados. O trabalho experimental desenvolvido nesta dissertação consistiu assim numa parte de reprodução de trabalho anterior e noutra de nova síntese de materiais. O foco principal esteve na caracterização de todos os materiais sintetizados, no sentido de inferir a potencialidade dos adesivos em aplicações cirúrgicas e na regeneração/reparação/reconstrução dos tecidos biológicos (externos ou internos).

2.3.1. Reprodução da síntese e caracterização dos adesivos de base ácido lático

Como trabalho de continuidade, o objetivo foi sintetizar novamente os adesivos fotoreticuláveis (apostando na produção de PLA de estrutura linear). As etapas de síntese do oligómero linear, funcionalização (com MAA e IEMA) e fotoreticulação foram executadas partindo dos protocolos já

definidos, respeitando as condições de operação estabelecidas. A quantidade de fotoiniciador fixou-se nos 6% do número de moles de ligações duplas dos pré-polímeros modificados, com a consciência que a manipulação desta quantidade permitiria um estudo interessante sobre a morfologia e estrutura final dos adesivos. Ainda assim, a quantidade de 6% resultou de um estudo prévio feito por Marques [12] para obter tempos de reticulação considerados aceitáveis em contexto cirúrgico (inferiores a cinco minutos). As motivações incidem por isso na avaliação da reprodutibilidade do estudo e no complementar de inúmeras propriedades/características dos adesivos (que ainda não foram avaliadas).

2.3.2. Seleção de monómeros funcionais, produção e caracterização de novos adesivos de base ácido láctico

Teve-se ainda como objetivo a escolha de novos monómeros funcionais para modificar o pré-polímero linear sintetizado. Cada monómero funcional vai conferir diferentes características aos materiais finais obtidos. Neste sentido, a caracterização dos mesmos considera-se bastante pertinente, pois permite conhecer e comparar os materiais sintetizados. Este trabalho apresenta assim um carácter inovador, na procura por novas soluções capazes de alcançar os seguintes requisitos:

✓ Bons tempos de reticulação (elevada velocidade de cura):

É de grande importância a produção de materiais que solidifiquem rapidamente em condições fisiológicas. Em contexto cirúrgico, por exemplo, quanto menor for o tempo de cura, mais fácil é a aplicação por parte do profissional e mais económica será a técnica (pois será preciso um menor tempo de fotopolimerização). Desenvolver novas formulações através do PLA que permitam chegar a adesivos com tempos de reticulação iguais ou menores aos já obtidos (para a mesma quantidade de fotoiniciador), poderá ser uma mais-valia em futuras aplicações.

✓ Redução do tempo da reação de modificação:

Na escolha de monómeros altamente reativos com os grupos OH, pode-se conseguir uma diminuição do tempo da reação de modificação do oligómero linear, sem adição de catalisadores, tornando esta etapa mais rápida e sobretudo mais económica (reduzindo-se gastos energéticos associados ao processo de produção).

✓ Bom desempenho na sua função:

- Desenvolver materiais com um bom desempenho mecânico (igual ou superior) relativamente aos já existentes (com particular atenção à sua flexibilidade), sem comprometer a biocompatibilidade;
- Permitir uma boa integração dos adesivos com os tecidos vivos, garantindo a adesão aos mesmos;
- Preservar a capacidade de degradação em ambiente biológico, de forma a não comprometer: 1) o carácter temporário de uma determinada aplicação; 2) e o carácter não-invasivo do material;
- Garantir a não-toxicidade dos materiais;
- Permitir uma boa regeneração celular e a integridade dos tecidos e plasma sanguíneo.

Na escolha de novos monómeros teve-se em conta diversos critérios de seleção, baseados num compromisso: os monómeros funcionarem na prática, garantindo que os materiais finais obtidos não seriam tóxicos. Na Figura J.1, Anexo J, apresenta-se um esquema que exemplifica a estratégia de

pesquisa efetuada para a escolha de novos monómeros, e os critérios tidos em consideração. Optou-se por escolher monómeros da família dos isocianatos para a funcionalização do PLA linear. A escolha incidiu sobre o Laromer® LR 9000 (produzido e comercializado pela BASF⁷) e o 3-isopropenil- α , α -dimetilbenzil isocianato (TMI), associados à indústria dos revestimentos/adesivos. A comparação de materiais resultantes da modificação do PLA por três monómeros funcionais da mesma família (IEMA, LAR e TMI) revelou-se desde logo um dos pontos a focar neste trabalho, razão pela qual se definiu como objetivo principal a forte exploração das suas propriedades.

O Laromer® LR 9000 (LAR) é um isocianato funcional, uma resina acrílica insaturada, de base diisocianato de hexametileno, associado à indústria de revestimentos de superfícies. Foi especialmente concebido pela BASF, inserindo-se numa gama de produtos para aplicações “*dual-cure*” (reticulação fotoquímica e térmica). Alguns estudos neste âmbito podem ser revistos [74, 75]. É utilizado essencialmente em combinação com resinas com grupos terminais hidroxilo, como os poliésteres (por ser extremamente reativo na sua presença).⁸ Apresenta duas ligações duplas de carbono terminais (C=C) e dois grupos isocianato livres (N=C=O). Fornecedores referem a capacidade de melhorar propriedades dos materiais, como a adesão às superfícies, conferindo-lhes também uma maior flexibilidade (dado o comprimento da sua cadeia). A biocompatibilidade poderá ser um desafio, ainda assim as propriedades mecânicas que este poderá conferir aos materiais finais poderão ser relevantes. De notar que, na literatura, este monómero não se encontra associado à área médica, nem existem muitos estudos sobre o mesmo. A sua exploração na produção de um novo adesivo biológico revela-se por isso um desafio interessante, podendo vir a representar uma importante inovação no mercado dos bioadesivos. O facto de ter dois grupos isocianato confere-lhe elevada versatilidade de reação, permitindo a manipulação de diferentes proporções de PLA e LAR de forma a obter materiais finais com propriedades diferentes.

O TMI, tal como o IEMA, apresenta um grupo isocianato extremamente reativo com grupos hidroxilo e uma ligação de carbono dupla terminal (fotopolimerizável). Apresenta porém um anel benzénico, tendo por isso características diferentes. Ambos foram testados na produção de oligómeros para aplicações na área de Engenharia de Tecidos. No estudo em causa, *Lee et al.* [76, 77] referiram que os oligómeros preparados apresentaram excelentes resultados de adesão em diferentes tecidos (osso, dentes e outros), com estudos de biocompatibilidade em curso. Dadas as suas características e ao facto de estar associado à área médica, seleccionou-se também este monómero para a modificação do PLA. As estruturas químicas dos novos monómeros funcionais (LAR⁹ e TMI¹⁰) são apresentadas na Figura 2.4.

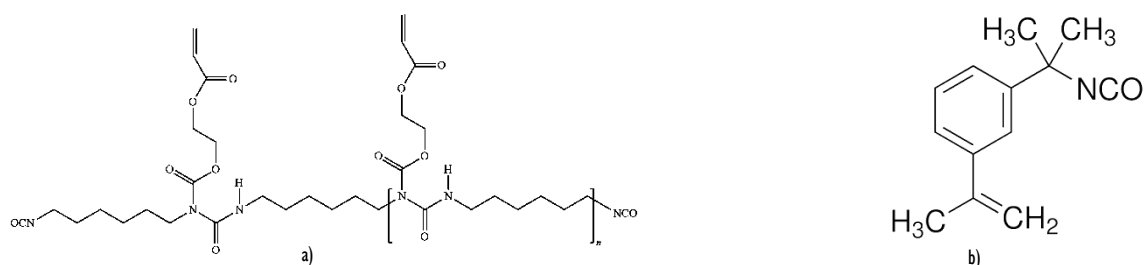


Figura 2.4 Estruturas químicas dos novos monómeros funcionais: **a)** LAR; **b)** TMI.

⁷ Informações sobre a gama de produtos em: <http://www.basf.com/group/corporate/en/brand/LAROMER>.

⁸ Informações sobre o Laromer® LR 9000 (LAR) estão disponíveis na ficha técnica de identificação do produto, disponibilizada pela BASF Corporation.

⁹ Estrutura molecular do LAR retirada da patente US 20120088879 A1. Referência: <http://www.google.com/patents/US20120088879>

¹⁰ Estrutura molecular do TMI retirada de *Sigma-Aldrich*. Referência: <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/aldrich/361771?lang=pt®ion=PT>.

CAPÍTULO 3

MATERIAIS E MÉTODOS

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Materiais

A solução aquosa de ácido láctico L(+) (80%), o co-monomero 1,4-butanodiol (BD) (99%) e o monómero anidrido metacrílico (MAA) (94%) foram adquiridos à *Sigma-Aldrich* (Sintra, Portugal) e utilizados como fornecidos, sem purificação. Os monómeros metacrilato de 2-isocianoetilo (IEMA) (98%) e 3-isopropenil- α , α -dimetilbenzil isocianato (TMI) (95%), produzidos pela TCI (Bélgica), foram adquiridos à própria e também usados como fornecidos. Por sua vez, o monómero Laromer® LR 9000 (LAR) foi gentilmente disponibilizado pela BASF (Alemanha) e utilizado nas mesmas condições. O éter dietílico (99%), utilizado como solvente, foi adquirido à *ACROS Organics*. O fotoiniciador 2-hidroxi-1-[4-(2-hidroxietoxi)fenil]-2-metil-1-propanona, com o nome comercial de Irgacure® 2959 (97-99%) foi também fornecido pela BASF (Alemanha) e utilizado como recebido.

Os reagentes formamida (99%), etilenoglicol (99,8%) e propilenoglicol (99,5%) foram adquiridos à *Sigma-Aldrich* (Sintra, Portugal) e utilizados em ensaios de caracterização. Os reagentes di-hidrogenofosfato de potássio (99,5%) e cloreto de cálcio (99,5%), da CHEM-LAB, cianeto de potássio (97%), da *ACROS Organics*, ferrocianeto de potássio (99%) e formol (37%, estabilizado com metanol), da *Sigma-Aldrich*, e o tensioativo não iónico Triton X®-100 (*proanalysis*, *Sigma-Aldrich*) foram utilizados nos ensaios de hemocompatibilidade. As pastilhas de PBS¹¹ foram adquiridas à *Sigma-Aldrich*. O sangue ACD-A de coelho, também utilizado nos testes de hemocompatibilidade, foi fornecido pela PROBIOLÓGICA (Empresa de Produtos Biológicos, Lda.) (Lisboa, Portugal) e utilizado no mesmo dia em que foi recebido. Na lavagem de material, foi utilizado clorofórmio (99,9%), produzido e comercializado pela JMGS (Portugal). No Anexo K, Tabelas K.1 e K.2, apresentam-se os principais reagentes utilizados, respetivas fórmulas e estruturas químicas, propriedades, riscos/perigos associados e procedimentos de segurança no seu manuseamento.

3.2. Síntese

3.2.1. Síntese do pré-polímero de base ácido láctico

Na primeira etapa foi sintetizado o pré-polímero de estrutura linear, por destilação do ácido láctico. Adicionou-se 100 mL da solução aquosa de ácido láctico L(+) num balão de fundo redondo de três tubuladuras com a capacidade máxima de 250 mL. Adicionou-se de seguida aproximadamente 16 mL de 1,4-butanodiol (BD), de acordo com a estequiometria da reação (Figura 3.1) e pesos moleculares de reagentes e produto.

Adicionados os reagentes, fechou-se cuidadosamente a tubuladura central do balão com uma rolha de vidro, conectando um adaptador de redução numa das tubuladuras laterais, para remover a água libertada do sistema. Na outra tubuladura lateral do balão, ligou-se uma corrente contínua de azoto, com caudal constante, a fim de garantir um ambiente inerte. O balão foi imerso num banho de óleo, termostaticado à temperatura de 150°C, isolando-se a parte superior do sistema com papel de alumínio. As reações de síntese de PLA decorreram, com agitação magnética e alimentação contínua de azoto, por um período de

¹¹ PBS – Phosphate buffered saline – uma pastilha dissolvida em 200 mL de água destilada produz uma solução tampão fosfato 0,01M, 0,0027M cloreto de potássio e 0,137M cloreto de sódio, pH 7,4, 25°C.

aproximadamente 9h. O produto obtido foi devidamente armazenado, em local fresco e seco, para posterior funcionalização.

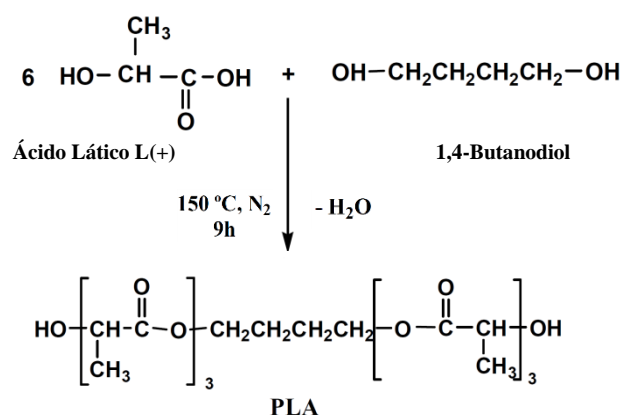


Figura 3.1 Representação esquemática da reação de síntese de PLA de estrutura linear, por policondensação do ácido lático.

3.2.2. Funcionalização do pré-polímero

Produzido o pré-polímero (PLA), procedeu-se à sua funcionalização/modificação com quatro monómeros diferentes (MAA, IEMA, LAR e TMI), de modo a obter novas moléculas que a partir de agora serão designadas por PLA-MAA0, PLA-IEMA0, PLA-LAR0 e PLA-TMI0, respetivamente. A funcionalização dos pré-polímeros com os diferentes monómeros envolveu diferentes procedimentos, sendo descritos de seguida.

3.2.2.1. Modificação com Anidrido Metacrílico (MAA)

Para proceder à modificação do PLA com MAA, adicionou-se uma dada quantidade do pré-polímero (\approx 0,01 moles) num balão de duas tubuladuras de capacidade máxima de 100 mL. Adicionou-se de seguida MAA, tendo em conta um rácio molar de 1:2 (MAA:OH). A reação em causa é apresentada na Figura 3.2.

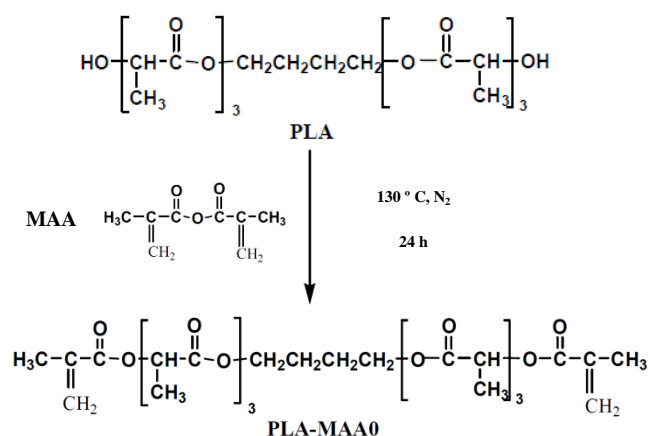


Figura 3.2 Representação esquemática da reação de funcionalização do PLA com MAA.

Adicionados os reagentes, colocou-se um adaptador de redução numa tubuladura, para remoção da água durante a reação de esterificação. De seguida, o balão foi colocado num banho de óleo, à temperatura de 130°C. O ambiente inerte foi garantido assim que se iniciou a montagem do sistema reacional e durante toda a reação, tendo sido ligada uma corrente de azoto. Estabilizada a temperatura, as reações decorreram,

sob agitação magnética, e com forte alimentação contínua de azoto, por um período de 24h. Tratando-se de reações de esterificação, e uma vez que não se usou catalisador, a temperatura de reação foi mais elevada, assim como o tempo de reação. O polímero modificado obtido (PLA-MAA0) foi devidamente armazenado no frigorífico, em local escuro, de modo a estar protegido da luz visível, até se proceder à etapa seguinte.

3.2.2.2. Modificação com Metacrilato de 2-isocianoetilo (IEMA)

De forma a estabelecer uma razão equimolar com os grupos terminais OH do pré-polímero, o IEMA foi adicionado numa proporção de 2 moles para cada 1 mol de PLA. A reação de modificação é apresentada na Figura 3.3. Utilizou-se o éter dietílico como solvente essencialmente por duas razões: 1) baixo ponto de ebulição, ou seja, elevada volatilidade (o que se traduz na facilidade de secagem do material final); 2) e baixa toxicidade (fundamentalmente importante para as aplicações que se pretende explorar, como já referido).

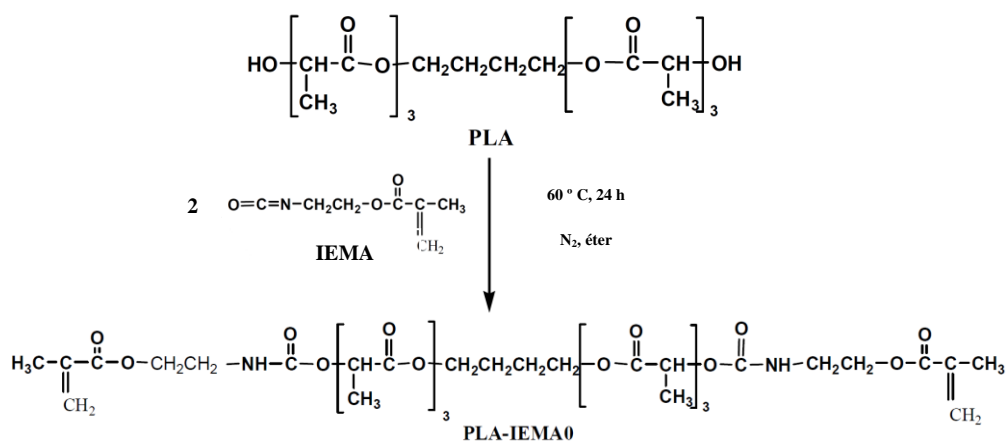


Figura 3.3 Representação esquemática da reação de funcionalização do PLA com IEMA.

Introduziu-se o PLA ($\pm 0,01$ moles) num balão de três tubuladuras, de 100 mL, adicionando-se 5 a 8 mL de éter dietílico para promover a dissolução do IEMA. Numa das tubuladuras laterais do balão foi ligada uma corrente contínua de azoto, para garantir o ambiente inerte no interior do mesmo. A outra tubuladura foi fechada imediatamente, para não se evaporar o solvente adicionado. Na tubuladura central, foi montado um condensador para que a reação fosse conduzida com refluxo de solvente, uma vez que o éter dietílico é bastante volátil. No topo do condensador, colocou-se uma torre de secagem (com cloreto de cálcio) para prevenir e evitar a entrada de humidade no sistema reacional. Finalmente adicionou-se o volume necessário de IEMA ($\approx 0,02$ moles) da forma mais cuidadosa e rápida possível, para evitar a entrada de humidade do ar. O IEMA reage fortemente com a água, correndo o risco de se perder os grupos isocianato necessários para a introdução de ligações duplas nas extremidades do PLA. É por isso muito importante que o procedimento seja executado com rapidez e segurança. A temperatura da reação foi mantida a 60°C , por um período de aproximadamente 24h. O produto final de cada ensaio foi protegido da luz (com papel de alumínio) e armazenado em local fresco, até se proceder à etapa seguinte.

3.2.2.3. Modificação com Laromer® LR 9000 (LAR)

Foram testadas duas modificações diferentes dos grupos hidroxilo presentes no pré-polímero de base ácido láctico, dada a versatilidade de reação do monómero/oligómero LAR. No primeiro caso, procedeu-se

à adição de 1 mol de LAR por cada 2 moles de PLA, de modo a ter um consumo total dos grupos isocianato presentes na molécula de LAR (por reação destes com os terminais OH disponíveis). O procedimento experimental executado foi muito semelhante ao que foi descrito para a via de funcionalização com IEMA, pelo que não é novamente descrito.

No segundo caso, adicionou-se 1 mol de LAR por cada 1 mol de PLA. A adição destes na proporção de 1:1 permitiu a reação de um grupo isocianato com um dos terminais OH do PLA, sem existir à partida um consumo total de grupos isocianato. Pretendeu-se testar a modificação de PLA com LAR nesta proporção, a fim de se obter um produto com “dupla função”: 1) por um lado ter ligações de carbono duplas fotopolimerizáveis; 2) por outro ter grupos isocianato livres pendentes que poderão promover uma forte adesão aos tecidos (por reação com proteínas aminas presentes no organismo).

O procedimento experimental foi também semelhante ao descrito em 3.2.2.2., com exceção da quantidade de solvente utilizada e do tempo da reação de modificação. O facto de se juntar o LAR com o PLA na mesma proporção exigiu uma quantidade de solvente significativa (≈ 60 a 80 mL) para a quantidade de PLA em causa, de forma a obter um produto com viscosidade adequada. Todavia, a grande vantagem esteve na redução do tempo de modificação, uma vez que as reações decorreram apenas durante aproximadamente 4h (também a uma temperatura de 60°C e com alimentação contínua de azoto). As reações são apresentadas na Figura 3.4. As estruturas finais dos pré-polímeros modificados foram concebidas considerando como molécula principal o LAR (ao qual se juntou o PLA por reação dos grupos hidroxilo com os grupos isocianato).

Tendo-se obtido dois pré-polímeros modificados diferentes, a nomenclatura a partir de agora será: PLA-LAR02:1 (para a proporção de 2:1) e PLA-LAR01:1 (para a proporção 1:1). Os produtos foram protegidos da luz até à etapa seguinte.

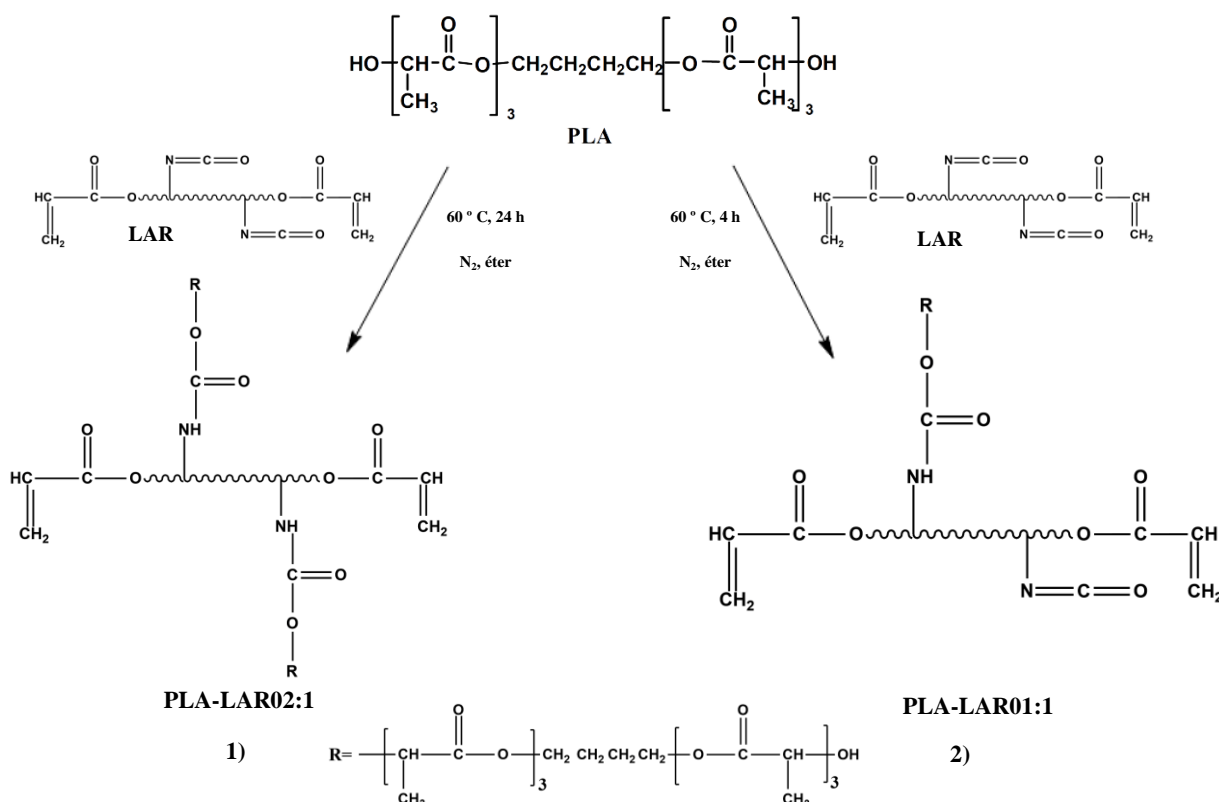


Figura 3.4 Representação esquemática da reação de funcionalização do PLA com LAR: **1)** Adição de 2 moles de PLA por cada 1 mol de LAR; **2)** Adição de 1 mol de PLA por cada 1 mol de LAR.

3.2.2.4. Modificação com 3-isopropenil- α , α -dimetilbenzil isocianato (TMI)

O TMI foi adicionado ao PLA numa proporção de 2 moles por cada 1 mol de PLA, como o IEMA, de modo a ter as duas extremidades do PLA com ligações duplas. O procedimento realizado foi também muito semelhante ao executado para a via de modificação do IEMA, com exceção da quantidade de éter dietílico adicionada, 20 a 30 mL. A adição do TMI ao sistema foi executada de forma cuidadosa, por ser altamente reativo e tóxico. Na Figura 3.5 apresenta-se o esquema reacional em causa.

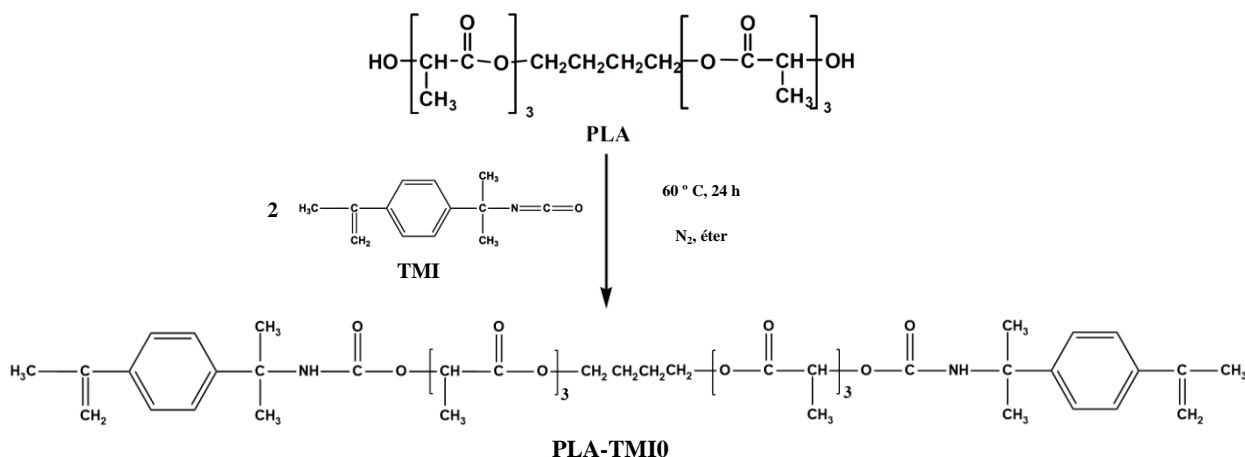


Figura 3.5 Representação esquemática da reação de funcionalização do PLA com TMI.

3.2.3. Reticulação fotoquímica dos polímeros funcionalizados

Obtidos os pré-polímeros PLA-MAA0, PLA-IEMA0, PLA-LAR02:1, PLA-LAR01:1 e PLA-TMI0, adicionou-se a cada o fotoiniciador Irgacure® 2959 (Ir 2959).

Na maioria dos casos, o Ir 2959 foi adicionado às soluções assim que terminada cada reação de modificação. Uma vez desconhecida a percentagem ótima de Ir 2959 a adicionar, estabeleceu-se uma percentagem de 6% do número de moles de ligações de carbono duplas existentes em cada molécula modificada [12]. Essa quantidade foi fixada para todos os pré-polímeros modificados obtidos neste trabalho, de modo a estabelecer uma comparação direta de propriedades entre adesivos de base PLA obtidos a partir da mesma quantidade de fotoiniciador. A manipulação desta quantidade interfere com a estrutura final do adesivo e com os tempos de reticulação do material final, sendo de grande importância no futuro a sua otimização, tendo em conta uma dada aplicação. De referir que a quantidade de 6% foi sempre calculada em relação ao número de moles de monómero presente na solução, admitindo-se por isso que é igual ao número de moles de ligações duplas existente no polímero final. Para adicionar o fotoiniciador, duas estratégias foram possíveis: 1) dissolução prévia do Ir 2959 num volume conhecido de éter dietílico à temperatura ambiente (5 a 20 mL, dependendo do pré-polímero modificado), e posterior adição à solução de polímero até se obter uma mistura homogénea; 2) ou então adição do Ir 2959 diretamente ao produto, e o éter dietílico logo de seguida.

Adicionado o fotoiniciador, manteve-se o sistema a uma temperatura de 60°C, com refluxo de solvente, e agitação magnética contínua, pelo período de tempo necessário à sua solubilização total, até se obter uma mistura homogénea (variável, máx. 24h). Obtiveram-se produtos finais (PLA-MAA, PLA-IEMA, PLA-

LAR2:1, PLA-LAR1:1 e PLA-TMI) de diferentes viscosidades e aspeto transparente. Estes foram transferidos para frascos escuros ou os balões envolvidos em papel de alumínio, de forma a ficarem protegidos da luz (para evitar reticulação).

Preparadas as soluções finais, procedeu-se à fotoreticulação, recorrendo a uma lâmpada de UV (modelo UVGL-48, *Multiband UV*, da *Mineral light® Lamp*), cuja gama de radiação se situa entre os 254 e os 365 nm (em que o Ir 2959 é mais sensível) [11, 12]. As amostras líquidas foram preparadas em caixas de Petri ou em placas de vidro, previamente limpas com etanol ou acetona e devidamente secas. Sobre as placas, conseguiu-se o espalhamento de amostras líquidas de modo a obter filmes com diferentes espessuras (250, 500, 1000 ou 2000 μm), com a ajuda de um espalhador de inox, seguindo-se a sua irradiação. Foram testados diferentes tempos de irradiação, consoante o pré-polímero modificado. Para os produtos PLA-MAA e PLA-IEMA, os tempos de irradiação foram fixos em 2 minutos [12]. Para os produtos PLA-LAR2:1 e PLA-LAR1:1, submetem-se as amostras a sucessivos períodos de irradiação de 15 segundos, a fim de perceber qual o tempo necessário para a reticulação dos mesmos. Para o PLA-LAR2:1 fixou-se o tempo de irradiação em 2 minutos. Para o PLA-LAR1:1, foram testados três tempos de irradiação: 30 segundos, 1 e 2 minutos (obtendo sempre matrizes reticuladas). O PLA-TMI foi sujeito ao mesmo teste, porém não reticulou por irradiação de luz UV, tendo sido descartado do estudo de caracterização.

Obtiveram-se diferentes filmes/membranas transparentes, com diferentes rendimentos de reticulação (dada a existência de algum líquido residual para menores tempos de irradiação) e com diferentes propriedades: PLA-IEMA e PLA-LAR1:1 revelaram-se flexíveis e resistentes, enquanto PLA-MAA e PLA-LAR2:1 se apresentaram gelatinosos. Todos os adesivos obtidos foram limpos e secos numa estufa de vácuo, a uma temperatura de 40°C, de modo a remover o éter dietílico da sua composição. Posteriormente foram armazenados em local seco, a temperatura ambiente, e finalmente caracterizados. No Anexo L, Figura L.1, apresenta-se um esquema-síntese com as várias etapas do processo de produção dos adesivos. Na Figura L.2 apresenta-se uma ilustração da montagem experimental efetuada e salientam-se os fatores tidos em consideração.

3.3. Caracterização

Produzidos os diferentes filmes/membranas, avaliou-se um conjunto de propriedades recorrendo a diversas técnicas de caracterização, cujos procedimentos experimentais são apresentados de seguida. Será feito também um enquadramento teórico muito sucinto de cada técnica, apresentando-se as motivações da sua execução. Fundamentos importantes serão referidos. Protocolos detalhados são apresentados em Anexo.

3.3.1. Espectroscopia de infravermelho com reflexão total atenuada (ATR-FTIR)

A análise por ATR-FTIR é uma técnica de caracterização química, simples e eficaz, que permite a identificação dos grupos funcionais existentes em diferentes tipos de amostras. Permite conhecer a composição química de um dado produto, confirmando a presença dos grupos funcionais de interesse. O princípio básico da técnica consiste na passagem de um feixe de radiação infravermelho (IV) pela amostra. Cada grupo funcional absorve energia num dado número de onda, obtendo-se assim o seu espectro [4, 73]. Interessa realizar esta análise a todos os reagentes utilizados, pré-polímero sintetizado, pré-polímeros modificados (a fim de identificar a presença ou não dos grupos funcionais que se pretendeu introduzir) e adesivos obtidos após reticulação fotoquímica das amostras. As análises de ATR-FTIR

foram realizadas num espectrofotómetro *Jasco FT/IR-4200 Spectrometer*¹² equipado com um *Golden Gate Single Reflection Diamond ATR*. Os espectros foram registados a 128 *scans*, à temperatura ambiente, com uma resolução de 4 cm⁻¹.

3.3.2. Teor de gel (*gel content*)

A fim de perceber o grau de reticulação das amostras obtidas, foi determinado para cada um dos produtos o seu *gel content*. Foram preparadas amostras de filmes de espessura de 1mm, de cada um dos produtos. Os filmes foram previamente pesados, registando-se a sua massa inicial (m_0) e de seguida colocados em recipientes fechados com éter dietílico durante a noite (com agitação). De seguida, foram secos numa estufa de vácuo (a 40°C) e pesados, registando-se a sua massa seca final (m_1). O *gel content* para cada adesivo foi determinado pela Equação 3.1.

$$\text{gel content (\%)} = \frac{m_1}{m_0} \times 100 \quad (3.1)$$

3.3.3. Avaliação da capacidade de absorção de água (*Swelling*)

Um dos fatores a ter em conta na preparação de um adesivo biológico é a sua capacidade de absorção de água (ou a sua capacidade de “inchaço”), que influencia o seu desempenho/eficácia no tratamento e reparação de tecidos. Torna-se por isso pertinente a sua avaliação para todos os adesivos produzidos neste trabalho.

Para a realização do teste, foram preparadas amostras de filmes de diferentes espessuras: 1 mm e 2 mm. Estas foram secas numa estufa de vácuo até atingirem um valor de peso constante. Desta forma, obteve-se o seu peso seco (W_s). De seguida, três amostras de cada espessura foram transferidas para recipientes fechados contendo apenas água destilada, sendo colocados à temperatura de 37°C (temperatura fisiológica). As outras três amostras de cada espessura foram colocadas em recipientes fechados em solução PBS, também à temperatura de 37°C. Em cada recipiente, adicionou-se um volume de água ou solução PBS de 10 mL. Iniciado o teste, as amostras foram pesadas em intervalos de tempo pré-determinados até atingirem um valor de peso constante, que corresponde ao seu peso hidratado (W_h). Foi assim possível determinar a capacidade de absorção de água (em percentagem) de cada adesivo através da Equação 3.2.

$$\text{Capacidade de absorção de água (\%)} = \left(\frac{W_h - W_s}{W_s} \right) \times 100 \quad (3.2)$$

3.3.4. Microscopia eletrónica de varrimento (SEM)

A análise de microscopia eletrónica de varrimento (SEM) utiliza um feixe focalizado de eletrões de alta energia, de modo a produzir uma diversidade de sinais na superfície de amostras sólidas. Os sinais resultantes das interações eletrão-amostra contribuem com algumas informações sobre as amostras, nomeadamente: estrutura da superfície e sua morfologia, composição química, estrutura cristalina ou até mesmo orientação dos materiais que constituem a amostra, sendo por isso uma das técnicas mais utilizadas na pesquisa e estudo de materiais [78].

¹² Informações sobre o equipamento em: <http://www.jascoinc.com/spectroscopy/ft-ir-4000-series>

Todos os filmes obtidos para os diversos tempos de irradiação UV foram submetidos a SEM, a fim de identificar as diferenças existentes na sua estrutura e morfologia. As amostras foram por isso colocadas num suporte apropriado sobre fita de carbono, sendo de seguida revestidas com uma camada fina de ouro, de forma a tornarem-se condutoras. Para observar a secção transversal, arrefeceram-se as amostras em azoto líquido, abaixo do seu valor de T_g , provocando facilmente a sua fratura. O aparelho utilizado foi um *Scanning Microscope JSM-5310* da *Jeol*. Foram obtidas imagens com ampliações de 500×, 5000× e 7500×. Mais informações sobre o funcionamento da técnica e equipamentos utilizados poderão ser consultadas em [78].

3.3.5. Propriedades térmicas – TGA, DSC, DMTA

Foram aplicadas diversas técnicas de caracterização térmica, de forma a conhecer as propriedades térmicas dos materiais sintetizados. Estas serão apresentadas por sequência de realização.

A análise termogravimétrica (TGA) foi realizada para todas as amostras líquidas e reticuladas (depois da irradiação UV). Pretendeu-se com esta análise avaliar a estabilidade térmica dos materiais, observando a sua variação de massa em função da temperatura e/ou do tempo, quando estes são sujeitos a um aumento controlado de temperatura. Para cada material, determinou-se a temperatura de degradação (T_d) (ou seja, a temperatura a partir da qual o material começou a sofrer uma variação de massa considerável resultado do aumento de temperatura), concluindo sobre a sua estabilidade em condições de uma determinada aplicação ou no seu processamento. Também se teve como objetivo avaliar o perfil de degradação do PLA de estrutura linear sintetizado, confrontando com perfis de PLA comercial encontrados na literatura. A técnica em si é bastante simples e usufrui de vantagens inerentes, como a possibilidade de estudar os materiais até temperaturas bastante elevadas, utilizando quantidades muito pequenas de material (entre 5 a 10 mg). A análise da degradação térmica das amostras foi assim conduzida num equipamento *SDT Q500* da *Thermal Analysis (TA) Instruments*. Todas as amostras foram aquecidas até uma temperatura de 600°C, com uma velocidade de aquecimento de 10°C min⁻¹ em atmosfera de azoto com um fluxo de 100 mL min⁻¹. O processamento dos dados foi feito no *Universal analysis 2000 software* da *TA Instruments*.

A análise por calorimetria diferencial de varrimento (DSC) foi de seguida executada para todos os produtos obtidos: pré-polímero, pré-polímeros modificados e reticulados. Esta técnica (simples e rápida) permite analisar a alteração da capacidade calorífica (C_p) de um material por variação da temperatura. Para tal, sujeitou-se as amostras de massa conhecida (entre 5 a 10 mg) e uma amostra de referência, a uma variação de temperatura, em intervalos pré-determinados, medindo-se as transições térmicas¹³ [16]. É assim possível determinar a temperatura e entalpia nas fases de transição dos materiais. Uma curva típica de DSC representa o fluxo de calor medido em função da temperatura e/ou do tempo, podendo-se determinar a temperatura de transição vítrea (T_g), temperatura de cristalização (T_c), temperatura de fusão (T_m) e entalpia de fusão (ΔH_m) de cada amostra em análise [12, 16].

Recorreu-se à técnica DSC, neste trabalho experimental, essencialmente para determinar a T_g de todos os materiais sintetizados. As curvas de DSC foram obtidas num equipamento de calorimetria diferencial de varrimento, modelo *Q100* da *TA Instruments*, também com uma velocidade de aquecimento de 10°C min⁻¹, numa atmosfera inerte (fluxo de 100 mL min⁻¹). Os testes foram executados numa gama de temperaturas de -80°C até 200°C (temperatura inferior à temperatura de degradação de cada material).

¹³ Mais informações sobre a técnica, seu funcionamento e equipamentos em: http://www.perkinelmer.com/CMSResources/Images/44-74542GDE_DSCBeginnersGuide.pdf.

Por último, as amostras foram sujeitas a análise térmica dinâmico-mecânica (DMTA). A técnica consiste na aplicação de uma força periódica sinusoidal a uma determinada amostra, medindo-se a deformação resultante como função da frequência e da temperatura [12]. Com o DMTA, é possível medir a rigidez, elasticidade e amortecimento do material ($\tan \delta$).

A análise DMTA foi conduzida para todos os adesivos, com espessuras conhecidas de aproximadamente 1 mm, recorrendo a um *Triton Tritec 2000* em *Constrain Layer Damping Mode*, com uma velocidade de aquecimento de $5^{\circ}\text{C min}^{-1}$, em condições de multifrequência (1 e 10 Hz). A temperatura de transição vítrea (T_g) foi neste caso determinada como sendo o pico em $\tan \delta$ (Equação 3.3).

$$\tan \delta = \frac{E''}{E'} \quad (3.3)$$

Onde E'' representa o módulo de perda, ou seja, a capacidade do material em dissipar energia (comportamento viscoso) e E' o módulo de armazenamento, traduzindo-se na capacidade do material em armazenar energia (comportamento elástico)¹⁴ [11, 12].

3.3.6. Degradação hidrolítica em solução PBS

O carácter temporário das aplicações em estudo tem implícitos diversos requisitos: 1) produção de materiais que sejam biodegradáveis; 2) que esses mesmos materiais sejam bioabsorvíveis, de modo a serem metabolizados pelo organismo; 3) e que o tempo de degradação não seja demasiado longo, correspondendo ao tempo de tratamento. Como tal, torna-se pertinente estudar a degradação dos materiais sintetizados, avaliando a variação de massa ao longo do tempo.

Os estudos de biodegradação dos filmes PLA-MAA, PLA-IEMA, PLA-LAR2:1 e PLA-LAR1:1, tempos de reticulação de 2 minutos, foram por isso realizados em solução PBS (pH 7,4) e conduzidos ao longo de seis semanas (≈ 42 dias). Preparou-se amostras de filmes de diferentes espessuras (1 e 2 mm), a fim de perceber se a espessura teria influência na taxa de degradação dos materiais, nos diversos tempos de incubação pré-determinados (24h, 72h, 1, 2, 3, 4, 5 e 6 semanas). Para cada tempo de incubação (e cada espessura) foram preparadas amostras em triplicado, obtendo-se no total 48 amostras de cada produto (24 filmes de cada espessura). Para que todas as amostras de cada produto (de 1 ou 2 mm) tivessem uma massa idêntica, foram feitos filmes com uma área aproximada de 1 cm^2 . Todos os filmes produzidos foram previamente secos numa estufa de vácuo, a 40°C , de modo a evaporar o solvente (éter dietílico) existente. O tempo de secagem foi o suficiente para que apresentassem uma massa constante. Desta forma, registou-se a sua massa seca inicial ($m_{s,0}$).

De seguida, colocou-se cada um dos filmes num recipiente de vidro, ao qual foi adicionado 10 mL de solução PBS, sendo de seguida devidamente fechado. A solução PBS pretende simular a concentração salina do plasma sanguíneo, com um pH de 7,4. O teste de degradação foi realizado a uma temperatura de 37°C (temperatura fisiológica do corpo humano). A cada tempo pré-determinado, as seis amostras de cada produto foram retiradas da estufa, pesadas húmidas e de seguida limpas e colocadas a secar (a uma temperatura de aproximadamente 37 a 40°C) para eliminar toda a água que pudessem ter absorvido. Depois de secas, pesou-se a sua massa final ($m_{s,t}$), determinando-se a variação de massa ocorrida.

¹⁴ Mais informações sobre a técnica, seu funcionamento e equipamentos em: http://www.perkinelmer.com/CMSResources/Images/44-74546GDE_IntroductionToDMA.pdf.

O grau de degradação foi obtido determinando a perda de massa (%) de cada amostra ao fim de um determinado período de tempo, através da Equação 3.4.

$$\text{Perda de massa (\%)} = \frac{m_{s,0} - m_{s,t}}{m_{s,0}} \times 100 \quad (3.4)$$

Em que $m_{s,0}$ e $m_{s,t}$ são as massas seca inicial e ao fim do tempo t de degradação. Para cada tempo, foram retiradas três amostras de cada espessura, de cada produto. A fim de perceber as diferenças morfológicas dos filmes ao longo do processo de degradação, uma das três amostras retiradas para os tempos de incubação de 72h e 6 semanas, foi analisada pela técnica de microscopia eletrónica de varrimento (SEM).

3.3.7. Testes de adesão em folhas de gelatina

Tendo em conta as aplicações em estudo, revela-se de grande importância a realização de testes de adesão *in vitro* das diferentes soluções obtidas. Para simular a adesão dos materiais aos tecidos biológicos foram cortadas e preparadas duas folhas de gelatina de dimensões idênticas, entre as quais se colocou individualmente uma amostra de solução de cada pré-polímero modificado, que foi de seguida fotopolimerizado. Obtiveram-se assim matrizes reticuladas com o objetivo de promover a adesão entre as folhas de gelatina, na área em que estas foram sobrepostas. As folhas de gelatina pretendem representar os tecidos biológicos, uma vez que têm uma composição semelhante em grupos amínicos. De seguida, cada amostra foi sujeita a um teste mecânico de tração numa máquina de ensaios *Instron 5900 R 1186*.¹⁵ Cada ensaio terminou com a fratura das folhas (no caso de ter ocorrido adesão) ou com a separação destas por descolagem (quando não aconteceu), tendo-se registado em cada a força na rutura.

Os ensaios foram realizados à temperatura ambiente e a velocidade de afastamento foi de 5 mm min^{-1} . Para se ter uma referência (designada de controlo), efetuou-se um teste de tração a uma folha de gelatina sem pré-polímero, registando-se o valor máximo de força na rutura. De referir ainda que, em cada ensaio, a deformação de cada amostra foi registada ao longo do tempo através de um *software* disponível.

3.3.8. Determinação das energias de superfície por medição de ângulos de contacto

Neste trabalho pretendeu-se ainda determinar as energias de superfície de todos os pré-polímeros sintetizados, após reticulação fotoquímica. Assim, os produtos foram individualmente espalhados em pequenas lamelas de vidro e submetidos a irradiação UV por 2 minutos, obtendo-se filmes com uma superfície lisa e uniforme. Um equipamento *OCA 20*, da *Dataphysics*, permitiu medir os ângulos de contacto estáticos (θ), a partir dos quais se calculou a energia de superfície de cada adesivo [79 – 81]. Informações sobre o equipamento poderão ser consultadas em [80].

Para a determinação dos ângulos de contacto estáticos foram utilizados quatro líquidos: 1) água; 2) etilenoglicol; 3) propilenoglicol; 4) e formamida. Para cada líquido, em cada adesivo, foram efetuadas dez medições em diferentes pontos da amostra, de modo a determinar um ângulo de contacto estático médio. Medidos os ângulos de contacto foi possível, através do método de *Owens-Wendt-Rabel e Kaelble* [82], o cálculo da energia de superfície (γ) e das respetivas componentes polares (γ_S^P) e dispersivas (γ_S^D) para cada adesivo, assim como para a folha de gelatina utilizada nos ensaios de tração [11].

¹⁵ Informações sobre o equipamento e acessórios em: <http://www.instron.com/wa/product/5900-Series-Mechanical-Testing-Systems.aspx>

3.3.9. Hemocompatibilidade

De acordo com a norma da *International Organization for Standardization (ISO)* – “ISO 10993-4 *Biological Evaluation of Medical Devices*” [83], a avaliação da hemocompatibilidade é extremamente importante e um requisito essencial para todos os materiais que entrem em contacto com o sangue. Todavia, não existem protocolos definidos para o estudo em causa. Desta forma, cada laboratório ou grupo de investigação deve padronizar e validar o seu método de avaliação [84].

Neste trabalho, teve-se como objetivo para todos os adesivos de PLA produzidos o estudo *in vitro* de dois tipos de interação com o sangue, nomeadamente: 1) hemólise; 2) e trombogenicidade. Utilizou-se sangue de coelho já anti-coagulado (sangue ACD-A) em todos os ensaios, fornecido pela PROBIOLÓGICA. Este foi usado assim que recebido, para garantir a qualidade do mesmo e a fiabilidade dos resultados obtidos.

Os procedimentos experimentais realizados para a determinação do índice hemolítico e do potencial trombogénico dos diferentes materiais são apresentados de seguida. Estes foram realizados com base em protocolos já estabelecidos pelo grupo de investigação do CIEPQPF, a partir dos quais se consultou a bibliografia por estes citada, e que pode ser consultada em [85 – 95]. Os procedimentos detalhados e alguns fundamentos importantes são apresentados no Anexo M.

3.3.9.1. Determinação do índice hemolítico

Os testes de hemólise foram realizados de acordo com a norma ASTM F 756-00 – *Standard Practice for Assessment of Hemolytic Properties of Materials* [85], que permitiu determinar a percentagem de hemólise que cada material é capaz de provocar nos constituintes do sangue, nomeadamente nos glóbulos vermelhos. A percentagem de hemólise provocada por cada material foi obtida tendo por base a quantidade de hemoglobina (Hb) libertada para o plasma sanguíneo, no contacto (direto ou indireto) dos materiais com o sangue, por um determinado período de tempo.

Para determinar a concentração de Hb recorreu-se ao método da cianometahemoglobina modificado, com base na norma anteriormente referida [85]. Esta mesma norma refere que o sangue utilizado nos testes de hemólise deve apresentar uma concentração final de Hb de 10 mg/mL \pm 1 mg/mL. Por sua vez, a concentração de Hb no plasma do sangue amostrado deve ser inferior a 2 mg/mL. Para obter os valores de concentração de Hb referidos, o sangue foi diluído com uma solução salina tamponizada (PBS, pH 7,4), após determinação da concentração inicial de Hb. Foi assim necessário delinear uma curva padrão, a partir de diferentes soluções de hemoglobina, com diferentes concentrações. A curva obtida permitiu relacionar os valores de absorvância obtidos por espectrofotometria com a quantidade de hemoglobina livre. No anexo M, apresenta-se a explicação detalhada de todos os passos efetuados nos testes de hemólise, fundamentos e requisitos tidos em consideração, nomeadamente na elaboração da curva de calibração.

A concentração inicial de Hb no plasma foi de 1,33 mg/mL (correspondendo aos requisitos desejados). Por sua vez, a concentração inicial de Hb no sangue foi de 110,6 mg/mL, e após sucessivas diluições, atingiu-se uma concentração de Hb no sangue diluído de 10,3 mg/mL.

Posteriormente procedeu-se ao contacto dos materiais testados com o sangue, usando amostras de adesivos, com uma área superficial de 21 cm². Todas as amostras produzidas foram devidamente secas, cortadas e colocadas em tubos de propileno, aos quais se adicionou aproximadamente 7 mL de solução

PBS (contacto indireto). Após incubação por um período de 24h a 37°C, removeu-se o PBS dos tubos, tendo-se adicionado a cada material 1 mL da solução diluída de sangue ACD-A de coelho. Foi adicionada a mesma quantidade de sangue diluído à solução PBS que esteve em contacto com cada um dos materiais. Todas as amostras foram colocadas na estufa, permanecendo pelo menos por um período de 3h, a uma temperatura de 37°C, e sem agitação, promovendo assim o contacto entre materiais/sangue e soluções de extração (PBS)/sangue. Foram ainda preparados os controlos negativos (por adição de igual quantidade de sangue ACD-A a 6 mL de PBS) e os controlos positivos (adicionando neste caso o sangue a água destilada, correspondendo a 100% de hemólise). Todos os tubos com as amostras foram invertidos cuidadosamente em intervalos de tempo pré-estabelecidos (30 minutos), de modo a garantir o contacto entre o material e o sangue.

Após o período de incubação, as amostras foram transferidas para tubos apropriados e centrifugadas a 2100 rpm, durante 15 min. Com a centrifugação, obtiveram-se duas fases: a componente celular sedimentada e o sobrenadante (plasma). A quantidade de hemoglobina libertada por hemólise para o sobrenadante foi determinada através da medição das densidades óticas (DO) de todos os sobrenadantes, a uma absorvância de 540 nm. Para tal, foi utilizado um espectrofotómetro *UV-Vis Jasco V-550*.

Finalmente, a percentagem de hemólise (% Hemólise) em cada amostra testada (material e PBS) foi calculada através da Equação 3.5.

$$\% \text{ Hemólise} = \left(\frac{DO_{\text{amostra teste}} - DO_{\text{controlo negativo}}}{DO_{\text{controlo positivo}} - DO_{\text{controlo negativo}}} \right) \times 100 \quad (3.5)$$

3.3.9.2. Avaliação da trombogenicidade

Para avaliar o potencial trombogénico dos adesivos produzidos, preparou-se três caixas de Petri de cada produto, de forma a realizar o estudo em triplicado. Os produtos líquidos foram irradiados por um período de 2 minutos, não se retirando os adesivos das caixas de Petri, de forma a garantir o pleno contacto entre sangue e material. O carácter trombogénico dos materiais foi avaliado tendo em conta a massa de coágulo formada na superfície de cada um dos adesivos, após um determinado tempo de contacto entre o sangue ACD-A de coelho e os materiais. Para o efeito, recorreu-se ao método gravimétrico de *Imai e Nose* [96].

Todos os produtos foram previamente incubados em PBS, a uma temperatura de 37°C por um período de 24 a 48h. Seguidamente, o PBS foi removido, tendo-se adicionado a cada amostra 250 μL de sangue ACD-A. A mesma quantidade de sangue foi também adicionada a três caixas de Petri vazias, que funcionaram como controlo positivo (uma vez que o vidro é um material trombogénico). O início dos testes de coagulação só foi possível depois da adição de 25 μL de uma solução de cloreto de cálcio (CaCl_2) 0,10M previamente preparada, a cada amostra. Todas as caixas de Petri foram de seguida colocadas na estufa, a 37°C, durante 40 min. Após esse tempo, foram retiradas da estufa e adicionou-se a cada 5 mL de água destilada aos coágulos formados, de forma a interromper o processo de coagulação. Após 5 min, a solução em cada caixa de Petri foi devidamente filtrada, sob vácuo.

Os coágulos resultantes foram finalmente fixados com a adição a cada um de uma solução a 37% de formaldeído. Todos os papéis de filtro com os coágulos secaram em local protegido até evaporação do formaldeído. De seguida, foram colocadas na estufa, a 37°C, durante 24h, até peso constante das amostras. Para determinar a percentagem de massa dos trombos/coágulos formados em cada caso, recorreu-se à Equação 3.6.

$$\% \text{ massa de coágulos formada} = \frac{m_{\text{coágulo_amostra}} - m_{\text{média_negativo}}}{m_{\text{média_positivo}} - m_{\text{média_negativo}}} \times 100 \quad (3.6)$$

Onde $m_{\text{coágulo_amostra}}$ é a massa de coágulo formada em cada amostra, obtida a partir da subtração da massa inicial de cada papel de filtro à massa final com os coágulos ($m_{\text{filtro+coágulo}}$). Por sua vez, $m_{\text{média_negativo}}$ corresponde à massa média formada de coágulo nos brancos (controlos negativos), e $m_{\text{média_positivo}}$ é a massa média de coágulo formado nos controlos positivos (vidro).

3.3.10. Biocompatibilidade

Biocompatibilidade é entendida como a capacidade de o material implantado proporcionar uma resposta favorável no hospedeiro, sem que haja sinais de citotoxicidade, mutagénese e/ou carcinogénese [97]. Assim, foi fundamental a realização de testes de biocompatibilidade *in vitro* para os adesivos de PLA, de forma a avaliar o seu potencial nas aplicações clínicas pretendidas. Dois estudos foram realizados: 1) avaliação da citotoxicidade dos materiais (que envolveu cultura celular de fibroblastos humanos em contacto direto com os adesivos e consequente estudo da viabilidade celular); 2) e avaliação da atividade antibacteriana dos materiais (envolvendo a cultura das bactérias *S.aureus* e *E.coli* em contacto com os filmes). Os estudos foram conduzidos na Universidade da Beira Interior (UBI, Covilhã) e realizados paralelamente aos ensaios de caracterização já mencionados. Os procedimentos experimentais seguiram protocolos previamente estabelecidos pelo grupo de investigação da UBI. Nas próximas secções apresentam-se os procedimentos, técnicas de caracterização complementares, assim como os materiais utilizados especificamente nestes ensaios.

3.3.10.1. Materiais

Meio *Eagle* modificado por *Dulbecco* (DMEM-F12), ácido etilenodiaminotetracético (EDTA), caldo LB (*LB Broth*), canamicina (*Kanamycin*), pastilhas PBS, estreptomicina (*Streptomycin*) e tripsina (*Trypsin*) foram adquiridos à *Sigma-Aldrich* (Sintra, Portugal). Células criopreservadas de fibroblastos humanos (*normal human dermal fibroblasts adult* (NHDF)) foram obtidas pela *PromoCell* (*Labclinics, S.A.*; Barcelona, Espanha) e utilizadas nos ensaios de citotoxicidade. A estirpe bacteriana *Escherichia coli* (*E.coli*) DH5 α foi adquirida à ATCC. *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) ATCC 25923 foi utilizada como modelo para avaliar as propriedades antimicrobianas dos adesivos. Soro fetal de bovino (*fetal bovine serum*, FBS) (livre de qualquer antibiótico) foi comprado na *Biochrom AG* (Berlim, Alemanha). Finalmente, o 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium (MTS) foi adquirido à *Promega* (*Madison, Wisconsin, E.U.A.*).

3.3.10.2. Avaliação da biocompatibilidade

3.3.10.2.1. Cultura celular de fibroblastos humanos na presença dos filmes

Células de fibroblastos humanos (hFib) foram cultivadas em contacto direto com os materiais (a uma densidade de 10×10^3 células por amostra) em placas de 96 poços. O meio de cultura utilizado foi o DMEM-F12, suplementado com FBS (10% v/v), 100 $\mu\text{g/mL}$ de estreptomicina e 100 $\mu\text{g/mL}$ de gentamicina. Antes do cultivo das células, todos os adesivos foram esterilizados, usando radiação UV durante 30 minutos. Por sua vez, o crescimento celular foi monitorizado através de um microscópio ótico *Olympus CX41*, equipado com uma câmara digital *Olympus SP-500 UZ* [98].

3.3.10.2.2. Estudo da viabilidade celular na presença dos filmes de PLA

Com o objetivo de avaliar o perfil citotóxico de todos os materiais sintetizados, realizou-se o teste MTS, de acordo com um método previamente desenvolvido nos laboratórios da UBI, onde decorreram os ensaios [98]. De forma sucinta, todos os materiais foram colocados numa placa de 96 poços (n=5) e irradiados com luz UV durante 30 minutos. As células foram cultivadas no meio de cultura preparado, como referido anteriormente, a uma densidade de 10×10^3 células/filme, por períodos de incubação de 24, 48 e 72 horas. Após cada tempo de incubação, a atividade redox das mitocôndrias das células viáveis foi avaliada através da conversão do MTS num produto *formazan* de cor púrpura solúvel em água. Para isso, o meio de cultura em cada poço foi removido e substituído por 100mL de meio fresco com 20mL de solução reagente MTS/PMS. De seguida, as células foram incubadas por um período de 4 horas, à temperatura de 37°C, numa atmosfera húmida com 5% de CO₂. Finalmente, a absorvância da solução colorida foi medida através de um leitor de microplaca *Anthos 2020 (Safoni, Diagnostics Pauster)*, a uma absorvância de 492nm. De referir ainda que foram preparados controlos negativos, K⁻ (cultura de células na ausência dos materiais) e os controlos positivos, K⁺ (com a adição de etanol (96%) a células cultivadas em diversos poços).

3.3.10.2.3. Microscopia eletrónica de varrimento (SEM) das amostras

A adesão e proliferação celular na presença dos materiais foram ainda caracterizadas por SEM. Para tal, as amostras foram lavadas com solução PBS, à temperatura ambiente, e fixadas durante a noite com 2,5% (v/v) de glutaraldeído. Posteriormente foram lavadas três vezes com PBS e desidratadas com soluções de etanol graduais (50, 60, 70, 80, 90 e 99,9%). Os filmes foram depois congelados, liofilizados por um período de 3 horas e finalmente colocados em suportes de alumínio com fita adesiva dupla, sendo revestidos com uma camada fina de ouro. Para o efeito, utilizou-se um revestidor por crepitação *Quorum Q150R ES*. As imagens SEM foram obtidas com uma voltagem de aceleração de 20kV, em diferentes ampliações, com um *Hitachi S-3400N Scanning Electron Microscope* [99].

3.3.10.3. Estudo da atividade antibacteriana dos filmes de PLA

Um dos problemas associados à implantação de dispositivos médicos no organismo são as infeções bacterianas, que não só comprometem a função e desempenho dos materiais implantados, como contribuem para reações adversas e complicações graves nos tratamentos [97, 100, 101]. Pretendeu-se desta forma avaliar se os adesivos teriam ou não características antibacterianas.

O estudo de adesão bacteriana foi conduzido com dois tipos de bactérias: 1) *S. aureus*, gram-positiva, uma das principais responsáveis pela ocorrência de infeções no organismo no contacto de biomateriais com os fluidos e tecidos biológicos [100, 101]; 2) e a *E.coli*, gram-negativa, normalmente presente no organismo humano. Ambas as bactérias constituíram o modelo de avaliação das propriedades microbianas dos filmes de PLA obtidos. Para esta finalidade, foi utilizado o método de difusão em ágar, onde as estirpes (1×10^8 CFU/mL) foram cultivadas em placas de ágar, seguindo-se a colocação dos filmes no topo por um período de 24 horas, a 37°C [102]. Posteriormente, o halo inibitório foi observado e imagens SEM foram obtidas, a fim de avaliar a formação de biofilme na superfície dos materiais [103].

CAPÍTULO 4

RESULTADOS E DISCUSSÃO

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Preparação dos Bioadesivos

O trabalho experimental desenvolvido conduziu à preparação de diferentes bioadesivos a partir de ácido láctico com vista à sua possível utilização em cirurgia (no tratamento de feridas incisais e/ou reparação, adesão e regeneração dos tecidos orgânicos), podendo estes no futuro ser ferramentas clínicas de grande importância e valor indubitável para tratamentos médicos e/ou cirúrgicos.

Na próxima secção começa-se por resumir os aspetos mais importantes e decisões tomadas em cada etapa do processo de produção, que resultou na obtenção de diferentes matrizes poliméricas a partir de PLA de estrutura linear. A nomenclatura de todos os produtos sintetizados será novamente esclarecida, facilitando a posterior leitura e compreensão dos resultados.

4.1.1. Síntese dos pré-polímeros modificados e reticulação fotoquímica

O trabalho teve início com a preparação do pré-polímero tequéllico de base ácido láctico por policondensação direta do ácido láctico L(+), utilizando como co-monomero o 1,4-butanodiol (BD), submetendo-se a solução a temperaturas bastante elevadas até ser removida toda a água existente. Obteve-se um polímero de baixa viscosidade, baixo peso molecular e com um tom ligeiramente amarelado.

Posteriormente, o pré-polímero obtido foi funcionalizado com os quatro monómeros já mencionados (MAA, IEMA, LAR e TMI). Obtiveram-se polímeros com ligações de carbono duplas nos seus terminais, capazes de reticular fotoquimicamente *in situ*, na presença de radiação UV (após adição do fotoiniciador Ir 2959), com exceção do polímero modificado com TMI (o que será explicado mais à frente). As etapas de produção foram executadas sem a adição de catalisadores, sacrificando o tempo de reação. Para todos os materiais, a quantidade de fotoiniciador foi fixa em 6% do número de moles de ligações duplas existentes nos pré-polímeros modificados. Partiu-se desta quantidade para garantir uma elevada velocidade de reação de cura dos materiais em condições ambientais.

Na preparação dos materiais, o fotoiniciador revelou-se insolúvel em todos os pré-polímeros modificados. Como tal, houve a necessidade de o solubilizar em éter dietílico, adicionando-o posteriormente aos polímeros, até se obterem no final produtos viscosos e com um aspeto homogéneo. A quantidade de solvente adicionada nas várias etapas do processo foi um dos aspetos mais críticos, dependendo do monómero funcional utilizado. Na adição do solvente teve-se em conta um objetivo fulcral: obter materiais de adequada viscosidade, para serem facilmente espalhados sobre as placas de vidro, seguindo-se a sua fotopolimerização, da qual resultassem membranas/filmes de superfície homogénea, lisa e de espessura adequada.

Resultado dos diferentes métodos de funcionalização, obtiveram-se cinco pré-polímeros modificados. O nome dado a cada um partiu da designação “PLA-M0”, sendo “M” o monómero funcional em causa e “0” a designação atribuída ao polímero antes da etapa de solubilização do fotoiniciador. Por sua vez, após adição deste e do processo de fotopolimerização, o nome das membranas obtidas partiu da designação “PLA-M”. Sendo assim, obteve-se os pré-polímeros modificados: **PLA-MAA0**, **PLA-IEMA0**, **PLA-LAR02:1**, **PLA-LAR01:1** e **PLA-TMI0**. Após exposição a UV, obtiveram-se as membranas **PLA-MAA**, **PLA-IEMA**, **PLA-LAR2:1** e **PLA-LAR1:1**. A designação “2:1” e “1:1” para os produtos PLA-

LAR resultou das diferentes proporções testadas. Uma vez que o produto PLA-LAR1:1 foi sujeito a diferentes tempos de irradiação UV, as membranas/adesivos obtidos tiveram também nomes diferentes: **PLA-LAR1:1A** (2 minutos), **PLA-LAR1:1B** (1 minuto) e **PLA-LAR1:1C** (30 segundos).

Como referido anteriormente, o pré-polímero de base ácido lático modificado pelo monómero TMI não reticulou por irradiação de luz UV. Este facto poderá ter sido devido à absorção de UV por parte do anel benzénico (constituente da molécula TMI), impedindo a reticulação das ligações duplas por inativação do fotoiniciador. Com o objetivo de verificar a sua reticulação por ação da temperatura (reticulação térmica) procedeu-se à adição de um iniciador térmico bastante comum (o peróxido de benzoflona, PBO) ao pré-polímero modificado, numa percentagem de 6% do número de moles de ligações duplas existentes. O peróxido foi solubilizado no pré-polímero à temperatura ambiente e de seguida uma amostra da solução foi colocada numa estufa, a uma temperatura de aproximadamente 80°C para garantir a ativação do iniciador, que geralmente dá origem a radicais reativos a partir de temperaturas superiores a 60°C [104].

Após 3 horas na estufa, verificou-se que o produto tinha reticulado, ou seja, os radicais resultantes da ativação do PBO tinham sido capazes de reagir com as ligações duplas existentes no pré-polímero, dando origem a uma matriz polimérica tridimensional. Contudo, a consistência dessa matriz revelou-se muito diferente da consistência das matrizes obtidas por fotoreticulação. Em vez de se obter uma membrana flexível, resistente e facilmente manipulável, obteve-se uma matriz bastante dura, pegajosa e muito difícil de manipular (inadequada para as aplicações pretendidas). Para além disso, identificou-se como principal inconveniente só ter sido possível a reticulação do material por ação da temperatura.

No processo de reticulação térmica, além do difícil controlo da reação de reticulação, os longos tempos e a temperatura elevada, constituem grandes limitações em aplicações biomédicas [21]. Uma vez que se pretendeu explorar a síntese de materiais que pudessem ser aplicados facilmente *in situ*, à temperatura ambiente, e com tempos de reticulação bastante reduzidos, o processo de reticulação térmica nunca foi visto como uma alternativa de produção possível. Face a todos os inconvenientes referidos, não se continuou a explorar esta via de produção nem a caracterização do material obtido. O TMI revelou ser inadequado para o processo de fotopolimerização. Todavia, a modificação do PLA foi bem-sucedida (como se comprova mais à frente no espetro obtido por ATR-FTIR). O LAR, por sua vez, revelou-se um monómero extremamente versátil e adequado na síntese de materiais para os fins pretendidos. Diferentes proporções usadas na modificação do PLA resultaram em materiais com consistências completamente diferentes. Desde logo se percebeu que o adesivo PLA-LAR2:1 era mais frágil e quebradiço, enquanto o PLA-LAR1:1 se demonstrou extremamente resistente e com uma flexibilidade incrível (superior aos adesivos PLA-IEMA ou PLA-MAA).

A fim de resumir algumas das informações referidas, apresenta-se na Tabela 4.1 os detalhes sobre a composição das formulações, condições de reação (em que não foi usado catalisador), pesos moleculares, estado físico e aparência visual dos pré-polímeros obtidos (antes da irradiação UV).

Pretende-se desde já destacar o sucesso da reação de modificação do PLA com LAR (na proporção de 1:1), atingindo-se um dos objetivos definidos neste trabalho: selecionar um novo monómero altamente reativo com os grupos OH do PLA, que conduzisse a uma redução significativa no tempo da reação de modificação do pré-polímero, sem adição de catalisadores. Uma redução de aproximadamente 20 horas nesta etapa representa um grande avanço, no que diz respeito à diminuição dos gastos energéticos associados à produção. Fixou-se o tempo da reação nas 4h, para garantir o êxito da modificação.

Tabela 4.1 Formulações de PLA e PLA modificado, peso molecular, estado físico e aparência visual dos materiais.

PRODUTOS	Condições de reação			Formulações			
	Tempo (h)	Temperatura (°C)	Co-monomero/monómero	Solvente	Peso molecular pretendido (g.mol ⁻¹)	Estado físico ^c	Aparência visual
PLA	9	150	BD	-	500	Líquido (baixa visc.)	Ligeiramente amarelado
PLA-MAAO	24	130	MAA	-	654	Líquido (visc. moderada)	Ligeiramente esbranquiçado
PLA-IEMAO	24	60	IEMA	ED ^b	810	Líquido (visc. moderada)	Transparente
PLA-LAR02:1	24	60	LAR (1/2 AL ^a)	ED	n.a.	Líquido (visc. moderada)	Transparente
PLA-LAR01:1	3 a 4	60	LAR (1/1 AL ^a)	ED	n.a.	Líquido (visc. elevada)	Transparente
PLA-TMIO	24	60	TMI	ED	n.a.	Ceroso	Transparente

^a AL – Ácido lático L(+); ^b Éter dietílico (quantidade adicionada bastante variável, dependente do monómero utilizado e da quantidade de pré-polímero que se pretenda modificar); ^c Estado físico à temperatura ambiente; n.a. – não avaliado.

De referir que é esperada a existência de grupos isocianatos livres na matriz ao adicionar o LAR ao PLA na proporção de 1:1. O adesivo daqui resultante foi o que demonstrou maior flexibilidade e elevada resistência, como já mencionado. O sucesso das várias etapas será comprovado mais à frente na secção 4.1.3. Na Tabela 4.2 resumem-se as informações já disponíveis para os adesivos produzidos neste trabalho.

Tabela 4.2 Resumo das condições de produção, tempos de reticulação testados, estado de cura e aparência visual dos bioadesivos produzidos.

PRODUTOS	MATRIZES POLIMÉRICAS RETICULADAS					
	Método de Iniciação	Temperatura (°C)	Quantidade de iniciador (%)	Tempo de reticulação (s)	Estado de cura do bioadesivo	Aparência visual
PLA-MAA	FOTO	ambiente	6	120	Muito gelatinoso e um pouco frágil	Ligeiramente Amarelado
PLA-IEMA	FOTO	ambiente	6	120	Flexível e resistente	Muito Transparente
PLA-LAR2:1	FOTO	ambiente	6	120	Muito suave e frágil	Muito Transparente
PLA-LAR1:1A	FOTO	ambiente	6	120	Muito flexível e resistente	Transparente
PLA-LAR1:1B	FOTO	ambiente	6	60	Flexível e resistente	Transparente
PLA-LAR1:1C	FOTO	ambiente	6	30	Flexível e resistente ^a	Transparente
PLA-TMI	TÉRMICA	80	6	10800 (3h)	-	-

↳ Produto eliminado

^a presença de algum líquido residual.

Os tempos de reticulação para os produtos PLA-MAA, PLA-IEMA e PLA-LAR2:1 foram estabelecidos como tempos mínimos a partir dos quais se percebeu que se obtinham matrizes reticuladas, sem sacrifício do rendimento de reticulação. Se este tempo (120 segundos) fosse diminuído, as membranas permaneceriam líquidas ou apresentariam vestígios de líquido residual (resultado da não conversão total

de ligações de carbono duplas existentes nos polímeros). Uma vez que os adesivos PLA-MAA e PLA-LAR2:1 se revelavam frágeis e gelatinosos, aumentou-se o tempo de fotoreticulação, verificando-se que as diferenças existentes no estado de reticulação das matrizes eram desprezáveis, após 5 a 6 minutos de irradiação. Assim, não se colocou como hipótese aumentar o tempo de irradiação para estes produtos, dado o interesse na produção de adesivos com o menor tempo de cura possível.

Relativamente ao PLA-LAR1:1, verificou-se que o tempo de irradiação UV podia ser menor que 120 segundos, obtendo-se na mesma membranas resistentes e flexíveis, embora existisse algum líquido residual (em quantidades mínimas) para tempos de irradiação UV de apenas 30 segundos. Ainda assim é de salientar a capacidade de reticulação do material num período de tempo tão reduzido. Tal facto revela-se mais uma vez muito importante e um êxito alcançado com a modificação do PLA com LAR nesta proporção. Menores tempos de exposição UV correspondem a matrizes menos reticuladas e, neste âmbito, poderão ser mais maleáveis, mais porosas e com maior capacidade de absorção de água [11, 105]. Porém a capacidade de adesão aos tecidos e o seu desempenho mecânico poderão ser comprometidos. Sempre que possível, procedeu-se à caracterização de todos os materiais presentes na Tabela 4.2 (exceto o PLA-TMI). Ainda assim, em ensaios mais morosos, as membranas PLA-LAR1:1B e PLA-LAR1:1C não foram tidas em consideração, caracterizando-se apenas a membrana PLA-LAR1:1A.

A fim de perceber a consistência e aspeto dos materiais, apresenta-se na Figura 4.1 a aparência visual dos bioadesivos resultantes das diferentes modificações testadas.

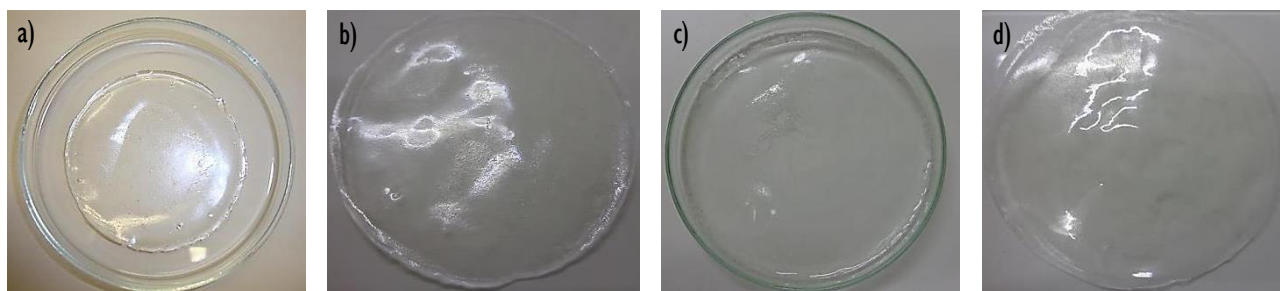


Figura 4.1 Aparência visual dos bioadesivos produzidos após fotoreticulação das soluções líquidas, por um tempo de exposição UV de 2 minutos: **a)** PLA-MAA; **b)** PLA-IEMA; **c)** PLA-LAR2:1 e **d)** PLA-LAR1:1A.

4.1.2. Esquemas Reacionais da modificação e fotoreticulação do PLA

De forma a sistematizar as etapas de modificação e fotoreticulação do PLA linear, apresentam-se nesta secção (Figuras 4.2 e 4.3) os esquemas reacionais das diferentes funcionalizações efetuadas e subsequente irradiação UV na presença de Ir 2959, originando as diferentes matrizes reticuladas já referidas.

A reticulação térmica do PLA-TMI0 com o PBO como iniciador é também apresentada. Importante mencionar que todos os esquemas reacionais apresentados são os teoricamente esperados, pretendendo ilustrar as ligações existentes entre as moléculas e os fenómenos ocorridos.

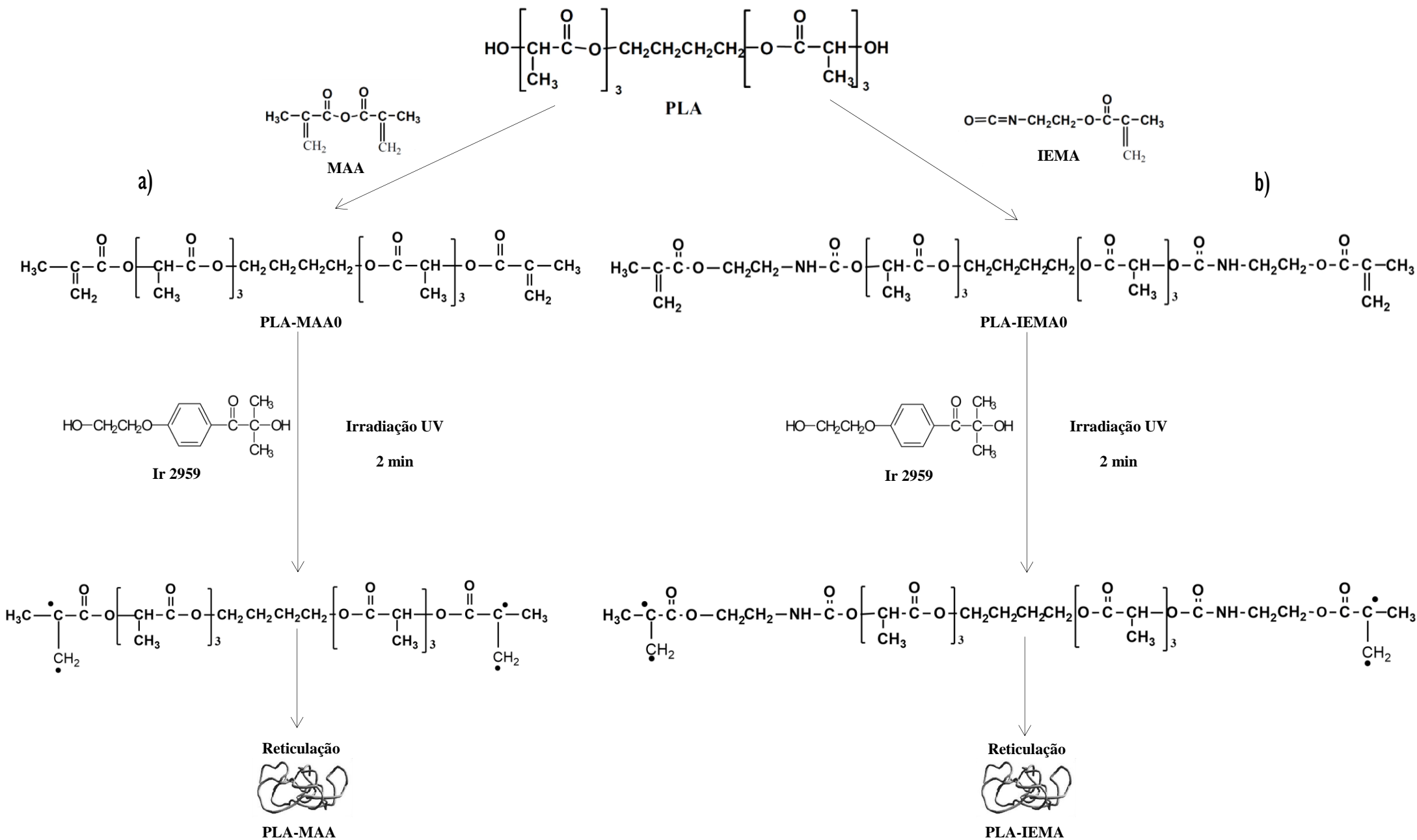


Figura 4.2 Metodologia de síntese dos bioadesivos PLA-MAA e PLA-IEMA – Esquemas reacionais da modificação do PLA: **a)** com MAA e **b)** com IEMA e subsequente irradiação UV originando matrizes reticuladas.

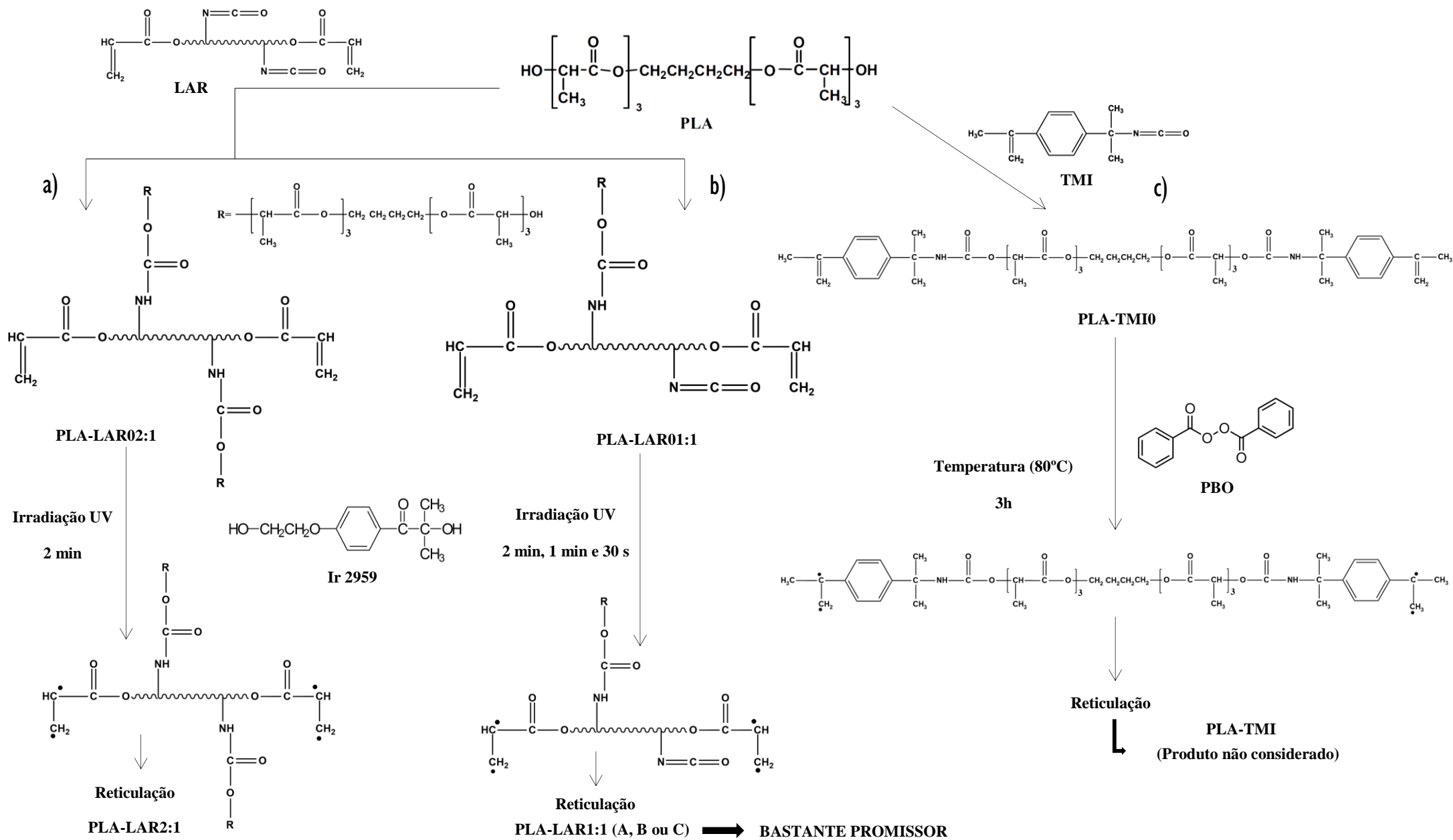


Figura 4.3 Metodologia de síntese dos bioadesivos PLA-LAR2:1 e PLA-LAR1:1 – Esquemas reacionais da modificação do PLA: com a) LAR (2:1); com b) LAR (1:1) e subsequente irradiação UV originando matrizes reticuladas. Demonstração da reticulação térmica do PLA-TMI0, c).

4.1.3. Caracterização por ATR-FTIR

A técnica ATR-FTIR, tal como descrito no Capítulo 3 (secção 3.3.1.), permitiu identificar os grupos químicos presentes em cada amostra, possibilitando assim o acompanhamento do sucesso das reações de síntese do oligómero linear (PLA), sua modificação com os diferentes monómeros testados e reações de reticulação. O estudo começou com a síntese de PLA com dois grupos hidroxilo terminais, utilizando o BD como co-monómero. Com a produção do pré-polímero esperou-se encontrar uma banda correspondente à elongação dos grupos OH da molécula, assim como uma banda correspondente aos grupos éster. No Anexo N, Tabela N.1, apresentam-se as bandas características que interessa analisar [106].

Na Figura 4.4 apresenta-se o espectro resultante da análise de ATR-FTIR para o pré-polímero sintetizado (PLA) e para o reagente base (ácido lático) utilizado na sua síntese.

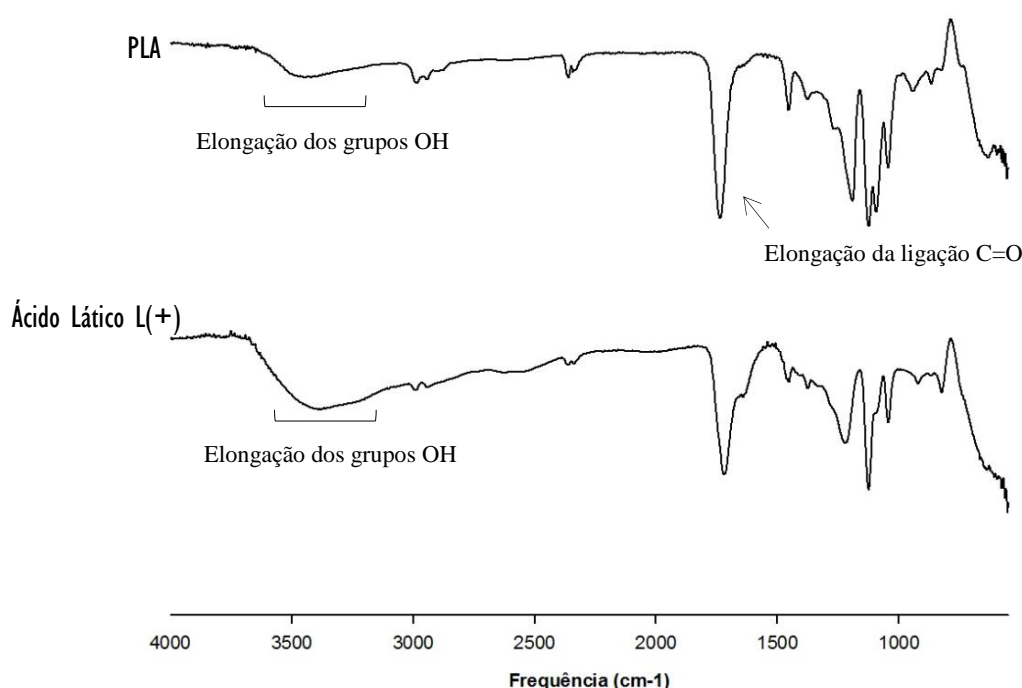


Figura 4.4 Espectro de ATR-FTIR do Ácido lático L(+) e do PLA sintetizado.

No espectro correspondente ao ácido lático verificou-se a existência de uma banda bastante acentuada, na zona de 3378cm⁻¹ correspondente à elongação característica dos grupos OH. Por sua vez, ao analisar o espectro do PLA, detetou-se também uma elongação característica dos grupos OH na banda de 3448cm⁻¹, mas não tão acentuada. Tal facto deve-se à perda de água resultante da reação de policondensação a temperaturas bastante elevadas. Detetou-se ainda no espectro do PLA a banda característica da elongação da ligação C=O, na zona de 1738cm⁻¹, correspondente aos grupos éster.

A fim de identificar a existência ou não dos grupos funcionais que se pretendeu introduzir no pré-polímero, a análise ATR-FTIR foi também realizada para todos os produtos resultantes da modificação do PLA com os diferentes monómeros. Para comprovar o sucesso das reações de modificação, esperou-se observar nos espectros um desaparecimento ou uma diminuição significativa da intensidade da banda típica dos grupos hidroxilo do PLA, assim como o desaparecimento da banda típica dos grupos funcionais livres de cada monómero. Para além disso, esperou-se observar em todos os espectros a presença de ligações duplas de carbono (C=C), principalmente na zona típica de 1640-1610cm⁻¹.

Os espectros ATR-FTIR presentes na Figura 4.5 comprovam assim o sucesso de todas as reações de funcionalização do PLA com os diferentes monómeros testados (cujo os espectros se encontram no Anexo N, Figura N.1).

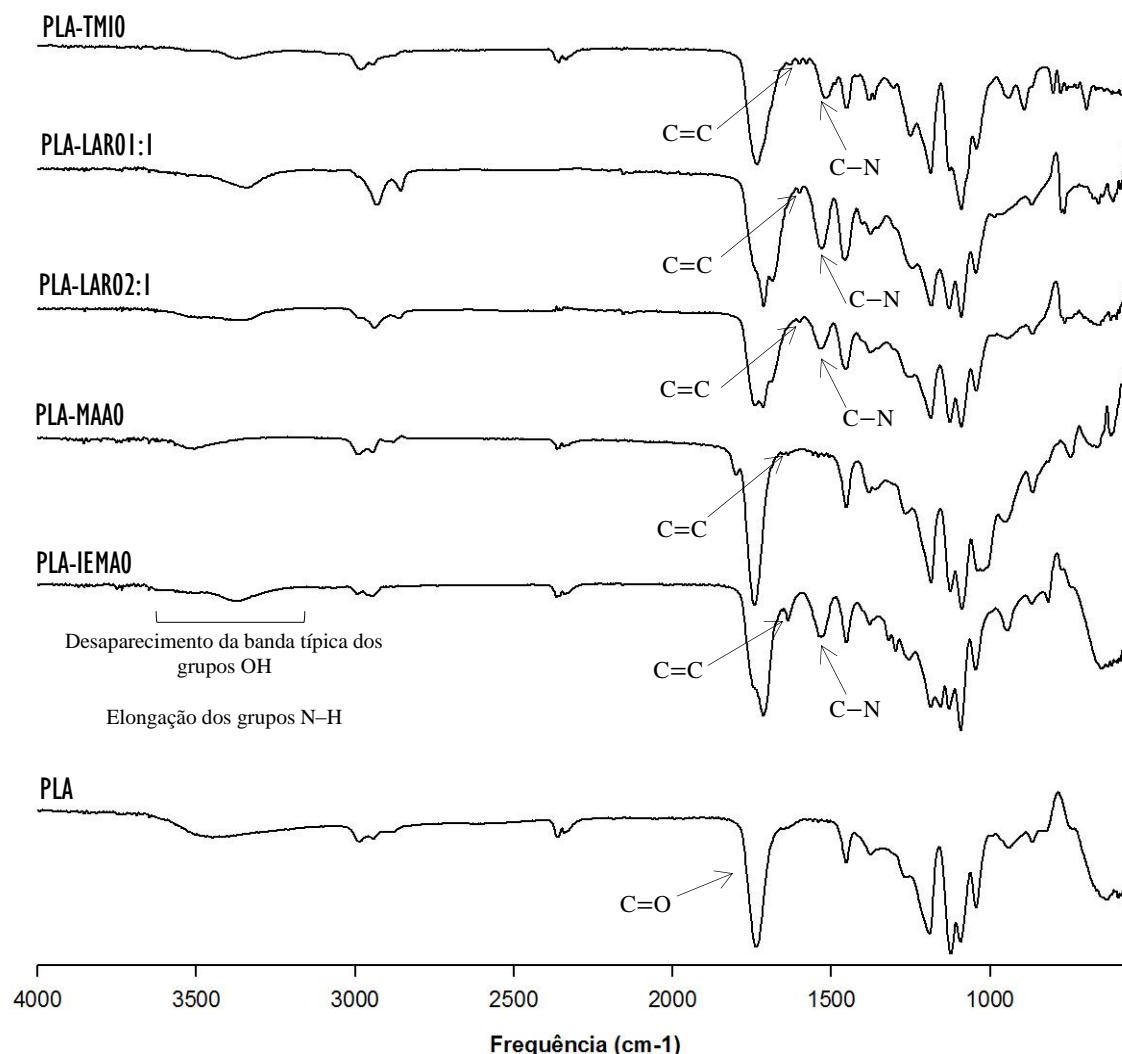


Figura 4.5 Espectros de ATR-FTIR do PLA e PLA modificado por IEMA, MAA, LAR e TMI.

Observando os espectros na Figura 4.5 é possível confirmar que a banda correspondente à elongação dos grupos OH do PLA sintetizado (3448cm^{-1}) desapareceu nos espectros de todos os pré-polímeros modificados. Para além disso, nos casos em que o PLA foi modificado pelos monómeros IEMA, LAR (na proporção 2:1) e TMI, verificou-se o desaparecimento da banda característica dos grupos isocianato que se encontrava presente nos espectros dos monómeros a 2260cm^{-1} (IEMA), 2263cm^{-1} (LAR) e 2253cm^{-1} (TMI) (Anexo N, Figura N.1). Tal situação sugere que as reações de funcionalização por estas vias terão ocorrido com elevado rendimento. Relativamente ao PLA-LAR01:1, foi possível identificar nas análises efetuadas uma pequena banda a 2273cm^{-1} que sugere a existência de alguns grupos isocianato livres na estrutura do polímero (o que já era de esperar). Ainda assim, o pico referido é praticamente impercetível no espectro apresentado na Figura 4.5, concluindo-se o consumo quase total dos grupos isocianato livres também nesta modificação. No que diz respeito ao PLA-MAA0 não foram detetadas ligações anidrido livres nas bandas típicas de 1800 a 1740cm^{-1} , sugerindo também um elevado rendimento de reação.

A reação entre os grupos OH do PLA e os grupos isocianato dos monómeros IEMA, LAR e TMI foi ainda confirmada pela formação dos grupos uretana em cada pré-polímero, uma vez detetadas as suas

bandas características. Foi possível verificar as bandas correspondentes: 1) à elongação da ligação C–N e deformação da ligação N–H dos grupos uretana na frequência de 1532cm^{-1} (PLA-IEMA0), 1531cm^{-1} (PLA-LAR02:1 e PLA-LAR01:1) e 1518cm^{-1} (PLA-TMI0); 2) e ainda à elongação dos grupos N–H (ligados por pontes de hidrogénio) [11] nas frequências de 3364cm^{-1} (PLA-IEMA0), 3362cm^{-1} (PLA-LAR02:1), 3341cm^{-1} (PLA-LAR01:1) e 3367cm^{-1} (PLA-TMI0). Relativamente aos grupos uretana, deve-se ainda salientar a elongação da ligação C=O que se situa na banda característica de 1718cm^{-1} (PLA-IEMA0) e 1715cm^{-1} (PLA-LAR02:1 e PLA-LAR01:1). Contudo, as bandas características da ligação C=O são sobreponíveis com a banda dos grupos éster do PLA, já anteriormente identificada a 1738cm^{-1} , pelo que não são visíveis nos espetros apresentados.

Finalmente, a presença de ligações de carbono duplas após funcionalização foi confirmada pela deteção das bandas típicas de 816 e 1636cm^{-1} (PLA-IEMA0), 810 e 1636cm^{-1} (PLA-MAA0), 810 e 1637 (PLA-LAR02:1 e PLA-LAR01:1) e ainda de 892 e 1629cm^{-1} (PLA-TMI0). Após observação do espetro do PLA-TMI0, concluiu-se o sucesso da reação de modificação, culminando com a presença de ligações de carbono duplas que seriam capazes de reticular fotoquimicamente. Tal não aconteceu e a única explicação plausível foi a já referida anteriormente. Após irradiação UV dos restantes polímeros modificados, esperava-se uma conversão das ligações de carbono duplas existentes, obtendo-se matrizes poliméricas reticuladas. Para comprovar tal facto, apresenta-se na Figura 4.6 os espetros ATR-FTIR obtidos para todos os adesivos produzidos, incluindo PLA-LAR1:1B e PLA-LAR1:1C.

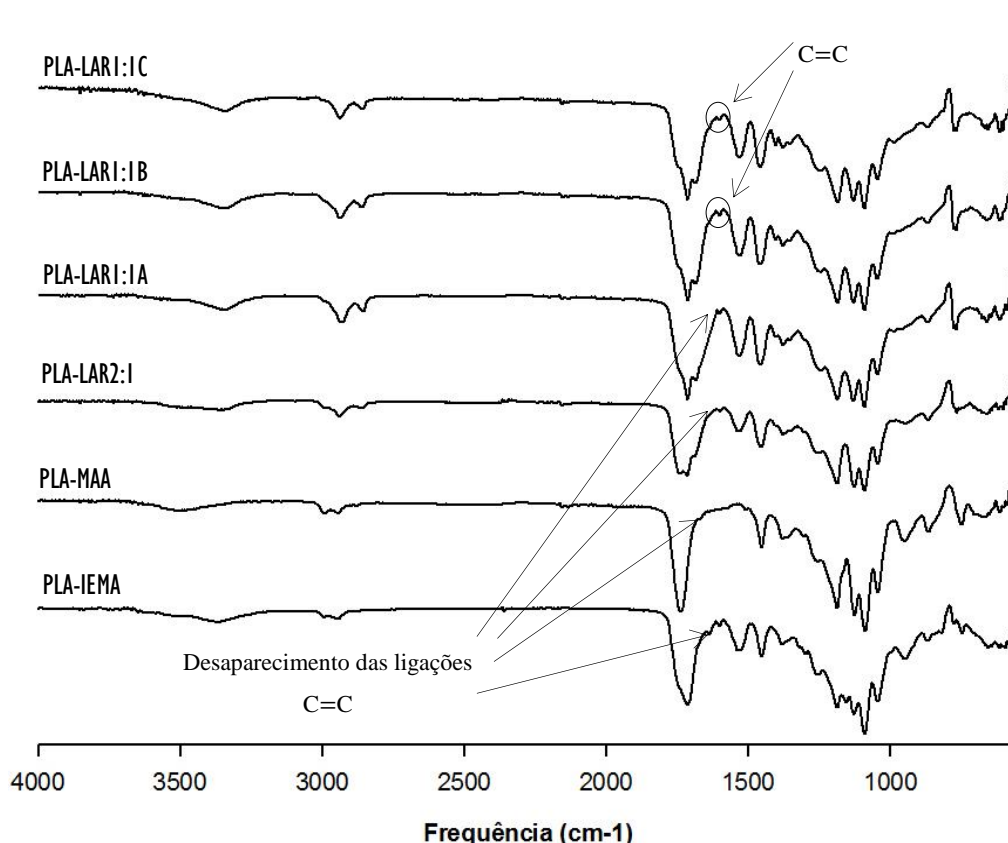


Figura 4.6 Espetros de ATR-FTIR das membranas formadas após adição de 6% de Ir 2959 e fotoreticulação por um período de exposição a UV de 2 minutos (exceto para os produtos PLA-LAR1:1B e PLA-LAR1:1C).

Por observação dos espetros, pode-se constatar que são praticamente coincidentes aos anteriormente apresentados na Figura 4.5, relativos aos pré-polímeros modificados. Desde modo, pode-se concluir que a

adição do Ir 2959 (espectro na Figura N.2) não interfere na composição química dos materiais, permitindo apenas a reticulação e coesão da sua estrutura. Essa mesma reticulação é comprovada pelo desaparecimento das bandas características das ligações duplas nas zonas típicas de 1636cm^{-1} e 810cm^{-1} para todos os adesivos, exceto os resultantes de menores tempos de irradiação.

As matrizes PLA-LAR1:1B e PLA-LAR1:1C apresentam ainda algum líquido residual, resultado de um menor rendimento da reação de reticulação. Esse líquido tem exatamente a mesma composição do pré-polímero, o que significa que é apenas PLA modificado por reticular. Apesar do rendimento de reticulação ser menor, estas membranas apresentavam-se resistentes e flexíveis.

4.2. Avaliação de propriedades dos adesivos e pré-polímeros

O potencial em aplicações *in situ* tornou-se cada vez mais uma realidade, uma vez obtidas membranas bem definidas, de aspeto homogêneo e uniforme, e com tempos de cura bastante promissores (≤ 2 min) em condições fisiológicas. Avaliou-se um conjunto de propriedades químicas, físicas, térmicas, mecânicas e biológicas, de forma a concluir sobre o seu desempenho e eficácia em contexto clínico, perante uma aplicação de interesse. Apesar de a utilização ser abrangente a outras áreas (como aplicações transdérmicas, com o desenvolvimento de sistemas de libertação controlada por incorporação de fármacos nas membranas obtidas), o estudo de caracterização foi concebido e estruturado para inferir a aplicação dos materiais sintetizados em cirurgia, como já referido. Pretende-se que os adesivos daqui resultantes possam ser alternativas consistentes e superiores aos já existentes no mercado dos adesivos cirúrgicos, apresentando um bom desempenho nas funções que lhes estão destinadas. Assim, nas próximas secções apresentam-se os resultados obtidos da caracterização efetuada, estabelecendo sempre um enquadramento com a aplicação pretendida. Sempre que pertinente, foram também avaliadas propriedades dos materiais ainda no seu estado líquido (ou seja, antes da irradiação UV), sendo estas devidamente discutidas.

4.2.1. Teor de gel e capacidade de absorção de água

De acordo com o que foi referido na secção 4.1., foram obtidas membranas com diferentes rendimentos de reticulação. Pela manipulação destas em laboratório, foi possível perceber as notáveis diferenças na sua estrutura e estado final de cura (Tabela 4.2). De forma a concluir sobre o grau de reticulação dos diferentes adesivos, foi determinado o seu teor de gel (*gel content*). Adesivos/membranas com um *gel content* de 100% correspondem geralmente a uma total conversão das ligações de carbono duplas [70]. Fatores considerados importantes no estado de reticulação são: 1) quantidade de fotoiniciador; 2) tempo de irradiação UV; 3) e monómero funcional utilizado [11, 12, 21, 70, 105]. Este trabalho não abordou a influência da quantidade de fotoiniciador. Ainda assim, para maiores quantidades de Ir 2959 a tendência seria a obtenção de matrizes mais reticuladas, e por consequência mais compactas e menos porosas [11, 70].

Para os produtos PLA-MAA, PLA-IEMA, PLA-LAR1:1A e PLA-LAR2:1, com tempos de irradiação fixos em 2 minutos, foi possível perceber a influência que diferentes monómeros funcionais teriam no grau de reticulação dos adesivos. Para os produtos PLA-LAR1:1A, B ou C, foi possível perceber como o tempo de irradiação UV influencia a reticulação de um material obtido a partir de uma mesma modificação. Estudos experimentais realizados [21, 70] confirmam que quanto maior for o tempo de exposição a UV, maior será a reticulação do material, obtendo-se membranas mais rígidas, densas e compactas. Contudo, estas características vão influenciar o comportamento das matrizes no que diz

respeito à sua capacidade de absorção de água ou de inchaço. Para determinar o *gel content* de todas as amostras, pequenos filmes de espessura de 1mm foram colocados em frascos com éter dietílico, durante 24h, com agitação moderada. Uma vez que o éter é capaz de dissolver o polímero líquido, qualquer quantidade residual presente nas membranas foi dissolvida no mesmo. A parte reticulada não se dissolveu no solvente. Através da Equação 3.1 foi determinado o *gel content* de todas as membranas produzidas. Na Tabela 4.3 são apresentados os resultados obtidos, pretendendo-se estudar a influência do grau de reticulação dos adesivos na capacidade de absorção de água dos mesmos.

Ocorrem diversas fases num processo de cicatrização de feridas cirúrgicas ou traumáticas, nomeadamente: hemóstase, inflamação, proliferação e remodelação do tecido [107 – 109]. Adesivos têm como objetivo ajudar e facilitar o processo de cicatrização dos tecidos enfraquecidos, promovendo a reestruturação, reconstituição e tratamento dos mesmos. Um dos fatores a ter em conta na sua preparação é por isso a capacidade de absorção de água. Essa capacidade traduz-se num aumento de volume de uma determinada amostra, sendo um fator preponderante e bastante importante no processo de cicatrização [4, 109]. O “inchamento” de um adesivo até um valor ótimo de volume contribui para um melhor desempenho do mesmo no tratamento, facilitando o processo de homeostasia tecidual. No entanto, um aumento significativo de volume poderá originar o efeito contrário, provocando danos nos tecidos envolventes. Por isso mesmo, pretende-se que a capacidade de absorção de água seja moderada, sendo esta dependente da hidrofiliicidade ou hidrofobicidade do material e do estado de reticulação. Avaliando a capacidade de absorção de água para todos os adesivos produzidos, tem-se uma noção do carácter hidrófobo ou hidrófilo, permitindo concluir sobre a sua menor ou maior eficácia na aplicação em estudo.

Assim, a capacidade de absorção de água (*swelling*) foi determinada através da Equação 3.2 para uma série de três amostras de cada espessura (1 e 2mm), colocadas em água destilada, e para três amostras de cada espessura imersas em solução PBS, à temperatura de 37°C. Este ensaio pretendeu assim avaliar a influência da espessura do material e do pH do meio sobre a capacidade de absorção de água. Os resultados obtidos são apresentados na Figura 4.7. Os resultados de *swelling* para a incubação dos materiais em solução PBS foram analisados com maior detalhe, uma vez que o PBS (pH 7,4) pretende simular a constituição salina do plasma sanguíneo, conduzindo a resultados mais próximos da realidade. Estes foram de seguida relacionados com o grau de reticulação dos adesivos (Tabela 4.3).

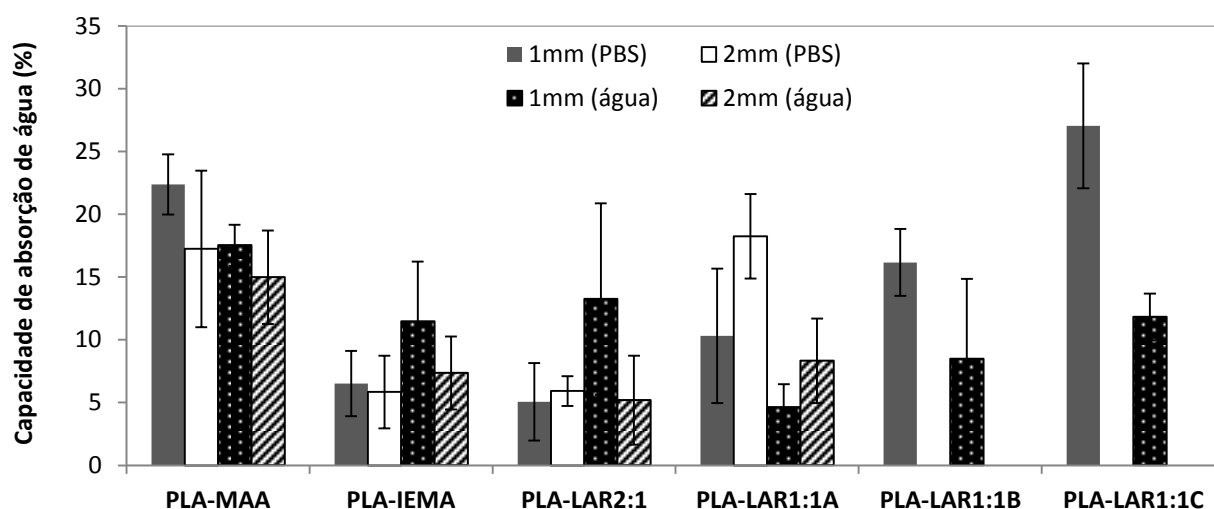


Figura 4.7 Valores de capacidade de absorção de água (%) para os adesivos sintetizados – imersão em água destilada (pH 7,0) e em solução PBS (pH=7,4). Tempo de incubação: 6h. Temperatura: 37°C.

Na realização dos testes, as matrizes aumentaram de peso até às 6 horas de incubação, devido à água que foi absorvida. Contudo, a partir deste tempo, as membranas começaram a “desinchar”, apresentando uma menor capacidade de absorção (independentemente do meio onde foram incubadas), de tal forma que o seu peso hidratado já era inferior ao peso seco inicial. Este facto sugere que a partir das 6 horas os adesivos começaram a sofrer alguma degradação por hidrólise, devido à quantidade de água que foi absorvida nas primeiras horas do teste [12, 110]. Assim, os valores de absorção de água apresentados na Figura 4.7 correspondem a uma média do valor de *swelling* máximo atingido ao fim das 6 horas de incubação em água destilada e PBS. Observando os resultados, constata-se de forma geral que a espessura do material não teve uma influência significativa na capacidade de absorção de cada membrana, considerando o desvio padrão calculado para as três amostras de cada produto utilizadas nos ensaios. Contudo, existem exceções. Para o adesivo PLA-LAR1:1A, o aumento de espessura teve influência na capacidade de absorção, principalmente para as membranas que foram incubadas em PBS. Isto poderá indicar uma menor reticulação da matriz, que traz como consequência uma maior porosidade ao material. No entanto este comportamento não é transversal, uma vez que para os restantes produtos a tendência é contrária: adesivos de menor espessura apresentaram uma maior capacidade de absorção. Em termos de valor percentil absoluto para cada material, as variações não são muito significativas, para além de que os desvios padrão obtidos são bastante elevados em todos os casos.

Relativamente à influência do pH do meio, constata-se um fenómeno interessante. Os adesivos PLA-MAA e PLA-LAR1:1A, B ou C, incubados em solução PBS, apresentam uma maior capacidade de inchaço comparativamente aos que foram incubados em água destilada. Esta situação poderá ser devida a possíveis interações entre os grupos carboxilo ou grupos terminais dos polímeros e os catiões sódio presentes na solução PBS, que serão responsáveis pela existência de forças eletrostáticas repulsivas bastante fortes, contribuindo para um aumento da capacidade de absorção de água dos materiais. Este fenómeno foi também explicado por *Proikakis et al.* [110] no seu estudo, sendo comum a sua ocorrência. Para os adesivos PLA-LAR1:1A, B ou C, a diferença é ainda considerável. Daqui se pode concluir que as membranas em causa apresentam uma maior capacidade de inchaço num meio mais básico. Por sua vez, os adesivos PLA-IEMA e PLA-LAR2:1 tiveram um comportamento oposto, apresentando uma maior capacidade de absorção para um pH igual a 7.

Centrando a análise nos resultados da imersão das amostras em PBS, constata-se que os adesivos PLA-IEMA e PLA-LAR2:1 são os mais hidrofóbicos. A incorporação de ligações uretana no PLA através do IEMA dificultou a capacidade de inchaço do adesivo final, talvez como resultado de possíveis interações das ligações uretanas por pontes de hidrogénio [12, 26]. Relativamente ao PLA-LAR2:1, o seu comportamento hidrófobo poderá estar relacionado com o pH do meio, todavia existe uma influência do monómero funcional LAR nesse processo. O PLA-LAR2:1 resulta de uma menor percentagem de modificação do PLA com LAR que o PLA-LAR1:1A. Observando os resultados na Figura 4.7, constata-se que estes têm sempre comportamentos contrários: o PLA-LAR2:1 apresenta um maior *swelling* em água destilada e o PLA-LAR1:1A em PBS. Isto poderá indicar que o monómero LAR contribui para a obtenção de uma estrutura final com um maior *swelling* quando presente num meio mais básico (pH 7,4). É ainda possível perceber, para o mesmo tempo de irradiação, que o PLA-MAA é o adesivo mais hidrofílico, seguido do PLA-LAR1:1A. Este último revelou-se com maior capacidade de absorção que o PLA-IEMA, por existir possivelmente um maior espaço entre as moléculas do polímero. O LAR é um oligómero de cadeia muito comprida. Como tal, as moléculas estão mais espaçadas entre si, facilitando a entrada de água na sua estrutura. Comparando os adesivos PLA-LAR1:1A, B ou C, percebe-se a

influência do tempo de irradiação UV, sendo a capacidade de absorção de água maior, quanto menor a exposição do material a irradiação UV.

Os resultados obtidos estão claramente relacionados com o grau de reticulação da estrutura dos materiais. Para estabelecer uma relação entre os resultados de absorção de água dos adesivos (incubados em solução PBS, 1mm de espessura) e o grau de reticulação dos mesmos, apresenta-se na Tabela 4.3 os valores de *swelling* e de *gel content*.

Tabela 4.3 Valores de *gel content* e capacidade de absorção de água (*swelling*) para adesivos de 1mm.

PRODUTO	Tempo de reticulação (s)	<i>Gel content</i> (%)	<i>Swelling</i> ^a (%)
PLA-MAA	120	77	22,38±2,41
PLA-IEMA	120	89	6,51±2,60
PLA-LAR2:1	120	66	5,06±3,08
PLA-LAR1:1A	120	95	10,32±5,37
PLA-LAR1:1B	60	88	16,16±2,67
PLA-LAR1:1C	30	85	27,05±4,97

^a Valores de *swelling* para incubação dos materiais em PBS, T = 37°C.

Para os produtos PLA-MAA, PLA-IEMA, PLA-LAR2:1 e PLA-LAR1:1A, foi visível a influência da monómero funcional no grau de reticulação, obtendo-se membranas com diferentes valores de *gel content*. Segundo *Hakala* [21] esta diferença evidente deve-se à concentração de ligações de carbono duplas dos pré-polímeros modificados. Assim, a modificação molecular teve influência no estado de reticulação das membranas. Conclui-se que a quantidade de ligações duplas existentes no polímero modificado por LAR (1:1) foi maior, resultando por isso numa matriz final com um *gel content* bastante elevado (95%), seguindo-se as matrizes obtidas da modificação com IEMA (89%) e MAA (77%). O PLA-LAR2:1 foi o adesivo que apresentou um menor valor de *gel content* (66%), sugerindo uma menor quantidade de ligações duplas [21, 23, 26, 70]. Estas conclusões podem ser inferidas, uma vez que o tempo de irradiação UV foi igual para todos os produtos. Se o tempo de exposição a UV fosse superior para os adesivos PLA-LAR2:1, PLA-MAA e PLA-IEMA, poder-se-iam obter matrizes mais reticuladas e conseqüentemente com valores de *gel content* superiores [21]. A influência do tempo de irradiação UV foi também evidente para os produtos PLA-LAR1:1. Verifica-se que uma redução do tempo de irradiação UV deu origem a matrizes menos reticuladas, e por conseqüência com valores de *gel content* inferiores.

Observando os resultados de *swelling* na Tabela 4.3, foi possível verificar que membranas com valores inferiores de *gel content* apresentaram uma maior capacidade de absorção de água. Com exceção do PLA-LAR2:1, que apresenta um carácter hidrófobo em solução PBS, e do PLA-LAR1:1A que, apesar da sua estrutura reticulada, apresenta uma capacidade de absorção de água superior ao PLA-IEMA.

Factos importantes a assinalar: 1) A modificação do PLA com LAR em diferentes proporções resultou em matrizes com rendimentos de reticulação diferentes e com comportamentos completamente distintos (no que diz respeito à absorção de água); 2) A diminuição do tempo de irradiação UV para o PLA-LAR1:1 conduziu a menores rendimentos de reticulação, com uma crescente capacidade de absorção de água; 3) Mesmo diminuindo o tempo de UV até 30 segundos para este produto, a membrana obtida apresentou um grau de reticulação superior em relação aos outros produtos e equivalente ao PLA-IEMA, sugerindo que o

tempo de UV pode realmente ser reduzido, sem um sacrifício significativo no rendimento de reticulação; 4) Os adesivos PLA-IEMA e PLA-LAR2:1 demonstraram ser ligeiramente hidrofílicos, enquanto PLA-MAA e PLA-LAR1:1A, B ou C se revelaram hidrofílicos (quando imersos em solução PBS) [4, 12]; 5) A capacidade de absorção de água de todos os adesivos produzidos demonstrou-se dependente do pH do meio, do monómero funcional utilizado e do grau de reticulação (*gel content*) dos materiais; 6) A espessura não pareceu ser um fator preponderante na capacidade de hidratação das amostras.

Independentemente das diferenças observadas, todos os adesivos produzidos demonstraram uma capacidade de absorção de água moderada, correspondendo aos requisitos inicialmente referidos. Uma vez que a capacidade de absorção de água conduz a um aumento de volume do material, adesivos com capacidades de absorção acima de 20% poderão trazer problemas aos tecidos envolventes, quando implantados *in vivo* [11, 12, 109]. Ainda assim, dado o comportamento dos materiais em solução aquosa, esse facto não é preocupante, uma vez que iniciam a sua degradação por hidrólise após algumas horas.

Manipulando todos os parâmetros mencionados, consegue-se obter um adesivo com a capacidade de hidratação desejada, não só para cirurgia, mas também para aplicações transdérmicas. O produto PLA-LAR1:1 demonstrou ser o mais versátil e adequado.

4.2.2. Microscopia eletrónica de varrimento (SEM)

Todas as membranas produzidas neste trabalho foram analisadas pela técnica SEM, permitindo observar as diferenças morfológicas decorrentes dos diversos modos de preparação. Uma vez fixa a quantidade de fotoiniciador, foi apenas possível estudar a influência dos monómeros funcionais e do tempo de irradiação UV (para o PLA-LAR1:1), na sua estrutura final. Como constatado anteriormente, as membranas apresentaram estados de reticulação distintos, resultado dos diferentes rendimentos de reticulação. Com a técnica SEM pretendeu-se verificar se essas diferenças decorriam de uma menor ou maior porosidade do material (influenciando o seu comportamento quando incubadas em solução aquosa).

As membranas preparadas foram observadas na sua superfície e corte transversal, a diferentes ampliações. Nas Figuras 4.8 e 4.9 apresentam-se as imagens referentes às superfícies e secções transversais dos adesivos com espessura de 1mm, a uma ampliação de 5000×.

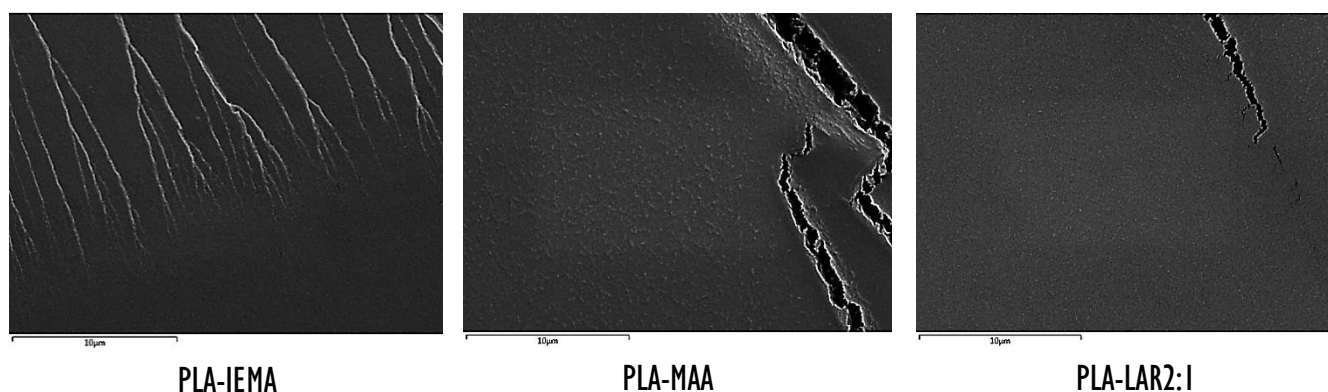


Figura 4.8 Fotografias de SEM (ampliação de 5000×) da **secção transversal** dos adesivos PLA-IEMA, PLA-MAA e PLA-LAR2:1, respetivamente (espessura de 1mm; 2 min de irradiação UV).

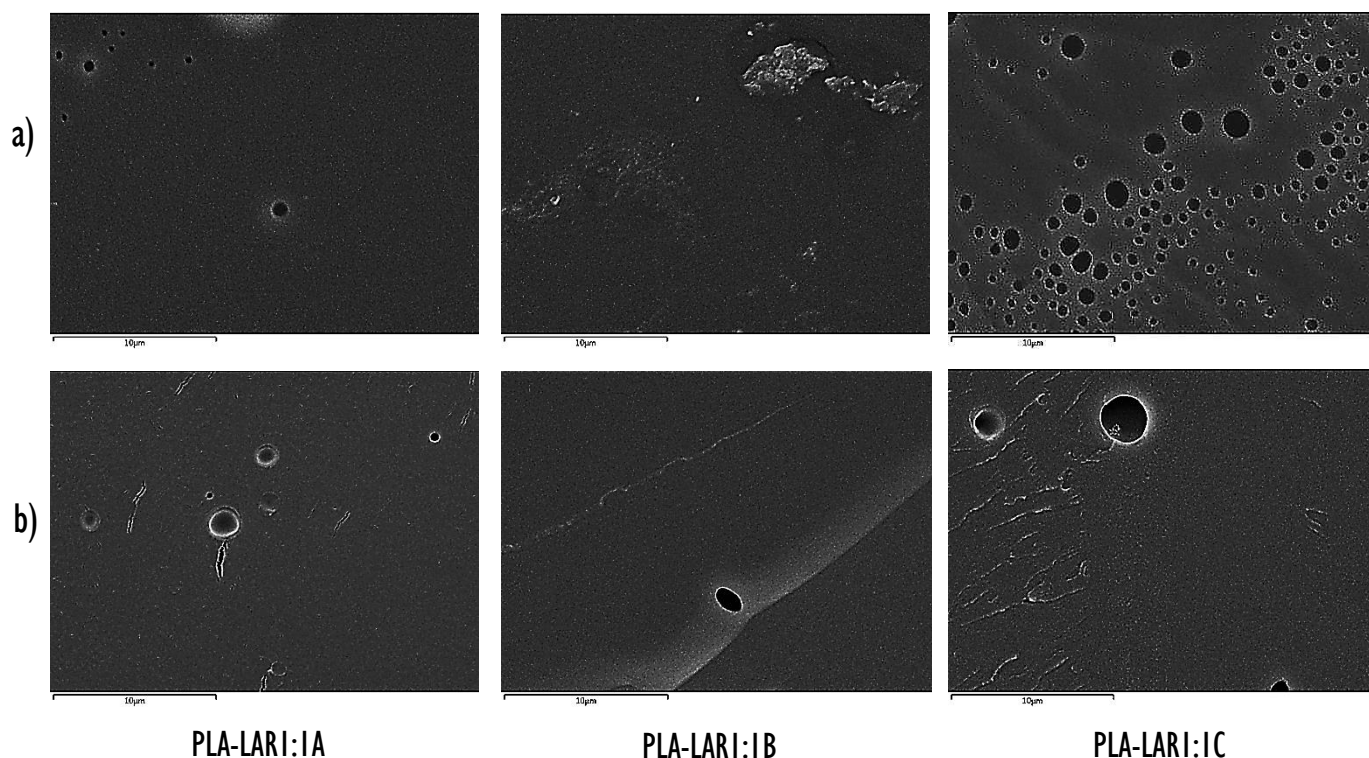


Figura 4.9 Fotografias de SEM (ampliação de 5000×): **a)** da superfície e **b)** secção transversal dos adesivos PLA-LAR1:1A, PLA-LAR1:1B e PLA-LAR1:1C, respetivamente (espessura de 1mm). Avaliação do efeito do tempo de irradiação UV.

Analisando as fotografias de SEM das Figuras 4.8 e 4.9, verifica-se que os adesivos obtidos a partir de um mesmo tempo de irradiação não apresentam diferenças significativas no que diz respeito à sua estrutura/morfologia. Todos os filmes revelaram ser bastante compactos, com uma superfície muito lisa e homogénea, apesar de pequenas fissuras em alguns casos. Na Figura 4.9 é possível confirmar a influência do tempo de irradiação UV na estrutura morfológica do produto PLA-LAR1:1. Uma redução no tempo de irradiação conduziu à formação de membranas de menor densidade, mais maleáveis e por consequência mais porosas, como seria de esperar. Ainda assim, a diferença foi mais acentuada entre os produtos PLA-LAR1:1B (1 minuto) e PLA-LAR1:1C (30 segundos), do que entre o PLA-LAR1:1A (2 minutos) e o PLA-LAR1:1B. Porém, é de salientar que os poros que se observam na estrutura do PLA-LAR1:1C parecem também estar relacionados com a evaporação do solvente. Todos os adesivos foram sujeitos a secagem antes de caracterizados. Uma evaporação mais rápida do solvente poderá ter originado a formação de poros na matriz, conferindo-lhe este aspeto. Dada a porosidade observada, não é de surpreender a crescente capacidade de absorção de água, comparativamente às membranas obtidas a partir de um maior tempo de irradiação UV. Nesta análise, pretendeu-se ainda avaliar se um aumento de espessura (de 1 para 2mm) conduziria a diferenças na morfologia dos materiais. Tal não foi constatado, sendo as fotografias praticamente iguais, razão pela qual não são aqui apresentadas.

Consideram-se como fatores preponderantes na obtenção de estruturas com maior ou menor porosidade: 1) o tempo de irradiação UV; 2) e quantidade de fotoiniciador utilizada. Ferreira [11] salienta que no processo de reticulação dos materiais (induzido por exposição UV) existe um aumento das ligações intra e intermoleculares, o que significa que quanto maior for o tempo de reticulação, mais densa e compacta será a estrutura, suportando os resultados obtidos. Também a quantidade de fotoiniciador seria um parâmetro bastante importante. Verifica-se para uma quantidade de 6%, que todas as membranas obtidas são compactas e apresentam estrutura lisa. Uma redução na quantidade de fotoiniciador, para um mesmo

tempo de irradiação UV, resultaria à partida em matrizes mais porosas [11, 70]. A porosidade é um aspeto importante, e deve ser considerado quando se pretende a aplicação dos materiais em Engenharia de Tecidos. Um material mais poroso não só apresenta uma maior capacidade de absorção de água, como permite uma maior adaptação das células ao mesmo, facilitando a sua proliferação, e o transporte de nutrientes, gases e outros componentes [30, 111, 112]. Em aplicações transdérmicas a quantidade e dimensão dos poros são fatores muito importantes a ter em conta na libertação de um dado fármaco e na prevenção de contaminações bacterianas [112 – 114]. Os adesivos obtidos neste trabalho apresentaram estruturas muito compactas e pouco porosas. Tal facto poderá ser uma limitação nas aplicações referidas.

4.2.3. Propriedades térmicas

A caracterização térmica dos materiais foi também objeto de estudo e interesse. Nesta secção, para além de exibidas as propriedades térmicas dos adesivos sintetizados, são também apresentadas as propriedades térmicas do pré-polímero produzido (PLA) e dos pré-polímeros modificados no estado líquido.

4.2.3.1. Análise Termogravimétrica (TGA)

Tal como descrito na secção 3.3.5. (Capítulo 3), pretendeu-se com esta análise o estudo e avaliação da estabilidade térmica dos materiais produzidos, líquidos e reticulados, quando sujeitos a um aumento controlado de temperatura até 600°C, analisando os perfis de degradação exibidos. Para cada material foi determinada a temperatura de degradação (T_d). Teve-se como objetivos: 1) analisar o perfil de degradação do pré-polímero sintetizado, de modo a determinar o valor de T_d , confrontando com valores típicos da literatura para PLA comercial; 2) comparar a estabilidade térmica dos pré-polímeros modificados no seu estado líquido e reticulado, detetando as perdas de massa ocorridas no processo de aquecimento; 3) comparar a estabilidade das matrizes reticuladas obtidas por diferentes modificações do PLA, de forma a estudar a influência do monómero funcional na T_d dos adesivos; 4) e finalmente comparar a influência do tempo de irradiação UV na estabilidade térmica do produto PLA-LAR1:1.

De acordo com alguns autores [115, 116], tem sido necessária a melhoria das propriedades térmicas e mecânicas de PLA comercial de elevado peso molecular, recorrendo a diversas estratégias de modificação com plastificantes, em condições de processamento exigentes. Ainda assim, como já referido no Capítulo 1, este polímero apresenta estabilidade térmica superior a outros biopolímeros, com temperaturas de degradação acima de 200°C [36 – 40]. Uma vez sintetizado PLA líquido, de baixa viscosidade e baixo peso molecular ($M_w = 500 \text{ g.mol}^{-1}$), esperou-se obter um material com um perfil termicamente inferior ao PLA comercialmente existente. *Chhaya Engineer et al.* [117] referem que o peso molecular é um dos fatores que influencia o processo de degradação em polímeros, reportando que quanto menor for o peso molecular, mais rápida será a sua degradação.

Na Figura 4.10 é exibido o perfil de degradação térmica do pré-polímero produzido, sendo possível constatar que a perda de massa ocorreu essencialmente em duas fases. A primeira corresponde aproximadamente a uma perda de 5% em relação à massa inicial, até à temperatura de 97°C. Esta perda poderá corresponder à evaporação de água, sugerindo que esta não foi totalmente removida, o que indica que o tempo de reação para produção do PLA (9h) poderá ter que ser superior, a fim de garantir a completa remoção de água. A segunda encontra-se no início da descida abrupta da curva, a 199°C, tendo sido considerado o valor da temperatura de degradação do material. Muitos autores consideram o valor de T_d como sendo o pico na derivada da curva TGA (curva DTG). Porém, neste trabalho, o valor de T_d foi

considerado no instante exatamente antes da descida acentuada da curva. Verificou-se no perfil exibido que a partir dos 199°C a variação de massa foi muito rápida, de tal modo que a partir dos 240°C o polímero sofreu uma degradação quase completa. Porém, quantidades mínimas de material foram ainda detetadas no fim da análise.

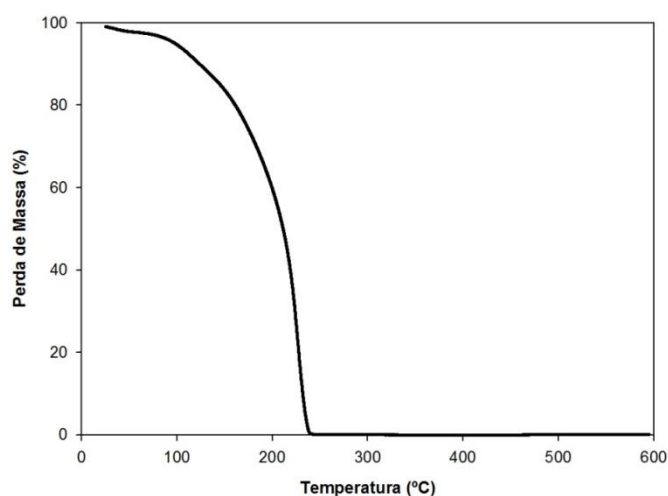


Figura 4.10 Perfil de degradação térmica do pré-polímero sintetizado (PLA), $M_w = 500 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$, obtido por análise termogravimétrica (rampa de aquecimento de $10^\circ\text{C min}^{-1}$).

De acordo com o estudo realizado por *Silverajah et al.* [116], PLA comercializado pela *NatureWorks LLC* apresenta um valor de T_d de aproximadamente 260°C , exibindo um pico de degradação na curva DTG a 325°C , degradando-se totalmente a uma temperatura de 363°C . Também Marques [12] produziu PLA de elevado peso molecular por policondensação, tendo reportado valores de T_d de 271 a 302°C , consoante o sistema catalítico utilizado no processo. Face aos valores apresentados, constata-se de facto que o polímero do qual se partiu para a síntese dos bioadesivos é termicamente menos estável. Contudo é importante salientar que a variedade de processos e estudos existentes tem resultado numa diversidade de comportamentos térmicos, não sendo estes diretamente comparáveis. Apesar de menos estável, constata-se que o pré-polímero linear obtido apresenta um valor de T_d aceitável, face ao seu baixo peso molecular. Tal valor não compromete as reações de modificação realizadas (uma vez que decorreram a temperaturas inferiores), nem a subsequente utilização nas aplicações biomédicas desejadas. Com a sua modificação esperou-se obter produtos termicamente mais estáveis, como confirma a Figura 4.11.

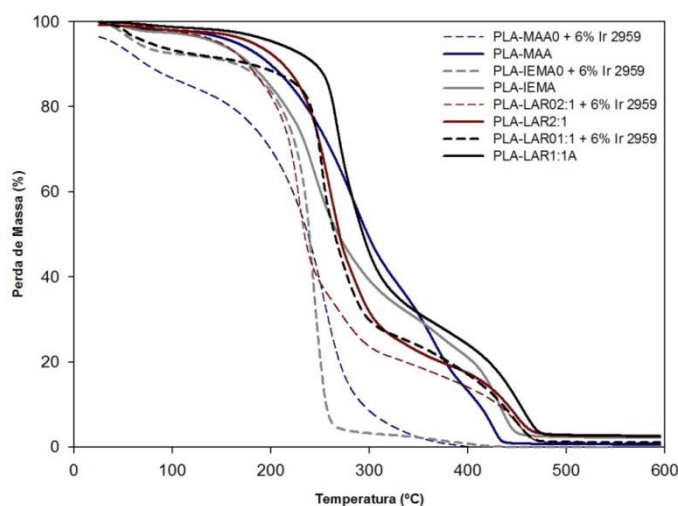


Figura 4.11 Traços termogravimétricos obtidos para os pré-polímeros modificados com 6% de Ir 2959 no estado líquido (---) e após 2 minutos de irradiação UV (—), com rampa de aquecimento de $10^\circ\text{C min}^{-1}$.

De acordo com os resultados obtidos, foi possível detetar uma crescente estabilidade térmica do material após modificação com diferentes monómeros e após reticulação fotoquímica. Observando atentamente a Figura 4.11, foi possível detetar que todos os pré-polímeros modificados no estado líquido, antes de irradiação UV, apresentaram uma pequena variação de massa entre os 30 e os 200°C, exibindo uma variação significativa de massa a partir de 200°C, o que sugeriu desde logo um aumento no valor de T_d face ao pré-polímero sintetizado. A primeira perda de massa aos 30°C pode estar relacionada com a volatilização do éter dietílico, que foi usado como solvente (ponto de ebulição de 35°C).

Comparando os pré-polímeros modificados, observou-se que o menos estável foi o PLA-MAA0. O facto de apresentar um perfil ligeiramente instável para baixas temperaturas poderá indicar a evaporação de algum monómero livre presente na solução final, que não reagiu com os terminais hidroxilo do PLA (dado que o ponto de ebulição do MAA se encontra nesta faixa de valores). O PLA-LAR02:1 exibiu um comportamento mais instável na fase inicial do processo, contudo a degradação foi mais lenta a elevadas temperaturas, comparativamente ao PLA-IEMA0. De todos, o PLA-LAR01:1 exibiu o comportamento térmico mais estável. Ainda assim é importante mencionar que na faixa de 30 a 200°C todos os polímeros perderam aproximadamente 10% da sua massa.

Observando os traços termogravimétricos dos pré-polímeros reticulados, verificou-se também uma pequena perda de massa a 30°C, contudo muito menos acentuada que os materiais no estado líquido, sugerindo que as membranas estavam praticamente secas antes da realização da análise. Constata-se também em geral que o processo de reticulação fotoquímica deu origem a materiais termicamente mais estáveis, não só na fase inicial de degradação, mas também a elevadas temperaturas. Observou-se uma crescente estabilidade em todos os materiais, exibindo temperaturas de degradação superiores. Mais uma vez foi visível a maior estabilidade térmica do PLA-LAR1:1A face aos restantes materiais. Os valores de T_d registados encontram-se compilados na Tabela 4.4, para facilitar a análise efetuada.

PLA-MAA0 e PLA-IEMA0 apresentaram valores de T_d superiores às membranas a que dão origem, contudo apresentam um perfil mais instável até ser atingida a temperatura de degradação. Ambos os pré-polímeros se degradaram na totalidade quando a temperatura atingiu os 400 e 530°C, respetivamente, enquanto as membranas ainda apresentavam vestígios por degradar no final da análise, a uma temperatura de 600°C.

Os produtos PLA-LAR02:1 e PLA-LAR01:1 apresentaram menores valores de T_d face às membranas a que deram origem. Também o perfil de degradação ao longo do processo foi mais instável. PLA-LAR02:1 degradou-se na totalidade aos 590°C, enquanto o PLA-LAR01:1 apresentava vestígios por degradar, o que comprova que este produto é mais estável, até no estado líquido. Os adesivos PLA-LAR2:1 e PLA-LAR1:1 também terminaram os ensaios com vestígios por degradar. O PLA-LAR1:1, para além do valor mais elevado de T_d , apresentou a maior percentagem de massa por degradar no fim da análise.

Foi ainda avaliada a influência do tempo de irradiação UV para este produto. Pelos resultados na Tabela 4.4, verificou-se que o estado de reticulação da membrana, decorrente de diferentes tempos de exposição a UV, não teve influência nos valores de T_d dos materiais, sendo os traços termogravimétricos quase sobreponíveis (Figura 4.12). Também não se registou uma influência do *gel content* das amostras na estabilidade térmica dos adesivos.

Tabela 4.4 Temperaturas de degradação dos materiais sintetizados: PLA, PLA modificado e PLA reticulado [116].

TEMPERATURAS DE DEGRADAÇÃO					
PRODUTOS	<i>Gel content</i> (%)	T_d (°C)	$T^{95\%}$ (°C) ^{a)}	$T^{90\%}$ (°C) ^{a)}	$T^{50\%}$ (°C) ^{a)}
PRÉ-POLÍMERO					
PLA	-	199	97	124	210
PLA comercial	-	260	-	-	-
PRÉ-POLÍMEROS MODIFICADOS					
PLA-MAAO	-	220	37	74	238
PLA-IEMAO	-	230	64	161	239
PLA-LAR02:I	-	205	147	172	235
PLA-LAR01:I	-	245	74	181	265
MATRIZES POLIMÉRICAS (1mm)					
PLA-MAA	77	216	165	199	298
PLA-IEMA	89	205	144	180	267
PLA-LAR2:I	66	228	180	212	270
PLA-LAR1:IA	95	251	203	245	293
PLA-LAR1:IB	88	250	203	241	290
PLA-LAR1:IC	85	250	222	254	304

a) $T^{95\%}$, $T^{90\%}$, $T^{50\%}$ - Temperaturas correspondentes a uma perda de massa de 5, 10 e 50%, respetivamente.

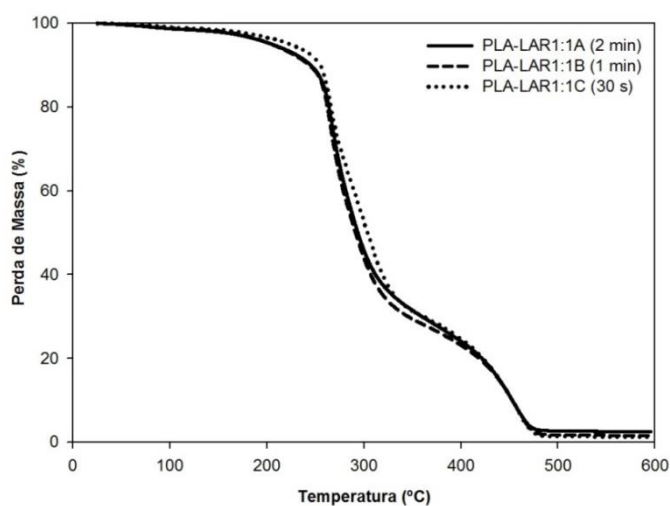


Figura 4.12 Traços termogravimétricos obtidos para os adesivos PLA-LAR1:1A, B ou C, com rampa de aquecimento de 10°C min⁻¹. Avaliação do efeito do tempo de irradiação UV na estabilidade térmica dos materiais.

Os resultados permitiram concluir: 1) que a modificação do PLA com diferentes monómeros deu origem a polímeros termicamente mais estáveis; 2) a reticulação fotoquímica contribuiu para uma maior

estabilidade dos materiais; 3) o tempo de irradiação UV para o PLA-LAR1:1 não teve influência na sua estabilidade térmica; 4) o adesivo PLA-LAR1:1 apresentou maior estabilidade durante todo o processo 5) e que, face às aplicações biomédicas pretendidas e considerando os valores de temperatura de degradação obtidos, todos os produtos serão estáveis à temperatura fisiológica (37°C), antes e após reticulação.

4.2.3.2. Análise por calorimetria diferencial de varrimento (DSC) e análise térmica dinâmico-mecânica (DMTA)

No decorrer da caracterização térmica efetuada teve-se ainda como objetivo a determinação dos valores de T_g dos materiais sintetizados. Segundo *Hakala* [21], o processo de fotoreticulação é facilitado quando a T_g dos oligómeros é inferior à temperatura fisiológica. Menores valores de T_g significa que não é necessária tanta energia para que as cadeias do polímero se movimentem, passando este do estado vítreo para o estado borrachoso com maior facilidade [12, 16, 21, 26, 118, 119]. Além do peso molecular, a T_g também tem influência no processo de degradação dos adesivos sintetizados. Maiores valores de T_g indicam que a rede polimérica é mais firme e compacta, contribuindo para uma degradação mais lenta (Anexo B) [21]. Tais informações permitem complementar os resultados anteriormente obtidos e são pertinentes mais à frente no estudo de degradação hidrolítica.

Neste âmbito, utilizou-se a técnica DSC para identificar transições térmicas no pré-polímero sintetizado, pré-polímeros modificados no estado líquido e membranas após reticulação fotoquímica. Todas as amostras foram submetidas a uma variação de temperatura de -80°C a 200°C, com um fluxo de aquecimento de 10°C min⁻¹, como referido na secção 3.3.5. A técnica DMTA foi também selecionada para identificar a T_g das membranas, dada a elevada sensibilidade a esta transição, comparativamente à técnica DSC [12, 26]. As análises DMTA foram conduzidas em *Constrain Layer Damping Mode* em condições de multifrequência, assegurando a devida identificação dos valores de T_g dos materiais.

Dada a elevada sensibilidade da técnica, esperou-se obter valores de T_g superiores aos obtidos por DSC [26]. Marques [12] analisou os adesivos PLA-MAA e PLA-IEMA por DMTA, comprovando que os valores de T_g de ambos eram inferiores à temperatura fisiológica. Assim, a análise DMTA neste trabalho foi aplicada somente aos novos produtos PLA-LAR2:1 e PLA-LAR1:1 (para os diferentes tempos de irradiação UV).

Na Tabela 4.5 são compilados os valores de T_g dos materiais, determinados por ambas as técnicas. Os traços de DMTA na frequência de 1Hz para os produtos PLA-LAR2:1 e PLA-LAR1:1A são exibidos na Figura 4.13. Na Figura 4.14 encontram-se os traços de DMTA dos adesivos PLA-LAR1:1A, B e C, a fim de avaliar a influência do tempo de irradiação UV nas propriedades térmicas dos mesmos. Os traços de DSC dos pré-polímeros modificados e reticulados e os traços de DMTA obtidos em multifrequência (comprovando os valores de T_g determinados) encontram-se no Anexo O.

Observando os resultados obtidos pela técnica DSC (Tabela 4.5) foi possível constatar que o oligómero de estrutura linear sintetizado apresentou um valor de T_g bastante baixo, comportando-se como um líquido de baixa viscosidade. Após modificação com MAA, o valor de T_g diminuiu, o que se revelou extremamente favorável para o processo de fotoreticulação [21]. Resultado de um aumento no peso molecular, os pré-polímeros PLA-IEMA0 e PLA-LAR02:1 apresentaram valores de T_g superiores, e maior viscosidade que o PLA-MAA0.

Tabela 4.5 Temperaturas de transição vítrea dos materiais sintetizados, determinadas por DSC e DMTA.

TEMPERATURAS DE TRANSIÇÃO VÍTREA				
PRODUTOS	M_w (g.mol ⁻¹)	Gel content (%)	T_g (por DSC) a)	T_g (por DMTA) b)
PRÉ-POLÍMEROS				
PLA	500	-	-47,7	-
PLA-MAAO	654	-	-65,5	-
PLA-IEMA0	810	-	-29,8	-
PLA-LAR02:1	n.a ^{c)}	-	-31,3	-
PLA-LAR01:1	n.a ^{c)}	-	-18,4	-
MATRIZES POLIMÉRICAS (1mm)				
PLA-MAA	-	77	-36,9	n.a
PLA-IEMA	-	89	-10,9	n.a
PLA-LAR2:1	-	66	-7,6	15,2
PLA-LAR1:1A	-	95	0,5	37,1
PLA-LAR1:1B	-	88	-4,8	30,2
PLA-LAR1:1C	-	85	-6,2	29,7

a) DSC a 10°C min⁻¹;

b) DMTA a 5°C min⁻¹;

c) É esperado um peso molecular superior aos restantes materiais;

n.a. – não avaliado.

Apesar de não ter sido avaliado o peso molecular dos pré-polímeros PLA-LAR02:1 e PLA-LAR01:1, é de esperar pesos moleculares superiores aos restantes materiais. O peso molecular do LAR é 578 g.mol⁻¹. Face às modificações de PLA realizadas, espera-se que o peso molecular do PLA-LAR02:1 seja semelhante ao PLA-IEMA, enquanto o PLA-LAR01:1 deverá ser superior. Tal facto, se se verificar, permite encontrar uma relação entre o peso molecular dos pré-polímeros e os valores de T_g obtidos. Assim, quanto maior for o peso molecular do pré-polímero, maior será o valor de T_g , o que se coaduna com o aumento de T_g quanto maior for o comprimento de cadeia. Apesar das diferenças observadas, todos os materiais apresentaram valores de T_g inferiores à temperatura fisiológica, indo de encontro ao que era pretendido.

As matrizes reticuladas apresentaram valores de T_g superiores aos oligómeros, sendo os valores dependentes dos pesos moleculares dos seus precursores. O aumento de T_g foi mais acentuado para os precursores de menor peso molecular, como o PLA-MAA0, de -65,5°C para -36,9°C. Este aumento mais dramático poderá ser atribuído a uma menor distância entre os pontos de *cross-link* do precursor, resultando numa maior densidade de reticulação, de acordo com *Karikari et al.* [26]. Contudo, é importante referir que o valor de T_g da membrana PLA-MAA continuou a ser o mais baixo de todos os valores medidos.

A influência dos monómeros nos valores de T_g das membranas não pode ser diretamente discutida, uma vez que correspondem a membranas com estados de reticulação diferentes. Ainda assim, é visível a obtenção de matrizes com valores de T_g distintos, consoante o monómero funcional [12].

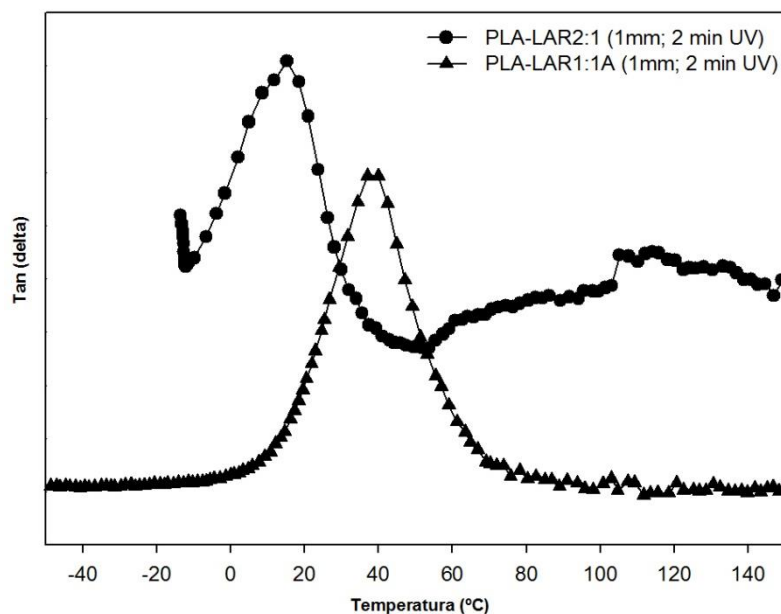


Figura 4.13 Traços de $\tan \delta$ em função da temperatura (à frequência de 1 Hz) para os adesivos PLA-LAR2:1 e PLA-LAR1:1A. Avaliação do efeito de diferentes proporções de LAR na modificação do PLA.

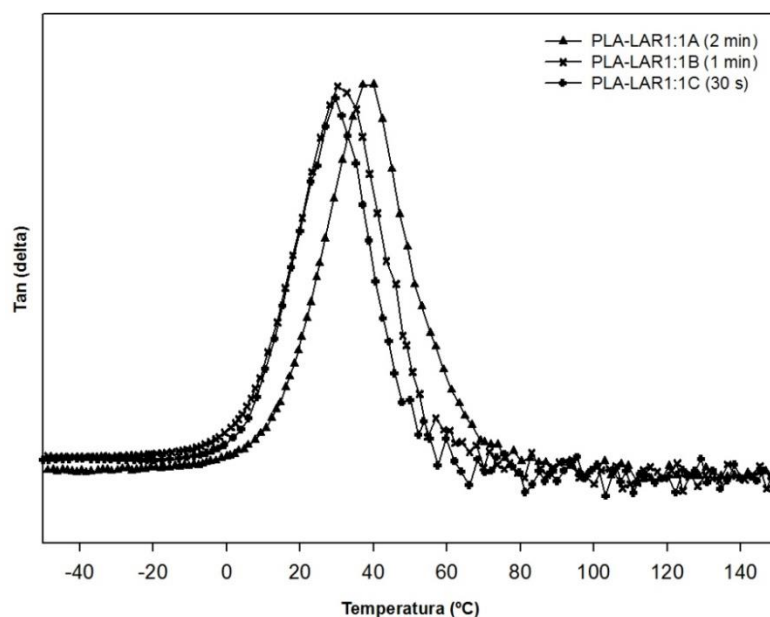


Figura 4.14 Traços de $\tan \delta$ em função da temperatura (à frequência de 1 Hz) para os adesivos PLA-LAR1:1A, B e C. Avaliação do efeito do tempo de irradiação UV.

Os valores de T_g obtidos por DMTA foram notoriamente superiores em relação aos valores obtidos por DSC, facilmente identificados como o pico em $\tan \delta$. Uma vez que as técnicas se baseiam em diferentes princípios, ambos os resultados são considerados corretos, esperando-se sempre uma diferença de 20 a 30°C de uma técnica para outra, como foi demonstrado. O DMTA, por ser uma técnica mais sensível, torna-se mais precisa e exata na determinação deste parâmetro [119]. Observando novamente a Tabela 4.5 e o gráfico da Figura 4.13 foi possível comprovar que diferentes proporções de LAR na modificação do PLA resultaram em membranas com propriedades térmicas distintas, sendo o valor de T_g do PLA-LAR2:1 sensivelmente metade do valor para o PLA-LAR1:1. Essa tendência foi também verificada nos resultados obtidos por DSC. Contudo, os valores de T_g destes dois produtos não são diretamente

comparáveis, visto que as membranas apresentam estados de reticulação diferentes [21]. Os resultados da Figura 4.14, também visíveis na Tabela 4.5, sugerem que o tempo de irradiação UV teve uma ligeira influência nos valores de T_g do produto PLA-LAR1:1. Menores tempos de irradiação resultaram em materiais com valores de T_g inferiores. Contudo, essa influência foi mais evidente de 2 minutos para 1 minuto de reticulação, do que de 1 minuto para 30 segundos, sendo os traços de DMTA para os produtos PLA-LAR1:1B e PLA-LAR1:1C quase sobreponíveis.

De acordo com a análise de DMTA, e tendo em conta os resultados obtidos por Marques [12], os adesivos sintetizados apresentaram valores de T_g na gama de 1 a 37°C, cumprindo os requisitos necessários à finalidade pretendida.

4.2.4. Degradação hidrolítica em solução PBS

Dependendo do local de aplicação, adesivos cirúrgicos são vistos como instrumentos de utilização temporária no organismo. Em aplicações cutâneas ou feridas exteriores, e dependendo da sua biodegradabilidade, os adesivos poderão depois soltar-se, removidos pelo utilizador quando terminado o processo de cicatrização, ou então sofrer degradação com o tempo (sendo absorvidos pelo próprio organismo). Porém, se os materiais forem utilizados internamente, o carácter temporário passa a ser um aspeto crítico. A durabilidade dos materiais no organismo vai depender da sua biodegradabilidade, sendo esta dependente de inúmeros fatores, como explicado em capítulos anteriores.

Estudos de biodegradação foram conduzidos ao longo de 6 semanas para os adesivos resultantes de irradiação UV de 2 minutos. Os materiais foram incubados em solução PBS (pH 7,4), à temperatura de 37°C. Pretendeu-se estudar a variação de massa ocorrida ao longo dos diversos tempos de incubação estabelecidos, determinando os valores de perda de massa (%) dos adesivos (1 e 2mm de espessura) através da Equação 3.4. Os resultados para os adesivos de 1mm encontram-se na Figura 4.15. No Anexo P, Figura P.1, encontram-se representados os resultados obtidos para adesivos de 2mm.

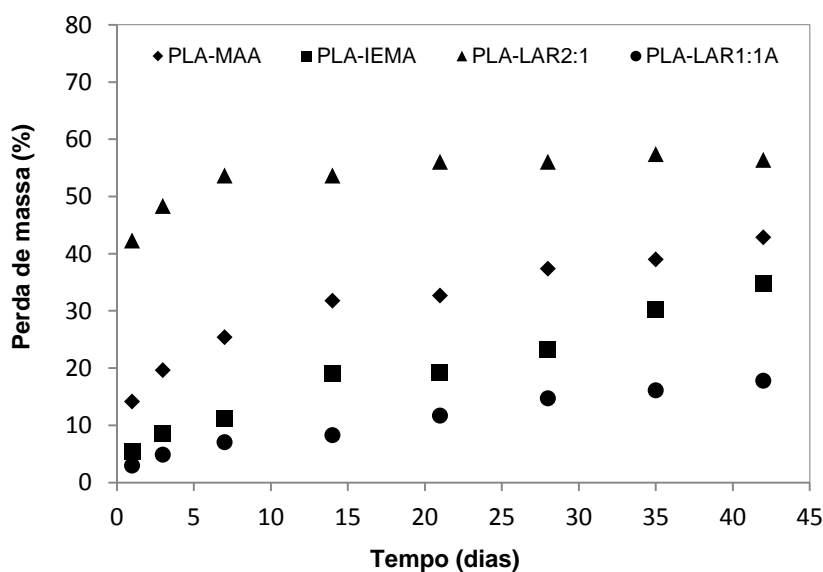


Figura 4.15 Perda de massa dos adesivos PLA-MAA, PLA-IEMA, PLA-LAR2:1 e PLA-LAR1:1A, 1mm, por hidrólise em solução PBS, a 37°C, durante 6 semanas.

Os resultados indicam que todos os adesivos são hidroliticamente instáveis, exibindo uma perda de massa mais acentuada nos primeiros dias de incubação, com tendência a estabilizar no decorrer do estudo

experimental. Esta perda de massa acentuada das matrizes nas primeiras 48h do teste poderá ser devida à libertação de componentes mais simples, de baixo peso molecular, como monómero não reagido ou moléculas de fotoiniciador que se encontravam aprisionadas na rede polimérica [12]. A libertação de quantidades residuais de éter dietílico para o meio de incubação poderá também ter contribuído. Apesar de esta tendência ser comum a todos os materiais, foi possível constatar que estes apresentaram taxas de degradação consideravelmente distintas.

Inúmeros fatores podem ter influência na degradação dos adesivos em ambiente aquoso, nomeadamente: 1) composição química; 2) estado de reticulação e morfologia/porosidade; 3) capacidade de absorção de água; 4) peso molecular dos precursores; 5) comprimento de cadeia dos polímeros; 6) temperatura de transição vítrea (T_g), etc. [21, 110, 117, 120, 121] (Anexo B).

A Figura 4.15 sugere desde logo que a perda de massa dependeu bastante do tipo de monómero funcional utilizado na modificação do PLA e que, em cada caso, outros fatores tiveram maior ou menor influência. Comparando a percentagem de perda de massa dos adesivos constata-se que o PLA-LAR2:1 sofreu maior degradação ao longo do processo. Destaque para uma perda de massa de aproximadamente 42% após 24h. Tal facto poderá estar relacionado com o seu estado de reticulação. Como referido anteriormente, o PLA-LAR2:1 com um conteúdo em gel de apenas 66%, apresentou um grau de reticulação bastante débil comparativamente aos restantes produtos. As quantidades de polímero por reticular, juntamente com o solvente ainda aprisionado na matriz, poder-se-ão ter dissolvido no PBS, resultando numa perda de massa muito acentuada no início do teste. Este resultado vai de encontro ao facto da solução PBS ter ficado ligeiramente opaca e turva. Após esta perda de massa, houve tendência a estabilizar a partir da segunda semana, registando-se um valor máximo de perda de aproximadamente 57%, ao fim dos 45 dias. Esta estabilização tão rápida poderá estar relacionada com o carácter hidrófobo que o material manifestou quando incubado em solução PBS (como foi verificado na Figura 4.7).

Tendo em conta os resultados obtidos para o PLA-LAR1:1A, conclui-se que diferentes proporções do monómero LAR na modificação do PLA resultaram em materiais com propriedades distintas. Esta conclusão comprova que não é só o tipo de monómero que influencia o comportamento do material final, mas também a sua proporção [21, 120]. Neste caso, o adesivo perdeu apenas 3% de massa na fase inicial, apresentando uma perda máxima de 18% no final do estudo. Por sua vez, o PLA-IEMA sofreu uma perda de massa de 6% no primeiro dia, exibindo uma perda máxima final de 35%. O PLA-MAA apresentou uma taxa de degradação superior, perdendo cerca de 14% de massa no início e de 43% no final das seis semanas de incubação em PBS.

Estes resultados relacionam-se com o estado de reticulação dos adesivos. Como observado na Tabela 4.3, o adesivo PLA-LAR1:1A apresentou um maior conteúdo em gel (95%), seguido do PLA-IEMA, PLA-MAA e finalmente do PLA-LAR2:1. Assim, pode-se afirmar que quanto maior a densidade/estado de reticulação do material, menor foi a taxa de degradação. Maiores densidades de reticulação resultam em materiais com menor porosidade, exibindo menores valores de degradação. Contudo, diferenças na porosidade dos materiais não foram detetadas nas fotografias de SEM (Figuras 4.8 e 4.9), onde todos os adesivos ostentam estruturas compactas e homogéneas. As diferenças no estado de reticulação das membranas advêm das diferentes composições químicas. No caso dos adesivos de PLA com LAR, advêm de diferentes quantidades de monómero. Todos estes fatores contribuíram para os perfis de degradação exibidos. Diretamente relacionado com o estado de reticulação estão os valores de T_g dos materiais.

Matrizes com maior densidade de reticulação apresentam valores de T_g superiores, o que significa que apresentam estruturas mais organizadas, estáveis e com menor espaço livre [21, 117, 120]. O PLA-LAR1:1A foi o adesivo que apresentou maior valor de T_g , sendo também o que sofreu menor perda de massa. Estes resultados são concordantes com o facto de ter sido o material mais estável termicamente.

Também o peso molecular dos precursores influenciou a biodegradação dos adesivos. Segundo *Makadia et al.* [120] polímeros com peso molecular superior exibem taxas de degradação inferiores. Diretamente relacionado com o peso molecular está o comprimento de cadeia, e a quebra de um elevado número de ligações dificulta o processo de degradação. Esta poderá ser mais uma explicação para as menores taxas de degradação dos adesivos PLA-IEMA e PLA-LAR1:1A, que são resultantes de precursores com um peso molecular superior.

Ao longo do processo de incubação, o PLA sofre degradação não enzimática que resulta da suscetibilidade dos grupos éster à hidrólise, tal como é reportado por diversos autores [9, 12, 18, 117, 122]. Assim, a degradação hidrolítica foi claramente influenciada pela capacidade de absorção de água dos adesivos [11, 12, 21, 110, 117, 122]. Matrizes com densidades de reticulação inferiores apresentam uma maior capacidade de absorção de água, resultando numa maior taxa de degradação. Este facto explica o perfil de degradação do PLA-MAA, com um *swelling* superior aos outros adesivos. Para além disso, as ligações anidrido são mais suscetíveis a hidrólise [21]. Porém, o processo de degradação é um fenómeno muito complexo. O PLA-LAR1:1A, por exemplo, apresentou uma capacidade de absorção de água superior (quando incubado em PBS) comparativamente ao PLA-IEMA e ao PLA-LAR2:1, no entanto foi o que se degradou mais lentamente. O PLA-LAR2:1, com menor valor de *swelling*, foi o adesivo que perdeu mais massa em todo o processo. Isto permite concluir que os perfis de degradação exibidos resultam da conjugação de todos os fatores enunciados. Se, num determinado caso, a matriz polimérica apresenta um menor valor de T_g que contribui para um aumento na capacidade de absorção de água, por outro lado a composição química poderá estar a contribuir para um comportamento hidrófobo tornando o processo de degradação mais lento. Estas questões foram referidas por *Hakala* [21] e o seu estudo aprofundado torna-se bastante pertinente se se pretender desenvolver adesivos com ação farmacológica, uma vez que o tipo de fármaco e a quantidade incorporada vão também afetar o processo de degradação das matrizes [110, 117, 120].

Os adesivos sujeitos a degradação *in vitro* foram ainda observados pela técnica SEM, a fim de verificar as diferenças existentes na sua superfície e secção transversal (Figura 4.16). Foram visíveis as alterações que o PLA-IEMA sofreu na sua estrutura, registando-se um aumento expressivo na irregularidade da membrana devido ao processo de hidrólise. Considerando uma perda total de massa de 35% no final do estudo, pode-se assumir que o mecanismo dominante no processo de degradação foi a erosão de superfície [11, 12, 21]. Neste caso, o material degradou-se do exterior para o interior, sendo a capacidade de absorção de água menor que a taxa de degradação, com conseqüente aumento do desgaste da matriz em toda a sua superfície, deixando de ser uniforme e compacta. A irregularidade parece também ser interior, com a formação de estratificações na matriz.

Relativamente ao PLA-MAA não se observaram diferenças na superfície da membrana. Uma vez que foi dos materiais que mais se degradou, apresentando uma capacidade de absorção de água superior relativamente aos restantes adesivos, constata-se que o processo de degradação poderá ter sido dominado por um processo de erosão interna, sofrendo uma perda de massa uniforme em toda a matriz [21].

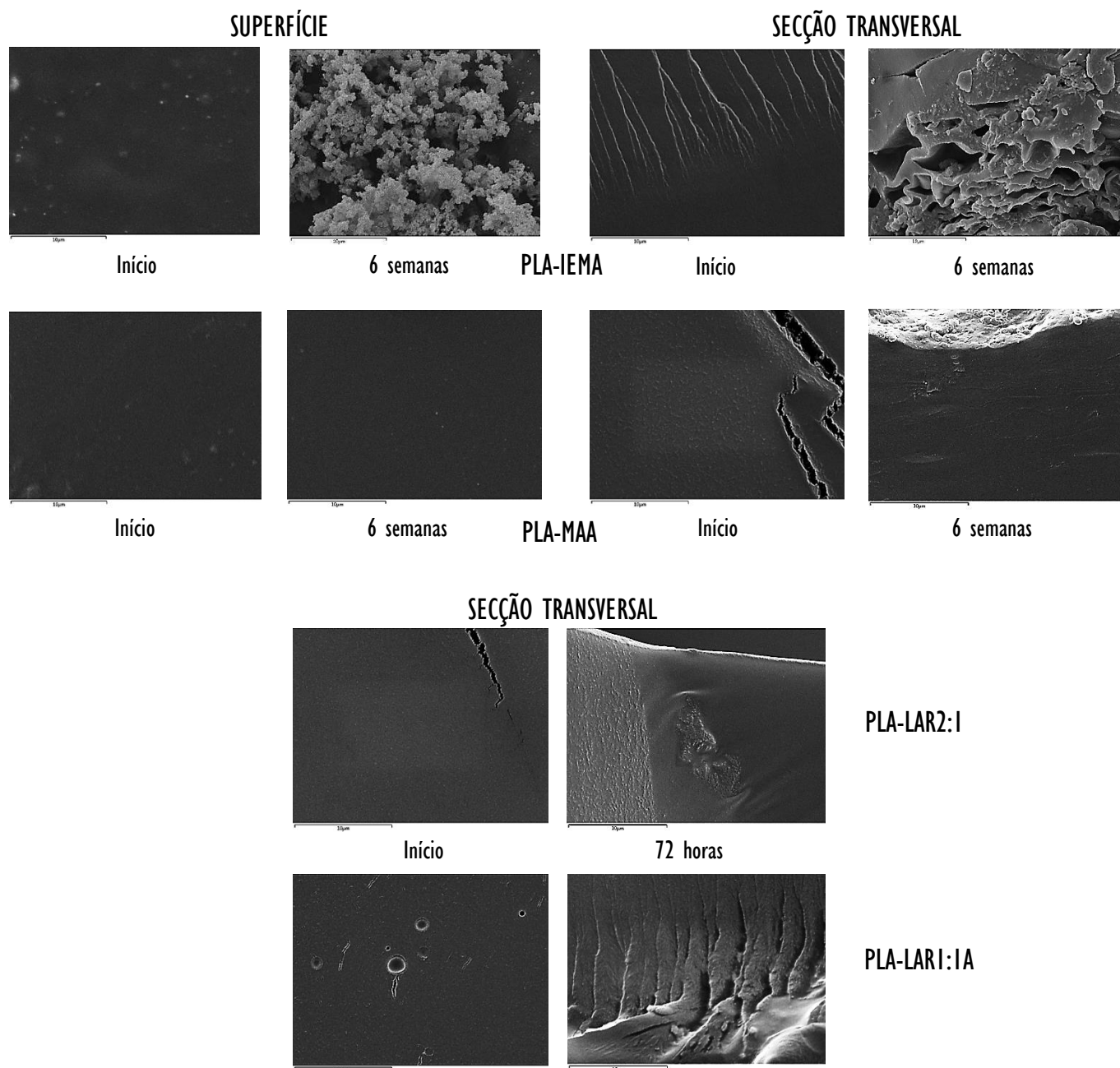


Figura 4.16 Fotografias de SEM (ampliação de 5000×) para os adesivos resultantes de um tempo de irradiação UV de 2 minutos assim que sintetizados e após 6 semanas de degradação (PLA-MAA e PLA-IEMA) e 72 horas de degradação (PLA-LAR2:1 e PLA-LAR1:1A).

Observa-se porém, na fotografia da secção transversal para as 6 semanas, um aumento da irregularidade da membrana PLA-MAA junto à sua superfície, o que prova que o processo de degradação poderá ter resultado de uma combinação de ambos os mecanismos (erosão interna e superficial), sem formação de poros na matriz polimérica. O PLA-LAR2:1 e o PLA-LAR1:1A mostraram sinais de erosão após 72 horas de incubação. O PLA-LAR2:1, apesar de ter perdido quase metade da sua massa no início do estudo, permanece com uma estrutura muito semelhante à inicial, com aspeto uniforme. Isto poderá comprovar que a perda de massa resultou da libertação de componentes mais simples para o meio de incubação, não afetando a consistência da matriz. O PLA-LAR1:1A apresenta porém uma estrutura mais estratificada e irregular comparativamente à estrutura inicial, resultado do fenómeno de hidrólise.

Adesivos resultantes de diferentes funcionalizações do PLA demonstram assim comportamentos divergentes, úteis em diversas aplicações dependendo da durabilidade desejada. Apesar das diferenças

observadas, todos os materiais exibiram perdas de massa consideráveis. Deste modo, a sua biodegradabilidade pode ser assegurada, com potencial de absorção pelo próprio organismo. Contudo, o processo de degradação poderá conduzir a resultados distintos quando implantados *in vivo*, com mais fatores a influenciar a degradação (local de implantação, presença de enzimas, pH, etc.) [120]. Tendo em conta os resultados obtidos para o PLA-LAR1:1A, torna-se pertinente o estudo de biodegradação para as membranas PLA-LAR1:1B e C, a fim de perceber a influência do tempo de irradiação UV e do estado de reticulação, na degradação de matrizes obtidas a partir do mesmo pré-polímero.

4.2.5. Adesão aos substratos

De acordo com o que foi mencionado no Capítulo 1, um adesivo biológico deve apresentar uma forte adesão aos tecidos, flexibilidade, capacidade de deformação e elevada resistência à tensão, com um comportamento mecânico adequado durante todo o processo de tratamento. Para além de manter os tecidos unidos, deverá também funcionar como barreira a fluidos pós cirurgia [30]. Assim, exige-se uma forte ligação em ambientes húmidos. Muitas vezes, neste contexto, o desempenho mecânico torna-se inferior [31, 32]. A ligação entre um adesivo e os tecidos envolve atrações moleculares, sendo consequência do balanço entre forças eletrostáticas de repulsão e forças de atração de *Van der Waals* [30, 123 – 125]. Por sua vez, a força dessa ligação está dependente das ligações químicas existentes à superfície (e das elongações que podem ocorrer), da rugosidade do material, da sua energia de superfície e do próprio substrato a que pretende aderir [4, 11, 30, 123]. Neste âmbito, tornou-se fundamental: 1) o estudo e avaliação da capacidade de adesão *in vitro* dos diferentes pré-polímeros; 2) e a determinação das energias de superfície dos adesivos por medição dos ângulos de contacto, comparando com valores de energia de superfície da literatura para a pele e fluidos sanguíneos. Nas próximas secções (4.2.5.1. e 4.2.5.2) apresenta-se cada um dos estudos, as motivações e resultados obtidos.

4.2.5.1. Testes de adesão em folhas de gelatina

Para testar a capacidade de adesão *in vitro*, foram utilizadas folhas de gelatina de dimensões idênticas, que funcionaram como substrato, simulando a ligação dos pré-polímeros aos tecidos biológicos. Posteriormente foi avaliada a força e consistência dessa ligação com a realização de ensaios mecânicos de tração. Se a capacidade de adesão for nula ou insuficiente para algum dos materiais, a utilização como adesivo cirúrgico fica comprometida. Cada pré-polímero no estado líquido foi colocado entre duas folhas de gelatina, seguindo-se a sua fotopolimerização *in situ*. Para o produto PLA-LAR1:1 foram testados diferentes tempos de irradiação UV. Nos ensaios de tração foram registados os valores de força (N) máxima suportada pelas amostras, até separação por rutura ou descolagem, usando uma folha de gelatina sem pré-polímero como controlo. Os resultados obtidos encontram-se na Figura 4.17. A Figura Q.1, Anexo Q, pretende ilustrar as várias etapas do estudo, de acordo com o que foi descrito na secção 3.3.7. Apresentam-se ainda fotografias dos ensaios (Figura Q.2).

Os testes de tração conduziram a resultados bastante satisfatórios. Observando a Figura 4.17, constata-se que as folhas de gelatina coladas com os pré-polímeros apresentaram valores de força de rutura elevados, muito próximos da referência considerada (53 N). O PLA-MAA demonstrou ser o mais eficaz na adesão às folhas de gelatina, com um valor de força de rutura de aproximadamente 50N. O PLA-IEMA proporcionou também uma boa adesão entre as folhas, apresentando uma força de rutura de 41N.

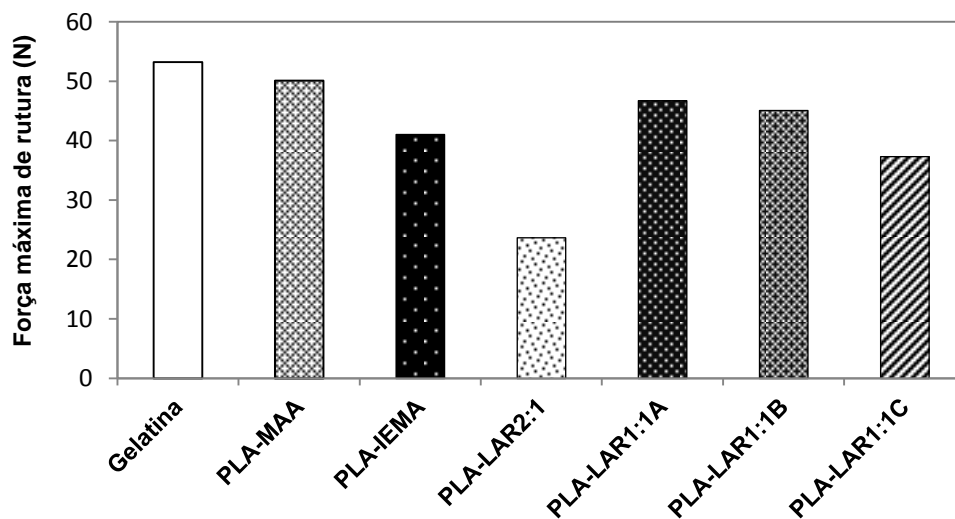


Figura 4.17 Valores de força máxima registados para cada amostra (testes realizados à temperatura ambiente, velocidade de afastamento de 5mm min^{-1}).

Na preparação dos testes, o PLA-LAR2:1 também aderiu as folhas de gelatina na área em que foram sobrepostas, após ter sido fotopolimerizado. Todavia, a amostra não resistiu a forças superiores a 24N. A separação das folhas ocorreu por descolagem. Este facto estará possivelmente relacionado com o menor estado de reticulação da matriz e com a presença de algum líquido residual, impedindo uma interação adequada entre a superfície do adesivo e a gelatina, o que significa que a capacidade adesiva do material não foi eficaz. Contrariamente, o PLA-LAR1:1A apresentou uma excelente capacidade de adesão e resistência, registando-se um valor de força na rutura de 47N (muito próximo dos valores obtidos para o PLA-MAA e controlo).

Na Figura 4.17 é possível observar a influência do tempo de irradiação UV na capacidade de adesão e resistência do produto PLA-LAR1:1. Uma redução no tempo de irradiação conduziu à formação de membranas menos reticuladas e conseqüentemente com estruturas menos coesas, diminuindo a capacidade de adesão entre o polímero e o substrato. Ainda assim, as variações não foram significativas. O PLA-LAR1:1B exibiu uma força de rutura de 45N e o PLA-LAR1:1C de 38N. A diminuição do tempo de irradiação UV teve por isso mais influência na capacidade de adesão de 1 minuto para 30 segundos, do que de 2 minutos para 1 minuto. A eficácia de adesão da membrana PLA-LAR1:1C foi ligeiramente afetada, como consequência da existência de polímero líquido por reticular. De acordo com os resultados obtidos, uma diminuição do tempo de irradiação UV de 2 minutos para 1 minuto no produto PLA-LAR1:1 não apresentará implicações significativas na eficácia de adesão e no seu desempenho mecânico. Segundo *Kao et al.* [32], fluidos biológicos interferem na superfície do adesivo e substrato se a adesão do material ao tecido não for efetuada da forma mais rápida possível. O PLA-LAR1:1B, face ao referido, apresenta um bom compromisso entre tempo de reticulação e eficácia de adesão.

Destaque para os principais resultados: 1) PLA-MAA e PLA-LAR1:1A foram os mais eficazes na adesão das folhas de gelatina, apresentando valores de força de rutura muito semelhantes ao registado para a gelatina sem manipulação; 2) diferentes proporções do monómero LAR na modificação do PLA conduziram mais uma vez a adesivos com comportamentos divergentes: o PLA-LAR2:1 com a sua estrutura frágil e quebradiça não apresentou uma capacidade adesiva adequada, enquanto o PLA-LAR1:1A demonstrou ser eficaz nesta função, sugerindo que quanto maior for a quantidade de LAR adicionada ao PLA, melhor serão as propriedades de adesão e resistência mecânica dos adesivos resultantes (uma vez fixos a quantidade de fotoiniciador e o tempo de irradiação UV); 3) o LAR deu

origem a adesivos de PLA com melhores capacidades de adesão e melhores desempenhos mecânicos que o IEMA, para tempos de irradiação UV iguais e inferiores; 4) e ainda que, excetuando o PLA-LAR2:1, todos os materiais sintetizados se mostraram eficazes na adesão às folhas, nunca quebrando na zona de colagem.

4.2.5.2. Energias de superfície por medição de ângulos de contacto

Independentemente do tipo e local de aplicação, os materiais sintetizados estarão inevitavelmente em contacto com superfícies como a pele ou o sangue. É por isso fundamental conhecer melhor a interação que os mesmos terão com as superfícies destes compostos biológicos, concluindo sobre a sua eficácia de adesão. Assim, pretendeu-se determinar as energias de superfície das membranas resultantes de um tempo de irradiação UV de 2 minutos, de forma a comparar com os valores de energia de superfície ou tensão superficial para o sangue e pele, como referido anteriormente. Também se determinou a energia de superfície da gelatina, uma vez que foi utilizada como substrato nos testes de adesão *in vitro*. De referir que a energia de superfície de um material é um parâmetro muito importante que afeta não só a adesão e a molhabilidade dos materiais, como também a sua biocompatibilidade [97, 98].

Para cada material, foram medidos os ângulos de contacto estáticos utilizando quatro líquidos distintos com tensões superficiais conhecidas (água, etilenoglicol, propilenoglicol e formamida). Para cada adesivo e gelatina, obteve-se um ângulo de contacto estático médio e o respetivo desvio padrão, a partir do qual foi possível a determinação das energias de superfície e suas respetivas componentes polares (γ_S^P) e dispersivas (γ_S^D) pelo método indireto de *Owens-Wendt-Rabel e Kaelble* [82, 124, 125].

Este método, considerando ambas as componentes, tem por base o princípio de *Berthelot* que assume que a interação entre as moléculas de dois corpos nas suas camadas superficiais é igual ao significado geométrico do trabalho de coesão entre as moléculas de cada corpo [82]. A componente dispersiva da energia superficial corresponde ao somatório das interações intermoleculares. Por sua vez, a componente polar é resultado das interações entre dipolos permanentes, entre dipolos permanentes e dipolos induzidos e ligações de hidrogénio [82, 97, 98, 126]. Desta forma, se as componentes polares forem significativamente superiores aos valores das componentes dispersivas significa que as interações moleculares são fracas e conseqüentemente as forças de adesão serão superiores às forças de coesão do material. Há ainda que ter em conta o princípio termodinâmico que afirma que um material só vai aderir a um substrato se a sua energia de superfície for menor ou igual à energia de superfície do aderente [124, 127]. Na Tabela 4.6 apresentam-se os valores de energias de superfície dos adesivos reticulados, gelatina, sangue e pele, e suas componentes polares e dispersivas.

De acordo com a Tabela 4.6, verificou-se que as energias de superfície para os adesivos PLA-MAA e PLA-IEMA apresentam valores muito semelhantes, sendo a componente polar muito superior à componente dispersiva. A energia de superfície para o PLA-LAR2:1 é relativamente superior, contudo também apresenta uma componente polar superior à dispersiva. Tais resultados indicam que os principais tipos de interações estabelecidas pelos materiais são abrangidos pela componente polar. Uma vez que os valores de energia de superfície obtidos são inferiores aos das superfícies aderentes (sangue e pele), conclui-se que os adesivos vão aderir aos substratos. As forças adesivas entre as membranas conseguirão sobrepor-se às forças coesivas, resultando na proximidade intermolecular entre os adesivos e as ditas superfícies [11].

Tabela 4.6 Valores de energia de superfície e correspondentes componentes dispersivas e polares para os adesivos de PLA sintetizados, gelatina, pele e sangue.

SUBSTRATO	Energias de superfície e tensões superficiais (mN/m)		
	γ_s	γ_s^D	γ_s^P
Gelatina	44,05	5,33	38,72
Pele	38 – 56*	-	-
Sangue	47,50*	-	-
PLA-MAA	37,83	3,80	34,03
PLA-IEMA	39,39	8,61	30,78
PLA-LAR2:1	41,61	7,38	34,23
PLA-LAR1:1A	26,96	13,20	13,76

*Valores determinados experimentalmente por outros autores – gama de valores para a **pele**: dependente de temperatura e humidade; **sangue** – à temperatura de 37°C (em Ferreira [11]).

O PLA-LAR1:1A apresenta o valor mais baixo de energia de superfície, garantindo a adesão do material às superfícies biológicas. Enquanto os restantes valores de energia de superfície se enquadravam no intervalo de valores obtidos para a pele, o valor de energia de superfície do PLA-LAR1:1A foi francamente inferior a esse intervalo. Todavia, há que salientar que a componente dispersiva é muito semelhante à componente polar. Este facto indica que as forças intermoleculares da membrana são fortes. O adesivo poderá aderir eficazmente aos diversos substratos que foram testados, apresentando um bom desempenho mecânico na sua função, e ao mesmo tempo ser de fácil remoção quando a sua utilização não for mais necessária. Esta conclusão corrobora o comportamento do material, quando reticulado em placas de vidro: aderiu com eficácia, mas facilmente se manipulava e removia da superfície quando pretendido.

Face aos resultados alcançados, e com base no princípio anteriormente mencionado, afirma-se que os adesivos sintetizados conseguirão aderir eficazmente às superfícies do sangue e da pele, quando irradiados *in vivo*. Salienta-se também que os valores de energia de superfície dos adesivos foram inferiores ao valor obtido para a gelatina, comprovando adesão. Caso os valores de energia de superfície fossem superiores aos valores dos substratos aderentes, o princípio termodinâmico não estaria satisfeito. Por consequência, o adesivo não iria cumprir eficazmente a sua função, podendo facilmente deslocar-se da sua posição inicial ou nem sequer aderir à superfície [4, 11].

4.2.6. Hemocompatibilidade

Independentemente do tipo de cirurgia, do tipo e local de incisão, o primeiro objetivo de um adesivo cirúrgico é ajudar e facilitar o processo de coagulação local, atuando em parceria com os eventos celulares decorrentes na cascata de coagulação [4, 128, 129]. Neste processo, tem-se como finalidade estancar hemorragias e minimizar a perda de fluidos, promovendo a reestruturação, reconstituição e adesão dos tecidos orgânicos lesados. Mesmo refletindo em outras aplicações (sistemas de libertação controlada de fármaco ou transdérmicos para queimaduras), sabe-se que os adesivos estarão inevitavelmente em contacto direto ou indireto com o sangue. No subcapítulo anterior, concluiu-se que os materiais sintetizados apresentavam valores de energia de superfície inferiores ao valor de tensão superficial do sangue e, desta forma, a adesão superficial entre os polímeros reticulados e o sangue iria

acontecer. Surgiu então a necessidade de avaliar a hemocompatibilidade dos materiais, segundo as regras estabelecidas pela norma internacional “ISO-10993-4” [83]. Como mencionado na secção 3.3.9. (Capítulo 3), um dos objetivos foi a determinação da percentagem de hemólise que cada material foi capaz de provocar no sangue. O segundo objetivo esteve na avaliação da capacidade hemostática/trombogénica dos adesivos, determinando a percentagem de massa de coágulo formada em cada material. Para o efeito, utilizou-se sangue anti-coagulado (ACD-A) de coelho.

4.2.6.1. Determinação do índice hemolítico

O processo de hemólise consiste na destruição dos eritrócitos do sangue através do rompimento da membrana plasmática, com consequente libertação de hemoglobina para o meio [111]. A integridade do sangue fica comprometida, podendo causar anemia hemolítica nos vasos sanguíneos (hemólise intravascular) ou noutra local do organismo. Não existe concordância na literatura relativamente aos níveis de hemólise que são aceitáveis ou toleráveis [98]. De um modo geral, um material é hemocompatível se não provocar hemólise no sangue [11].

Alves et al. [98] referem a importância do estudo de hemólise *in vitro* para materiais que estejam em contacto com o sangue, uma vez que permitem a quantificação de pequenos níveis de hemoglobina (Hb) no plasma sanguíneo, que não poderiam ser medidos em condições *in vivo*. Por se perceber a importância do estudo, procedeu-se à determinação do índice hemolítico para os adesivos PLA-IEMA, PLA-LAR2:1 e PLA-LAR1:1A.

Foram preparadas três amostras de cada adesivo, assim como dos controlos positivo (água) e negativo (solução PBS). A indução de hemólise foi avaliada por contacto indireto. Como tal, os materiais foram previamente incubados em solução PBS que funcionou como solução de extração, removendo os componentes mais simples das matrizes poliméricas, como monómero/polímero por reticular, solvente aprisionado na matriz, moléculas de fotoiniciador, etc. Decorrido este processo, a solução PBS foi removida. Seguidamente, os materiais e as soluções PBS foram colocados em contacto com o sangue ACD-A de coelho previamente diluído. Como descrito na secção 3.3.9.1., todas as amostras foram incubadas durante 3 horas a uma temperatura de 37°C, sem agitação. Terminado o processo, a concentração de hemoglobina libertada para o plasma foi determinada por espectrofotometria (Anexo M). Por sua vez, o índice hemolítico para cada amostra foi determinado através da Equação 3.5. Os resultados obtidos encontram-se representados na Figura 4.18.

Os estudos foram conduzidos segundo a norma ASTM F 756-00 [85], que divide os materiais de acordo com o seu índice hemolítico em três grupos: 1) hemolíticos (> 5%); 2) ligeiramente hemolíticos (2 a 5%); 3) e não hemolíticos (< 2%) [11, 111]. De acordo com esta classificação, e observando a Figura 4.18, constata-se que os adesivos PLA-IEMA, PLA-LAR2:1 e PLA-LAR1:1 exibiram um carácter hemolítico para o tempo em que estiveram em contacto com o sangue ACD-A de coelho. O PLA-IEMA apresentou um índice hemolítico de 26%, enquanto o PLA-LAR1:1A exibiu um índice de 30% e o PLA-LAR2:1 de 45%. As soluções PBS que estiveram previamente em contacto com os materiais apresentaram um comportamento distinto, com índice hemolítico de 3% a 5%, indicando um carácter ligeiramente hemolítico. Estes resultados sugerem que as membranas dos eritrócitos foram muito mais sensíveis à superfície dos materiais, do que ao contacto com os subprodutos que o PBS extraiu durante o processo de incubação, o que originou a sua rutura e consequente libertação de hemoglobina para o plasma sanguíneo.

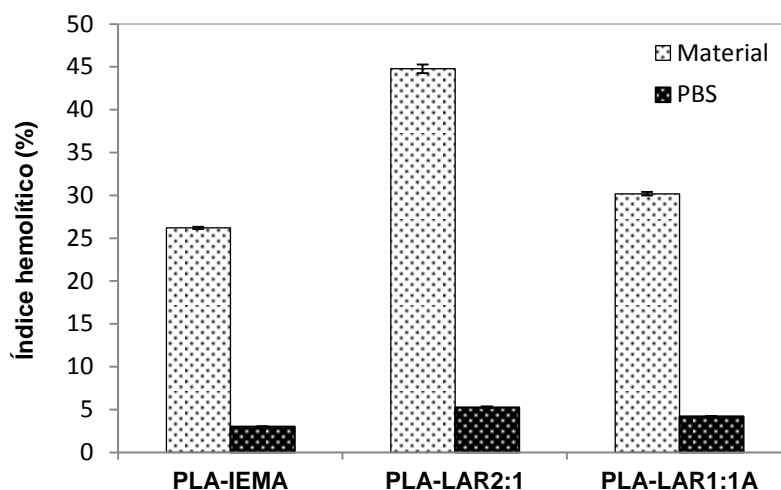


Figura 4.18 Valores de índice hemolítico obtidos para os adesivos PLA-IEMA, PLA-LAR2:1 e PLA-LAR1:1 por contacto indireto e para as soluções de extração (PBS) de cada material.

Um dos componentes presentes na formulação dos materiais é o éter dietílico. Este solvente, utilizado nas etapas de modificação do PLA e na adição do fotoiniciador, poderia ser um dos responsáveis pela indução de hemólise. Outros subprodutos resultantes da degradação dos materiais, como o ácido lático ou moléculas de fotoiniciador, poderiam contribuir para a destruição das hemácias. Como se observou na Figura 4.15, secção 4.2.4., os materiais sofrem degradação após 24 horas de incubação em PBS, que foi exatamente o tempo que os adesivos estiveram incubados antes de entrar em contacto com o sangue. Contudo, se o problema residisse na libertação de subprodutos para o meio de incubação, os valores de concentração de hemoglobina no plasma seriam superiores nas soluções PBS [11].

O PBS poderá não ter removido com eficácia os subprodutos presentes nas matrizes, ou o problema estará mesmo na composição química do material e nas interações que ocorrem na sua superfície. Independentemente dos cenários, os valores de índice hemolítico exibidos pelos materiais são muito acima do que é previsto pela norma [85]. A destacar é a diferença de valores obtidos para os adesivos resultantes de diferentes modificações do PLA com LAR, indicando a possibilidade de ser o PLA a induzir a hemólise do sangue. Nos ensaios, verificou-se também a coagulação do sangue nos tubos do PLA-LAR2:1, no período de tempo em que houve contacto com o material, o que comprova que houve uma forte interação entre os constituintes do sangue e a sua superfície [97]. A coagulação em si não é problemática tendo em conta a aplicação pretendida, mas a destruição significativa dos glóbulos vermelhos do sangue poderá excluir a utilização do material em contexto clínico, dependendo do local em que for aplicado. Uma vez coagulado o sangue e retidos os fluidos biológicos decorrentes da cirurgia, o carácter hemolítico dos materiais poderá não ser muito problemático. Todavia, a aplicação dos materiais em tecidos internos pode ser contestada.

Os resultados obtidos indicam que os adesivos PLA-IEMA, PLA-LAR2:1 e PLA-LAR1:1A são hemolíticos, contudo não se exclui a utilização dos mesmos na área médica. Uma vez que a interação da superfície dos materiais com o sangue é um fenómeno muito complexo, a (in)compatibilidade entre estes não pode ser conjecturada com base em apenas um teste de hemólise. Sugere-se por isso a realização de novos testes de hemocompatibilidade *in vitro*, para concluir sobre a reprodutibilidade dos resultados. Em um estudo mais aprofundado, deve-se ter em conta as limitações do estudo *in vitro* e dos protocolos estabelecidos pela norma “ISO-10993-4”, que têm vindo a ser debatidas por diversos autores [130, 131].

Como principais limitações, destaca-se: 1) condições de limpeza e esterilização do local e dos materiais; 2) e condições do sangue utilizado nos ensaios (no que diz respeito ao anticoagulante que é usado, em que concentrações, e se o manuseamento inadequado não induz hemólise antecipadamente) [130]. O estudo *in vivo* é também de grande importância. *Oeveren* [131] destaca que o estudo *in vitro*, apesar das claras vantagens e da sua importância, poderá representar o pior cenário de contacto do material com o sangue, uma vez que a reação do sangue com o biomaterial é muito mais rápida. Este facto poderá ter contribuído para os resultados que foram obtidos.

4.2.6.2. Avaliação da trombogenicidade

Quando um biomaterial é implantado no organismo e colocado em contacto com o sangue, o primeiro evento a ocorrer é a adsorção de proteínas na sua superfície [97]. Este mesmo fenómeno é considerado o fator chave para o processo trombogénico [97, 98]. Na literatura, são inúmeros os autores [97, 98, 132 – 134] que destacam a trombogenicidade como o principal problema dos biomateriais implantados em contacto direto e permanente com o fluxo sanguíneo. À partida, um material hemocompatível não deve contribuir para a formação de coágulos/trombos no sangue [98]. Por isso mesmo, muitas são as estratégias de modificação de superfície atualmente aplicadas, para reduzir a trombogenicidade dos materiais. Porém, quando se pretende que os materiais estimulem o processo de coagulação, e facilitem a cicatrização, a trombogenicidade é uma característica requerida. Deste modo, se os adesivos sintetizados forem trombogénicos, pode-se assegurar uma adequada função em cirurgia, melhorando o processo de coagulação e promovendo a cicatrização tecidual [11].

Assim, a indução da formação de coágulos na superfície das membranas obtidas foi avaliada tendo em conta o método gravimétrico de *Imai e Nose* [11, 96, 98], descrito na secção 3.3.9.2, Capítulo 3. Estabeleceu-se um contacto entre sangue e materiais de 40 minutos. O estudo foi efetuado em triplicado. Em cada caso, a percentagem de massa dos coágulos formados foi determinada através da Equação 3.6. Na Figura 4.19 constata-se a formação dos coágulos sobre as superfícies dos materiais. As percentagens de massa dos coágulos formados poderão ser observadas na Figura 4.20. Apresenta-se também a percentagem de massa de coágulo obtida no controlo positivo (K+).

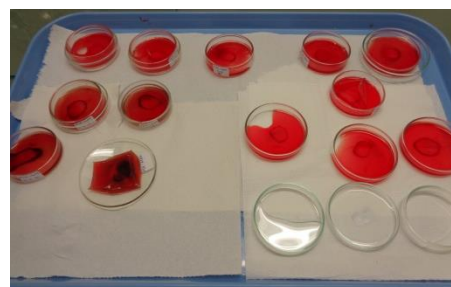


Figura 4.19 Formação dos coágulos nas superfícies das membranas, após contacto de 40 minutos.

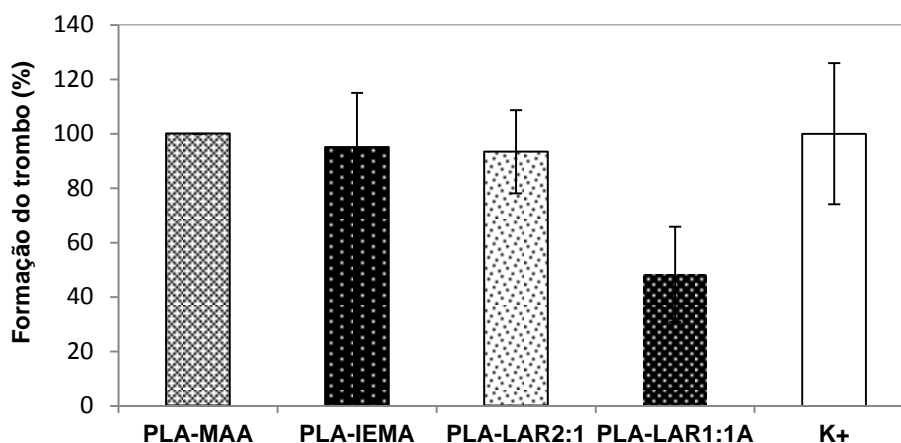


Figura 4.20 Valores de massa (%) dos trombos formados na superfície das membranas, após 40 minutos de contacto com o sangue. Valores obtidos representam a média de três amostras; K+, controlo positivo.

De acordo com os resultados obtidos, e tendo em conta que o controlo positivo consiste na avaliação da formação de um trombo ou coágulo sobre a superfície do vidro (material trombogénico), pode-se afirmar que os adesivos PLA-MAA, PLA-IEMA e PLA-LAR2:1 são trombogénicos, apresentando valores de formação de trombo de 100, 95 e 93%, respetivamente. Por sua vez, o PLA-LAR1:1A exibiu um valor inferior de formação de trombo (48%). Diversos autores [11, 97, 98, 132] mencionam que a trombogenicidade dos materiais está diretamente relacionada com os valores de energia de superfície. Materiais que apresentam menor valor de energia de superfície têm a tendência a ser mais trombogénicos, uma vez que as proteínas aderem em maior quantidade, promovendo o processo de coagulação. Também a força da ligação entre as proteínas e as superfícies é mais forte [11]. Estes factos permitem justificar os valores de trombogenicidade para os adesivos PLA-MAA, PLA-IEMA e PLA-LAR2:1 que apresentam um valor crescente de energia de superfície, e por isso a indução da formação de coágulos foi tendencialmente menor. Todavia, não existem diferenças estatísticas entre eles.

Tendo em conta o mesmo princípio, seria de esperar que o PLA-LAR1:1A apresentasse uma capacidade hemostática mais elevada (por apresentar menor valor de energia de superfície e um maior valor da componente dispersiva). *Tzoneva-Velinova* [132] refere que superfícies que exibam uma componente dispersiva de energia de superfície (γ_s^D) mais elevada, apresentam maior afinidade proteica, ou seja, as proteínas terão tendência a aderir mais ao material, ocorrendo a coagulação do sangue na sua superfície. Surpreendentemente isso não aconteceu.

Na maioria, os materiais apresentaram um carácter trombogénico, útil na aplicação pretendida. Sugere-se ainda assim a realização de novos testes, para certificar os resultados obtidos. O facto de o PLA-LAR1:1A apresentar uma capacidade hemostática menor comparativamente aos restantes adesivos não se revela um aspeto preocupante, podendo até representar um papel fundamental em outras aplicações. Para que isso seja possível, não deverá ser hemolítico. Como principal problema na realização do teste de trombogenicidade destaca-se as condições de utilização e preservação do sangue que é utilizado nos ensaios.

4.2.7. Biocompatibilidade

Adesivos cirúrgicos só poderão desempenhar uma função adequada na regeneração e reconstrução dos tecidos orgânicos se o seu contacto com as células for o mais favorável possível, permitindo a sua adaptação e crescimento sem risco de irritações e inflamações [11, 97]. Um dos principais problemas dos adesivos existentes no mercado continua a ser a toxicidade dos subprodutos de degradação e o risco de inflamações e transmissão de doenças, como já discutido anteriormente. Foi assim fundamental estudar a biocompatibilidade *in vitro* dos materiais sintetizados para inferir a sua aplicação clínica. O estudo foi dividido em duas partes: 1) viabilidade celular (para conhecer a interação dos materiais com células de fibroblastos humanos); 2) e atividade antibacteriana (para conhecer a interação dos materiais com diferentes bactérias), como descrito na secção 3.3.10.

Marques [12] avaliou a citotoxicidade dos adesivos PLA-IEMA e PLA-MAA, concluindo que ambos seriam promissores na área médica. Contudo, pretendeu-se realizar o teste para todos os adesivos produzidos, com um tempo de irradiação UV fixo em 2 minutos. O destaque foi dado aos adesivos PLA-LAR1:1A e PLA-LAR2:1 por serem produtos novos, cuja biocompatibilidade nunca foi investigada.

4.2.7.1. Estudo da viabilidade celular

A citotoxicidade dos adesivos foi avaliada *in vitro* na UBI, promovendo a adesão e proliferação de células de fibroblastos humanos em contacto direto com a superfície dos materiais. Os fibroblastos são células envolvidas no processo de cicatrização tendo como função a formação de fibras, promovendo a regeneração dos tecidos. De salientar ainda que são as células que existem em maior abundância no tecido conjuntivo [4, 12]. As células foram cultivadas e incubadas por períodos de 24, 48 e 72 horas. Para avaliar a atividade metabólica recorreu-se ao teste calorimétrico MTS [12, 98, 135]. Neste teste pretende-se detetar a quantidade de células vivas existentes numa suspensão e o seu grau de ativação. Por isso mesmo adiciona-se a cada poço com o meio de cultura uma solução reagente MTS/PMS. As células viáveis conseguem metabolizar o MTS num produto *formazon* de cor púrpura devido à presença de enzimas mitocondriais [4], obtendo-se uma solução colorida. A absorvância dessa solução é medida por espectrofotometria na gama de 490-500nm [135, 136]. Quanto maior for o valor de absorvância, maior será o número de células viáveis [12].

O estudo foi efetuado em triplicado para todos os materiais. A Figura 4.21 exibe a resposta fisiológica das células à presença dos adesivos de PLA sintetizados. Salienta-se porém uma novidade neste estudo com a existência de dois tipos de adesivos de PLA-LAR1:1. A composição química dos materiais advém da mesma modificação do PLA e o tempo de irradiação UV foi igual para ambos os materiais (2 min). A diferença entre eles reside no tempo da reação de modificação. Como foi mencionado na secção 4.1.1., o tempo da reação de modificação do PLA com LAR na proporção de 1:1 foi fixo em 4 horas para garantir uma elevada conversão dos grupos isocianato, sabendo à partida que iriam existir grupos isocianato livres na matriz polimérica. Todavia, também se verificou que a partir das 3 horas de modificação o produto apresentava uma viscosidade considerável, capaz de reticular *in situ* após adição do fotoiniciador. Nesta secção avalia-se também o desempenho do PLA-LAR1:1A resultante de uma modificação de PLA de 3 horas para se perceber a influência do tempo de modificação e da presença de grupos isocianato livres na biocompatibilidade do material final.

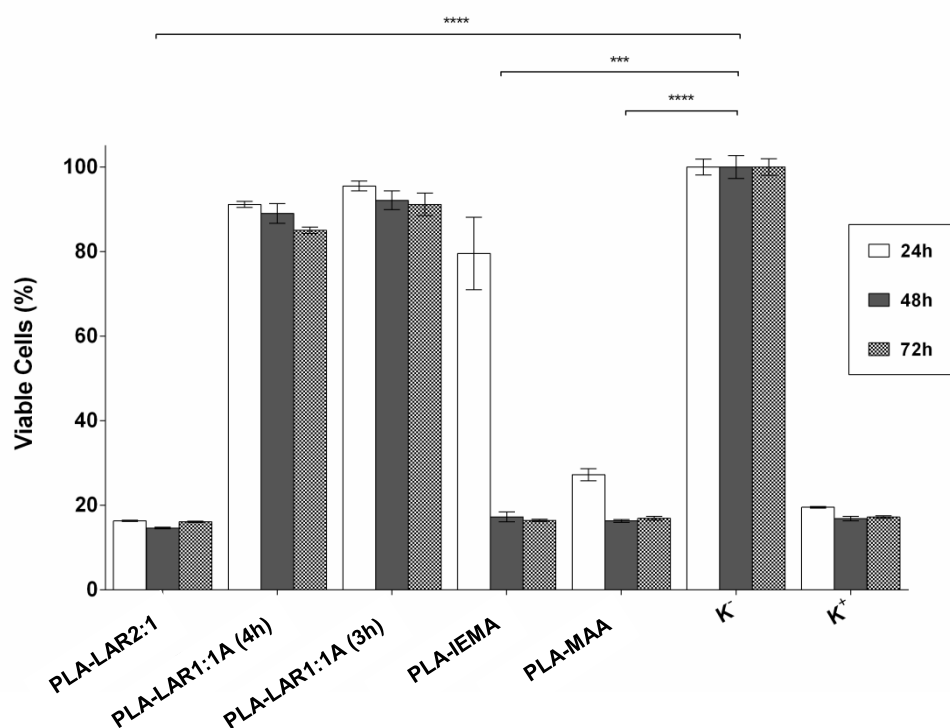


Figura 4.21 Avaliação da atividade celular após 24, 48 e 72 horas de contacto com os adesivos de PLA. K⁻, controlo negativo; K⁺, controlo positivo. Resultados apresentados são a média de três experiências independentes.

Observando a Figura 4.21 é possível concluir que as células apresentaram respostas distintas quando colocadas em contacto direto com os materiais, sugerindo a influência do monómero funcional na biocompatibilidade dos adesivos. Comparando os resultados com o controlo negativo (que corresponde a 100% de células viáveis), constata-se que os produtos PLA-LAR1:1 apresentaram excelentes valores de viabilidade celular, sem variações significativas nos diversos tempos de incubação. Destaca-se o adesivo de PLA-LAR1:1A(3h) como o material mais biocompatível, com valores de viabilidade celular de 90% após 72 horas de incubação. Tal facto é surpreendente e revela-se muito importante nesta fase da investigação. Isto poderá indicar que a presença de grupos isocianatos livres contribuiu para um aumento da adesão celular, uma vez que os grupos isocianato tendem a reagir com os grupos amínicos das proteínas [24]. Se assim for, e se estes resultados se confirmarem em próximos testes, poder-se-á otimizar a modificação do PLA com LAR(1:1), estabelecendo um tempo de reação de apenas 3 horas. Este aspeto é fundamental, porque significa uma redução nos custos energéticos de produção, obtendo-se um adesivo final biocompatível. Todavia, há que referir que o PLA-LAR1:1(4h) que foi caracterizado ao longo deste trabalho não se distancia muito dos resultados obtidos para o PLA-LAR1:1A(3h), apresentando valores de viabilidade celular acima de 80% após as 72 horas de incubação.

Contrariamente, o PLA-LAR2:1 demonstrou ser não biocompatível. Aqui fica patente que diferentes proporções de LAR na modificação do PLA tiveram bastante influência na biocompatibilidade dos materiais finais. Neste caso, os valores de viabilidade celular são muito baixos, assemelhando-se aos valores obtidos para o controlo positivo (células mortas). Suspeita-se que os resultados obtidos para o PLA-LAR2:1 possam estar relacionados com a libertação dos subprodutos (polímero por reticular, éter dietílico) para o meio de incubação, contribuindo para a morte celular. Como se constatou anteriormente, o PLA-LAR2:1 apresenta uma perda de massa significativa para os primeiros tempos de incubação em PBS. Exatamente no mesmo período de tempo verifica-se que os valores de viabilidade celular são muito baixos. Os subprodutos dissolvidos no meio de incubação poderão ter contribuído para um meio com condições desfavoráveis ao crescimento adequado e normal das células. Além da composição química dos materiais e da influência dos subprodutos libertados, *Taubert et al.* [97] salientam que são muitos os fatores que podem influenciar a biocompatibilidade dos materiais, nomeadamente: 1) a sua energia de superfície; 2) hidrofiliicidade; 3) ângulos de contacto; 4) polaridade; 5) interações eletrostáticas; 6) rugosidade; 7) espessura; 8) porosidade, etc. O adesivo PLA-LAR1:1A(4h) demonstrou ser mais hidrofílico, com menor energia de superfície, estrutura compacta, mas com sinais de alguma porosidade. Estes fatores, juntamente com os enunciados em cima, poderão ter contribuído para que tivesse um excelente desempenho, quando em contacto com as células, comparativamente ao PLA-LAR2:1.

Relativamente aos produtos PLA-MAA e PLA-IEMA verifica-se que os resultados de viabilidade celular não foram muito favoráveis, revelando um comportamento distinto do que foi avaliado por Marques [12]. O PLA-IEMA apresentou valores de viabilidade celular de aproximadamente 80% para 24 horas de incubação, contudo houve um decréscimo acentuado na viabilidade celular a partir das 48 e 72 horas de incubação. Marques [12] tinha já referido que a libertação e acumulação de subprodutos ácidos no meio de cultura seriam responsáveis por um decréscimo na viabilidade celular para tempos de incubação superiores. No entanto, esse decréscimo foi mais acentuado neste estudo. Na síntese dos materiais, a quantidade de solvente adicionada foi variável, consoante a viscosidade do produto. Maiores quantidades de solvente e uma secagem inadequada do material poderão ter contribuído para os resultados obtidos, devido à libertação de éter dietílico para o meio de cultura. É importante mencionar que estes resultados não são diretamente comparáveis com os obtidos no estudo anterior, uma vez que os materiais foram

sintetizados em alturas diferentes e os ensaios de caracterização biológica foram também realizados em condições distintas. Relativamente ao PLA-MAA, salienta-se outro aspeto: o tempo de conservação do pré-polímero. Por falta de material novo, o estudo de biocompatibilidade *in vitro* foi realizado para material que estava armazenado há 2 anos. Assim sendo, poderia apresentar um estado de degradação elevado. Suspeita-se neste caso que a acidez dos produtos de degradação tenham contribuído para um meio com o pH muito baixo, desfavorável à adesão e proliferação celular [12].

Tendo em conta os resultados obtidos, conclui-se que o produto PLA-LAR1:1 poderá ser extremamente promissor em cirurgia e Engenharia de Tecidos, revelando-se um produto biocompatível. Salienta-se por isso o sucesso da modificação do PLA com LAR nesta proporção. A composição química do material e as interações que decorreram na sua superfície foram favoráveis à adesão e proliferação celular nos tempos de incubação considerados. Além disso, o seu carácter moderadamente hidrofílico poderá ter sido um dos fatores chave no sucesso da interação com as células, uma vez que o tipo de células testado tende a aderir e a crescer mais facilmente em superfícies moderadamente hidrofílicas [137]. Para comprovar o sucesso do produto, apresenta-se ainda na Figura 4.22 as fotografias de SEM obtidas para os adesivos PLA-LAR1:1A(3h) e (4h) e para os controlos negativo e positivo. Analisando os resultados, constata-se que as células foram capazes de aderir e crescer em contacto com os materiais, permanecendo vivas. Destaca-se finalmente a importância da realização de novos testes *in vitro* e também *in vivo* para avaliar a reprodutibilidade do estudo. Tal como a hemocompatibilidade, o estudo da biocompatibilidade é bastante complexo. Perceber todos os fatores que contribuem para o sucesso de um material em contacto com as células é objetivo de qualquer investigador, para que os processos de produção sejam continuamente otimizados. Por sua vez, só a realização de uma série de testes permitirá classificar os materiais como biocompatíveis ou não [5, 138].

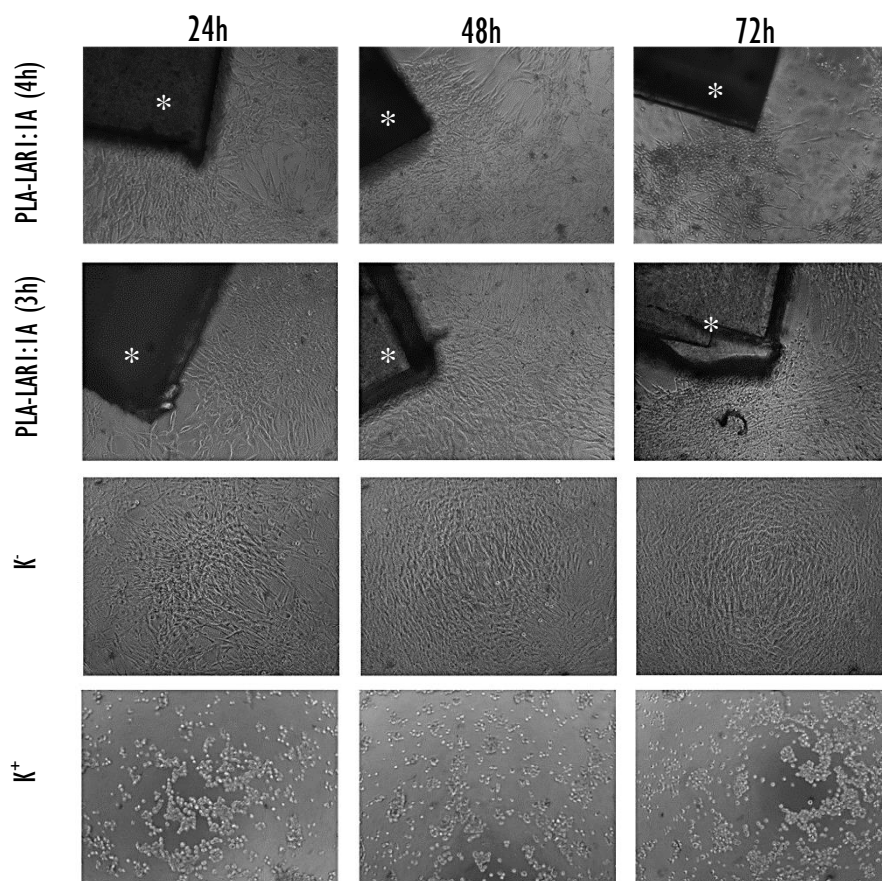


Figura 4.22 Fotografias de SEM da cultura celular de fibroblastos humanos na presença dos adesivos PLA-LAR1:1 (*) para tempos de incubação de 24, 48 e 72 horas. Controlo positivo (K^+) – células mortas; Controlo negativo (K^-) – células vivas.

4.2.7.2. Estudo da atividade antibacteriana

Um dos grandes problemas na implantação de materiais no organismo centra-se na ocorrência de infeções devido à adesão e colonização de bactérias na superfície do material e na zona envolvente onde o mesmo foi implantado [97]. Materiais que estejam em contacto direto com o sangue sofrem um elevado risco das bactérias aderirem à sua superfície, culminando com a formação de um biofilme. Tal facto associado ao sistema de circulação aumenta o risco de infeções crónicas persistentes [97]. Em cirurgia, as bactérias poderão sofrer colonização sobre o material e a zona envolvente no decorrer do ato cirúrgico. Também em tecidos queimados, a perda da integridade da pele e o desequilíbrio na regulação do pH cutâneo possibilitam a colonização de microrganismos prejudiciais e oportunistas [97, 100, 139]. Os principais microrganismos presentes neste tipo de problemas são a *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* e a *Escherichia coli* [97, 139].

Para que estes problemas sejam evitados e prevenidos, é fundamental reunir condições de limpeza e esterilização dos equipamentos, instrumentos e materiais utilizados em cirurgia. Porém, se existirem materiais que exibam características bactericidas, a probabilidade de ocorrência de infeções é muito menor. Neste âmbito, pretendeu-se avaliar se os adesivos sintetizados teriam propriedades antibacterianas, impedindo ou minimizando a formação de biofilme sobre as suas superfícies. Para tal, foi utilizado o método de difusão em ágar, sendo as estirpes da *S. aureus* e *E. coli* cultivadas em placas de ágar. Este método pretende de forma simples, rápida e qualitativa avaliar a sensibilidade de uma dada estirpe microbiana. As bactérias são cultivadas nas placas e os adesivos são colocados no topo. Se estes exibirem um comportamento bactericida, as bactérias não vão crescer à volta do mesmo. Haverá inibição em torno do material, que será maior ou menor conforme a sensibilidade da bactéria ao seu contacto [139 – 141]. Tal como descrito no capítulo 3, secção 3.3.10.3, o teste foi realizado na UBI por um período de 24 horas, à temperatura fisiológica de 37°C.

Na Figura 4.23 apresentam-se os resultados obtidos do teste de difusão em ágar para os dois tipos de bactérias. Apresentam-se ainda as fotografias de SEM (Figura 4.24) das estirpes bacterianas em contacto com a superfície dos adesivos, a fim de avaliar a formação de biofilme.

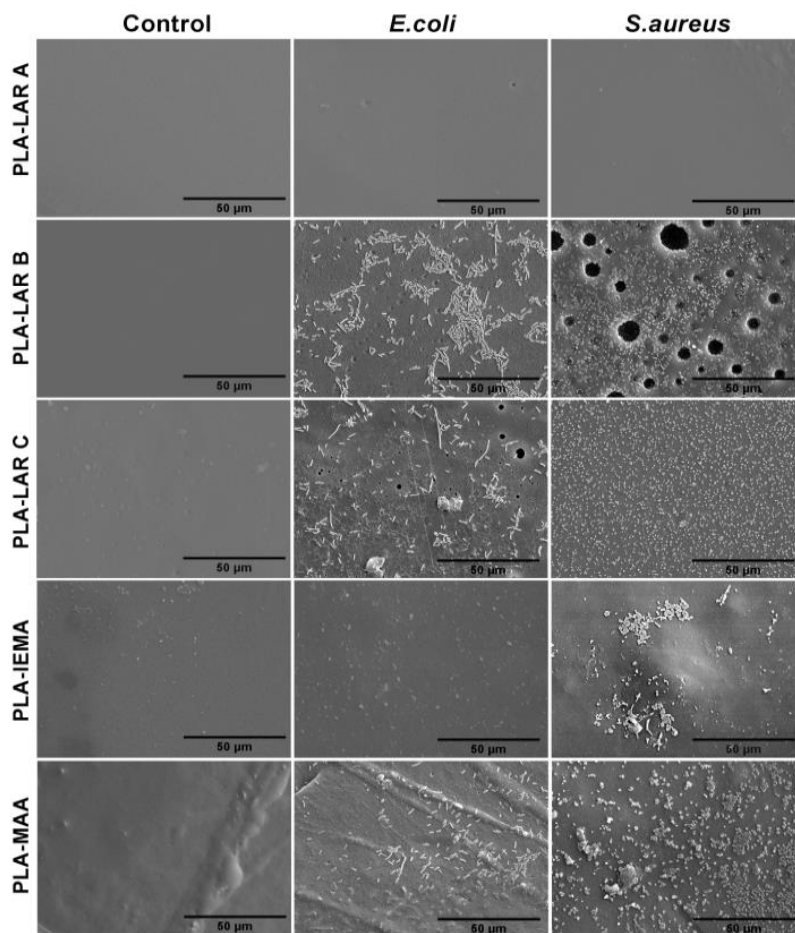
Analisando de forma sucinta os resultados da Figura 4.23, verifica-se em maioria que os adesivos de PLA apresentam características bactericidas, bastante úteis nas aplicações pretendidas. PLA-IEMA e PLA-LAR2:1 demonstraram potencial bactericida para ambas as estirpes bacterianas. O tamanho dos halos inibitórios foi superior comparativamente aos outros produtos. Tendo em conta a literatura [100, 139 – 141] quanto maior o halo inibitório, maior a sensibilidade das bactérias ao material. Também nas fotografias de SEM não se observa a adesão de bactérias às superfícies dos adesivos PLA-LAR2:1 e PLA-IEMA (exceto *S. aureus*). Embora os resultados sejam positivos, estes mesmos produtos não se revelaram biocompatíveis nos estudos mais recentes. Novos testes são assim necessários.

Os produtos PLA-LAR1:1A (3 e 4h) apresentaram halos de inibição menores. Também foi visível a deposição de bactérias sobre as suas superfícies. O carácter bactericida não é por isso tão evidente. A libertação de subprodutos tóxicos ou acídicos poderá ter estado na origem do potencial bactericida dos adesivos PLA-IEMA, PLA-MAA e PLA-LAR2:1. Contudo, a porosidade e rugosidade dos materiais parece ter tido influência. De acordo com *Kantorski et al.* [142], materiais com superfícies mais lisas apresentam um potencial bactericida maior, facto que se constatou.



PLA-LAR2:1 – A; PLA-LAR1:1A (4h) – B; PLA-LAR1:1A (3h) – C

Figura 4.23 Halos inibitórios para as estirpes *S. aureus* e *E. coli* em contacto com os adesivos.



PLA-LAR2:1 – A; PLA-LAR1:1A (4h) – B; PLA-LAR1:1A (3h) – C

Figura 4.24 Fotografias de SEM das estirpes bacterianas em contacto com os adesivos.

4.3. Resumo das propriedades dos adesivos

Uma vez discutidos os resultados da caracterização efetuada, pretende-se compilar as principais propriedades de cada adesivo, facilitando a comparação entre produtos. A Tabela 4.7 disponibiliza todas as informações recolhidas sobre os adesivos de PLA sintetizados neste trabalho, em complemento da Tabela 4.2.

Tabela 4.7 Resumo das propriedades avaliadas no estudo – comparação do desempenho dos bioadesivos.

PROPRIEDADES ^(*)	ADESIVOS DE PLA					
	PLA-MAA	PLA-IEMA	PLA-LAR2:1	PLA-LAR1:1A	PLA-LAR1:1B	PLA-LAR1:1C
Tempo de reticulação (s)	120	120	120	120	60	30
<i>Gel content</i> (%)	77	89	66	95	88	85
<i>Swelling</i> (%)	22	7	5	10	16	27
T_d (°C)	216	205	228	251	250	250
T_g (por DSC)	-37	-11	-8	0,5	-5	-6
T_g (por DMTA)	-	-	15	37	30	30
Perda de massa (%) (45 dias)	43	35	57	18	-	-
Força de rutura (N) (gelatina – 53N)	50	41	24	47	45	38
Energia de superfície (mN/m)	37,8	39,4	41,6	26,9	-	-
% Hemólise	-	> 5	> 5	> 5	-	-
% massa de coágulo	100	95	93	48	-	-

(*) Não se apresentam os resultados da biocompatibilidade, uma vez que a análise efetuada foi em geral de forma qualitativa. Todavia, o PLA-LAR1:1A foi o mais promissor nos estudos de viabilidade celular.

CAPÍTULO 5

CONCLUSÕES

5. CONCLUSÕES

5.1. Conclusão geral

Estratégias de produção de bioadesivos a partir de ácido lático foram concebidas e aprofundadas começando pela síntese de PLA de baixo peso molecular, por policondensação direta do ácido lático sem catalisadores. Os oligómeros com dois grupos terminais hidroxilo foram funcionalizados com ligações de carbono duplas por diferentes monómeros: MAA, IEMA, LAR ou TMI. O sucesso das modificações foi comprovado pela técnica de ATR-FTIR. Finalmente, os pré-polímeros foram fotoreticulados à temperatura ambiente, adicionando um fotoiniciador biocompatível. Excetuando o caso do pré-polímero com TMI, obtiveram-se matrizes poliméricas homogêneas de aspeto uniforme e transparente, com tempos de reação de cura iguais ou inferiores a 2 minutos, assegurando a sua aplicação *in situ*. Exibiram porém diferentes estados de reticulação.

O trabalho realizado consistiu em duas partes experimentais: reprodução de estudo anterior com a síntese do oligómero base e sua modificação com MAA e IEMA; e seleção de novos monómeros, desenvolvendo-se novas estratégias de modificação de PLA (LAR e TMI). O LAR revelou-se extremamente eficaz nas reações de modificação e fotoreticulação. Duas modificações de PLA com LAR em diferente proporção estequiométrica foram testadas com sucesso, e o foco do estudo esteve na caracterização dos materiais obtidos. Na modificação com LAR (1/1 AL) conseguiram-se diversos progressos, rumo a um processo otimizado e energeticamente mais favorável. O tempo da reação de modificação para esta via foi diminuído em 20 horas, obtendo-se no final membranas resistentes e flexíveis a partir de 30 segundos de irradiação UV. A gama de produtos resultante desta modificação foi considerada bastante promissora numa fase inicial da investigação. Sempre que possível, foi avaliada a influência do tempo de irradiação UV nas propriedades e desempenho destes materiais.

Apesar de serem inúmeras as aplicações possíveis em contexto clínico, as propriedades dos materiais foram avaliadas para inferir o seu potencial como adesivos cirúrgicos. A capacidade de absorção de água foi determinada para todas as membranas, quando imersas em água destilada e solução PBS. Em ambos os meios, revelaram um carácter moderadamente hidrofílico, apesar de um comportamento individual distinto dependente do meio. Em PBS, as membranas apresentaram valores de *swelling* de 5 a 27%, consoante o monómero funcional utilizado e o estado de reticulação das matrizes. Em geral, quanto menor o estado de reticulação da matriz, maior foi a capacidade de absorção de água. Face aos resultados obtidos, espera-se que os materiais não induzam problemas nos tecidos envolventes quando implantados *in vivo*, sendo adequados na função a que se destinam.

A técnica de microscopia eletrónica de varrimento (SEM) permitiu avaliar a morfologia das membranas. Todos os filmes demonstraram ser bastante compactos, com estrutura lisa e homogênea. Apesar das membranas ostentarem estados de reticulação distintos, não se assinalam aspetos díspares na sua morfologia. Para o PLA-LAR1:1, percebeu-se que uma diminuição no tempo de irradiação UV conduziu à formação de membranas menos densas, com valores de *gel content* inferiores e mais porosas. Sendo a porosidade um aspeto importante na adesão e proliferação celular, tal facto poderá ser muito útil quando em contacto com os tecidos fragilizados. Uma vez obtidas membranas muito compactas para os outros produtos, poderá vir a ser necessário a otimização de formulações, de modo a conseguir um melhor compromisso entre quantidade de fotoiniciador, tempo de irradiação UV e porosidade final da matriz.

A análise termogravimétrica permitiu o estudo da estabilidade dos materiais, quando sujeitos a elevadas temperaturas. Em maioria, o processo de reticulação fotoquímica deu origem a materiais termicamente mais estáveis, comparativamente aos mesmos no estado líquido. O pré-polímero base apresentou uma temperatura de degradação de 199°C e os pré-polímeros sofreram maior degradação a partir de 205 a 245°C, sendo o PLA-LAR01:1 o mais estável. As membranas exibiram uma maior degradação a partir de 205 a 251°C, consoante o monómero funcional. De todos os materiais, a gama de produtos PLA-LAR1:1 revelou ser a mais estável termicamente. Tendo em conta os resultados obtidos e a aplicação clínica pretendida, conclui-se que os materiais sintetizados apresentarão estabilidade térmica antes e após reticulação à temperatura de 37°C, considerando-se não existirem contra-indicações na sua utilização *in vivo*. A análise de DSC permitiu identificar as transições térmicas do pré-polímero, pré-polímeros modificados e reticulados, determinando-se os valores de temperatura de transição vítrea. Todos os materiais no estado líquido exibiram valores de T_g negativos, extremamente favorável ao processo de fotoreticulação, que aumentaram com o peso molecular dos materiais. Após reticulação, as T_g foram ainda superiores, uma vez obtidas estruturas mais densas, compactas e organizadas. A técnica de DMTA permitiu também identificar as transições térmicas das membranas, que apresentaram valores de T_g iguais ou inferiores à temperatura fisiológica. A influência do tempo de irradiação UV nos resultados obtidos para o PLA-LAR1:1 não foi considerável. O mesmo se verificou relativamente à sua estabilidade térmica.

A biodegradação dos materiais foi avaliada em solução PBS, por um período de 6 semanas. Todas as membranas revelaram ser hidroliticamente instáveis, com perda de massa mais acentuada na fase inicial do estudo. Todavia, apresentaram perdas totais de massa de 18 a 57%, consoante o monómero funcional utilizado. Além do grau de reticulação e das diferentes composições químicas, a capacidade de absorção de água das membranas teve também influência nos perfis de degradação exibidos. Apesar da suscetibilidade do PLA a hidrólise, a sua degradação é geralmente morosa. Face aos resultados obtidos, foi possível concluir que os adesivos de PLA produzidos apresentaram perdas de massa consideráveis, extremamente importante para aplicações temporárias. Assim, poder-se-á assegurar a capacidade de degradação, absorção e metabolização dos materiais quando implantados no organismo. Se aplicados externamente, poderão ser facilmente removidos pelo utilizador quando não forem mais necessários. A técnica de SEM permitiu ainda verificar as variações morfológicas das membranas após 72 horas e 6 semanas de degradação. Em geral, o mecanismo de erosão superficial foi dominante no processo de degradação hidrolítica, com aumento da irregularidade na estrutura das matrizes.

O estudo de adesão *in vitro* foi efetuado para todos os materiais, utilizando folhas de gelatina como substrato. Após fotopolimerização *in situ* e realização de ensaios de tração, verificou-se que todos os materiais, excetuando o PLA-LAR2:1, aderiram com eficácia à gelatina, apresentando valores de força de rutura muito próximos do valor controlo. A separação das folhas foi sempre por rutura na gelatina, permanecendo intacta a zona de colagem. Dos isocianatos testados, o LAR (na proporção de 1:1) permitiu a produção de materiais mais eficazes na adesão ao substrato que o IEMA. A capacidade de adesão do PLA-LAR1:1 não foi comprometida quando o tempo de irradiação UV foi reduzido a metade. O material continuou a apresentar uma adesão eficaz e um desempenho mecânico adequado. Foram ainda determinadas as energias de superfície dos materiais após reticulação fotoquímica, revelando-se inferiores às energias de superfície das superfícies aderentes (sangue e pele). Deste modo, pode-se esperar uma adesão eficaz a estes substratos quando irradiados *in vivo*. O princípio termodinâmico será satisfeito, sendo as forças adesivas superiores às forças coesivas.

Estudos de hemocompatibilidade foram conduzidos para avaliar a capacidade de indução de hemólise e o potencial trombogénico dos adesivos. Estabelecido o contacto entre sangue e materiais (previamente incubados em PBS), constatou-se que os mesmos apresentavam um carácter hemolítico, sendo significativamente menor para as soluções de extração PBS. Isto indicou que os eritrócitos foram sensíveis aos materiais e não aos subprodutos de degradação. Tendo em conta os resultados, e face às limitações do estudo, sugere-se a realização de novos testes de hemólise. Salienta-se porém que o carácter hemolítico dos materiais não deverá ser problemático em processos de cicatrização, uma vez que estes estarão em contacto com sangue coagulado. Relativamente aos ensaios de trombose, todas as membranas apresentaram potencial trombogénico, fundamental para o processo de coagulação de feridas incisais. As percentagens de formação de coágulos foram em maioria muito próximas do controlo efetuado. Os adesivos serão capazes de cumprir eficazmente a sua função, promovendo a hemóstase e coagulação local.

Finalmente, a biocompatibilidade *in vitro* foi investigada. Estudos de viabilidade celular foram conduzidos, utilizando células de fibroblastos humanos. O PLA-LAR1:1 apresentou excelentes valores de viabilidade celular, considerando-se um produto biocompatível. A modificação do PLA com LAR na proporção de 1:1 demonstrou ser a mais eficaz, registando-se valores de viabilidade celular acima de 85% para tempos de incubação de 72 horas. Tendo em conta os resultados, sugere-se ainda que o tempo da modificação do PLA por esta via possa ser otimizado, favorecendo o desempenho do adesivo final no que diz respeito à sua biocompatibilidade. A técnica SEM permitiu ainda observar as células em contacto com o adesivo, comprovando a adesão e proliferação celular, sem sinais de citotoxicidade. Relativamente aos outros materiais, os resultados não foram tão favoráveis. Como principais problemas destaca-se a libertação de éter dietílico e subprodutos acídicos para o meio de cultura, comprometendo o crescimento adequado das células. A atividade antibacteriana dos adesivos foi ainda alvo de estudo e atenção. Em maioria, os materiais apresentaram potencial bactericida para ambas as estirpes microbianas, extremamente útil na minimização de infeções. Foi possível verificar nos testes de difusão em ágar a formação dos halos de inibição em torno dos materiais, sendo estes mais evidentes para os produtos PLA-LAR2:1, PLA-IEMA e PLA-MAA. A técnica SEM permitiu verificar que nem sempre houve formação de biofilme sobre a superfície dos adesivos. Nos casos em que tal aconteceu, suspeita-se que a porosidade e rugosidade dos materiais terão contribuído para uma maior adesão das bactérias.

Face a todos os resultados, conclui-se que o PLA poderá vir a ter um lugar de destaque no mercado dos bioadesivos. Além disso o LAR, que até ao momento não se encontrava associado à área médica, poderá vir a ter um papel fundamental na síntese de materiais para aplicações clínicas. Prova disso é o produto PLA-LAR1:1, que solidificou rapidamente em condições fisiológicas, apresentou viscosidade adequada antes de aplicado, aderiu facilmente ao substrato exibindo um desempenho mecânico adequado, demonstrou-se extremamente flexível, resistente e estável a temperaturas elevadas, promoveu a coagulação local, revelou-se hidroliticamente instável, com uma capacidade de absorção de água moderada, e foi altamente biocompatível. Este desempenho torna-o extremamente promissor em cirurgia e na área de Engenharia de Tecidos. Em complemento, os custos energéticos de produção serão menores comparativamente aos restantes materiais. O caminho começa a ser traçado com vista à obtenção de um produto final economicamente mais acessível.

5.2. Principais contribuições

Este trabalho pretendeu ser uma mais-valia na revisão de conceitos teóricos sobre o tema e na produção e caracterização de novos materiais que pretendem ter destaque no mercado dos bioadesivos.

Destacam-se os principais contributos:

1. Revisão da literatura: pretendeu-se fazer um enquadramento geral em duas áreas: 1) biomateriais e bioadesivos; 2) e ácido lático. O contributo esteve na revisão efetuada com foco nas aplicações biomédicas do PLA. O leitor poderá facilmente consultar os estudos que foram realizados nos últimos anos de síntese e desenvolvimento de materiais a partir de PLA com impactos importantes em áreas cirúrgicas, farmacêuticas e de Engenharia de Tecidos;
2. Caracterização dos adesivos de base ácido lático e desenvolvimento de novas estratégias: a avaliação da reprodutibilidade do estudo anterior e a caracterização complementar permitiram um melhor conhecimento dos materiais sintetizados, conducente ao estudo de diversas aplicações. Foi possível perceber as potencialidades dos adesivos em contexto cirúrgico. Além disso foram desenvolvidas novas estratégias de funcionalização do PLA, com resultados muito promissores. Deste modo existe a possibilidade de alargar a gama de adesivos bioabsorvíveis e biocompatíveis a partir do ácido lático (caso do PLA-LAR1:1);
3. Exploração de novas moléculas: A funcionalização de polímeros é uma área de grande interesse pela investigação. A exploração de monómeros como o Laromer® LR 9000 na funcionalização do PLA constituiu um importante avanço científico e tecnológico, com a produção de um adesivo final biocompatível;
4. Revolução no mercado: O Laromer® LR 9000 (LAR) até ao momento encontrava aplicação na produção de revestimentos para materiais metálicos, cerâmicos, madeiras, etc. Neste trabalho, foi associado pela primeira vez à área médica com vista à produção de novos adesivos biológicos. O desafio foi superado. A modificação do PLA com LAR na proporção de 1:1 resultou num material promissor para cirurgia. Daqui poder-se-ão abrir novos caminhos de investigação na área médica onde o LAR ganhe cada vez mais destaque. Se assim for, poder-se-á revolucionar o seu mercado e potencial económico. De salientar que um longo caminho deverá ser percorrido para que isso aconteça. Contudo não deve ser descartada a possibilidade de um dia vir a acontecer.

5.3. Perspetivas futuras

Em seguimento dos resultados promissores neste estudo, recomendam-se um conjunto de linhas e estratégias de investigação a desenvolver no futuro. Destaque para:

1. **Otimização dos protocolos respeitantes à modificação do PLA com os diferentes monómeros** (estudar eventuais problemas na reprodução dos materiais, fixar a quantidade de solvente de forma a obter materiais com a melhor viscosidade possível e testar diferentes quantidades de fotoiniciador, principalmente para o novo monómero LAR, na procura do

- melhor compromisso entre porosidade desejada, boas propriedades mecânicas, tempo de reticulação e custo de produção dos adesivos finais);
2. **Repetição dos testes de hemocompatibilidade e biocompatibilidade *in vitro* dos materiais sintetizados** (só a realização de uma série de testes e o estudo aprofundado da interação dos materiais com o sangue e as células permitirá assegurar a sua utilização nas áreas clínicas pretendidas. No estudo de hemocompatibilidade deverá ser também efetuado o contacto direto entre sangue e materiais);
 3. **Realização de testes de biocompatibilidade *in vivo*** (só assim será possível conhecer a interação dos materiais com diferentes tecidos orgânicos externos (pele) e internos (ex. fígado). O objetivo será avaliar a possível ocorrência de reações alérgicas, inflamações ou até sinais de necrose tecidual. Considera-se interessante o estudo de diferentes tempos de implantação, permitindo avaliar a resposta progressiva do organismo ao material implantado e a evolução da sua degradação. Desta forma poder-se-á avaliar se os sinais de toxicidade apresentados são devidos ao material em si ou se são resultado dos seus produtos de degradação, e em que momento serão estes mais críticos. Promover incisões em diferentes tecidos e avaliar o desempenho dos materiais na adesão, regeneração e encerramento dos mesmos);
 4. **Exploração da caracterização para a gama de produtos PLA-LAR1:1** (uma vez que o PLA-LAR1:1A demonstrou ser o mais promissor, interessa realizar um estudo comparativo com o PLA-LAR1:1B e C, de forma a retirar conclusões mais consistentes. A biocompatibilidade, hemocompatibilidade e degradação hidrolítica *in vitro* deverão ser estendidas a estes produtos. Se os mesmos se revelarem promissores, poder-se-á ter adesivos de PLA em cirurgia com 30 segundos e 1 minuto de irradiação UV);
 5. **Estudos de degradação em plasma humano** (estudar os perfis de degradação em plasma humano revela-se também importante, comparando com os perfis de degradação em PBS. Avaliar o despoletar da cascata de coagulação *in vitro*, uma vez que o plasma apresenta na sua constituição todos os constituintes necessários ao processo de coagulação [11]);
 6. **Realização de ensaios mecânicos** (testar a elongação dos materiais);
 7. **Exploração de outras aplicações** (começar pela incorporação de fármaco (ex. antibiótico) nos adesivos, preparando assim sistemas de libertação controlada. Testar cinéticas de libertação do fármaco. Compreender os fenómenos envolvidos na libertação da substância por difusão ou degradação. Avaliar o potencial de preparação de transdérmicos para tratamento de queimaduras, tendo atenção à porosidade do material final para garantir a esterilidade do transdérmico. O potencial bactericida deverá ser garantido);
 8. **Testar novas proporções de LAR na modificação do PLA** (considerando a molécula LAR como a “principal”, poder-se-á testar a modificação de LAR na proporção de (2/1 AL), avaliando o potencial do adesivo resultante);
 9. **Produção de copolímeros de PLA e PCL** (testando diferentes modificações de forma a produzir novos adesivos biológicos);
 10. **Testar novas moléculas na modificação do PLA** (ex. cloreto de metacrilóilo).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] Kucharczyk, P., Preparation and modifications of biodegradable polyesters for medical applications, Doctoral Thesis, Faculty of Technology Tomas Bata, University in Zlín, 2013.
- [2] Parida, P., Behera, A., Mishra, S. C., Classification of Biomaterials used in Medicine, *International Journal of Advances in Applied Sciences*, 3, 31-35, 2012.
- [3] Bronzino, Ed. Joseph D., The Biomedical Engineering Handbook, 2nd ed., vol.2, CRC Press, Boca Raton, FL, USA, 2000.
- [4] Cunha, A. L. C. P., Desenvolvimento de Adesivos Biológicos Biodegradáveis, Tese de Mestrado, Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade de Coimbra, 2008.
- [5] Sousa, A., Preparação e Caracterização de um sistema de libertação de fármacos para tratamento do Glaucoma, Seminário I/II, Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade de Coimbra, 2002.
- [6] Ikada, Y., Tsuji, H, Biodegradable polyesters for medical and ecological applications, *Macromol. Rapid Commun*, 21, 117–132, 2000.
- [7] Seal, B. L., Otero, T. C., Panitch, A., Polymeric biomaterials for tissue and organ regeneration, Review, *Materials Science and Engineering*, R 34, 147-230, 2001.
- [8] Gunatillake, P. A., Adhikari, R., Biodegradable synthetic polymers for tissue engineering, *European Cells and Materials*, Vol.5, 1-16, 2003.
- [9] Vroman, I., Tighzert, L., Biodegradable Polymers, Review., *Materials*, 2, 307-344, 2009.
- [10] Seppala, J., Korhonen, H., Hakala, R., Malin, M., Photocrosslinkable polyesters and poly (ester anhydride)s for Biomedical Applications, *Macromolecular Bioscience*, 11, 1647-1652, 2011.
- [11] Ferreira, P., Preparação e caracterização de adesivos de base uretana, Tese de Doutorado, Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade de Coimbra, 2007.
- [12] Marques, D. A. S., Studies on high molecular weight poly(lactic acid) synthesis, Doctoral Thesis, Universidade de Coimbra, 2012.
- [13] Wong, J. Y., Bronzino, J. D., Biomaterials, CRC Press, Boca Raton, FL, USA, 2007.
- [14] Ratner, B. D., Hoffman, A. S., Schoen, F. J., Lemons, J., Biomaterials Science: A multidisciplinary Endeavor, *Biomaterials Science*, 2nd edition, 2004.
- [15] Griesser, H. J., Vermette, P., Laroche, G., Guidoin, R., Biomedical Applications of Polyurethanes, Chapter 4: Biocompatibility of Polyurethanes, 2001.
- [16] Canevarolo, S. V., Ciência dos Polímeros, 2^aed., Artliber Editora Ltda, SP, Brasil, 2006.
- [17] Zee, M.V., Biodegradability of polymers–Mechanisms and evaluation methods. In: Bastioli C, editor. Handbook of biodegradable polymer, 1stedition, 1-22, Shropshire, U.K.: Rapra Technology Limited, 2005.
- [18] Gomes, M. E., Reis, R. L., Biodegradable polymers and composites in biomedical applications: from catgut to tissue engineering. Part 1 Available systems and their properties, *International Materials Reviews*, vol.49, 5, 2004.
- [19] Ghanbarzadeh, B., Almasi, H., Biodegradable Polymers, Chapter 6, InTech, 2013. More information available in: <http://dx.doi.org/10.5772/56230>.
- [20] Deopura, B. L., Alagirusamy, R., Joshi, M., Gupta, B., Polyesters and Polyamides, CRC Press, Boca Raton, FL, USA, 2008.
- [21] Hakala, R., Crosslinked poly(ester anhydrides) for controlled drug delivery, Doctoral Thesis,

- School of Chemical Technology, Aalto University, Finland, 2013.
- [22] Melchels, F. P., Velders, A. H., Feijen, J., Grijpma, D. W., Photo-crosslinked poly (D,L-lactide)-based networks. Structural characterization by HRMAS NMR spectroscopy and hydrolytic degradation behavior, *Macromolecules*, 43(20), 8570-8579, 2010.
- [23] Ifkovits, J. L., Burdick, J.A., Review: Photopolymerizable and Degradable Biomaterials for Tissue Engineering Applications, *Tissue Engineering*, 13(10), 2007.
- [24] Ferreira, P., Coelho, J. F. J., Almeida, J. F., Gil, M. H., Photocrosslinkable Polymers for Biomedical Applications, *Biomedical Engineering - Frontiers and Challenges*, Prof. Reza Fazel (Ed.), ISBN: 978-953-307-309-5, InTech, 2011.
Available from: <http://www.intechopen.com/books/biomedical-engineering-frontiers-andchallenges/photocrosslinkable-polymers-for-biomedical-applications>.
- [25] Jennyangel, S., Dhandapani, R., Eco-friendly biopolymers as adhesives – An overview, *International Journal of Pharma and Bio Sciences*, 4(3), 524-533, 2013.
- [26] Karikari, A. S., Edwards, W. F., Mecham, J. B., Long, T. E., Influence of Peripheral Hydrogen Bonding on the Mechanical Properties of Photo-Cross-Linked Star-Shaped Poly (D,L-lactide) Networks, *Biomacromolecules*, 6, 2866-2874, 2005.
- [27] Allen, N. S., Marin, M. C., Edge, M., Davies, D. W., Garrett, J., Jones, F., Navaratnam, S., Parsons, B. J., Photochemistry and photoinduced chemical crosslinking activity of type I & II co-reactive photoinitiators in acrylated prepolymers, *J. Photoch. Photobio. A*, 126 (1), 135-149, 1999.
- [28] Ryou, M., Thompson, C. C., Tissue Adhesives: A review, *Techniques in Gastrointestinal Endoscopy, Elsevier*, 8, 33-37, 2006.
- [29] Rohm, H. W., Lurtz, C., Wegmann, J., Odermatt, E. K., Behrend, D., Schmitz, K., Sternberg, K., Development of a biodegradable tissue adhesive based on functionalized glycol bis(dilactic acid).II., *Wiley Online Library (wileyonlinelibrary.com)*, 2010.
- [30] Mehdizadeh, M., Yang, J., Design Strategies and Applications of Tissue Bioadhesives, *Macromolecular Bioscience*, 13, 271-288, 2013.
- [31] Duarte, A. P., Coelho, J. F., Bordado, J. C., Cidade, M. T., Gil, M. H., Surgical adhesives: Systematic review of the main types and development forecast, *Progress in Polymer Science*, 37, 1031-1050, 2012.
- [32] Kao, F., Manivannan, G., Sawan, S. P., UV Curable Bioadhesives: Copolymers of N-Vinyl Pyrrolidone, *J. Biomed. Mater. Res. (Appl. Biomater.)*, 38(3), 191-196, 1997.
- [33] Ono, K., Saito, Y., Yura, H., Ishikawa, K., Kurita, A., Akaike, T., Ishihara, M., Photocrosslinkable chitosan as a biologic adhesive, *J. Biomed. Mater. Res.*, 49 (2), 289-295, 2000.
- [34] Ono, K., Ishihara, M., Ozeki, Y., Deguchi, H., Sato, M., Saito, Y., Yura, H., Sato, M., Kikuchi, M., Kurita, A., Maehara, T., Photocrosslinkable chitosan as a biological adhesive with surgical applications, *Surgery*, 130 (5), 844-850, 2001.
- [35] Vieira, A. P.; Ferreira, P.; Coelho, J. F. J., Gil, M. H., Photocrosslinkable starch based polymers for ophthalmologic drug delivery, *International Journal of Biological Macromolecules*, Vol.43, No.4, 325-332, 2008.
- [36] Lasprilla, A. J. R., Martinez, G. A. R., Lunelli B. H., Jardini A. L., Filho, R. M., Poly-lactic acid synthesis for application in biomedical devices – A review, *Biotechnology Advances*, 30, 321-328, 2012.

- [37] Auras, R., Lim, L., Selke, S. E. M., Tsuji, H., Poly (lactic acid). Synthesis, Structures, Properties, Processing, and Application, John Wiley & Sons, Inc., USA, 2010.
- [38] Xavier, A. M. M., Study of lactic acid polycondensation and lactide production, Master Thesis, Faculdade de Engenharia, Universidade do Porto, 2010.
- [39] Garlotta, D., A Literature Review of Poly (Lactic Acid), *Journal of Polymers and the Environment*, 9 (2), 2002.
- [40] Xiao, L., Wang, B., Yang, G., Gauthier, M., Poly (Lactic Acid)-Based Biomaterials: Synthesis, Modification and Applications, Biomedical Science, Engineering and Technology, Prof. Dhanjoo N. Ghista (Ed.), ISBN: 978-953-307-471-9, InTech, 2012.
Available from: <http://www.intechopen.com/books/biomedicalscience-engineering-and-technology/poly-lactic-acid-based-biomaterials-synthesis-modification-andapplications>.
- [41] Jamshidian, M., Tehrani, E. A., Imran, M., Jacquot, M., Desobry, S., Poly-Lactic Acid: Production, Applications, Nanocomposites, and Release Studies, *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, Vol. 9, 2010.
- [42] Babu, R. P., O'Connor, K., Seeram, R., Current progress on bio-based polymers and their future trends, *Progress in Biomaterials*, 2-8, 2013.
- [43] Lim, L.-T., Auras, R., Rubino, M., Processing technologies for poly(lactic acid), *Progress in Polymer Science*, 33, 820-852, 2008.
- [44] Rasal, R. M., Janorkar, A. V., Hirt, D. E., Poly(lactic acid) modifications, *Progress in Polymer Science*, 35, 338-356, 2010.
- [45] Lopes, M. S., Jardini, A. L., Filho, R. M., Poly (lactic acid) production for tissue engineering applications, *Procedia Engineering*, 42, 1402-1413, 2012.
- [46] Capellari, J. B., Biossíntese de ácido láctico por *Lactobacillus amylovorus* a partir de resíduos agroindustriais, Tese de Mestrado, Universidade da região de Joinville-Univille, 2010.
- [47] Martinez, F. A. C., Balciunas, E. M., Salgado, J. M., González, J. M. D., Converti, A., Oliveira, R. P. S., Lactic acid properties applications and production: A review, *Trends in Food Science & Technology*, 30, 70-83, 2013.
- [48] Taskila, S., Ojamo, H., The current status and future expectations in industrial production of lactic acid by lactic acid bacteria, InTech, Chapter 26, 2013.
- [49] Datta, R., Henry, M., Lactic acid: recent advances in products, processes and technologies - a review, *J Chem Technol Biotechnol*, 81,1119–1129, 2006.
- [50] Wee, Y., Kim, J., Ryu H., Biotechnological Production of Lactic Acid and Its Recent Applications, 2006.
- [51] John, R. P., Nampoothiri, K. M., Fermentative production of lactic acid from biomass: an overview on process developments and future perspectives, *Appl Microbiol Biotechnol*, 74,524–534, 2007.
- [52] Abdel-Rahman, M. A., Tashiro, Y., Sonomoto, K., Recent advances in lactic acid production by microbial fermentation processes, *Biotechnology Advances*, 31, 877–902, 2013.
- [53] Zhang, Z. Y., Jin, B., Kelly, J. M., Production of lactic acid from renewable materials by *Rhizopus* fungi, *Biochemical Engineering Journal*, 35, 251–263, 2007.
- [54] Litchfield, J. H., Lactic Acid, Microbially Produced, Battelle Memorial Institute, Columbus, OH, USA, 2009.
- [55] Pandey, A. K., Recent advancements of biodegradable polylactic acid/ polylactide: A review on synthesis, characterization and applications, *Advanced Materials Letters*, 2013.

- [56] Helminen, A. O., Korhonen, H., Seppala, J. V. J., Structure Modification and Crosslinking of Methacrylated Polylactide Oligomers, *J Appl Polym Sci*, 86, 3616-3624, 2002.
- [57] Ho, S-M., Young, A. M., Synthesis, polymerization and degradation of poly(lactide copropylene glycol) dimethacrylate adhesives, *Eur Polym J*, 42, 1775-1785, 2006.
- [58] Behera, B. K., Pharmaceutical Applications of Lactides and Glycolides: A Review, *Journal of Medical and Pharmaceutical*, 1 (1), 1-5, 2013.
- [59] Vila, A. et al., PLA-PEG particles as nasal protein carriers: The influence of the particle size. *International Journal of Pharmaceutics*, Vol.292, No.1-2, 43-52, 2005.
- [60] Jie, P. et al., Micelle-like nanoparticles of star-branched PEO-PLA copolymers as chemotherapeutic carrier. *Journal of Controlled Release*, Vol.110, No.1, 20-33, 2005.
- [61] Sethuraman, V. A., Bae, Y. H., TAT peptide-based micelle system for potential active targeting of anti-cancer agents to acidic solid tumors. *Journal of Controlled Release*, Vol.118, No.2, 216-224, 2007.
- [62] Nagarwal, R.C., Singh, P.N., Kant S., Maiti, P., Pandit, J.K., Chitosan coated PLA nanoparticles for ophthalmic delivery: characterization, in-vitro and in-vivo study in rabbit eye. *J Biomed Nanotechnol.*, 6, 648–656, 2010.
- [63] Liu, C. X. et al., Enhanced gene transfection efficiency in CD13-positive vascular endothelial cells with targeted poly(lactic acid)-poly(ethylene glycol) nanoparticles through caveolae-mediated endocytosis, *Journal of Controlled Release*, (in press), 2011.
- [64] Jeevitha, D., Kanchana, A., Chitosan/PLA nanoparticles as a novel carrier for the delivery of anthraquinone: synthesis, characterization and in vitro cytotoxicity evaluation. *Colloids Surf B Biointerfaces* 101(1), 126–134, 2013.
- [65] Pang, J., Luan, Y., Li, F., Cai, X., Du, J., Li, Z., Ibuprofen-loaded poly(lactic-co-glycolic acid) films for controlled drug release, *International Journal of Nanomedicine*, 6, 659-665, 2011.
- [66] Grijpma, D. W., Hou, Q., Feijen, J., Preparation of biodegradable networks by photo-crosslinking lactide, ϵ -caprolactone and trimethylene carbonate-based oligomers functionalized with fumaric acid monoethyl ester, *Biomaterials*, 26, 2795-2802, 2005.
- [67] Ge, Z. et al., Histological evaluation of osteogenesis of 3D-printed poly-lactic-coglycolic acid (PLGA) scaffolds in a rabbit model. *Biomedical Materials*, Vol. 4, No. 2, 2009.
- [68] Shin, I. K. et al., Novel three-dimensional scaffolds of poly(L-lactic acid) microfibers using electrospinning and mechanical expansion: Fabrication and bone regeneration. *Journal of Biomedical Materials Research B: Applied Biomaterials*, Vol.95B, No.1, 150-160, 2010.
- [69] Motta, A. C., Duek, E. A. R., Síntese, Caracterização e Degradação “in vitro” do Poli(L-ácido láctico), *Polímeros: Ciência e Tecnologia*, 16, 26-32, 2006.
- [70] Jansen, J., Photo-crosslinked biodegradable polymer networks for controlled intraocular drug delivery, PhD thesis, University of Twente, Enschede, Netherlands, 2011.
- [71] Tehfe, M. A., Louradour, F., Lalevéé, J., Fouassier, J-P., Photopolymerization Reactions: On the Way to a Green and Sustainable Chemistry, *Appl. Sci.*, 3, 490-514, 2013.
- [72] Rodrigues, M. R., Neumann, M. G., Fotopolimerização: Princípios e Métodos, *Polímeros: Ciência e Tecnologia*, 13 (4), 276-286, 2003.
- [73] Bach, M., Near Infrared Laser Sensor System for In-Line Detection of Conversion in UV-Cured Polymer Coatings, PhD Thesis, KIT Scientific Publishing, 2012.
- [74] Studer, K., Decker, C., Beck, E., Schwalm, R., Thermal and photochemical curing of isocyanate

- and acrylate functionalized oligomers, *European Polymer Journal*, 41, 157-167, 2005.
- [75] Trey, S. M., Sidenvall, P., Alavi, K., Ståhlberg, D., Johansson, M., Dual cure (UV/thermal) primers for composite substrates – Effect of surface treatment and primer composition on adhesion, *Progress in Organic Coatings*, 64, 489-496, 2009.
- [76] Brauer, G. M., Lee, C. H., Oligomers with pendant isocyanate groups as tissue adhesives, I. Synthesis and characterization, *J. Biomed. Mater. Res.*, 23,295-309,1989.
- [77] Brauer, G. M., Lee, C. H., Oligomers with pendant isocyanate groups as tissue adhesives, II. Adhesion to bone and other tissues, *J. Biomed. Mater. Res.*, 23,753-763,1989.
- [78] An Introduction to electron microscopy, 2010. Available in www.FEI.com
- [79] Yuan, Y., Lee, T. R., Chapter 1. Contact Angle and Wetting Properties, *Springer Series in Surface Sciences*, 51,2013.
- [80] Operating Manual DataPhysics OCA, 2002.
- [81] Hejda, F., Solar, P., Kousal, J., Surface Free Energy Determination by Contact Angle Measurements – A Comparison of Various Approaches, *Proceedings of Contributed Papers, Part III*, 25-30, 2010.
- [82] Rudawska, A., Adhesive Properties, Scanning Electron Microscopy, Dr. Viacheslav Kazmiruk (Ed.), ISBN: 978-953-51-0092-8, InTech, 2012.
Available from: <http://www.intechopen.com/books/scanning-electron-microscopy/adhesives-properties>.
- [83] ISO 10993-4 Biological Evaluation of Medical Devices – Part 4: Selection of Tests for Interaction with Blood, 1999.
- [84] Ratner, B. D., The catastrophe revisited: blood compatibility in the 21st century, *Biomaterials*, 28, 5144-5147, 2007.
- [85] American Standard for Testing Materials, (ASTM) F 756-00: Standard Practice for Assessments of Hemolytic Properties of Materials, 2000.
- [86] Anticoagulant Citrate Dextrose Solution, *U.S. Pharmacopeia*, 23, 119, 1995.
- [87] ICSH, Recommendations for Reference Method for Haemoglobin in Human Blood (ICSH standard 1995) and Specifications for International Haemoglobincyanide Standard (4th edition), *J. Clin. Pathol.*, 49, 271-274, 1996.
- [88] Sir Dacie John V., Lewis, S. M., Practical Haematology, 6th Edition. Churchill Livingstone, London, 1984.
- [89] Lewis, S. M., Bain, B. J., Bates, I., Practical Haematology, 9th Edition. Churchill Livingstone, London, 2001.
- [90] Rius F. C., Valentí P. F., Diagnóstico Hematológico – Laboratorio y Clínica Vol. II, Editorial Jims, Barcelona, 1972.
- [91] Malinauskas R. A., Plasma Hemoglobin Techniques for the *In Vitro* Evaluation of Blood Damage Caused by Medical Devices, *Artificial Organs*, 21 (12), 1255-1267, 1997.
- [92] Cripps C. M., Rapid Method for the Estimation of Plasma Haemoglobin Levels, *J. Clin. Pathol.*, 21, 110-111, 1968.
- [93] Moore G. L., Ledford M. E., Merydith A., A Micromodification of the Drabkin Assay for Measuring plasma Hemoglobin in the range of 5 to 2000 mg/dl, *Biochemical Medicine*, 26, 167-173, 1981.
- [94] Assendelft W van, Buursma A., Zijlstra W. G., Stability of Haemoglobincyanide Standards, *J. Clin. Pathol.*, 49, 275-277, 1996.

- [95] Harmand M. F., Briquet F., *InVitro* Comparative Evaluation under Static Conditions of the Hemocompatibility of four types of Tubing for Cardiopulmonar Bypass, *Biomaterials*, 20, 1561-1571, 1999.
- [96] Imai, Y., Nose, Y., A new method for evaluation of antithrombogenicity of materials, *J. Biomed. Mater. Res.*, 6, 165-172, 1972.
- [97] Taubert, A., Mano, J. F., Rodriguez-Cabello, J. C., *Biomaterials Surface Science*, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. Weinheim, Germany, 2013.
- [98] Alves, P., Cardoso, R., Correia, T. R., Antunes, B. P., Correia, I. J., Ferreira, P., Surface modification of polyurethane films by plasma and ultravioleta light to improve haemocompatibility for artificial heart valves, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 113, 25-32, 2014.
- [99] Ribeiro, M. P., Morgado, P. I., Miguel, S. P., Coutinho, P., Correia, I. J., Dextran-based hydrogel containing chitosan microparticles loaded with growth factors to be used in wound healing, *Materials Science and Engineering C*, 33, 2958-2966, 2013.
- [100] An, Y. H., Friedman, R. J., *Handbook of Bacterial Adhesion. Principles, Methods, and Applications*, Humana Press Inc., New Jersey, USA, 2000.
- [101] Batista, A. C. L., Dantas, G. C., Santos, J., Amorim, R. V. S., Antimicrobial Effects of Native Chitosan against Opportunistic Gram-negative Bacteria, *Microbiology Journal*, 1 (3), 105-112, 2011.
- [102] Kim, K., Luu, Y. K., Chang, C., Fang, D., Hsiao, B. S., Chu, B., Hadjiargyrou, M., 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, 2004.
- [103] Miguel, S. P., Ribeiro, M. P., Brancal, H., Coutinho, P., Correia, I. J., Thermoresponsive chitosan-agarose hydrogel for skin regeneration, *Carbohydrate Polymers*, 111, 366-373, 2014.
- [104] Kwon, T-Y., Bagheri, R., Kim, Y. K., Kim, K-H., Burrow, M. F., Cure mechanisms in materials for use in esthetic dentistry, *Journal of Investigative and Clinical Dentistry*, 3, 3-16, 2012.
- [105] Kweon, H. Yoo, M. K., Park, I. K., Kim, T. H., Lee, H. C., Lee, H-S., Oh, J-S., Akaike, T., Cho, C-S., A novel polycaprolactone networks for tissue engineering, *Biomaterials*, 24 (5), 801-808, 2003.
- [106] Billmeyer, Jr. F. W., *Textbook of Polymer Science*, 3rd edition, New York: John Wiley & Sons Inc., 232, 1984.
- [107] Guo, S., DiPietro, L. A., Factors Affecting Wound Healing, *J Dent Res.*, 89 (3), 219-229, 2010.
- [108] Mandelbaum, S.H., Di Santis, É. P., Mandelbaum, M. H. S., Cicatrization: current concepts and auxiliary resources – Part I. *Anuais Brasileiros de Dermatologia*, 78 (4), 393-410, 2003.
- [109] Morandini, W., Ortiz, V., Use of tissue adhesives in surgery, *Acta Cirúrgica Brasileira*, São Paulo, 7, 80-85, 1992.
- [110] Proikakis, C. S., Mamouzelos, N. J., Tarantili, P. A., Andreopoulos, A. G., Swelling and hydrolytic degradation of poly(D,L-lactic acid) in aqueous solutions, *Polymer Degradation and Stability*, 91, 614-619, 2006.
- [111] Santos, R., Síntese de materiais poliméricos para regeneração de tecido muscular, Tese de Mestrado, Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade Coimbra, 2010.

- [112] Kim, J. H. K., Lim, J. K., Park, H-K., Porous chitosan-based adhesive patch filled with poly(L-3,4-dihydroxyphenylalanine) as a transdermal drug-delivery system, *J. Porous Mater*, 20, 177-182, 2013.
- [113] Sawamura, A. M. S., Franco, S. L., Sistemas terapêuticos transdérmicos, *Arq. Apadec*, 8 (1), 40-47, 2004.
- [114] Silva, J. A., Apolinário, A. C., Souza, M. S. R., Damasceno, B. P. G. L., Medeiros, A. C. D., Administração cutânea de fármacos: desafios e estratégias para o desenvolvimento de formulações transdérmicas, *Rev Ciênc Farm Básica Apl.*, 31 (3), 125-131, 2010.
- [115] Al-Itry, R., Lamnawar, K., Maazouz, A., Improvement of thermal stability, rheological and mechanical properties of PLA, PBAT and their blends by reactive extrusion with functionalized epoxy, *Polymer Degradation and Stability*, 97, 1898-1914, 2012.
- [116] Silverajah, V. S. G., Ibrahim, N. A., Zainuddin, N., Yunus, W. M. Z. W., Hassan, H. A., Mechanical, Thermal and Morphological Properties of Poly(lactic acid)/Epoxidized Palm Olein Blend, *Molecules*, 17, 11729-11747, 2012.
- [117] Engineer Chhaya, Parikh, J., Raval, A., Review on Hydrolytic Degradation Behavior of Biodegradable Polymers from Controlled Drug Delivery System, *Trends Biomater. Artif. Organs*, 25 (2), 79-85, 2011.
- [118] Castro, M. L., Copolímeros estatísticos biodegradáveis de ϵ -caprolactona e L,L-dilactídeo – Síntese, Caracterização e Propriedades, Tese de Doutorado, Escola Politécnica da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2006.
- [119] Reis, A. C. M., Efeito da temperatura de cura na temperatura de transição vítrea de um adesivo estrutural, Dissertação de Mestrado, Faculdade de Engenharia da Universidade do Porto, 2012.
- [120] Makadia, H. K., Siegel, S. J., Poly Lactic-co-Glycolic Acid (PLGA) as Biodegradable Controlled Drug Delivery Carrier, *Polymers*, 3, 1377-1397, 2011.
- [121] Deroiné, M., Duigou, A., Corre, Y-M., Gac, P-Y., Davies, P., César, G., Bruzaud, S., Accelerated ageing of polylactide in aqueous environments: Comparative study between distilled water and seawater, *Polymer Degradation and Stability*, Article in Press, 2014.
- [122] Proikakis, C. S., Mamouzelos, N. J., Tarantili, P. A., Andreopoulos, A. G., Stability of D,L-Poly(lactic acid) in Aqueous Solutions, *J Appl Polym Sci*, 87, 795-804, 2003.
- [123] Fraunhofer, J. A., Review Article: Adhesion and Cohesion, *International Journal of Dentistry*, 2012.
- [124] Silva, L., Öchsner, A., Adams, R. D., Handbook of Adhesion Technology, Springer Heidelberg, Berlin, Germany, 2011.
- [125] Pizzi, A., Mittal, K. L., Handbook of Adhesive Technology, 2nd ed., Taylor & Francis Group, LLC, New York, USA, 2003.
- [126] Carré, A., Polar interactions at liquid/polymer interfaces, *J. Adhesion Sci. Technol.*, 21 (10), 961-981, 2007.
- [127] Venkatraman, S., Gale, R., Skin adhesives and skin adhesion, 1. Transdermal drug delivery systems, *Biomaterials*, 19 (13), 1119-1136, 1998.
- [128] Carvalho, M. V. H., Marchi, E., Pantoroto, M., Rossini, M., Silva, D. M. S., Teodoro, L. F. F. T., Pantaroto, A., Agentes hemostáticos locais e adesivos teciduais, *Rev. Col. Bras. Circ.*, 40 (1), 66-71, 2013.
- [129] Oliveira, I. V. P. M., Dias, R. V. C., Cicatrização de feridas: fases e fatores de influência, *Acta Veterinaria Brasilica*, 6 (4), 267-271, 2012.

- [130] Braune, S., Grunze, M., Straub, A., Jung, F., Are there sufficient standards for the *in vitro* hemocompatibility testing of biomaterials?, *Biointerphases*, 8 (33), 2013.
- [131] Oeveren, W., Review Article: Obstacles in Haemocompatibility Testing, Hindawi Publishing Corporation Scientifica, 2013.
- [132] Tzoneva-Velinova, R., The wettability of biomaterials determines the protein adsorption and the cellular responses, Dissertation, Institute of Chemistry, Teltow, 2003.
- [133] Oeveren, W., Schoen, P., Majers, C. A., Monnick, S. H., Boven, A. J., Hemocompatibility os Stents, Progress in Biomedical Research, 1999.
- [134] Vermette, P., Griesser, H. J., Laroche, G., Guidoin, R., Biomedical Applications of Polyurethanes, Tissue Engineering Intelligence Unit 6, Landes Bioscience, Texas, USA, 2001.
- [135] Mosmann, T., Rapid calorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays, *Journal of Immunological Methods*, 65, 1-2, 1983.
- [136] Huang, K. T., Chen, Y. H., Walker, A., M., Inaccuracies in MTS assays: major distorting effects of medium, serum albumin, and fatty acids, *BioTechniques*, 37, 406-412, 2004.
- [137] Vidovic, E., The development of bioabsorbable hydrogels on the basis of polyester grafted poly(vinyl alcohol), PhD Thesis, RWTH Aachen University, 2006.
- [138] Silvio, L., Cellular response to biomaterials, CRC Press, Boca Raton, FL, USA, 2009.
- [139] Dias, I. O. V., Fontana, G. H., Resende, L. N., Análise do potencial bactericida e bacteriostático da sulfadiazina de prata, *Rev Bras Queimaduras*, 12 (4), 278-285, 2013.
- [140] Qiao, J., Antibacterial effect of extracts from two icelandic algae (*Ascophyllum nodosum* and *Laminariadigitata*), Final Project, University of Akureyri, Iceland, 2010.
- [141] Pupe, C. G., Villardi, M., Rodrigues, C. R., Rocha, H. V. A., Maia, L. C., Sousa, V. P., Cabral, L. M., Preparation and evaluation of antimicrobial activity of nanosystems for the control of oral pathogens *Streptococcus mutans* and *Candida albicans*, International Journal of Nanomedicine, 6, 2581-2590, 2011.
- [142] Kantorski, K. Z., Pagani, C., Influência da rugosidade superficial dos materiais odontológicos na adesão bacteriana: revisão da literatura, Revista de Odontologia da Universidade de São Paulo, 19 (3), 325-330, 2007.

ANEXOS

¹ Referências bibliográficas poderão ser consultadas na secção anterior.

Anexo A – Classificação dos Biomateriais e dos Polímeros Biodegradáveis

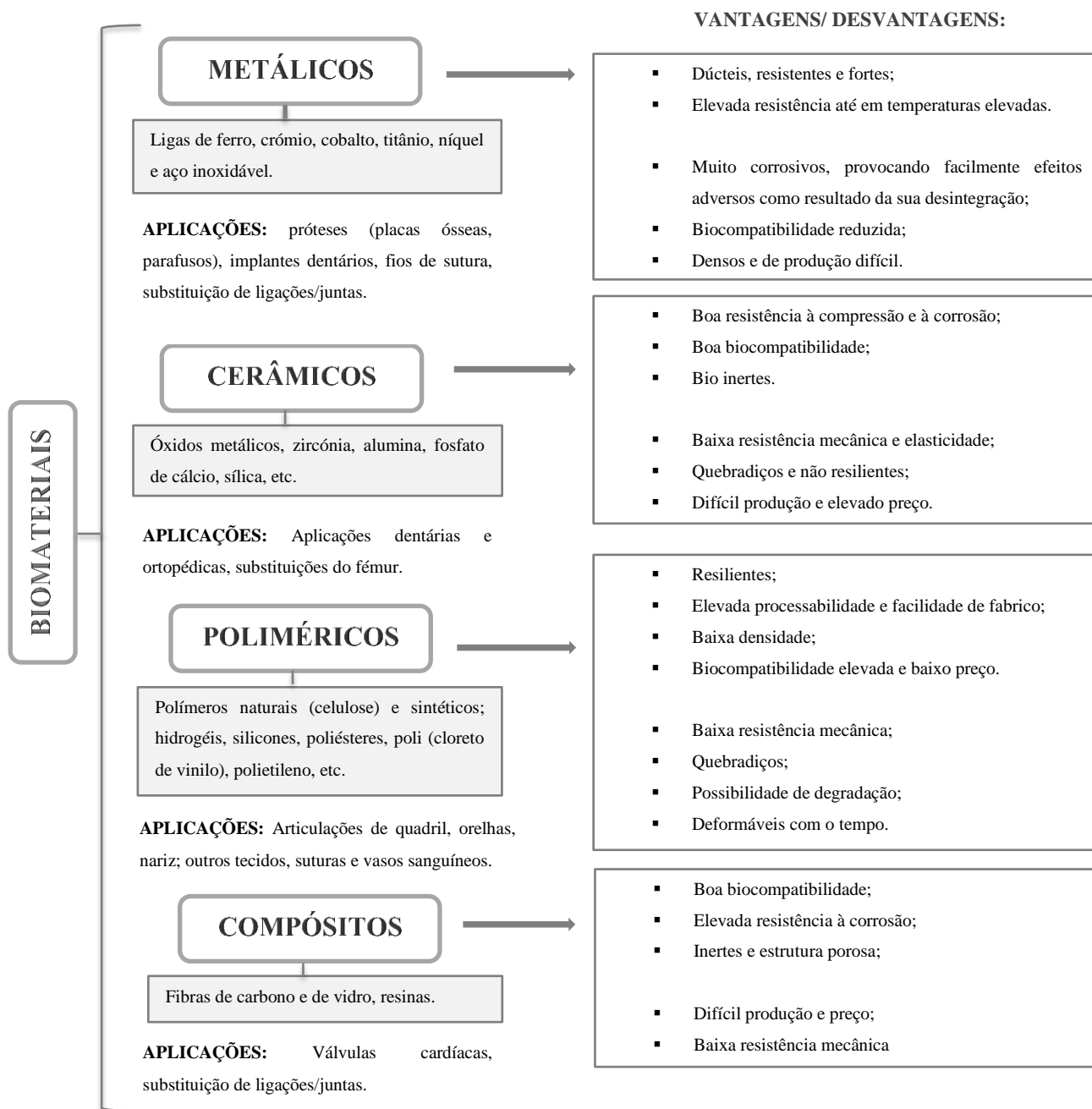


Figura A.1 Classificação dos Biomateriais, vantagens e desvantagens e suas aplicações na área médica [1 – 4, 13].

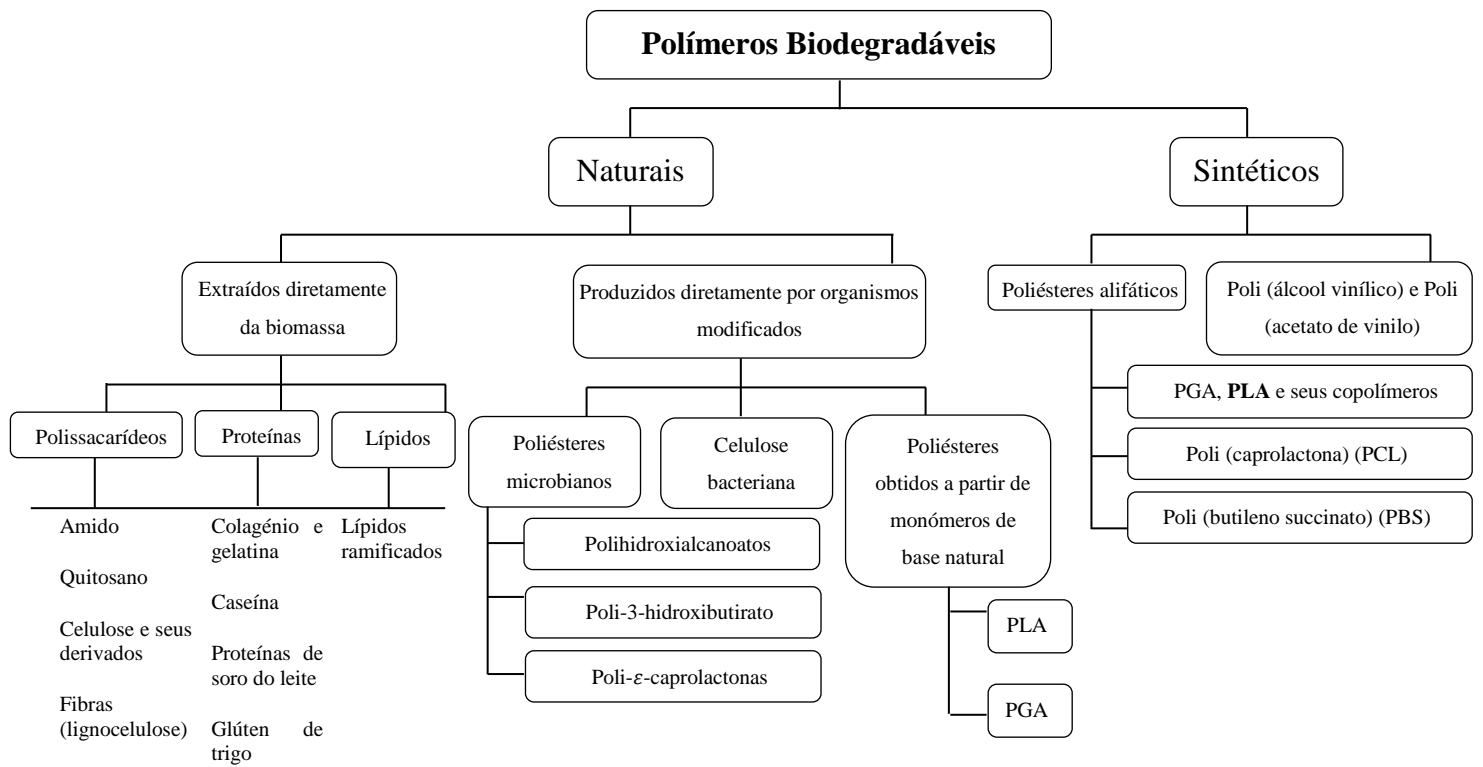


Figura A.2 Classificação de polímeros biodegradáveis tendo em conta a sua natureza/origem e método de produção (adaptado de [19]).

Anexo B – Degradação hidrolítica e erosão

Este Anexo (adaptado do trabalho de dissertação de *Hakala* [21]) pretende resumir um conjunto de elementos que permitam compreender os mecanismos de degradação hidrolítica/enzimática e os processos de erosão de polímeros, assim como os fatores externos e internos que os influenciam. Os materiais a sintetizar destinam-se à área médica e caracterizam-se por ser não-invasivos (pretende-se por isso que sejam biodegradáveis). Perceber os fatores que poderão influenciar a sua erosão/transformação/degradação será útil mais à frente (aquando a realização de testes e discussão dos resultados obtidos).

BI) Degradação vs. Erosão

Compreender estes dois conceitos é importante, de modo a perceber que tipo de degradação acontece com o material.

Como é referido na secção 1.2 (Capítulo 1), o termo degradação refere-se ao processo de rutura das cadeias do polímero, conduzindo a moléculas mais simples (monómeros ou oligómeros). Por sua vez, o termo erosão refere-se à perda de massa do polímero, resultado da libertação de monómeros pelo mesmo.

BI.1) Ligações químicas suscetíveis de degradação

Polímeros bioabsorvíveis apresentam ligações químicas suscetíveis de degradação por hidrólise ou por ação de enzimas (Figura B.1).

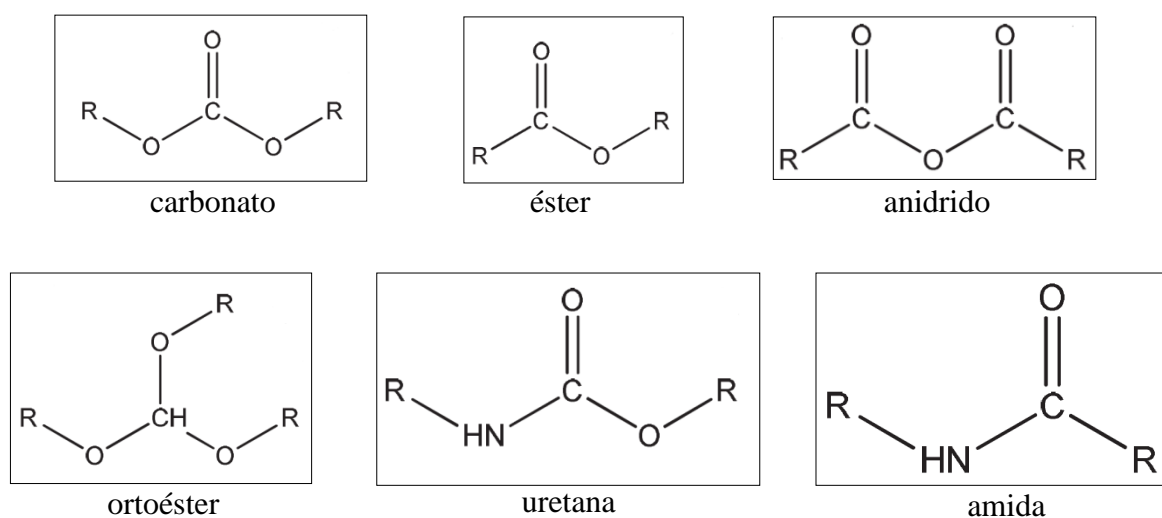


Figura B.1 Ligações químicas suscetíveis de degradação hidrolítica e/ou enzimática [21].

Com a implantação do material no organismo, as ligações químicas degradam-se em subprodutos metabolizados pelo mesmo. A taxa de degradação dos polímeros que sofrem hidrólise não é tão dependente do sítio/local onde os mesmos são implantados, comparativamente aos polímeros que se degradam por ação enzimática. Assim, materiais que se degradam por hidrólise são os melhores para aplicações biomédicas temporárias.

B2) Processos de Erosão

A erosão de polímeros compreende as seguintes etapas:

- Degradação;
- Dissolução;
- Difusão de espécies dissolvidas;
- Absorção de água;
- Alterações morfológicas.

B2.1) Classificação dos Processos de Erosão

A erosão poderá ser classificada em:

- Erosão de superfície (ou heterogénea);
- Erosão interna (ou homogénea);
- Combinação de ambas.

No processo de erosão de superfície, o material degrada-se do exterior para o interior (uma vez que a capacidade de absorção de água do polímero é menor que a taxa de degradação do mesmo). Deste modo, a erosão à superfície depende da área superficial do polímero (mais do que do seu volume). Assim, materiais com maior espessura apresentam, à partida, um maior tempo de degradação.

Contrariamente, no processo de erosão interna (*bulk*) a taxa de absorção de água é superior à taxa de degradação do material. Consequentemente, o polímero sofre uma perda de massa uniforme em toda a matriz (a erosão neste caso depende mais do volume do polímero do que da sua área superficial ou espessura).

B2.2) Fatores que influenciam a degradação e erosão dos polímeros

Diversas características dos polímeros influenciam a sua taxa de degradação hidrolítica e de erosão, nomeadamente:

- Natureza das ligações internas do polímero (ex. os grupos anidrido e ortoéster (Figura B.1) são mais suscetíveis a hidrólise, comparativamente aos grupos amida ou grupos éster);
- Hidrofobicidade/Hidrofilicidade do polímero: Um polímero que seja hidrofílico e absorva grandes quantidades de água degrada-se uniformemente em toda a matriz. No entanto, num polímero hidrofóbico, a taxa de degradação vai ser muito menor, resultado da baixa capacidade de absorção de água. Como consequência, tem-se um material com um tempo de vida útil muito maior. Para aplicações temporárias de curta duração será uma desvantagem. Ainda assim, se o material tiver na sua estrutura ligações que sejam hidroliticamente instáveis, a degradação do polímero tenderá a ser à superfície. Poderão existir casos em que os produtos resultantes da degradação sejam também hidrofóbicos, depositando-se sobre a matriz. Em termos práticos, o polímero acaba por não sofrer uma variação significativa de massa;

- Flexibilidade do polímero: Um polímero que apresente maior flexibilidade terá à partida uma estrutura em que as moléculas apresentam um maior espaço entre si (resultado de um maior comprimento de cadeia, por exemplo). Nesta situação, quanto maior for o espaço entre as moléculas, maior será a capacidade de absorção de água pelo polímero e consequentemente maior será a probabilidade de este sofrer hidrólise;

- Peso molecular do polímero: Um material com peso molecular elevado apresenta na constituição um elevado número de ligações que têm que ser quebradas. Para além disso tende a ser um material vítreo, e consequentemente menos flexível. Desta forma, a taxa de degradação é menor (ou seja, a degradação é mais lenta, comparativamente a polímeros de menor peso molecular);

- Temperatura de transição vítrea (T_g): Um material com um elevado valor de T_g corresponde a um material vítreo, com elevado grau de cristalinidade, e por isso com uma estrutura ordenada e mais estável. Por vezes, o elevado valor de T_g indica que o material tem um peso molecular elevado, e na maioria das vezes significa ser um polímero mais estável devido às ligações de hidrogénio ou interações hidrofóbicas. Sendo assim, um aumento num valor de T_g resulta numa menor taxa de degradação;

- Composição química do polímero: Uma das formas existentes para manipular a taxa de degradação do material é alterando a sua composição química, através da adição de monómeros ou co-monómeros funcionais. A adição destes pode aumentar a irregularidade das cadeias do polímero, diminuindo a sua cristalinidade e aumentando a capacidade de absorção de água (tornando-o hidroliticamente instável). Contudo, se os monómeros adicionados contribuírem com grupos que aumentem a rigidez do material, poderá ocorrer o processo oposto (e nesse caso a taxa de degradação é menor);

- Outros: Dimensões do polímero, solventes adicionados, sítio/local de implantação, presença ou não de enzimas, porosidade do material e reticulação (já referido na secção 1.2.1, Capítulo 1).

Anexo C – Aplicações biomédicas de polímeros biodegradáveis

Tabela C.I Aplicações médicas de polímeros biodegradáveis e bioabsorvíveis (adaptada de [6]).

Função	Objetivos/Aplicações	Exemplos
Regeneração/ligação	- Sutura	Anastomose vascular e intestinal
	- Adesão	Adesão cirúrgica
	- Fixação	Fixação e regeneração óssea
Encerramento/reconstrução	- Cobertura	Hemóstase local Cobertura de feridas incisas
	- Oclusão	Embolização vascular
Produção de <i>scaffolds</i>	- Proliferação celular	Reconstrução de tecido cutâneo e tecidos internos
Separação	- Isolamento - Inibição de contacto	Proteção de órgãos Prevenção de adesão
Encapsulamento	- Administração controlada de substâncias	Libertação controlada de fármaco

Anexo D – Aplicações de polímeros biodegradáveis em diversas áreas.

Tabela D.I Aplicações de polímeros biodegradáveis em diferentes áreas e produtos comercializados (adaptada de [9]).

Empresa/ Localização	Produto	Composição	Aplicações
<i>Novamont</i> (Itália)	Mater-Bi®	Amido e poliéster	Sacos de recolha de resíduos, filmes para agricultura, aplicações descartáveis.
<i>Roverc'h</i> (França)	Polynat®	Flor de centeio (80%)	Aplicações descartáveis, recipientes de flores.
<i>American Excelsior Company</i> (E.U.A)	Ecofoam®	Amido	Invólucro de recipientes.
BASF (Alemanha)	Ecoflex®	Co poliéster	Filmes para agricultura.
<i>Bayer</i> (Alemanha)	BAK 1095®	Poliéster amida	Aplicações descartáveis, recipientes de flores.
<i>Cargill Dow</i> (E.U.A.)	Eco-pla®	PLA	Produtos sanitários, roupas desportivas, embalagens e recipientes de conservação.
<i>Goodfellow</i> (Inglaterra)	Biopol®	PHB/PHV	Garrafas, lâminas.

Anexo E – Adesivos comercializados à base de cianoacrilatos, fibrina, colagénio e albumina

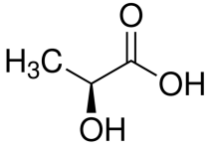
Tabela E.1. Adesivos à base de cianoacrilatos, fibrina, colagénio e albumina atualmente existentes no mercado e suas aplicações, vantagens e limitações [11, 28, 30].

Adesivos à base de cianoacrilatos				
Produtos/Produtos	Aplicação/Função	Considerações	Vantagens	Limitações
<i>Histoacryl e Histoacryl Blue (N-butyl-2-cyanoacrylate)</i> (B Braun, Medical Inc., Germany)	Terapia endoscópica/ Tratamento de feridas cutâneas.	Atualmente comercializado nos E.U.A.		
<i>Glubran (N-butyl-2-cyanoacrylate)</i> (GEM S.r.l., Viareggio, Italy)	Aprovado para uso endoscópico na Europa.	Não comercializado nos E.U.A.		
<i>Dermabond (2-octyl-cyanoacrylate)</i> (Ethicon, Inc., Johnson & Johnson Co)	Tratamento de feridas superficiais.	Aprovado pela FDA; Pode ser utilizado em conjunto com suturas; Utilizado por cirurgiões plásticos, médicos de emergência ou dermatologistas.	Forte adesão aos tecidos; Rápida polimerização; Fácil aplicação;	Polimerização exotérmica; Melhor performance em superfícies secas; Preocupação relativa aos produtos resultantes da degradação; Degradação lenta; Preço relativamente elevado.
<i>Indermil (n-butyl-2-cyanoacrylate)</i> (Covidien Inc.)	Feridas superficiais da pele.	Utilizado em conjunto com pontos dérmicos profundos.		
Adesivos à base de fibrina				
Produtos/Produtos	Aplicação/Função	Considerações	Vantagens	Limitações
<i>Beriplast-P®</i> (Centeon)	Tampão hemostático primário; Matriz de cicatrização de feridas.	Disponível a partir de duas fontes comerciais nos E.U.A.: <i>Tisseel (Baxter, Westlake Village, CA)</i> <i>Hemaseel (Hemacure, Sarasota, FL)</i>		
<i>Evicel</i> (Ethicon, Inc., Johnson & Johnson Co)	Complemento para encerramento de colostomias.			
<i>Vitagel</i> (Orthovita Inc.)	Utilizado em procedimentos cirúrgicos como adjuvante de coagulação.	Exceto neurocirurgia e cirurgia oftalmológica.	Biocompatibilidade; Elevada velocidade de cura.	Risco de transmissão de doenças sanguíneas; Reações alérgicas e risco de transmissão de infeções.
<i>Cryoseal system</i> (ThermoGenesis Corp.)	Adjuvante de hemostasia de incisões na superfície do fígado em pacientes submetidos a ressecção hepática.			
Adesivos à base de colagénio				
Produtos/Produtos	Aplicação/Função	Considerações	Vantagens	Limitações
<i>FloSeal</i> (Sulzer Spine-tech, Anaheim, CA)	Hemóstase em cirurgias vasculares.			
<i>Proceed</i> (Fusion Medical Technologies, Mountain View, CA)	Prevenção e tratamento das “CSF leaks”.	Combinação de trombina e colagénio de origem bovina.		
<i>CoStasis</i> (Cohesion Technologies, Inc.)	Spray para hemostasia cirúrgica.	Combinação de plasma humano com uma mistura de colagénio de origem bovina e trombina.		
Adesivos à base de albumina				
Produtos/Produtos	Aplicação/Função	Considerações	Vantagens	Limitações
<i>BioGlue</i> (CryoLIFE, Inc. Kennesaw, GA)	Reparação de dissecações da aorta e artérias femorais e carótidas.	Combinação de gluturaldeído com albumina de bovino; Utilizado como complemento aos métodos convencionais de hemostasia.	Rápida polimerização; Boa adesão aos tecidos.	Preocupação relativa à toxicidade do gluturaldeído.

Nota: As vantagens e limitações dos diferentes adesivos comercializados são apresentadas num contexto geral. O desempenho e as características de cada adesivo dependem de inúmeros fatores, nomeadamente da aplicação a que se destinam.

Anexo F – Propriedades físico-químicas do Ácido Lático

Tabela F.I Propriedades físico-químicas e estrutura química do Ácido lático [12, 37].

Propriedades e informações do Ácido Lático	
Número CAS	Geral: 50-21-5
Peso molecular (g mol ⁻¹)	90,08
Estrutura química	
Fórmula química	C ₃ H ₆ O ₃
Temperatura de fusão (°C)	Mistura racémica de isómeros: 18 L(+): 53 D(-): 53
Solubilidade em água (% m/m)	86 (20° C, ácido lático L(+))
Entalpia de fusão (kJ/mol)	16,8 (ácido lático L(+))
Temperatura de ebulição (°C)	122 (a 14 mmHg)
Massa volúmica (g mL ⁻¹) (80 % solução)	1,209
Viscosidade (mPa s)	28,5 (85,3% solução em água, 25°C)

Anexo G – Fornecedores de PLA à escala global

Tabela G.I Fornecedores globais de PLA: Localização e capacidades de produção (adaptado de [42]).

Empresa/Sociedade	Localização	Marca	Capacidade de Produção (kton/ano)
Nature Works	E.U.A.	Ingeo	140
Futero	Bélgica	Futero	1,5
Tate & Lyle	Holanda	Hycail	0,2
Purac	Holanda	Purasorb	0,05
Hiusan Biosciences	China	Hisun	5
Jiangsu Jiulding	China		5
Teijin	Japão	Biofront	1
Toyobo	Japão	Vylocol	0,2
Synbra	Holanda	Biofoam	50

Anexo H – Propriedades físicas e químicas do poli (ácido lático) (PLA)

Tabela H.I Propriedades físicas e químicas do poli (ácido lático) (PLA) (adaptado de [36, 40]).

Propriedades dos estereoisómeros do PLA			
	PLLA	PDLA	PDLLA
Temperatura de transição vítrea T_g (°C)	55 – 60	50 – 60	Variável
Temperatura de fusão T_m (°C)	aprox. 180	aprox. 180	Variável
Temperatura de decomposição/degradação (°C)	aprox. 200	aprox. 200	185 - 200
Massa volúmica (g cm ⁻³)	1,290	1,248	1,250
Elongação na rutura (%)	20 – 30	20 – 30	Variável
Estrutura cristalina	Semicristalino	Cristalino	Amorfo
Tempo de degradação (em ambiente salino, 37 °C)	4 a 6 meses	4 a 6 meses	2 a 3 meses
Solubilidade	Todos demonstram ser solúveis em clorofórmio, benzeno, acetonitrilo, THF, dioxano, etc. Por sua vez, são insolúveis em água, etanol, metanol, heptano, hexano, etc.		

Anexo I – Síntese e Modificação de PLA

Tabela I.I Vantagens e Desvantagens dos diferentes métodos de síntese de PLA (adaptado de [40]).

Métodos de Síntese		Vantagens	Desvantagens
Policondensação direta (<i>direct polycondensation</i>)	<i>Solution polycondensation</i>	- Apenas uma etapa; - Via económica; - Fácil controlo das condições de operação.	- Impurezas, reações secundárias, PLA de baixo peso molecular.
	<i>Melt polycondensation</i>		- Necessárias elevadas temperaturas de reação, sensibilidade às condições de operação, obtenção de PLA de baixo peso molecular.
Polimerização por abertura de anel (<i>ring-opening polymerization</i>)		- PLA de elevado peso molecular.	- Requer elevada pureza do monómero ácido lático, custos de produção elevados.
Novos métodos (novas condições de operação, catalisadores, etc.)		- Eficiência, produtos não tóxicos, PLA de elevado peso molecular, redução da poluição face a processos convencionais.	(em desenvolvimento)
Biossíntese (Processo enzimático)		- Apenas uma etapa, eficiência, produtos não tóxicos, baixo custo, sem poluição.	(em desenvolvimento)

Tabela I.2 Estratégias de modificação física e química do PLA, motivações e estudos na área [40, 44].

ESTRATÉGIAS DE MODIFICAÇÃO DO PLA (adaptado de [40] ¹):	
MODIFICAÇÃO BULK	
- Materiais destinados à área médica deverão possuir propriedades mecânicas adequadas (boa resistência, ductilidade, flexibilidade) para que tenham um bom desempenho na sua função. Para além disso, a hidrofiliabilidade é importante para que haja uma boa interação entre o biomaterial e as células. As desvantagens do PLA neste âmbito são a baixa ductilidade e o facto de apresentar uma taxa de degradação lenta. Diversos métodos de modificação têm vindo a ser investigados para melhorar as propriedades mecânicas do PLA, com foco na variedade de grupos hidrolisáveis (de modo a melhorar o perfil de degradação do material), no controlo da flexibilidade e cristalinidade das cadeias do polímero (permitindo um maior processamento do material) e na presença de grupos hidrofílicos.	
Modificação física	
Mistura/ combinação (<i>Blending</i>)	Método simples e versátil que permite desenvolver novos materiais com melhores propriedades, sem que seja necessário a síntese de novos polímeros. Consiste assim na combinação ou junção do PLA a diferentes polímeros, biodegradáveis ou não, permitindo obter melhores propriedades devido à interação entre estes.
	<u>Combinação de polímeros com o PLA:</u> - Biodegradáveis: PEG, PCL, PHB, PBAT; - Não-biodegradáveis: PE, PVA, PP.
	<u>Estudos:</u> - PLA/PP: melhor resistência à biodegradação e hidrólise; melhorias na capacidade de coloração; imiscíveis; exibição de fracas propriedades mecânicas devido a uma reduzida adesão interfacial entre as fases do polímero; - PLA/TKGM: miscível devido a interações específicas entre o PLA e o TKGM; melhorias nas propriedades mecânicas: alongação na rutura de 520% para a mistura (20/80), comparativamente a apenas 14% do PLA puro; resistência ao impacto foi melhorada de 11,9 kJ/m ² (PLA puro) para 26,9 kJ/m ² (PLA/TKJM).
Plastificação	Estratégia de modificação que consiste na adição de plastificantes de baixo peso molecular ao PLA, de modo a diminuir a T _g , aumentando a suavidade e ductilidade do material final. Esforços têm sido desenvolvidos fazendo variar a polaridade, peso molecular e os grupos funcionais dos plastificantes. <u>Plastificantes:</u> triacetina, tributil citrato considerados os mais eficientes na diminuição da T _g do PLA (PLA/TB: T _g de 24 °C).
Compósitos	A produção de compósitos tem como objetivo a combinação de diferentes materiais de modo a obter melhores propriedades. Fibras poderão servir como enchimento/carga de compósitos de base PLA. Estudos referem a produção de compósitos de PLA com fibras de celulose, com melhores propriedades mecânicas (alongação na rutura, força de tensão, módulo de Young, etc.)
Modificação química	
Copolimerização	Devido à presença dos grupos carboxilo ou hidroxilo do ácido lático, o PLA apresenta uma enorme versatilidade de reação. É por isso possível produzir copolímeros de PLA de baixo peso molecular por policondensação, adicionando outros monómeros (como a caprolactona). Copolímeros de elevado peso molecular também poderão ser obtidos por ROP com monómeros cíclicos (ácido glicólico, valerolactona, carbonato de trimetileno, etc.). Copolímeros de base PLA mais comuns: PLA/PGA, PLA/PEO, PLA/PEG (a fim de produzir materiais que apresentem elevada biocompatibilidade e sejam hidrofílicos, não tóxicos, não imunogénicos e não antigénicos).
Reticulação (<i>Crosslinking</i>)	Materiais de base PLA poderão ser reticulados por irradiação UV (na presença de um fotoiniciador) ou através de reticulação química (na presença de iniciador e agente reticulante). A reticulação do polímero poderá dar origem a um material muito mais estável (termicamente) e com melhores propriedades mecânicas.
MODIFICAÇÃO DE SUPERFÍCIE	
- Estratégias de modificação de superfície do PLA são adotadas para melhorar propriedades como a hidrofiliabilidade, rugosidade, energia de superfície, funcionalidade química, entre outras, de forma a produzir materiais com características adequadas à sua utilização no organismo, em inúmeras aplicações terapêuticas.	
Métodos Físicos	
Revestimento de superfície	Considerado dos métodos de modificação de superfície mais simples, aplicado particularmente na produção de nanopartículas de PLA para libertação controlada de fármaco. <u>Tipos de revestimento:</u> - Revestimento com PEG é o mais reportado, tendo atrasado a fagocitose das nanopartículas e prolongado a sua circulação em testes <i>in vivo</i> , contudo incapazes de direcionamento específico, com consequências negativas na eficiência de libertação.

¹ Xiao *et al.* [40] apresentam uma revisão detalhada sobre estratégias de modificação do PLA e estudos realizados nesse âmbito (onde se poderão encontrar os autores e referências dos mesmos). Na Tabela H.2. são apenas mencionados alguns exemplos.

Tabela I.2 (cont.)

MODIFICAÇÃO DE SUPERFÍCIE	
Métodos Físicos	
Revestimento de superfície	- Polissacarídeos revelam-se promissores no revestimento de partículas de base PLA (comparativamente ao PEG). - Matrizes extracelulares de proteínas (como a fibronectina ou o colagénio) são também usadas para revestimento, conduzindo à adesão celular e à obtenção de um material final mais biocompatível.
Aprisionamento (<i>Entrapment</i>)	Método de aprisionamento de diferentes espécies de modificação (PEG, alginato, etc.) por absorção reversível através da superfície do PLA, sem necessidade de grupos funcionais específicos nas cadeias poliméricas. As moléculas acumulam-se apenas na superfície do material que se pretende modificar, sem que haja modificação das suas propriedades na massa.
Tratamento por Plasma	Método de modificação utilizado para melhorar propriedades como a hidrofiliicidade do PLA e a sua afinidade com as células. O tratamento por plasma permite obter um controlo sobre energia e carga de superfície, modificando-a uniformemente sem alterações significativas nas propriedades na massa. O tratamento por plasma introduz grupos funcionais no polímero, (-NH ₂ , -OH, -COOH) capazes de criar ligações covalentes com outros materiais para posterior modificação.
Modificação Química	
Introdução de grupos funcionais no polímero. Tratamento por hidrólise superficial simples (com um álcali) ou tratamento por aminólise, introduzindo grupos hidrofílicos (-COOH e -OH) e grupos reativos (-NH ₂) que podem ser usados para ligar moléculas bioativas como quitosano, arginina, lisina, colagénio, PEG, entre outras, com o objetivo de regular a adesão celular e a adsorção de proteínas ao material (promovendo a sua biocompatibilidade), sendo de extrema importância na produção de <i>scaffolds</i> e implantes para Engenharia de Tecidos.	

Anexo J – Seleção de novos monómeros funcionais.

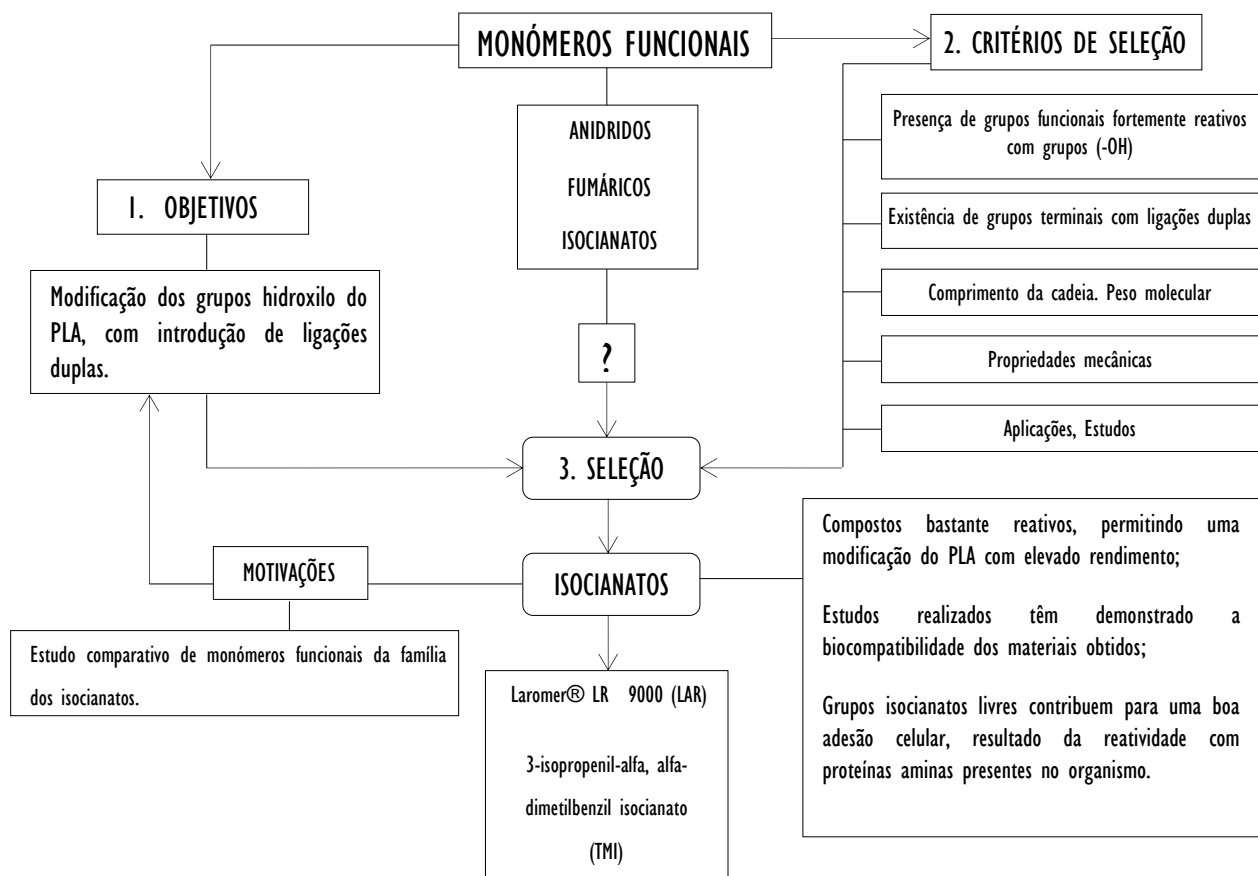


Figura J.1 Pesquisa de novos monómeros funcionais: objetivos, critérios de seleção e motivações [4, 11, 12, 35, 73 – 76].

Anexo K – Propriedades e Estruturas químicas dos principais reagentes utilizados

Tabela K.1 Propriedades, fórmulas e estruturas químicas, códigos R e S dos monómeros, co-monómeros, solventes e iniciadores utilizados, obtidos a partir de fornecedores ou das fichas MSDS dos compostos.

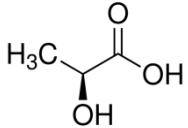
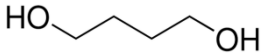
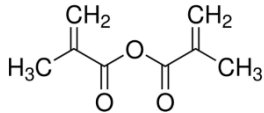
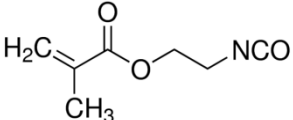
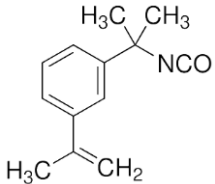
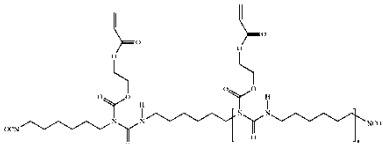
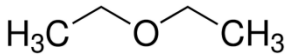
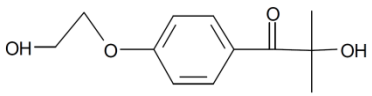
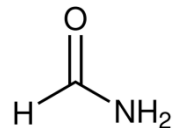
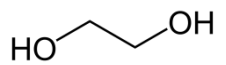
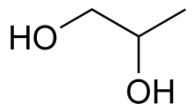
Nome da substância	Fórmula química	Estrutura química	Peso molecular (g mol ⁻¹)	Ponto de fusão (°C)	Ponto de Ebulição (°C)	Massa volúmica (g mL ⁻¹)	Códigos R	Códigos S
Ácido 2-hidroxi-propanóico ou Ácido Lático L(+)	C ₃ H ₆ O ₃		90,08	53	122 (a 12 mmHg)	1,209 (solução a 80%)	R38 R41	ND
1,4-butanodiol	C ₄ H ₁₀ O ₂		90,12	16	230	1,017	R22 R67 R20	S23 S36
Anidrido metacrílico	C ₈ H ₁₀ O ₃		154,16	ND	87 (a 13 mmHg)	1,035	R37/38 R41	S26 S39
Metacrilato de 2-isocianoetilo	C ₇ H ₉ NO ₃		155,15	-45	211	1,098	R22, R23 R25, R26 R36/37/38 R41, R42	ND
3-isopropenil- α , α -dimetilbenzil isocianato	C ₁₃ H ₁₅ NO		201,27	ND	268-271	1,018	R26, R34 R42/43 R48/20 R50/53	S7, S15, S28 S36/37/39 S38, S45, S60 S61
Laromer® LR 9000	-		578	ND	ND	1,154	R21, R22, R23 R36/37/38 R42/43	ND

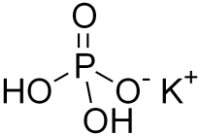
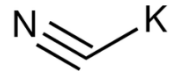
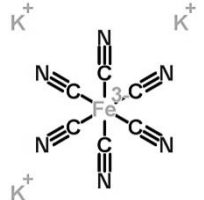
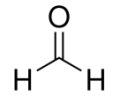
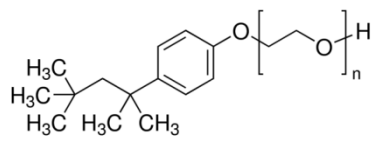
Tabela K.1 (cont.)

Nome da substância	Fórmula química	Estrutura química	Peso molecular (g mol ⁻¹)	Ponto de fusão (°C)	Ponto de Ebulição (°C)	Massa volúmica (g mL ⁻¹)	Códigos R	Códigos S
Éter dietílico	C ₄ H ₁₀ O		74,12	-116	34,6	0,710	R12, R19 R22 R66, R67	ND
2-hidroxi-1-[4-(2-hidroxietoxi)fenil]-2-metil-1-propanona ou Irgacure® 2959	C ₁₂ H ₁₆ O ₄		224,30	86,5-89,5	ND	ND	ND	ND
Formamida ^(a)	CH ₃ NO		45,04	2-3	210	1,134	R40 R48/22 R61	ND
Etilenoglicol ^(a)	C ₂ H ₆ O ₂		62,07	-13	196-198	ND	ND	ND
Propilenoglicol ^(a)	C ₃ H ₈ O ₂		76,09	-59	188,2	1,036	ND	ND

ND – não disponível

^{a)} Reagentes utilizados nos ensaios de medição de ângulos de contacto.**Nota:** As frases dos códigos R (perigo) e S (procedimentos de segurança) poderão ser consultadas nas fichas MSDS dos compostos.

Tabela K.2 Reagentes utilizados nos ensaios de hemocompatibilidade – Propriedades, Fórmulas e Estruturas químicas e códigos R/S (obtido a partir de fornecedores).

Nome da substância	Fórmula química	Estrutura química	Peso molecular (g mol ⁻¹)	Ponto de fusão (°C)	Ponto de Ebulição (°C)	Massa volúmica (g mL ⁻¹)	Códigos R	Códigos S
di-hidrogenofosfato de potássio	KH ₂ PO ₄		136,09	252,6	ND	2,338	Esta substância não é classificada como perigosa de acordo com a Diretiva 67/548/CE.	-
Cianeto de potássio	KCN		65,12	634	1625	1,520	R26/27/28 R32, R50/53	ND
Ferrocianeto de potássio	K ₃ Fe(CN) ₆		329,24	ND	ND	1,890	R32 R36/37/38	S22,S24/25 S26,S28 S36/37/39 S45
Cloreto de cálcio	CaCl ₂	Cl—Ca·Cl	110,98	772	1670	2,150	R36	ND
Formaldeído	CH ₂ O		-	ND	ND	1,016	R11, R23/24/25 R34, R39 R40, R43	ND
4 - (1,1,3,3-tetrametilbutil) fenil-glicol polietileno ou Triton X®-100	(C ₂ H ₄ O) _n C ₁₄ H ₂₂ O		ND	6	> 200	1,070	R22, R36 R51/53	ND

ND – não disponível

Anexo L – Processo de produção, montagem experimental, condições de operação e fatores em consideração

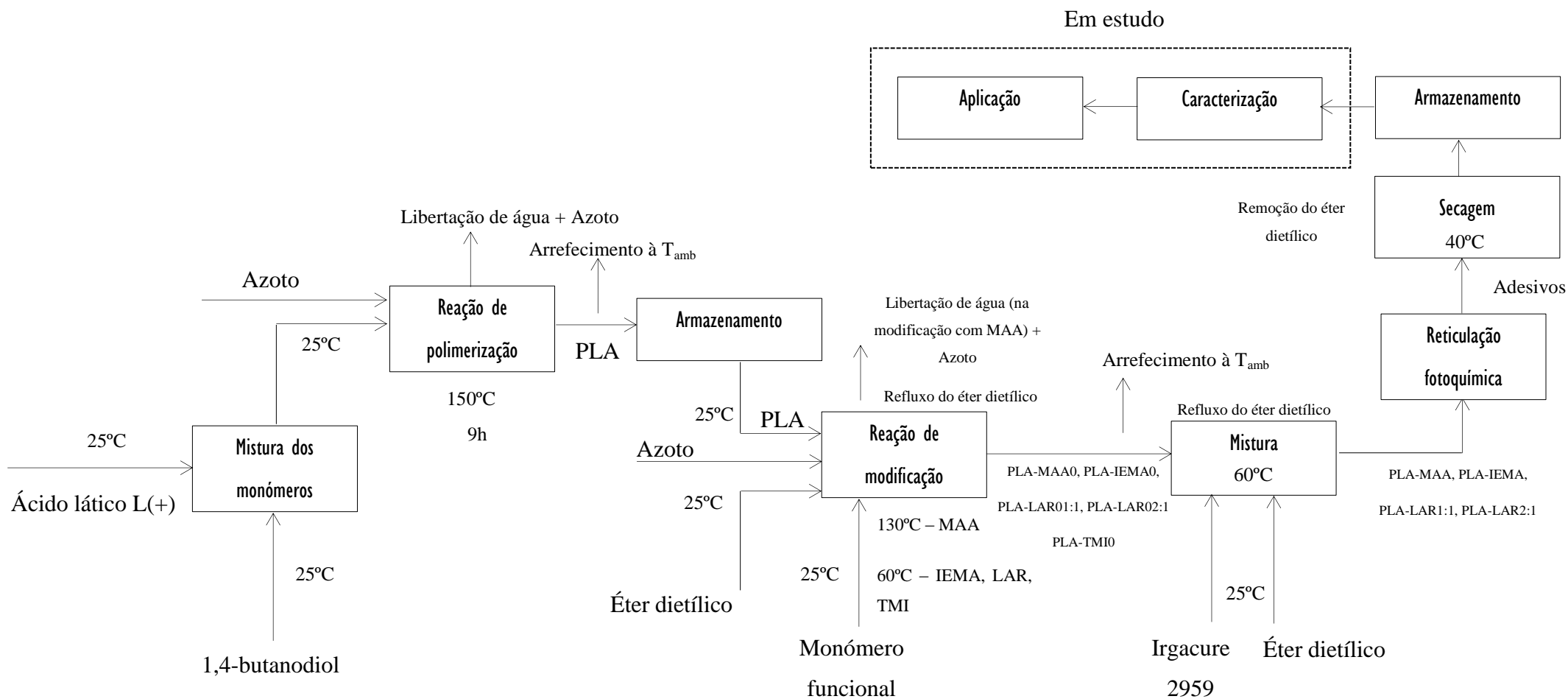


Figura L.1 Esquema do processo de produção dos bioadesivos a partir de ácido lático (preparação em laboratório).

Nota: O esquema apresentado na Figura L.1 não pretende ser um diagrama PFD do processo. Este esquema apenas representa as várias etapas de síntese realizadas em laboratório, desde a síntese do pré-polímero até à obtenção final do adesivo, como forma de ilustração (secção 3.2).

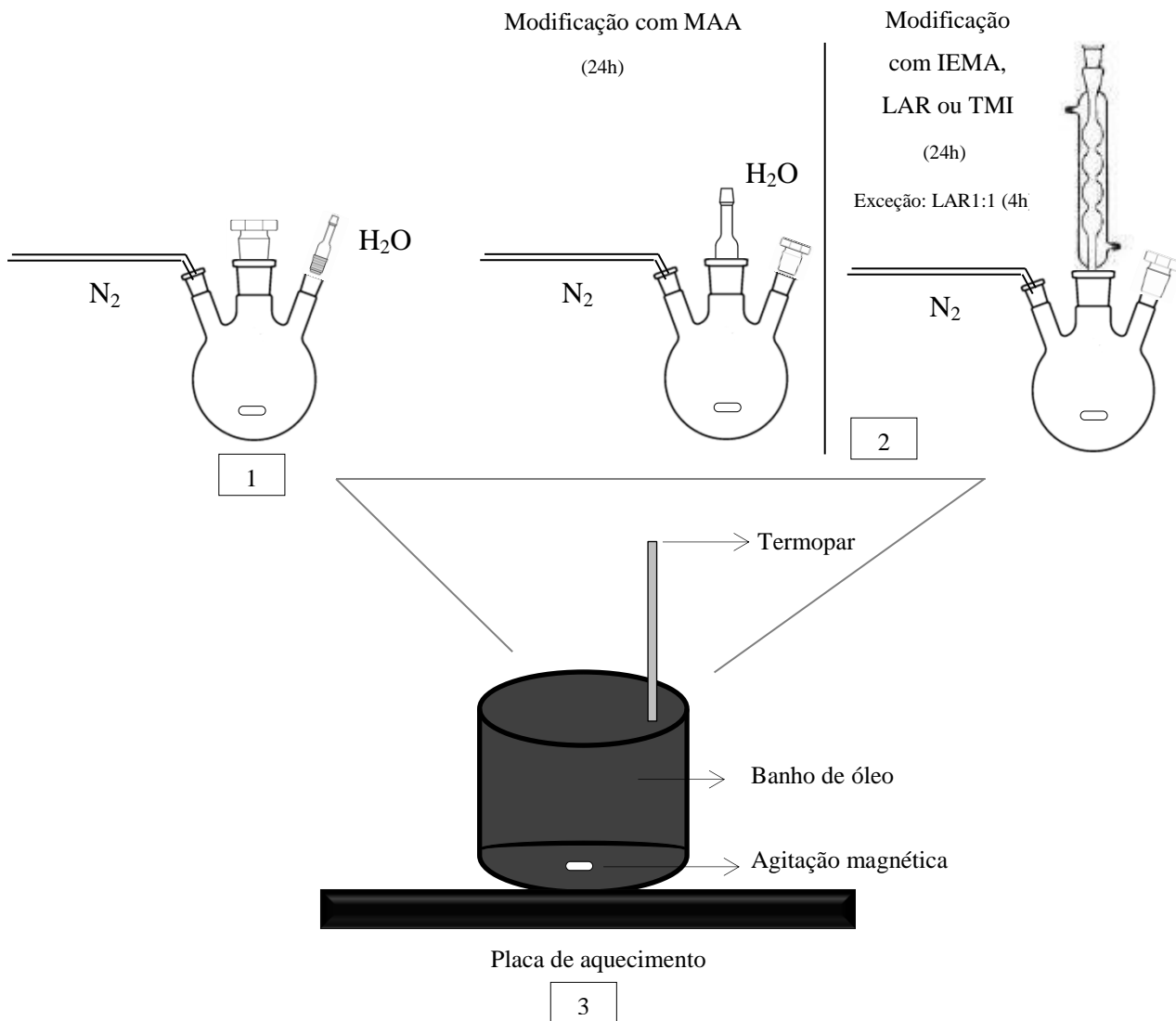


Figura L.2 Exemplificação da montagem experimental nos ensaios: **1)** Montagem para produção do pré-polímero por policondensação direta (com libertação de água); **2)** Montagem para a funcionalização do pré-polímero (anidrido vs. isocianatos); **3)** Banho de aquecimento onde foi introduzido cada um dos sistemas anteriores – agitação magnética ~ 250 rpm.

Aspetos críticos no processo (cuidados a ter/limitações encontradas)

I. Síntese do pré-polímero

- Tempo necessário de reação para a total remoção de água da solução (> 9h);
- Controlo da temperatura (dificuldade em estabilizar acima dos 130°C);
- Identificação das bandas características correspondentes aos grupos OH e grupos éster (ATR-FTIR).

2. Funcionalização do pré-polímero

- Quantidade de solvente adicionada (muito crítico) – a otimizar (de forma a obter a melhor viscosidade possível; depende muito do monómero funcional utilizado);
- Presença de bolhas de ar na solução polimérica (em modificações com LAR);
- Garantir o ambiente inerte no sistema durante todo o processo (essencial);
- Nas modificações em que é utilizado solvente, é importante ter um bom refluxo (controlar o caudal da corrente fria do condensador);
- Proteção da luz (a fim de evitar reticulação dos produtos) – em caso de armazenamento, é preferível utilizar frascos escuros e armazená-los em local fresco (refrigerado);
- Verificação da qualidade dos produtos: identificação do desaparecimento dos grupos funcionais livres (do monómero adicionado ao pré-polímero), da diminuição ou desaparecimento dos grupos OH e do aparecimento dos grupos uretana ou anidrido, e consequentemente das ligações de carbono duplas (ATR-FTIR) – avançar para a última etapa se se verificar a presença de ligações duplas;
- Dificuldade no *scale-up* da modificação: a quantidade de solvente não aumenta linearmente (aspecto mais crítico desta etapa).

3. Reticulação fotoquímica do pré-polímero

Solubilização do fotoiniciador:

- Quantidade de solvente adicionada (muito crítico se o polímero modificado for muito viscoso);
- Refluxo do solvente (importante);
- Garantir a homogeneização da mistura (de forma a obter um produto transparente);
- Proteção da luz (muito importante);

Irradiação das amostras com UV:

- Espalhamento sobre superfícies à temperatura ambiente (deve ser feito com cuidado para evitar a presença de bolhas de ar no produto final; deve ser feito da forma mais cuidadosa possível, para que o adesivo tenha uma espessura uniforme, sem fragilidades);
- Dificuldade no controlo da espessura dos filmes obtidos;
- Tempo de irradiação deverá ser controlado (garantir a reticulação total da matriz; evitar a presença de líquido residual);
- Verificação da conversão de ligações de carbono duplas (ATR-FTIR);

4. Secagem dos materiais

- Secagem dos materiais deve ser feita numa estufa de vácuo (a temperatura não deve ser elevada, para não desidratar completamente as membranas obtidas). Contudo a secagem do material é fundamental, antes de estes serem caracterizados;
- Otimização do tempo de secagem (muito variável, consoante o produto e a espessura das amostras)

CUIDADOS GERAIS (REAÇÕES):

- Agitação magnética: Em casos em que a viscosidade da solução aumenta consideravelmente ao longo da reação, deve-se ir controlando a mesma, para evitar que o sistema reacional deixe de ser homogeneizado. Em reações que decorram durante a noite, deve-se deixar a agitação numa velocidade menor.

Anexo M – Protocolos dos Ensaios de Hemocompatibilidade

Teste da Hemólise

Os testes de hemólise compreenderam as seguintes etapas:

1. Amostragem do Sangue;
2. Quantificação da hemoglobina:
 - 2.1. Método da Cianometahemoglobina
 - Preparação de soluções;
 - Preparação dos padrões para elaboração da curva de calibração;
 - Determinação da concentração de hemoglobina no sangue e no plasma;
 - Diluição do sangue;
3. Contacto do material com o sangue;
4. Cálculo da percentagem de hemólise provocada por cada material.

Protocolo experimental

1. Amostragem do Sangue

Nos testes realizados, o sangue já anti-coagulado foi fornecido pela PROBIOLÓGICA, acondicionado num frasco de vidro e transportado num saco térmico. Assim que recebido, o sangue foi armazenado no frigorífico até ser utilizado (nas mesmas condições em que foi entregue). Apesar de a sua validade permitir o seu armazenamento durante aproximadamente um mês, este foi utilizado no mesmo dia em que foi recebido, para garantir a sua qualidade. De outra forma, poderia sofrer hemólise com o tempo, pondo em causa o seu uso nos ensaios realizados.

Nota: Se o sangue for recolhido fresco, a recolha deve ser feita em recipientes de colheita apropriados, e a cada recipiente deve ser adicionada previamente uma solução anticoagulante preparada em laboratório, designada de Solução Anticoagulante de Citrato e Dextrose (ACD). Para preparar essa solução deve-se dissolver 0,3637g de ácido cítrico ($C_6H_8O_7$), 1,1001g de citrato de sódio ($Na_3C_6H_5O_7 \cdot 2H_2O$) e ainda 1,2268g de dextrose mono-hidratada ($C_6H_{12}O_6 \cdot H_2O$) em 50 mL de água destilada [86]. A proporção a utilizar deve ser de 1 mL de anticoagulante para cada 9 mL de sangue. Os recipientes devem ser agitados com bastante cuidado (promovendo a homogeneização do sangue com a solução ACD), para que não ocorra a hemólise. O seu transporte deve ser feito também com muito cuidado. Malas ou sacos térmicos com gelo são preferíveis, para que o sangue esteja bem acondicionado e mantenha as suas propriedades.

2. Quantificação da hemoglobina

2.1. Método da Cianometahemoglobina – Fundamentos

Para quantificar a hemoglobina (Hb) presente na totalidade dos glóbulos vermelhos e plasma, podem ser utilizados diferentes métodos analíticos, nomeadamente: 1) espectrofotometria; 2) doseamento do ferro; 3)

absorção de gases. De entre os métodos referidos, a espectrofotometria é preferível, dada a sua precisão, rapidez e relativa facilidade de execução. O método da cianometahemoglobina é o mais utilizado, por referência do Conselho Internacional de Padronização em Hematologia.

Neste método, a concentração de hemoglobina é determinada sob a forma de cianometahemoglobina. Para tal, faz-se reagir a Hb com o cianeto de potássio (KCN) e o ferrocianato de potássio ($K_3Fe(CN)_6$), convertendo todas as formas de Hb (oxihemoglobina, desoxihemoglobina, metahemoglobina e carbohemoglobina) em cianometahemoglobina (que apresenta um pico de absorvância de 540 nm).

2.2. Procedimentos realizados

- Preparação de Soluções

De acordo com a norma ASTM F 756-00, que utiliza como método de referência o método da cianometahemoglobina, o sangue utilizado nos testes de hemólise deve apresentar as seguintes características:

- 1) [Hb] no sangue = 10 mg/mL \pm 1 mg/mL;
- 2) [Hb] no plasma do sangue <2,0 mg/mL.

Como tal, na aplicação do método foram preparadas diversas soluções. Na Tabela M.1 apresentam-se todos os reagentes utilizados na preparação das soluções necessárias, modos de preparação e utilização.

Tabela M.1 Soluções preparadas para o teste de hemólise.

Soluções	Materiais e Preparação	Aplicação/Utilização
Solução de PBS	<p>Reagentes:</p> <ul style="list-style-type: none"> - Pastilhas de PBS (<i>Phosphate buffered saline</i>) <p>(Uma pastilha dissolvida em 200 mL de água destilada produz uma solução fosfato tamponizada 0,01M, 0,0027M cloreto de potássio e 0,137M cloreto de sódio, pH 7,4, 25°C).</p> <p>Preparação:</p> <p>Para preparar 1L de solução PBS 0,01M, foram adicionadas 5 pastilhas de PBS a 1L de água destilada. Agitou-se a solução algumas vezes, até dissolução total das pastilhas. Deixou-se repousar e de seguida armazenou-se no frigorífico.</p>	<ul style="list-style-type: none"> - Dispersão dos eritrócitos liofilizados para preparar a solução de Hb; - Diluição do sangue, até se obter o valor pretendido de concentração de Hb no sangue e no plasma sanguíneo; - Incubação dos materiais, para posterior contacto com o sangue-ACD diluído.
Solução de Drabkin modificada	<p>Reagentes:</p> <ul style="list-style-type: none"> - Cianeto de potássio (KCN), ferrocianeto de potássio ($K_3Fe(CN)_6$), di-hidrogenofosfato de potássio (KH_2PO_4) e tensoativo não iónico Triton X-100. <p>Preparação:</p> <ul style="list-style-type: none"> - Para preparar 1L de solução de Drabkin modificada (com aspeto amarelado), dissolveu-se 50 mg de KCN, 200 mg de (KH_2PO_4), 140 mg de ($K_3Fe(CN)_6$) e 1 mL de Triton X-100 em 1L de água destilada. A solução obtida foi filtrada e armazenada em local protegido da luz. 	<ul style="list-style-type: none"> - Adição à solução de Hb para preparação dos padrões para elaboração da curva de calibração.

Tabela M.1. (cont.)

Soluções	Materiais e Preparação	Aplicação/Utilização
Solução de Hb	<p>Materiais: Eritrócitos liofilizados e solução PBS.</p> <p>Preparação: Para preparar a solução de Hb, adicionou-se entre 0,25 a 0,30 g de eritrócitos liofilizados a 75 mL de solução de PBS 0,01 M (pH 7,4). A solução foi preparada no dia em que foi utilizada.</p>	- Elaboração da curva de calibração.

Importante referir que na preparação da solução de Drabkin modificada (Tabela M.1), o pH da mesma deve estar compreendido entre 7,0 - 7,4 e esta não deverá ter um aspeto turvo. Caso contrário, a solução deve ser rejeitada e feita uma nova. Uma vez que a solução deve repousar durante um determinado período de tempo, é aconselhável que seja feita na véspera de utilização.

- Preparação dos padrões para elaboração da curva de calibração

Antes de diluir o sangue-ACD com a solução de PBS (de forma a obter a concentração desejada de Hb no sangue e no plasma), teve que se determinar a concentração inicial de Hb no sangue recebido. Para tal, delineou-se uma curva de calibração a partir de diferentes soluções de hemoglobina (com diferentes concentrações). Os padrões foram preparados a partir de diferentes diluições da solução de Hb preparada previamente, a partir da adição de eritrócitos liofilizados a um determinado volume de solução PBS (Tabela M.1).

Após dispersão dos eritrócitos na solução PBS e conseqüente solubilização da hemoglobina, a solução de Hb foi centrifugada, durante 10 min, a 2100 rpm. Desta forma, obteve-se um sobrenadante onde ficou solubilizada a totalidade da Hb presente nos eritrócitos. Retirou-se 1 mL do sobrenadante e adicionaram-se 5 mL da solução de Drabkin (também já preparada), aguardando-se 5 minutos. A solução de Drabkin permite converter todas as formas de hemoglobina em cianometahemoglobina, possibilitando a sua total quantificação no comprimento de onda de 540 nm.

Após 5 minutos, determinou-se a concentração de Hb no sobrenadante por espectrofotometria de *UV-Vis* no comprimento de onda de absorção do composto. Fez-se um varrimento no espectrofotómetro numa gama de comprimentos de onda compreendida entre 400-800 nm. Utilizou-se ainda a solução de Drabkin como branco, fazendo pelo menos três replicações do ensaio. A concentração de Hb foi então calculada a partir da Equação M.1.

$$[Hb] = \frac{A_{540nm} \times M \times f_d}{\epsilon_{HiCN}^{540nm} \times 1 \times 1000} \text{ (g/l)} \quad (M.1)$$

Onde A_{540nm} corresponde à absorvância a 540 nm, ϵ_{HiCN}^{540nm} é o coeficiente milimolar da cianometahemoglobina (HiCN), 11 mM.cm^{-1} , M está relacionado com a massa molecular da hemoglobina (16114,5 g) e f_d é o fator de diluição. Substituindo os valores na Equação M.1, obteve-se a Equação M.2. para o cálculo da concentração de Hb.

$$[Hb] = 1,465 \times A_{540nm} \times f_d \text{ (g/l)} \quad (M.2)$$

Prepararam-se diferentes diluições (a partir da adição de diferentes volumes de solução de Hb e de solução de Drabkin). As soluções padrão obtidas para elaboração da curva de calibração foram sempre aceites, desde que o valor de concentração de Hb obtido correspondesse aos seguintes requisitos:

- 1) $1,59 < \frac{A_{540nm}}{A_{504nm}} < 1,63$
- 2) $A_{750nm} \leq 0,003$

A curva de calibração obtida (Figura M.1) permitiu relacionar todos os valores de absorvância registados com a concentração de Hb livre. Com esta curva, tornou-se assim possível determinar a concentração inicial de Hb no sangue e no plasma sanguíneo.

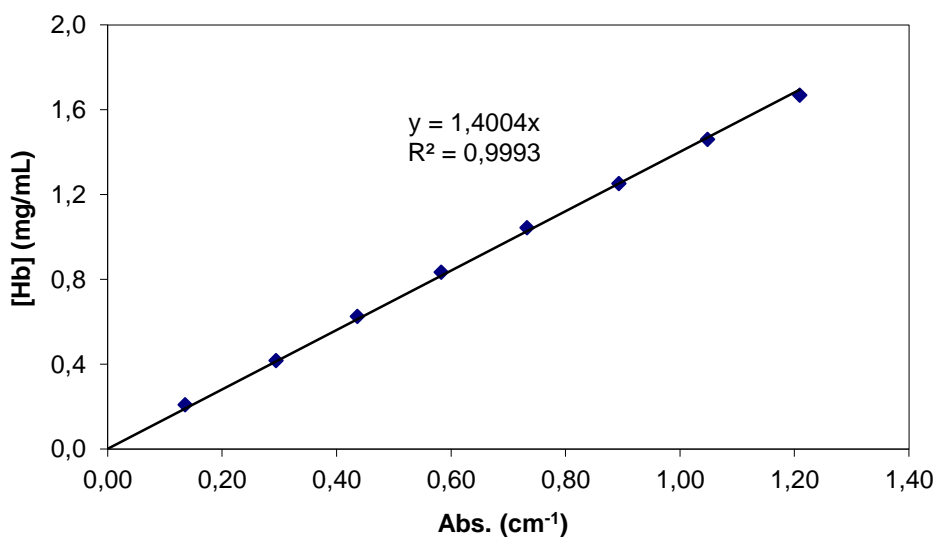


Figura M.1 Curva de calibração obtida, a partir da qual foi possível determinar os valores de concentração de Hb no sangue e plasma, após leitura das absorvâncias no espectrofotómetro.

- Determinação da concentração de hemoglobina ([Hb]) no sangue e no plasma

Concentração de Hb no plasma:

Para saber a concentração de Hb livre no plasma, começou-se por centrifugar 5 mL de sangue, a uma velocidade de 2100 rpm, pelo período de 5 a 15 minutos, de forma a permitir a sedimentação de todas as partículas em suspensão. Obteve-se um sobrenadante límpido (plasma). De seguida, diluiu-se 1 mL do plasma em 1 mL de solução de Drabkin modificada, e procedeu-se à leitura da absorvância a 540 nm (A_{540nm}). A concentração de Hb foi posteriormente calculada mediante a curva de calibração. Salientando que o fator de diluição é definido como o quociente entre o volume final (V_f) e o volume inicial (V_i). Repetiu-se o procedimento pelo menos três vezes, a fim de validar os valores obtidos. Obteve-se deste modo um valor para a concentração de Hb livre no plasma de 1,33 mg/mL, dentro do intervalo desejado.

Concentração de Hb no sangue:

Para saber a concentração de Hb total no sangue, diluiu-se 20 μ L de sangue em 5 mL de solução de Drabkin modificada, e mais uma vez se procedeu à leitura da absorvância, no mesmo comprimento de

onda. O cálculo foi mais uma vez feito mediante a curva de calibração, multiplicando pelo fator de diluição. O procedimento foi também executado três vezes. Obteve-se um valor de concentração de Hb no sangue de aproximadamente 110,6 mg/mL.

- Diluição do Sangue

Determinada a concentração de Hb inicial, foi necessário diluir o sangue de modo a obter a concentração de Hb pretendida ($10 \text{ mg/mL} \pm 1 \text{ mg/mL}$). Para tal, preparou-se uma solução de sangue por adição de $600 \mu\text{L}$ do mesmo a 5 mL de PBS. De seguida, da solução de sangue diluída retirou-se $400 \mu\text{L}$ e diluiu-se em 5 mL de solução de Drabkin, leu-se a A_{540nm} e calculou-se a concentração de Hb a partir da curva de calibração. Fez-se três réplicas. Obteve-se uma concentração de Hb no sangue de 10,3 mg/mL.

Tendo atingido a concentração desejada, procedeu-se à última etapa prática do teste, que consistiu no contacto entre a solução de sangue diluído e os materiais sintetizados.

3. Contacto do material com o sangue

O contacto do material pode ser feito direta ou indiretamente. Deste modo, pode-se concluir se a hemólise é provocada pelo contacto direto do material com o sangue, ou se é apenas provocada pela interação de substâncias que são libertadas pelo mesmo. Em ambos os contactos dois fatores são preponderantes: 1) concentração de Hb na solução sanguínea; 2) e quantidade de material em contacto.

Determinou-se assim o volume de solução sanguínea necessário para estabelecer o contacto com o material. A norma ASTM F 756-00, a partir da qual se estabeleceu todo o procedimento experimental executado, refere o uso de pelo menos 7 mL, equivalente a ter um material com 21 cm^2 de área superficial. Foi por isso necessário fazer um adesivo de cada produto com essa área. Posto isto, cortou-se o material em pedaços (de tamanho semelhante) e colocaram-se todos os pedaços em tubos de ensaio, juntamente com solução PBS, a 37°C , deixando-os estabilizar por um período de pelo menos 12h (contacto indireto).

Se o contacto for direto, os materiais são logo colocados em contacto com o sangue diluído, de modo a permitir uma interação entre estes durante 3h, numa incubadora a 37°C . Se o contacto for indireto, o sangue é adicionado aos materiais (que foram previamente incubados em PBS) e à solução de extração PBS. Neste trabalho, utilizou-se contacto indireto. De seguida, procedeu-se à transferência da solução dos tubos para outros tubos, centrifugando-se a mesma durante 15 minutos, a 2100 rpm. Posto isto, determinou-se a concentração de Hb na parte sobrenadante. Fez-se pelo menos três réplicas do ensaio, assim como foram realizados os controlos negativos (com a adição de sangue diluído ao PBS) e os controlos positivos (com a adição de sangue a água destilada). Estas etapas foram já devidamente explicadas na secção 3.3.9.1, no corpo do trabalho.

4. Cálculo da percentagem de hemólise provocada por cada material

O cálculo da percentagem de hemólise provocada por cada material foi feito de acordo com o que já foi também referido na secção 3.3.9.1. (equação 3.5).

Anexo N – Espectros de ATR-FTIR de reagentes utilizados

Neste Anexo apresentam-se os espectros de ATR-FTIR dos monómeros funcionais utilizados na modificação do PLA e fotoiniciador utilizado na fotopolimerização dos pré-polímeros modificados.

Na Tabela N.1 estão compiladas as bandas de absorção IV dos grupos químicos que interessa analisar e discutir, por observação dos espectros de ATR-FTIR apresentados na secção 4.1.3.

Tabela N.1 Bandas características de absorção IV dos grupos químicos a analisar nos espectros de ATR-FTIR

PRODUTOS: Ácido Láctico L(+) e PLA linear		Bandas características de absorção IV	
GRUPOS QUÍMICOS		Número de onda (cm ⁻¹)	Atribuição
Grupos OH	Álcoois	≈ 3650 ou 3400-3300	elongação
	Ácidos carboxílicos	3400-2400	elongação
Grupos éster (C=O)		1750-1735	elongação
PRODUTOS: Pré-polímeros modificados		Bandas características de absorção IV	
GRUPOS QUÍMICOS		Número de onda (cm ⁻¹)	Atribuição
Grupos isocianato livres (modificações com IEMA, LAR ou TMI)		≈ 2270	-
Grupos anidrido livres		≈ 1830 – 1800 1775 - 1740	-
C=C		1640 – 1610	-
C-N		1640 – 1500	elongação
N-H		1640 - 1500	deformação
Grupos uretana	Grupos NH ligados por pontes de hidrogénio	3500 – 3300/3180	elongação

Na Figura N.1 é possível observar os espectros do IEMA, MAA, LAR e TMI, identificando claramente os grupos químicos que os caracterizam. Para os monómeros IEMA, LAR e TMI salienta-se a banda típica dos grupos isocianato livre e a elongação da ligação C=O. Para o MAA, observam-se as bandas correspondentes às ligações anidrido. Na Figura N.2 ilustra-se o espectro do Ir 2959.

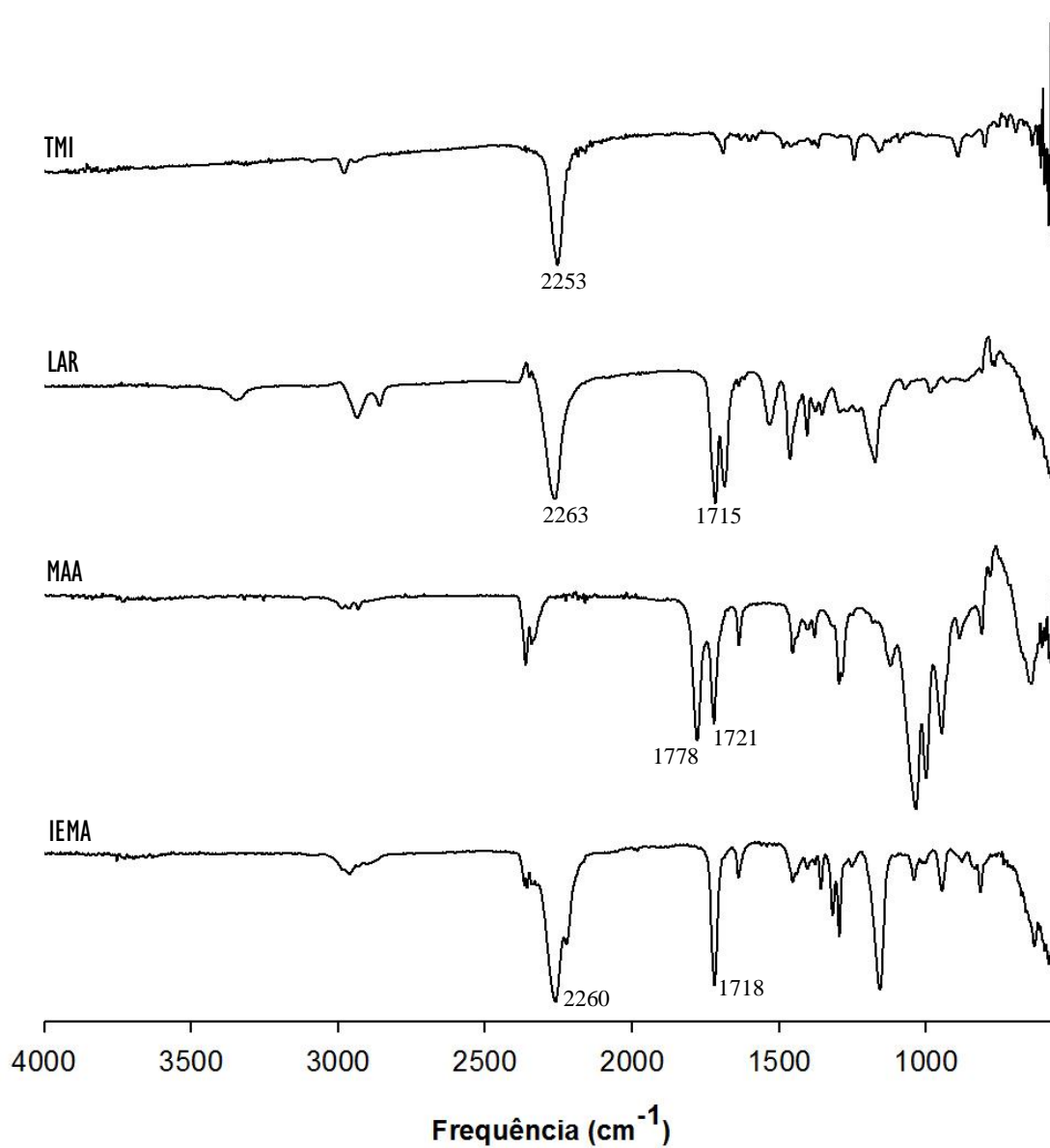


Figura N.1 Espectros de ATR-FTIR do IEMA, MAA, LAR e TMI.

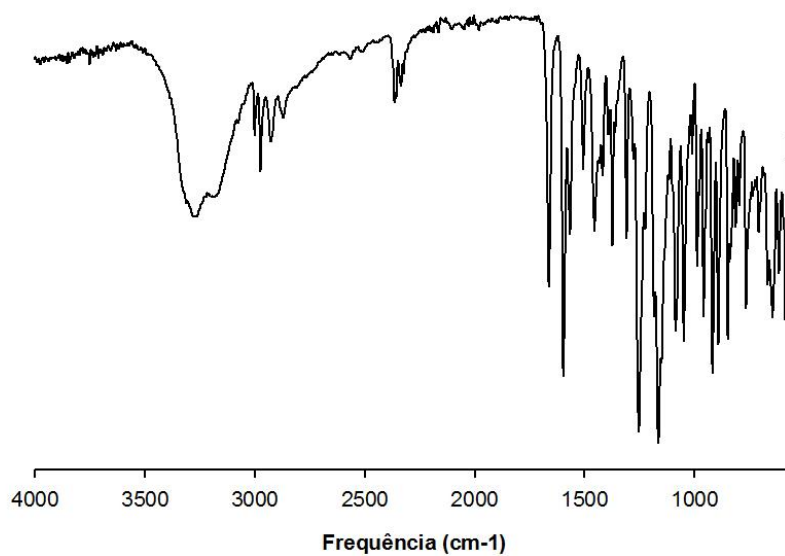


Figura N.2 Espectro de ATR-FTIR do Ir 2959.

Anexo 0 – Propriedades Térmicas (DSC e DMTA)

Neste Anexo são apresentados os traços de DSC que permitiram determinar os valores de T_g na Tabela 4.5 (secção 4.2.3.2.) para o pré-polímero (PLA), pré-polímeros modificados e membranas após reticulação fotoquímica. De seguida, são exibidos os traços de $\tan \delta$ para as diferentes membranas, em condições de multifrequência (1 e 10Hz), a fim de comprovar a correta identificação dos valores de T_g . Se a 1Hz o valor no pico de $\tan \delta$ for mesmo a T_g do material, este valor deverá ser superior a 10Hz, pois o pico vai sofrer um deslocamento com a frequência.

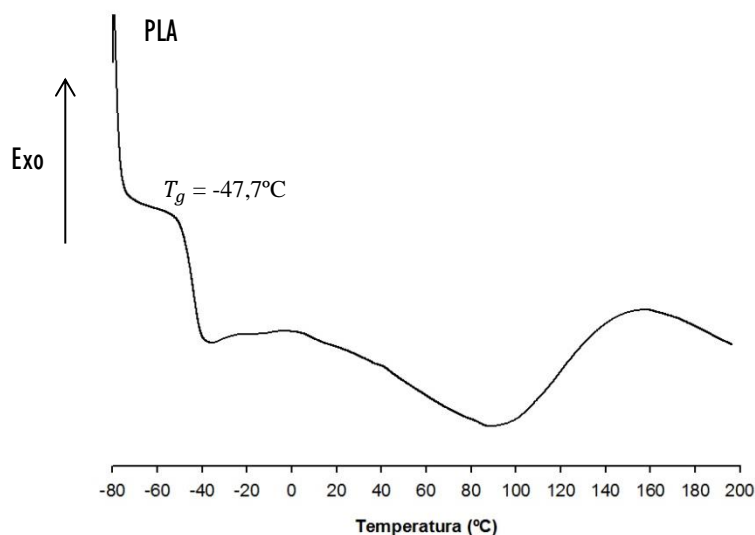


Figura 0.1 Curva DSC do PLA sintetizado ($M_w = 500 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$), com rampa de aquecimento de $10^\circ\text{C min}^{-1}$.

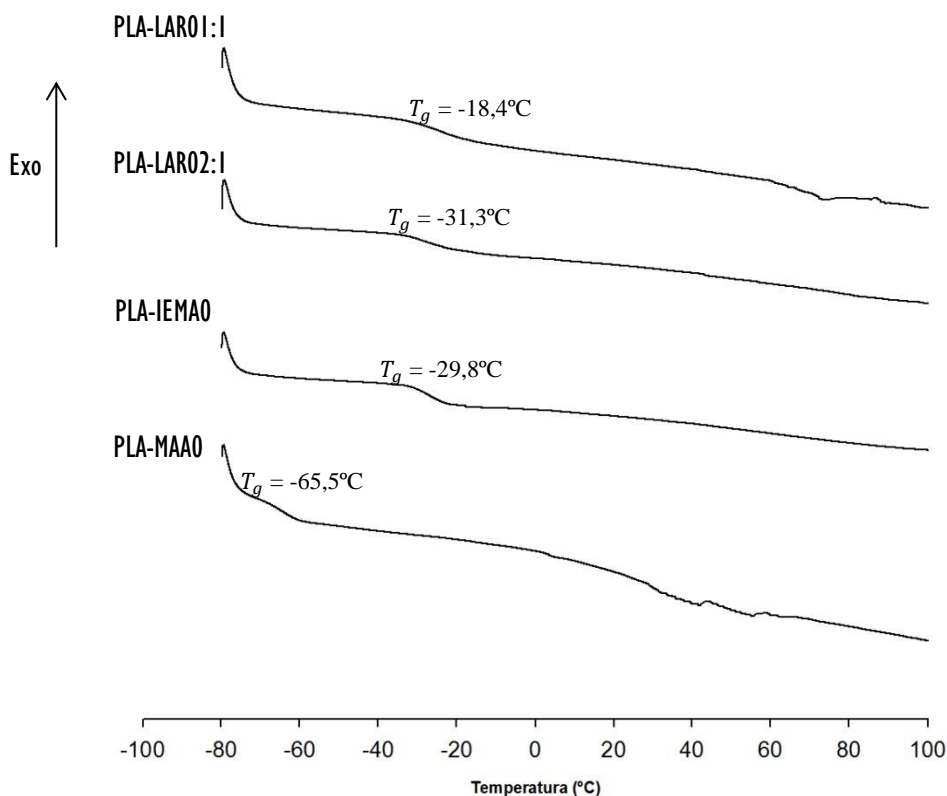


Figura 0.2 Curvas DSC dos pré-polímeros modificados (rampa de aquecimento de $10^\circ\text{C min}^{-1}$).

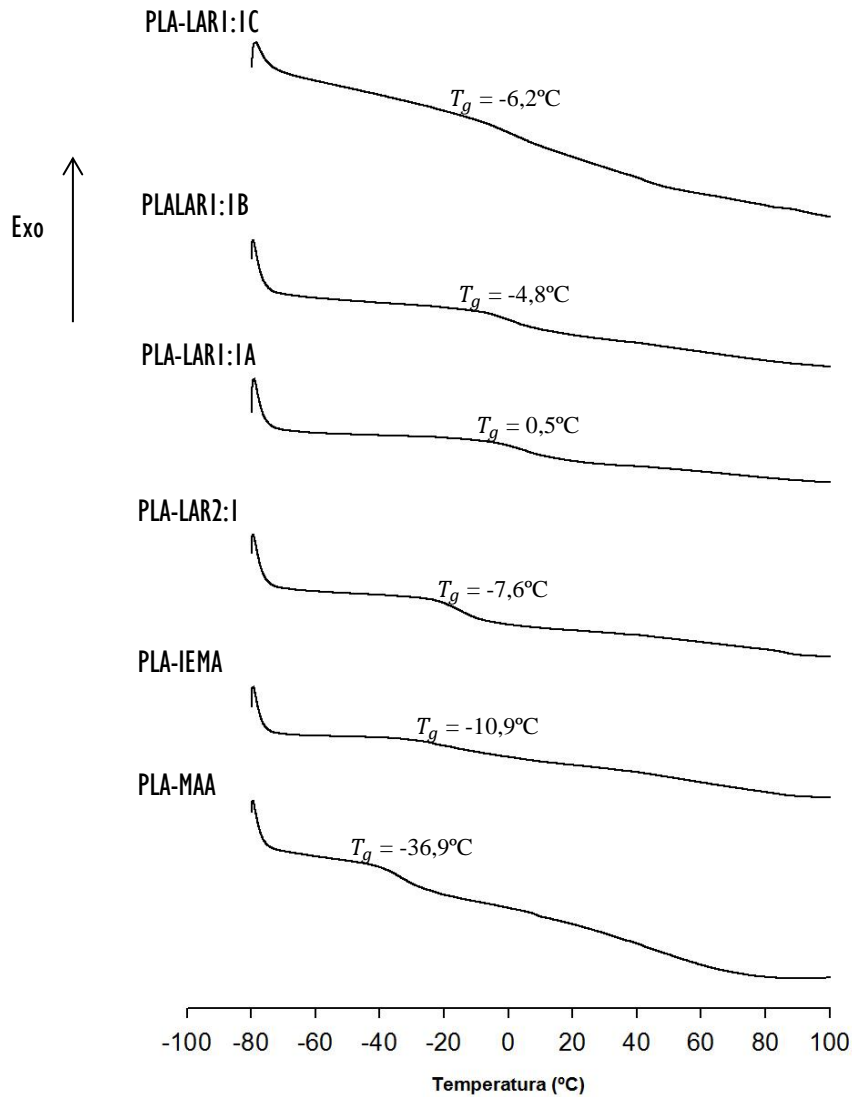


Figura 0.3 Curvas DSC das membranas sintetizadas, com rampa de aquecimento de $10^{\circ}\text{C min}^{-1}$

Os traços de DMTA em multifrequência encontram-se apenas representados na região da transição vítrea, de forma a observar-se o deslocamento do pico da $\tan \delta$ quando se aumentou a frequência para 10Hz.

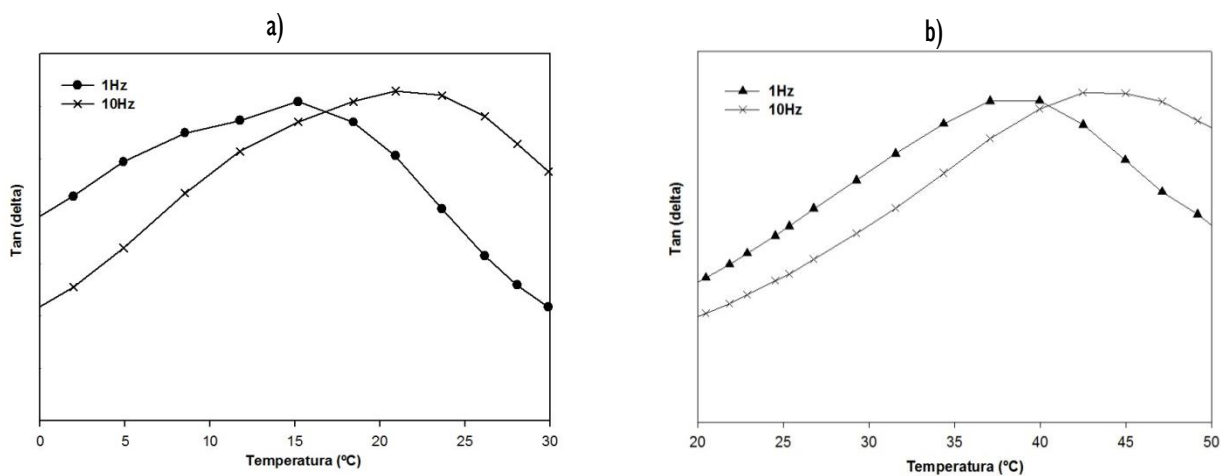


Figura 0.4 Traços de $\tan \delta$ em função da temperatura obtidos em multifrequência para: a) as membranas PLA-LAR2:1 e b) PLA-LAR1:1A – deslocamento do pico a 1Hz para 10Hz.

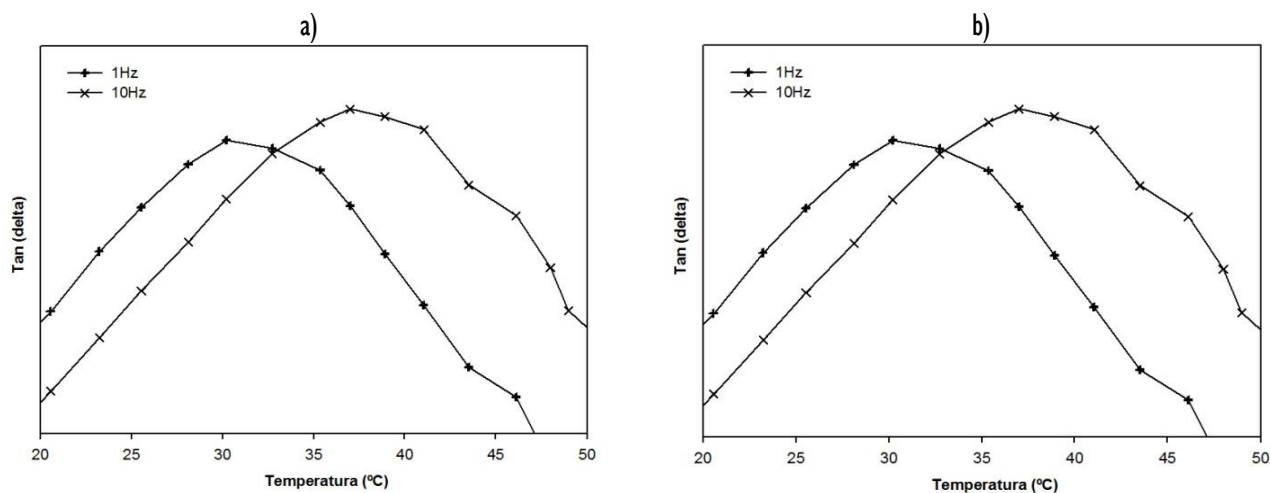


Figura 0.5 Traços de $\tan \delta$ em função da temperatura obtidos em multifrequência para: **a)** as membranas PLA-LAR1:B e **b)** PLA-LAR1:1C – deslocamento do pico a 1Hz para 10Hz.

Anexo P – Degradação hidrolítica em solução PBS

Apresenta-se neste anexo, Figura P.1, os resultados obtidos no estudo de degradação de adesivos com espessura de 2mm, a fim de perceber a influência da espessura nos perfis de degradação.

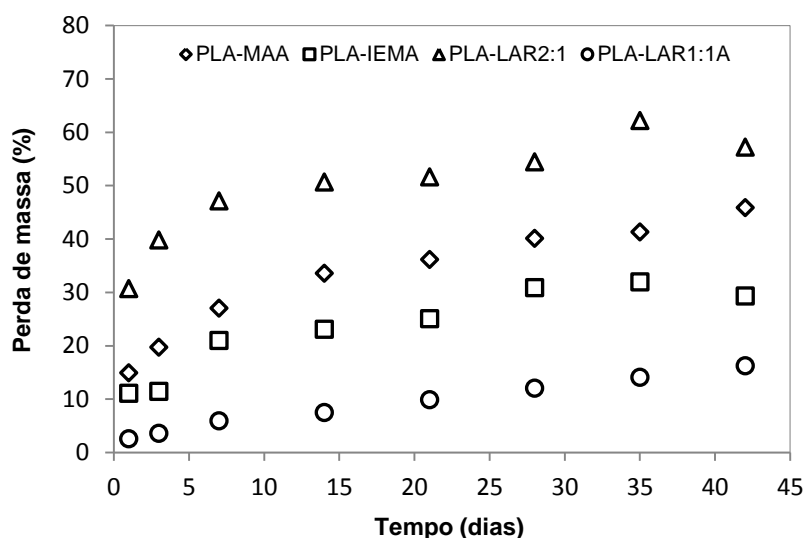


Figura P.1 Perda de massa dos adesivos PLA-MAA, PLA-IEMA, PLA-LAR2:1 e PLA-LAR1:1A, espessura de 2mm, por hidrólise, em solução PBS, a 37°C, durante 6 semanas.

Constata-se mais uma vez que a espessura do material não teve influência na taxa de degradação dos adesivos, sendo os perfis de degradação praticamente coincidentes aos obtidos para filmes de 1mm. Todavia, a degradação dos adesivos PLA-LAR1:1A e PLA-LAR2:1 foi mais lenta neste caso. Ambos os materiais apresentaram sinais de erosão de superfície, suspeitando-se que este seja o mecanismo dominante na degradação hidrolítica. Num processo de erosão de superfície, o desgaste do material ocorre do exterior para o interior [21]. Assim sendo, materiais com maior espessura terão uma taxa de degradação menor.

Anexo Q – Teste de adesão em folhas de gelatina (ensaios de tração)

Apresenta-se na Figura Q.1 uma ilustração das várias etapas do teste de adesão *in vitro* que conduziu aos resultados na Figura 4.18. Na Figura Q.2 pode-se observar um exemplo de separação das folhas de gelatina por descolagem (PLA-LAR2:1) e por rutura na folha de gelatina (PLA-LAR1:1A).

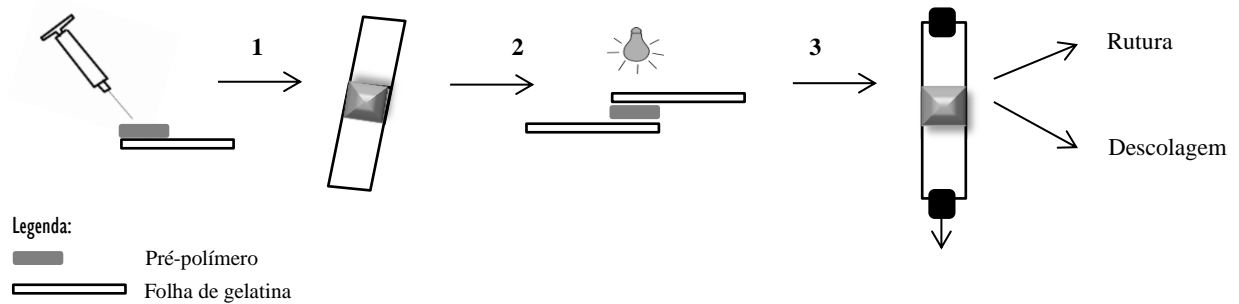


Figura Q.1 Esquema representativo das várias etapas do teste de adesão em folhas de gelatina: 1) Preparação de cada solução entre duas folhas de gelatina; 2) Fotopolimerização *in situ*; 3) Ensaio de tração, terminando com a separação das folhas por rutura ou descolagem.

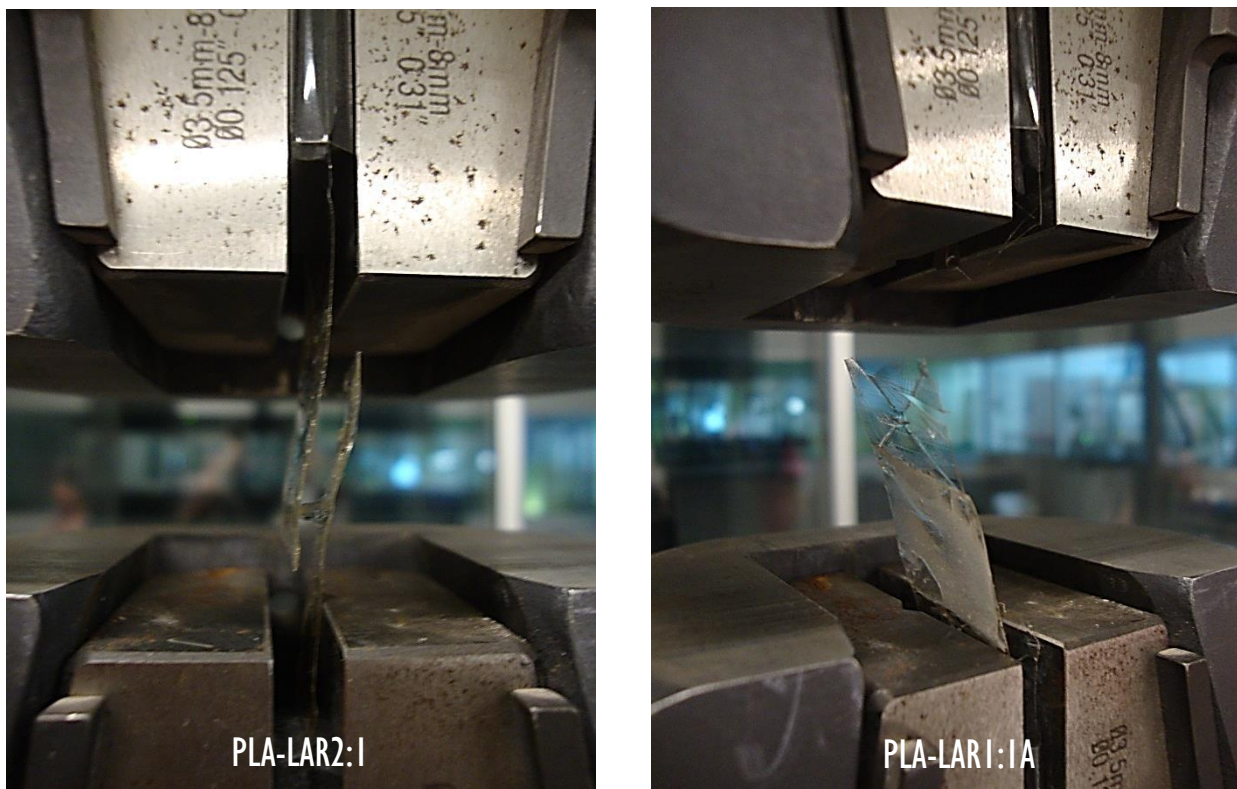


Figura Q.2 Fotografias dos ensaios de tração: **PLA-LAR2:1** – exemplo de separação por descolagem; **PLA-LAR1:1A** – exemplo de separação por rutura.

